

**Gefrierschutz bei Fischen der Polarmeere**

**Freezing resistance in Antarctic and  
Arctic fishes**

---

**Andreas P. A. Wöhrmann**

**Ber. Polarforsch. 119 (1993)  
ISSN 0176 - 5027**

Diese Arbeit möchte ich meinen Freunden Annette Barthelt und Daniel Reinschmidt widmen, die unter den Opfern des Bombenattentats am 18. März 1987 in Dschibuti waren. Sie befanden sich am Anfang ihrer wissenschaftlichen Laufbahn und wollten während einer Forschungsreise Proben für die Diplomarbeit gewinnen. Freundschaftlich und wissenschaftlich verband uns während des Hauptstudiums in Kiel die Begeisterung an der meeresbiologischen Forschung.

---

Andreas P. A. Wöhrmann

Institut für Polarökologie, Christian-Albrechts-Universität zu Kiel,  
Wischhofstraße 1-3, Geb. 12, W-2300 Kiel 14, Bundesrepublik Deutschland

Printed version of a Ph. D. Thesis of the mathematisch-naturwissenschaftliche Fakultät of the Christian-Albrechts-University of Kiel.

Druckfassung einer Dissertation für die mathematisch-naturwissenschaftliche Fakultät der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel.

## INHALTSVERZEICHNIS

Liste der Tabellen & Abbildungen .....	III
Abkürzungen .....	V
Zusammenfassung .....	VI
Summary .....	VIII
<b>EINLEITUNG .....</b>	<b>5</b>
Die Polarmeere und ihre Fischfauna.....	5
Gefrierschutz bei Fischen der Polarmeere .....	6
Fragestellung.....	11
<b>MATERIAL .....</b>	<b>13</b>
Biologisches Material - Probennahme.....	13
Chemikalien und sonstige Materialien.....	16
<b>METHODEN.....</b>	<b>17</b>
Isolierung der Gefrierschutzsubstanzen.....	17
Extraktion.....	17
Chromatographische Aufreinigung.....	18
Charakterisierung der Gefrierschutzsubstanzen .....	19
Chromatographische Analysen.....	19
Zuckeranalytik.....	19
Immunochemische Analysen .....	20
Elektrophoresen.....	21
Enzymatische Analysen.....	22
Chemische Analysen.....	23
Aminosäurenanalyse.....	24
Spektroskopische Analysen.....	25
Kalorimetrische Analysen .....	26
<b>ERGEBNISSE .....</b>	<b>29</b>
Der Antifreeze Glycoprotein (AFGP)-Gehalt .....	29
Der Rohextrakt der Gefrierschutzsubstanzen.....	29
Die AFGP-Fractionen .....	30
Die AFGP-Struktur.....	35
Zuckerzusammenstzung und -struktur der Glycoproteine.....	35
Sekundärstruktur der Gefrierschutzglycoproteine.....	38
Die AFGP-Funktion.....	39
Die Gefrierschutzaktivität.....	39
Der Sonderfall <i>Pleuragramma antarcticum</i> .....	43
Der AFGP-Gehalt in Abhängigkeit vom Alter des Fisches .....	43
Das N-Acetylglucosamin enthaltende Glycoprotein.....	47

Die Schritte der Isolierung .....	47
Die Bestimmung der terminalen Zucker .....	49
Die Zuckerzusammensetzung des PAGP.....	51
Die Bindung des Kohlenhydratanteils an eine Aminosäure.....	52
SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	53
Die Bestimmung des Molekulargewichts .....	54
Die Primärstruktur des PAGP.....	55
Die Sekundärstruktur des PAGP.....	56
Die Gefrierschutzaktivität des PAGP.....	57
<b>DISKUSSION.....</b>	<b>62</b>
<b>Die Gefrierschutzsubstanzen polarer Fische.....</b>	<b>62</b>
<i>Die Menge und Zusammensetzung der Gefrierschutzglycoproteine hängt mit der Lebensweise des Fisches zusammen.</i> .....	62
<i>Lepidonotothen kempfi aus dem Lasarewmeer zeigt eine außergewöhnliche Glycoproteinzusammensetzung</i> .....	65
<i>Bathyrdraco marri gibt bezüglich seines geringen AFGP-Gehalts Rätsel auf.</i> .....	66
<i>Der antarktische Silberfisch Pleuragramma antarcticum variiert seine AFGP-Mengen im Verlauf eines Lebens.</i> .....	67
<i>Arctogadus glacialis besitzt im Sommer große Mengen von AFGP ähnlich wie der Channichthyide Chaenodraco wilsoni.</i> .....	68
<i>Vertreter der Familie Liparididae der Arktis und der Antarktis synthetisieren Gefrierschutzsubstanzen.</i> .....	69
<b>Der Mechanismus der Gefrierschutzsubstanzen polarer Fische .....</b>	<b>70</b>
<i>Das AFGP von Pleuragramma antarcticum arbeitet effektiver als das anderer Notothenioidei</i> .....	70
<b>Das Pleuragramma - Antifreeze Glycoprotein (PAGP).....</b>	<b>72</b>
<i>Das PAGP ist hoch glycosiliert und zeigt eine aus dem Cytoplasma bekannte Kohlenhydrat-Aminosäuren Bindung</i> .....	72
<i>Das Protein setzt sich nur aus wenigen Aminosäuren zusammen und seine Sekundärstruktur ist dominiert durch das <math>\beta</math>-Faltblatt.</i> .....	73
<i>Die Gefrierschutzaktivität des PAGP erinnert an die der Thermal Hysterese Proteine von überwinternden Insekten.</i> .....	76
<b>Betrachtungen zur Evolution polarer Fische und deren Gefrierschutzsubstanzen .....</b>	<b>80</b>
<i>Die Gefrierschutzsubstanzen polarer Fische könnten sich aus einem "Ur-Gefrierschutzprotein" entwickelt haben.</i> .....	80
<i>Die Gefrierschutzsubstanzen polarer Fische zeigen eine erstaunlich hohe Diversität und sind in phylogenetisch weit entfernten Fischtaxa verbreitet.</i> .....	81
<i>Die Phylogenese der Teleosteer polarer Meere wurde in starkem Maße beeinflusst durch die Vereisungsperiodik auf der Nord- und Südhalbkugel.</i> .....	83
<b>Abschließende Bemerkungen und Ausblick.....</b>	<b>85</b>
<b>LITERATUR.....</b>	<b>87</b>
<b>Danksagung .....</b>	<b>99</b>

**LISTE DER TABELLEN**

Tab. 1	Untersuchte Arten.....	15
Tab. 2	Gefrierschutz-Rohextrakte der untersuchten Arten.....	30
Tab. 3	Gefrierschutzfraktionen der untersuchten Arten.....	34
Tab. 4	Bruttozusammensetzung der Monosaccharide des AFGP.....	37
Tab. 5	Gefrierschutz-Rohextrakte von <i>Pleuragramma antarcticum</i> .....	45
Tab. 6	Aminosäurezusammensetzung des PAGP.....	56
Tab. 7	Thermale Hysteresen ausgewählter Gefrierschutzsubstanzen.....	60
Tab. 8	Gefrierschutzsubstanzen bei Fischen der Polarmeere.....	64

**LISTE DER ABBILDUNGEN**

Abb. 1	Gefrierpunktserniedrigende Substanzen im Fischblut.....	7
Abb. 2	Modell der Sekundärstruktur des AFGP.....	11
Abb. 3	Untersuchungsgebiet während ANT VII/4 und ANT IX/3.....	13
Abb. 4	Untersuchungsgebiet während ARK VII/2.....	14
Abb. 5	Schema des Differential Scanning Calorimeter (DSC).....	26
Abb. 6	Kalibrierung des DSC mit Wasser.....	27
Abb. 7a-e	DEAE-Anionenaustauscherchromatographie der Rohextrakte.....	32
Abb. 8	Dot Blot verschiedener Gefrierschutzsubstanzen, inkubiert mit den Lektinen PNA, WGA und SNA.....	35
Abb. 9	HPAEC-Chromatogramm der TFA-Hydrolyse des AFGP von <i>Chionodraco myersi</i> .....	36
Abb. 10	HPAEC-Chromatogramm des O-Glycosidase Verdau des AFGP von <i>C. myersi</i> .....	38
Abb. 11	CD Spektrum des AFGP von <i>Racovitzia glacialis</i> .....	39
Abb. 12	DSC des AFGP 1-4 von <i>Dissostichus mawsoni</i> .....	40
Abb. 13	DSC des AFGP 5-8 von <i>D. mawsoni</i> .....	41
Abb. 14	DSC des AFGP von <i>Cryodraco antarcticus</i> .....	42
Abb. 15	DSC des AFGP von <i>Lepidonotothen kempfi</i> .....	42
Abb. 16	Anionenaustauscherchromatographie des Rohextrakts von <i>P. antarcticum</i> .....	44
Abb. 17	DSC des AFGP von <i>P. antarcticum</i> .....	46
Abb. 18	Ionenaustauscherchromatographie (Mono Q) des PAGP.....	47
Abb. 19	Reversed Phase HPLC (RP C4) des PAGP.....	48
Abb. 20	Re-Chromatographie (RP C18) des PAGP.....	49
Abb. 21	Dot Blot des AFGP und PAGP von <i>P. antarcticum</i> .....	50
Abb. 22	Dot Blot mit Glycosyltransferasen des AFGP und PAGP.....	50
Abb. 23	HPAEC-Chromatogramm der TFA-Hydrolyse des PAGP.....	51

## Abbildungen

---

Abb. 24	HPAEC-Chromatogramm der $\beta$ -Elimination des PAGP.....	52
Abb. 25	SDS-Gelelektrophorese des AFGP und PAGP .....	53
Abb. 26	Gelfiltration (Superdex™ 75) des PAGP .....	54
Abb. 27	CD Spektrum des PAGP.....	57
Abb. 28	DSC des PAGP.....	58
Abb. 29	DSC des PAGP & AFGP .....	59
Abb. 30	Hypothetische Primärstruktur des PAGP .....	74
Abb. 31	Sekundärstruktur des PAGP in Abhängigkeit der Proteinkonzentration.....	75
Abb. 32	Rekonstruktion der Sekundärstruktur des PAGP .....	76
Abb. 33	Gefrierpunkte in Abhängigkeit der Proteinkonzentration.....	78
Abb. 34	Thermale Hysterese in Abhängigkeit vom Eisgehalt in der Probe.....	79
Abb. 35	Phylogenetische Beziehungen recenter Fischordnungen mit Gefrierschutzsubstanzen.....	82

**ABKÜRZUNGEN**

AFGP	Antifreeze Glycoprotein
AFP	Antifreeze Protein
BSA	Bovine Serum Albumin = Rinderserumalbumin
CD	Circular Dichroism = Zirkulardichroismus
CMP-NANA	Cytidin-5'-Phosphat-N-Acetylneuraminsäure
CPY	Carboxypeptidase Y
DEAE	Diethylaminoethan
DMAB	p-Dimethylaminoaldehyd
<Dig>Fab-AP	polyclonaler Schaf anti-digoxigeniertes Fab-Fragment, konjugiert mit alkalischer Phosphatase
DSA	Lektin, <i>Datura stramonium agglutinin</i>
DSC	Differential Scanning Calorimetry
Gal	Galaktose
GalNAc	N-Acetylgalactosamin
Glc	Glucose
GlcNAc	N-Acetylglucosamin
HPAEC-PAD	High-Performance-Anion-Exchange-Chromatography with Pulsed Amperometric Detection
HPLC	High-Performance-Liquid-Chromatography
IEF	Isoelektrische Fokussierung
Man	Mannose
NaAc	Natriumacetat
NANA	N-Acetylneuraminsäure (Sialinsäure)
NBT	Nitroblau Tetrazolium Chlorid
PITC	Phenylisothiocyanat
PAGP	<i>Pleuragramma</i> -Antifreeze Glycoprotein
PNA	Lektin, <i>Peanut agglutinin</i>
SDS-PAGE	Sodium Dodecylsulfat-Polyacrylamid Gel Electrophorese
SNA	Lektin, <i>Sambucus nigra agglutinin</i>
TCA	Trichloressigsäure
TFA	Trifluoressigsäure
UDP-Gal	Uridin-5'-diphospho-[H <sup>3</sup> ]Galactose
WGA	Lektin, <i>Wheat germ agglutinin</i>
X-Phosphat	5-bromo-4-chloro-3-indolyl Phosphat, 4-toluidine Salz

## ZUSAMMENFASSUNG

Da das Blut mariner Fische gegenüber Seewasser hyposmotisch ist, verwundert es, daß Fische in den polaren Meeren nahe dem Gefrierpunkt des Seewassers überleben können. Bei vielen Notothenioidei der Antarktis konnte ein "Antifreeze Glycoprotein" (AFGP) isoliert werden, welches aus Polymeren von  $H_2N[Ala-Ala(\beta\text{-galactosyl}(1\rightarrow3)\alpha\text{-N-Acetylgalactosamin})Thr]_n Ala-Ala-COOH$  aufgebaut ist und in acht verschiedenen Größen vorkommt. Dieses Glycoprotein dient auch den Gadiden der Arktis als Gefrierschutz, während Vertreter der Zoarcidae, Cottidae und Pleuronectidae nicht-glycosylierte Gefrierschutzproteine (AFP) synthetisieren.

Für die vorliegende Untersuchung wurden während zweier Antarktis-Expeditionen in das Weddellmeer (EPOS 3, 1989) und das Lasarewmeer (SWW 3, 1991), sowie einer Arktis-Expedition in die Grönland See (Ark VII/2, 1990) 229 Fische aus 5 Ordnungen (36 Arten) ausgewählt und auf Gefrierschutzsubstanzen hin untersucht. Die Probennahme erfolgte in jedem Fall im Sommer. Der Schwerpunkt lag auf Arten der antarktischen Unterordnung Notothenioidei (Perciformes). Die Gefrierschutzsubstanzen wurden aus den Ganzfischen bzw. Geweben extrahiert und mit verschiedenen Methoden der Ionenaustauscher-, Adsorptions-, Affinitäts- und Reversed Phase-Chromatographie gereinigt. Ihre Zuckerszusammensetzung und -struktur sowie Aminosäurezusammensetzung, Sekundärstruktur und Gefrierschutzeigenschaften wurden untersucht.

Von den untersuchten Arten besitzen alle Notothenioidei und der arktische Gadide *Arctogadus glacialis* AFGP. Die AFGP-Menge variiert zwischen 0.28 g/kg Frischgewicht (FRG) bei *Bathyrdraco marri* und 3.34 g AFGP/kg FRG bei *Trematomus pennellii*. Die Notothenioiden *B. marri*, *Lepidonotothen kempii* und *Dolloidraco longedorsalis* besitzen darüberhinaus noch weitere Gefrierschutzsubstanzen, die aber nicht näher charakterisiert werden konnten. Bei zwei Vertretern der Liparididae der Arktis (*Liparis fabricii*: 0.11 g/kg FRG) und der Antarktis (*Paraliparis somovi*: 0.10 g/kg FRG) konnten Gefrierschutzproteine nachgewiesen werden. Erstmals konnten auch Gefrierschutzsubstanzen aus antarktischen Arten der Gadiformes (*Muraenolepis marmoratus*: 0.076 g/kg FRG; *Macrourus holotrachys*: 0.031 g/kg FRG), der Scorpaeniformes (*Lycenchelys hureaui*: 0.041 g/kg FRG) und der Myctophiformes (*Gymnoscopelus opisthopterus*: 0.070 g/kg FRG) isoliert werden. Die arktischen Cottiden *Icelus bicornis* und *Triglops nybelini* synthetisieren zumindest im Sommer keinen Gefrierschutz.

Die thermale Hysterese, d. h. die Gefrierschutzaktivität, wurde mit der "Differential Scanning Calorimetry" (DSC) bestimmt. Bei AFGP-Konzentrationen von 20 mg/ml konnten maximale Hysteresen von 0.65°C bei *L. kempii* bis 1.20°C bei *Pleuragramma antarcticum* festgestellt werden. Bei der überwiegenden Mehrheit der notothenioiden Arten liegt sie bei 0.9°C. Die neu entdeckten Gefrierschutzsubstanzen aus *L. kempii*, *D. longedorsalis* und *B. marri* bewirken ebenfalls eine deutliche Hysterese zwischen 0.4° und 0.8°C (50 mg/ml). Die thermale Hysterese der Gefrierschutzproteine von nicht-notothenioiden Fischen liegt zwischen 0.1°C (50 mg/ml) bei *L. hureaui*, *M. holotrachys* und *G. opisthopterus* und 0.5°C (50 mg/ml) bei *P. somovi* und *M.*



*marmoratus*. Untersuchungen zum Zirkulardichroismus und Gefrierungsprozess zeigen, daß es sich bei dem AFGP der Notothenioidei in allen Fällen um eine expandierte  $\alpha$ -Helix handeln muß.

Am Beispiel des antarktischen Silberfisch *P. antarcticum* konnte erstmalig gezeigt werden, daß sich die AFGP-Konzentrationen im Laufe eines Lebens verändern. Die Synthese verläuft damit nicht wie bislang angenommen kontinuierlich, sondern wird vermutlich über die Wassertemperatur gesteuert. Darüberhinaus konnte ein neuartiges Glycoprotein isoliert und charakterisiert werden. Dieses Glycoprotein ist aus den Aminosäuren Serin (461 nMol/mg), Histidin (141 nMol/mg) und Arginin (29 nMol/mg) und zu geringen Teilen noch Tyrosin und Glycin aufgebaut und mit dem Zucker N-Acetylglucosamin (GlcNAc) hoch glycosiliert (150  $\mu$ g/mg Glycoprotein). Wie chemische und enzymatische Tests beweisen, ist das GlcNAc als Disaccharid O-glycosidisch an Serin gebunden. Das Spektrum des Zirkulardichroismus ergibt Anteile der Sekundärstruktur von 56%  $\beta$ -Konformation, 19%  $\alpha$ -Helix und 25% restliche Strukturen.

Dieses 'Pleuragramma-Antifreeze Glycoprotein' (PAGP) zeigt außergewöhnliche Gefrierschutzeigenschaften. Bei einer Konzentration von 50 mg/ml konnte eine maximale Hysterese von 3.4°C gemessen werden. Die Hysterese nimmt sowohl mit zunehmendem Eisgehalt in der Probe, als auch mit fallender Proteinkonzentration stark ab. Ein Eiskristallwachstum wird, anders als bei dem AFGP, während der ersten Abkühlungsphase völlig unterdrückt. Diese Hysterese-Eigenschaften waren bislang nur von der Hämolymphe überwinterner Insekten bekannt, und könnten auf die Aminosäure Histidin zurückzuführen sein, die beiden Proteinen gemeinsam ist. Eine Rekonstruktion der Sekundärstruktur deutet darauf hin, daß das PAGP ähnlich wie das AFGP sehr expandiert ist, die Disaccharide auf einer Ebene liegen, und Eiskristalle bzw. Wassermoleküle über Wasserstoffbrücken gebunden werden können.

Die Isolierung und Charakterisierung des PAGP hat gezeigt, daß das AFGP nicht das einzige Glycoprotein ist, welches eine thermale Hysterese auslöst. Außerdem zeigt der Mechanismus der Gefrierpunktniedrigung einen neuen Weg zur Verhinderung der Eisbildung in einem Organismus auf. Aus allen hier untersuchten Teleostei konnten Gefrierschutzsubstanzen isoliert werden. Auch Arten, die nicht mit sehr kaltem Wasser oder sogar Eis in Kontakt kommen, besitzen Gefrierschutzsubstanzen. Diese Substanzen sind demnach viel weiter verbreitet als bislang angenommen, was wiederum Konsequenzen für die Entstehungsgeschichte hat. Die AFGP-Konzentrationen zeigen einen Zusammenhang mit der Lebensweise der Art. Fische, die Gefahr laufen, mit Eis in Berührung zu kommen, besitzen mehr AFGP als Arten, die in tieferem oder wärmerem Wasser vorkommen. Wie die vorliegende Untersuchung zeigt, besitzen vermutlich alle Notothenioidei AFGP. Der Nachweis von sehr ähnlich gebauten und auf dem selben Mechanismus beruhenden Gefrierschutzsubstanzen aus phylogenetisch wenig verwandten Taxa veranlaßt zu der Annahme, daß es vor der Trennung der Kontinente Fische mit einem "Ur"-Gefrierschutzprotein gegeben haben muß, und daß bei einigen Arten der Gefrierschutz als Relikt vergangener Eiszeiten gewertet werden kann.

## SUMMARY

The blood of marine teleosts is hypo-osmotic to seawater. The colligative effect of the solutes in seawater depresses its freezing point down to  $-1.9^{\circ}\text{C}$ , whereas a typical teleost serum will freeze at  $-0.7^{\circ}\text{C}$ . In the blood of many Antarctic notothenioids, freezing is inhibited by antifreeze glycoprotein macromolecules (AFGP). These antifreeze molecules are built up of repeating tripeptide units  $(\text{Ala-Ala-Thr})_n$ , to which the disaccharide  $\beta\text{-D-galactosyl-(1}\rightarrow\text{3)}\alpha\text{-N-acetyl-D-galactosamine}$  is linked through the hydroxyl oxygen of the threonyl residue. The AFGP is also synthesised by the gadids of the Arctic, whereas species of Zoarcidae, Cottidae and Pleuronectidae synthesise only unglycosylated antifreeze proteins (AFP).

The samples were taken during two Antarctic expeditions in the Weddell Sea (EPOS leg 3, 1989) and the Lazarev Sea (SWW leg 3, 1991), and one Arctic expedition in the Greenland Sea (ARK VII leg 2, 1991). The samples were always collected in summer. Two hundred and twenty nine fishes of five orders (36 species) were investigated for antifreeze macromolecules. Species of the Antarctic notothenioids (Perciformes) were investigated preferentially. The antifreeze macromolecules were extracted from both whole fish and specific tissues and were isolated with various types of liquid chromatography such as ion exchange-, affinity-, adsorption-, and high-performance reversed-phase chromatography (HPLC). The carbohydrate composition, carbohydrate structure, amino acid sequence, protein conformation, and freezing point depression were determined for each protein.

All investigated notothenioids as well as the Arctic gadid *Arctogadus glacialis* were found to contain AFGP. The concentration of AFGP ranges between 0.28 g/kg fresh weight (FW) by *Bathyraco marri* and 3.34 g/kg FW by *Trematomus pennellii*. The notothenioids *B. marri*, *Lepidonotothen kempfi* and *Dolloidraco longedorsalis* contain not only AFGP but also other antifreeze macromolecules. Arctic (*Liparis fabricii*: 0.11 g/kg FW) and Antarctic liparidids (*Paraliparis somovi*: 0.10 g/kg FW) synthesise only AFP. For the first time, antifreeze proteins were isolated from species of Antarctic Gadiformes (*Muraenolepis marmoratus*: 0.076 g/kg FW; *Macrourus holotrachys*: 0.031 g/kg FW), Scorpaeniformes (*Lycenchelys hureaui*: 0.041 g/kg FW) and Myctophiformes (*Gymnoscopelus opisthopterus*: 0.070 g/kg FW). The Arctic cottids *Icelus bicornis* and *Triglops nybelini* though, contain no antifreeze macromolecules.

The thermal hysteresis (antifreeze activity) was measured by differential scanning calorimetry (DSC). At AFGP concentrations of 20 mg/ml, maximal hysteresis varies between  $0.65^{\circ}\text{C}$  in *L. kempfi* and  $1.20^{\circ}\text{C}$  in *P. antarcticum*. In most cases the antifreeze activity of AFGP is around  $0.9^{\circ}\text{C}$ . The novel antifreeze macromolecules in *L. kempfi*, *D. longedorsalis* and *B. marri* exhibit an antifreeze activity between  $0.4^{\circ}$  and  $0.8^{\circ}\text{C}$  (50 mg/ml). The thermal hysteresis of AFP of non-notothenioid fishes varies between  $0.1^{\circ}\text{C}$  (50 mg/ml) by *L. hureaui*, *M. holotrachys* and *G. opisthopterus* and  $0.54^{\circ}\text{C}$  (50 mg/ml) by *P. somovi* and *M. marmoratus*. Investigation of the circular dichroism and of the freezing point depression would lead to the conclusion that AFGP is an expanded left-handed helical structure.

It could be demonstrated for the Antarctic silverfish *P. antarcticum* that the synthesis of AFGP is not constitutive but rather regulated by the water temperature. Juvenile fish, living in the warmer deep water (-0.5°C), contain little of AFGP, whereas adult fish, living in the supercooled shelf water (< -2.0°C), synthesise greater quantities of AFGP. Moreover a novel glycoprotein comprised of the carbohydrate residue N-acetylglucosamine (GlcNAc; 150 µg/mg glycoprotein) and the amino acids serine (461 nMol/mg), histidine (141 nMol/mg), arginine (29 nMol/mg), and traces of tyrosine and glycine was isolated and characterised from *P. antarcticum*. Chemical and enzymatic studies show the disaccharide GlcNAc-GlcNAc O-linked to serine. Secondary structure predictions using circular dichroism, indicate the partial presence of  $\beta$  structure (56%),  $\alpha$  helix (19%) and random coil (25%).

This 'Pleuragramma-antifreeze glycoprotein' (PAGP) shows extraordinary thermal hysteretic effects. At concentrations of 50 mg/ml a maximal hysteresis of 3.4°C was measured. The hysteresis decreases with increasing amounts of ice in the sample and decreasing protein concentration. In contrast to AFGP, the ice crystal growth of PAGP is completely stopped during first time of cooling. Until now, such attributes were known to be exhibited only by the hemolymph of overwintering insects like *Tenebrio molitor*. This mechanism of depressing the freezing point can be due to the fact that both proteins contain large amounts of the amino acid histidine. A reconstruction of secondary structure indicates that PAGP resembles the structure of AFGP, and suggests that PAGP binds to the ice crystal surfaces by hydrogen bond formation between the disaccharide and the oxygen atoms on the ice crystal surface.

The isolation and characterisation of the PAGP has shown, that AFGP is not the only glycoprotein which produces a thermal hysteretic effect. Also the mechanism of the freezing point depression shows a new way for the protection against freezing. Antifreeze macromolecules were isolated from all teleosts investigated here, but species which live in warmer water have also been found to contain antifreeze proteins. There is, however, a correlation between the AFGP concentration and the mode of life of the species. Fish living in ice-laden water contain much more AFGP than species living in warmer and/or deeper water. However, it seems that all Antarctic notothenioids contain AFGP. Surprisingly, antifreeze molecules are not specific to a given taxa, as was previously thought, but are found throughout the phylogenetic tree of fish even between highly dissimilar taxa. The conclusion to be drawn is that before the continental drift occurred a precursor protein to the present antifreeze proteins existed, which has evolved into the various antifreeze proteins to be found today.



## EINLEITUNG

### Die Polarmeere und ihre Fischfauna

#### *Palaeogeographie und Hydrographie der Polarmeere.*

Die Ozeane der Arktis und Antarktis unterscheiden sich bezüglich ihrer Entstehungsgeschichte grundlegend. Ursprünglich war die Antarktis neben Südafrika, Südamerika, Indien und Australien Teil des Urkontinents Gondwana. Mit ausgehendem Mesozoikum, vor etwa 120 Mio. Jahren, brach dieser Urkontinent auseinander, die Antarktisplatte driftete südwärts bis in ihre heutige Lage und kühlte in mehreren Phasen ab (KENNETT 1977). Die letzte Verbindung zum alten Kontinent brach im Oligozän vor 28 - 23 Mio. Jahren auf (ELLIOT 1985), die Drake Passage entstand und damit der zirkumantarktische Ringozean. Seit dieser Zeit ist die Antarktis kalt und isoliert (HEDGPETH 1977). Anders verlief die Entwicklung des arktischen Ozeans. Das Alter des arktischen Ökosystems ist weitaus geringer. Der Ozean ist nicht isoliert, sondern erhält ständigen Austausch mit Wassermassen aus dem Atlantik. Außerdem besteht eine Anbindung arktischer Schelfe an boreale Schelfgebiete.

Da ein Großteil des bearbeiteten Materials aus den hochantarktischen Bereichen des Weddellmeers und des Lasarewmeeres stammt, soll kurz etwas näher auf diese Meeresgebiete eingegangen werden. Die Hydrographie des antarktischen Ozeans zeichnet sich durch die am Kontinent entlangführende Ostwinddrift, die im Weddellmeer in den Weddellwirbel mündet, und die davon nördlich verlaufende Westwinddrift aus. Für die ektothermen Fische ist neben dem Sauerstoffgehalt vor allem die Temperatur des umgebenden Wassers von Bedeutung. Das Antarktische Bodenwasser füllt das zentrale Becken des Weddellmeeres. In Tiefen ab  $\approx 2000$  m werden Temperaturen um  $-0.5^{\circ}\text{C}$  gemessen (BRENNECKE 1921). Der größte Teil des zentralen Weddellmeeres wird durch das warme Tiefenwasser gebildet. In Tiefen zwischen 500 - 1000 m reichen die Temperaturen am Kontinentalabhang bis hin zu  $+0.5^{\circ}\text{C}$  (FAHRBACH *et al.* 1987; SEABROOKE *et al.* 1971). Auf dem Schelf des Weddellmeeres können wir das östliche- und westliche Schelfwasser sowie das Eisschelfwasser unterscheiden. Während die Temperaturen auf dem flachen Schelf konstant unter  $-1.8^{\circ}\text{C}$  liegen, erreichen sie an der Oberfläche im Sommer  $+0.4^{\circ}\text{C}$  (CARMACK & FOSTER 1975, 1977). In einer Tiefe zwischen 500 - 600 m an der Kontinentalkante bildet sich eine Grenzschicht zwischen dem warmen Tiefenwasser und dem kaltem Schelfwasser. Die Temperaturen schwanken zwischen  $-1.8^{\circ}$  und  $+0.5^{\circ}\text{C}$  räumlich und zeitlich (ARNTZ *et al.* 1992). Damit unterliegen die Temperaturen der fischreichsten Zone des Weddellmeers größeren Schwankungen, als sie LITTLEPAGE (1965) für das Rossmeer feststellte ( $-1.81^{\circ}\text{C} \pm 0.08^{\circ}\text{C}$ ).

#### *Entstehung und Zusammensetzung der Fischfaunen.*

Für ein Überleben polarer Fische nahe dem Gefrierpunkt waren verschiedene Entwicklungen auf biochemischer und physiologischer Ebene Voraussetzung. Die mehr als 20 Mio. Jahre dauernde Entwicklungszeit in der Antarktis, die vermutlich auch durch die periodischen Vereisungen im Pleistozän nicht unterbrochen wurde (CLARKE & CRAME 1989; EASTMAN 1990), hat sicher diese evolutiven Prozesse begünstigt. Als einen entscheidenden Einschnitt für die Schelflebens-

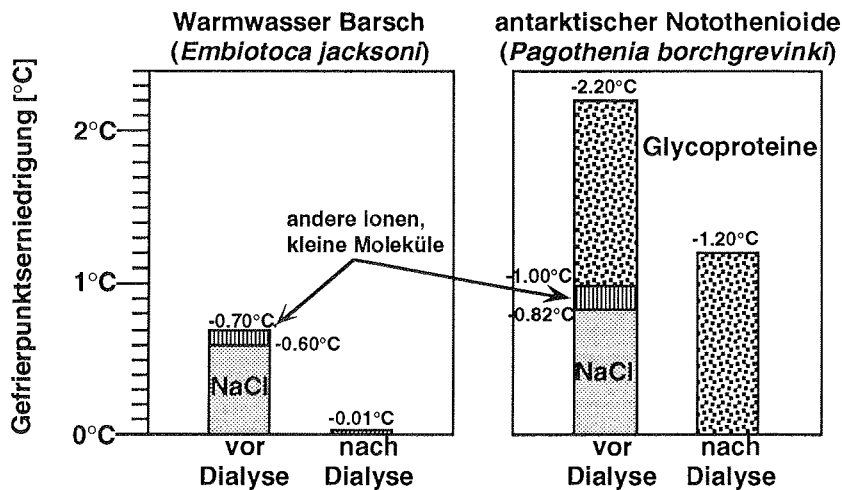
gemeinschaften gelten die Eiszeiten. Im Pleistozän sind bis zu 16 Eiszeiten aufgetreten, mit einer Periode von ungefähr 125000 Jahren. Die Warmzeiten dauerten nur 10 - 20.000 Jahre, glaziale Klimazeiten dauerten sehr viel länger an. Die heute herrschenden Bedingungen stellen vermutlich ein extremes Maximum der Warmzeit da (EMILIANI 1966; DAVIS 1976). Noch vor etwa 18000 Jahren bedeckten Schelfeis Massen einen großen Teil der heute eisfreien Schelfgebiete (ANDERSEN *et al.* 1980; HUGHES 1981; MELLES 1991), das südliche Weddellmeer war vermutlich vollständig eisbedeckt (ELVERHOI & MAISEY 1983). Es deutet einiges darauf hin, daß während der Eiszeiten ein Ausweichen verschiedener Tierpopulationen in tiefere Bereiche (Tiefseegräben und Kontinentalabhang) notwendig und möglich war (ANDRIASHEV 1965; EASTMAN & GRANDE 1989; KLAGES 1991). Auch muß man annehmen, daß die Wassertemperaturen vieler Lebensbereiche während dieser Zeit geringer als heute waren. Arten, die während der Warmzeiten in eisfreiem Wasser leben konnten, wurden mit Eis konfrontiert.

Die Fischfaunen der Antarktis und Arktis unterscheiden sich in Bezug auf ihre Artenzusammensetzung, Diversität und Biomasse grundlegend. Die Fischfauna der Antarktis ist charakterisiert durch eine Unterordnung der Perciformes, die Notothenioidei, die ihre Entwicklung vor ungefähr 50 Mio. Jahren begann (ANDERSEN 1984; ANDRIASHEV 1987). Die Arten dieser Unterordnung sind heute dominierend in der Antarktis. Sie machen über 50% aller Fischarten (DEWITT 1970) und mehr als 90% der Biomasse aus (ANDRIASHEV 1987; KOCK 1992). Sie besetzen fast alle Nischen des Ökosystems, die unterschiedlichsten Lebensräume des Ozeans, die in anderen Teilen der Weltmeere durch verschiedene Fischordnungen eingenommen werden. Im Gegensatz dazu besteht in der Arktis, bedingt durch das Stromsystem, ein ständiger Austausch der Fischpopulationen mit denen borealer Gewässer. Hier sind alle wichtigen marinen Knochenfischordnungen vertreten. Es gibt nur wenige "echte" arktische Arten, die nördlich der Kontinente im arktischen Becken vorkommen. Hierzu zählen einige Gadidae, Cottidae und Liparididae.

## Gefrierschutz bei Fischen der Polarmeere

### *Warum ist ein biologischer Gefrierschutz überhaupt nötig ?*

In vielen Lebensbereichen unserer Erde werden Tiere mit niedrigen, nahe bei oder sogar unter dem Gefrierpunkt der Körperflüssigkeit liegenden Temperaturen konfrontiert (Review: BLOCK 1990; COSSINS & BOWLER 1987; DAVENPORT 1992; GROUT & MORRIS 1987; STOREY 1990; STOREY & STOREY 1988; WANG 1989). Besonders betroffen sind dabei die Ektothermen, die durch verschiedene Mechanismen ein Gefrieren des Cytoplasmas und damit den Zelltod verhindern müssen (CLARKE 1983). Dies gilt auch für arktische und antarktische Fische, die vielfach in einem Milieu leben, welches durch Temperaturen um den Gefrierpunkt des Seewassers (-1.8° - -2.2°C) charakterisiert ist. Da das Blut mariner Fische gegenüber Seewasser hypotisch ist, verwundert es, daß Fische in den polaren Meeren nahe dem Gefrierpunkt überleben können (DEVRIES 1970, 1974, 1978).



**Abbildung 1:** Vergleich des Blutplasmas eines pazifischen Warmwasser-Barsches mit dem eines antarktischen Notothenioiden vor und nach der Dialyse. Vor der Dialyse liegt der Gefrierpunkt des Plasmas vom Barsch bei  $-0.7^{\circ}\text{C}$ , nach der Dialyse bei  $-0.6^{\circ}\text{C}$ . Bei dem Blutplasma des Notothenioiden liegt der Gefrierpunkt vor der Dialyse bei  $-2.2^{\circ}\text{C}$ , nach der Dialyse bei  $-1.2^{\circ}\text{C}$ . Im Plasma sind noch makromolekulare und gefrierpunktsenkende Substanzen vorhanden, die nicht durch die Dialyse (Ausschlussgrenze 1 kDa) entfernt werden konnten (verändert nach EASTMAN & DEVRIES 1986a).

Frühe Arbeiten von GORDON *et al.* (1962) und SCHOLANDER *et al.* (1953, 1957) zeigten, daß das Blutserum arktischer Fische einen niedrigeren Gefrierpunkt hat als das anderer Fische. Sie beobachteten nicht-dialysierbare Substanzen im Blutserum, die den Gefrierpunkt erniedrigen. Salze, Harnstoff, Aminosäuren und andere Substanzen im Blut erniedrigen den Gefrierpunkt der meisten marinen Fische auf ungefähr  $-0.8^{\circ}\text{C}$  (GORDON *et al.* 1962; OSUGA & FEENEY 1978). In der Antarktis leben jedoch Fische (z.B. *Pagothenia borchgrevinki*) zwischen Eisplättchen (DEVRIES & WOHLISCHLAG 1969). In Aquarien wurde beobachtet, daß sich bei Temperaturen  $< -2.2^{\circ}\text{C}$  Eiskristalle auf der Haut der Fische bilden können, ohne daß diese sterben (*Trematomus hansonii*: WÖHRMANN unpubl.). Der Gefrierpunkt des Bluts dieser Fische liegt mit  $< -2.2^{\circ}\text{C}$  tiefer als der von Seewasser. Nach Dialyse zeigt das Serum immer noch einen signifikant niedrigeren Gefrierpunkt ( $< -1.2^{\circ}\text{C}$ ), als man von einer salzfreien Lösung erwarten würde (Abbildung 1). Im Gegensatz dazu gefriert das dialysierte Serum tropischer Fische bei  $0^{\circ}\text{C}$  (OSUGA & FEENEY 1978). Dies deutet darauf hin, daß Fische der Polarmeere makromolekulare Gefrierschutzsubstanzen synthetisieren, die den Gefrierpunkt des Serums unter den des Wassers senken. Im Gegensatz zu Salzen beeinflussen sie den osmotischen Wert einer Flüssigkeit nur geringfügig. Bei allen Organismen, in denen dieser makromolekulare Gefrierschutz nachgewiesen wurde, handelt es sich um Proteine bzw. Glycoproteine (DEVRIES *et al.* 1970; DUMAN *et al.* 1982; TOMCHANEY *et al.* 1982). Sie machen ungefähr 3% des Blutplasmas und der meisten anderen Körperflüssigkeiten aus (AHLGREN *et al.* 1988).

### **Welche Struktur haben Gefrierschutzglycoproteine (AFGP)?**

Bislang wurde nur ein Typ von Glycoproteinen beschrieben, der als Gefrierschutz dient und als **AFGP** (antifreeze glycoprotein) bezeichnet wird. Bei allen Untersuchungen am AFGP polarer Fische konnte bislang dasselbe Glycotripeptid nachgewiesen werden: Das AFGP besteht aus Polymeren von  $\text{H}_2\text{N}[\text{Ala-Ala}(\beta\text{-galactosyl}(1\text{-}\rightarrow\text{3})\alpha\text{-N-Acetylgalactosamin})\text{Thr}]_n\text{Ala-Ala-COOH}$  und kommt in acht verschiedenen Größen vor [ $n = 50, 45, 35, 28, 17, 12, 6-4$ ], die als AFGP 1 (MW 33500) bis AFGP 8 (MW 2600) bezeichnet werden (DEVRIES *et al.* 1970, 1971; KOMATSU *et al.* 1970; OSUGA & FEENEY 1978; VANDENHEEDE *et al.* 1972). Diese AFGPs haben eine ungewöhnliche Konformation: sie besitzen keine Tertiärstruktur. Vermutlich handelt es sich um eine ausgedehnte  $\alpha$ -Helix, wobei das Tripeptid Ala-Ala-Thr eine Drehung ausmacht, und so das Disaccharid immer zur gleichen Seite zeigt (BUSH *et al.* 1981, 1984; FRANKS & MORRIS 1978; RAYMOND *et al.* 1977) (Abbildung 2).

### **Sind die anderen nicht glycosilierten Gefrierschutzsubstanzen (AFP) ähnlich homogen ?**

In nicht-notothenioiden Fischen der Antarktis und Fischen der Arktis konnten außerdem Gefrierschutzproteine (**AFP**) nachgewiesen werden, die keinen Zuckeranteil besitzen. Man unterscheidet dabei zwischen drei Typen: der Typ I ist Alanin-reich und kommt in Plattfischen und Cottiden vor. Der Typ II ist Cystein-reich und wurde bei dem Cottiden *Hemirhamphus americanus* gefunden. Der Typ III hat weder Alanin noch Cystein als wichtigste Aminosäure und wurde aus Zoarciden isoliert. Die AFP zeigen großenteils eine geringere Gefrierschutzaktivität als die Glycoproteine. Es gibt große Variationen der AFP von Art zu Art, sowohl in Bezug auf ihre Primär- als auch Sekundärstruktur (ANANTHANARAYANAN 1989; ANANTHANARAYANAN *et al.* 1986; CHENG & DEVRIES 1989; SCHRAG *et al.* 1987; SCOTT *et al.* 1987). Diese AFP sollen nicht monophyletischen Ursprungs sein, sondern haben sich vermutlich während der letzten 35 Millionen Jahre unter dem Einfluß der Eiszeiten unabhängig voneinander entwickelt (DAVIES *et al.* 1988; SCOTT *et al.* 1986)

### **Welche Fische besitzen Gefrierschutzglycoproteine ?**

Die bisherigen Untersuchungen zum Gefrierschutz antarktischer Fische wurden größtenteils an Arten der Antarktischen Halbinsel und des McMurdo Sounds durchgeführt. Viele hochantarktische Arten, wie z. B. *Aethotaxis mitopteryx*, blieben bislang unberücksichtigt. Die ersten Untersuchungen an den Notothenioidei des Weddellmeeres machten SCHNEPPENHEIM & THEEDE (1982) sowie RAHMANN *et al.* (1984). Untersuchungen an nicht-notothenioiden Fischen sind rar (DEVRIES & LIN 1977: *Paraliparis devriesi*; SCHRAG *et al.* 1987: *Lycodichthys dearborni*; CHENG & DEVRIES 1989: *Pachycara brachycephalum*). In der Arktis wurden Untersuchungen vor allem an verschiedenen Gadiformes (FLETCHER *et al.* 1982a; HEW *et al.* 1981; OSUGA & FEENEY 1978; RAYMOND *et al.* 1975; VAN VOORHIES *et al.* 1978), einigen Cottiden (HEW *et al.* 1980, 1985; SLAUGHTER *et al.* 1981), Zoarciden (HEW *et al.* 1984; SCHRAG *et al.* 1987) und Plattfischen (DUMAN & DEVRIES 1974; HEW & YIP 1976) in der Grönland- und Labradorsee sowie der Nordamerikanischen Ostküste durchgeführt.



AFGP wurde in den meisten daraufhin untersuchten notothenioiden Fischen der Antarktis gefunden (AHLGREN & DEVRIES 1984; EASTMAN 1990; HASCHEMEYER & JANNASCH 1983). AFGP konnte auch in fünf arktischen Arten nachgewiesen werden, die alle der Familie der Gadidae angehören: *Boreogadus saida*, *Eleginus gracilis*, *Gadus morhua*, *Gadus ogac* und *Microgadus tomcod* (BURCHAM *et al.* 1986; FLETCHER *et al.* 1982b; GODDARD *et al.* 1992; HEW *et al.* 1981; OSUGA & FEENEY 1978; RAYMOND *et al.* 1975; VAN VOORHIES *et al.* 1978). Kein AFGP besitzen nach diesen Untersuchungen der antarktische Silberfisch *Pleuragramma antarcticum* (HASCHEMEYER & JANNASCH 1983) und einige andere Notothenioide, u.a. *Lepidonotothen kempfi* (DEVRIES & LIN 1977), obwohl auch diese Tiere bei Temperaturen nahe dem Gefrierpunkt (-1.8°C) leben. Bei nicht-notothenioiden Fischen außer den Gadidae konnten nur Gefrierschutzproteine (AFP) isoliert werden, bei vielen antarktischen und arktischen Arten (u.a. Liparididae) sollen diese Substanzen völlig fehlen (DEVRIES & LIN 1977; DEVRIES 1988). Das Fehlen dieser Substanzen bei den Liparididae wird mit zwei Phänomenen begründet: Zum einen wird bei einer Wassertiefe von 500 m der Gefrierpunkt, bedingt durch den Druck, um  $\approx 0.4^\circ\text{C}$  herabgesetzt (DEVRIES 1988), zum anderen kommt in solchen Tiefen gewöhnlich kein Eis vor.

Die arktischen Cottiden bauen im Winter hohe Konzentrationen von AFP auf; antarktische Notothenioidei besitzen dagegen ganzjährig einen Gefrierschutz aus AFGP. Die Konzentration des AFGP wird entsprechend der Lebensweise nur auf die tatsächlich notwendige Temperaturtoleranz eingestellt. So ist bekannt, daß im selben Lebensraum (Rossmeer) die oberflächennah in ständigem Eiskontakt lebende *Pagothenia borchgrevinki* einen stärkeren Gefrierschutz unterhält als die Bodenarten *Trematomus hansonii*, *T. loennbergii* oder *T. bernacchii* (DEVRIES 1980; DUMAN & DEVRIES 1974; O'GRADY *et al.* 1982). Entsprechendes gilt auch für die Gefrierschutzmengen von Fischarten, die in unterschiedlichen geographischen Breiten anzutreffen sind. So synthetisieren hochantarktische Notothenioide mehr AFGP als z.B. *Lepidonotothen larseni* aus der Subantarktis (DEVRIES & LIN 1977), der hocharktische Gadide *B. saida* mehr als der nordboreale *G. morhua* (MORRIS *et al.* 1978; HEW *et al.* 1981).

Fraglich erscheint das Fehlen von Gefrierschutzsubstanzen der antarktischen *Pogonophryne scottii*, *L. kempfi* oder *P. antarcticum* (HASCHEMEYER & JANNASCH 1983; EASTMAN 1990). Populationen des vollpelagischen antarktischen Silberfisch *Pleuragramma antarcticum* z.B. führen während eines Lebenszyklus vertikale Wanderungen im Filchnergrabenbereich durch, und kommen dabei mit sehr unterschiedlich temperierten Wassermassen und Eis in Berührung. Larven finden wir im oft mit Plättcheneis beladenen kalten Oberflächenwasser (-1.8°C), die Juvenilen halten sich bevorzugt im wärmeren Wasser ( $> -0.5^\circ\text{C}$ ) der Ostwinddrift auf, während die Adulten schließlich auf den Schelf in das kalte Eisschelfwasser ( $< -2.0^\circ\text{C}$ ) zurückkehren (HUBOLD 1985b, 1990; HUBOLD & TOMO 1989). Aber auch von anderen Arten ist bekannt (z.B. *L. kempfi*, *Cryodraco antarcticus*, *Gymnoscopelus opisthopterus*, nicht-Notothenioidei), daß Individuen im Laufe eines Lebens oder aber ganze Populationen in Wassermassen unterschiedlicher Temperatur vorkommen, einige Arten führen vertikale Wanderungen innerhalb eines Tages durch (GON &

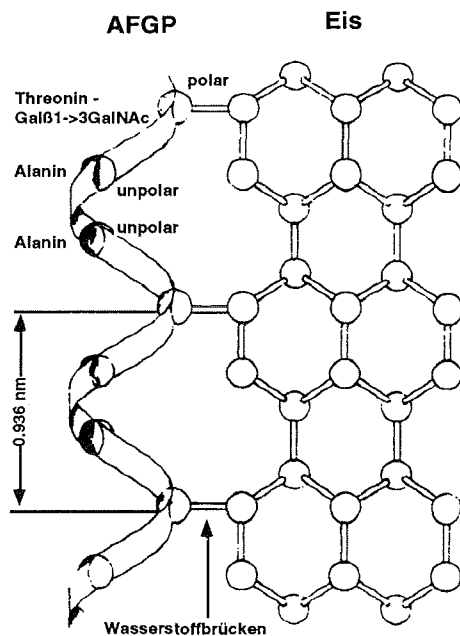
HEEMSTRA 1990; WÖHRMANN & ZIMMERMANN 1992); Gefrierresistenz ist demnach bei einigen Arten/Stadien nötig, bei anderen nicht, sowohl bei antarktischen, als auch arktischen Arten. In geologischen Zeiträumen führten die Vereisungen der antarktischen Schelfe während der vergangenen Eiszeiten zu starken Temperaturveränderungen. Fische wärmerer Wassermassen beider Polargebiete können zu diesen Zeiten mit Eis in Berührung gekommen sein.

### *Worin äußert sich die Gefrierschutzaktivität und wie kann man sie messen ?*

Auf molarer Basis senken die höhermolekularen AFGPs 1-5 den Gefrierpunkt einer Flüssigkeit um ein Vielfaches gegenüber NaCl ( $\approx 500$ fach: DEVRIES *et al.* 1970; FEENEY & YEH 1978). Die Aktivität der niedermolekularen AFGPs 6-8 ist sehr viel geringer (5% in Bezug auf das Molekulargewicht). Eine AFGP-Lösung schmilzt bei nahe 0°C. Die Differenz zwischen dem Schmelz- und dem Gefrierpunkt wird als "**thermale Hysterese**" bezeichnet, und gibt die Aktivität des AFGP (oder AFP) an (FEENEY & HOFMANN 1973). Die Zunahme der Aktivität in Abhängigkeit der AFGP-Konzentration zeigt eine hyperbolische Funktion, während die Gefrierpunktserniedrigung einer Salzlösung linear mit der Konzentration ansteigt. Um diese Hysterese zu messen, wurden im Laufe der vergangenen Jahre verschiedene Methoden entwickelt, die entweder optisch arbeiten (Clifton Nanoliter Osmometer: DEVRIES 1982; KNIGHT *et al.* 1984), oder physikalisch (Gefrierpunktsosmometer: SLAUGHTER & HEW 1981), oder kalorimetrisch (HANSEN & BAUST 1988a, b; HANSEN *et al.* 1991).

### *Wie funktioniert ein Gefrierschutzglycoprotein ?*

Arbeiten zur Funktion und zum Mechanismus des AFGP und AFP wurden gerade in den vergangenen Jahren in mehreren Reviews zusammengetragen (ANANTHANARAYANAN 1989; CHENG & DEVRIES 1991; DAVIES & HEW 1990; DEVRIES 1988; FEENEY 1988; FEENEY *et al.* 1986; HEW & YANG 1992). Allerdings sind nach wie vor nicht alle Fragen zur Funktionsweise geklärt. Vor allem die Struktur des AFGP gibt Rätsel auf. Das Wachstum von Eiskristallen wird vermutlich verhindert, indem das AFGP Eiskristalle über Wasserstoffbrücken an sich bindet (Abbildung 2), und diese so von den empfindlichen Zellen ferngehalten werden (BURCHAM *et al.* 1984; BROWN *et al.* 1985; TOMIMATSU *et al.* 1976; KNIGHT *et al.* 1984). Hohe Konzentrationen von AFGP in den Kiemen und im Hautschleim verhindern ein Eindringen von Eiskristallen in den Körper (SCHNEPPENHEIM & THEEDE 1982; VALERIO *et al.* 1989). Die makromolekularen Gefrierschutzproteine können so als eisspezifische "Bindeproteine" bezeichnet werden, die eine Antikörper-ähnliche Funktion erfüllen, und den Organismus durch Isolation und Inaktivierung von Eiskristallen vor einem Gefrieren schützen (MACDONALD *et al.* 1987). Die niedermolekularen AFGP sind "inaktiv" bei sogenanntem "rauhem" Eis von sehr kalten Lösungen, hier kommen die hochmolekularen AFGP zur Wirkung (BURCHAM *et al.* 1984). Der Mechanismus der Gefrierpunktserniedrigung ist also in starkem Maße abhängig von der Primär- und Sekundärstruktur der AFGP und AFP (CHOU 1992; DILL *et al.* 1992).



**Abbildung 2:** Modell der  $\alpha$ -Helix eines Gefrierschutzglycoproteins (AFGP) und die mögliche Anlagerung von Eiskristallen. Das Glycoprotein liegt in der Sekundärstruktur vor. An einer Windung sind genau drei Aminosäuren beteiligt, d.h. das Threonin ist immer nach einer Seite orientiert und damit auch das daran gebundene Disaccharid Gal $\beta$ 1->3GalNAc. An diese "Antennen" im Abstand von 0,936 nm könnten sich Eiskristalle anlagern, gebunden über Wasserstoffbrücken. Entlang der Achse der  $\alpha$ -Helix würden die Eiskristalle nur in Richtung ihrer c-Achse wachsen, ein exponentielles Wachstum wird unterdrückt und die Eiskristalle werden "neutralisiert". Erst eine weitere Abkühlung bedingt das exponentielle Wachstum und damit das Gefrieren der Lösung (verändert nach DEVRIES & LIN 1977).

## Fragestellung

Wie oben ausgeführt, sind biologische Gefrierschutzmakromoleküle für ein Überleben polarer Fische bei Wassertemperaturen nahe dem Gefrierpunkt unbedingt notwendig. Andererseits wird von einigen Arten (u.a. *L. kempfi*, *P. antarcticum*) angegeben, daß sie keine Gefrierschutzsubstanzen synthetisieren sollen, obwohl sie bei Temperaturen unterhalb des Gefrierpunktes ihres Bluts leben. Vorrangiges wissenschaftliches Ziel dieser Arbeit ist es, diesen Widerspruch aufzuklären.

Anhand von Untersuchungen zum AFGP notothenioider Fische der antarktischen Halbinsel, des Weddellmeeres und des Lasarewmeeres und eines Vertreters der arktischen Gadiden soll der Zusammenhang zwischen dem Vorkommen der jeweiligen Art in tiefem/flachem bzw.

## Einleitung

---

warmem/kaltem Wasser und dem Gehalt an AFGP bzw. seinem Mechanismus geklärt werden. Gibt es einen Zusammenhang zwischen Wassertemperatur bzw. Wassertiefe und AFGP-Gehalt? Kann eine ganzjährige und gleichmäßige Synthese von AFGP angenommen werden, oder sparen die Fische mit ihrer Energie und unterhalten eine temperaturgesteuerte Synthese? Wieviel AFGP synthetisieren Arten, die sowohl in wärmeren als auch eisbeladenem Wasser vorkommen? Gibt es Unterschiede in der Effektivität der Gefrierschutzsubstanzen? Wie wird ein Eiskristallwachstum letztendlich verhindert? Wie schützen sich nicht-notothenioide Fische vor dem Gefrieren? Besitzen auch sie das AFGP?

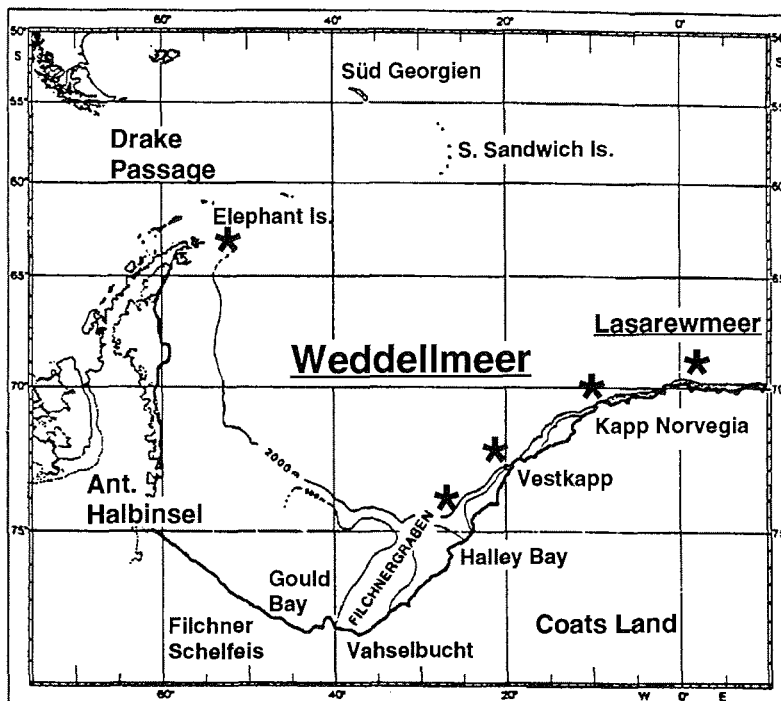
Der Schwerpunkt der Untersuchungen soll auf dem hochantarktischen Silberfisch *Pleuragramma antarcticum* liegen. In den bisherigen, auf dem Alanin-Gehalt beruhenden Untersuchungen, konnte bei den wenigen im McMurdo Sound gefangenen Exemplaren dieser Art kein AFGP nachgewiesen werden. Mit Hilfe neuester Methoden der Zucker- und Aminosäurenanalyse, immunochemischer, spektroskopischer und kalorimetrischer Verfahren soll auch nach alternativen Substanzen zum AFGP gesucht werden. Wie schützt sich *P. antarcticum* vor einem Gefrieren in dem eisbeladenen Wasser des Filchner Grabens? Ein Gefrierschutz ist hier unbedingt zu fordern. Gibt es vielleicht eine Abhängigkeit der Gefrierschutzmenge vom Alter des Fisches? Sind die Konzentrationen des AFGP zu gering, um sie nachzuweisen? Gibt es andere (Glyco)proteine, die eine ähnliche Funktion erfüllen?

Die meisten hier vorgestellten Arten werden zum ersten Mal auf einen Gefrierschutz hin überprüft. Es wurde darauf Wert gelegt, daß es sich um eine große Zahl unterschiedlicher Ökotypen handelt, und hauptsächlich hochantarktische Arten ausgewählt. Besondere Aufmerksamkeit wurde der Lebensweise und Evolution dieser Teleostee unter Berücksichtigung des Lebensraum geschenkt, mit dem Versuch Zusammenhänge zu den Gefrierschutzcharakteristika aufzuzeigen.

## MATERIAL

### Biologisches Material - Probennahme

Die Fische wurden mit dem kommerziellen Grundschieppnetz (GSN), dem benthopelagischen Trawl (BPN) und dem Agassiztrawl (AGT) während drei *Polarstern* Expeditionen in die Antarktis und Arktis gefangen. Dabei handelte es sich um die Fahrtabschnitte ANT VII/4 (EPOS 3, 1989) und ANT IX/3 (SWW 3, 1991), an denen ich selber teilnahm, und ARK VII/2 (1990). Der Großteil der antarktischen Fische wurde im Weddellmeer vor Halley Bay und Vestkapp, sowie in dem Lasarewmeer zwischen Kap Norvegia und Astrid Rücken gefangen (Abbildung 3). Die südlichste Station lag bei  $76^{\circ}08'S$  und  $28^{\circ}23'W$ , die nördlichste bei  $69^{\circ}40'S$  und  $00^{\circ}51'E$ . Es wurde in Tiefen zwischen 161 m (LazarevSee) und 2000 m (Halley Bay) gefischt. Einige Tiere stammen aus dem Bereich von Elephant Island, Antarktische Halbinsel. Die arktischen Fische wurden in der Region um Nordost Grönland gefangen. Die Stationen lagen zwischen  $77^{\circ}59'N/15^{\circ}25'W$  und  $81^{\circ}48'N/10^{\circ}52'W$  in Tiefen von 91 bis 491 m (Abbildung 4). Genaue Angaben zu den Stationen mit Position, Wassertiefe und Fangzusammensetzung sind den Fahrtberichten ARNTZ *et al.* (1990), BATHMANN *et al.* (1992) und KRAUSE (1991) zu entnehmen.



**Abbildung 3:** Untersuchungsgebiet und Lage der Fischereistationen (\*) während der *Polarstern*-Reise ANT VII/4 (HUREAU *et al.* 1990) und ANT IX/3 (WÖHRMANN & ZIMMERMANN 1992) in das Weddellmeer und das Lasarewmeer, Antarktis.

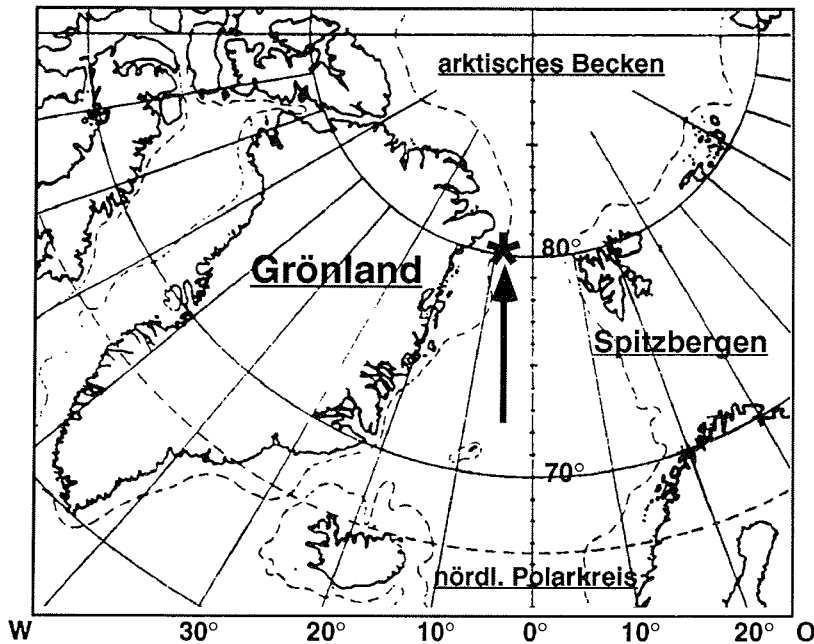


Abbildung 4: Untersuchungsgebiet und Lage der Fischereistationen (\*) während der Polarstern-Reise ARK VII/2 (PIEPENBURG *et al.* 1991) in das Seegebiet nordöstlich von Grönland.

Für die vorliegende Arbeit wurden folgende Arten ausgewählt:

#### ARKTIS

Fam. Gadidae: *Arctogadus glacialis*

Fam. Liparididae: *Liparis fabricii*

Fam. Cottidae: *Icelus bicornis*, *Triglops nybelini*

#### ANTARKTIS

Fam. Nototheniidae: *Gobionotothen gibberifrons*, *Lepidonotothen kempi*, *Aethotaxis mitopteryx*, *Dissostichus mawsoni*, *Pleuragramma antarcticum*, *Trematomus bernacchii*, *Trematomus pennellii*, *Trematomus eulepidotus*, *Trematomus lepidorhinus*, *Trematomus loennbergii*

Fam. Artedidraconidae: *Artedidraco loennbergi*, *Dolloidraco longedorsalis*, *Pogonophryne marmorata*, *Pogonophryne scotti*

Fam. Bathydraconidae: *Bathydraco marri*, *Gerlachea australis*, *Gymnodraco acuticeps*, *Racovitzia glacialis*

Fam. Channichthyidae: *Chaenodraco wilsoni*, *Chionodraco hamatus*, *Chionodraco myersi*, *Cryodraco antarcticus*, *Dacodraco hunteri*, *Neopagetopsis ionah*, *Pagetopsis macropterus*, *Pagetopsis maculatus*

Fam. Rajidae: *Bathyraja maccaini*  
 Fam. Macrouridae: *Macrourus holotrachys*  
 Fam. Liparididae: *Paraliparis somovi*  
 Fam. Muraenolepididae: *Muraenolepis marmoratus*  
 Fam. Zoarcidae: *Lycenchelys hureaui*  
 Fam. Myctophidae: *Gymnoscopelus opisthopterus*

**Tabelle 1:** Anzahl der untersuchten Individuen (n), sortiert nach der systematischen Stellung der Art. Angegeben sind zudem minimale und maximale Standardlänge SL [mm], minimales und maximales Frischgewicht FRG [g], die durchschnittliche Fangtiefe [m], die dort vorherrschende Temperatur [°C] und die Stationsnummer.

Art	n	SL [mm]	FRG [g]	Tiefe [m]	Temp. [°C]	Station Nr
<i>Arctogadus glacialis</i>	4	165 - 206	33 - 69	350		17222
<i>Liparis fabricii</i>	1	98	15	200		17227
<i>Icelus bicornis</i>	2	55 - 65	3.6 - 6.9	150		17101
<i>Triglops nybelini</i>	1	102	15	200		17224
<i>Gobionotothen gibberifrons</i>	3	290 - 325	317 - 430	200	0.00	14211
<i>Lepidonotothen kempi</i>	6	105 - 170	31 - 54	450 - 560	-1.40	18169
<i>Aethotaxis mitopteryx</i>	3	280 - 290	202 - 255	701 - 702	-0.16	14249
<i>Pleuragramma antarcticum</i>	116	95 - 220	7.3 - 90.6	451 - 626		diverse
<i>Dissostichus mawsoni</i>	1	810	≈10000	561 - 626	-1.60	18130
<i>Trematomus bernacchii</i>	1	240	220	561 - 626	-1.60	18130
<i>Trematomus pennellii</i>	1	200	148	400 - 405	-1.84	18123
<i>Trematomus eulepidotus</i>	2	170 - 185	85 - 95	330 - 467		diverse
<i>Trematomus lepidorhinus</i>	4	219 - 225	177 - 216	602 - 617	-1.40	14269
<i>Trematomus loennbergii</i>	1	150	33	569 - 574	-1.92	14226
<i>Artedidraco loennbergii</i>	12	75 - 90	5.0 - 8.0	338 - 343	-0.50	18206
<i>Dolloidraco longedorsalis</i>	25	65 - 90	4.0 - 15.0	561 - 626	-1.60	18130
<i>Pogonophryne marmorata</i>	1	150	108	539 - 623	-1.00	18158
<i>Pogonophryne scotti</i>	1	170	120	802 - 830	+0.75	18160
<i>Bathyraco marri</i>	10	165 - 200	21 - 42	539 - 623	-1.00	18158
<i>Gerlachea australis</i>	2	200 - 225	46 - 68	405 - 407	-0.47	14235
<i>Gymnodraco acuticeps</i>	1	285	125 - 130	193 - 197	-1.40	14273
<i>Racovitzia glacialis</i>	2	160 - 170	21 - 23	569 - 574	-1.92	14226
<i>Chaenodraco wilsoni</i>	1	215	71	484 - 509	-1.60	14258
<i>Chionodraco hamatus</i>	1	110	16	405 - 407	-1.40	14235
<i>Chionodraco myersi</i>	4	255 - 270	87 - 105	539 - 623		diverse
<i>Cryodraco antarcticus</i>	2	340 - 460	286 - 735	539 - 623	-1.00	18158
<i>Dacodraco hunteri</i>	1	255	89	539 - 623	-1.00	18158
<i>Neopagetopsis ionah</i>	1	390	578	798 - 799	+0.20	14261
<i>Pagetopsis macropterus</i>	1	155	26	500 - 506	-1.89	14229
<i>Pagetopsis maculatus</i>	9	135 - 200	20 - 68	451 - 453	-1.40	14241
<i>Lycenchelys hureaui</i>	2	350 - 420	190 - 242	802 - 830	+0.75	18160
<i>Bathyraja maccaini</i>	1	350	1000	661 - 742	+0.70	18211
<i>Paraliparis somovi</i>	3	105 - 160	17 - 21	539 - 623	-1.00	18158
<i>Muraenolepis marmoratus</i>	2	230 - 255	88 - 130	802 - 830	+0.75	18160
<i>Macrourus holotrachys</i>	6	180 - 240	63 - 73	661 - 742	+0.70	18211
<i>Gymnoscopelus opisthopterus</i>	3	130 - 140	23 - 28	661 - 742	+0.70	18211

Die antarktischen Fische wurden von mir direkt nach dem Fang sortiert, zum großen Teil bestimmt und vermessen. Als Bestimmungsschlüssel dienten die FAO Species Identification Sheets (FISCHER & HUREAU 1985), "The Fishes of the Southern Ocean" (GON & HEEMSTRA) und ein von KOCK (unpubl.) zusammengestellter Schlüssel nach NORMAN (1938) und anderen Autoren. Die Zoarcidae, Liparididae und Myctophidae wurden von KOCK und STEHMANN (Hamburg) bestimmt. Die arktischen Fische wurden ebenfalls schon an Bord von Mitarbeitern des Instituts für Polarökologie bestimmt (PIEPENBURG *et al.* 1991). Es wurde die Totallänge und die Standardlänge (auf den nächsten unteren cm) gemessen und das Total- und Schlachtgewicht bestimmt (auf 1 g genau). Die Bestimmung des Reifegrades der Gonaden erfolgte nach der fünfteiligen Skala von EVERSON (1977).

Für die Entnahme der Gewebeproben wurden nur lebende Tiere ausgesucht. Magen, Leber, Gonade und Herz wurden einzeln gewogen (auf 0.1 g genau) und anschließend tiefgefroren (RANKIN *et al.* 1990). Für die Zwischenhaltung von Fischen bzw. für Lebendbeobachtungen wurde ein Kühlcontainer mit einer Raumtemperatur von -1°C verwendet (WÖHRMANN 1990). Einige Arten konnten mehr als drei Jahre gehalten werden und leben heute in den Aquarien des Alfred-Wegener-Instituts in Bremerhaven.

## Chemikalien und sonstige Materialien

Extraktion: Ethanol; Trichloressigsäure; (Merck; p.A.-Qualität)

Chromatographie: Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Roth). Salzsäure 25%ig; Trifluoressigsäure; Acetonitril; Harnstoff; Natrium-, Magnesium- und Calciumchlorid; Kalium- und Natriumphosphat; Ammoniumsulfat; Glycin (Merck; p.A.-Qualität). WGA-Sepharose (Sigma). Sephadex G-25M (Pharmacia). Eichproteine I & II, combithek (Gelchromatographie) (Boehringer Mannheim).

Zuckeranalytik DIONEX: Natronlauge 50%ig; Natriumacetat (Baker). Zuckerstandards (GlcNAc; GalNAc; Glc; Gal; Man; NANA; Galβ1->3GalNAc; Asn-GlcNAc; N<sup>''</sup>N<sup>''</sup>Diacetyl-chitobiose; N<sup>''</sup>N<sup>''</sup>''-Triacetylchitotriose; N<sup>''</sup>N<sup>''</sup>''N<sup>''</sup>''-Tetraacetylchitotetraose) (Sigma).

Enzymatische und immunochemische Analysen: Endoglycosidase F; Endoglycosidase H; Endoglycosidase D; β-Galactosaminidase; Endo-β-Galactosidase; Endo-α-N-Acetylgalactosaminidase; β-Hexosaminidase; N-Glycosidase F; Chitinase; Pronase; Trypsin sequencing grade; UDP-[H<sup>3</sup>]Gal; CMP-NANA; Glycan Detection Kit; Glycan Differentiation Kit; digoxigenylierte Lektine PNA, WGA, DSA SNA, MAA; Galaktosyltransferase; Sialyltransferase (Boehringer Mannheim). 2-[4-(2-Hydroxyethyl-1-piperazinyl)]-propansulfonsäure; Natriumazid; Nonidet P-40; TBS; PBS; Nitrozellulose; *p*-Dimethylaminobenzaldehyd; Natrium-Cacodylat (Merck; p.A.-Qualität). Coomassie-Lösung (BioRad).

Elektrophoresen: Elektrophorese- und Blottingapparatur (Bio-Rad bzw. Pharmacia). Natrium-Dodecyl-Sulfat; Borat-Puffer, pH 9.6; Glycerin; Schiffs Reagenz; Nitrozellulose; 37%iges Formalin; Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (43%ig); Ethanol; Isopropanol; Essigsäure 10%; Perjodsäure; Na-metabisulfid



(Merck; p.A.-Qualität). Eichproteine, combithek (SDS-Gelelektrophorese) (Boehringer Mannheim). PhastSystem™; PhastGel IEF 3-9 (Pharmacia).

Chemische Analysen: Kationenaustauscher AG 50W-X12, 20-50 mesh (H<sup>+</sup>-Form; Bio-Rad); Essigsäure 100%ig; Natronlauge 50%ig; Natrium-Borhydrid; Salzsäure 25%ig; Trifluoressigsäure; Essiganhydrid; Schwefelsäure 25%ig (Merck; p.A.-Qualität). Sephadex G-15 (Pharmacia)

Aminosäurenanalyse: H<sub>2</sub>O (Baker); Methanol (Baker); DIEA; 5%iges PITC in Heptan; 3M Natriumacetatpuffer, pH 5.5; 3M Natriumacetatpuffer, pH 3.8; K<sub>3</sub>-EDTA; Acetonitril (Applied Biosystems). Aminosäurenstandard H (Pierce). L-Serin; N-Acetylglucosamin (Sigma).

## METHODEN

Alle im Folgenden beschriebenen biochemischen Arbeiten wurden von mir in den Abteilungen von Dr. Hösel (NP-RE) und Dr. Haselbeck (TB-BC) in den Forschungswerken Tutzing und Penzberg der Firma Boehringer Mannheim GmbH durchgeführt.

### Isolierung der Gefrierschutzsubstanzen

#### EXTRAKTION

Die Fische (oder einzelne Gewebe wie Leber, Muskel, etc.) wurden im Ganzen in einem Edelstahlmischer mit 50%igem Ethanol bei 0°C über 3 min homogenisiert und anschließend im Kühlraum (4°C) über eine Stunde gerührt. Das Lösungsmittelvolumen betrug das Doppelte des Gewichts (100 g Fisch -> 200 ml Ethanol 50%). Die Probe wurde nun mit 8000xg bei 4°C für 30 min zentrifugiert (Sorvall, DuPont, Rotor GS3). Der Niederschlag wurde ein weiteres mal mit 50%igem Ethanol extrahiert, gerührt und anschließend wie oben zentrifugiert. Die Überstände wurden addiert, in einem Vakuumrotationsverdampfer bei 15°C einrotiert und die Proteine mit einer 10%igen TCA-Lösung gefällt. Proteine fallen bei dieser Säurebehandlung aus, Gefrierschutzglycoproteine sind in 10% TCA löslich. Diese Suspension wurde mit 5000xg bei 4°C für 30 min zentrifugiert (Sorvall, DuPont, Rotor GSA), der Überstand gesammelt, über 5 Tage gegen die zwanzigfache Menge H<sub>2</sub>O bei 4°C dialysiert (Ausschlußgrenze 2 kDa) und mit einer Amicon-Zelle (Ultrafiltrations-Zelle, Modell 402, YM1 Filter, Amicon) eingengt, und anschließend lyophilisiert (WÖHRMANN *et al.* 1991).

Die weitere Aufreinigung erfolgte mit Hilfe der hochauflösenden Flüssigkeitschromatographie (High-Performance-Liquid-Chromatography: HPLC). Die Anlagen (getrennt für organische und anorganische Eluenten) bestanden aus HPLC-Pumpe, Controller, Wellenlängenmonitor, Entgasungsmodul, Injektionsventil (alles von Pharmacia/LKB) und Schreiber (Shimadzu). Das Elutionsprofil wurde durch Detektion der Absorption wahlweise bei 215, 230 oder 280 nm erfaßt. Die Trennung erfolgte bei Raumtemperatur. Injektionsvolumen, Flußrate, Eluenten und Gradienten wurden je nach verwendeter Säule und Fragestellung variiert und sollen im Folgenden bei den einzelnen Säulen erläutert werden.

## CHROMATOGRAPHISCHE AUFREINIGUNG

### *Eluenten- und Probenvorbereitung*

Eluenten und Proben wurden mit bidestillierten Wasser angesetzt. Die Eluenten wurden über einen Millipore Filter (0.45 µm; Millipore, Bedford, MA) keimfrei filtriert und anschließend mit Helium entgast. Die Proben wurden über Millipore Ultrafree MC Filter (0.45 µm) filtriert.

### *Ionenaustauschchromatographie*

(A) Bio-Gel TSK DEAE 5-PW (Diethylaminoethyl Cellulose; 75 x 7.5 mm I.D.; BIO-RAD). Eluent A: 20 mM Tris/HCl-Puffer; Eluent B: 1 M NaCl in 20 mM Tris/HCl, pH 9.6. Es wurden 200 µl (1-10 mg/ml) injiziert. Die Flußrate betrug 1 ml/min, die Fraktionsgröße 1 ml. Die Detektion erfolgte durch Absorbtionsmessung wahlweise bei 215, 230 oder 280 nm. Die verwendeten Gradienten sind bei den entsprechenden Abbildungen angegeben.

(B) Mono Q HR 5/5 (Pharmacia). Die entsalzten Fraktionen der DEAE-Chromatographie wurden ein weiteres mal mittels Ionenaustauscher-HPLC aufgetrennt. Eluent A: 20 mM Tris/HCl; Eluent B: 1 M NaCl in 20 mM Tris/HCl, pH 7.5. Es wurden 200 µl der Probe injiziert (5 mg/ml). Die Flußrate betrug 0.8 ml/min, die Fraktionsgröße 1 ml. Die Detektion erfolgte durch Absorbtionsmessung wahlweise bei 215, 230 oder 280 nm. Die verwendeten Gradienten sind bei den entsprechenden Abbildungen angegeben.

### *Entsalzen der Proben*

Die gesammelten Fraktionen wurden entweder durch Dialyse gegen H<sub>2</sub>O (Ausschlußgrenze 2 kDa) oder über kleine Gelfiltrationssäulen Sephadex G-25M (Pharmacia) entsalzt.

### *Reversed-Phase-Chromatographie*

Reversed-Phase C4 Hyperchrome Synchronapak S300 (250x4.6 mm; Bischoff) und Reversed-Phase C18 ODS Hypersil, 5 µm (250x4.6 mm; Bischoff). Die Lyophilisate der Mono Q - Fraktionen wurden auf diese hydrophoben Säulen aufgetragen. Als Eluent A wurde eine 0.1%ige TFA-Lösung (Trifluoressigsäure; wässrig) verwendet, als Eluent B Acetonitril mit ebenfalls 0.1% TFA. Es wurden 100 µl der Probe injiziert (1-10 mg/ml). Die Flußrate betrug 1 ml/min, die Fraktionsgröße 500 µl. Detektiert wurde bei 215 nm (Empfindlichkeit 0.32). Die verwendeten Gradienten sind bei den entsprechenden Abbildungen angegeben.

### *Bestimmung des Proteingehalts*

Zur Bestimmung des Proteingehalts nach BRADFORD (1976) wurden 1-100 µl der Enzym bzw. Proteinlösung eingesetzt und mit H<sub>2</sub>O auf 600 µl aufgefüllt. Daraufhin wurden 500 µl Coomassie-Lösung hinzugegeben und für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Absorption bei 578 nm wurde gemessen. Für die Eichkurve wurde eine BSA-Lösung (c = 1) verwendet. Zum Einsatz kamen Konzentrationen von 1, 2, 3 und 4 µl BSA-Lösung (PIERCE & SUELTER 1977).

## Charakterisierung der Gefrierschutzsubstanzen

### CHROMATOGRAPHISCHE ANALYSEN

#### *Ausschlusschromatographie*

(A) Superdex™ 75 HR 10/30 (300 x 10 mm; Pharmacia) zur Bestimmung des Molekulargewichts. Als Puffer wurde 50 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ /150 mM NaCl verwendet (isokratisch); der pH wurde zwischen 7.5 und 9.5 variiert, um eine optimale Trennung zu erzielen. Die Säule wurde über eine HPLC betrieben. Die Flußrate betrug 0.5 ml/min, die Fraktionsgröße 2 ml. Detektiert wurde wahlweise bei 215, 230 oder 280 nm. Alternativ wurde auch mit 6 M Harnstoff in 50 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , pH 7.5 eluiert. Der hochmolekulare Harnstoff unterbindet Aggregatbildungen der Glycoproteine, die ein höheres Molekulargewicht vortäuschen würden.

(B) Bio-Zorbax GF-250 (250 x 7.5 mm; DuPont) zur Überprüfung der Homogenität verschiedener Chargen. Eluiert wurde mit 200 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , pH 7.0 - 8.5 (isokratisch). Die Flußrate betrug 0.5 ml/min, die Fraktionsgröße 500  $\mu\text{l}$ . Detektiert wurde bei 215 nm.

#### *Adsorptionschromatographie*

Bio-Gel TSK Phenyl-5PW (75 x 7.5 mm; BIO-RAD). Eluent A: 2 M  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (Ammoniumsulfat), Eluent B:  $\text{H}_2\text{O}$ . Die Flußrate betrug 1.0 ml/min, die Fraktionsgröße 1 ml. Detektiert wurde bei 215 nm. Die verwendeten Gradienten sind bei den entsprechenden Abbildungen angegeben.

#### *Affinitätschromatographie*

Zur Isolierung von GlcNAc enthaltenden Glycoproteinen wurde die Affinitätschromatographie eingesetzt. Als Trägermaterial wurde eine WGA-Sepharose verwendet. Die Säule wurde mit Puffer (0.1 M Tris/HCl, pH 8.0; 0.1 M NaCl; 1 mM  $\text{CaCl}_2$ ; 1 mM  $\text{MnCl}_2$ ; 1 mM  $\text{MgCl}_2$ ) äquilibriert, anschließend die Probe aufgetragen (500  $\mu\text{l}$ ; 100  $\mu\text{g/ml}$  Puffer) und mit Puffer (500  $\mu\text{l}$ ) nachgewaschen. Danach wurde mit 0.3 M GlcNAc, 1 M NaCl oder Glycin/HCl, pH 2.3 eluiert, die Fraktionen (500  $\mu\text{l}$ ) gesammelt und lyophilisiert.

### ZUCKERANALYTIK

#### *Hochauflösende Anionenaustauschchromatographie (HPAEC-PAD)*

Zum Nachweis der Monosaccharide Gal, GalNAc und GlcNAc, von Disacchariden und Glycopeptiden wurde die hochauflösende Anionenaustauschchromatographie (HPAEC) mit gepulstem amperometrischen Detektor (PAD) verwendet (Dionex Corp, Sunnyvale, Kalifornien). Bei der Anlage handelte es sich um die Dionex Bio-LC Series 5000, bestehend aus der Bio LC Gradientenpumpe und dem PAD 2 Detektor. Das Dionex Eluenten Entgasungs Modul wurde für die kontinuierliche Begasung mit Helium eingesetzt, der Druck betrug konstant 5 bar. Als mobile Phase dienten die Eluenten A:  $\text{H}_2\text{O}$ , B: 0.1 M NaOH, C: 0.5 M NaOH und D: 0.1 M NaOH/0.5 M

## Material und Methoden

---

NaAc (Natriumacetat). Diese Lösungen wurden mit einer 50%igen NaOH (Baker) und gefiltertem und entgastem H<sub>2</sub>O direkt im Eluenten-Modul angesetzt. Das NaAc (Merck) wurde ebenfalls erst im Eluenten-Modul angesetzt und in Lösung gebracht. Alle Schritte wurden zur Vermeidung der Entstehung von Natriumcarbonat unter kontinuierlicher Heliumbegasung durchgeführt. Gradient 1 (Trennung von Monosacchariden): isokratisch mit 16 mM NaOH über 20 min (verändert nach HARDY 1989). Gradient 2 (Trennung von Oligosacchariden): isokratisch mit 40 mM NaOH über 10 min, von 10 bis 20 min lineare Zunahme von NaOH auf 150 mM. Gradient 3 (Trennung von sialinsäurehaltigen Oligosacchariden; verändert nach LEE 1990; TOWNSEND & HARDY 1991):

0'	100% B	0% C
10'	100% B	0% C
40'	72% B	18% C
45'	100% B	0% C
65'	100% B	0% C

Die Proben wurden automatisch über einen Autosampler (Perkin Elmer) injiziert. Das Probenvolumen variierte zwischen 25 und 40 µl. Monosaccharide wurden mit der Säule CarboPac PA-1, Oligosaccharide mit der Säule PA-100 (beide 250 x 4.6 mm) getrennt. Die Flußrate betrug in beiden Fällen 1 ml/min bei Raumtemperatur. Als Vorsäule wurde eine CarboPac PA guard Säule (3 x 25 mm) gebraucht. Detektiert wurde durch den PAD mit einer Goldelektrode. Die PAD Operationsparameter waren: E<sub>1</sub> = +0.05V (T<sub>1</sub> = 360 msec); E<sub>2</sub> = +0.80V (T<sub>2</sub> = 120 msec); E<sub>3</sub> = -0.65V (T<sub>3</sub> = 420 msec). Die chromatographischen Daten wurden gesammelt und mittels Nelson Analytik Integrator und Dionex 410 Software geplottet.

## IMMUNOCHEMISCHE ANALYSEN

### Dot Blot

Zum Nachweis terminaler Zucker wurden digoxigenylierte Lektine (Boehringer Mannheim) eingesetzt. Die Lektine: *Peanut agglutinin* (PNA), *Wheat germ agglutinin* (WGA), *Datura stramonium agglutinin* (DSA), *Galanthus nivalis agglutinin* (GNA), *Sambucus nigra agglutinin* (SNA) und *Maackia amurensis agglutinin* (MAA). Die Probe (1 µl, 1-10 mg/ml) wurde auf Nitrozellulose aufgetropft, angetrocknet und die Membran über 30 min in TBS (Tris-HCl, 0.05 mol/l; NaCl, 0.15 mol/l; pH 7.5) in 0.5% Casein inkubiert und anschließend 2x in TBS und 1x in TBS plus Salze (TBS; MgCl<sub>2</sub>, 1mmol/l; CaCl<sub>2</sub>, 1mmol/l; pH 7.5) über 10 min gewaschen. Im folgenden wurde mit den jeweiligen Lektinen inkubiert: 10-100 µg Lektin auf 10 ml TBS plus Salze, 60 min bei Raumtemperatur. Abermals wurde mit TBS gewaschen (3mal 10 min). Für die Antikörper-Inkubation wurde das <Dig>AP-Konjugat (750U/ml) verwendet. Die Konzentration betrug 10 µl/10 ml TBS. Inkubiert wurde über 60 min bei Raumtemperatur mit anschließend dreimaligem waschen mit TBS für 10 min. Als Substrat für die alkalische Phosphatase wurde NBT (10µl/10 ml 70%iges Dimethylformamid) und X-Phosphat (12.5 µl/10 ml Dimethylformamid) verwendet, und der Färbeprozess mit H<sub>2</sub>O gestoppt.

### ***Glycosyltransferasen***

Zum Nachweis von terminalem GlcNAc (oder auch Gal) auf Dot Blots durch sequentielle Übertragung von Galaktose und Sialinsäure wurde die Probe (1 µl; 0.1 - 10 mg/ml) auf Nitrocellulose aufgetropft und angetrocknet. Es wurde für 30 min in 1% BSA/Puffer (10mM Hepes, pH 7.4; 50 mM MnCl<sub>2</sub>) blockiert und anschließend mit PBS gewaschen. Die Nitrozellulose wurde in Folie mit Galactosyltransferase (60 mU, 20 µl) und UDP-[H<sup>3</sup>]Gal (0.078 M, 20 µl) in 600 µl Puffer/1% NP40 benetzt, eingeschweißt und über 12 h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde abermals mit PBS gewaschen, die Nitrozellulose in Folie mit Sialyltransferase (10 mU, 10 µl) und CMP-NANA (1.62 mM, 3 µl) in 600 µl Puffer/1% NP40 versetzt und eingeschweißt. Es wurde über 4 h bei 37°C inkubiert und mit PBS gewaschen. Die terminale Sialinsäure wurde dann mit dem Lectin SNA, wie oben beschrieben, nachgewiesen.

## **ELEKTROPHORESEN**

### ***SDS-Gelelektrophorese und Western Blotting***

Das lyophilisierte AFGP wurde für die Bestimmung des Molekulargewichts über ein Natrium-Dodecyl-Sulfat Polyacrylamidgel (SDS-PAGE) nach LAEMMLI (1970) getrennt. Verwendet wurden 12%ige, 10%ige und 7.5%ige Gele. Die Proben wurden in Borat-Puffer, pH 9.22 (Merck) mit 10% Glycerin gelöst (20 mg/ml Puffer). Pro Kammer wurden 20 µl (400 µg Protein) eingesetzt (verändert nach DEVRIES 1986). Als Standard wurden die Eichproteine Fructose-6-phosphat-Kinase (85204), Glutamat Dehydrogenase (55562), Aldolase (39212), Triosephosphat-Isomerase (26626) und Trypsin-Inhibitor (20100) verwendet (Boehringer Mannheim). Die Spannung betrug im Sammelgel 15 mA über 15 min, im Trenngel 20 mA über 90 min.

Anschließend wurde über 45 min auf Nitrozellulose bei 100 Volt (0.2 A) (verändert nach BURNETTE 1981; TOWBIN *et al.* 1979) geblottet. Das Gel wurde nach verschiedenen Vorschriften mit Silber gefärbt (siehe unten), die Nitrozellulose für 5' in Poinceau gefärbt und anschließend mit Lektinen inkubiert (GLASS *et al.* 1981; HASELBECK & HÖSEL 1990).

### ***Tricine-Gelelektrophorese***

Das Tricine-Gel für sehr niedermolekulare Proteine (MG 3000-20000) wurde aus Sammelgel, Zwischengel (10%) und Trenngel (16.5%) gegossen. Als Anodenpuffer wurde 0.2 M Tris-HCl, pH 8.9 verwendet, als Kathodenpuffer 0.1 M Tris-HCl, pH 8.25, 0.1 M Tricine, 0.1% SDS. Das Gel wurde genauso wie ein SDS-PAGE gefahren (siehe oben) und anschließend auf Nitrozellulose geblottet (siehe oben). Als Eichproteine dienten: Glutamat Dehydrogenase (55562), Trypsin-Inhibitor (20100), Lysozyme (14300), Cytochrom C (12500) und Aprotinin (6500) (Boehringer Mannheim).

### ***Isoelektrische Fokussierung***

Zur Bestimmung der Ladungseigenschaften wurde eine horizontale Gelfokussierung mit dem PhastSystem™ von Pharmacia durchgeführt. Zur Verwendung kamen das PhastGel IEF 3-9

(Pharmacia). Es wurden je Probe 2 µl (20 µg Glycoprotein) aufgetropft, der Standard (BioRad) wurde mit 1 µl (10 µg) aufgegeben. Für die Trennung wurde die Methode 1 (PhastSystem™ Separation Technique File No. 100) angewendet, und die Gele anschließend Silber gefärbt (BLUM *et al.* 1987).

### Silberfärbung von Gelen

(A) Das Gel wurde 2 h in Essigsäure/Methanol/H<sub>2</sub>O (1:4:5, v/v/v), 30 min in Essigsäure/Ethanol/H<sub>2</sub>O (5:10:85, v/v/v) und 2x15 min in Ethanol/H<sub>2</sub>O (1:9, v/v) bei langsamen Schütteln fixiert. Anschließend wurde fixiert: 1 min in Lösung A (50 ml H<sub>2</sub>O; 25 µl Formalin (37%ig); 21 µl Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (43%ig)); 3mal in H<sub>2</sub>O waschen; 6 min in Lösung B (50 ml Silbernitrat (0.2%ig); 25 µl Formalin (37%ig)); 2mal in H<sub>2</sub>O waschen. Entwickelt wurde in Lösung C (50 ml Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (6%ig); 25 µl Formalin (37%ig); 0.5 µl Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (43%ig)) und mit H<sub>2</sub>O gewaschen. Gestoppt wurde mit Essigsäure/Glycerin/H<sub>2</sub>O (3:5:92, v/v/v) (BLUM *et al.* 1987).

(B) Alternativ dazu wurde die PAS-Färbung angewandt. Das Gel wurde 2-3 h in 100 ml 25% Isopropanol/10% Essigsäure (v/v), 2-10 h in 10% Isopropanol/ 10% Essigsäure (v/v) und 1 h in 10% Essigsäure fixiert. Gefärbt wurde zunächst 3 h in 0.7% H<sub>5</sub>JO<sub>6</sub> (Perjodsäure) in 5% Essigsäure; dann 2-3 h in 0.2% Na-metabisulfit in 5% Essigsäure, 12-18 h in Schiffreagenz (Merck) im Dunkeln und in 0.1% Na-metabisulfit in 0.01 N HCl. Die Lösung wurde so lange gewechselt, bis keine Formaldehydreaktion mehr nachweisbar war.

## ENZYMATISCHE ANALYSEN

### Morgan - Elson Test

Das Disaccharid Galβ1->3GalNAc des bekannten AFGP kann durch das Enzym *Endo-α-N-Acetylgalactosaminidase* abgespalten werden, und die freigesetzte Menge Zucker mit Hilfe der Morgan - Elson Reaktion bestimmt werden. Es wurden 40 µl der Glycoprotein-Lösung (4 mg/ml), 50 µl 0.2 M NaCac, pH 6.0 und 10 µl Enzym in einem Sarstedt-Röhrchen über 30 min bei 37°C inkubiert. Nach der Inkubation wurde die Reaktion mit 50 µl 0.8 M H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, pH 9.0 und 150 µl H<sub>2</sub>O gestoppt und die Lösung für 3 min bei 100° C gekocht. In einem Eisbad wurde der Ansatz abgekühlt und anschließend mit 1500 µl 1%iger DMABA (Ehrlich's Reagenz: *p*-Dimethylaminobenzaldehyd) unter Morgan-Elson Bedingungen für die Farbreaktion behandelt (REISSIG *et al.* 1955). Der Ansatz wurde für 20 min bei 37°C inkubiert und anschließend die Absorbtion bei 585 nm gemessen. Als Standard wurden Gal, GalNAc und GlcNAc verwendet. Die Farbreaktion wurde mit Hilfe des Standards als Maß für die Zuckerkonzentration benutzt.

### Enzymatische Verdaus

Zur Strukturaufklärung der Glycoproteine wurden die AFGP mit folgenden Enzymen behandelt: *Endo-α-N-Acetylgalactosaminidase*, *β-Hexosaminidase*, *Endoglycosidase D*, *Endoglycosidase F*, *Endoglycosidase H*, *β-Galactosidase* (Stierhoden), *Endo-β-Galaktosidase*, *N Glycosidase F* und

*Chitinase* (alle Boehringer Mannheim). Im Ansatz wurden 40 µl AFGP-Lösung (4 mg/ml), 10 µl Enzym, 10 µl 0.5 M NaAc-Puffer, pH 5.5 und 40 µl H<sub>2</sub>O bei 37°C über Nacht (15 h) inkubiert. Die Verdauungen wurden in Eppendorf-Gefäße dialysiert. Außen- und Innendialysat wurden eingeeengt und mit 100 µl H<sub>2</sub>O aufgenommen. Beide Dialysate wurden getrennt auf ihre Zuckerzusammensetzung hin mit der HPAEC-PAD analysiert. Bei der Behandlung mit *N-Glycosidase F* wurden die Glycoproteine (100 µg) in 0.5% SDS gelöst und 2 min gekocht. Der Probe wurden NaPO<sub>4</sub>, 20 mmol/l, pH 7.2; EDTA, 50 mmol/l; Natriumazid, 10 mmol/l; 0.5% Nonidet P-40 zugesetzt. Nach 2 min Kochen und anschließender Abkühlung wurden 2U *N-Glycosidase F* zugefügt und bei 37°C über 15 h inkubiert. Die Probe wurde über Centrikon 10 zentrifugiert, das Filtrat lyophilisiert, mit 100 µl H<sub>2</sub>O aufgenommen und zur weiteren Zuckeranalytik aufbewahrt.

#### ***Trypsin Behandlung***

100 µg des Glycoproteins wurden in 95 µl 100 mM Tris-HCl, pH 8.0, gelöst und mit 5 µl Trypsin (1 mg/ml Puffer; sequencing grade, Boehringer Mannheim) behandelt. Es wurde über 15 h bei 37°C inkubiert. Der Verdau wurde mit der Reversed Phase-HPLC analysiert.

#### ***Pronase Behandlung***

450 µl Probe (100 µg; 0.1 M Tris-HCl, pH 8.0) und 50 µl Pronase (10 mg/ml 0.1 M Tris-HCl, pH 8.0; 1mM CaCl<sub>2</sub>) wurden bei 37°C über 48 h inkubiert. Nach 24 h und 36 h wurde weitere Pronase hinzugefügt. Die Pronase war zuvor für 30 min bei 60°C vorinkubiert worden. Der pH wurde mehrmals kontrolliert und gegebenenfalls mit NaOH auf 8.0 nachgestellt. Zur Verhinderung von Bakterienwachstum wurde Toluol aufgetropft. Als Standard wurde CPY verwendet. Die Proben wurden eingetrocknet und mit der HPAEC-PAD analysiert bzw. mit WGA auf GlcNAc-haltige Peptide geprüft. Zur Trennung des Glycopeptids Asn-GlcNAc von dem Aminosäurengemisch wurde die Probe über eine WGA-Sepharose aufgetrennt (siehe oben). Als Standard diente das Glycopeptid Asn-GlcNAc (Sigma).

### **CHEMISCHE ANALYSEN**

#### ***Mild-alkalische Hydrolyse***

Zur β-Elimination wurden 100 µg des Glycoproteins in 200 µl 0.1 N NaOH/1M NaBH<sub>4</sub> in einem Eppendorfgefäß gelöst und über 24 h bei 37°C inkubiert. Die Probe wurde mit 50 µl 10%iger Essigsäure neutralisiert (bis pH 5). Das Borhydrid wurde durch viermalige Behandlung der Probe mit Methanol (1% Essigsäure, v/v) verflüchtigt. Dazu wurde die Probe jeweils bei 60°C mit Helium begast (TORRES & HART 1984). Die getrocknete Probe wurde mit 100 µl H<sub>2</sub>O aufgenommen, über einen Kationenaustauscher AG 50W-X12, 20-50 mesh (H<sup>+</sup>-Form; 1 ml Bettvolumen; Bio-Rad) entsalzt, lyophilisiert und mit H<sub>2</sub>O aufgenommen zur weiteren Zuckeranalytik mit der HPAEC-PAD. Alternativ wurden 100 µg der Probe in 200 µl 0.1 N NaOH ohne NaBH<sub>4</sub> gelöst und über 24 h bei 37°C inkubiert (SPIRO 1972). Die Probe wurde weiterhin wie oben beschrieben bearbeitet.

### ***stark-alkalische-Hydrolyse***

Zur Abspaltung von N-glycosidisch gebundenem GlcNAc (auch O-glycosidisch: BHAVAN-ANDAN *et al.* 1990) wird die stark-alkalische-Hydrolyse angewandt (LEE & SOCCA 1972). Die Probe (100 µg) wurde mit 1 M NaOH/1 M NaBH<sub>4</sub> versetzt und für 4 h bei 100°C inkubiert. Nach dem Abkühlen wurde die Lösung mit 2 M Essigsäure neutralisiert (pH 5) und auf einer Sephadex G-15 Säule getrennt (Eluent 0.05 M Essigsäure). Die Zucker enthaltende Fraktion wurde re-N-acetyliert mit 10% Essiganhydrid in Ethanol (KROTKIEWSKI *et al.* 1989) und das Produkt auf derselben Säule entsalzt (Eluent H<sub>2</sub>O). Die Probe wurde eingengt und mit 100 µl H<sub>2</sub>O aufgenommen.

### ***stark-saure-Hydrolyse***

200 µl der Probe (0.5 mg/ml) und 200 µl 4 M TFA wurden über 4 h bei 100°C in einem geschlossenen Glasröhrchen gekocht (verändert nach HARDY *et al.* 1988). Die Probe wurde anschließend in einer "speed-vac" eingetrocknet und mit 1 ml H<sub>2</sub>O aufgenommen. Als Standard dienten Gal, Glc, GalNAc und GlcNAc. Diese Zucker wurden ebenfalls (50 µl einer 10 mM Stammlösung) mit 150 µl H<sub>2</sub>O und 200 µl 4 M TFA versetzt und wie oben beschrieben behandelt. Die Zuckeranalytik erfolgte mit der HPAEC-PAD.

### ***mild-saure-Hydrolyse***

Zur Abspaltung des Peptid GlcNAc-Asn wurden 100 µl Probe (1 mg/ml) mit 100 µl 4 M HCl versetzt und bei 100°C über 20 min gekocht. Anschließend wurde das Gemisch in der "speed-vac" eingetrocknet und mit 50 µl H<sub>2</sub>O aufgenommen. Das Peptid wurde mit der HPAEC-PAD und der Säule PA-100 getrennt und analysiert.

### ***schwefelsaure-Hydrolyse***

Zur Abspaltung von Sialinsäuren (NANA) wird die schwefelsaure-Hydrolyse eingesetzt. 100 µg Glycoprotein wurden in 200 µl 0.1 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> gelöst und bei 80°C über 1 h hydrolysiert (verändert nach TOWNSEND *et al.* 1989). Anschließend wurde die Probe mit 50 µl 0.4 N NaOH neutralisiert, und die Zucker von den Peptiden durch Dialyse oder Zentrifugation mit Centrikon 10 getrennt. Auftrennung und Charakterisierung der Sialinsäuren erfolgte ebenfalls mit HPAEC-PAD.

## AMINOSÄURENANALYSE

### ***Aminosäurezusammensetzung***

Zur Bestimmung der Aminosäurezusammensetzung wurde der Derivatizer 420A, die HPLC 130A und das Data Analysis Module 920A (alle von Applied Biosystems) verwendet. Probenpuffer, Eluenten, Gradient und HPLC-Einstellungen nach BELLO *et al.* (1989) kamen zum Einsatz. Zur Identifizierung von L-Serin und GlcNAc wurde manuell hydrolysiert und derivatisiert. Die Proben (2000 pMol im Standard) wurden über 18, 24 bzw. 48 h bei 110°C mit einer 6 N HCl-Lösung hydrolysiert (Gasphasenhydrolyse), anschließend mit PITC derivatisiert, und in Puffer



(150 mM NaAc, pH 5.2; 0.2% K<sub>3</sub>-EDTA) aufgenommen. Für die HPLC (Modell 130A; Applied Biosystems) wurde die Säule PTC C18 (220x2.1 mm; Applied Biosystems) benutzt. Die mobile Phase bestand aus A: 300 mM NaAc, pH 5.28 und B: 70% Acetonitril/32 mM NaAc, pH 6.2. Es wurden 200 µl (500 pMol) injiziert und bei 254 nm detektiert. Die Flußrate betrug 300 µl/min, die Säulentemperatur 39°C (verändert nach DUPONT *et al.* 1989). Es wurde ein Aminosäurenstandard H von Pierce (Illinois, USA) verwendet, L-Serin war von Sigma.

#### **Aminosäuresequenzierung**

Die Sequenzierung wurde an einem gepulstem Flüssigphasen-Sequenzierer Modell 477A (Applied Biosystems) nach der Edman Degradation durchgeführt. Aminosäurenstandard Lösung H und Triethylamine waren von Pierce, alle anderen Chemikalien von Applied Biosystems.

### SPEKTROSKOPISCHE ANALYSEN

#### **Zirkulardichroismus (CD)**

Zur Bestimmung des Spektrums in zirkular polarisiertem Licht wurde das Spectropolarimeter Jasco J-600 (Japan Spectroscopic Co., Ltd.) mit einer 450 W Xenon Lampe verwendet. Das Spektrum wurde im Bereich von 180 - 400 nm gemessen. Die Scangeschwindigkeit betrug 10 nm/min. Die Probe (0.5 mg/ml 50 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7.4) wurde in einer temperierbaren Quarzküvette mit einem Durchmesser von 0.05 mm vermessen. Die molare Elliptizität ergibt sich aus dem Zusammenhang

$$[\theta] = \theta^{\circ} m / 10 \lambda C$$

wobei  $\theta^{\circ}$  die Elliptizität in Grad,  $m$  den Hauptwert,  $\lambda$  den Durchmesser der Quarzküvette in cm und  $C$  die Probenkonzentration in g/cm<sup>3</sup> darstellt. Das CD Spektrum der Glycoproteine wurde mit Hilfe des FORTRAN Programms CONTIN (PROVENCHER 1982a, b) nach der Methode von PROVENCHER & GLÖCKNER (1981) ausgewertet. Hierbei wird ein Spektrum aus 16, aus der X-ray Kristallographie bekannten Proteinspektren kalkuliert. Vergleichend wurde noch eine Interpretation der Daten nach den Methoden von GREENFIELD & FASMAN (1969), sowie HENNESSEY & JOHNSON (1981) durchgeführt.

#### **Spektralfluorimetrie**

(A) Bestimmung der Extinktionswerte im Wellenlängen-Scan mit dem Dioden-Array-Spektralphotometer DU 7400 (Beckmann) zur Bestimmung des kontinuierlichen Spektrums. In eine Quarzküvette wurden 1 ml der Probe (100 µg/ml) pipettiert und die Absorption im Bereich von 180 bis 400 nm bei Raumtemperatur gemessen. Abgeglichen wurde mit H<sub>2</sub>O.

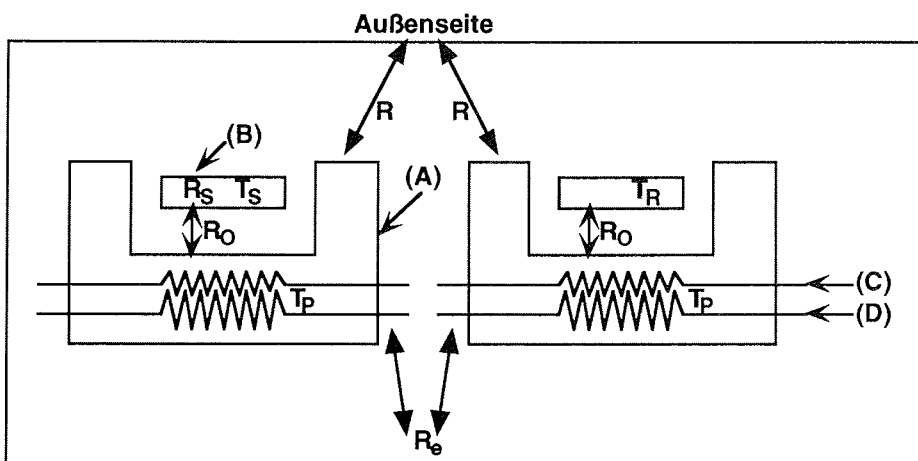
(B) Das Fluoreszenz-Spektrum zur Bestimmung der Denaturierungstemperatur wurde mit dem Fluorescence Spectrophotometer F-4000 (Hitachi, Ltd. Japan) bestimmt. Der Puffer (0.1 M Tris/HCl, pH 8.0) wurde in einer Quarzküvette (1 ml) mit Rührer vortemperiert (47°C und 65°C).

Bei konstanter Temperatur würden 10 µl Probe (5 mg/ml) zupipettiert und die Absorbtion bei 360 nm über 20 min gemessen.

## KALORIMETRISCHE ANALYSEN

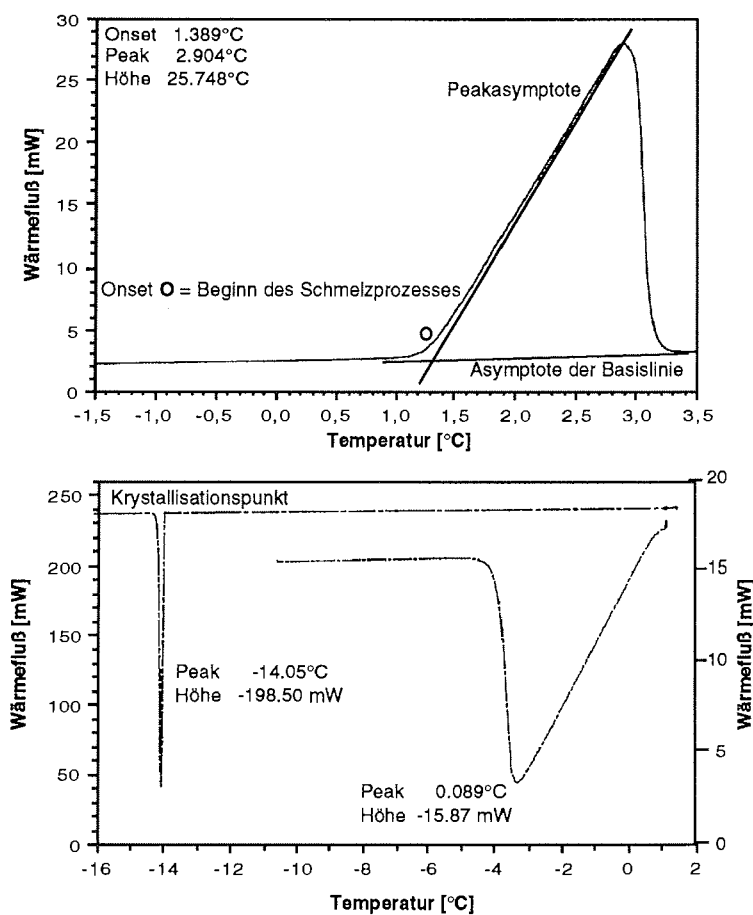
### Differential scanning calorimetry (DSC)

Die DSC (differential scanning calorimetry) ist eine neu entwickelte Methode (HIRSH *et al.* 1985; PARODY-MORREALE *et al.* 1986), die vor allem verwandt wird, um den Denaturierungspunkt von Proteinen zu bestimmen. Zur Bestimmung der thermalen Hysterese von Gefrierschutzsubstanzen wurde sie erst in den letzten Jahren an dem AFP von *Tenebrio molitor* eingesetzt (HANSEN & BAUST 1988a, b; 1989), zur Bestimmung der Hysterese von Gefrierschutzsubstanzen polarer Fische nur von HANSEN *et al.* (1991). Aus diesem Grund soll etwas ausführlicher auf diese Methodik eingegangen werden.



**Abbildung 5:** Schematische Darstellung der Messkammer des DSC. (A) Probenkammer aus Platin; (B) Probenpfännchen aus Aluminium; (C) Widerstandsthermometer (Temperatursensor); (D) Heizelement; (R) Wärmewiderstand der Probenkammer zur Außenseite; (Re) Eigenwiderstand der Stromquelle; (Rs) interner Wärmewiderstand der Probe; (Ro) Wärmewiderstand zwischen Probenpfännchen und Probenkammer; (Tp) Sensortemperatur; (Tr) Temperatur der Referenzprobe; (Ts) Temperatur der Probe.

Um Ergebnisse der kalorimetrischen Messungen am DSC interpretieren zu können, muß dieses Gerät geeicht werden. Dies geschieht üblicherweise mit destilliertem Wasser, gemessen gegen Luft (Abbildung 5 und 6). Die Probe wird auf -40°C gekühlt, dann auf +10°C erwärmt (1°C/min), um wieder auf -40°C gekühlt zu werden. Während des Messvorgangs wurde der relative Wärmefluß (in mW) kontinuierlich gemessen. Man erhält während des Schmelzprozesses eine endotherme Reaktion, beim Gefrieren kristallisiert die Probe aus, eine exotherme Reaktion ist zu beobachten.



**Abbildung 6:** Kalibrierung des DSC mit destilliertem Wasser. Destilliertes Wasser (5  $\mu$ l) wurde in ein Aluminiumpfännchen pipettiert und auf  $-40^{\circ}\text{C}$  gefroren. Anschließend wurde die Probe auf  $+10^{\circ}\text{C}$  erwärmt, das Wasser schmilzt vollständig (Kurve oben). Der Schmelzpunkt ist festgelegt durch den "Onset" O des Schmelzprozesses. Das Wasser ist vollständig geschmolzen, wenn die Kurve zur Basislinie zurückkehrt ( $+3.37^{\circ}\text{C}$ ). Die Probe wurde nun wieder eingefroren und zu verschiedenen "Haltetemperaturen" (annealing temperature) erwärmt (5 min), um dann wieder abgekühlt zu werden (Kurven unten). Eis war bei  $1.3^{\circ}\text{C}$  noch vorhanden und die Probe gefriert beim Abkühlen sofort wieder (rechts). Kein Eis war mehr bei einer "Haltetemperatur" von  $1.4^{\circ}\text{C}$  (5 min) vorhanden. Durch Abkühlen der eisfreien Lösung erhält man die Krystallisationstemperatur (links). Sie beträgt bei Wasser  $-14.05^{\circ}\text{C}$  ( $\pm 0.4^{\circ}\text{C}$ ,  $n=3$ ). Die y-Achse gibt den Wärmefluß in mW wieder.

## Material und Methoden

---

Während bei den bisher üblichen visuellen Methoden zur Bestimmung der Gefrierschutzaktivität das Ende des Schmelzprozesses für die Temperaturkalibrierung benutzt wird (DEVRIES 1982; SLAUGHTER & HEW 1981), dient bei dem DSC der Beginn des Schmelzens, der "Onset" [O], zur Kalibrierung. D.h., im DSC ist auch noch Eis in der Probe, wenn die Temperatur über dem Onset (Schmelzpunkt) liegt.

Der Onset des Schmelzprozesses (Abbildung 6a) berechnet sich aus der Asymptote der Basislinie und der Peakasymptote. Bei destilliertem Wasser liegt der Onset bei 0°C, aber erst bei +3.4°C ist die Probe komplett aufgetaut. Für die Analysen wird bis zu einer bestimmten "Haltetemperatur" (*annealing temperature* = AT) erwärmt, und die Temperatur für 5 min gehalten. So ist gewährleistet, daß sich die Probe der Temperatur des Gerätes anpasst. Bei diesem Verfahren ist in dem destillierten Wasser bei 1.3°C noch Eis vorhanden, bei 1.4°C dagegen alles aufgetaut, das destillierte Wasser unterkühlt beim Gefrieren und kristallisiert bei ungefähr -14°C aus (Abbildung 6b). Der Eisgehalt in der Probe wird mit Hilfe des Energieflußdiagramms berechnet.

Bei den Messungen kam das DSC 7 des Perkin-Elmer 7 Series Thermal Analysis System (Perkin Elmer Corp.) zum Einsatz (Abbildung 5). Die Probe wurde in H<sub>2</sub>O gelöst (10 bis 50 mg/ml). 5µl der Probe wurden in Aluminiumpfännchen (10 µl) pipettiert (B in Abbildung 5) und in dem DSC-7 placiert. Die Probe wurde auf -40°C abgekühlt, auf +10°C erwärmt (1°C/min), und wieder auf -40°C gekühlt (1°C/min). Schmelzpunkt und Krystallisationstemperatur wurden bestimmt. Nun wurde wieder auf eine bestimmte *annealing temperature* (AT) erwärmt (1°C/min), 5 min die Temperatur gehalten und abgekühlt (1°C/min). Die Gefrierschutzaktivität berechnet sich aus dem Punkt des Eiswachstums minus der "Haltetemperatur":

$$\text{onset} - \text{annealing temperature} = \text{thermale Hysterese.}$$

## ERGEBNISSE

Der Ergebnissteil ist in zwei Teile gegliedert. Im ersten Teil werden die Untersuchungen zum Nachweis und zur Zusammensetzung von Gefrierschutzsubstanzen in verschiedenen polaren Fischarten dargestellt. Der Schwerpunkt liegt auf Untersuchungen am AFGP. Im zweiten Teil der Arbeit wird detailliert auf den Sonderfall *Pleuragramma antarcticum* eingegangen. Der Schwerpunkt liegt dabei auf der Isolierung und Charakterisierung einer neuen Gefrierschutzsubstanz.

### Der AFGP-Gehalt

#### DER ROHEXTRAKT DER GEFRIERSCHUTZSUBSTANZEN

Unter der Verwendung proteochemischer Methoden wurde bei den ausgewählten Arten nach makromolekularen Gefrierschutzsubstanzen gesucht. Dazu wurden immer auf die gleiche Art und Weise diese Substanzen aus Fischen der Polarmeere isoliert, charakterisiert und in ihrer chemischen Zusammensetzung, sowie ihrem Mechanismus der Gefrierpunktserniedrigung miteinander verglichen. Es wurden im Folgenden diejenigen Fraktionen gesammelt und untersucht, die (1) in 50%igem Ethanol und 10%iger TCA löslich sind, (2) bei 215 nm und nicht bei 280 nm detektiert werden, (3) positiv mit Lektinen reagieren (Glycoproteine) und (4) eine thermale Hysterese bewirken.

Der erste Schritt der Aufreinigung bestand aus der Extraktion der Gefrierschutzsubstanzen. Auf Grund der Tatsache, daß Gefrierschutz(glyco)proteine bei einer Behandlung mit 50%igem Ethanol und 10%iger TCA stabil sind und in Lösung gehen, während die meisten anderen Proteine ausfallen (FEENEY & YEH 1978; VAN VOORHIES *et al.* 1978; SCHNEPPENHEIM 1978), finden wir im Rohextrakt nur noch wenige Verunreinigungen. Das Lyophilisat dieses Rohextrakts kann daher als grobes Maß für die absoluten Gefrierschutzmengen dienen. Weitere chemische Eigenschaften der Gefrierschutzglycoproteine (BURCHAM *et al.* 1984; DEVRIES 1986), wie die starke Absorption bei 215 nm oder die Spezifität der Anfärbung (keine Coomassie oder Amido Schwarz Anfärbung), konnten während der Isolierung zur Identifizierung genutzt werden. In Tabelle 2 sind die untersuchten Fische, systematisch geordnet, und die absoluten und relativen Mengen des Rohextrakts aufgelistet. Die größten Mengen konnten bei *T. pennellii* (0.871% Frischgewicht), den Channichthyiden *C. wilsoni* (0.488%), *P. macropterus* (0.448%) und *C. myersi* (0.415%) und dem arktischen *A. glacialis* (0.414%) nachgewiesen werden. Bei dem Nototheniiden *T. eulepidotus* wurden im Vergleich zu den anderen antarktischen Notothenioiden die geringsten Mengen an Rohextrakt extrahiert. Die niedrigsten Werte insgesamt sind bei *G. opisthopterus* (0.039%) und *M. holotrachys* (0.032%) zu finden, wobei man davon ausgehen muß, daß es sich hier - wie auch bei den anderen nicht-notothenioiden Fischen - nicht um AFGP handelt (siehe auch unten).

**Tabelle 2:** Rohextrakte der untersuchten Arten. Die Mengen sind absolut [mg] und relativ (g/kg Frischgewicht FRG) angegeben.

Art	n	FRG [g]	Rohextrakt [mg]	Rohextrakt [g/kg FRG]
<i>Arctogadus glacialis</i>	4	206.5	855.0	4.14
<i>Liparis fabricii</i>	1	15.2	13.8	0.91
<i>Icelus bicornis</i>	2	10.4	8.3	0.80
<i>Triglops nybelini</i>	1	15.1	11.5	0.76
<i>Gobionotothen gibberifrons</i>	Leber	26.1	48.6	1.86
<i>Lepidonotothen kempfi</i>	6	230.0	860.0	3.74
<i>Aethotaxis mitopteryx</i>	1	202.9	377.8	1.86
<i>Dissostichus mawsoni</i>	Leber	167.4	321.1	1.92
<i>Trematomus bernacchii</i>	1	220.0	680.8	3.09
<i>Trematomus pennellii</i>	1	127.0	1106.6	8.71
<i>Trematomus eulepidotus</i>	2	180.0	170.0	0.94
<i>Trematomus lepidorhinus</i>	4	611.0	1420.0	2.32
<i>Trematomus loennbergii</i>	1	32.9	63.9	1.94
<i>Arteidraco loennbergi</i>	12	65.0	167.7	2.58
<i>Dolloidraco longedorsalis</i>	25	203.0	588.7	2.90
<i>Pogonophryne marmorata</i>	1	108.0	307.6	2.85
<i>Pogonophryne scotti</i>	1	120.0	335.4	2.79
<i>Bathyraco marri</i>	10	265.0	493.0	1.86
<i>Gerlachea australis</i>	2	64.8	174.5	2.69
<i>Gymnodraco acuticeps</i>	1	130.0	430.3	3.31
<i>Racovitzia glacialis</i>	2	94.8	179.4	1.89
<i>Chaenodraco wilsoni</i>	1	70.6	344.5	4.88
<i>Chionodraco hamatus</i>	1	16.2	67.3	4.15
<i>Chionodraco myersi</i>	4	193.1	523.0	2.71
<i>Cryodraco antarcticus</i>	1	194.0	471.0	2.43
<i>Dacodraco hunteri</i>	1	75.6	136.0	1.80
<i>Neopagetopsis ionah</i>	Leber	23.0	47.6	2.07
<i>Pagetopsis macropterus</i>	1	25.6	114.8	4.48
<i>Pagetopsis maculatus</i>	9	265.0	340.0	1.28
<i>Lycenchelys hureaui</i>	1	240.0	160.4	0.67
<i>Bathyraja maccaini</i>	Leber	56.5	25.4	0.45
<i>Paraliparis somovi</i>	3	102.8	132.0	1.28
<i>Muraenolepis marmoratus</i>	1	112.6	114.9	1.02
<i>Macrourus holotrachys</i>	6	165.0	52.7	0.32
<i>Gymnoscopelus opisthopterus</i>	3	74.6	27.8	0.37

## DIE AFGP-FRAKTIONEN

Die nach der alkoholischen Extraktion aus den Fischen bzw. Geweben erhaltenen Proteine wurden durch Ionenaustausch an verschiedene Ionenaustauscher gebunden und mit einem Puffer eluiert. Dieses Reinigungskonzept ist in Anlehnung an das für das AFGP entwickelte (DEVRIES *et al.* 1970; VAN VOORHIES *et al.* 1978). Im ersten Schritt wurde die DEAE-Ionenaustauschchromatographie angewendet, mit dem Schwerpunkt der Isolierung des AFGP. Daraus resultierten zwischen einem und drei Eluaten (I - III), die jeweils unterschiedlich geladene Proteine enthalten. In Abbildung 7a-e sind die Chromatogramme der Aufreinigung der Rohextrakte an diesem Ionenaustauscher dargestellt. Exemplarisch werden die Chromatogramme der Arten *A. mitop-*

*teryx*, *L. kempi*, *B. marri*, *C. antarcticus* und *M. holotrachys* gezeigt. Sie zeigen verschiedene Variationen der Zusammensetzung der Rohextrakte, wie sie bei der vorgelegten Arbeit nachgewiesen werden konnten. Detektiert wurde bei 215 und 280 nm. Bekannte Gefrierschutzsubstanzen werden sehr gut bei 215 nm, abgeschwächt bei 230 nm detektiert, und sind bei 280 nm - im Gegensatz zu vielen anderen Proteinen - nicht mehr detektierbar (siehe oben). Den bislang bekannten Gefrierschutzproteinen polarer Fische fehlen die für die Absorption bei 280 nm verantwortlichen aromatischen Aminosäuren. Verunreinigungen können so schnell erkannt werden.

Bei den Rohextrakten der meisten Fischarten dominiert der Peak I, der zwischen 3 und 7 min eluiert. Diese Substanzen binden nur sehr schwach an die Säule und weisen geringe Ladungseigenschaften auf. Bei ihnen handelt es sich um das bekannte Gefrierschutzglycoprotein AFGP, wie es schon DEVRIES *et al.* (1970) an nototheniiden Fischen des McMurdo Sounds und VAN VOORHIES *et al.* (1978) an *B. saida* der Arktis zeigen konnten. Die hochmolekulare AFGP (1-5) eluieren früher als die kleineren AFGP (6-8). Die Arbeitsgruppe um DeVries trennte diese beiden Fraktionen, indem sie an einem Ionenaustauscher zuerst mit einem niedermolekularen Puffer (2.5 mM Tris/HCl, pH 9.6) eluierten und anschließend mit 50 mM Tris/HCl, pH 9.6. Mit dem hier verwendeten Puffer (20 mM Tris/HCl, pH 9.5) wurde ein Mittelweg gewählt, mit dem NaCl-Gradient ist zudem gewährleistet, daß wirklich alle bindenden Substanzen eluieren. Die Auftrennung des Rohextrakts von *A. mitopteryx* (Abbildung 7a) zeigt außer dem dominierenden Peak I nur noch kleine Verunreinigungen, auf die nicht weiter eingegangen werden wird. Dieses Chromatogramm ist typisch für die Rohextrakte der meisten Nototheniidae (Ausnahmen *P. antarcticum* und *L. kempi*), die Artedidraconidae (Ausnahme *D. longedorsalis*) und Bathydraconidae (Ausnahme *B. marri*). Ebenfalls konnte es bei dem arktischen Gadiden *A. glacialis* beobachtet werden. Daraus läßt sich unter Berücksichtigung der Untersuchungen an nototheniiden Fischen der Antarktis (u.a. DEVRIES *et al.* 1970) und Gadiden der Arktis (u.a. VAN VOORHIES *et al.* 1978) folgern, daß diese Arten nur das AFGP mit dem Disaccharid Gal $\beta$ 1->3GalNAc (siehe unten) als Gefrierschutzsubstanz besitzen.

Der Rohextrakt des Nototheniiden *L. kempi* konnte in 3 Hauptfraktionen getrennt werden (Abbildung 7b). Nach Peak I eluieren die größten Mengen mit 0.06 M NaCl (Peak II), geringere mit 0.12 M NaCl (Peak III). Peak I und III zeigen ähnlich hohe Konzentrationen (Tabelle 3). Dagegen ist das Chromatogramm des Rohextrakts von *C. antarcticus* (Abbildung 7c) klar dominiert durch den Peak des AFGP (I). Auffallend ist im Vergleich mit dem Chromatogramm von *L. kempi*, daß zwischen 2'-3' (hochmolekulare AFGP 1-4) nur geringe Mengen eluieren, während zwischen 6' und 9' (niedermolekulare AFGP 5-8) die größte Menge eluiert. Die Peaks II bis IV sind Verunreinigungen (keine thermale Hysterese), die nicht weiter analysiert wurden. Diese Zusammensetzung des Rohextraktes bestätigte sich auch bei der Aufreinigung der Rohextrakte der übrigen Channichthyiden. Der Rohextrakt des Bathydraconiden *B. marri* (Abbildung 7d) zeigt eine heterogene Zusammensetzung. Zwischen 2' und 7' eluiert das AFGP. Die niedermolekularen Substanzen dominieren. Eine zweite Fraktion (II) wird mit 0.06 - 0.13 M NaCl eluiert, eine dritte (III) nach 30 min mit 0.60 M NaCl. Der Rohextrakt des Artedidraconiden

*D. longedorsalis* zeigt eine ähnliche Zusammensetzung, lediglich die Fraktion III fehlt (hier nicht dargestellt).

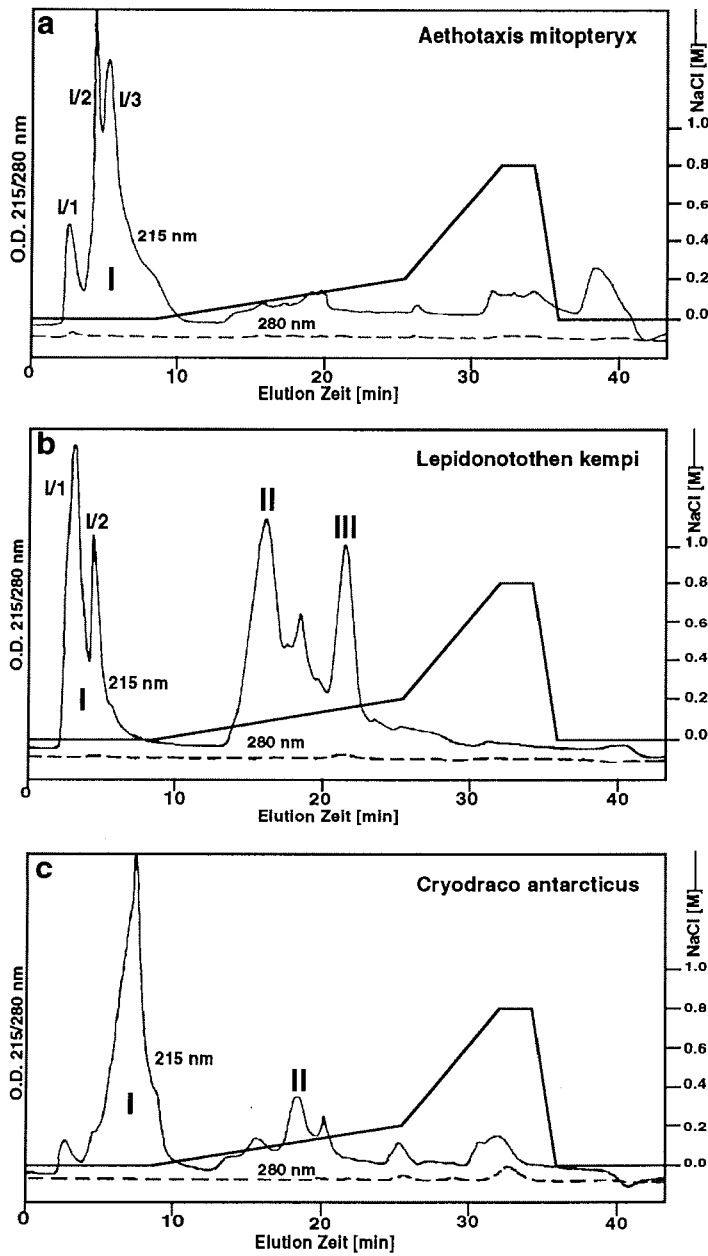
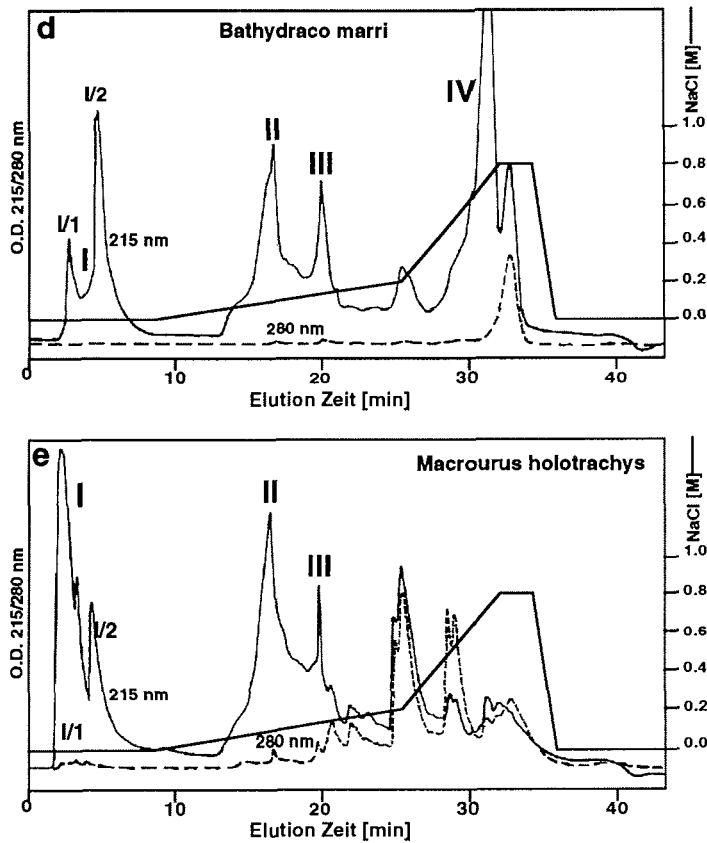


Abbildung 7a-c: Anionenaustauscherchromatographie (DEAE-TSK) der Rohextrakte von (a) *A. mitopteryx*, (b) *L. kempfi* und (c) *C. antarcticus*.





**Abbildung 7a-e:** Anionenaustauscherchromatographie (DEAE-TSK) der Rohextrakte von (a) *A. mitopteryx*, (b) *L. kempi*, (c) *C. antarcticus*, (d) *B. marri* und (e) *M. holotrachys*. Dargestellt sind die Absorbance-Kurven für 215 und 280 nm. Als Anfangsbedingung wurde mit 20 mM Tris-HCl, pH 9.5 eluiert. Die Zeitereignisse des NaCl-Gradienten (% Eluent B: 20 mM Tris-HCl, 1 M NaCl, pH 9.5) sind: 0 min, 0%; 8 min, 0%; 26 min, 20%; 32 min, 80%; 34 min, 80%; 36 min, 0%; 42 min, 0%. Es wurden 200  $\mu$ l injiziert, die Flußgeschwindigkeit betrug 1 ml/min, die Empfindlichkeit 1.28.

Ein sehr inhomogenes Bild ergibt sich bei der Aufreinigung der Rohextrakte der nicht-notothenioiden Fische sowohl der Antarktis als auch Arktis, hier am Beispiel des Macrouriden *M. holotrachys* dargestellt (Abbildung 7e). Gefrierschutzsubstanzen eluieren kurz nach dem Ausschluß (I), wie es auch bei den Rohextrakten der Notothenioidei zu beobachten ist. Allerdings konnten diese Substanzen bislang nicht eindeutig als Glycoproteine identifiziert werden. Es würde sich in diesem Fall um einen Erstrnachweis von Glycoproteinen als Gefrierschutz bei nicht-notothenioiden Fischen handeln. Eine weitere Fraktion eluiert mit 0.1 bis 0.2 M NaCl. Auch von diesen Substanzen steht eine Charakterisierung noch aus. Bei den Substanzen, die nach 18 min eluieren (> 0.2 M NaCl) handelt es sich vermutlich um Verunreinigungen (detektierbar bei 280 nm). Die

## Ergebnisse

Zusammensetzung der Rohextrakte der antarktischen *L. hureaui*, *P. somovi*, *M. marmoratus* und *G. opisthopterus* und der arktischen *I. bicornis*, *T. nybelini* und *L. fabricii* ist vergleichbar und soll hier nicht weiter gezeigt werden.

**Tabelle 3:** AF (antifreeze) Fraktionen nach der Auftrennung der Rohextrakte mit der DEAE-TSK Anionenaustauscherchromatographie (siehe auch Abbildung 7a-e). Die Mengen sind absolut [mg] und relativ (mg/kg Frischgewicht FRG) angegeben.

Art	AF I [mg]	AF I [mg/kg]	AF II [mg]	AF II [mg/kg]	AF III [mg]	AF III [mg/kg]
<i>A. glacialis</i>	589.9	2856.9				
<i>L. fabricii</i>	1.6	106.2	3.9	259.7	1.4	95.3
<i>I. bicornis</i>	1.5	146.2	2.0	188.7	0.4	40.7
<i>T. nybelini</i>	2.1	136.7	3.7	243.1	0.9	59.4
<i>G. gibberifrons</i>	7.0	269.7				
<i>L. kempii</i>	146.2	635.6	215.0	934.8	137.6	598.3
<i>A. mitopteryx</i>	72.2	355.6				
<i>D. mawsoni</i>	176.3	1053.1				
<i>T. bernacchii</i>	224.7	1021.2				
<i>T. pennellii</i>	423.8	3337.2				
<i>T. eulepidotus</i>	358.0	1988.8				
<i>T. lepidorhinus</i>	825.3	1350.8				
<i>T. loennbergii</i>	39.6	1204.2				
<i>A. loennbergi</i>	63.50	976.9				
<i>D. longedorsalis</i>	178.4	878.7	268.4	1322.4		
<i>P. marmorata</i>	172.3	1595.0				
<i>P. scotti</i>	195.2	1626.7				
<i>B. marri</i>	73.9	279.1	123.2	465.1	172.5	651.1
<i>G. australis</i>	106.4	1642.7				
<i>G. acuticeps</i>	256.5	1973.0				
<i>R. glacialis</i>	108.7	1146.8				
<i>C. wilsoni</i>	200.1	2835.0				
<i>C. hamatus</i>	41.7	2575.7				
<i>C. myersi</i>	298.1	1543.8				
<i>C. antarcticus</i>	178.5	920.1				
<i>D. hunteri</i>	61.2	809.5				
<i>N. ionah</i>	14.3	620.9				
<i>P. macropterus</i>	63.9	2497.8				
<i>P. maculatus</i>	47.6	1796.2				
<i>L. hureaui</i>	9.9	41.4	6.4	26.7	15.7	65.5
<i>B. maccaini</i>	4.9	86.2	3.7	65.4	-	-
<i>P. somovi</i>	10.6	102.7	17.2	166.9	8.7	84.7
<i>M. marmoratus</i>	8.6	76.5	4.8	42.9	9.5	84.7
<i>M. holotrachys</i>	5.1	30.7	8.5	51.7	-	-
<i>G. opisthopterus</i>	5.2	69.9	5.1	68.9	2.6	34.3

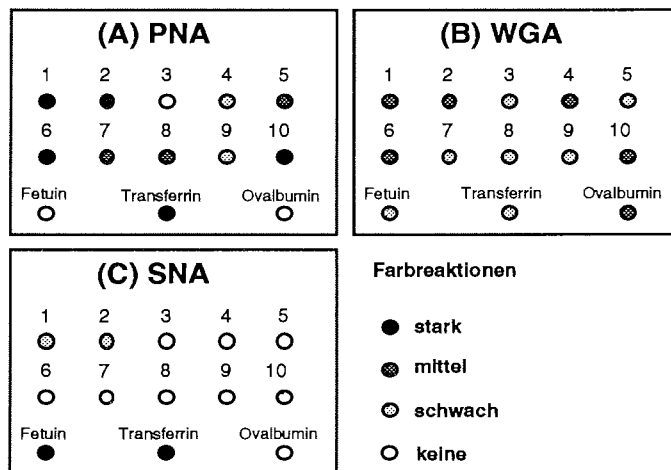
In Tabelle 3 sind die Mengen (relativ und absolut) der Fraktionen I - III der DEAE-Anionenaustauscherchromatographie (siehe auch Abbildung 7a-e) für jede Art aufgelistet und mit AF (antifreeze) bezeichnet, da noch nicht in allen Fällen geklärt ist, ob es sich um Glycoproteine oder Proteine handelt. Während alle Notothenioidei (Ausnahmen: *P. antarcticum*, *L. kempii*, *D. longedorsalis* und *B. marri*) nur eine AF-Fraktion (I) besitzen, bei der es sich um das AFGP handelt (siehe auch unten), konnten bei den nicht-notothenioiden Fischen der Antarktis und den Cottiden und Liparididen der Arktis zwei oder drei AF-Fraktionen isoliert werden. Demnach besitzt *T. pennellii* mit Abstand am meisten AFGP (3340.1 mg/kg Fisch), gefolgt von dem arktischen

Gadiden *A. glacialis* mit 2856.9 mg/kg und den Channichthyiden *C. wilsoni* (0.284% FRG), *C. hamatus* (0.258% FRG) und *P. macropterus* (0.250% FRG). Die geringsten Mengen an AFGP wurden aus *A. mitopteryx* (0.036% FRG) aus dem Lasarewmeer und aus *G. gibberifrons* (0.027% FRG) von der antarktischen Halbinsel isoliert. Bei den Arten *L. kempi*, *D. longedorsalis* und *B. marri* wurden zwar ebenfalls geringe AFGP-Mengen isoliert (0.064% bzw. 0.028% FRG), allerdings besitzen diese Arten noch andere AF - Fraktionen, die einen weit höheren Anteil ausmachen. Die nicht-notothenioiden Fische der Antarktis besitzen AF-Substanzen meist unter 0.01% FRG, die niedrigsten Werte wurden bei *M. marmoratus* (76.5 mg/kg) und *G. opisthopterus* (69.9 mg/kg) nachgewiesen. Ähnliches gilt auch für die arktischen Cottidae und Liparididae.

## Die AFGP-Struktur

### ZUCKERZUSAMMENSETZUNG UND -STRUKTUR DER GLYCOPROTEINE

#### Die terminalen Zucker der Gefrierschutzglycoproteine.



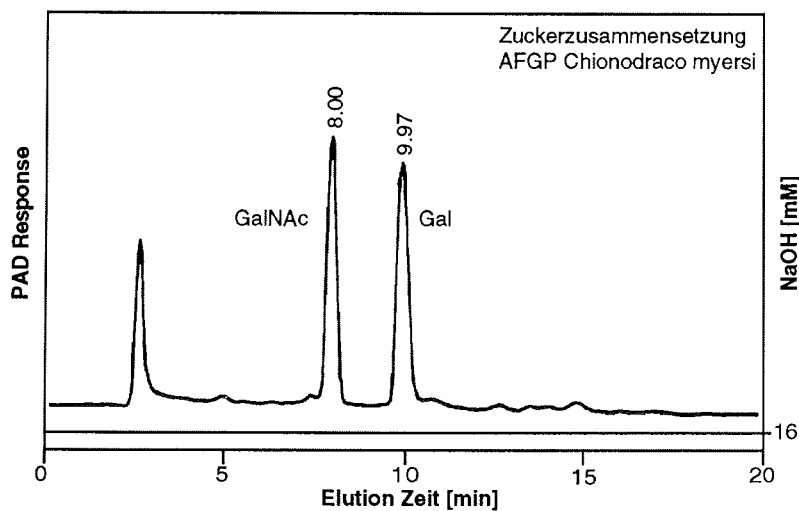
**Abbildung 8:** Skizze eines Dot Blot der Glycoproteine von *A. mitopteryx* (1), *G. gibberifrons* (2), *L. kempi* (3), *T. eulepidotus* (4), *C. myersi* (5), *P. maculatus* (6), *N. ionah* (7), *D. longedorsalis* (8), *L. fabricii* (9) und *I. bicornis* (10). Als Standard dienten Fetuin, Transferrin und Ovalbumin. Es wurden jeweils 1  $\mu$ l (10 mg/ml; Standard 1 mg/ml) aufgetropft. Inkubiert wurde mit den Lektinen PNA, 100  $\mu$ g (A), WGA, 20  $\mu$ g (B) und SNA, 10  $\mu$ g (C). Die Graustufe der Dots gibt die Stärke der Färbung an. Es wurde zwischen 4 Stufen unterschieden: stark, mittel, schwach, keine Färbung. Diese Skalierung gilt für alle weiteren in dieser Arbeit dargestellten Dot Blots.

Als schnelle und zuverlässige Methode zur Bestimmung der terminalen Zucker erwies sich der Dot Blot mit digoxigenylierten Lektinen. Von dem AFGP ist bekannt, daß es mit dem Disaccharid Gal $\beta$ 1- $\rightarrow$ 3GalNAc hoch glycosiliert ist (DEVRIES *et al.* 1971). Schon geringe Mengen sind ausreichend, um das AFGP mit dem Lektin PNA nachzuweisen. In der Abbildung 8 sind die Dot Blots

der Gefrierschutzsubstanzen von 8 Notothenioiden und zwei arktischen Arten dargestellt. Das Lektin PNA erkennt terminales Gal $\beta$ 1- $\rightarrow$ 3GalNAc (AFGP), WGA terminales GlcNAc und bedingt Sialinsäuren. SNA ist sensitiv für Sialinsäuren. Es wurden jeweils 1  $\mu$ l (10  $\mu$ g) des Rohextrakts aufgetropft. Außer bei dem Rohextrakt von *L. kempfi* konnte bei allen anderen Proben eine Reaktion mit PNA nachgewiesen werden. Eine besonders starke Färbung ist bei den Extrakten von *A. mitopteryx*, *G. gibberifrons* und bei dem arktischen *I. bicornis* zu beobachten. Bei den mit WGA inkubierten Dot Blots kann in allen Fällen eine leichte Anfärbung beobachtet werden. Mit dem Lektin SNA wurde in keinem Fall eine Reaktion beobachtet, eine terminale Sialinsäure kommt demnach bei keinem der untersuchten Rohextrakte vor.

**Die Zuckerzusammensetzung der Gefrierschutzglycoproteine.**

Erst durch die TFA-Hydrolyse der Glycoproteine und die anschließende Analyse mit der HPAEC-PAD lassen sich quantitative und qualitative Aussagen über die Zuckerzusammensetzung machen. In Abbildung 9 ist beispielhaft das Chromatogramm der Zuckerzusammensetzung des Rohextrakts von *C. myersi* dargestellt. Es wird charakterisiert durch zwei Peaks, die N-Acetylgalactosamine [GalNAc] (min 8.00; 460 ng) und Galaktose [Gal] (min 9.97; 412 ng) zugeordnet werden können. Diese Zusammensetzung ist charakteristisch für das AFGP der Notothenioidei und der arktischen Gadiden (VANDENHEEDE *et al.* 1972; O'GRADY *et al.* 1982).



**Abbildung 9:** HPAEC-PAD Chromatogramm der Zuckerzusammensetzung des AFGP-Extraktes von *C. myersi* nach TFA-Hydrolyse. Es wurden 25  $\mu$ l (100  $\mu$ g/ml) hydrolysierte Probe injiziert und isokratisch mit 16 mM NaOH eluiert. Der Fluß betrug 1 ml/min, die Empfindlichkeit 300 nA.

Bei allen hier untersuchten Notothenioidei und *A. glacialis* konnten Gal und GalNAc aus dem Rohextrakt identifiziert werden. In Tabelle 4 sind die Konzentrationen der Monosaccharide pro mg Glycoprotein verschiedener Arten angegeben. Die höchste Glycosylierung der Proteine ist bei

*T. lepidorhinus*, *T. eulepidotus* und *C. myersi* zu beobachten. Die Monosaccharide GalNAc (831.8-1280.0 nMol/mg Glycoprotein) und Gal (914.7-1390.0 nMol/mg) liegen in einem Verhältnis von ungefähr 1:1 vor. Dies wird auch erwartet, wenn man ein AFGP, glycosiliert mit dem Disaccharid Gal $\beta$ 1- $\rightarrow$ 3GalNAc annimmt. Der Zuckeranteil im Rohextrakt ( $\mu$ g/mg Rohextrakt) mit GalNAc und Gal ist von Art zu Art sehr verschieden. Bei den Arten *A. mitopteryx*, *D. longedorsalis*, *G. gibberifrons* und *L. kempi* sind zum Teil nur geringe Mengen zu beobachten. Verunreinigungen des Rohextrakts werden zu diesen Differenzen geführt haben. Bei *D. longedorsalis* und *L. kempi* konnte zudem gezeigt werden, daß diese Arten noch andere AF-Fractionen besitzen (Tabelle 3). Abweichend ist die Zuckerzusammensetzung bei *L. kempi*. Hier wurden die geringsten Konzentrationen der Monosaccharide GalNAc (23.5 nMol/mg) und Gal (55.9 nMol/mg) im Verhältnis 1:2 beobachtet. Zudem wurde ein anderes Monosaccharid, das N-Acetylglucosamin [GlcNAc] (87.2 nMol/mg), nachgewiesen. Diese Zusammensetzung erinnert an die Zuckerzusammensetzung des Rohextrakts von *P. antarcticum*, auf die später eingegangen werden soll.

**Tabelle 4:** Bruttozusammensetzung der Monosaccharide der Gefrierschutzsubstanzen von *T. lepidorhinus*, *T. eulepidotus*, *A. mitopteryx*, *L. kempi*, *G. gibberifrons*, *D. longedorsalis* und *C. myersi*. Angegeben sind die Konzentrationen der Zucker in  $\mu$ g und nMol je mg Rohextrakt.

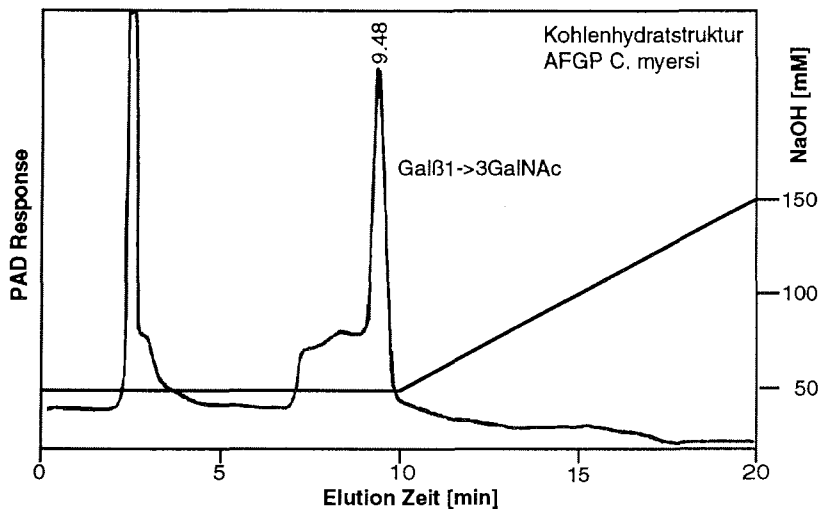
Art	GalNAc [ $\mu$ g]	Gal [ $\mu$ g]	GlcNAc [ $\mu$ g]	GalNAc [nMol]	Gal [nMol]	GlcNAc [nMol]
<i>T. lepidorhinus</i>	283.2	250.4	-	1280.0	1390.0	-
<i>T. eulepidotus</i>	217.9	184.5	-	985.0	1042.0	-
<i>A. mitopteryx</i>	93.6	94.4	-	423.1	524.0	-
<i>L. kempi</i>	5.2	10.1	19.3	23.5	56.0	87.2
<i>G. gibberifrons</i>	18.0	12.0	-	81.4	66.6	-
<i>D. longedorsalis</i>	73.2	85.6	-	330.9	475.1	-
<i>C. myersi</i>	184.0	164.8	-	831.8	914.7	-

#### Die Bindung des Zuckers an eine Aminosäure.

Um den Bindungstyp des Zuckers an eine Aminosäure zu analysieren, wurde der Rohextrakt mit verschiedenen Enzymen inkubiert, und der Verdau mit der HPAEC-PAD analysiert. Dabei wurde ein Gradient gewählt, mit dem auch sialylierte Oligosaccharide eluiert werden. Bei allen daraufhin untersuchten Arten konnte lediglich bei dem Verdau mit der *O-Glycosidase* (*Endo- $\alpha$ -N-Acetylgalactosaminidase*) ein Zucker nachgewiesen werden. In Abbildung 10 ist das HPAEC-Chromatogramm des Verdaus des Rohextrakts von *C. myersi* dargestellt. Die *O-Glycosidase* spaltet das Disaccharid Gal $\beta$ 1- $\rightarrow$ 3GalNAc von den Aminosäuren Threonin bzw. Serin. Dieses Disaccharid Gal $\beta$ 1- $\rightarrow$ 3GalNAc konnte im isokratischen Lauf mit 50 mM NaOH nach 9.48' eluiert werden. Der Gradient auf 150 mM NaOH eluierte keine weiteren Zuckerstrukturen. Ebenfalls konnten keine zusätzlichen Oligosaccharide mit dem Gradienten 3 für Sialinsäuren (Material und Methoden) eluiert werden (nicht abgebildet). Die Konzentrationen des Disaccharids der AFGP der einzelnen Arten sind sehr unterschiedlich und sind in Übereinstimmung mit den in der TFA-Hydrolyse gefundenen Werten. D.h. die höchsten Konzentrationen finden sich bei *T. lepidorhinus*, die

## Ergebnisse

niedrigsten bei *L. kemp*i. Alle untersuchten Notothenioidei besitzen demnach ein AFGP mit dem Disaccharid Gal $\beta$ 1->3GalNAc, O-glycosidisch gebunden an Threonin/Serin. Bei der Schulter direkt vor dem Disaccharid-Peak handelt es sich vermutlich um die Monosaccharide Gal und GalNAc.



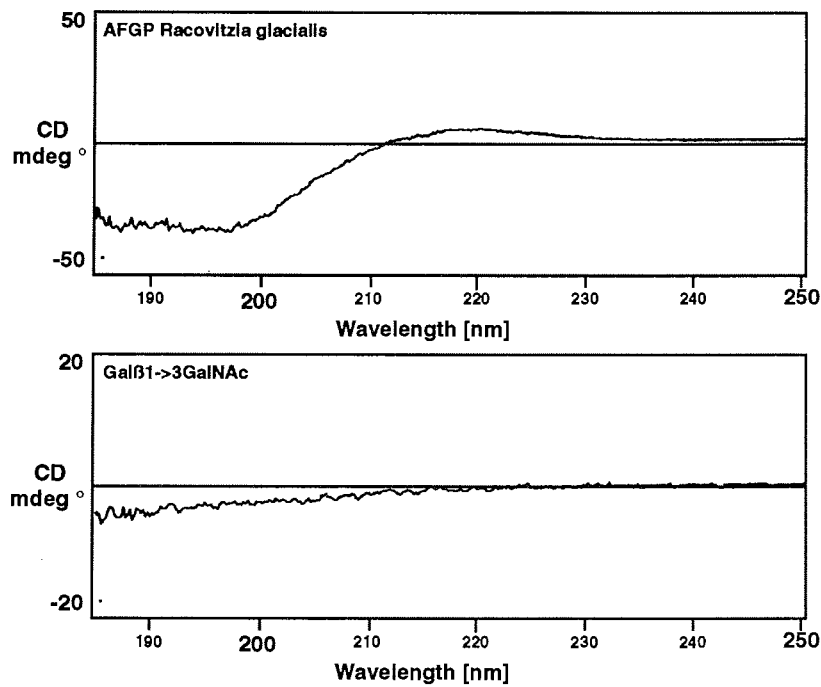
**Abbildung 10:** HPAEC-PAD Chromatogramm der Zuckerzusammensetzung des AFGP-Extraktes von *C. myersi* nach dem Verdau mit *O*-Glycosidase. Es wurden 25  $\mu$ l (16  $\mu$ g/ml) der verdauten Probe injiziert und mit einem NaOH-Gradienten (50 mM bis 150 mM) eluiert. Der Fluß betrug 1 ml/min, die Empfindlichkeit 300 nA. Das Disaccharid Gal $\beta$ 1->3GalNAc eluiert nach 9,48 min.

## SEKUNDÄRSTRUKTUR DER GEFRIERSCHUTZGLYCOPROTEINE

### *Das Spektrum des Zirkulardichroismus (CD-Spektrum).*

Von dem isolierten AFGP (DEAE Anionenaustauscherchromatographie Peak I) wurden die CD-Spektren bei Raumtemperatur vermessen. Repräsentativ für das AFGP aller untersuchter Notothenioidei ist in Abbildung 11 das Spektrum des AFGP von *R. glacialis* dargestellt. Das Chromatogramm zeigt ein Maximum zwischen 219 und 221 nm. Das Minimum des negativen Signals liegt zwischen 190 und 195 nm. Dieses Spektrum deckt sich mit den Untersuchungen von BUSH *et al.* (1981, 1984), DEVRIES *et al.* (1970), FRANKS & MORRIS (1978) und RAYMOND *et al.* (1977), die am AFGP von Nototheniiden des McMurdo Sounds durchgeführt wurden. Ungefähr 50% des AFGP (Gewicht) besteht aus Kohlenhydraten. Um festzustellen, inwieweit das Disaccharid Gal $\beta$ 1->3GalNAc Einfluß auf das CD-Spektrum nimmt, ist weiterhin dieser Zucker unter den selben Bedingungen vermessen worden. Es zeigt bei einer höheren Empfindlichkeit eine nur

geringe Abweichung von der Nulllinie bei kurzen Wellenlängen. Von einer Beeinflussung des CD-Spektrums durch den Zucker kann somit abgesehen werden (BUSH *et al.* 1981).



**Abbildung 11:** CD Spektrum (Zirkulardichroismus) des AFGP von *R. glacialis* bei Raumtemperatur. Das Spektrum ist für den Wellenlängenbereich von 185 bis 250 nm dargestellt. Die Ordinate gibt die molare Elliptizität  $[\theta]$  in  $\text{mdeg}^\circ$  wieder. Unten ist das CD-Spektrum des Disaccharids Gal $\beta$ 1->3GalNAc dargestellt. Die eingesetzten Lösungen hatten eine Konzentration von 0.5 mg/ml Puffer (50 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , pH 7.4), die Spaltbreite betrug 0.05 mm.

## Die AFGP-Funktion

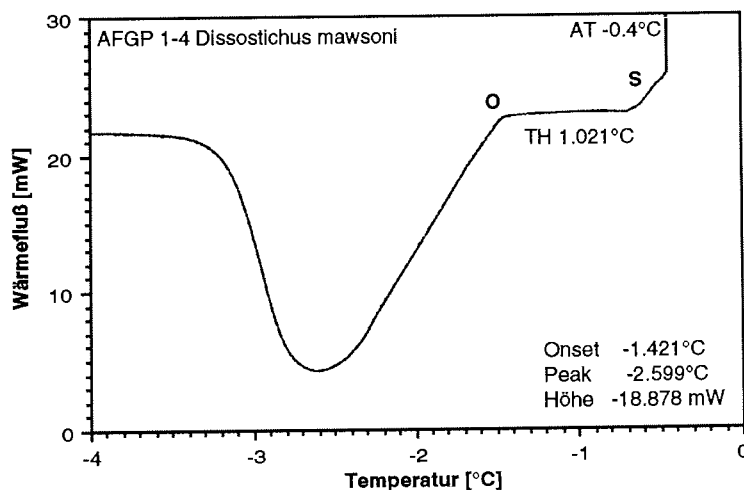
### DIE GEFRIERSCHUTZAKTIVITÄT

#### *Die thermale Hysterese von Gefrierschutzsubstanzen.*

Im Folgenden werden DSC-Diagramme verschiedener Gefrierschutzsubstanzen (AF-Fractionen) dargestellt, die mit der DEAE-Anionenaustauscherchromatographie isoliert wurden (siehe auch Tabelle 3). Die maximalen Hysteresen der einzelnen AF-Fractionen sind in der Tabelle 7 wiedergegeben. Die Diagramme stehen im Vergleich mit dem des destillierten Wassers, dem "Nullwert" (Material und Methoden). Aus den Diagrammen läßt sich neben der thermalen Hysterese  $[\text{°C}]$

## Ergebnisse

auch die Art und Weise ablesen, wie die Probe gefriert, d.h. wie die Gefrierschutzsubstanzen ein Gefrieren verhindern. Die nächsten vier Diagramme geben verschiedene Gefrierprozesse wieder, auf die in der Diskussion näher eingegangen wird. In Abbildung 12 ist das DSC-Diagramm des AFGP 1-4 (20 mg/ml) von *D. mawsoni* dargestellt. Die Haltetemperatur beträgt  $-0.4^{\circ}\text{C}$  [AT]. Während der ersten Abkühlphase ist eine Schulter [S] zu beobachten, die ein langsames Wachstum von Eiskristallen entlang ihrer c-Achse kennzeichnet. Die übrigen Achsen der Eiskristalle sind durch das AFGP blockiert. Das normale exponentielle Wachstum der Eiskristalle ist dadurch gestoppt. Ein Plateau schließt sich an. Das Eiswachstum ist durch die Anwesenheit von AFGP in dieser Phase völlig unterbunden. Nach einer weiteren Abkühlung ist ein Onset [O] bei  $-1.42^{\circ}\text{C}$  zu beobachten, ein Exotherm folgt, d.h. die Probe gefriert schlagartig. In diesem Fall ist eine maximale Hysterese von  $1.02^{\circ}\text{C}$  zu messen. Bei der Haltetemperatur von  $-0.3^{\circ}\text{C}$  ist die Probe komplett aufgetaut und kristallisiert bei  $\approx -18.0^{\circ}\text{C}$  aus. Diese Ergebnisse stehen in Übereinstimmung mit Untersuchungen an *D. mawsoni* aus dem McMurdo Sound (HANSEN *et al.* 1991).

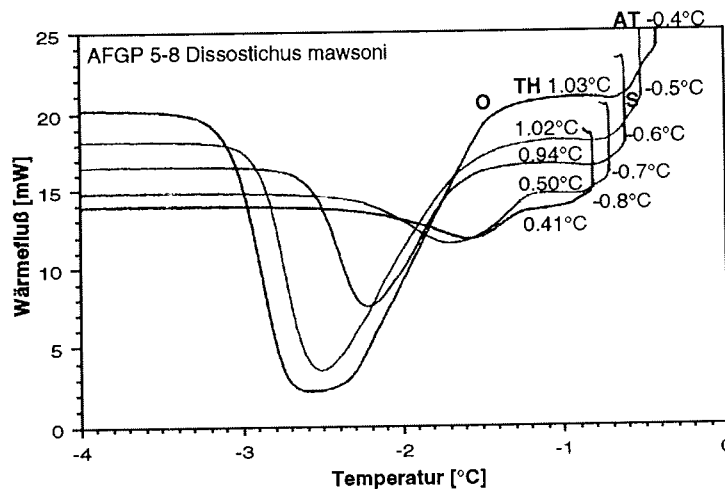


**Abbildung 12:** Kalorimetrische Analyse des AFGP 1-4 von *D. mawsoni*. Die Probe (5  $\mu\text{l}$ ; 20 mg/ml) wurde auf  $-40^{\circ}\text{C}$  abgekühlt, mit  $1^{\circ}\text{C}/\text{min}$  auf  $-0.4^{\circ}\text{C}$  erwärmt, die Temperatur gehalten (5 min), und wieder mit  $1^{\circ}\text{C}/\text{min}$  gefroren. Bei einer "Haltetemperatur" von  $-0.3^{\circ}\text{C}$  (5 min) ist die Probe vollständig aufgetaut, die Probe unterkühlt beim Gefrieren und kristallisiert bei  $\approx -18.0^{\circ}\text{C}$  aus. Die y-Achse gibt den Wärmefluss in mW wieder. S = Schulter, O = Onset, AT = annealing temperature, TH = thermale Hysterese.

In Abbildung 13 sind die Wärmeflußdiagramme für verschiedene Haltetemperaturen des AFGP 5-8 von *D. mawsoni* dargestellt. Im Gegensatz zu dem Diagramm der hochmolekularen AFGP ist die Schulter stärker ausgeprägt, das Plateau zeigt eine leichte Wölbung und der Onset ist nicht so klar zu bestimmen, d.h. das Gefrieren der Probe vollzieht sich nicht plötzlich. Die maximale beobachtete Hysterese beträgt  $0.92^{\circ}\text{C}$  und liegt damit unter dem Wert des AFGP 1-4. Bei der Haltetemperatur von  $-0.4^{\circ}\text{C}$  lagen 15% Eis in der Probe vor, bei  $-0.8^{\circ}\text{C}$  waren es schon 65% Eis. Je höher der Eisgehalt in der Probe ist, desto flacher wird die Schulter und das Plateau kürzer. Bei

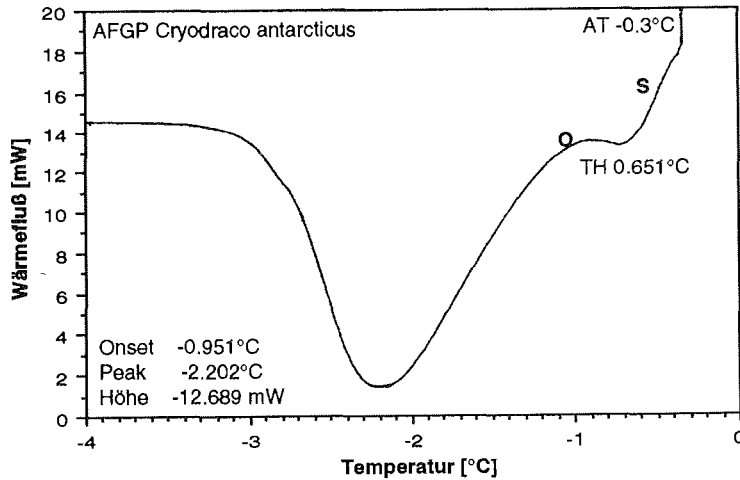


einer Haltetemperatur von  $-0.8^{\circ}\text{C}$  geht die Schulter kontinuierlich in das Plateau über, die Hysterese beträgt jetzt nur noch  $0.45^{\circ}\text{C}$ .

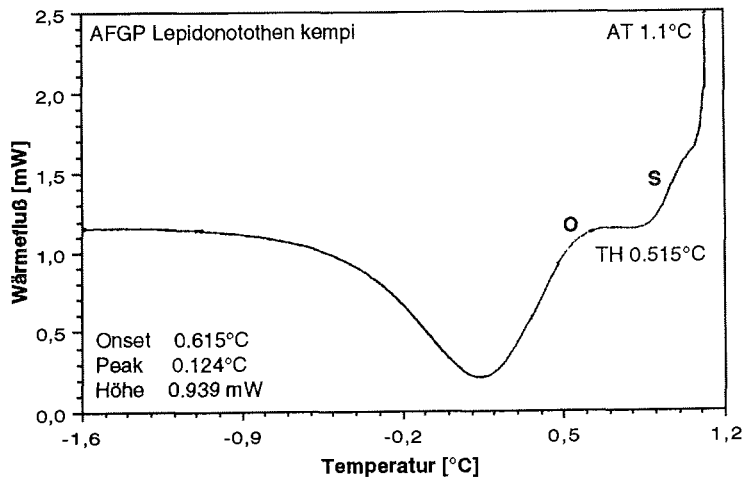


**Abbildung 13:** Kalorimetrische Analyse des AFGP 5-8 von *D. mawsoni*. Die Probe (5  $\mu\text{l}$ ; 20 mg/ml) wurde auf  $-40^{\circ}\text{C}$  abgekühlt, mit  $1^{\circ}\text{C}/\text{min}$  auf verschiedene "Haltetemperaturen" ( $-0.4$  -  $-0.8^{\circ}\text{C}$ ) erwärmt, die Temperatur gehalten (5 min), und wieder mit  $1^{\circ}\text{C}/\text{min}$  gefroren. Bei einer "Haltetemperatur" von  $-0.3^{\circ}\text{C}$  (5 min) ist die Probe vollständig aufgetaut, die Probe unterkühlt beim Gefrieren und kristallisiert bei  $\approx -18.0^{\circ}\text{C}$  aus. Die y-Achse gibt den Wärme flu ß in mW wieder. S = Schulter, O = Onset, AT = annealing temperature, TH = thermale Hysterese

Das AFGP (AF I in Tabelle 3) des Channichthyiden *C. antarcticus* zeigt ein verändertes Verhalten während der Abkühlphase (Abbildung 14) gegenüber dem AFGP von *D. mawsoni*. Sofort nach dem Abkühlen ist hier ebenfalls eine Schulter zu beobachten, die allerdings über einen Temperaturbereich von fast  $0.4^{\circ}\text{C}$  ( $\approx 5$  mW) geht. Das Eiskristallwachstum kann durch dieses AFGP nicht so effektiv verlangsamt werden wie durch das AFGP von *D. mawsoni*. Das anschließende Plateau fällt sehr kurz aus. Der relative Wärme flu ß nimmt ab, erkennbar an dem leichten Anstieg. Das Eiswachstum wird demnach nie völlig unterbunden. Vielmehr friert die Probe kontinuierlich weiter, ein Exotherm entsteht. Eine maximale Hysterese von  $0.65^{\circ}\text{C}$  konnte bei der Haltetemperatur  $-0.3^{\circ}\text{C}$  gemessen werden. Ein ähnliches Verhalten während der Abkühlphase konnte bei dem AFGP der Channichthyiden *C. aceratus* und *N. ionah* beobachtet werden (sind nicht dargestellt). Die AFGPs der anderen Channichthyiden, Artedidraconiden, Bathydraconiden, und einiger Nototheniiden (Ausnahme *L. kemp*i und *P. antarcticum*) zeigen einen Verlauf während des Gefrierprozesses wie er schon bei dem AFGP von *D. mawsoni* festgestellt werden konnte.



**Abbildung 14:** Kalorimetrische Analyse des AFGP von *C. antarcticus*. Die Probe (5 µl; 20 mg/ml) wurde auf -40°C abgekühlt, mit 1°C/min auf -0.3°C erwärmt, die Temperatur gehalten (5 min), und wieder mit 1°C/min gefroren. Bei einer "Haltetemperatur" von -0.2°C (5 min) ist die Probe vollständig aufgetaut, die Probe unterkühlt beim Gefrieren und kristallisiert bei ≈ -17.1°C aus. Die y-Achse gibt den Wärmefluß in mW wieder. S = Schulter, O = Onset, AT = annealing temperature, TH = thermale Hysterese



**Abbildung 15:** Kalorimetrische Analyse des AFGP von *L. kempfi*. Die Probe (5 µl; 20 mg/ml) wurde auf -40°C abgekühlt, mit 1°C/min auf 0.9°C erwärmt, die Temperatur gehalten (5 min), und wieder mit 1°C/min gefroren. Bei einer "Haltetemperatur" von 1.0°C (5 min) ist die Probe vollständig aufgetaut, die Probe unterkühlt beim Gefrieren und kristallisiert bei ≈ -11.2°C aus. Die y-Achse gibt den Wärmefluß in mW wieder. S = Schulter, O = Onset, AT = annealing temperature, TH = thermale Hysterese.

Der Gefrierprozess der Fraktion AF I (Tabelle 3) von *L. kempfi* ist in Abbildung 15 dargestellt. Direkt nach dem Abkühlen ist eine steile und lange Schulter zu beobachten, die ebenfalls (siehe

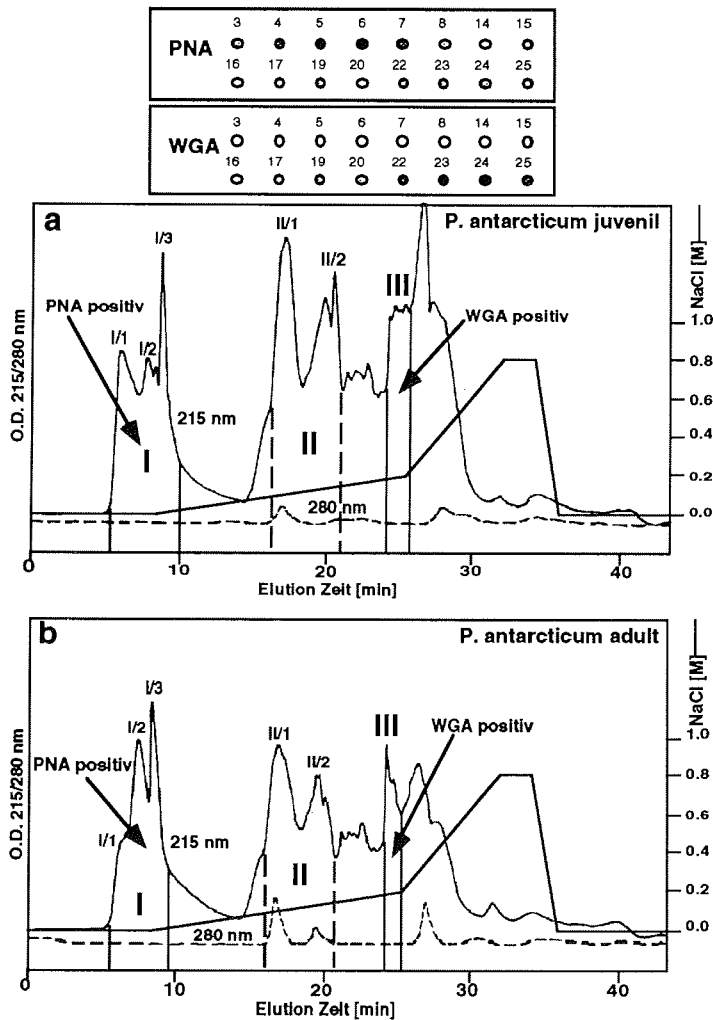
AFGP *C. antarcticus*) ein relativ starkes Wachstum von Eiskristallen entlang ihrer *c*-Achse andeutet. Dieses Eiswachstum läßt langsam nach und kommt bei 0.82°C zum Stillstand. Ein Plateau schließt sich an. Ein großer Teil der Probe ist bereits mit Eis versetzt. Nach kurzem weiteren Abkühlen der Probe um 0.20°C gefriert sie vollständig, ein Exotherm entsteht. Die maximale beobachtete Hysterese betrug nur 0.48°C, und hatte damit den geringsten Wert aller untersuchten AFGP (Tabelle 7).

### Der Sonderfall *Pleuragramma antarcticum*

#### DER AFGP-GEHALT IN ABHÄNGIGKEIT VOM ALTER DES FISCHES

Die Auftrennung des Rohextraktes erfolgte wie bei den anderen Arten. In Abbildung 16a-b sind die Diagramme der DEAE-Ionenaustauscherchromatographie der Rohextrakte der kleinsten (SL 95 mm; 16a) und größten untersuchten Individuen (SL 220 mm; 16b) dargestellt, außerdem eine Skizze der Dot Blots der gesammelten Fraktionen, inkubiert mit PNA und WGA. Ähnlich wie bei den anderen Arten (Abbildung 7) eluieren zwischen 3 und 7 min mit 20 mM Tris-HCl Proteine, die nur schwach an die Säule binden, und bei denen es sich um das AFGP handelt (Peak I; PNA positiv). Eingesetzt wurde in beiden Fällen 5 mg Substanz. Aus dem Rohextrakt der Juvenilen wurde sehr viel mehr AFGP (je g Rohextrakt) eluiert als bei den Adulten. Die Mengenverhältnisse der PNA-positiven Fraktionen Ia-c verschieben sich. Das AFGP der Adulten beinhaltet relativ weniger hochmolekulare Glycoproteine (Fraktion Ia). Bei dem AFGP der Juvenilen kann ein Anstieg der ersten (Ia) und dritten Fraktion (Ic; niedermolekulare AFGP) beobachtet werden.

Im weiteren Verlauf des Gradienten werden noch weitere Substanzen eluiert. Mehrere Fraktionen (zusammengefaßt in Peak II) können zwischen 15 und 21 min (0.05 - 0.13 M NaCl) beobachtet werden. Diese Substanzen konnten nicht weiter analysiert werden. Lediglich wurde festgestellt, daß sie nicht glycosiliert sind, daß sie aber eine, wenn auch geringe Gefrierschutzaktivität aufweisen (Tabelle 7). Demnach müßte es sich um Gefrierschutzproteine handeln. Bei einer Salzkonzentration von 0.14 M NaCl (min 23/24) kann ein GlcNAc enthaltendes (WGA-positiv) und bislang nicht beschriebenes Glycoprotein eluiert werden, auf das in den folgenden Abschnitten genauer eingegangen werden soll. Bei der letzten Fraktion handelt es sich vermutlich um eine Verunreinigung (detektierbar bei 280 nm und keine Gefrierschutzaktivität).



**Abbildung 16:** Anionenaustauscherchromatographie (DEAE-TSK) des AFGP-Rohextraktes von *P. antarcticum* (a: SL 9/10 und b: SL 22). Dargestellt sind die Absorbance-Kurven für 215 und 280 nm. Als Anfangsbedingung wurde mit 20 mM Tris-HCl, pH 9.5 eluiert. Die Zeitereignisse des NaCl-Gradienten (% Eluent B: 20 mM Tris-HCl, 1 M NaCl, pH 9.5) sind: 0 min, 0%; 8 min, 0%; 26 min, 20%; 32 min, 80%; 34 min, 80%; 36 min, 0%; 42 min, 0%. Es wurden 200 µl injiziert, die Flußgeschwindigkeit betrug 1 ml/min, die Empfindlichkeit 1.28. Oben Skizze zweier Dot Blots aller gesammelter Fraktionen (1 min = 1 ml) inkubiert mit den Lektinen PNA und WGA. Bedingungen siehe Abbildung 8.

Die Dot Blots, inkubiert mit PNA bzw. WGA, zeigen den Nachweis der Glycoproteine im Rohextrakt nach der Aufreinigung am DEAE-Ionenaustauscher. Sie dienen zur Kontrolle der zu sammelnden Fraktionen. Von jeder Fraktion (jede min = 1 ml) wurden 1µl aufgetropft. Fraktion 5

und 6 zeigen eine deutliche PNA-Reaktion, die Fraktionen 4 und 7 eine abgeschwächte. In diesen befindet sich das AFGP mit Gal $\beta$ 1- $\rightarrow$ 3GalNAc als Kohlenhydratanteil. Fraktion 23 und 24 zeigen eine Farbreaktion bei der Inkubation mit WGA. Hier eluiert offensichtlich ein Glycoprotein mit N-Acetylglucosamin als Zuckerbestandteil. Das Disaccharid Gal $\beta$ 1- $\rightarrow$ 3GalNAc ist nicht in diesen Fraktionen vorhanden, zu schließen aus dem Ausbleiben der PNA-Reaktion.

**Tabelle 5:** Rohextrakte von *P. antarcticum* verschiedener Größen- bzw. Altersklassen. Angegeben sind die absolut extrahierte Menge, sowie der relative Gehalt (% Frischgewicht FRG). Außerdem Fangtiefe [m], Wassertemperatur [°C] und Station. Das Alter der Fische [a] wurde aus der Standardlänge nach HUBOLD & TOMO (1989) ermittelt.

Im unteren Teil sind die gesammelten AF (antifreeze) Fraktionen des Rohextrakts nach der Auftrennung mit der DEAE-TSK Ionenaustauscherchromatographie für verschiedene Altersklassen aufgelistet. Die Angaben sind absolut [mg] und relativ [% FRG]. Bei der Fraktion AF I handelt es sich um das AFGP.

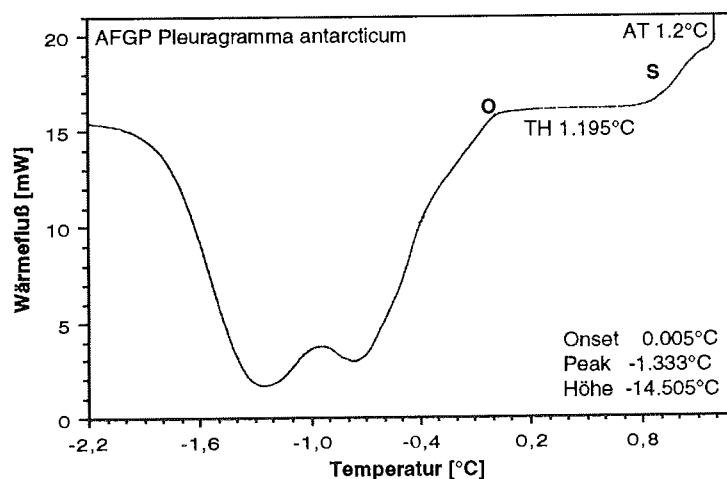
SL [cm]	a	n	Stat	Netz	Tiefe [m]	FRG [g]	Rohextrakt [mg]	Rohextrakt [% FRG]
9.5	4	32	18130	GSN	620	235.9	130.0	0.0551
14.5	8	9	18130	GSN	570	207.0	121.0	0.0585
15.0	8	20	14241	GSN	450	560.3	345.2	0.0616
15.0	8	24	14241	GSN	450	690.0	466.1	0.0675
16.0	9	3	10796	AGT		126.9	73.5	0.0579
16.0	9	3	10796	AGT		103.7	63.9	0.0616
16.0	9	7	14241	GSN	450	250.0	209.0	0.0836
17.0	10	7	18130	GSN	620	348.0	260.3	0.0748
18.0	11	4	18130	GSN	620	234.0	182.0	0.0778
22.0	14	3	18130	GSN	620	254.1	260.0	0.1023

SL [cm]	AF I [mg]	AF I [% FRG]	AF II [mg]	AF II [% FRG]	AF III [mg]	AF III [% FRG]
9.5	63.5	0.0269	12.3	0.0052	50.7	0.0215
14.5	53.0	0.0256	11.4	0.0055	31.5	0.0152
17.0	66.5	0.0313	12.3	0.0035	67.7	0.0195
22.0	68.0	0.0267	8.2	0.0032	36.4	0.0143

Im oberen Teil der Tabelle 5 sind die extrahierten Rohextrakte (absolut und relativ) von *P. antarcticum* unterschiedlicher Größenklassen zusammengestellt. Die Tiere stammen alle aus der Region um Halley Bay aus Tiefen zwischen 450 und 620 m. Das Alter wurde über einen Alters-Längen-Schlüssel (HUBOLD & TOMO 1989) ermittelt. Der Anteil des Rohextrakts steigt kontinuierlich mit zunehmendem Alter des Fisches an. Er variiert zwischen 551 mg/kg FRG bei den Juvenilen (SL 95 mm) und 1023 mg/kg FRG bei den Adulten (SL 220 mm), und liegt damit deutlich niedriger als die Rohextraktkonzentrationen der meisten anderen Notothenioidei (Tabelle 2). Im unteren Teil der Tabelle sind die absoluten und relativen Anteile der Fraktionen nach der Auftrennung mit der DEAE-Ionenaustauscherchromatographie (Abbildung 16) aufgelistet. Die größten Mengen der AF-Fraktion I (entspricht dem AFGP) wurden bei Tieren mit einer SL von 17 cm (0.0313% FRG), die geringsten bei Tieren mit einer SL von 14.5 cm (0.0256%) isoliert. Es kann kein Zusammenhang zwischen dem AFGP-Gehalt und dem Alter des Fisches

festgestellt werden. Die Fraktion AF II liegt sowohl bei den jungen (0.005%) als auch bei den älteren Fische (0.003%) nur in sehr geringen Konzentrationen vor. Von der Fraktion AF III konnten die größten Mengen bei den jüngsten Fischen (0.0215%), die geringsten Mengen bei den ältesten Fischen (0.0143%) isoliert werden. Diese Fraktion besteht fast ausschließlich aus einem GlcNAc enthaltenden Glycoprotein.

In Abbildung 17 ist das Wärmeflußdiagramm des AFGP = AF I (20 mg/ml) von *P. antarcticum* (SL 170 mm) dargestellt. Ähnlich wie bei dem AFGP von *D. mawsoni* (Abbildung 13) ist während der ersten Phase der Abkühlung eine Schulter zu beobachten, die über  $\approx 0,4^\circ\text{C}$  geht und in ein Plateau mündet. Das Eiswachstum ist gestoppt, und die Probe gefriert erst vollständig, nachdem sie auf  $-0,26^\circ\text{C}$  (Onset) abgekühlt worden ist. Dies entspricht einer maximal beobachteten Hysterese von  $1,19^\circ\text{C}$  (siehe auch Tabelle 7). Der zweigipfelige Exotherm ist vermutlich auf die Inhomogenität (verschieden große Moleküle) der AFGP-Probe zurückzuführen. Die hochmolekularen Moleküle verhindern ein Eiswachstum länger als die niedermolekularen AFGP. Ähnliches konnten auch HANSEN *et al.* (1991) bei den AFGP 1-5 von *D. mawsoni* feststellen. *P. antarcticum* besitzt folglich ein AFGP, das sich dem AFGP von *D. mawsoni* in der Struktur (Gal-GalNAc als Zuckerbestandteil) wie in der Funktion ähnelt. Auf die Zusammensetzung dieses AFGP soll später noch eingegangen werden.

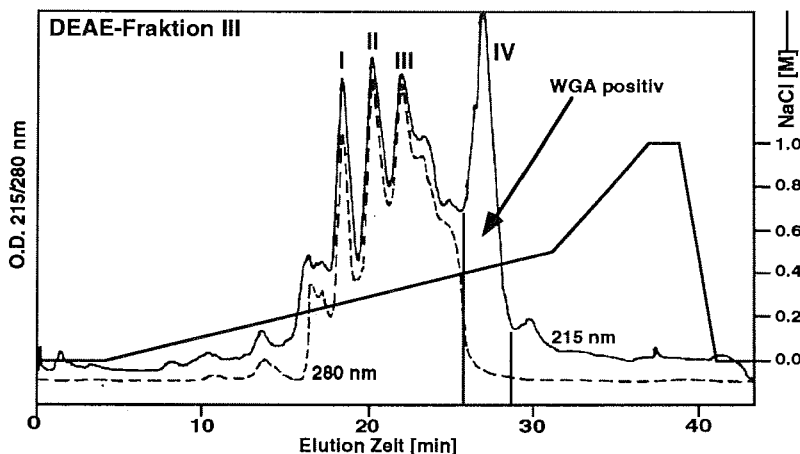


**Abbildung 17:** Kalorimetrische Analyse des AFGP von *P. antarcticum* (SL 170 mm). Die Probe ( $5\ \mu\text{l}$ ;  $20\ \text{mg/ml}$ ) wurde auf  $-40^\circ\text{C}$  abgekühlt, mit  $1^\circ\text{C/min}$  auf  $1,2^\circ\text{C}$  erwärmt, die Temperatur gehalten (5 min), und wieder mit  $1^\circ\text{C/min}$  gefroren. Bei einer "Haltetemperatur" von  $1,3^\circ\text{C}$  (5 min) ist die Probe vollständig aufgetaut, die Probe unterkühlt beim Gefrieren und kristallisiert bei  $\approx -17,6^\circ\text{C}$  aus. Die y-Achse gibt den Wärmefluß in mW wieder. S = Schulter, O = Onset, AT = annealing temperature, TH = thermale Hysterese.

## DAS N-ACETYLGLUCOSAMIN ENTHALTENDE GLYCOPROTEIN

*Die Schritte der Isolierung.*

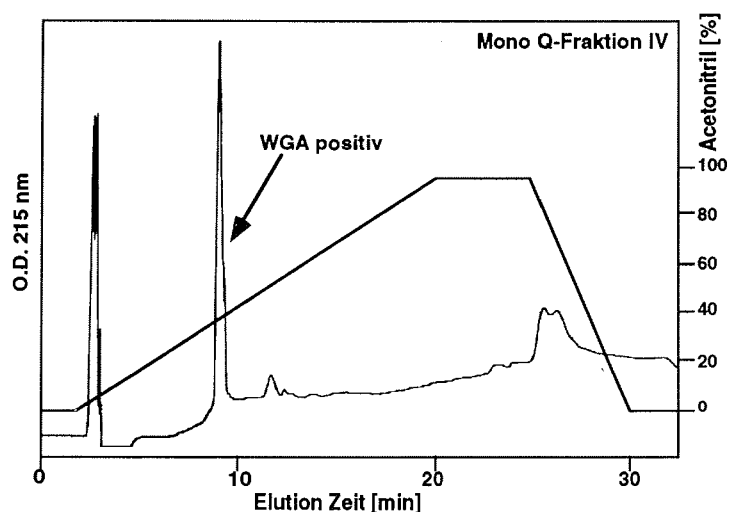
Neben dem AFGP (Peak I der DEAE-Chromatographie) fiel ein weiteres Glycoprotein auf, das mit dem Lektin WGA positiv reagierende Glycoprotein der Fraktionen 23/24 (AF III). Der erste Schritt zur Isolierung des GlcNAc enthaltenden Glycoproteins ist, wie bereits oben beschrieben, die Auftrennung auf einem DEAE-Ionenaustauscher (Abbildung 16). Das Glycoprotein eluiert - unabhängig von dem Alter des bearbeiteten Fisches - bei einer Salzkonzentration zwischen 0.14 und 0.15 M NaCl. Nachgewiesen wurde dieses Glycoprotein mit Lektinen. Nach jedem Schritt der Aufreinigung wurde ein Dot Blot mit verschiedenen digoxigenylierten Lektinen durchgeführt. Das Glycoprotein reagiert positiv mit den Lektinen WGA und DSA, aber negativ mit den Lektinen PNA, MAA oder SNA (siehe auch Abbildung 21). Daraus läßt sich ableiten, daß es sich zumindest bei dem terminalen Zucker um ein GlcNAc handeln muß. Das Glycoprotein konnte nur bei *P. antarcticum* isoliert werden, bewirkt eine außerordentliche thermale Hysterese (Abbildung 27-28), und soll deshalb im folgenden als **PAGP** (*Pleurogramma-Antifreeze Glycoprotein*) bezeichnet werden.



**Abbildung 18:** Anionenaustauscherchromatographie (Mono Q) der WGA-positiven Fraktionen der DEAE-TSK Säulenchromatographie. Dargestellt sind die Absorbance-Kurven für 215 und 280 nm. Als Anfangsbedingung wurde mit 20 mM Tris-HCl, pH 7.5 eluiert. Die Zeitereignisse des NaCl-Gradienten (% Eluent B: 20 mM Tris-HCl, 1 M NaCl, pH 7.5) sind: 0 min, 0%; 4 min, 0%; 34 min, 50%; 37 min, 100%; 39 min, 100%; 41 min, 0%; 47 min, 0%. Es wurden 200 µl injiziert, die Flußgeschwindigkeit betrug 1 ml/min, die Empfindlichkeit 0.64.

Die WGA-positiven Fraktionen der DEAE - Ionenaustauscherchromatographie (23/24; Dot Blot Abbildung 16) wurden gesammelt und erschöpfend gegen H<sub>2</sub>O dialysiert. Unter der Annahme, daß es sich bei PAGP ebenfalls um ein kleines Peptid handeln könnte wie bei dem bekannten AFGP 8 (2500 Dalton), wurde ein Dialyseschlauch mit einer Ausschlußgrenze von 2000 Dalton gewählt. Die Probe wurde lyophilisiert, mit H<sub>2</sub>O aufgenommen und ein weiteres Mal über einen

Ionenaustauscher (Mono Q) getrennt (Abbildung 18). Als Eluat diente ebenfalls ein Tris-HCl Puffer und ein NaCl-Gradient, der pH wurde allerdings variiert. Während bei einem pH von 9.5 keine deutliche Fraktionierung zu erkennen war, konnte bei pH 7.5 eine optimale Trennung erzielt werden. Zwischen einer Salzkonzentration von 0.16 und 0.38 M NaCl werden verschiedene Substanzen eluiert. Die vorderen Peaks (I - III), die eine Einheit bilden, zeigen keine positive Reaktion bei einer Lektinbehandlung, und sind demnach wohl nicht glycosiliert. Sie sind bei 280 nm noch deutlich detektierbar, und stellen offensichtlich eine Proteinverunreinigung dar. Der etwas isoliert stehende letzte Peak (IV), eluiert mit 0.34 - 0.38 M NaCl, zeigt eine deutliche Reaktion bei den Lektinen WGA und DSA und keine Reaktion mit PNA. Zudem ist er bei 280 nm nicht mehr detektierbar und bewirkt eine thermale Hysterese.



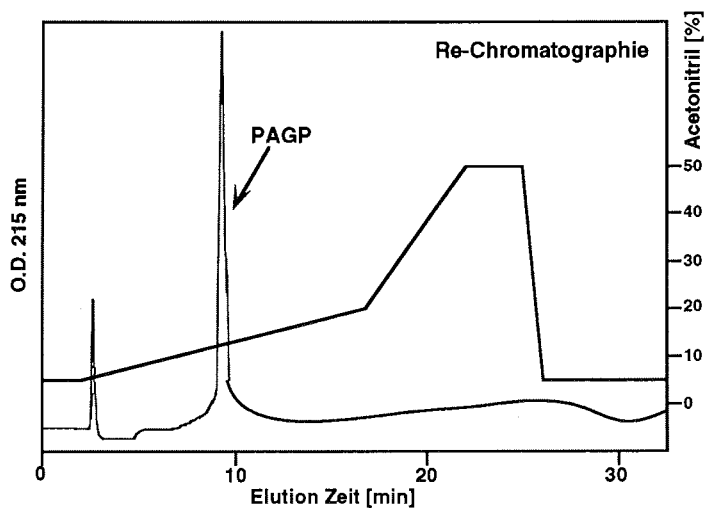
**Abbildung 19:** Reversed-Phase HPLC (Synchronapak S300 C4) der WGA-positiven Fraktion der Mono Q Säulenchromatographie. Dargestellt ist die Absorbance-Kurve für 215 nm. Als Anfangsbedingung wurde mit 0.1% TFA eluiert. Die Zeitereignisse des Acetonitril-Gradienten (% Eluent B: Acetonitril/0.1% TFA) sind: 0 min, 0%; 2 min, 0%; 20 min, 95%; 25 min, 95%; 30 min, 0%; 35 min, 0%. Injiziert wurden 100 µl, die Flußgeschwindigkeit betrug 1 ml/min, die Empfindlichkeit am Wellenlängenmonitor 0.32 und am Schreiber 7.

Die WGA-positiven Fraktionen der Mono Q - Ionenaustauscherchromatographie (Fraktion 27/28; 0.34 - 0.38 M NaCl) wurden gesammelt und lyophilisiert. Das Lyophilisat enthielt sehr viel NaCl. Eine anschließende Dialyse des salzhaltigen Lyophilisats erbrachte allerdings keine Verbesserung in der Aufreinigung. Vielmehr wurde die Probe in H<sub>2</sub>O gelöst und direkt mit der Reversed-Phase HPLC chromatographiert. Es wurden sowohl die stark hydrophobe C18 ODS Hypersil als auch die Synchronapak S300 C4 eingesetzt. Die weniger hydrophobe C4-Säule erwies sich dabei als die mit der größeren Trennschärfe (Abbildung 19). Eluiert wurde mit einem Acetonitril-Gradienten (in 0.1% TFA). Die schwach bindenden Substanzen, wie z.B. das NaCl, eluieren zwischen 3 und 4 min, erkenntlich an dem ersten großen Peak. Dieser Peak enthält keine Substanzen, die mit Lektin-



nen positiv reagieren oder eine thermale Hysterese auslösen. Die WGA-positive Substanz konnte bei einer Acetonitrilkonzentration von 15 - 17% nach 9 min eluiert werden. Diese Fraktion wurde gesammelt und lyophilisiert.

Um die Homogenität der eluierten Substanzen zu prüfen, wurde die gesammelte Fraktion mit der Synchropak S300 C4 (und C18 ODS Hypersil) re-chromatographiert (Abbildung 20). Es wurde ebenfalls mit Acetonitril eluiert, allerdings wurde ein flacherer Gradient gewählt. Das GlcNAc enthaltende Glycoprotein eluiert nach 14.7 min (15% Acetonitril) als homogener Peak.



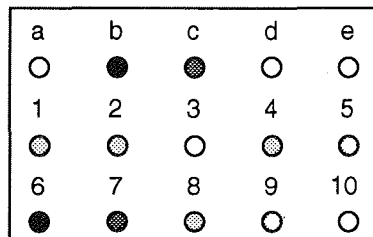
**Abbildung 20:** Re-chromatographie (C18 ODS Hypersil) der WGA-positiven Fraktion der RP C4 HPLC. Dargestellt ist die Absorbance-Kurve für 215 nm. Als Anfangsbedingung wurde mit 0.1% TFA (wässrig) eluiert. Die Zeitereignisse des Acetonitril-Gradienten (% Eluent B: Acetonitril/0.1% TFA) sind: 0 min, 5%; 2 min, 5%; 17 min, 20%; 22 min, 50%; 25 min, 50%; 26 min, 5%; 35 min, 5%. Injiziert wurden 100  $\mu$ l (50  $\mu$ g Glycoprotein), die Flußgeschwindigkeit betrug 1 ml/min, die Empfindlichkeit am Wellenlängenmonitor 0.32 und am Schreiber 7.

#### **Die Bestimmung der terminalen Zucker.**

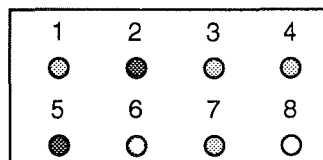
Zur Bestimmung der terminalen Zucker wurden Dot Blots angefertigt. In diesen Tests wurde das homogene, über RP-HPLC gereinigte Material (Abbildung 20) eingesetzt. In der oberen Reihe der Abbildung 21 (Dots a-e) wurde das PAGP (1  $\mu$ l = 10  $\mu$ g) mit PNA, WGA, DSA, SNA und MAA inkubiert. DSA (b) und WGA (c) zeigen deutliche Reaktionen, PNA (Gal $\beta$ 1- $\rightarrow$ 3GalNAc) zeigt keine Reaktion (a). SNA und MAA, die Sialinsäuren erkennen, sind ebenfalls negativ (d & e). Danach muß es sich bei dem terminalen Zucker um ein GlcNAc handeln. Ein Konzentrations-experiment in den unteren Reihen (Dots 1-10) zeigt, daß sogar noch 0.5  $\mu$ g (Dot 9) Glycoprotein mit dem Lektin WGA nachzuweisen sind. Dot 1-5 sind verschiedene Standards.

## Ergebnisse

Eine weitere elegante Möglichkeit terminales GlcNAc nachzuweisen, ist eine Kopplung von Zuckern an andere terminale Zucker mit Glycosyltransferasen und der anschließende Nachweis mit Lektinen (Abbildung 22). Dazu muß zunächst das auf Nitrocellulose übertragene Glycoprotein mit BSA blockiert werden. Alle weiteren Reaktionen laufen ebenfalls an dem an die Nitrocellulose gebundenen Glycoprotein ab. Zunächst wird mit Hilfe der Galactosyltransferase die Galaktose der Uridin-5'-diphospho-Galaktose (UDP-Gal) an ein terminales N-Acetylglucosamin übertragen. Diese Reaktion erfolgt bei 37°C über Nacht. Anschließend wird an die nun terminale Galaktose mit der Sialyltransferase eine Sialinsäure der Cytidin-5'-Phosphat-N-Acetylneuraminsäure (CMP-NANA) geknüpft. Diese Reaktion erfolgt ebenfalls bei 37°C über Nacht.



**Abbildung 21:** Skizze eines Dot Blot verschiedener Glycoproteine. Es wurden jeweils 1 µl aufgetropft. In der oberen Reihe (a-e) wurden jeweils 10 µg PAGP aufgetropft und mit verschiedenen Lektinen inkubiert: (a) 100 µg PNA, (b) 20 µg WGA, (c) 10 µg DSA, (d) 10 µg MAA, (e) 10 µg SNA. In den unteren beiden Querreihen (1-10) wurde jeweils mit WGA inkubiert (20 µg). (1) 1 µg Transferrin, (2) 1 µg Ovalbumin, (3) 1 µg a Glycoprotein, (4) 1 µg Asialofetuin, (5) 1 µg Fetuin, (6) 10 µg PAGP *P. antarcticum*, (7) 5 µg PAGP, (8) 1 µg PAGP, (9) 0.5 µg PAGP, (10) 0.1 µg PAGP. Bedingungen siehe Abbildung 8.

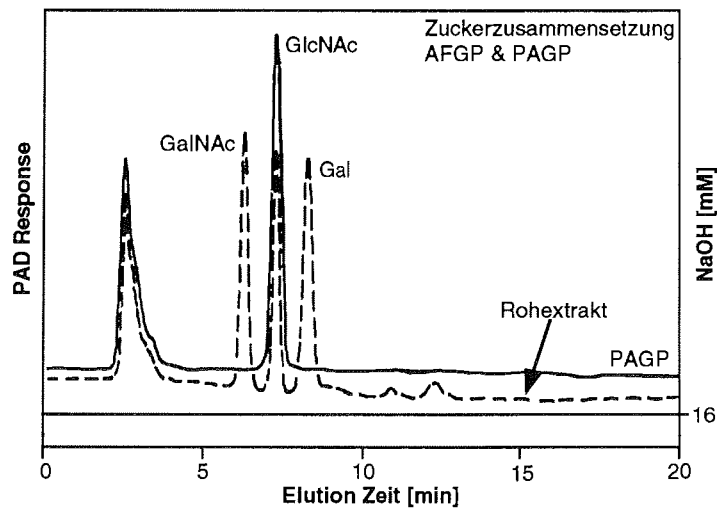


**Abbildung 22:** Skizze eines Dot Blot nach der Inkubation mit Glycosyltransferasen. Es wurden jeweils 1 µl aufgetropft und mit Galactosyltransferase und anschließend mit Sialyltransferase inkubiert. (1) 1 µg Asialofetuin, (2) 1 µg Fetuin, (3) 1 µg BSA-GlcNAc, (4) 1 µg BSA-Gal, (5) 10 µg AFGP *P. antarcticum*, (6) 1 µg AFGP *P. antarcticum*, (7) 10 µg PAGP *P. antarcticum*, (8) 1 µg PAGP *P. antarcticum*. Lektininkubation mit SNA (10 µg). Bedingungen siehe Abbildung 8.

Alle terminalen GlcNAc des PAGP sind jetzt mit Gal-NANA besetzt. Der Nachweis dieser entstehenden Sialinsäuren ist nun mit den für Sialinsäuren spezifischen Lektinen SNA und MAA möglich. Ebenfalls kann an die Galaktose des Disaccharids Galβ1-3GalNAc des AFGP mit der Sialyltransferase eine Sialinsäure gekoppelt werden, und damit mit SNA gezeigt werden, daß das Gal terminal vorliegt, wie es von dem AFGP zu erwarten ist. Abbildung 22 zeigt mit SNA inkubierte Dot Blots (1-8). Sowohl das AFGP (Dot 5) als auch das PAGP (7) zeigen eine Färbung,

wenn 10 µg Glycoprotein eingesetzt werden, eine Kopplung hat also in beiden Fällen stattgefunden. Bei den Dots mit nur 1 µg Substrat (6 & 8) konnte keine Kopplung mehr nachgewiesen werden. Als Standard wurden Asialofetuin und Fetuin (Kontrolle Färbung), BSA-GlcNAc (Kontrolle 1.Kopplung) und BSA-Gal (Kontrolle 2.Kopplung) aufgetropft (1 µg).

#### Die Zuckerzusammensetzung des PAGP.

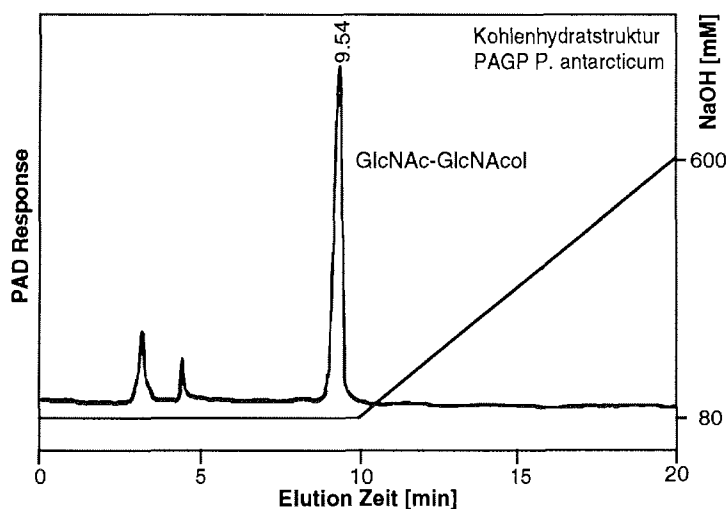


**Abbildung 23:** HPAEC-PAD Chromatogramm der Zuckerzusammensetzung des Rohextrakts (gestrichelt) und des gereinigten Thermal Hysterese Glycoproteins (gepunktet) von *P. antarcticum* nach TFA-Hydrolyse. Es wurden 25 µl (100 µg/ml) hydrolysierte Probe injiziert und isokratisch mit 16 mM NaOH eluiert. Der Fluß betrug 1 ml/min, die Empfindlichkeit 300 nA.

Die Kombination der TFA-Hydrolyse mit der HPAEC-PAD ermöglichte auch hier eine klare Bestimmung der Zuckerzusammensetzung. In Abbildung 23 sind die HPAEC Chromatogramme der TFA-Hydrolysen des AFGP-Rohextraktes (gestrichelt) und des gereinigten PAGP (durchgezogene Linie) dargestellt. Das Chromatogramm der TFA-Hydrolyse des Rohextrakts erinnert an das von *L. kempfi*. Es eluieren bei einem isokratischen Lauf mit 16 mM NaOH GalNAc bei 6.32' (0.065 nMol/500 ng Glycoprotein), GlcNAc bei 7.19' (0.137 nMol/500 ng) und Gal bei 8.27' (0.101 nMol/500 ng). Die Zucker Gal und GalNAc müssen dem AFGP zugeordnet werden. Nach der TFA-Hydrolyse des gereinigten Glycoproteins eluiert nur noch GlcNAc (0.682 µM/mg Glycoprotein). Da nach der TFA-Hydrolyse Sialinsäuren nicht erfaßt werden, wurde noch die schwefelsäure-Hydrolyse durchgeführt. Mit der HPAEC konnten jedoch keine Sialinsäuren bzw. sialinsäurehaltigen Oligosaccharide nachgewiesen werden (nicht abgebildet). Der einzige Zucker des PAGP ist demnach GlcNAc in einer Konzentration von 150.8 µg/mg Glycoprotein (0.682µMol/mg).

### Die Bindung des Kohlenhydratanteils an eine Aminosäure.

Zwar kann durch die TFA-Hydrolyse die Bruttozusammensetzung der Zucker eines Glycoproteins zweifelsfrei bestimmt werden, es bleibt aber ungeklärt, ob diese Zucker als Mono- oder Oligosaccharide vorliegen, und auf welche Art sie an welche Aminosäure gebunden sind. Zur Klärung kommen eine enzymatische oder chemische Deglycosilierung in Frage. Die Behandlung mit *Endoglycosidase F* (aktiv an N-glycosylierten Glycopeptiden mit hohem Mannose-Gehalt), *N-Glycosidase F* (spaltet alle N-Glycanketten von Glycopeptiden oder Proteinen) und *N-Acetyl-β-D-Glucosaminidase* (spaltet terminales GlcNAc in β-gebundenen Oligosacchariden) konnte keine Zucker freisetzen. Lediglich die chemische Methode der β-Elimination mit Na-Borhydrid erbrachte eine Deglycosilierung (Abbildung 24). Allerdings mußten die chemischen Bedingungen, die zu einer Spaltung der O-glycosidischen Bindung führen, verändert werden. Temperatur und NaOH-Konzentration wurden erhöht. Diese Bedingungen ähneln denen zur Spaltung von N-Glycanen (AMANO & KOBATA 1989; CHAMOV & HEDRICK 1988; OGATA & LLOYD 1982).



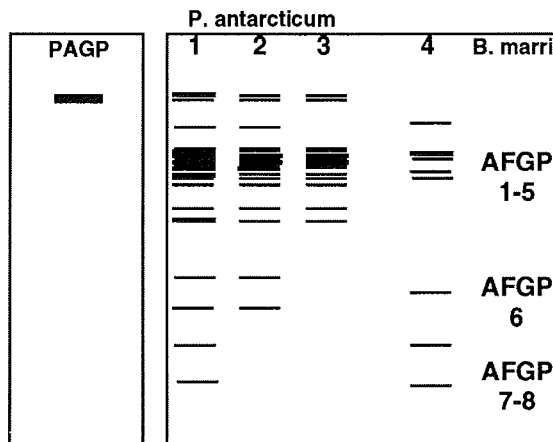
**Abbildung 24:** HPAEC-PAD Chromatogramm der Zuckerzusammensetzung des PAGP aus *P. antarcticum* nach β-Elimination mit NaBH<sub>4</sub>. Es wurden 25 µl (100 µg/ml) β-eliminierte Probe injiziert und über 10 min isokratisch mit 80 mM NaOH, sowie über weitere 10 min mit einem Gradienten auf 600 mM NaOH eluiert. Der Fluß betrug 0,4 ml/min, die Empfindlichkeit 300 nA.

Die Durchführung der β-Elimination in Kombination mit der HPAEC erwies sich als problematisch. Bei einer Behandlung ohne NaBH<sub>4</sub> sind die β-eliminierten Zucker nicht reduziert, binden an die Säule und sind so gut detektierbar. Oligosaccharide werden allerdings in vielen Fällen zerstört. Hingegen ist bei der Behandlung mit NaBH<sub>4</sub> zwar gewährleistet, daß Oligosaccharide in ihrer ursprünglichen Form vorliegen, sie sind aber reduziert und binden als Alditole nur sehr schlecht an die Säulen PA-1/PA-100 der DIONEX (HARDY & TOWNSEND 1988). So eluieren z. B. das Disaccharid N'-N''-Diacetylchitobiose und das Trisaccharid N'-N''-N'''-Triacetylchitotriose inner-

halb einer Minute, das Monosaccharid verschmilzt zumeist mit dem Injektionspeak. Mit der ganz neu entwickelten Säule MA-1 für Alditole (Dionex) ist es dagegen möglich Zuckeralkohole exakt zu trennen, da diese sehr stark an die Festphase binden, und mit hohen Konzentrationen NaOH eluiert werden müssen. In Abbildung 24 ist ein solches Chromatogramm dargestellt. Es wurde die MA-1 mit der MA-1 Guard Vorsäule verwendet, und die  $\beta$ -eliminierten und reduzierten Zucker des PAGP mit einem NaOH-Gradienten eluiert. Das Disaccharid GlcNAc-GlcNAcol eluiert mit 80 mM NaOH nach 9.54 min. Die Alkohole der Triacetylchitotriose und der Tetraacetylchitotetraose eluieren früher, der Alkohol des Monosaccharids GlcNAc dagegen erst nach 10.56 min (nicht dargestellt).

### SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

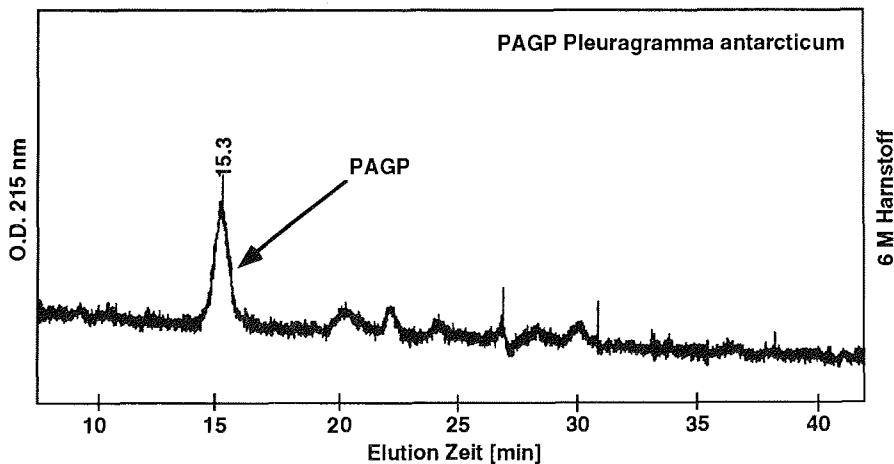
Die Molekulargewichtsbestimmung der Gefrierschutzglycoproteine erwies sich als problematisch. Zum einen zeigen Glycoproteine allgemein auf Grund ihrer Glycosilierung eine verminderte Wandergeschwindigkeit in Gelen. Sie täuschen ein höheres MW vor, eine Standardisierung ist schwierig. In Anlehnung an die Methode von DEVRIES *et al.* (1970) wurden die Proben nativ auf das SDS-PAGE aufgetragen. Lediglich der pH des Borat-Puffer wurde variiert (8.6, 8.9 und 9.22), wobei mit dem alkalischen (pH 9.22) die beste Trennschärfe erzielt werden konnte. Zum anderen lassen sie sich im Gel mit den konventionellen Methoden nicht anfärben. Bei der von O'GRADY *et al.* (1982) entwickelten Anfärbung (Fluorescamine in Aceton) werden 20 mg/ml je AFGP-Fraktion eingesetzt. Eine sehr sensitive, aber unspezifische Anfärbung ist die Silberfärbung nach BLUM *et al.* (1987). Spezifisch auf Glycoproteine allgemein reagiert die PAS-Färbung.



**Abbildung 25:** SDS-Gelelektrophorese (10%iges Gel) des AFGP von *P. antarcticum* in verschiedenen Konzentrationen und des PAGP (links). In jede Spur wurden 20  $\mu$ l pipettiert. Als Standard wurde das AFGP von *B. marri* verwendet, welches die gleiche Zusammensetzung wie das AFGP von *D. mawsoni* hat (nach O'Grady *et al.* 1982). (1) 400  $\mu$ g AFGP von *P. antarcticum*, (2) 200  $\mu$ g AFGP, (3) 100  $\mu$ g AFGP, (4) Standard, 400  $\mu$ g AFGP von *B. marri*. Das Gel wurde auf NC geblottet. Die linke Spur wurde mit WGA, die anderen mit PNA inkubiert und angefärbt.

Eine neue, sensitive und spezifische Methode zum Nachweis von AFGP (und anderen Glycoproteinen) auf Nitrocellulose (NC) mit Hilfe von digoxigenylierten Lektinen wird hier erstmalig vorgestellt. Abbildung 25 zeigt den Blot der SDS-Gelelektrophorese des AFGP von *P. antarcticum* in verschiedenen Konzentrationen (1-3) und des AFGP von *B. marri* (400 µg) als Standard, da dieses vergleichbar mit dem gut untersuchten AFGP von *D. mawsoni* (O'GRADY *et al.* 1982) ist. Geblotet wurde nur über 45 min um einen Verlust von Glycoproteinen durch die Wanderung durch die Membran zu vermeiden. Die Inkubation mit PNA ergab eine spezifische Anfärbung des AFGP, die mit WGA des PAGP. In den ersten vier eng beieinander liegenden Banden des Standards sind die AFGP 1-5 zu finden mit einem MW zwischen 33500 und 12600 Dalton. Das AFGP 6 (MW ) zeigt eine Hauptbande mit drei schwachen Banden. AFGP 7-8 sind nur sehr schwach auszumachen. Auffällig bei der Trennung des AFGP von *P. antarcticum* ist die intensive Färbung auch bei geringeren Mengen (100 µg) und die weiteren Banden, d.h. das AFGP liegt nicht nur in den bislang 8 beschriebenen Größen vor. Zusätzlich sind 7 Banden zwischen AFGP 5 und 6, sowie eine Bande zwischen AFGP 6 und 7 zu beobachten. Das PAGP blieb im Sammelgel "stecken", konnte also auf Grund entweder seiner (A) Größe oder (B) Glycosilierung oder (C) expandierten Form unter diesen Bedingungen nicht wandern.

**Die Bestimmung des Molekulargewichts**



**Abbildung 26:** Chromatogramm der Gelfiltration (Superdex 75) des PAGP zur Bestimmung des Molekulargewichts. Die Säule wurde isokratisch mit 6 M Harnstoff (in 50 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7.5) über eine HPLC gefahren. Es wurden 100 µl (1 mg/ml) Probe injiziert. Der Fluß betrug 0.5 ml/min, es wurde bei 215 nm detektiert.

Als weitere Methode zur Bestimmung des MW wurde die Gelfiltration eingesetzt. Sowohl bei der Verwendung von Superdex 75 mit einem 50 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> Puffer (pH 7.5), als auch mit 6 M Harnstoff (in 50 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7.5) als Eluent, eluiert das gesuchte Glycoprotein im Aus-

schluß. Dies würde bedeuten, daß sein MW mindestens 75 kDa beträgt. In Abbildung 26 ist das Chromatogramm dargestellt (6 M Harnstoff). Auch hier ergaben sich die Probleme der Zuordnung zu einem MW nach dem Standard. Glycoproteine können Aggregate bilden, täuschen dadurch ein höheres MW vor, und eluieren früher als erwartet. Dieses Phänomen sollte durch den Harnstoff als Eluat ausgeschlossen werden. Allerdings ergibt sich noch ein anderes Problem, nachdem die Gelfiltrationssäulen mit globulären Proteinen geeicht werden, d.h. die so ermittelten Molekulargewichte gelten nur für solche Proteine. Glycoproteine mit einer expandierten Sekundärstruktur, wie sie z.B. bei dem AFGP beobachtet werden, täuschen ebenfalls ein höheres MW vor. Sie lassen sich in der Regel nicht auf ihre Größe hin bestimmen, da eine Standardisierung schwer möglich ist.

#### **Die Primärstruktur des PAGP.**

Die Analysen zur Aminosäurezusammensetzung und -sequenz erwiesen sich auf Grund der hohen Glycosilierung des Protein als schwierig, da die ebenfalls hydrolysierten Zucker zu Fehlinterpretationen führen können. Am Aminosäureanalyser sind Säule und mobile Phase der HPLC unter Standardbedingungen für eine optimale Trennung der Aminosäuren (AS) ausgelegt. Unter diesen Bedingungen eluieren aber Serin und GlcNAc zur gleichen Zeit. Beide Substanzen werden in einem Peak, d.h. als eine Substanz dargestellt. Diese Umstände machten eine manuelle Hydrolyse und Derivatisierung der Glycoproteine unumgänglich, um eine quantitative Aussage der AS-Zusammensetzung zu bekommen.

Zur Trennung von Serin und GlcNAc wurden zwei Variationen versucht, wobei allerdings Einbußen in der Trennschärfe der übrigen AS hingenommen werden mußten. Zum einen wurde der Acetonitril-Gradient verflacht, was aber zu keiner Verbesserung führte. Zum anderen wurde der pH des Puffers der mobilen Phase auf 5.28 und/oder der Derivatisierungspuffer auf 4.90 herabgesetzt, und die Ionenstärke von 30 mM im Standard auf 300 bzw. 150 mM heraufgesetzt. Bei pH-Werten des Derivatisierungspuffers von 4.8 und tiefer bestand die Gefahr, daß die Bindung der Aminosäure an PTC gelöst wird, und somit die Detektion nicht stattfinden kann. Für die vorliegende Untersuchung wurde zur Trennung von Serin und GlcNAc der Puffer der mobilen Phase (300 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , pH 5.28) verändert.

In Tabelle 6 sind die Aminosäurezusammensetzung der automatischen Analyse und die Ergebnisse der manuellen Bestimmung von Serin und GlcNAc zusammengefasst. Von den Aminosäuren dominiert Serin klar mit 461 nMol/mg Glycoprotein, gefolgt von Histidin (141 nMol/mg) und Arginin (29 nMol/mg). Glycin und Tyrosin sind nur in geringen Konzentrationen (23 bzw. 12 nMol/mg) vorhanden. Die Angabe zum Glycin ist zudem mit Vorsicht zu interpretieren, da Kontaminationen mit dieser AS sehr leicht auftreten. Der Anteil von GlcNAc mit 750 nMol/mg ist sehr hoch. Er steht in gutem Einklang mit den Untersuchungen zur Zuckerzusammensetzung an der HPAEC (Abbildung 23: 682 nMol/mg). Betrachtet man die relative Zusammensetzung der AS (Mol%), so fällt die Dominanz von Serin und die geringe Diversität der AS auf, die an das AFGP

## Ergebnisse

mit den AS Alanin und Threonin im Verhältnis 2:1 erinnert. Das Verhältnis GlcNAc : Serin : Histidin beträgt ungefähr 5:3:1.

**Tabelle 6:** Aminosäuren- und Zuckerzusammensetzung des PAGP. Es wurde über 24 h bei 110°C hydrolysiert. Die Aminosäuren sind in nMol/mg Glycoprotein bzw. in Mol% angegeben.

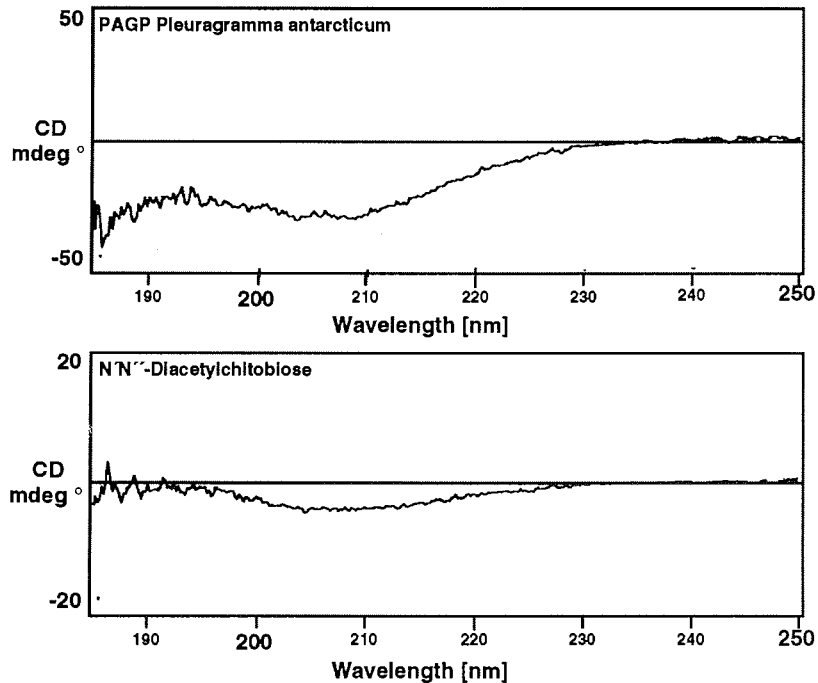
Zusammensetzung Aminosäure	absolut nMol/mg	relativ (nur AS) Mol%	relativ (gesamt) Mol%
GlcNAc	750	-	53.0
Serin	461	69.2	32.6
Glycin	23	3.5	1.6
Histidin	141	21.2	10.0
Arginin	29	4.3	2.0
Tyrosin	12	1.8	0.8

Die Sequenzierung des PAGP führte zu keinem Ergebnis. Bei gering glycosilierten Proteinen kann man eine Sequenz mit mehr oder weniger Lücken erwarten, bei dem PAGP mit einem Zuckeranteil von über 50 Mol% war jedoch keine Sequenz zu sehen, lediglich die erste AS konnte als Serin identifiziert werden. Einen Ausweg bietet ein Abbau des Glycoproteins mit Proteasen. Aber weder mit Protease noch mit Trypsin konnte das PAGP verdaut werden. Von Glycoproteinen mit einer N-Glycosilierung ist bekannt, daß sie besonders widerstandsfähig gegen Proteasenabbau sind. Dies könnte auch in dem vorliegenden Fall eingetroffen sein.

### Die Sekundärstruktur des PAGP.

Das CD-Spektrum (Zirkulardichroismus) des PAGP zeigt die Abbildung 27, dargestellt als die molare Elliptizität  $[\theta]$  in Abhängigkeit von der Wellenlänge [nm]. Das PAGP wurde in 50 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  gelöst und bei Raumtemperatur vermessen. Das Maximum des CD Signals liegt im positiven Bereich bei 192 nm, das Minimum wurde bei 208 nm gemessen. Das CD Spektrum ist grundlegend verschieden von dem des AFGP (siehe auch Abbildung 11). Für die Berechnung der Sekundärstruktur muß die eingesetzte Proteinmenge bekannt sein. Unter Berücksichtigung der Aminosäurenanalyse (Tabelle 6) wurde bei einer verwendeten Probenkonzentration von 0.5 mg/ml eine Proteinkonzentration von 0.2 mg/ml kalkuliert. In diesem Fall ergeben sich Anteile von 56%  $\beta$ -Konformation, 19%  $\alpha$ -Helix und 25% restliche Strukturen. Der Fehler der Berechnung der  $\beta$ -Konformation wird mit 20% angegeben, der der  $\alpha$ -Helix mit maximal 5%. Das Spektrum des Puffers wurde für diese Berechnungen von dem Proteinspektrum abgezogen. Die Abhängigkeit der Anteile der Sekundärstruktur von der Proteinkonzentration soll in der Diskussion näher erläutert werden (siehe auch Abbildung 31). Als Kontrolle wurde das Disaccharid N'-Diacetylchitobiose unter den selben Bedingungen vermessen (Abbildung unten). Es zeigt ähnlich wie bei dem Disaccharid Gal-GalNAc nur eine geringe Absorption und hat somit einen geringen Einfluß auf das Spektrum des Proteins.





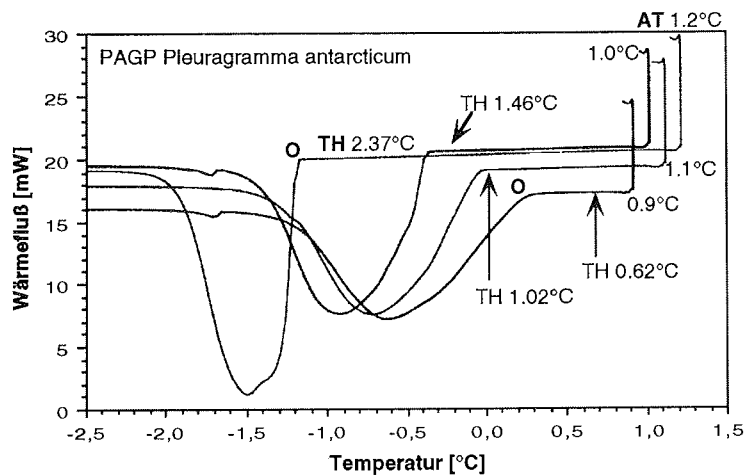
**Abbildung 27:** Zirkulardichroismus Spektrum des PAGP von *Pleuragramma antarcticum* gemessen bei Raumtemperatur (20°C). Das Glycoprotein wurde in 50 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , pH 7.4 gelöst (500  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ), die Spaltbreite der Küvette betrug 0.05 mm. Das Spektrum ist für den Wellenlängenbereich von 185 bis 250 nm dargestellt. Die Ordinate gibt die molare Elliptizität  $[\theta]$  in  $\text{mdeg}^\circ$  wieder. Die untere Abbildung zeigt das Spektrum des Disaccharids N,N'-Diacetylchitobiose, vermessen unter den gleichen Bedingungen.

#### **Die Gefrierschutzaktivität des PAGP.**

Die Gefrierschutzaktivität (thermale Hysterese) wurde, entsprechend den Untersuchungen an dem AFGP der anderen Arten, mit Hilfe der differential scanning calorimetry (DSC) bestimmt. In Abbildung 28 sind die Wärmeflußdiagramme des PAGP (50 mg/ml) für verschiedene Haltetemperaturen (0.9° - 1.2°C) dargestellt. Bei einer Haltetemperatur von 1.3°C ist die Probe komplett aufgetaut, und gefriert erst wieder in einem unterkühlten Stadium bei  $\approx -17.0^\circ\text{C}$ . Maximale Hysteresen zwischen 3.22° und 2.44°C wurden bei einer Haltetemperatur von 1.2°C (15.6 % Eis) gemessen. Bei 1.3°C war die Probe aufgetaut. Die Konsistenz der Glycoproteinlösung in dieser Konzentration ähnelt der eines klebrigen Breis, vermutlich hervorgerufen durch den hohen Zuckeranteil.

## Ergebnisse

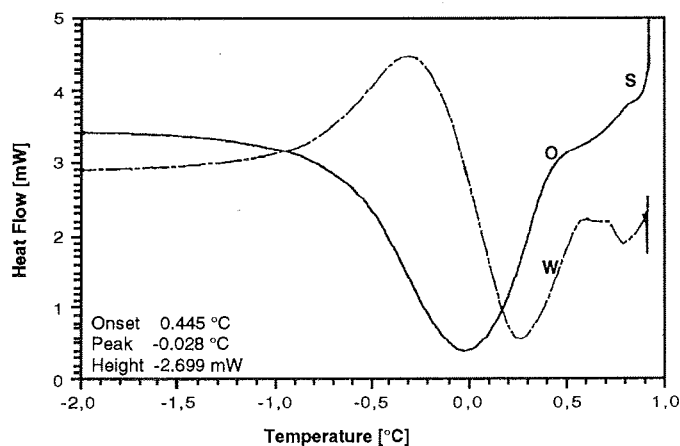
Bei anderen Proteinen, Glycoproteine oder Oligosacchariden konnte dies nicht beobachtet werden. Setzt man eine geringer konzentrierte Lösung ein (40 mg/ml), so lassen diese beobachteten Eigenschaften stark nach, und die maximal beobachtete Hysterese verringert sich auf 0,89°C. Anders als bei dem AFGP entsteht während der ersten Abkühlphase keine Schulter. Vielmehr wird ein langes Plateau beobachtet, welches abrupt in den Exotherm mündet (Onset -1,24°C). Das Glycoprotein verhindert ein Wachstum von Eiskristallen bis zu einer kritischen Temperatur vollständig, es findet also auch kein Wachstum der Eiskristalle entlang ihrer *c*-Achse statt, wie es bei dem AFGP beobachtet werden konnte, gekennzeichnet durch die Schulter [S]. Die Hysterese nimmt stark ab, wenn die Haltetemperatur erniedrigt wird, d. h. der Eisgehalt in der Probe zunimmt.



**Abbildung 28:** Kalorimetrische Analyse des PAGP von *P. antarcticum*. Die Probe (5  $\mu$ l; 50 mg/ml) wurde auf -40°C abgekühlt, mit 1°C/min auf verschiedene "Haltetemperaturen" erwärmt, die Temperatur gehalten (5 min), und wieder mit 1°C/min gefroren. Bei einer "Haltetemperatur" von 1,3°C (5 min) ist die Probe vollständig aufgetaut, die Probe unterkühlt beim Gefrieren und kristallisiert bei  $\approx$  -17,0°C aus. Die y-Achse gibt den Wärmefluß in mW wieder. S = Schulter, O = Onset, AT = annealing temperature, TH = thermale Hysterese.

Bei dem PAGP kann keine Hysterese nachgewiesen werden, wenn die Glycoproteinkonzentration der Probe 5 mg/ml oder weniger beträgt. Ähnliches gilt auch für das AFGP. Erst bei einer Konzentration von 10 mg/ml AFGP ist eine deutliche Hysterese meßbar (Tabelle 7). Mischt man aber beide Glycoproteine jeweils in einer Konzentration von 5 mg/ml, so ist eine deutliche Verzögerung des Eiswachstums zu beobachten (Abbildung 29). Dargestellt ist der Gefrierprozess bei einer Haltetemperatur von 1,0°C, der die maximale Hysterese anzeigt. Bei 1,1°C ist in diesem Fall die Probe vollständig aufgetaut, und kristallisiert erst bei 13,8°C aus. Kurz nach dem Abkühlen entsteht eine kurze, aber steile Schulter. Diese Schulter flacht etwas ab, mündet aber nie in ein Plateau, wie man es bei dem AFGP in höheren Konzentrationen nachweisen kann (Abbildung 17).

Die Probe gefriert erst bei 0.445°C vollständig, die Hysterese beträgt also  $\approx 0.45^\circ\text{C}$ . Trotz der geringen Konzentrationen einer Lösung mit den Glycoproteinen AFGP und PAGP wird ein Gefrieren verhältnismäßig lange verzögert, auch wenn kein vollständiger Stop des Eiswachstums eintritt (kein Plateau während der Abkühlung wie beim AFGP). Die zweite Kurve zeigt die erste Ableitung, berechnet mit Hilfe der Perkin Elmer Software. Der Wendepunkt W der ersten Ableitung gibt den Onset O wieder, an dem die Probe vollständig gefriert.



**Abbildung 29:** Kalorimetrische Analyse des AFGP und des PAGP von *P. antarcticum*. Die Probe (5  $\mu\text{l}$ ; 5 mg/ml) wurde auf  $-40^\circ\text{C}$  abgekühlt, mit  $1^\circ\text{C}/\text{min}$  auf verschiedene "Haltetemperaturen" erwärmt, die Temperatur gehalten (5 min), und wieder mit  $1^\circ\text{C}/\text{min}$  gefroren. Bei einer "Haltetemperatur" von  $1.3^\circ\text{C}$  (5 min) ist die Probe vollständig aufgetaut, die Probe unterkühlt beim Gefrieren und kristallisiert bei  $\approx -13.8^\circ\text{C}$  aus. Die gestrichelte Kurve zeigt die erste Ableitung, W den Wendepunkt, der den Onset O bestimmt. Die y-Achse gibt den Wärme fluß in mW wieder. S = Schulter, O = Onset, AT = annealing temperature, TH = thermale Hysterese.

Abschließend sollen die Gefrierschutzaktivität verschiedener (Glyco)Proteine (AF-Typ) verglichen werden, angegeben als maximale thermale Hysterese TH [ $^\circ\text{C}$ ] (Tabelle 7). Die untersuchten Fraktionen (AF I - III) stammen aus der Aufreinigung mit der DEAE-Anionenaustauscherchromatographie (Abbildung 7). Bei dem AFGP handelt es sich um die Fraktion AF I, bei dem PAGP um das rein isolierte Glycoprotein (RP-HPLC). Als Kontrolle wurde das Verhalten während des Gefrierungsprozess von Standards untersucht. Mucin aus Schweinemagen, Fetuin, Asialofetuin, Poly-L-Serin und das Oligosaccharid N'-N''-N'''-Tetraacetylchitotetraose lösen auch in Substratkonzentrationen von 50 mg/ml keine thermale Hysterese aus, sondern verhalten sich während des Abkühlens wie  $\text{H}_2\text{O}$  (siehe auch Material und Methoden).

## Ergebnisse

Der Vergleich der verschiedenen AF-Fractionen zeigt, daß auch bei gleicher AFGP-Konzentration (20 mg/ml) die Aktivitäten sehr unterschiedlich sein können. So wurden bei *L. kemp* und den Channichthyiden *C. wilsoni* und *N. ionah* Hysteresen von nur 0.52 - 0.56°C gemessen, während bei *P. antarcticum*, *D. mawsoni* und *D. hunteri* maximale Werte von über 1.0°C festgestellt wurden. Das AFGP der meisten Arten verursacht eine Hysterese von  $\approx 0,9^\circ\text{C}$ . Auffällig ist, daß die AFGP der Bathydraconidae und der Artedidraconidae alle eine sehr ähnliche Hysterese auslösen, die zwischen 0.84° und 0.90°C liegt. *B. marri* besitzt zudem noch eine weitere Gefrierschutzsubstanz, die hier als AF III bezeichnet ist und ebenfalls eine Hysterese von 0.85°C bewirkt. Diese Art, die vorwiegend im Filchner-Graben gefangen wird und in großen Tiefen (> 1000 m) lebt, nimmt vermutlich, ähnlich wie *P. antarcticum*, eine Sonderstellung innerhalb der Notothenioidei ein (s.a. Diskussion).

**Tabelle 7:** Vergleich der maximalen thermalen Hysterese TH [°C] verschiedener Gefrierschutzsubstanzen (minimaler Eisgehalt in der Probe) ausgewählter Fischarten. AF-Typ = Gefrierschutzsubstanz.

Fischart	AF-Typ	mg/ml	TH [°C]
<b>Nototheniidae</b>			
<i>Lepidonotothen kemp</i>	AFGP	20	0.515
<i>Aethotaxis mitopteryx</i>	AFGP	20	0.888
<i>Dissostichus mawsoni</i>	AFGP 1-4	20	1.021
	AFGP 5-8	20	0.915
<i>Pleuragramma antarcticum</i>	AFGP	10	0.805
	AFGP	20	1.195
	AF II	20	0.455
	PAGP	40	0.895
	PAGP	50	2.44-3.21
	AFGP & PAGP	5	0.455
<b>Artedidraconidae</b>			
<i>Pogonophryne marmorata</i>	AFGP	20	0.873
<i>Pogonophryne scoti</i>	AFGP	20	0.895
<b>Bathydraconidae</b>			
<i>Bathydraco marri</i>	AFGP	20	0.845
	AF III	20	0.850
<i>Gymndraco acuticeps</i>	AFGP	20	0.904
<i>Gerlachea australis</i>	AFGP	20	0.838
<i>Racovitzia glacialis</i>	AFGP	20	0.838
<b>Channichthyidae</b>			
<i>Chaenodraco wilsoni</i>	AFGP	20	0.565
<i>Chionodraco myersi</i>	AFGP	20	0.888
<i>Cryodraco antarcticus</i>	AFGP	20	0.651
<i>Dacodraco hunteri</i>	AFGP	20	1.001
<i>Neopagetopsis ionah</i>	AFGP	20	0.521
<i>Pagetopsis maculatus</i>	AFGP	20	0.941
<i>Pagetopsis macropterus</i>	AFGP	20	0.968
<b>nicht-Notothenioidei</b>			
<i>Paraliparis somovi</i>	AF I	50	0.541
<i>Muraenolepis marmoratus</i>	AF I	50	0.564
<i>Macrourus holotrachys</i>	AF I	50	$\approx 0.1$
<i>Gymmoscopelus opisthopterus</i>	AF I	50	$\approx 0.1$

Die stärkste Gefrierpunktserniedrigung kann bei dem PAGP in einer Konzentration von 50 mg/ml gemessen werden, sie beträgt bis zu 3.21°C. Bei einer Konzentration von 40 mg/ml konnte nur noch eine Hysterese von 0.89°C beobachtet werden. *P. antarcticum* besitzt als einzige Art noch eine dritte Gefrierschutzsubstanz, die hier mit AF II bezeichnet ist und eine Hysterese von immerhin 0.45°C auslöst. Bei den anderen aus der DEAE-Ionenaustauscherchromatographie isolierten Substanzen (Tabelle 3) war eine Hysteresebestimmung mit Konzentrationen von 20 mg/ml schwierig. So wurden diese Messungen in Konzentrationen von 50 mg/ml durchgeführt. Die Fraktionen AF I des Liparididen *P. somovi* und des Gadiden *M. marmoratus* bewirken immerhin eine Hysterese von 0.54° bzw. 0.56°C. Der Nachweis der Gefrierschutzsubstanz bei *M. marmoratus* bedeutet gleichzeitig einen Erstdnachweis von Gefrierschutzsubstanzen bei antarktischen Gadiden allgemein. Die Gefrierschutzfraktionen AF I von *M. holotrachys* und *G. opisthopterus* verursachen Hysteresen von ca. 0.1°C. Auch wenn die Gefrierpunktserniedrigung nur sehr niedrig ist, so ist dieser Nachweis doch von großer Bedeutung, da beide Arten Tiefseefische sind, und nur in wärmeren Wasser vorkommen. Ähnliches gilt auch für *P. somovi* und *M. marmoratus*.

## DISKUSSION

Ausgangspunkt dieser Arbeit war der Widerspruch zwischen dem (vermeintlichen) Fehlen biologischer Gefrierschutzsubstanzen bei einigen polaren Fischarten und deren Vorkommen bei Temperaturen nahe dem Gefrierpunkt. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sollen im folgenden unter Berücksichtigung von Biologie und Evolution der Arten besprochen werden.

### Die Gefrierschutzsubstanzen polarer Fische

#### DAS AFGP DER ANTARKTISCHEN NOTOTHENIOIDEI

*Die Menge und Zusammensetzung der Gefrierschutzglycoproteine hängt mit der Lebensweise des Fisches zusammen.*

Mit der vorliegenden Arbeit gelang erstmals eine weiträumig angelegte Analyse der Gefrierschutzsubstanzen von Fischarten der wichtigsten antarktischen Familien, sowohl der Notothenioidei, als auch nicht-notothenioider Arten. Dabei wurden die bisherigen Untersuchungen insofern ergänzt, als daß nun ein sehr umfassendes Bild über das Vorkommen dieser Proteine in polaren Fischen vorliegt. Die aus der Literatur verfügbaren und die eigenen Daten über Gefrierschutz sind in der Tabelle 8 zusammengestellt. Wie im Ergebnissteil dargestellt wurde, variiert die qualitative und quantitative Zusammensetzung der Gefrierschutzglycoproteine von Art zu Art stark (Tabelle 3). Bei *T. pennellii* wurden z.B. große Mengen AFGP (0.334% FRG) isoliert, während *G. gibberifrons* weniger als ein Zehntel davon besitzt (0.027% FRG). Das deutet auf eine Beziehung zwischen dem Gefrierpunkt des Blutes, d.h. der Temperatur, bei der der Fisch in der Anwesenheit von Eis gefriert und dem Lebensraum des Fisches hin (DEVRIES 1988). Die antarktischen Notothenioidei besitzen ganzjährig einen Gefrierschutz aus AFGP (DEVRIES & SOMERO 1970), die meisten arktischen Fische dagegen synthetisieren Gefrierschutz nur im Winter (ANANTHANARAYANAN 1989).

Die Konzentrationen dieser Substanzen werden entsprechend der Lebensweise nur auf die tatsächlich notwendige Temperaturtoleranz eingestellt. So ist bekannt, daß im selben Lebensraum (Rossmeer) der oberflächennah in ständigem Eiskontakt lebende *P. borchgrevinki* einen stärkeren Gefrierschutz unterhält als die Bodenarten *T. hansonii*, *T. loennbergii* und *T. bernacchii* (DEVRIES & LIN 1977). Außerdem werden AFGP-Moleküle bei den Notothenioidei nicht ausgeschieden, sondern durch aglomeruläre Nieren zurückgehalten (DOBBS *et al.* 1974; DOBBS & DEVRIES 1975; EASTMAN & DEVRIES 1986b). Der physiologische Aufwand, der zur Rückhaltung dieser Moleküle getrieben wird, weist auf einen vermutlich aufwendigen Stoffwechselprozeß hin, der sich im Ruhesauerstoffverbrauch niederschlägt (HUBOLD 1991).

DEVRIES & LIN (1977) führten als Beweis für die Hypothese, daß Gefrierschutzsubstanzen antarktischer Fische ganzjährig und gleichmäßig synthetisiert werden, ein Experiment mit akklimatisierten Fischen an: *P. borchgrevinki* synthetisiert auch nach 6 Wochen in 4°C warmen Wasser noch AFGP, die Hysterese des Blutserums ändert sich nicht. Es sollte allerdings bedacht werden,

daß *P. borchgrevinki* nicht repräsentativ für die Notothenioidei ist. Diese Art lebt cryopelagisch in der oberen Wasserschicht (ANDRIASHEV 1970; WILLIAMS 1988), und ist damit sehr konstanten physikalischen Bedingungen ausgesetzt. Das ganzjährig mit Eis beladene Wasser zeigt gleichbleibende Temperaturen (-1.86°C) mit nur minimalen Schwankungen (LITTLEPAGE 1965), sowohl während der derzeitigen Warmzeit, als sicherlich auch vor 50 000 Jahren während der letzten Eiszeit. Auf Grund dieser langzeitigen thermalen Stabilität einiger Ökosysteme der antarktischen marinen Umwelt, besteht für manche antarktische Fischarten (z.B. *P. borchgrevinki*) keine Notwendigkeit einer genetischen Variabilität der Akklimation an Temperaturwechsel.

Dagegen beträgt die thermale Hysterese des Bluteserums von *L. dearborni* nach 6 Wochen Akklimation nur noch  $\approx 80\%$  des ursprünglichen Wertes (DEVRIES & LIN 1977). Von den Zoarcidae wird allgemein angenommen, daß sie aus dem Norden in das Südpolarmeer eingewandert sind (siehe auch unten). An der Antarktischen Halbinsel und den subantarktischen Inseln liegen die Wassertemperaturen meist um 0°C. Arten dieser Regionen (z.B. *L. larseni*, *C. rastrispinosus*) zeigen eine geringere Gefrierresistenz als hochantarktische Arten; bei *L. kempfi* konnten gar keine Gefrierschutzsubstanzen nachgewiesen werden (DEVRIES & LIN 1977). Zudem ist in diesen Regionen, ähnlich wie auch in der Arktis, ein jahresszeitlicher Wechsel der Wassertemperatur zu beobachten. Die physikalischen Bedingungen, im speziellen die Gefahr, mit Eis in Berührung zu kommen, sind für die dort lebenden Arten nicht konstant. Gleiches trifft auch für Arten zu, die durch Wanderung z.B. auf dem schmalen östlichen Schelf des Weddellmeeres verschiedene Bodenwassertemperaturen von -1.8 bis +0.5°C aktiv aufsuchen (HUBOLD 1991).

Wie aus Tabelle 8 hervorgeht, zeigen die meisten antarktischen Fischarten eine extreme Tiefenverbreitung (z.B. *D. longedorsalis* > 2000 m), wie es auch von anderen Tierordnungen beschrieben wurde (KLAGES 1991; HAIN 1990). Zum Teil führen sie im Verlauf ihres Lebenszyklus vertikale Wanderungen durch (z.B. *P. antarcticum*), oder aber tagesperiodische (z.B. Myctophidae), zum Teil sind sie an verschiedenen geographischen Orten in unterschiedlichen Tiefen anzutreffen (*T. hansonii*: McMurdo < 100 m, Weddellmeer 200-300 m). Die Notothenioidei der vorliegenden Untersuchung kann man bezüglich ihres Vorkommens und ihrer AFGP-Konzentrationen in drei Gruppen einteilen: Arten, die vorwiegend auf dem Schelf in flacherem Wasser (100 - 400 m) leben, besitzen viel AFGP (*T. pennellii*, *G. acuticeps*, *T. eulepidotus*, *C. wilsoni*, *C. hamatus*, *P. macropterus*). Arten der biomassenreichsten Zone am Kontinentalrand (400 - 600 m) im Weddellmeer und der Lazarev See (EKAU 1990; WÖHRMANN & ZIMMERMANN 1992) besitzen mittlere Mengen an AFGP (*T. lepidorhinus*, *T. loennbergi*, *G. australis*, *R. glacialis*, *C. myersi*, *P. maculatus*, *C. antarcticus*, *D. hunteri* und die Artedidraconidae). Arten der tieferen Zonen des Kontinentalabhangs synthetisieren die geringsten Mengen (*B. marri*, *N. ionah*, nicht-Notothenioidei).

## Diskussion

**Tabelle 8:** Zusammenfassung der verfügbaren Daten über Gefrierschutzsubstanzen polarer Fische. AF-Typ = Gefrierschutzsubstanz; TH = thermale Hysterese [°C] von Blutsrum (S) oder Proteinklösung (20 mg/ml), / = keine Untersuchungen. Angaben zur min/max Tiefe [m], Verbreitung und Lebensweise stammen aus Heemstra & Gon (1990); Fangregion und  $\sigma$  Temp [°C] sind den jeweiligen Arbeiten entnommen. \* = vorliegende Arbeit; 1 = Dobbs et al. 1974; 2 = Dobbs & DeVries 1975; 3 = Eastman & DeVries 1986a; 4 = Cheng & DeVries 1989; 5 = Schrag et al. 1987; 6 = Ananthanarayanan et al. 1986; 7 = Schneppenheim & Theede 1982; 8 = DeVries 1980; Duman & DeVries 1976; 10 = VanVoorhies et al. 1978; 11 = Raymond et al. 1975; 12 = Osuga & Feeney 1978; 13 = DeVries & Somero 1970; 14 = Franks & Morris 1978; 15 = DeVries et al. 1970; 16 = Hew et al. 1984; 17 = Slaughter et al. 1981; 18 = Hew et al. 1980; 19 = Hew et al. 1985; 20 = Hew et al. 1987; 21 = Fletcher et al. 1982; 22 = Scott et al. 1987; 23 = Duman & DeVries 1974; 24 = Hew & Yip 1976; 25 = Fletcher et al. 1982; 26 = Hew et al. 1981; 27 = Haschemeyer & Jannasch 1983; 28 = Morris et al. 1978; 29 = Burcham et al. 1986; 30 = Hew et al. 1986a; 31 = Hew & Fletcher 1985; 32 = Ng et al. 1986; 33 = Eastman 1990; 34 = Hew et al. 1986b; 35 = Scott et al. 1986; 36 = Davies et al. 1982; 37 = Pickett et al. 1984; 38 = Li et al. 1985; 39 = DeVries & Lin 1977; 40 = Rahmann et al. 1984; 41 = Chakrabarty et al. 1988; 42 = Fletcher et al. 1987

Fischart	AF-Typ	TH [°C]	Fangregion	Tiefe [m]	$\sigma$ Temp. [°C]	Verbreitung	Lebensweise	Quelle
--- ANTARKTIS ---								
<b>Nototheniidae</b>								
Gobionotothen gibberifrons	AFGP	/	Elephant Island	5 - 750		Ant. Halbinsel	benthisch	*
Notothenia coriiceps	AFGP	/	Balleney Islands	0 - 550	-1/+1	Circumpolar	benthisch	1,2,14
Notothenia angustata	-	0	Neuseeland		$\geq +5$	Neuseeland	benthisch	1,2
Notothenia microlepidota	-	0	Neuseeland		$\geq +5$	Neuseeland	benthisch	1,2
Lepidonotothen kempfi	GP	0.52	Lasarewmeer	100 - 900	-1.2	Circumpolar	benthisch	*
Lepidonotothen larseni	AFGP	0.40(S)	Balleney Islands	30 - 550	-1/+1	Subantarktis	benthisch	1,2,39
Aethotaxis mitopteryx	AFGP	0.89	Lasarewmeer	100 - 850	-1.9	Circumpolar	pelagisch	*
Pleuragramma antarcticum	AFGP	1.20	Weddellmeer	0 - 900	-1.9	Circumpolar	pelagisch	*
P. antarcticum	PAGP	3.21						*
Dissostichus mawsoni	AFGP	1.10	McMurdo	80 - 1600	-1.9	Circumpolar	pelagisch	*1,3,15
Dissostichus eleginoides	-	0	Chile	70 - 1500	$\geq +5$	Subantarktis	pelagisch	1,2
Pagothenia borchgrevinkii	AFGP	1.72(S)	McMurdo	0 - 30	-1.9	Circumpolar	cryopelagisch	1,2,15,39
Trematomus bernacchii	AFGP	1.51(S)	McMurdo	100 - 700	-1.9	Circumpolar	benthisch	*2,27,39
Trematomus hansonii	AFGP	1.56(S)	McMurdo	5 - 550	-1.9	Circumpolar	benthisch	1-3,7,40
Trematomus eulepidotus	AFGP	1.02(S)	Weddellmeer	70 - 550	-1.8	Circumpolar	benthopelagisch	*40
Trematomus lepidorhinus	AFGP	/	McMurdo	200 - 900	-1.9	Circumpolar	benthopelagisch	*1,2,27
Trematomus loennbergii	AFGP	0.95(S)	McMurdo	60 - 830	-1.9	Circumpolar	benthopelagisch	*2,27,39
Trematomus newnesi	AFGP	/	McMurdo	0 - 400	-1.9	Circumpolar	benthisch	1,2,27
Trematomus nicolai	AFGP	/	McMurdo	0 - 420	-1.9	Circumpolar	benthisch	1,2
Trematomus pennellii	AFGP	1.46(S)	McMurdo	0 - 730	-1.9	Circumpolar	benthisch	*1,2,27
<b>Artedidraconidae</b>								
Artedidracono orianae	AFGP	/	Ross Meer	80 - 800	-1.9	Circumpolar	benthisch	27
Artedidracono loennbergii	AFGP	/	Weddellmeer	230 - 600	-1.9	Circumpolar	benthisch	*
Histiograeco velifer	AFGP	/	Ross Meer	200 - 680	-1.9	Circumpolar	benthisch	27
Dolloidracono longedorsalis	AFGP	/	Weddellmeer	200 - 2250	-1.9	Circumpolar	benthisch	*
Pogonophryne marmorata	AFGP	0.87	Weddellmeer	140 - 1400	-1.9	Circumpolar	benthisch	*
Pogonophryne scotti	AFGP	0.89	Weddellmeer	110 - 1200	-1.9	Circumpolar	benthisch	*
Pogonophryne dolichobranchiata	AFGP	/	Ross Meer	200 - 550	-1.9	Circumpolar	benthisch	27
<b>Bathydraconidae</b>								
Bathydracono marri	AFGP	0.85	Weddellmeer	300 - 1250	-1.9	Circumpolar	benthisch	*
B. marri	AF II	0.84						*
Gymnodracono acuticeps	AFGP	0.90	McMurdo	0 - 550	-1.9	Circumpolar	benthisch	*1,3,39
Gerlachea australis	AFGP	0.84	Weddellmeer	200 - 670	-1.9	Circumpolar	benthisch	*
Racovitzia glacialis	AFGP	0.84	Weddellmeer	220 - 610	-1.9	Circumpolar	benthisch	*40
Prionodracono evansii	AFGP	0.74(S)	Weddellmeer	70 - 550	-1.9	Circumpolar	benthisch	40
<b>Channichthyidae</b>								
Chaenodracono wilsoni	AFGP	0.57	Weddellmeer	200 - 800	-1.9	Circumpolar	benthopelagisch	*40
Chaenocephalus aceratus	AFGP	0.56(S)	Subantarktis	5 - 770	-1/+1	Subantarktis	benthopelagisch	7,13
Chionodracono rastropinosus	AFGP	0.80(S)	Subantarktis	0 - 1000	-1/+1	Ant. Halbinsel	benthopelagisch	27,40
Chionodracono hamatus	AFGP	0.80(S)	Weddellmeer	0 - 600	-1.9	Circumpolar	benthopelagisch	*7,27
Chionodracono myersi	AFGP	0.89	Weddellmeer	200 - 800	-1.9	Circumpolar	benthopelagisch	*
Cryodracono antarcticus	AFGP	0.65	Weddellmeer	200 - 800	-1.9	Circumpolar	benthopelagisch	*
Dacodracono hunteri	AFGP	1.00	Lasarewmeer	300 - 800	-1.9	Circumpolar	pelagisch	*
Neopagetopsis ionah	AFGP	0.52	Weddellmeer	20 - 900	-1.9	Circumpolar	benthopelagisch	*
Pagetopsis maculatus	AFGP	0.94	Weddellmeer	200 - 800	-1.9	Circumpolar	benthisch	*
Pagetopsis macropterus	AFGP	0.97	Weddellmeer	0 - 650	-1.9	Circumpolar	benthisch	*
<b>Muraenolepididae</b>								
Muraenolepis marmoratus	AF(G)P	0.56	Lasarewmeer	20 - 1600	$\approx +0.5$	Subantarktis	benthisch	*
<b>Zoaridae</b>								
Lycodichthys dearborni	AFP III	0.78	McMurdo	550 - 590	$\approx +0.5$	Ross Meer	benthisch	5,39
Pachycara brachycephalum	AFP III	1.24	McMurdo	200 - 1800	$\approx +0.5$	Circumpolar	benthisch	4
Lycenchelys hureaui	AF(G)P	$\approx 0.1$	Lasarewmeer	560 - 940	$\approx +0.5$	Kerguelen	benthisch	*
<b>Liparidae</b>								
Paraliparis somovi	AF(G)P	0.54	Lasarewmeer	400 - 850	$\approx +0.5$	Süd-Shetland	pelagisch	*
Paraliparis devriesi	???	0.08(S)	McMurdo	500 - 700	$\approx +0.5$	Ross Meer	pelagisch	39
<b>Myctophidae</b>								
Gymnoscopelus opisthopterus	AF(G)P	$\approx 0.1$	Lasarewmeer	$\geq 500$	$\approx +0.5$	Circumpolar	pelagisch	*
<b>Macrouridae</b>								
Macrourus holotrachys	AF(G)P	$\approx 0.1$	Lasarewmeer	150 - 1100	$\approx +0.5$	Magellan	benthopelagisch	*
<b>Rajidae</b>								
Bathyraja maccaini	???	0	Lasarewmeer	$\approx 500$	-1/+1	Circumpolar	benthisch	*



--- ARKTIS ---								
<b>Gadidae</b>								
Arctogadus glacialis	AFGP	0.63	N/O-Grönland	90 - 490	-1.9/+1	Arktis	benthopelagisch	*
Boreogadus saida	AFGP	0.67	Barent See	0 - 100	-1.9/+2	Arktis	cryopelagisch	12,28
Gadus ogac	AFGP	1.18(S)	Labrador	20 - 150	-1.9/+4	N/W-Atlantik	benthopelagisch	10
Gadus morhua	AFGP	/	Neufundland	30 - 200	0/+6	N-Atlantik	benthopelagisch	26,42
Microgadus tomcod	AFGP	0.54	New Brunswick			N-Atlantik	benthopelagisch	25
Eleginus gracilis	AFGP	0.57	Alaska	0 - 100	-1.9/+2	Arktis	benthopelagisch	11,29
<b>Pleuronectidae</b>								
Pseudopleuronectes americanus	AFP I	0.50	Neufundland	0 - 200	0/+12	N-Atlantik	benthisch	9,23,24,30
Pleuronectes quadrituberculatus	AFP I	/	Neufundland	0 - 200	0/+12	N-Atlantik	benthisch	8,34-37
Pleuronectes platessa	AFP	0.78(S)	Nordsee	0 - 200	0/+12	N-Atlantik	benthisch	40
Limanda ferruginea	AFP I	/	Labrador	20 - 180		N-Atlantik	benthisch	22,34-37
<b>Cottidae</b>								
Icelus bicornis	???	0	N/O-Grönland	10 - 560	-1/+1	N-Atlantik	benthisch	*
Triglops nybelini	???	0	N/O-Grönland	50 - 300	-1/+1	N-Atlantik	benthisch	*
Myoxocephalus scorpius	AFP I	0.60(S)	Labrador	0 - 60	0/+12	N/O-Atlantik	benthisch	7,18,19,31
Myoxocephalus aeneus	AFP I	/	Neufundland	15 - 20	0/+12	N-Atlantik	benthisch	20,41
Myoxocephalus scorpioides	AFP I	/	Neufundland	0 - 30	0/+12	N-Atlantik	benthisch	21,34-37
Hemitripterus americanus	AFP II	0.53	Neufundland	0 - 50	0/+12	N-Atlantik	benthisch	17,32
<b>Zoarcidae</b>								
Lycodes polaris	AFP III	/	Labrador	100 - 300	-1/+1	N-Atlantik	benthisch	5,8,38
Macrozoarces americanus	AFP III	0.92	Neufundland		0/+12	N-Atlantik	benthisch	6,16,38
<b>Liparididae</b>								
Liparis fabricii	AFP ?	< 0.1	N/O-Grönland	200	-1/+1	N-Atlantik	benthopelagisch	*

Auch innerhalb der Familie der Channichthyidae ist die Tendenz zur Reduktion des AFGP-Gehalts mit zunehmender Tiefenverbreitung gut zu verfolgen (Tabelle 3). Arten (*C. wilsoni*, *C. hamatus* und *P. macropterus*), die bevorzugt auf dem flachen Schelf (200 - 300 m) vorkommen (SCHWARZBACH 1988), und die auch in oberflächennahem Wasser beobachtet werden (DEWITT 1971; DANIELS & LIPPS 1982), besitzen viel AFGP. *C. myersi* und *P. maculatus*, zwei Charakterarten des Schelfhangs zwischen 500 - 600 m im Weddellmeer (HUBOLD 1991), haben ihr AFGP reduziert. *C. antarcticus*, *D. hunteri* und *N. ionah* haben die geringsten Gefrierschuttmengen. Sie sind im Weddellmeer vor allem am Kontinentalabhang zwischen 500 - 800 m im warmen Tiefenwasser (> 0°C; FAHRBACH *et al.* 1987) anzutreffen (EKAU 1990). Gefrierschutz wäre hier allerdings auf Grund der Temperatur und des hydrostatischen Drucks - 50 bar erniedrigen den Gefrierpunkt des Fischbluts um 0.37°C (DEVRIES & LIN 1977) - nicht notwendig. Ausschlaggebend für die Synthese von AFGP bei diesen Arten muß demnach die Verbreitung der Art in (A) kälteres und (B) flacheres Wasser sein.

***Lepidonotothen kempii* aus der Lasarewmeer zeigt eine außergewöhnliche Glycoproteinzusammensetzung.**

DEVRIES & LIN (1977) konnten keine Gefrierresistenz des Blutserums von *L. kempii* feststellen. Ihre Versuchstiere stammten von Balleny Island. Erstmals konnte in dieser Arbeit bei *L. kempii* aus der Lasarewmeer AFGP isoliert werden (Tabelle 3). Darüber hinaus dienen vermutlich noch weitere Glycoproteine als Gefrierschutz, die in ihrer Zuckerzusammensetzung - sie enthalten ebenfalls N-Acetylglucosamin - an das PAGP von *P. antarcticum* erinnern (Tabelle 4). *L. kempii* wird als demersale Art beschrieben, die sich von benthischen Invertebraten, aber auch von Krill ernährt (TARVERDIYEVA & PINSKAYA 1980). Sie ist bekannt vom Scotia Bogen, dem nördlichen Teil der Antarktischen Halbinsel und der Ostantarktis (BALUSHKIN 1986). Die Tiefenverbreitung liegt zwischen 100 - 900 m, bei Elephant Island zwischen 250 - 550 m (TIEDTKE & KOCK 1989).

Der Widerspruch zwischen diesen Untersuchungen könnte drei Erklärungen haben. (1) Das AFGP der *L. kempfi* von Balleny Island konnte wegen sehr geringer Konzentrationen nicht isoliert werden. Dies erscheint fragwürdig, da die von DEVRIES & LIN (1977) angewandten Methoden ausgereift sind. (2) *L. kempfi* synthetisiert im Sommer kein AFGP, und würde sich damit so verhalten, wie es von den meisten arktischen Arten bekannt ist, bei denen die Synthese in erster Linie durch die Tageslänge (Licht) über den Hypothalamus gesteuert wird (SCOTT *et al.* 1988). Dagegen spricht jedoch, daß die Tiere der vorliegenden Untersuchung ebenfalls im Sommer gefangen wurden. (3) *L. kempfi* synthetisiert AFGP nach dem Grad der potentiellen Gefahr, mit Eis in Berührung zu kommen, die Synthese ist also in erster Linie Temperatur gesteuert. Die Population bei Balleny Island lebt bei Temperaturen um 2°C (DEVRIES & LIN 1977), die Populationen in der Lasarewmeer unter -1.0°C (WÖHRMANN & ZIMMERMANN 1992).

Unterschiede der thermalen Hysterese und damit des AFGP-Gehalts konnten z.B. auch in dem Blutserum des benthischen *T. hansonii* gemessen werden: im McMurdo Sound beträgt sie 1.56°C (EASTMAN & DEVRIES 1986a), bei der gleichen Art von den Süd-Shetland und Süd-Georgien nur 0.95°C (SCHNEPPENHEIM & THEEDE 1982). Die Wassertemperatur betrug in dem einen Fall -1.9°C, in dem anderen über 0°C. Nach den Untersuchungen dieser Dissertation zum AFGP bei *L. kempfi* muß man voraussetzen, daß die Populationen einiger Arten eine genetische Variabilität für die Akklimatisation an Temperaturwechsel unterhalten. Dies steht in Kontrast zu dem, was DEVRIES & LIN (1977) nach den Untersuchungen an *P. borchgrevinkii* für die Notothenioidei gefordert haben (keine genetische Variabilität; siehe oben).

### ***Bathyraco marri* gibt bezüglich seines geringen AFGP-Gehalts Rätsel auf.**

Auch *B. marri* besitzt in Bezug auf seinen Gefrierschutz eine Sonderstellung. Bei dieser Art wurden nur 279 mg AFGP/kg FRG gefunden (Tabelle 3). Dies ist die geringste Menge AFGP aller untersuchten Notothenioidei, und beträgt nur ca. 20% des AFGP der anderen Bathyracoiden. Allerdings wurden bei ihr ähnlich wie bei *L. kempfi* noch zwei weitere Fraktionen mit der DEAE-Ionenaustauscherchromatographie getrennt (AF II und III) (Abbildung 7c), wobei die Fraktion AF III eine fast ebenso hohe Hysterese auslöst wie das AFGP (Tabelle 7). Diese Substanzen könnten eine additive Wirkung haben (siehe auch *P. antarcticum*). Untersuchungen dazu stehen noch aus.

Die Bathyracoiden werden in größerer Zahl vor allem im südöstlichen Weddellmeer angetroffen. Dort sind sie in tieferem Wasser (> 700 m) verbreitet (HUREAU *et al.* 1990; EKAU 1988). ANDRIASHEV (1965) gibt an, daß einige Arten der Gattung *Bathyraco* bis in Tiefen von 2600 m vorkommen. *B. marri* hat seine Hauptverbreitung zusammen mit *D. longedorsalis* im Bereich des Filchner Grabens (SCHWARZBACH 1988), einer tiefen Einkerbung, die vom Filchner Eisschelf zum Kontinentalabhang verläuft. Die Hauptwassermasse ist das Eisschelfwasser mit Temperaturen bis -2.2°C (HELLMER & BERSCH 1985), welches zudem häufig mit Eisplättchen versetzt ist. Die geringe Arten-Diversität (und damit relativ hohe Abundanz der Bathyracoidae) in der Gould Bay könnte seine Ursache in der sehr tiefen Temperatur haben, wie es EKAU (1990) postuliert.

Untersuchungen zum Hämoglobin (KUNZMANN 1991; KUNZMANN *et al.* 1991) und den Membranglycolipiden (WÖHRMANN *et al.* 1990a, b) zeigen Anpassungen, die ein Überleben von *B. marri* unter diesen Bedingungen begünstigen. Die niedrige Temperatur in Kombination mit Eis fordert allerdings größere Mengen an AFGP.

Neben der Temperatur kann auch der Wasserdruck von Bedeutung sein. SOMERO (1990) zeigt, daß der hydrostatische Druck selektiv für verschiedene Proteine sein kann. "Normale" Enzyme funktionieren nicht unter dem Druck, der in 500 - 600 m Tiefe herrscht. Die Kombination von tiefer Temperatur mit hohem Druck im Filchner Graben könnte zu einer Selektion geführt haben, die u. a. *B. marri* mit ihrem ungewöhnlichen "Gefrierschutz-besteck" bevorzugt hat. Vielleicht gibt es in diesen Arten weitere Gefrierschutzproteine (z.B. AF II und III), die andere Struktureigenschaften besitzen und die niedrigen Mengen an AFGP in *B. marri* erklären könnten.

Ähnliches kann auch für den Artedidraconiden *D. longedorsalis* zutreffen. Der AFGP-Gehalt (0.088% FRG) ist ebenfalls im Vergleich zu anderen Artedidraconiden gering. Es konnte aber, wie bei *B. marri* auch, eine Fraktion AF II (0.132% FRG) isoliert werden. Für die Verbreitung von *D. longedorsalis* gilt das für *B. marri* gesagte (EKAU 1988). Die konvergente Entwicklung eines ähnlichen Gefrierschutzmechanismus in verschiedenen Familien gibt allerdings Fragen zur Evolution dieser Arten auf, die unten behandelt werden sollen.

#### ***Der antarktische Silberfisch Pleuragramma antarcticum variiert seine AFGP-Mengen im Verlauf eines Lebens.***

Wie bereits oben ausgeführt, soll die AFGP-Synthese der Notothenioidei kontinuierlich über das Jahr hinweg verlaufen (DEVRIES & LIN 1977). Dabei wird davon ausgegangen, daß die Umgebungstemperatur konstant ist. Juvenile würden in diesem Fall ebensoviel AFGP benötigen wie die Adulten. Nun ist von vielen Arten aus dem Weddellmeer bekannt, daß sie im Laufe des Lebens Wanderungen unternehmen (HUBOLD 1991). Larven werden in der oberflächennahen Wasserschicht angetroffen, die Adulten wandern in tiefere Zonen ab (HUBOLD 1990). Die Wassertemperaturen im Weddellmeer umfassen einen Spielraum von +1.0°C in der Oberflächenschicht im Sommer bis -2.2°C am Boden. Einige Arten führen Laichwanderungen aus dem warmen Tiefenwasser (+0.5°C) auf den flachen Schelf in kälteres Wasser (-1.86°C) durch (z. B. *C. antarcticus*: WÖHRMANN & ZIMMERMANN 1992).

Der Lebenszyklus von *P. antarcticum* aus dem Weddellmeer ist eingehend untersucht (HUBOLD 1984, 1985a, b; HUBOLD & TOMO 1989). Die Adulten laichen auf dem nordöstlichen Schelf ( $\approx -1.86^\circ\text{C}$ ) und wandern anschließend in die südlichen Schelfgebiete ( $< -2.0^\circ\text{C}$ ) zurück. Die Larven werden an der Oberfläche (0 - 50 m; -0.8 - -1.8°C) mit der küstennahen Ostwinddrift nach Süden verdriftet. Im Filchnergrabenbereich fallen Larvenaufwuchsgebiet und Adultgebiet räumlich zusammen. Aufgrund der großen Wassertiefe findet jedoch eine vertikale Trennung statt, so daß die Altersklassen ohne Kannibalismus im selben Gebiet leben können. Juvenile und Subadulte

## Diskussion

---

findet man vor allem in der wärmeren Ostwinddrift ( $> 0^{\circ}\text{C}$ ), wo sie sich von *Euphausia crystallophias* ernähren.

Die Konzentrationen von AFGP bei *P. antarcticum* liegen mit 0.026 bis 0.031% FRG im unteren Bereich im Vergleich mit anderen untersuchten Notothenioidei (Tabelle 3). Der Gefrierpunkt des Blutserums würde damit erheblich höher liegen, als z. B. der des Nototheniiden *P. borchgrevinki* (DEVRIES *et al.* 1970). Auch wenn man die Tiefe, in der die Tiere gefangen wurden (450 - 620 m), und die damit durch den hydrostatischen Druck verbundene Gefrierpunktserniedrigung ( $\approx 0.4^{\circ}\text{C}$ ) berücksichtigt, wäre *P. antarcticum* ständig der Gefahr des Gefrierens ausgesetzt. Trotzdem lebt diese Art bei Wassertemperaturen von  $< -2.0^{\circ}\text{C}$ , wie sie in ihrem Verbreitungsgebiet des Filchner Grabens herrschen können. Einige Male wurde *P. antarcticum* zusammen mit dem sogenannten Plättcheneis in Schleppnetzen gefangen und zwischen Eisschollen beobachtet (eigene Beobachtung). Dieser Lebensraum ist durchaus vergleichbar mit dem des cryopelagischen *P. borchgrevinki* im McMurdo Sound.

Es konnten Differenzen im AFGP-Gehalt zwischen den Altersklassen festgestellt werden, die allerdings keinen kausalen Zusammenhang zwischen Gefrierschutzmenge (% FRG) und Lebensweise bzw. Alter des Fisches anzeigen. Dieses Ergebnis muß aber in Zusammenhang mit der qualitativen Zusammensetzung des AFGP (Abbildung 25) und ebenso mit dem Vorhandensein des neu isolierten Glycoproteins gesehen werden. Darauf soll später eingegangen werden.

## DAS AFGP DES ARKTISCHEN GADIDEN *ARCTOGADUS GLACIALIS*

*Arctogadus glacialis* besitzt im Sommer große Mengen von AFGP ähnlich wie der Channichthyide *Chaenodraco wilsoni*.

Die Fischfauna des Nordpolarmeeres setzt sich, im Gegensatz zum Südpolarmeer, nur aus wenigen endemischen Arten zusammen (DUNBAR 1968). Zu ihnen gehört, neben dem Polardorsch *B. saida*, der arktische Dorsch *A. glacialis*. Zum ersten Mal konnte in der vorliegenden Arbeit dieser Gadidae auf Gefrierschutz hin untersucht werden. Bei ihm wurden ebenfalls hohe Mengen AFGP (0.28% FRG) isoliert, die an die maximalen Konzentrationen von AFGP der Notothenioidei (z. B. *C. wilsoni* 0.28% FRG) heranreichen (Tabelle 3).

In der Vergangenheit wurde AFGP aus einigen Gadidae der Arktis isoliert, das identisch zu dem der Notothenioidei ist. Aus *Gadus ogac* von Labrador (VANVOORHIES *et al.* 1978), *Gadus morhua* (HEW *et al.* 1981) und *Microgadus tomcod* (FLETCHER *et al.* 1982a) von Neufundland, *Boreogadus saida* (OSUGA & FEENEY 1978) und *Eleginus gracilis* (RAYMOND *et al.* 1975) von Alaska konnte AFGP in relativ hohen Konzentrationen (40 - 50 mg/ml Serum) isoliert werden. Während die ganzjährige Synthese von AFGP zumindest bei einigen Notothenioidei gesichert ist (DEVRIES 1988), erscheint dies bei den Gadidae der Arktis fraglich. Bei Sommertieren wurde in der Leber nur eine sehr verminderte Syntheseaktivität beobachtet (ANANTHANARAYANAN 1989). Trotzdem wurde bei den nördlicher vorkommenden Arten (*E. gracilis* und *B. saida*) eine

deutliche thermale Hysterese des Blutserums festgestellt. Es wird spekuliert, daß der hohe AFGP-Gehalt im Sommer durch die lange Halbwertszeit dieser Glycoproteine verursacht wird (ANANTHANARAYANAN 1989). Eine durch äußerliche Faktoren (Licht, Temperatur, etc.) beeinflusste AFGP-Synthese wird von allen arktischen Arten angenommen (DAVIES *et al.* 1988; VAISIUS *et al.* 1989; PRICE *et al.* 1990).

*A. glacialis* wird als hocharktische, ozeanische und Plankton fressende Art beschrieben, die im westlichen (BORKIN & MEL'YANTSEV 1984) und nordöstlichen Teil (DORRIEN *et al.* 1991) des arktischen Ozeans vorkommt. Seine Verbreitung im arktischen Becken im Winter (WALTERS 1961) verlangt einen effektiven Gefrierschutz, ähnlich dem des cryopelagischen Nototheniiden *P. borchgrevinki*. Im Sommer allerdings wurde er in Polynyen (eisfreien Gebieten) am Kontinentalabbruch (> 200 m) bei positiven Temperaturen gefangen (BORKIN & MEL'YANTSEV 1984; DORRIEN *et al.* 1991). Ein Gefrierschutz wäre in diesen Fällen nicht nötig. Aus den eigenen Daten ist nicht abzuleiten, ob das AFGP im Sommer synthetisiert wurde, oder noch aus der Winterzeit stammt. Auf Grund der hohen Konzentrationen ist allerdings eher anzunehmen, daß *A. glacialis* auch im Sommer AFGP in großen Mengen, wie wir es von den Notothenioidei kennen, synthetisiert.

#### DIE GEFRIERSCHUTZPROTEINE DER NICHT-NOTOTHENIOIDEN FISCHE

##### *Vertreter der Familie Liparididae der Arktis und der Antarktis synthetisieren Gefrierschutzsubstanzen.*

Neben den Notothenioidei kommen in der Antarktis noch Vertreter der Zoarcidae, Liparididae, Muraenolepididae, Macrouridae, Myctophidae und Rajidae vor. Arten weiterer Familien wurden bestimmt (GON & HEEMSTRA 1990), sollen hier aber nicht weiter erläutert werden. Viele nicht-notothenioide Fische sind entweder in der Subantarktis oder im wärmeren Tiefenwasser des Kontinents verbreitet. Betrachtet man die Verbreitungskarte der Fische im Weddellmeer, so fällt auf, daß der Anteil nicht-notothenioider Arten nach Süden hin abnimmt, bzw. in die Tiefe zunimmt (EKAU 1990; HUBOLD 1991; SCHWARZBACH 1988). Diese Arten meiden kaltes Wasser.

Bislang war nur von den antarktischen Zoarciden *L. dearborni* (SCHRAG *et al.* 1987) und *P. brachycephalum* (CHENG & DEVRIES 1989) bekannt, daß sie Gefrierschutz besitzen. Aus Gründen der Verbreitung nicht-notothenioider Fische in tieferem bzw. wärmeren Wasser wurde angenommen, daß die meisten Arten keinen Gefrierschutz benötigen. Die vorliegende Untersuchung an Fischen der Lasarewmeer erbrachte aber in fast allen Fällen (fraglich *B. maccaini*) Gefrierschutzsubstanzen (Tabelle 3). Erstmals konnten bei einem Liparididen, Muraenolepididen, Macrouriden und Myctophiden Gefrierschutzsubstanzen nachgewiesen werden. Dies bedeutet gleichzeitig, daß alle hier untersuchten Teleostei der Antarktis Gefrierschutzproteine synthetisieren. Diese Substanzen sind also viel weiter verbreitet als bislang angenommen, was wiederum Konsequenzen für die Entstehungsgeschichte hat (siehe unten). Wir vermuten auch, daß

die meisten antarktischen Arten auf Grund ihrer hochantarktischen und circumpolaren Verbreitung Gefrierschutz besitzen dürften. Hinzu kommt, daß viele Larvenstadien auch in der Hochantarktis in oberflächennahem Wasser vorkommen. Ein Kontakt mit Eis ist nicht ausgeschlossen, eine Synthese von Gefrierschutz notwendig.

Zu den demersalen Charakterarten im Weddellmeer zwischen 500 - 800 m können *M. holotrachys* und Arten der Gattung *Muraenolepis* gezählt werden (HUBOLD 1991), *M. holotrachys* ist auch aus der Magellanstraße (IWAMOTO in GON & HEEMSTRA 1990) bekannt. *G. opisthopterus* ist circumpolar südlich der antarktischen Konvergenz verbreitet (HULLEY in GON & HEEMSTRA 1990) und gehört zu den charakteristischen pelagischen Arten des östlichen Weddellmeeres (HUBOLD 1991). Von diesen Arten ist bekannt, daß sie zumindest als Larven und Juvenile auch in flacheren Zonen (< 100 m) vorkommen (CHIU & MARKLE; IWAMOTO; HULLEY; alle in GON & HEEMSTRA 1990). Eine Mischfauna wurde in der Lasarewmeer gefunden (WÖHRMANN & ZIMMERMANN 1992). Die sub-Antarktischen Arten *L. hureaui* (Kerguelen: ANDRIASHEV 1979), *P. somovi* (Süd Shetland: ANDRIASHEV & NEELOV 1979) und *M. marmoratus* (Scotia See: CHIU & MARKLE in GON & HEEMSTRA 1990) konnten aus den Fängen identifiziert werden, gefangen in Tiefen zwischen 400 - 800 m und Temperaturen von  $-1.0^{\circ}$  bis  $+0.75^{\circ}\text{C}$ .

## Der Mechanismus der Gefrierschutzsubstanzen polarer Fische

### DIE THERMALE HYSTERESE DES AFGP

#### *Das AFGP von Pleuragramma antarcticum arbeitet effektiver als das anderer Notothenioidei.*

In Tabelle 7 fällt auf, daß trotz gleicher Proteinkonzentration die thermale Hysterese der Gefrierschutzsubstanzen sehr unterschiedlich ist. Bei *L. kempfi* z.B. beträgt die maximale thermale Hysterese  $0.52^{\circ}\text{C}$ , bei *P. antarcticum* dagegen  $1.20^{\circ}\text{C}$  bei der selben Proteinkonzentration (20 mg/ml). Die AFGP 1-4 von *D. mawsoni* zeigen eine deutlichere Hysterese ( $1.02^{\circ}\text{C}$ ) als die AFGP 5-8 ( $0.91^{\circ}\text{C}$ ). Das AFGP und PAGP von *P. antarcticum* lösen getrennt in niedrigen Konzentrationen (5 mg/ml) nur eine geringe (<  $0.1^{\circ}\text{C}$ ), zusammen aber eine deutliche Hysterese aus ( $0.455^{\circ}\text{C}$ ). Um diesen Zusammenhang zu verstehen, ist eine Diskussion der möglichen Mechanismen von Gefrierschutzsubstanzen nötig.

Obwohl die Primärstruktur des AFGP schon früh bekannt war (DEVRIES *et al.* 1971; LIN *et al.* 1972; RAYMOND *et al.* 1977; AHMED *et al.* 1975; FRANKS & MORRIS 1978), ist erst in den letzten Jahren ein Einblick in den Mechanismus dieser Gefrierschutzglycoproteine gelungen (FEENEY 1988). Ein Phänomen ist der nicht-colligative Effekt, d.h. ein AFGP-Molekül erniedrigt den Gefrierpunkt um ein Vielfaches von dem was erwartet wird, wenn Konzentration und MW berücksichtigt werden (FEENEY & YEY 1978). HASCHEMEYER *et al.* (1977) und DUMAN *et al.* (1980) konnten zeigen, daß AFGP mehr Wassermoleküle binden kann als andere gewöhnliche Proteine wie z. B. Hämoglobin. Es wird mittlerweile allgemein akzeptiert, daß ein "adsorption-

inhibition" Prozess für das Wirken von (allen?) AF(G)P verantwortlich ist (DEVRIES 1983, 1984; FEENEY *et al.* 1986). Die Adsorption des AFGP zu der Eisoberfläche wird vermutlich über Wasserstoffbrücken zwischen den Hydroxyl-Gruppen der Zucker und den Wassermolekülen des Eis bewerkstelligt (RAYMOND & DEVRIES 1977).

Von Bedeutung für die Gefrierpunktserniedrigung ist die Größe des AFGP-Moleküls. Die kleinen AFGP 6-8, bei denen an einigen Stellen Alanin durch Prolin ersetzt ist, zeigen eine maximale Hysterese von 0.6°C. Die AFGP 1-5 lösen eine Hysterese von über 0.9°C aus (DEVRIES & LIN 1977). Die großen Moleküle sind besonders wirksam bei stark unterkühlten Lösungen, bei viel Eis und bei schnellen Temperaturwechseln (DUMAN & DEVRIES 1972; BURCHAM *et al.* 1984; HANSEN *et al.* 1991). Es scheint gesichert, daß alle AFGP 1-8 in einer ausgestreckten stabförmigen Struktur in Form einer linksgedrehten  $\alpha$ -Helix vorliegen (BUSH *et al.* 1984; RAO & BUSH 1987). Vermutlich blockieren AFGP-Moleküle ein Eiskristallwachstum entlang den *a*-Achsen des Kristalls, sodaß nadelartige Kristalle entstehen (Wachstum nur entlang der *c*-Achse); bei weiterer Unterkühlung findet auch ein Wachstum entlang der *a*-Achsen statt (HARRISON *et al.* 1987; HANSEN *et al.* 1991).

Die meisten der danach untersuchten Notothenioidei besitzen die AFGP 1-8. SCHNEPPENHEIM & THEEDE (1982) konnten bei *C. rastrispinosus* und *C. hamatus* AFGP-Moleküle mit einem MW von 50 - 60 kDa isolieren. In der vorliegenden Arbeit wurden ebenfalls bei Channichthyiden (*C. myersi* und *P. maculatus*) AFGP-Moleküle mit höherem MW beobachtet. Bekannt ist, daß das AFGP 1 (MW 33700) bei geringster Osmolarität die höchste Hysterese auslöst, also am effektivsten arbeitet (FEENEY *et al.* 1986). Andererseits muß berücksichtigt werden, daß die Viskosität einer Flüssigkeit nahe dem Gefrierpunkt stark ansteigt. Hohe Konzentrationen hochmolekularer Substanzen im Blut erschweren eine Zirkulation. Die Channichthyiden zeigen physiologische Besonderheiten (Reduktion der Erythrocyten, Erweiterung des Gefäßsystems, Vergrößerung des Blutvolumens) (EVERSON 1984), die die Synthese und den Transport der effektiver arbeitenden "großen" AFGPs begünstigen könnten.

Wie Tabelle 7 zeigt, verursacht das AFGP von *P. antarcticum* bei gleicher Proteinkonzentration die stärkste thermale Hysterese. Der Grund könnte in der Zusammensetzung liegen. Bei der SDS-Gelelektrophorese (Abbildung 24) waren neben den bekannten AFGP 1-8 weitere Banden zu sehen. Zwischen den Banden des AFGP 4 und 6 sind 7 zusätzliche, zwischen AFGP 6 und 7 eine zusätzliche Bande auszumachen. AFGP 4 besteht aus 28 Wiederholungen (17.0 kDa) des Glycotripeptides Ala-Ala-Thr, AFGP 6 aus 12 (7.9 kDa) und AFGP 7 aus 6 (3.5 kDa) (DEVRIES *et al.* 1971; SHIER *et al.* 1972, 1975). Die zusätzlichen AFGP-Moleküle von *P. antarcticum* haben also ein MW zwischen ungefähr 8000 und 17000 Dalton. Die genaue Bestimmung der Primärstruktur dieser AFGP-Moleküle ist noch notwendig. Geht man davon aus, daß die Moleküle zwischen AFGP 4-6 ähnliche gefrierpunktserniedrigende Eigenschaften wie die AFGP 1-5 haben, so könnte *P. antarcticum* zwei Vorteile besitzen: (1) Diese AFGP mittleren Molekulargewichts könnten die Viskosität des Bluts erniedrigen, ohne die Hysterese-Eigenschaften der hochmoleku-

laren AFGP einzubüßen. (2) Der Organismus kann viel differenzierter auf die wechselnden Temperaturen und Eisgehalte reagieren. Diese Eigenschaften würden *P. antarcticum*, der u.a. kleine Gefäße besitzt und mit der Energie sparen muß, ein pelagisches Leben sehr erleichtern.

### **Das Pleuragramma - Antifreeze Glycoprotein (PAGP)**

Das AFGP war die erste Gefrierschutzsubstanz (DEVRIES 1969, 1971; DEVRIES & WOHL-SCHLAG 1969), die in polaren Fischen nachgewiesen werden konnte und bislang auch das einzige Glycoprotein seiner Art. Erst Jahre später mit dem allgemein wachsenden Interesse an diesen makromolekularen Proteinen, konnten andere Gefrierschutzproteine isoliert und charakterisiert werden. Besondere Aufmerksamkeit erregte die Tatsache, daß Proteine mit völlig verschiedenen Primär- und Sekundärstrukturen eine thermale Hysterese bewirken können. Im Zusammenhang mit Untersuchungen über die Verteilung von Gefrierschutzglycoproteinen in arktischen und antarktischen Fischen ist es mir gelungen, ein weiteres Glycoprotein mit Gefrierschutzwirkung zu isolieren und charakterisieren, was im folgenden diskutiert werden soll.

#### ***Das PAGP ist hoch glycosyliert und zeigt eine aus dem Cytoplasma bekannte Kohlenhydrat-Aminosäuren Bindung.***

Die TFA-Hydrolyse zeigte einen ungewöhnlich hohen Zuckeranteil im PAGP (Abbildung 23). Selbst in dem AFGP, wo jede dritte Aminosäure (Threonin) ein Disaccharid trägt, liegt eine insgesamt geringere Glycosylierung vor. Die Bindung des GlcNAc an die Aminosäure gab Fragen auf, da sie sowohl mit Enzymen als auch mit der  $\beta$ -Elimination nicht zu spalten war. Selbst der Verdau mit der  $\beta$ -Hexosaminidase (spaltet GlcNAc $\beta$ 1->Aminosäure) konnte keine Zucker freisetzen. Auch die mild-alkalische Hydrolyse führte unter Bedingungen, wie sie z. B. bei der Spaltung der O-glycosidischen Bindung GalNAc-Thr(Ser) angewendet wird (FARWELL & DION 1981; RASILO & RENKONEN 1981; SOJAR & BAHL 1987), zu keinem Resultat. Erst Erhöhung der Temperatur und der NaOH-Konzentration in Anwesenheit von NaBH<sub>4</sub> führten zur Spaltung.

Problematisch ist bei der Kombination der HPAEC (starker Anionenaustauscher) und der  $\beta$ -Elimination mit NaBH<sub>4</sub>, daß der Zucker N-Acetylglucosamin zu N-Acetylglucosaminitol reduziert wird. Alkohole binden kaum an die PA-1 Ionenaustauschersäule der HPAEC (LLOYD & SAVAGE 1991). Mono-, Di- und Trisaccharide lassen sich in diesem Fall nur schlecht trennen (LEE 1990; TOWNSEND *et al.* 1988), ganz im Gegensatz zu den sauer gespaltenen Oligosacchariden (ANUMULA & TAYLOR 1991; TOWNSEND *et al.* 1989). Dies erschwerte die Identifizierung der abgespaltenen Zucker als Mono-, Di oder Oligosaccharide von N-Acetylglucosamin. Mit den Annahmen aber, daß erstens das GlcNAc  $\beta$ -eliminierbar und zweitens das molare Verhältniss von Serin zu GlcNAc 3:5 ist (Tabelle 6), muß zumindest ein Teil der Zucker als Disaccharid vorliegen, O-glycosidisch gebunden an Serin.



Anfänglich gaben die Ergebnisse der Charakterisierung des Bindungstyps GlcNAc-Serin Fragen auf. In den Lehrbüchern werden drei Arten glycosidischer Bindungen beschrieben: So ist z.B. in den Immunoglobulinen das GlcNAc über eine Glycosylaminbindung an das Asparagin gebunden. Bei anderen Glycoproteinen (z.B. AFGP oder submaxillare Mucoproteine) besteht eine glycosidische Bindung zwischen GalNAc und der Hydroxyl-Gruppe eines Threonin(Serin). Zum dritten können Oligosaccharidketten an Hydroxyl-Gruppen von Hydroxylysin-Resten gebunden sein (z.B. Kollagen). TORRES & HART (1984) konnten eine neue Kohlenhydrat-Peptid Bindung in Glycoproteinen des Cytosols nachweisen. Dies bedeutete gleichzeitig den Nachweis der Existenz von Cytoplasma- und Kern-Glycoproteinen (HOLT & HART 1986). Seit dieser Zeit wurde das O-glycosidisch gebundene GlcNAc in Proteinen des Cytoplasmas (HOLT *et al.* 1987), der Oberfläche von Kernporen (DAVIS & BLOBEL 1987; HANOVER *et al.* 1987; HANOVER 1992) und am rauhen endoplasmatischen Reticulum (ABEIJON & HIRSCHBERG 1988, 1992) nachgewiesen. Ebenfalls konnte es bei der RNA Polymerase II Transkriptions Faktor und in Drosophila Chromosomen beobachtet werden (KELLY & HART 1989).

Die Funktion dieses O-glycosidisch gebundenen GlcNAc ist allerdings bislang unbekannt. Zwei Tatsachen scheinen aber von Bedeutung: (1) Die Konzentrierung von O-GlcNAc Glycoproteinen am Kernporenkomplex, wobei es sich um Glycoproteine mittlerer Größe (40 - 200 kDa) handelt (HANOVER *et al.* 1987; HOLT *et al.* 1987; SNOW *et al.* 1987). Eines davon ist mit 10 - 12 GlcNAc glycosyliert (STARR *et al.* 1990), nur ein Bruchteil der Menge, die in dem PAGP nachgewiesen werden konnte. Das Lektin WGA kann bestimmte Transportprozesse zwischen Kern und Zellplasma verhindern, woraus gefolgert wird, daß diese Art der Glycosylierung eine wichtige Rolle spielt (DABAUVALLE *et al.* 1988; FINLAY *et al.* 1987; YONEDA *et al.* 1987). (2) Es wurde gezeigt, daß die für die Kopplung von GlcNAc an das Protein zuständige Glycosyltransferase im Cytoplasma lokalisiert ist, also abgetrennt vom Ort der normalen Glycosylierung, dem ER (HALTIWANGER *et al.* 1988). Der Nachweis dieses Glycosylierungstyps in einer extrazellulären Gefrierschutzsubstanz wirft ganz neue Aspekte auf, und läßt erahnen, daß der Bindungstyp GlcNAc-Serin offensichtlich an den unterschiedlichsten Proteinen mit verschiedenen Funktionen und lokalisiert an verschiedenen Orten vorkommt.

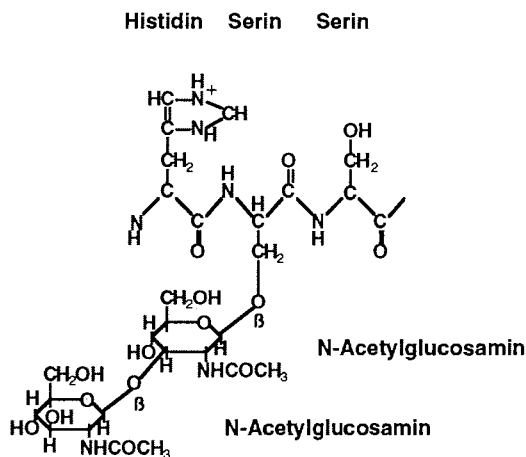
***Das Protein setzt sich nur aus wenigen Aminosäuren zusammen und seine Sekundärstruktur ist dominiert durch das  $\beta$ -Falblatt.***

Im Ergebnisteil wurde gezeigt, daß sich das neu isolierte Glycoprotein vor allem aus Serin (69 Mol%) und Histidin (21 Mol%) und zu geringen Teilen noch Arginin, Glycin und Tyrosin zusammensetzt. Ähnlich wie bei dem AFGP dominieren zwei Aminosäuren. Die Kohlenhydratstruktur zeigt ebenfalls Gemeinsamkeiten: im AFGP die bekannte Disaccharidstruktur, O-glycosidisch gebunden an Threonin, im PAGP der Zucker GlcNAc, der in einer Konzentration von über 50 Mol% vorliegt. Der Gefrierschutzmechanismus der AF(G)P wird ihrer Primär- und Sekundärstruktur zugeschrieben (HEW & YANG 1992; WEN & LAURSEN 1992). Die chemischen Eigenschaften eines Proteinmoleküls hängen fast vollständig von seinen nach außen stehenden, exponierten Oberflächen-Resten ab, die mit anderen Molekülen die verschiedenen Typen

## Diskussion

schwacher nicht-kovalenter Bindungen ausbilden können (FERSHT 1985). Diese Reste tragen bei den Gefrierschutzglycoproteinen zusätzlich noch Zucker, sind dadurch noch exponierter.

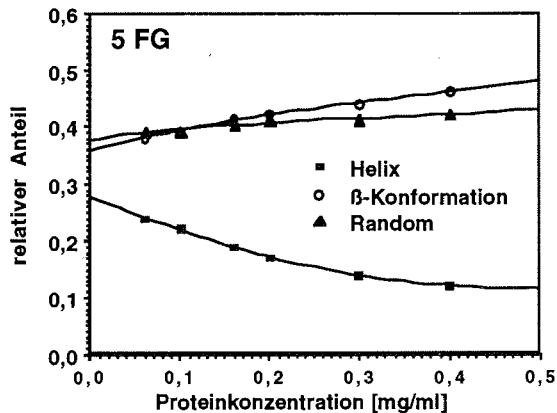
Die Struktur des AFGP wird als "expanded" bezeichnet, als ausgedehnt, wobei es sich vermutlich um eine  $\alpha$ -Helix handelt (FRANKS & MORRIS 1978; BUSH *et al.* 1981; BUSH & FEENEY 1986). Eine  $\alpha$ -Helix wird erzeugt, wenn eine Polypeptidkette sich regelmäßig um sich selbst windet, so daß ein fester Zylinder entsteht (DOOLITTLE 1985; RICHARDSON 1981). Die Identitätsperiode, ein kompletter Umgang, einer "idealen" Helix ist in der Hauptachse 0.54 nm lang und besteht aus 3.6 Aminosäuren (PAULING & COREY 1951; PAULING *et al.* 1951). Im Gegensatz dazu wird angenommen, daß eine Drehung im AFGP aus genau 3 Aminosäuren besteht und die Länge der Hauptachse 0.936 nm (FEENEY 1988; RAO & BUSH 1987). Dies hat zur Folge, daß die Disaccharide genau auf einer Seite in einem Abstand von eben 0.936 nm zu liegen kommen. Eine Bindung von Wassermolekülen oder Eiskristallen über Wasserstoffbrücken ist nun möglich, eine thermale Hysterese wird ausgelöst.



**Abbildung 30:** Ausschnitt einer hypothetischen Primärstruktur des *Pleura-gramma*-Antifreeze Glycoproteins PAGP). Die Abbildung basiert auf den Daten zur Zuckerzusammensetzung und -struktur, sowie der Aminosäurezusammensetzung (Abbildungen 23 & 24; Tabelle 6).

Eine Rekonstruktion des neu isolierten Glycoproteins soll im folgenden dargestellt werden. In Abbildung 31 ist basierend auf den Ergebnissen der vorliegenden Untersuchung eine mögliche kurze Sequenz der Primärstruktur dargestellt. Das Spektrum des Zirkulardichroismus ergab eine Zusammensetzung von 56%  $\beta$ -Konformation, 19%  $\alpha$ -Helix und 25% ungeordneten Strukturen, wenn man 5 Freiheitsgrade und eine Proteinkonzentration von 0.4 g/g Glycoprotein voraussetzt. Wie die Abbildung 32 zeigt, ist der berechnete Anteil der Sekundärstrukturen in starkem Maße von der angenommenen Proteinkonzentration abhängig. Dies Phänomen ist weniger problematisch, wenn ein reines Protein vorliegt. Im Fall des PAGP versagte auf Grund der hohen Glyco-

sylierung und der Dominanz von Serin jede konventionelle Proteinbestimmung. Die Proteinkonzentration wurde aus den Aminosäuredaten und der Zuckeranalyse berechnet (Tabelle 6).



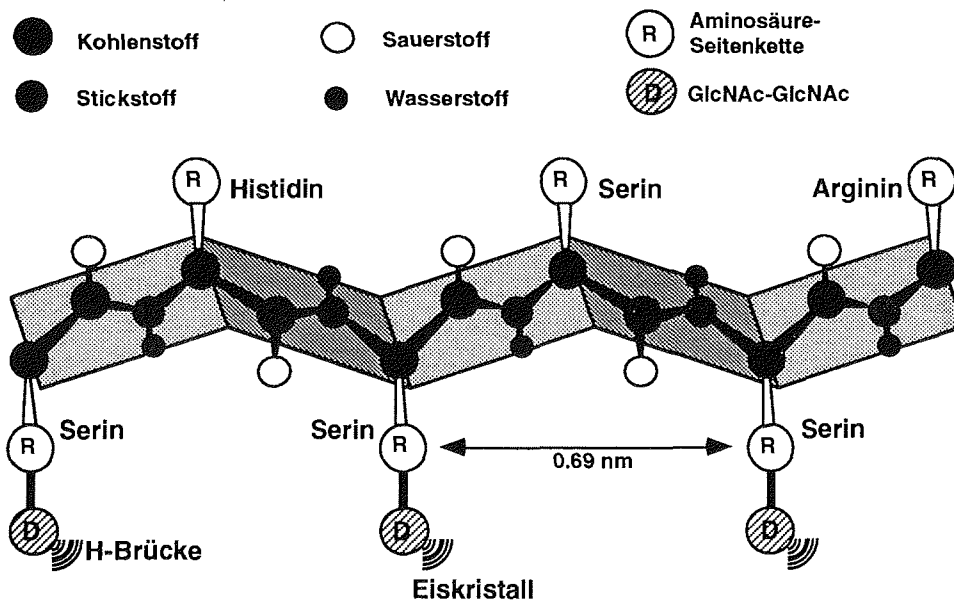
**Abbildung 31:** Anteile der  $\alpha$ -Helix,  $\beta$ -Faltblatt, und ungeordneter Strukturen in Abhängigkeit von der Konzentration des PAGP und der Freiheitsgrade [5 FG]. Durch die Punkte sind Ausgleichsgeraden gezogen.

Der Grad, zu dem eine Polypeptidkette in Form der stabilen  $\alpha$ -Helix existieren kann, ist abhängig von ihrer Aminosäuren-Zusammensetzung und ihrer Aminosäuresequenz. Nicht alle Polypeptidketten sind in der Lage, eine stabile  $\alpha$ -Helix zu bilden. So bildet z.B. die Polyaminosäure Polyalanin, deren Seitengruppen klein und ungeladen sind, in wässriger Lösung bei pH 7.0 spontan  $\alpha$ -Helices aus, während u.a. Serin und Arginin, aber auch Tyrosin und Glycin destabilisierend auf eine  $\alpha$ -Helix wirken (HAGGIS *et al.* 1964). Das  $\beta$ -Faltblatt ist eine häufige Struktur, die von den Kernen globulärer Proteine gebildet wird. Bei der  $\beta$ -Konformation kommen die Seitengruppen immer abwechselnd auf der einen oder anderen Seite zu stehen, d.h. sie zeigen in die entgegengesetzte Richtung (SPRINGALL 1954). Aber auch hier kann die Faltblattstruktur wegen der Interaktion dieser Seitengruppen nicht existieren, wenn diese zu voluminös sind oder Ladungen tragen.

Unter der Voraussetzung (Ergebnisteil), daß (1) zwei von drei Aminosäuren Serin sind, (2) das Verhältnis von GlcNAc zu Aminosäure 1:1 beträgt und (3) es sich bei der Kohlenhydratstruktur um GlcNAc-GlcNAc handelt, müßte jede zweite Aminosäure glycosyliert sein. In Abbildung 33 ist eine kurze Sequenz (Serin-Histidin-Serin-Serin-Serin-Arginin) einer theoretischen  $\beta$ -Konformation dargestellt, zusammengestellt aus den Ergebnissen der vorliegenden Untersuchung. Histidin trägt, ähnlich wie Arginin, eine relativ voluminöse Seitengruppe, die positiv geladen ist (pH 6.0). Histidin enthält eine schwach basische Imidazol-Funktion. Es ist die einzige AS, deren Rest einen pK nahe pH 7.0 besitzt (LEHNINGER 1983). Angenommen ist hier zudem eine Glycosylierung

## Diskussion

rung jeder zweiten Aminosäure, d.h. also der beiden Serin-Moleküle deren Reste entgegengesetzt den Resten von Histidin und Arginin gelegen sind. Das Disaccharid käme demnach ebenfalls in eine Ebene zu liegen wie es bei dem AFGP mit Gal-GalNAc beobachtet wird. Der Abstand zwischen den Serinmolekülen und damit zwischen den Disacchariden beträgt 0.69 nm, und damit 0.246 nm weniger als der Abstand zwischen den Kohlenhydraten im AFGP, wenn man eine Idealkonformation annimmt (ALBERTS *et al.* 1990). Auf Grund der hohen Glycosylierung und der Reste von Histidin bzw. Arginin ist zu erwarten, daß die Struktur gestreckter ist. Außerdem muß berücksichtigt werden, daß nach dem CD-Spektrum nur  $\approx 40\%$  der Sekundärstruktur in  $\beta$ -Konformation vorliegen. Der Rest setzt sich aus anderen Strukturen zusammen, deren Rekonstruktion u.a. die Kenntnis der Aminosäuresequenz voraussetzt.



**Abbildung 32:** Rekonstruktion (aus den Ergebnissen der vorliegenden Untersuchung) der  $\beta$ -Konformation eines Ausschnitts der oben angenommenen Polyglycopeptidkette. R bezeichnet die Aminosäuren-Seitenketten, die bei Serin noch mit dem Disaccharid GlcNAc-GlcNAc glycosyliert sind. Der angegebene Abstand zwischen zwei AS-Resten von 0.69 nm geht von einer idealen  $\beta$ -Konformation aus. An die Reste bzw. Disaccharide könnten über Wasserstoffbrücken Eiskristalle gebunden werden (siehe auch Einleitung Modell AFGP).

### *Die Gefrierschutzaktivität des PAGP erinnert an die der Thermal Hysterese Proteine von überwinternden Insekten.*

Das in dieser Arbeit aus *P. antarcticum* isolierte und charakterisierte GlcNAc-enthaltende Glycoprotein ist das bisher aktivste in Bezug auf eine eisbildungshemmende Aktivität (Tabelle 7). Es übertrifft an Aktivität sämtliche bisher gefundenen Fisch-Gefrierschutzproteine um mehr als 2°C. Insgesamt wird das Bild, das man sich von der Wirkungsweise der Gefrierschutzsubstanzen macht,

durch die Befunde am PAGP deutlich erweitert. Die oben beschriebene Primär- und Sekundärstruktur stellen eine Besonderheit unter den bislang bekannten Gefrierschutzsubstanzen polarer Fische dar, und zeigen neue Mechanismen auf, wie sie bislang nur ansatzweise bei überwinternden Insekten beobachtet werden konnten.

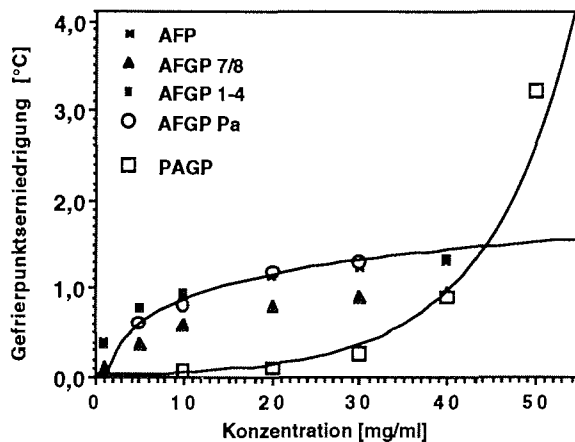
Dabei ist der vom PAGP bewirkte eisbildungshemmende Effekt der gleiche wie bei dem AFGP und AFP polarer Fische, sowie den Gefrierschutzproteinen überwinternder Insekten: Der Schmelzpunkt einer wässrigen Lösung wird durch diese Proteine nicht beeinflusst. Eine eingefrorene Probe taut dementsprechend bei dem aufgrund ihrer osmotischen Konzentration zu erwartenden Schmelzpunkt auf. Läßt man hierbei einen Eiskristall als Initiationskeim übrig und kühlt die Probe wieder ab, so gefriert sie erst bei einer wesentlich niedrigeren Temperatur, eine thermale Hysterese ist zu beobachten (Abbildungen 12-15). Dieses Phänomen wird mit der Anlagerung des hydrophilen Anteils des (Glyco)proteins an den Eiskristall erklärt, während die hydrophoben Anteile eine weitere Anlagerung von Wasser verhindern. Dazu muß sowohl ein bestimmtes Verhältnis von hydrophilen zu hydrophoben Anteilen vorliegen, als auch eine bestimmte Struktur, die zu der Anordnung der Wassermoleküle im Eiskristall paßt (siehe auch Abbildung 2 und 33). Wassermoleküle werden dadurch gezwungen, sich an andere nicht mit AF(G)P besetzte Stellen anzulagern. Daraus resultiert ein anormales Eiskristallwachstum, wofür allerdings eine niedrigere Temperatur notwendig ist. Dies kommt einer Gefrierpunktniedrigung gleich.

Dieses anormale Eiskristallwachstum während des Abkühlvorgangs kann allerdings bei den verschiedenen Gefrierschutzsubstanzen polarer Fische und Insekten sehr unterschiedlich aussehen. Während bei dem AFGP eine Schulter während des ersten Abkühlvorgangs zu beobachten ist (Abbildung 17), zeigt das Diagramm des PAGP nur ein Plateau (Abbildung 29); ein Eiskristallwachstum wird kurzfristig völlig unterbunden. Exakt das selbe Verhalten während des Gefrierens konnte bei der Hämolymphe der Larve von *Tenebrio molitor* beobachtet werden (HANSEN & BAUST 1988a, b; 1989). Die Schulter wird mit dem Anlagern von Eiskristallen an das AFGP erklärt. Über Wasserstoffbrücken werden an den zu einer Seite liegenden Disacchariden die Kristalle gebunden (RAYMOND *et al.* 1989). Wenn alle Eiskristalle an das AFGP gebunden sind, stellt sich kurzfristig ein stabiler Zustand ein, das Plateau entsteht. Erst nach weiterem Abkühlen gefriert die Probe. Bei dem AFP wird ein ähnlicher Prozess angenommen, nur daß hier nicht die Disaccharidstruktur entscheidend ist, sondern die Reste der Aminosäuren Asparagin und Threonin. Die Messungen am AFP von *P. somovi* in der vorliegenden Arbeit bestätigen diese Hypothese.

Trägt man die Gefrierpunktniedrigung [°C] gegen die Proteinkonzentration [mg/ml] auf, so kann sowohl bei dem AFGP als auch bei dem AFP von *L. dearborni* ein für Gefrierschutzsubstanzen polarer Fische typisches Verhalten beobachtet werden (Abbildung 34). Während bei Salzen ein linearer Zusammenhang besteht, verursachen schon geringe Mengen AF(G)P ( $\approx 5$  mg/ml) eine deutliche Gefrierpunktniedrigung. Bei  $\approx 20$  mg/ml ist ein Maximum erreicht, eine

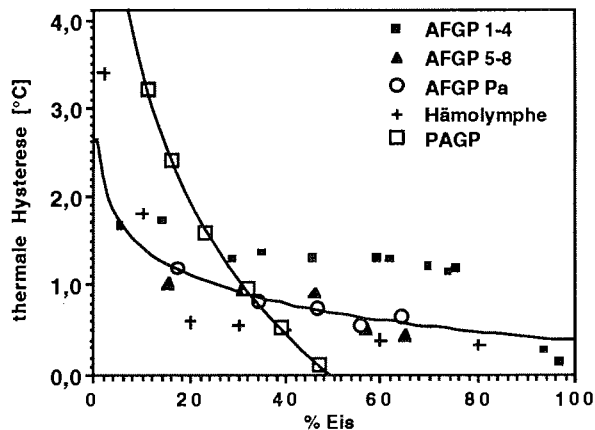
## Diskussion

weitere Erhöhung der Konzentration erbringt keine weitere Gefrierpunktniedrigung. Bei dem AFP von *L. dearborni* (DEVRIES 1988), dem AFGP 1-5 von *D. mawsoni* (DEVRIES 1988) und dem AFGP von *P. antarcticum* (eigene Arbeit) beträgt dieser Wert  $\approx 1.3^{\circ}\text{C}$ . Das AFGP 7/8 arbeitet nicht so effektiv, und zeigt eine maximale Gefrierpunktniedrigung von  $\approx 0.9^{\circ}\text{C}$  (DEVRIES 1988). Entgegengesetzt verhält sich das PAGP: bei niedrigen Konzentrationen zeigt es nur eine geringe Gefrierpunktniedrigung, die ab 30 mg/ml aber stark ansteigt und maximale Werte von  $3.4^{\circ}\text{C}$  erreichen kann. Verdünnt man die Hämolymphe von Insekten auf 50%, 20% oder 10%, ist ein ganz ähnlicher Zusammenhang zu beobachten.



**Abbildung 33:** Gefrierpunkte [ $^{\circ}\text{C}$ ] von ausgewählten Gefrierschutz(glyco)proteinen in Abhängigkeit von der Proteinkonzentration (mg/ml). \* AFP *Rigophila dearborni*;  $\blacktriangle$  AFGP 7/8 *D. mawsoni*;  $\blacksquare$  AFGP 1-4 *D. mawsoni* (alle DEVRIES 1988);  $\square$  PAGP *P. antarcticum*;  $\circ$  AFGP *P. antarcticum*. Die Meßwerte von  $\blacksquare$  und  $\circ$  sind interpoliert worden (Kurve).

Von großer Bedeutung für den Fisch ist das Verhalten der Gefrierschutzsubstanzen bei verschiedenen Eisgehalten. In Abbildung 35 ist die Abhängigkeit der thermalen Hysterese [ $^{\circ}\text{C}$ ] von dem Eisgehalt [%] in der Probenlösung dargestellt. Es fällt auf, daß alle AFGP ein ähnliches Verhalten zeigen. Die maximale Hysterese liegt bei  $\approx 1.7^{\circ}\text{C}$  (10% Eis) für das AFGP 1-5 von *D. mawsoni* (HANSEN *et al.* 1991) und bleibt relativ konstant bis zu einem Eisgehalt von 60-70%. Einen ähnlichen Verlauf zeigen die AFGP 5-8 von *D. mawsoni* und das AFGP von *P. antarcticum* (eigene Arbeit). Das PAGP dagegen zeigt, ähnlich wie die Hämolymphe (HANSEN & BAUST 1988a), eine ausgesprochen starke Hysterese von über  $3^{\circ}\text{C}$  bei niedrigen Eisgehalten, die aber schnell abfällt. Bei Eisgehalten von  $\approx 50\%$  beträgt die Hysterese nur noch  $\approx 0.2^{\circ}\text{C}$ .



**Abbildung 34:** Thermale Hysterese [°C] verschiedener Gefrierschutzsubstanzen in Abhängigkeit vom Eisgehalt in der Probe. ■ AFGP 1-4 (20 mg/ml) von *D. mawsoni*; ▲ AFGP 5-8 (20 mg/ml) von *D. mawsoni* (HANSEN *et al.* 1991); ○ AFGP (20 mg/ml) von *P. antarcticum*; + Hämolymphe aus *Tenebrio molitor* (HANSEN & BAUST 1988a); □ PAGP (50 mg/ml) von *P. antarcticum*. Die Meßwerte von □ und ○ sind interpoliert worden.

Die beiden in dieser Arbeit erstmals isolierten Gefrierschutzglycoproteine bei *P. antarcticum*, AFGP und PAGP, ergänzen sich in ihrer Wirkung (Abbildung 30) und zeigen damit eine bei Fischen bislang unbekannt Strategie der Gefrierresistenz auf: das PAGP ist vor allem bei niedrigen Eisgehalten aktiv, das AFGP dagegen bei höheren. Dadurch ist es *P. antarcticum* vermutlich möglich, bei niedrigeren Konzentrationen von Gefrierschutzsubstanzen (Tabelle 5) sehr viel effektiver ein Wachstum von Eiskristallen schon in einem frühen Stadium zu unterbinden. Da für das Erreichen einer maximal ausgeprägten Gefrierschutzwirkung ein Glycoproteingemisch einen höheren Effekt bewirkt als einzelne rein isolierte aktive Substanzen (Tabelle 7), scheint hier eine komplexere Wirkungsweise zugrunde zu liegen. Man muß wohl davon ausgehen, daß diese Substanzen miteinander in Wechselwirkung treten und erst dadurch eine maximale Hysterese entwickeln. Die niedrigen Konzentrationen bedingen zudem eine geringere Viskosität des Blutes und eine weniger energieaufwendige Synthese, vermutlich Voraussetzung für eine vollpelagische Lebensweise bei Wassertemperaturen nahe dem Gefrierpunkt.

Diese Befunde am PAGP lassen einen für die Gefrierschutzsubstanzen polarer Fische neuen Mechanismus erkennen, der bislang nur von den Proteinen der Insekten bekannt war und in der Primär- bzw. Sekundärstruktur manifestiert sein muß. Es konnte beobachtet werden, daß sich die Glycoproteinfraktionen schlecht gefriertrocknen lassen. Darüber hinaus erwiesen sich die Fraktionen an der Luft als recht hygroskopisch und luden sich elektrostatisch auf. Die Aminosäuren-

analyse ergab einen hohen Anteil der hydrophilen Aminosäure Serin. Dies spricht für die Fähigkeit, Wasser in erhöhtem Maße zu binden (BULL 1944). Ganz ähnliche Eigenschaften konnten bei den Gefrierschutzproteinen der Larve des Mehlwurms von *T. molitor* beobachtet werden (SCHNEPPENHEIM 1978).

Gefrierpunktserniedrigende Eigenschaften der Hämolymphe konnten bei über 25 Arten von Insekten, Spinnen und anderen Arthropoden nachgewiesen werden (BLOCK & DUMAN 1989). Erstaunlich ist dabei der niedrige Gefrierpunkt der Hämolymphe ( $-5^{\circ}\text{C}$  -  $-7^{\circ}\text{C}$ ; DUMAN *et al.* 1982), der allerdings vorwiegend durch niedermolekulare Verbindungen wie Polyol verursacht wird (CANNON & BLOCK 1988; MILLER & WERNER 1980). Verschiedene Thermal-Hysterese-Proteine (THP) mit einem MW zwischen 9 kDa und 17 kDa konnten isoliert werden (DUMAN & HORWATH 1983; PATTERSON & DUMAN 1979, 1982; SCHNEPPENHEIM & THEEDE 1980; TOMCHANEY *et al.* 1982). Auffallend ist ein ebenfalls (siehe PAGP) hoher Anteil hydrophiler AS wie Asparagin, Threonin und Serin. Zusätzlich zu den hydrophilen AS ist noch Histidin vorhanden. Diese AS konnte bislang in keiner Gefrierschutzsubstanz von Fischen nachgewiesen werden, nun aber erstmalig im PAGP von *P. antarcticum*. In der Hämolymphe von Insekten wird das Eiswachstum während der ersten Abkühlungsphase völlig unterdrückt (HANSEN & BAUST 1988a), gleiches gilt für das PAGP. Diese Ergebnisse zeigen, daß in zwei weit entfernten Tiergruppen sehr unterschiedliche Proteine mit ähnlichen physikochemischen Eigenschaften gleiche Aufgaben erfüllen können, und den Organismus effektiv vor dem Gefrieren schützen.

## Betrachtungen zur Evolution polarer Fische und deren Gefrierschutzsubstanzen

*Die Gefrierschutzsubstanzen polarer Fische könnten sich aus einem "Ur-Gefrierschutzprotein" entwickelt haben.*

Biologisch von Bedeutung ist die Frage nach der Entwicklungsgeschichte der Gefrierschutzproteine. Alle bislang aus den Notothenioidei und den arktischen Gadidae isolierten AFGP sind nach dem gleichen Prinzip aufgebaut. Ähnliches gilt für einige AFP. Das Vorkommen der Glycoproteine bei diesen phylogenetisch weit entfernten Fischtaxa läßt im Prinzip auf eine sehr frühe Entwicklung im Verlauf der Evolution schließen, zumal sich andeutet, daß weitere phylogenetisch wenig verwandte Arten ähnliche Substanzen besitzen. Auf den Verlauf der möglichen Entwicklung der Glycoproteine könnte ein Experiment hindeuten, welches in dieser Arbeit am AFGP und PAGP erstmalig durchgeführt worden ist (Abbildung 22). Der Zuckeranteil, d.h. die Galaktose, des AFGP ist ein guter Akzeptor für N-Acetylneuraminsäure (NANA). Durch Bindung der NANA an das Disaccharid entsteht ein Molekül, das große Ähnlichkeit mit Blutgruppensubstanzen und einigen Mucinen aufweist. Ähnliches konnte auch bei dem PAGP gezeigt werden, wobei in diesem Fall zuerst eine Kopplung von Galaktose an das N-Acetylglucosamin notwendig ist.



Aber schon das unsubstituierte AFGP (und PAGP) zeigt eine hämatologisch interessante Eigenschaft. Die bei dem AFGP und PAGP in dieser Arbeit festgestellte besonders hohe Affinität zu den Lectinen PNA bzw. WGA (Abbildung 21) demonstriert bereits eine gewisse Ähnlichkeit dieser Glycoproteine mit den Blutgruppensubstanzen und macht ihre Entwicklung aus einem entsprechenden Grundmolekül oder "Ur-Gefrierschutzprotein" verständlich. Eine solche Entwicklung könnte im einfachsten Fall durch das Fehlen des NANA-übertragenden Enzyms Sialyltransferase ausgelöst werden. Ist das geforderte Grundmolekül außerdem eine in Fischen ubiquitär vorkommende Substanz mit ursprünglich anderen Eigenschaften, so kann im Zuge der Evolution dieser Schritt der Entwicklung zu den Gefrierschutzproteinen mehrfach erfolgt sein, da das Fehlen eines Enzyms, bzw. die Änderung der Substrataffinität eines Enzyms, durch einfache Neumutation initiiert werden kann, wie das Beispiel der Phenylketonurie beim Menschen zeigt. Das Vorkommen des AFGP bei Perciformen der Antarktis und Gadiformen der Arktis, obwohl zwischen den Notothenioidei und den Gadidae kein genetischer Austausch stattfindet, spricht für eine Präadaptation zu einem sehr frühen Zeitpunkt und darauf folgenden Neumutationen. Eine solche Entstehung von Gefrierschutzproteinen ist zudem wahrscheinlicher als eine völlige Neuentwicklung dieser Moleküle.

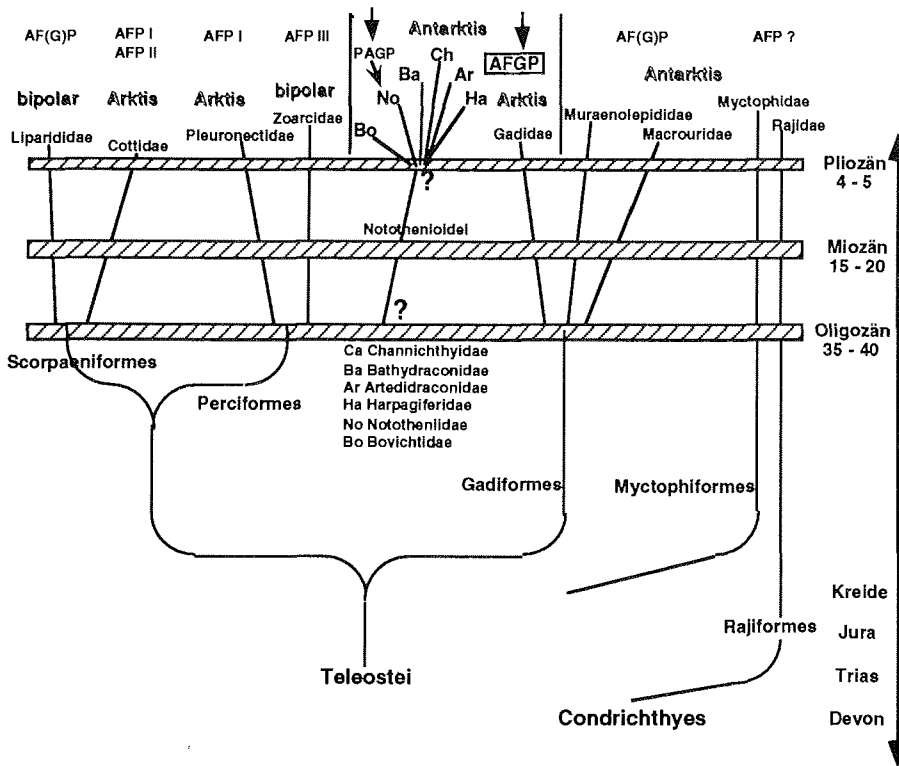
Neuere Untersuchungen am AFP III der Cottidae (EWART *et al.* 1992; NG & HEW 1992) zeigen eine Homologie zwischen dem AFP und Calcium-bindenden Lektinen auf. Lektine sind eine Klasse von Proteinen, die sowohl im Pflanzen- als auch im Tierreich weit verbreitet sind. Sie spielen eine wichtige Rolle im Zellstoffwechsel. Eine Klasse von Lektinen, die ursprünglich im Zellstoffwechsel bestimmter Fischarten eine wichtige Rolle spielte, besitzt auch "antifreeze"-Eigenschaften. Diese Fischarten besitzen im Falle einer starken Abkühlung des Ozeans mit Eisbildung einen Selektionsvorteil.

***Die Gefrierschutzsubstanzen polarer Fische zeigen eine erstaunlich hohe Diversität und sind in phylogenetisch weit entfernten Fischtaxa verbreitet.***

Die Proteine, die marine Teleostee für den Gefrierschutz synthetisieren, zeigen eine erstaunlich hohe Diversität. Dieses bekannte Phänomen konnte durch die vorliegende Arbeit eindeutig bestätigt werden. In nicht-notothenioiden Fischen der Antarktis und Fischen der Arktis konnten verschiedene Gefrierschutzproteine (AFP I - III) nachgewiesen werden, die keinen Zuckeranteil besitzen (siehe auch Tabelle 7). Sie zeigen zum großen Teil eine geringere Gefrierschutzaktivität als die Glycoproteine. Hinzu kommen die oben beschriebenen AFGP der arktischen Gadidae und antarktischen Notothenioidei. Schließlich wurden in der vorliegenden Arbeit das PAGP als Gefrierschutz bei *P. antarcticum* beschrieben, weitere bislang unbekannte Substanzen bei *P. antarcticum* (AF II), *L. kempfi* (AF I), *P. somovi* (AF I), *M. marmoratus* (AF I) und *G. opisthopterus* (AF I) konnten ebenfalls als Proteine identifiziert werden, die eine thermale Hysterese auslösen. Bei Hering (*Clupea harengus pallasi*: RAYMOND 1989; *Clupea harengus harengus*: EWART & FLETCHER 1990; CHADWICK *et al.* 1990) und Stint (*Osmerus mordax*: EWART & FLETCHER 1990) wurden in neuerer Zeit Gefrierschutzproteine nachgewiesen. Zudem konnten bei einigen nordborealen Arten unterschiedlicher Familien (Zoarcidae, Stichaeidae, Cryptacanthodidae,

**Diskussion**

Pholididae, Anarhichadidae und Pleuronectidae) AFP-Gene detektiert werden (DAVIES *et al.* 1988), die eine noch weitere Verbreitung des biologischen Gefrierschutzes erahnen lassen.



**Abbildung 35:** Schematische Darstellung der phylogenetischen Beziehungen rezenter Fischordnungen, die Gefrierschutzsubstanzen synthetisieren. Die Daten wurden zusammengetragen aus der vorliegenden Untersuchung, NELSON (1984), CLARKE (1987A, B, 1990), EASTMAN & GRANDE (1989), EASTMAN (1990), ANDERSON (1988), SCOTT *et al.* (1986). Die schraffierten Flächen bezeichnen die drei Abkühlungsphasen im Oligozän, Miozän und Pliozän. Die Zuweisungen der Gefrierschutzsubstanzen zu den Familien stammen aus der vorliegenden Arbeit und Literaturstellen (Tabelle 7). Die Begriffe Antarktis, Arktis und bipolar wurden denjenigen Familien zugeordnet, deren Vertreter in der jeweiligen Region Gefrierschutz synthetisieren. Abgegrenzt sind die Familien, deren Vertreter AFGP synthetisieren (Gadidae; Familien der U-Ordnung Notothenioidei).

Der Versuch, die verschiedenen Gefrierschutztypen mit den phylogenetischen Beziehungen der jeweiligen Art und ihrer zoogeographischen Verbreitung zu korrelieren, führt zu etlichen Widersprüchen (Abbildung 36). Die bisher beschriebenen Gefrierschutzsubstanzen (inklusive vorliegende Arbeit) sind auf 7 Unterordnungen verteilt. Berücksichtigt man die noch nicht charakterisierten Substanzen, ergeben sich 9 Unterordnungen bzw. 3 Klassen. Schon DEVRIES (1983) stellte fest, daß einerseits Fische des gleichen Lebensraums völlig verschiedene Gefrierschutztypen

synthetisieren (McMurdo Sound AFGP - AFP), während andererseits z.B. das AFGP von Vertretern verschiedener Ordnungen an den entgegengesetzten Polen synthetisiert wird. SCOTT *et al.* (1986) vermuten, daß die ersten Gefrierschutzglycoproteine während der ersten dramatischen Abkühlung vor ungefähr 30 Mio Jahren zwischen dem Eozän und dem Oligozän (KERR 1984) entstanden sind. Eine weitere Abkühlungsphase trat im ausgehenden Pliozän (4-5 Mio Jahre) ein. Die Evolution vor allem der arktischen AFPs soll während der Glacialzeit vor 2 Mio Jahren (SHACKLETON *et al.* 1984) mehrmals unabhängig voneinander stattgefunden haben (DAVIES *et al.* 1988).

***Die Phylogenese der Teleosteer polarer Meere wurde in starkem Maße beeinflusst durch die Vereisungsperiodik auf der Nord- und Südhalbkugel.***

Als gesichert kann man annehmen, daß antarktische Arten vor ca. 15-20 Mio (KENNETT 1977) und arktische Arten vor ca. 2.5 Mio Jahren (SHACKLETON *et al.* 1984) intensiv mit der Vereisung konfrontiert wurden und während dieser Zeiten unter dem Selektionsdruck u.a. der Temperatur eine Radiation auf Gattungs- und Artenebene stattgefunden hat (CLARKE & CRAME 1989; EASTMAN & GRANDE 1989; KOCK 1992). Unter der Voraussetzung, daß nur drei Familien der Unterordnung Notothenioidei einen identischen Gefrierschutz (AFGP) synthetisieren (DUMAN & DEVRIES 1975; FLETCHER 1977; EASTMAN 1990), wurde angenommen, daß während der Diversifikation der Familien unter klimatischem Stress das AFGP entstand. Arten mit der Anlage zur AFGP-Synthese konnten in kalte Regionen vordringen, andere nicht. Diese Hypothese muß allerdings insofern überdacht werden, als daß zum einen alle im Weddellmeer und der Lasarewmeer untersuchten Notothenioidei AFGP besitzen, so z.B. der in warmen Tiefenwasser (+0.5°C) lebende Channichthyide *N. ionah* und die *Pogonophryne* Arten (Tabelle 3). Zum anderen haben *P. antarcticum* und *L. kempfi* zusätzliche Glycoproteine evolviert.

Es ist bemerkenswert, daß auf der Nordhemisphäre Vertreter der Gadiformes dasselbe AFGP synthetisieren wie die antarktischen Notothenioidei, die nach morphologischen Merkmalen zu den Perciformes gerechnet werden (GREENWOOD *et al.* 1966; NELSON 1984). Eine konvergente Entwicklung eines solch komplexen Glycoproteins ist nur schwer vorstellbar. Andererseits fand die Trennung der Perciformes und Gadiformes vor der Vereisung der Antarktis statt. Eine Zuordnung der Notothenioidei zu den primitiveren Gadiformes wird von SCOTT *et al.* (1986) u.a. unter der Berücksichtigung enzymatischer Untersuchungen an der Lactat Dehydrogenase (WHITT 1969) diskutiert. Danach wurde schon vor 30-40 Mio Jahren das AFGP-Gen angelegt. Im Verlauf der Vereisung wanderten Vorfahren der heutigen Gadiformes nach Norden und breiteten sich in der Arktis aus, wo sie die dominierende Ordnung darstellen, ebenso wie die Notothenioidei in der Antarktis.

EASTMAN & GRANDE (1989) halten gegen die Hypothese von SCOTT *et al.* (1986), daß während der ersten Abkühlung im Eozän/Oligozän das Wasser zu warm (5° - 7°C) war, als daß eine Entwicklung von Gefrierschutzsubstanzen nötig gewesen wäre. Die Anlagen zum AFGP hätten sich demnach erst in den letzten 10 Mio Jahren während der Abkühlungsphase im Miozän auf Grund

## Diskussion

---

der Wassertemperaturen nahe dem Gefrierpunkt entwickelt. Während der letzten Abkühlungsphase im Pliozän hätte dann eine starke Radiation nur der notothenioiden Arten stattgefunden, die AFGP synthetisieren. EASTMAN & GRANDE (1989) beriefen sich dabei auf ältere Untersuchungen, wonach Gefrierschutz nur in einigen Notothenioiden (15 Arten) vorkommt (DEVRIES & LIN 1977; AHLGREN & DEVRIES 1984; EASTMAN & DEVRIES 1986b).

Unter Berücksichtigung der vorliegenden Untersuchung sind nun bei 38 notothenioiden und 7 nicht-notothenioiden Arten der Antarktis Gefrierschutzsubstanzen nachgewiesen worden, auch bei Arten subantarktischer und tiefer Gewässer. Auch Vertreter der bipolaren Scorpaeniformes und Zoarcidae besitzen Gefrierschutzproteine. Dies Resultat erstaunt um so mehr, als daß es sich bei dem antarktischen Vertreter, *P. somovi*, um einen Liparididen handelt, der aus dem Gebiet der Süd-Shetlands aus Tiefen von 400 - 850 m bekannt ist (STEIN & ANDRIASHEV in GON & HEEMSTRA 1990). Der Zoarcide *L. hureaui*, bekannt von den Kerguelen in Wassertiefen zwischen 560 - 940 m, besitzt AFP, zumindest die Exemplare aus der Lasarewmeer. Bei *M. marmoratus* (Gadiformes), *M. holotrachys* (Macrouriformes), *G. opisthopterus* (Myctophiformes) deutet sich an, daß sie AFP-ähnliche Substanzen in geringen Mengen synthetisieren. Akzeptiert man die Vermutung von EASTMAN & GRANDE (1989), daß sich Gefrierschutzsubstanzen erst in den letzten 10 Mio Jahren entwickelt haben, so müßten sie im Laufe der Evolution mehr als 12mal entstanden sein.

SCOTT *et al.* (1986) plädieren bei den Zoarcidae und Liparididae für eine Wanderung in Süd-Nordrichtung. Danach wurde der Gefrierschutz während der ersten Abkühlungsphasen im Südpolarmeer entwickelt (siehe AFGP der Notothenioidei), und erst später nach Norden eingeführt. Eine hohe Übereinstimmung konnte bei der Primär- und Sekundärstruktur des AFP III des arktischen Zoarciden *M. americanus* (HEW *et al.* 1984; HEW & FLETCHER 1985) und der antarktischen *L. dearborni* (SCHRAG *et al.* 1987) und *P. brachycephalum* (CHENG & DEVRIES 1989) nachgewiesen werden. Auch deutet sich an, daß *L. hurai* (Tabelle 3) ein ähnliches AFP besitzt. Andere Autoren (ANDERSON 1988; KOCK 1992) gehen allerdings von einer Verbreitung in Nord-Südrichtung aus. Die Gattung *Lycenchelys* z.B. hat vermutlich ihren Ursprung in der tropischen Zoarcidenfauna des Miozän (ANDERSON 1988). Die Entwicklung eines Gefrierschutzes hätte demnach erst im Pliozän eingesetzt.

Die Cottiden, weit verbreitet im Nord-Atlantik (NELSON 1984), produzieren sehr unterschiedliche AFP, wie aus Untersuchungen an *H. americanus* (SLAUGHTER *et al.* 1981) und verschiedenen *Myoxocephalus*-Arten (HEW *et al.* 1986b; PICKETT *et al.* 1984; SCOTT *et al.* 1986) hervorgeht. Dies trifft sowohl auf die Primär- als auch Sekundärstruktur zu. Eine unabhängige Evolution vor 2-3 Mio Jahren wird von SCOTT *et al.* (1986) angenommen. Meine Untersuchungen an den Cottiden *I. bicornis* und *T. nybelini* erbrachten keinen Gefrierschutz. Allerdings wurden diese Tiere im Sommer gefangen, wenn keine oder nur eine verminderte AFP-Synthese stattfindet (SCHNEPPENHEIM & THEEDE 1982; ANANTHANARAYANAN 1989).

## Abschließende Bemerkungen und Ausblick

Mit der vorliegenden Untersuchung konnten drei Tendenzen aufgezeigt werden: (1) Das AFGP ist innerhalb der Notothenioidei weiter verbreitet als bislang angenommen. Auch Arten, die wahrscheinlich nicht mit sehr kaltem Wasser oder sogar Eis in Kontakt kommen, besitzen diese Gefrierschutzsubstanzen. (2) Der Nachweis von sehr ähnlich gebauten und auf dem selben Mechanismus beruhenden Gefrierschutzsubstanzen bei fast allen antarktischen (fraglich bei *Bathyraja*) und einigen arktischen sowie nord-borealen Arten aus phylogenetisch wenig verwandten Taxa läßt vermuten, daß diese (Glyco)proteine sich vor sehr langer Zeit aus einem "Ur"-Gefrierschutzprotein (Lektine, Blutproteine, etc. ?) entwickelt haben, also eine Präadaptation stattfand, und bei einigen rezenten Arten als Relikt vergangener Eiszeiten gewertet werden müssen. Ein polyphyletischer Ursprung ist sehr unwahrscheinlich. (3) Die Isolierung und Charakterisierung des PAGP hat gezeigt, daß das AFGP nicht das einzige Glycoprotein ist, welches eine thermale Hysterese auslösen kann. Außerdem deutet sich an, daß die Mechanismen zur Verhinderung der Eisbildung vielfältiger sind, als bislang angenommen.

Die Gefrierschutzsubstanzen stellen einen bemerkenswerten Mechanismus der Kaltanpassung für Organismen dar, die in einer Umwelt nahe oder unterhalb dem Gefrierpunkt leben. AFPs und AFGPs polarer Fische haben seither Biologen, Biochemiker und Biophysiker nicht nur wegen ihrer ungewöhnlichen Funktion interessiert, sondern auch wegen ihres Vorkommens in verschiedenen Fischordnungen an beiden Polen und ihrer Diversität in der Biosynthese, der Primärstruktur und der Konformation. Obwohl gerade in den letzten Jahren viel über die makromolekularen Gefrierschutzsubstanzen geforscht worden ist, gibt es immer noch offene Fragen, die sich in drei Komplexe zusammenfassen lassen: (A) Biochemie/Biophysik; die Interaktionen zwischen Gefrierschutzsubstanz und Eis. (B) Molekulargenetik; die Frage nach dem Ursprung der AF(G)P. (C) Biotechnologie; die praktische Anwendung.

(A) Nach wie vor ist der Zusammenhang zwischen der Struktur und der Funktion der bekannten (Glyco)Proteine nicht vollständig aufgeklärt (BROWN *et al.* 1985; PARODY-MORREALE *et al.* 1988). Wie kann es sein, daß so verschiedene (Glyco)Proteine eine thermale Hysterese auslösen? Die Charakterisierung der Strukturen von AFGP und AFP I veranlassen zu der Hypothese, daß eine amphipatische Struktur notwendig ist, um Eis an der hydrophilen Seite zu binden und Wasser mit der hydrophoben Seite auszuschließen (KNIGHT & DEVRIES 1989; KNIGHT *et al.* 1990; YANG *et al.* 1988). Intensive Studien müssen eine Antwort darauf geben, warum in der Anwesenheit von AFGP ein Eiskristallwachstum entlang der *c*-Achse und nicht der *a*-Achse stattfindet. Wie unterbindet das PAGP das Eiswachstum?

(B) Die Entdeckung von Gefrierschutzsubstanzen in systematisch weit entfernten Fischtaxa veranlassen zu der Annahme, daß es vor der Trennung der Kontinente Fische mit einem Ur-Gefrierschutzprotein gegeben haben muß. Auch die vorliegende Untersuchung und neuere Forschungen (Cystein-reiches AFP im Stint und Hering; CHADWICK *et al.* 1990; DAVIES & HEW 1990; EWART & FLETCHER 1990; HSIAO *et al.* 1990) deuten an, daß die Gefrierschutzsubstanzen

monophyletischen Ursprungs sind, und daß weiterhin mit der Entdeckung neuer Gefrierschutz(glyco)proteine zu rechnen ist.

(C) Gerade in den letzten Jahren sind biotechnologische Aspekte des Gefrierschutzes stark in den Vordergrund getreten. Seitdem bekannt ist, daß das AFP die Rekristallisation beeinflusst (KNIGHT *et al.* 1984; KNIGHT & DUMAN 1986), hofft man, unerwünschte Prozesse beim Gefrieren zu verlangsamen oder auszuschließen. Vor allem in der Aquakultur bemüht man sich intensiv, kommerziell genutzte Fischarten gefrierresistent zu machen, und damit Aquakulturen auch in hohen Breiten zu etablieren (DU *et al.* 1992; FLETCHER *et al.* 1986, 1988, 1990; HEW *et al.* 1988; KING *et al.* 1989; LI & HEW 1991; LI *et al.* 1991; MACLEAN & PENMAN 1990). So wird z.B. versucht AFP-Gene der Winter-Flunder (*P. americanus*) in andere Organismen (atlantischer Lachs, Forelle, Weizen, etc.) zu transferieren. Eine weitere Anwendung liegt in der Cryopreservation sowohl im landwirtschaftlichen (z.B. Einfrieren von Eizellen; RUBINSKY *et al.* 1990, 1992), als auch im medizinischen Bereich (z.B. Einfrieren von Erythrocyten).

## LITERATUR

- ABELJON C & HIRSCHBERG CB (1988) Intrinsic membrane glycoproteins with cytosol-oriented sugars in the endoplasmic reticulum. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**, 1010-1014
- ABELJON C & HIRSCHBERG CB (1992) Topography of glycosylation reactions in the endoplasmic reticulum. *TIBS* **17**, 32-36
- AHLGREN JA & DEVRIES AL (1984) Comparisons of antifreeze glycopeptides from several antarctic fishes. *Polar Biol.* **3**, 93-97
- AHLGREN JA, CHENG CC, SCHRAG JD & DEVRIES AL (1988) Freezing avoidance and the distribution of antifreeze glycopeptides in body fluids and tissues of Antarctic fish. *J. Exp. Biol.* **137**, 549-563
- AHMED AI, FEENEY RE, OSUGA DT & YEH Y (1975) Antifreeze glycoproteins from an antarctic fish. *J. Biol. Chem.* **250**, 3344-3347
- ALBERTS B, BRAY D, LEWIS J, RAFF M, ROBERTS K & WATSON JD (1990) *Molekularbiologie der Zelle*, 2. Auflage. VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim
- AMANO J & KOBATA A (1989) Quantitative conversion of mucin-type sugar chains to radioactive oligosaccharides. *Meth. Enzymol.* **179**, 261-275
- ANDERSEN NC (1984) Genera and subfamilies of the family Nototheniidae (Pisces, Perciformes) from the Antarctic and Subantarctic. *Steenstrupia* **10**, 1-34
- ANDERSEN JB, KURTZ DD & DOMACK (1980) Glacial and glacial marine sediments of the Antarctic continental shelf. *J. Geol.* **88**, 399-414
- ANDERSON ME (1988) Studies on the Zoarcidae of the southern hemisphere. I. The Antarctic and subantarctic regions. *Antarct. Res. Ser.* **47**, 59-113
- ANDRIASHEV AP (1965) A general review of the Antarctic fish fauna. In: OYE P VAN & MIEGHEM J VAN (eds.) *Biogeography and ecology in Antarctica*. Junk Publ., The Hague, Monographiae Biologicae 15, pp 491-550
- ANDRIASHEV AP (1970) Cryopelagic fishes and their significance in polar cosystems. In: HOLDGATE MW (ed.) *Antarctic Ecology, Vol. 1*. Academic Press, London, pp 297-304
- ANDRIASHEV AP (1979) On the occurrence of fishes belonging to the families Zoarcidae (*Apodolycus hureaui* gen. et sp. n.) and Liparidae (*Paraliparis operculosus* sp. n.) off Kerguelen Island. *Mar. Biol. (Vladivostok)* **6**, 28-34
- ANDRIASHEV AP (1987) A general review of the Antarctic bottom fish fauna. In: KULLANDER SO & FERNHOLM B (eds.) *Proceedings of the 5th Congress of European Ichthyologists*. Stockholm 1985, pp 357-372
- ANDRIASHEV AP & NEELOV AV (1979) New species of the genus *Paraliparis* (Liparidae) from the western Antarctic. *J. Ichthyol.* **19**(1), 10-19
- ANANTHANARAYANAN VS (1989) Antifreeze proteins: structural diversity and mechanism of action. *Life Chem. Rep.* **7**, 1-32
- ANANTHANARAYANAN VS, SLAUGHTER D & HEW CL (1986) Antifreeze proteins from the ocean pout, *Macrozoarces americanus*: circular dichroism spectral studies on the native and denatured states. *Biochim. Biophys. Acta* **870**, 154-159
- ANUMULA KR & TAYLOR PB (1991) Rapid characterization of asparagine-linked oligosaccharides isolated from glycoproteins using a carbohydrate analyzer. *Eur. J. Biochem.* **195**, 269-280
- ARNTZ W, ERNST E & HEMPEL I (1990) The expedition ANTARKTIS VII/4 (Epos leg 3) and VII/5 of RV Polarstern in 1989. *Rep. Polar Res.* **68**, 1-214
- ARNTZ W, BREY T, GERDES D, GORNY M, GUTT J, HAIN S & KLAGES M (1992) Patterns of life history and population dynamics of benthic invertebrates under the high Antarctic conditions of the Weddell Sea. Proc. 25th Symp. Europ. Mar. Biol. Ferrara, Italy
- BALUSHKIN AV (1986) Morphometric characteristics of *Gobionotothen gibberifrons* (Lönnerberg, 1905) from various regions of the western Antarctica. Morphology and distribution of fishes of the southern ocean. *Proc. Zool. Inst. Leningrad* **153**, 72-75
- BATHMANN U, SCHULZ-BALDES M, FAHRBACH E, SMETACEK V & HUBBERTEN H-W (1992) The expedition ANTARKTIS IX/1-4 of the Research Vessel *Polarstern* in 1990/91. *Rep. Polar Res.* **100**, 254 pp

## Literatur

---

- BHAVANANDAN VP, SHEYKHNAZARI M & DEVARAJ H (1990) Colorimetric determination of N-acetylhexosamine-terminating O-glycosidically linked saccharides in mucins and glycoproteins. *Anal. Biochem.* **188**, 142-148
- BELLO R, BOZZINI ML, CHUI A & DUPONT D (1989) Optimizing hydrolysis strategies using a model synthetic peptide. Proc. Third Symp. Protein Society, Seattle, Washington, 29.7.-2.8.1989
- BLOCK W (1990) Cold tolerance of insects and other arthropods. *Phil. Trans. R. Soc. Lond.* **B 326**, 613-633
- BLOCK W & DUMAN JG (1989) Presence of thermal hysteresis producing antifreeze proteins in the Antarctic mite, *Alaskozetes antarcticus*. *J. exp. Zool.* **250**, 229-231
- BLUM H, BEIER H & GROSS HJ (1987) Improved silver staining of plant proteins, RNA, and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis* **8**, 93-99
- BORKIN IV & MEL'YANTSEV RV (1984) New data on the distribution of polar cod, *Arctogadus glacialis* (Gadidae), in the Arctic region. *J. Ichthyol.* **24**, 101-103
- BRADFORD M (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248-254
- BRENNECKE W (1921) Die ozeanographischen Arbeiten der Deutschen Antarktischen Expedition 1911-1912. *Arch. Deut. Seewarte* **39**(1), 1-215
- BROWN RA, YEH Y, BURCHAM TS & FEENEY RE (1985) Direct evidence for antifreeze glycoproteins adsorption onto an ice surface. *Biopolymers* **24**, 1265-1270
- BULL HB (1944) Adsorption of water vapor by proteins. *J. Am. Chem. Soc.* **66**, 1499-1507
- BURCHAM TS, KNAUF MJ, OSUGA DT, FEENEY RE & YEH Y (1984) Antifreeze glycoproteins: influence of polymer length and ice crystal habit on activity. *Biopolymers* **23**, 1379
- BURCHAM TS, OSUGA DT, RAO BNN, BUSH CA & FEENEY RE (1986) Purification and primary sequences of the major arginine-containing antifreeze glycopeptides from the fish *Eleginus gracilis*. *J. Biol. Chem.* **261**, 6384-6389
- BURNETTE WN (1981) "Western Blotting": Electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radiiodinated protein A. *Anal. Biochem.* **112**, 195-203
- BUSH CA & FEENEY RE (1986) Conformation of the glycotriptide repeating unit of antifreeze glycoprotein of polar fish as determined from the fully assigned proton n.m.r. spectrum. *J. Peptide Protein Res.* **28**, 386-397
- BUSH CA, FEENEY RE, OSUGA DT, RALAPATI S & YEH Y (1981) Antifreeze glycoprotein: conformational model based on vacuum ultraviolet circular dichroism data. *Int. J. Pept. Protein Res.* **17**, 125-129
- BUSH CA, RALAPATI S, MATSON GM, YAMASAKI RB & OSUGA DT (1984) Conformation of the antifreeze glycoprotein of polar fish. *Arch. Biochem. Biophys.* **232**, 624-631
- CANNON RJC & BLOCK W (1988) Cold tolerance of microarthropods. *Biol. Rev.* **63**, 23-77
- CARMACK EC & FOSTER TD (1975) Circulation and distribution of oceanographic properties near the Filchner Ice Shelf. *Deep-Sea Res.* **22**, 77-90
- CARMACK EC & FOSTER TD (1977) Water masses and circulation in the Weddell Sea. In: DUNBAR MJ (ed.) *Polar oceans*. Arctic Inst. of North America, pp 151-165
- CHADWICK EMP, CAIRNS DK, DUPUIS HMC, EWART KV, KAO MH & FLETCHER GL (1990) Plasma antifreeze levels reflect the migratory behaviour of Atlantic herring (*Clupea harengus harengus*) in the southern Gulf of St. Lawrence. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* **47**, 1534-1536
- CHAMOW SM & HEDRICK JL (1988) A micromethod for the estimation of oligosaccharides containing glycosidically linked sialic acid or hexoses, or both, in glycoproteins. *Carbohydrate Res.* **176**, 195-203
- CHAKRABARTY A, HEW CL, SHEARS M & FLETCHER G (1988) Primary structures of the alanine-rich antifreeze polypeptides from grubby sculpin, *Myoxocephalus aeneus*. *Can. J. Zool.* **66**, 403-408
- CHENG CC & DEVRIES AL (1989) Structures of antifreeze peptides from the antarctic eel pout, *Austrolycithys brachycephalus*. *Biochim. Biophys. Acta* **997**, 55-64
- CHENG CC & DEVRIES AL (1991) The role of antifreeze glycopeptides and peptides in the freezing avoidance of cold-water fish. In: DI PRISCO G (ed.) *Life under extreme conditions*. Biochemical adaptation. Springer, Berlin Heidelberg, pp 1-15
- CHOU K-C (1992) Energy-optimized structure of antifreeze protein and its binding mechanism. *J. Mol. Biol.* **223**, 509-517



- CLARKE A (1983) Life in cold water: the physiological ecology of polar marine ectotherms. *Oceanogr. Mar. Biol. Ann. Rev.* **21**, 341-453
- CLARKE A (1987a) The adaptation of aquatic animals to low temperatures. In: GROUT BWW & MORRIS G (eds.) *The effects of low temperatures on biological systems*. Edward Arnold, London, pp 315-348
- CLARKE A (1987b) Temperature, latitude and reproductive effort. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **38**, 89-99
- CLARKE A (1990) Temperature and evolution: Southern Ocean cooling and the Antarctic marine fauna. In: KERRY KR & HEMPEL G (eds.) *Antarctic ecosystems: change and conservation*. Springer, Berlin, pp 9-22
- CLARKE A & CRAME JA (1989) The origin of the Southern Ocean marine fauna. In: CRAME JA (ed.) *Origins and evolution of the Antarctic biota*. Geological Society Publications No 47, pp 253-268
- COSSINS AR & BOWLER K (1987) Temperature biology of animals. Chapman & Hall, New York London, 339 pp
- DABAUVALLE M-C, SCHULZ B, SCHEER U & PETERS R (1988) Inhibition of nuclear accumulation of karyophilic proteins in living cells by microinjection of the lectin wheat germ agglutinin. *Exp. Cell Res.* **174**, 291-296
- DANIELS RA & LIPPS JH (1982) Distribution and ecology of fishes of the Antarctic Peninsula. *J. Biogeogr.* **9**, 1-9
- DAVENPORT J (1992) Animal life at low temperature. Chapman & Hall, London New York Tokyo, 240 pp
- DAVIES PL & HEW CL (1990) Biochemistry of fish antifreeze proteins. *FASEB J.* **4**, 2460-2468
- DAVIES PL, ROACH AH & HEW CL (1982) DNA sequence coding for an antifreeze protein precursor from winter flounder. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **79**, 335-339
- DAVIES PL, HEW CL & FLETCHER GL (1988) Fish antifreeze proteins: physiology and evolutionary biology. *Can. J. Zool.* **66**, 2611-2617
- DAVIS LI & BLOBEL G (1987) Nuclear pore complex contains a family of glycoproteins that includes p62: glycosylation through a previously unidentified cellular pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**, 7552-7556
- DAVIS MG (1976) Pleistocene biogeography of temperate deciduous forests. *Geoscience and Man* **13**, 13-26
- DEVRIES AL (1969) Freezing resistance in antarctic fishes of the Antarctic Peninsula. *Antarctic J. U.S.* **4**, 104-105
- DEVRIES AL (1970) Freezing resistance in Antarctic fishes. In: HOLDGATE MW (ed.) *Antarctic ecology*, Vol. 1. Academic Press, London, pp 320
- DEVRIES AL (1971) Glycoproteins as biological antifreeze agents in antarctic fishes. *Science* **172**, 1152-1155
- DEVRIES AL (1974) Survival at freezing temperatures. In: SARGENT JS & MALLINS DW (eds.) *Biochemical and biophysical perspectives in marine biology*, Vol. 1. Academic Press, London, pp 289
- DEVRIES AL (1978) The physiology and biochemistry of low temperature adaptations in polar marine ectotherms. In: MCWHINNIE MA (ed.) *Polar Research. To the present and the future*. AAAS Selected Symposium, Washington DC, pp 175-202
- DEVRIES AL (1980) Biological antifreezes and survival in freezing environments. In: GILLES R (ed.) *Animals and Environmental Fitness*. Pergamon Press, Oxford, pp 583-607
- DEVRIES AL (1982) Biological antifreeze agents in cold water fishes. *Comp. Biochem. Physiol. A* **73**, 627-640
- DEVRIES AL (1983) Antifreeze peptides and glycopeptides in cold water fishes. *Ann. Rev. Physiol.* **45**, 245-260
- DEVRIES AL (1984) Role of glycopeptides and peptides in inhibition of crystallization of water in polar fishes. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. Ser.* **B304**, 575
- DEVRIES AL (1986) Antifreeze glycopeptides and peptides: interactions with ice and water. In: COLOWICK SP & KAPLAN NO (eds.) *Methods in Enzymology*, Vol. 127. Academic Press, Orlando San Diego, pp 293-303
- DEVRIES AL (1988) The role of antifreeze glycopeptides and peptides in the freezing avoidance of antarctic fishes. *Comp. Biochem. Physiol. B* **90**, 611-621
- DEVRIES AL & SOMERO GN (1970) The physiology and biochemistry of low temperature adaptation in Antarctic marine organisms. In: DEACON R (ed.) *Symposium on Antarctic ice and water masses*. Sci Commun. Antarct. Res., Cambridge, pp 101-111
- DEVRIES AL, KOMATSU SK & FEENEY RE (1970) Chemical and physical properties of freezing point-depression glycoproteins from Antarctic fishes. *J. Biol. Chem.* **245**, 2901-2913

## Literatur

---

- DEVRIES AL & LIN Y (1977) The role of glycoprotein antifreezes in the survival of Antarctic fishes. In: Llano GA (ed.) *Adaptations within Antarctic ecosystems*. Gulf, Houston, Texas, pp 439-458
- DEVRIES AL, VANDENHEEDE J & FEENEY RE (1971) Primary structure of freezing point-depression glycoproteins. *J. Biol. Chem.* **246**, 305-308
- DEVRIES AL & WOHLSCHLAG DE (1969) Freezing resistance in some Antarctic fishes. *Science* **163**, 1074-1075
- DEWITT HH (1970) The character of the midwater fish fauna of the Ross Sea, Antarctica. In: HOLDGATE MW (ed.) *Antarctic ecology, Vol. 1*. Academic Press, London, pp 305-314
- DEWITT HH (1971) Coastal and deep-water benthic fishes of the Antarctic. *Antarctic Map Folio Series* **15**, 1-10
- DILL K, HUANG L, BEARDEN DW & FEENEY RE (1992) Structural studies of Antarctic fish antifreeze glycoproteins by one- and two-dimensional NMR spectroscopy. *J. Carbohydrate Chemistry* **11**, 499-517
- DOBBS GH III & DEVRIES AL (1975) The glomerular nephron of Antarctic teleosts: a light and electron microscopic study. *Tissue Cell* **7**, 159-170
- DOBBS GH III, LIN Y & DEVRIES AL (1974) Agglomerularism in Antarctic fish. *Science* **185**, 793-794
- DOOLITTLE RF (1985) Proteins. *Scientific American* **253**(4), 88-99
- DORRIEN CF VON, PIEPENBURG D & SCHMID MK (1991) On the abundance of Arctic cod *Arctogadus glacialis* in Northeast water. *Polar Record* **27**, 362-364
- DU SJ, GONG Z, FLETCHER GL, SHEARS MA, KING MJ, IDLER DR & HEW CL (1992) Growth enhancement in transgenic atlantic salmon by the use of an "all fish" chimeric growth hormone gene construct. *Bio/Technology* **10**, 176-181
- DUMAN JG & DEVRIES AL (1972) Freezing behavior of aqueous solutions of glycoproteins from the blood of an Antarctic fish. *Cryobiol.* **9**, 469-472
- DUMAN JG & DEVRIES AL (1974) The effects of temperature and photoperiod on antifreeze production in cold water fishes. *J. Exp. Zool.* **190**, 89-98
- DUMAN JG & DEVRIES AL (1975) The role of macromolecular antifreezes in cold water fishes. *Comp. Biochem. Physiol. A* **52**, 193-199
- DUMAN JG & DEVRIES AL (1976) Isolation, characterization and physical properties of protein antifreezes from the winter flounder, *Pseudopleuronectes americanus*. *Comp. Biochem. Physiol.* **54B**, 375-380
- DUMAN JG & HORWATH K (1983) The role of hemolymph proteins in the cold tolerance of insects. *Ann. Rev. Physiol.* **45**, 261-270
- DUMAN JG, HORWARTH KL, TOMCHANEY A & PATTERSON JL (1982) Antifreeze agents in terrestrial arthropods. *Comp. Biochem. Physiol.* **73A**, 545-555
- DUMAN JG, PATTERSON JL, KOZAK JJ & DEVRIES AL (1980) Isopiestic determination of water binding by fish antifreeze glycoproteins. *Biochem. Biophys. Acta* **626**, 332-336
- DUNBAR MJ (1968) Ecological development in polar regions. A study in evolution. Prentice-Hall, Englewood Cliffs, New York, pp 1-119
- DUPONT D, BELLO R, BOZZINI ML & CHUI A (1989) Analysis of galactosamine and glucosamine from hydrolysates using an automated hydrolysis and derivatization system. Proc. Third Symp. Protein Society, Seattle, Washington, 29.7.-2.8.1989
- EASTMAN JT (1990) The biology and physiological ecology of notothenioid fishes. In: GON O & HEEMSTRA PC (eds.) *Fishes of the Southern Ocean*. J.L.B. Smith Institute of Ichthyology, Grahamstown, pp 34-52
- EASTMAN JT & DEVRIES AL (1986a) Antarctic fishes. *Scientific American* **254**(11), 106-114
- EASTMAN JT & DEVRIES AL (1986b) Reual glomerular evolution in Antarctic notothenioid fishes. *J. Fish Biol.* **29**, 649-662
- EASTMAN JT & GRANDE L (1989) Evolution of the Antarctic fish fauna with emphasis on the recent notothenioids. In: CRAME JA (ed.) *Origins and evolution of the Antarctic Biota*. Geological Society Special Publication No 47, pp 241-252
- EKAU W (1988) Ecomorphology of nototheniid fish from the Weddell Sea, Antarctica. *Rep. Polar Res.* **51**, 1-140
- EKAU W (1990) Demersal fish fauna of the Weddell Sea. *Antarctic Science* **2**(2), 1-9
- ELLIOT DH (1985) Physical geography - geological evolution. In: BONNER WN & WALTON DWH (eds.) *Key environments, Antarctica*. pp 39-61

- ELVERHOI A & MAISEY G (1983) Glacial erosion and morphology of the eastern and southeastern Weddell Sea Shelf. In: OLIVER RL, JAMES PR & JAGO JB (eds.) Antarctic earth science. Austr. Acad. Sci., Canberra, pp 483-487
- EMILIANI C (1966) Isotopic palaeotemperatures. *Science* **154**, 851-857
- EVERSON I (1977) The living resources of the Southern ocean. FAO, Rome 156, 75-112
- EVERSON I (1984) Fish biology. In: LAWS RM (ed.) *Antarctic ecology, Vol 1*. Academic Press, London, pp 491-532
- EWART KV & FLETCHER GL (1990) Isolation and characterization of antifreeze proteins from smelt (*Osmerus mordax*) and Atlantic herring (*Clupea harengus harengus*). *Can. J. Zool.* **68**, 1652-1658
- EWART KV, RUBINSKY B & FLETCHER GL (1992) Structural and functional similarity between fish antifreeze proteins and Calcium-dependent lectins. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **185**, 335-340
- FAHRBACH E, KLINDT H, MUUS D, ROHARDT G & SALAMEH P (1987) Physical oceanography. In: SCHNACK-SCHIEL S (ed.) Die Winter-Expedition mit FS "Polarstern" in die Antarktis (ANT V/1-3). *Rep. Polar Res.* **39**, 156-169
- FARWELL DC & DION AS (1981) Methods for the identification of N-asparaginy and O-seryl/threonyl glycosidic linkages to aminosugars in glycoproteins. *Anal. Biochem.* **113**, 423-437
- FEENEY RE (1988) Inhibition and promotion of freezing: fish antifreeze proteins and ice-nucleating proteins. *Comments Agric. & Food Chemistry* **1**(3), 147-181
- FEENEY RE, BURCHAM & YEH Y (1986) Antifreeze glycoproteins from polar fish blood. *Ann. Rev. Biophys. Biophys. Chem.* **15**, 59-78
- FEENEY RE & HOFMANN R (1973) Depression of freezing point by glycoproteins from an Antarctic fish. *Nature* **243**, 357-359
- FEENEY RE & YEH Y (1978) Antifreeze proteins from fish bloods. *Adv. Protein Chem.* **32**, 191-282
- FERSHT A (1985) Enzyme structure and mechanism, 2nd ed. W.H. Freeman, New York.
- FINLAY DR, NEWMAYER DD, PRICE TM & FORBES DJ (1987) Inhibition of in vitro nuclear transport by a lectin that binds to nuclear pores. *J. Cell Biol.* **104**, 189-200
- FISCHER W & HUREAU JC (1985) FAO species identification sheets for fishery purposes. Southern Ocean. FAO, Rome, pp 1-471
- FLETCHER GL (1977) Circannual cycles of blood plasma freezing point and Na<sup>+</sup> and Cl<sup>-</sup> concentrations in Newfoundland winter flounder (*Pseudopleuronectes americanus*): correlation with water temperature and photoperiod. *Can. J. Zool.* **55**, 789-795
- FLETCHER GL, ADDISON RF, SLAUGHTER D & HEW CL (1982a) Antifreeze proteins in the arctic shorthorn sculpin (*Myoxocephalus scorpius*). *Arctic* **35**, 302-306
- FLETCHER GL, HEW CL & JOSHI SB (1982b) Isolation and characterization of antifreeze glycoproteins from the Frostfish, *Microgadus tomcod*. *Can. J. Zool.* **60**, 348-355
- FLETCHER GL, KAO MH & FOURNEY RM (1986) Antifreeze peptides confer freezing resistance to fish. *Can. J. Zool.* **64**, 1897-1901
- FLETCHER GL, KING MJ & KAO MH (1987) Low temperature regulation of antifreeze glycopeptide levels in Atlantic cod (*Gadus morhua*). *Can. J. Zool.* **65**, 227-233
- FLETCHER GL, DAVIES PL & HEW CL (1988) Gene manipulation in fish: Can we produce more freeze-resistant fish for aquaculture? Proc. Aquacult. Int. Congr., Vancouver, Canada, September 6-9, 71
- FLETCHER GL, DU S-J, SHEARS MA, HEW CL & DAVIES PL (1990) Antifreeze and growth gene transfer in Atlantic salmon. *Bull. Aquacult. Assoc. Can.* **90**, 70-71
- FRANKS F & MORRIS ER (1978) Blood glycoprotein from antarctic fish possible conformational origin of antifreeze activity. *Biochim. Biophys Acta* **540**, 346-356
- GLASS WF, BRIGGS RC & HNILICA LS (1981) Use of lectins for detection of electrophoretically separated glycoproteins transferred onto nitrocellulose sheets. *Anal. Biochem.* **115**, 219-224
- GODDARD SV, KAO MH & FLETCHER GL (1992) Antifreeze production, freeze resistance, and overwintering of juvenile northern atlantic cod (*Gadus morhua*). *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* **49**, 516-522
- GON O & HEEMSTRA PC (1990) Fishes of the Southern Ocean. J.L.B. Smith Institute of Ichthyology, Grahamstown, pp 462

## Literatur

---

- GORDON MS, AMDUR BH & SCHOLANDER PF (1962) Freezing resistance in some northern fishes. *Biol. Bull. Biol. Lab., Woods Hole* **122**, 52-62
- GREENFIELD N & FASMAN GD (1969) Computed circular dichroism spectra for the evaluation of protein conformation. *Biochemistry* **8**, 4108-4116
- GREENWOOD PH, ROSEN DE, WEITZMAN SH & MYERS GS (1966) Phyletic studies of teleostean fishes, with a provisional classification of living forms. *Bull. Am. Mus. Nat. Hist.* **131**, 339-456
- GROUT BWW & MORRIS G (1987) The effects of low temperatures on biological systems. Edward Arnold, London
- HAGGIS GH, MICHIE D, MUIR AR, ROBERTS KB & WALKER PMB (1964) Introduction to molecular biology. John Wiley & Sons, Inc., New York.
- HAIN S (1990) Die beschalten benthischen Mollusken (Gastropoda und Bivalvia) des Weddellmeeres, Antarktis. *Rep. Polar Res.* **70**, 1-200
- HALTIWANGER RS, HOLT GD & HART GW (1988) UDP-GlcNAc: polypeptide GlcNAc transferase - a membrane-bound, cytoplasmically oriented enzyme. *Glycoconjugate J.* **5**,
- HANOVER JA (1992) The nuclear pore: at the crossroads. *FASEB J.* **6**, 2288-2295
- HANOVER JA, COHEN CK, WILLINGHAM MC & PARK MK (1987) O-linked N-acetylglucosamine is attached to proteins of the nuclear pore. Evidence for cytoplasmic and nucleoplasmic glycoproteins. *J. Biol. Chem.* **262**, 9887-9894
- HANSEN TN & BAUST JG (1988a) Serial dilution of *Tenebrio molitor* haemolymph: analysis of antifreeze activity by differential scanning calorimetry. *Cryo-Letters* **9**, 386-391
- HANSEN TN & BAUST JG (1988b) Differential scanning calorimetric analysis of antifreeze protein activity in the common mealworm, *Tenebrio molitor*. *Biochim. Biophys. Acta* **957**, 217-221
- HANSEN TN & BAUST JG (1989) Differential scanning calorimetric analysis of *Tenebrio molitor* antifreeze protein activity. *Cryobiology* **26**, 383-388
- HANSEN TN, DEVRIES AL & BAUST JG (1991) Calorimetric analysis of antifreeze glycoproteins of the polar fish, *Dissostichus mawsoni*. *Biochim. Biophys. Acta* **1079**, 169-173
- HARDY MR (1989) Monosaccharide analysis of glycoconjugates by high-performance anion-exchange chromatography with pulsed amperometric detection. *Methods Enzymol.* **179**, 76-82
- HARDY MR & TOWNSEND RR (1988) Separation of positional isomers of oligosaccharides and glycopeptides by high-performance anion-exchange chromatography with pulsed amperometric detection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**, 3289-3293
- HARDY MR, TOWNSEND RR & LEE YC (1988) Monosaccharide analysis of glycoconjugates by anion exchange chromatography with pulsed amperometric detection. *Anal. Biochem.* **170**, 54-62
- HARRISON K, HALLETT J, BURCHAM TS, FEENEY RE, KERR WL & YEH Y (1987) Ice growth in supercooled solutions of antifreeze glycoproteins *Nature* **328**, 241-243
- HASCHEMEYER AEV, GUSCHLBAUER W & DEVRIES AL (1977) Water binding by antifreeze glycoproteins from Antarctic fish. *Nature* **269**, 87-88
- HASCHEMEYER AEV & JANNASCH HW (1983) Antifreeze glycopeptides of antarctic fishes. *Comp. Biochem. Physiol. B* **76**, 545-548
- HASELBECK A AND HÖSEL W (1990) Description and application of an immunological detection system for analyzing glycoproteins on blots. *Glycoconjugate J.*, **7**, 63-74
- HEDGEPEETH JW (1977) The antarctic marine ecosystem. In: LLANO GA (ed.) *Adaptations within antarctic ecosystems*. Gulf Publishing Comp., Houston, Texas, pp 3-10
- HELLMER H & BERSCH M (1985) The Southern Ocean. A survey of oceanographic and marine meteorological research work. *Rep. Polar Res.* **26**, 1-115
- HENNESSEY JP JR, JOHNSON WC JR (1981) Information content in the circular dichroism of proteins. *Biochemistry* **20**, 1085-1094
- HEW CL & FLETCHER GL (1985) Biochemical adaptation to the freezing environment - structure, biosynthesis and regulation of fish antifreeze polypeptides. In: GILLES R (ed.) *Proceedings in life science*. Springer Verlag, Heidelberg, pp 553-563
- HEW CL & YIP C (1976) The synthesis of freezing-point-depressing protein of the winter flounder *Pseudopleuronectes americanus* in *Xenopus laevis* oocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **71**, 845-850

- HEW CL, FLETCHER GL & ANANTHANARAYANAN VS (1980) Antifreeze proteins from the shorthorn sculpin, *Myoxocephalus scorpius*: isolation and characterization. *Can. J. Biochem.* **58**, 377-383
- HEW CL, SLAUGHTER D, FLETCHER GL & JOSHI SB (1981) Antifreeze glycoproteins in the plasma of Newfoundland Atlantic cod (*Gadus morhua*). *Can. J. Zool.* **59**, 2186-2192
- HEW CL, SLAUGHTER D, JOSHI SB, FLETCHER GL & ANANTHANARAYANAN VS (1984) Antifreeze polypeptides from the Newfoundland ocean pout, *Macrozoarces americanus*: presence of multiple and compositionally diverse components. *J. Comp. Physiol. B* **155**, 81-88
- HEW CL, JOSHI S, WANG NC, KAO MH & ANANTHANARAYANAN VS (1985) Structures of shorthorn sculpin antifreeze polypeptides. *Eur. J. Biochem.* **151**, 167-172
- HEW CL, WANG NC, YAN S, CAI H, SCLATER A & FLETCHER GL (1986a) Biosynthesis of antifreeze polypeptides in the winter flounder. *Eur. J. Biochem.* **160**, 267
- HEW CL, SCOTT GK & DAVIES PL (1986b) Molecular biology of antifreeze. In: HELLER HC, MUSACCHIA XJ & WANG LCH (eds.) *Living in the cold: physiology and biochemical adaptations*. Elsevier, New York. pp 117-123
- HEW CL, CHAKRABARTTY A & YANG DS (1987) Biochemical adaptation to the freezing environment: structure and function relationship of antifreeze polypeptides. In: CON X, KON OL, CHUNG MCM, HWANG PLH, LEONG SF, LOKE KH, THIYAGARAJAH P & WONG PTH (eds.) *Integration and control of metabolic systems*. Cambridge University Press, Cambridge, pp 299-309
- HEW CL, DAVIES PL & FLETCHER GL (1988) Freezing resistance and antifreeze gene transfer. Proc. first Int. Symp. Mar. Mol. Biol., Baltimore, USA, Oktober 9-11
- HEW CL & YANG DSC (1992) Protein interaction with ice. *Eur. J. Biochem.* **203**, 33-42
- HIRSH AG, WILLIAMS RJ & MERYMAN HT (1985) A novel method of natural cryoprotection. *Plant Physiol.* **79**, 41-56
- HOLT GD & HART GW (1986) The subcellular distribution of terminal N-acetylglucosamine moieties. Localization of a novel protein-saccharide linkage, O-linked GlcNAc. *J. Biol. Chem.* **261**, 8049-8057
- HOLT GD, HALTIWANGER RS, TORRES C-R & HART GW (1987) Erythrocytes contain cytoplasmic glycoproteins: O-linked GlcNAc on Band 4.1. *J. Biol. Chem.* **262**, 14847-14850
- HSIAO K-C, CHENG C-HC, FERNANDES IE, DETRICH HW & DEVRIES AL (1990) An antifreeze glycopeptide gene from the antarctic cod *Notothenia coriiceps neglecta* encodes a polyprotein of high peptide copy number. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**, 9265-9269
- HUBOLD G (1984) Spatial distribution of *Pleuragramma antarcticum* (Pisces: Nototheniidae) near the Filchner and Larsen ice shelves (Weddell Sea/Antarctica). *Polar Biol.* **3**, 231-236
- HUBOLD G (1985a) Stomach contents of the Antarctic silverfish *Pleuragramma antarcticum* from the southern and eastern Weddell Sea (Antarctica). *Polar Biol.* **5**, 43-48
- HUBOLD G (1985b) The early life-history of the high-Antarctic silverfish, *Pleuragramma antarcticum*. In: SIEGFRIED WR, CONDY PR & LAWS RM (eds.) *Antarctic nutrient cycles and food webs*. Springer Verlag, Berlin Heidelberg, pp 445-451
- HUBOLD G (1990) Seasonal patterns of ichthyoplankton distribution and abundance in the Southern Weddell Sea. In: KERRY KR & HEMPEL G (eds.) *Antarctic ecosystems. Ecological change and conservation*. Springer Verlag, Berlin Heidelberg, pp 149-159
- HUBOLD G (1991) Zur Ökologie der Fische im Weddellmeer. Habilitationsschrift, Math.-Nat. Fakultät, Universität Kiel, 157 pp
- HUBOLD G & TOMO AP (1989) Age and growth of Antarctic silverfish *Pleuragramma antarcticum* Boulenger, 1902, from the southern Weddell Sea and Antarctic Peninsula. *Polar Biol.* **9**, 205-212
- HUGHES TJ (1981) Numerical reconstruction of paleo-ice sheets. In: DENTON GH & HUGHES TJ (eds.) *The last great ice sheets*. Wiley Interscience, New York, pp 221-261
- HUREAU J-C, BALGUERIAS E, DUHAMEL G, KOCK K-H, OZOUF-COSTAZ C & WHITE M (1990) Fish fauna of the eastern Weddell Sea. In: ARNTZ, W, ERNST W & HEMPEL I (eds.) *The expedition ANTARKTIS VII/4 (Epos leg 3) and VII/5 of RV "Polarstern" in 1989. Rep. Polar Res.* **68**, 130-138
- KELLY WG & HART GW (1989) Glycosylation of chromosomal proteins: localization of O-linked N-acetylglucosamine in *Drosophila* chromatin. *Cell* **57**, 243-251
- KENNETT JP (1977) Cenozoic evolution of antarctic glaciation, the circum antarctic ocean and their impact on global palaeoceanography. *J. Geophys. Res.* **82**, 3843-3876

## Literatur

---

- KERR RA (1984) Ice cap of 30 million years ago detected. *Science* **224**, 141-142
- KING MJ, KAO MH, BROWN JA & FLETCHER GL (1989) Lethal freezing temperatures of fish: Limitations to seapen culture in Atlantic Canada. *Bull. Aquacult. Assoc. Can.* **89**, 47-49
- KLAGES M (1991) Biologische und populationsdynamische Untersuchungen an ausgewählten Gammariden (Crustacea, Amphipoda) des südöstlichen Weddellmeers, Antarktis. Dissertation, Math.-Nat. Fakultät Universität Bremen, pp 240
- KNIGHT CA & DEVRIES AL (1989) Melting inhibition and superheating of ice by an antifreeze glycopeptide. *Science* **245**, 505-507
- KNIGHT CA & DUMAN JG (1986) Inhibition of recrystallization of ice by insect thermal hysteresis proteins: a possible cryoprotective role. *Cryobiology* **23**, 256-262
- KNIGHT CA, DEVRIES AL & OOLMAN LD (1984) Fish antifreeze protein and the freezing and recrystallization of ice. *Nature* **308**, 295-296
- KNIGHT CA, CHENG CC & DEVRIES AL (1990) Adsorption of  $\alpha$ -helical antifreeze peptides on specific ice crystal surface planes. *Biophysical J.* **59**, 409-418
- KOCK K-H (1992) Antarctic fish and fisheries. Cambridge University Press, Cambridge, New York, 343 pp
- KOMATSU SK, DEVRIES AL & FEENEY RE (1970) Studies of the structure of the freezing point-depressing glycoproteins from an Antarctic fish. *J. Biol. Chem.* **245**, 2901-2908
- KRAUSE G (1991) The expedition ARKTIS VII of RV "Polarstern" in 1990. Report of Leg ARK VII/2. *Rep. Polar Res.* **93**, 1-55
- KROTKIEWSKI H, NILSSON B & SVENSSON S (1989) Structural analysis of the carbohydrate chains of a mouse monoclonal IgM antibody. *Eur. J. Biochem.* **184**, 29-38
- KUNZMANN A (1991) Blood physiology and ecological consequences in Weddell Sea fishes (Antarctica). *Rep. Polar Res.* **91**, 1-79
- KUNZMANN A, CARUSO C & DI PRISCO G (1991) Haematological studies on a high-Antarctic fish: *Bathyracoe marri* Norman. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* **152**, 243-255
- LAEMMLI UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-685
- LEE YC (1990) High-performance anion-exchange chromatography for carbohydrate analysis. *Anal. Biochem.* **189**, 151-162
- LEHNINGER AL (1983) Biochemie, 2. Auflage. Verlag Chemie, Weinheim, pp 919
- LI XM & HEW CL (1991) Structure and function of an antifreeze polypeptide from ocean pout, *Macrozoarces americanus*: role of glutamic acid residues in protein stability and antifreeze activity by site-directed mutagenesis. *Protein Engineering* **4**, 1003-1008
- LI XM, TRINH KY & HEW CL (1991) Expression and characterization of an active and thermally more stable recombinant antifreeze polypeptide from ocean pout, *Macrozoarces americanus*, in *Escherichia coli*: improved expression by the modification of the secondary structure of the mRNA. *Protein Engineering* **4**, 995-1002
- LI XM, TRINH KV, HEW CL, BUETTNER B, BAENZINGER J & DAVIES PL (1985) Structure of an antifreeze polypeptide and its precursor from the ocean pout, *Macrozoarces americanus*. *J. Biol. Chem.* **260**, 12902-12909
- LIN Y, DUMAN JG & DEVRIES AL (1972) Studies on the structure and activity of low molecular weight glycoproteins from an antarctic fish. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **46**, 87-92
- LITTLEPAGE IL (1965) Additional oceanographic studies in McMurdo Sound, Antarctica. Biology of the Antarctic Seas II. Am. Geophys. Union, *Antarct. Res. Ser.* **5**, 1-37
- LLOYD KO & SAVAGE A (1991) High performance anion exchange chromatography of reduced oligosaccharides from sialomucins. *Glycoconjugate J.* **8**, 493-498
- MACDONALD JA, MONTGOMERY JC & WELLS RMG (1987) Comparative physiology of antarctic fishes. *Adv. Mar. Biol.* **24**, 322-388
- MACLEAN N & PENMAN D (1990) The application of gene manipulation to aquaculture. *Aquaculture* **85**, 1-20
- MELLES M (1991) Paläoglazologie und Paläozeanographie im Spätquartär am Kontinentalrand des südlichen Weddellmeeres, Antarktis. *Rep. Polar Res.* **81**, 1-99
- MILLER LK & WERNER R (1980) Supercooling to -60°C: an extreme example of freezing avoidance in northern willow gall insects. *Cryobiology* **17**, 621-622

- MORRIS HR, THOMPSON MR, OSUGA DT, AHMED AI, CHAN SM, VANDENHEEDE JR & FEENEY RE (1978) Antifreeze glycoproteins from the blood of an Antarctic fish. *J. Biol. Chem.* **253**, 5155-
- NELSON JS (1984) Fishes of the world. John Wiley & Sons, New York, 523 pp
- NG NFL & HEW CL (1992) Structure of an antifreeze polypeptide from the sea raven. Disulfide bonds and similarity to lectin-binding proteins. *J. Biol. Chem.* **267**, 16069-16075
- NG NFL, TRINH K-Y & HEW CL (1986) Structure of an antifreeze polypeptide precursor from the sea raven, *Hemirhamphus americanus*. *J. Biol. Chem.* **261**, 15690-15695
- NORMAN JR (1938) Coast fishes part III: the antarctic zone. *Discovery Rep.* **18**, 1-105
- OGATA S-I & LLOYD KO (1982) Mild alkaline borohydride treatment of glycoproteins - A method for liberating both N- and O-linked carbohydrate chains. *Anal. Biochem.* **119**, 351-359
- O'GRADY SM, CLARKE A & DEVRIES AL (1982) Characterization of glycoprotein antifreeze biosynthesis in isolated hepatocytes from *Pagothenia borchgrevinkii*. *J. Exp. Zool.* **220**, 179-189
- OSUGA DT & FEENEY RE (1978) Antifreeze glycoproteins from arctic fish. *J. Biol. Chem.* **253**, 5338-5343
- PARODY-MORREALE A, BISHOP G, FALL R & GILL SJ (1986) A differential scanning calorimeter for ice nucleation distribution studies - Application to bacterial nucleators. *Anal. Biochem.* **154**, 682-690
- PARODY-MORREALE A, MURPHY KP, CERA ED, FALL R, DEVRIES AL & GILL SJ (1988) Inhibition of bacterial ice nucleators by fish antifreeze glycoproteins. *Nature* **333**, 782-783
- PATTERSON JL & DUMAN JG (1979) Composition of a protein antifreeze from larvae of the beetle, *Tenebrio molitor*. *J. Exp. Zool.* **210**, 361-367
- PATTERSON JL & DUMAN JG (1982) Purification and composition of protein antifreezes with high cysteine contents from larvae of the beetle, *Tenebrio molitor*. *J. Exp. Zool.* **219**, 381-384
- PAULING L & COREY RB (1951) Configurations of polypeptide chains with favored orientations around single bonds: two new pleated sheets. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **37**, 729-740
- PAULING L, COREY RB & BRANSON HR (1951) The structure of proteins: two hydrogen-bonded helical configurations of the polypeptide chain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **27**, 205-211
- PICKETT M, SCOTT G, DAVIES P, WANG N, JOSHI S & HEW CL (1984) Sequence of an antifreeze protein messenger RNA at 4°C *in vivo* and *in vitro*. *Physiol. Zool.* **59**, 679-695
- PIEPENBURG D, DORRIEN C VON, RUST J & SCHMID M (1991) Benthos and fish. *Rep. Polar Res.* **93**, 27-31
- PIERCE J & SUELTER CH (1977) An evaluation of the coomassie brilliant blue G-250 dye-binding method for quantitative protein determination. *Anal. Biochem.* **81**, 478-480
- PRICE JL, LYONS CE & HUANG RCC (1990) Seasonal cycle and regulation by temperature of antifreeze protein mRNA in a Long Island population of winter flounder. *Fish Physiol. Biochem.* **8**, 187-198
- PROVENCHER SW (1982a) A constrained regularization method for inverting data represented by linear algebraic or integral equations. *Computer Physics Communications* **27**, 213-227
- PROVENCHER SW (1982b) CONTIN: a general purpose constrained regularization program for inverting noisy linear algebraic and integral equations. *Computer Physics Communications* **27**, 229-242
- PROVENCHER SW & GLÖCKNER J (1981) Estimation of globular secondary structure from circular dichroism. *Biochemistry* **20**, 33-37
- RAHMANN H, SCHNEPPENHEIM R, HILBIG R & LAUKE G (1984) Variability in brain ganglioside composition: a further molecular mechanism beside serum antifreeze glycoproteins for adaptation to cold in antarctic and arctic-boreal fishes. *Polar Biol.* **3**, 119-125
- RANKIN JC, JOHNSON T, KUNZMANN A & WÖHRMANN APA (1990) Physiological studies on teleost fish. - In: ARNTZ, W, ERNST, W & HEMPEL, I (eds.) The Expedition ANTARKTIS VII/4 (EPOS leg 3) and VII/5 of RV *Polarstern* in 1989. *Rep. Polar Res.* **68**, 144-152
- RAO BN & BUSH CA (1987) Comparison by H-NMR spectroscopy of the conformation of the 2600 Dalton antifreeze glycopeptide of polar cod with that of the high molecular weight. *Biopolymers* **26**, 1227-1244
- RASILO M-L & RENKONEN O (1981) Mild alkaline borohydride treatment liberates N-acetylglucosamine-linked oligosaccharide chains of glycoproteins. *FEBS letters* **135**, 38-42
- RAYMOND JA (1989) Freezing resistance in some northern populations of Pacific herring, *Clupea harengus pallasi*. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* **46**, 2104-2107
- RAYMOND JA & DEVRIES AL (1977) Adsorption inhibition as a mechanism of freezing resistance in polar fishes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**, 2589-2593

## Literatur

---

- RAYMOND JA, LIN Y & DEVRIES AL (1975) Glycoproteins and protein antifreezes in two Alaskan fishes. *J. Exp. Zool.* **193**, 125-130
- RAYMOND JA, RADDING W, DEVRIES AL (1977) Circular dichroism of protein and glycoprotein fish antifreezes. *Biopolymers* **16**, 2575-2578
- RAYMOND JA, WILSON P & DEVRIES AL (1989) Inhibition of growth of nonbasal planes in ice by fish antifreezes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**, 881-885
- REISSIG JL, STROMINGER JL & LELOIR LF (1955) A modified colorimetric method for the estimation of N-acetylamino sugars. *J. Biol. Chem.* **217**, 959-966
- RICHARDSON JS (1981) The anatomy and taxonomy of protein structure. *Adv. Protein Chem.* **34**, 167-339
- RUBINSKY B, ARAV A, MATTIOLI M & DEVRIES AL (1990) The effect of antifreeze glycopeptides on membrane potential changes at hypothermic temperatures. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **173**, 1369-1374
- RUBINSKY B, ARAV A & DEVRIES AL (1992) The cryoprotective effect of antifreeze glycopeptides from Antarctic fishes. *Cryobiology* **29**, 69-79
- SCHNEPPENHEIM R (1978) Zum Problem des Frostschutzes durch Peptide und Glykoproteine. Diss., Math.-Nat. Fak. Univ. Kiel, pp 119
- SCHNEPPENHEIM R & THEEDE H (1980) Isolation and characterization of freezing-point depressing peptides from larvae of *Tenebrio molitor*. *Comp. Biochem. Physiol.* **67**, 561-568
- SCHNEPPENHEIM R & THEEDE H (1982) Freezing-point depressing peptides and glycoproteins from arctic-boreal and antarctic fish. *Polar Biol.* **1**, 115-123
- SCHOLANDER PF, FLAGG W, HOCK RJ & IRVING L (1953) Studies on the physiology of frozen plants and animals in the Arctic. *J. Cell. Comp. Physiol.* **42**, 1-56
- SCHOLANDER PF, VANDAM L, KANWISHER JW, HAMMEL HT & GORDON MS (1957) Supercooling and osmoregulation in Arctic fish. *J. Cell. Comp. Physiol.* **49**, 5-24
- SCHRAG JD, CHENG C-HC, PANICO M, MORRIS HR & DEVRIES AL (1987) Primary and secondary structure of antifreeze peptides from arctic and antarctic zoarcid fishes. *Biochim. Biophys. Acta* **915**, 357-370
- SCHWARZBACH W (1988) Die Fischfauna des östlichen und südlichen Weddellmeeres: geographische Verbreitung, Nahrung und trophische Stellung der Fischarten. *Rep. Polar Res.* **54**, 1-94
- SCOTT GK, FLETCHER GL & DAVIES PL (1986) Fish antifreeze proteins: Recent gene evolution. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* **43**, 1028-1034
- SCOTT GK, DAVIES PL, SHEARS MA & FLETCHER GL (1987) Structural variations in the alanine-rich antifreeze proteins of the Pleuronectinae. *Eur. J. Biochem.* **168**, 629-633
- SCOTT GK, DAVIES PL, KAO MH & FLETCHER GL (1988) Antifreeze gene amplification driven by Cenozoic cooling. *J. Mol. Evol.* **27**, 29-35
- SEABROOKE IM, HUFFORD GL & ELDER RB (1971) Formation of Antarctic bottom water in the Weddell Sea. *J. Geophys. Res.* **76**, 2164-2178
- SHACKLETON NJ, BACKMAN J, ZIMMERMAN H, KENT DV, HALL MA, ROBERTS DG, SCHNITKER D, BALDAUF JG, DESPRAIRIES A, HOMRIGHAUSEN R, HUDDLESTON P, KEENE JB, KALTENBACK AJ, KRUMSIEK KAO, MORTON AC, MURRAY JW & WESTBERG-SMITH J (1984) Oxygen isotope calibration of the onset of ice-rafting and history of glaciation in the North Atlantic region. *Nature* **307**, 620-623
- SHIER WT, LIN Y & DEVRIES AL (1972) Structure and mode of action of glycoproteins from an antarctic fish. *Biochim. Biophys. Acta* **263**, 406-413
- SHIER WT, LIN Y & DEVRIES AL (1975) Structure of the carbohydrate of antifreeze glycoproteins from an antarctic fish. *FEBS Lett.* **54**, 135-138
- SLAUGHTER D, FLETCHER GL, ANANTHANARAYANAN VS & HEW CL (1981) Antifreeze proteins from the Sea Raven, *Hemirhamphus intermedius*. Further evidence for diversity among fish polypeptide antifreezes. *J. Biol. Chem.* **256**, 2022-2026
- SLAUGHTER D & HEW CL (1981) Improvements in the determination of antifreeze protein activity using a freezing point osmometer. *Anal. Biochem.* **115**, 212-218
- SNOW CM, SENIOR A & GERACE L (1987) Monoclonal antibodies identify a group nuclear pore complex glycoproteins. *J. Cell Biol.* **104**, 1143-1156
- SOJAR HT & BAHL OP (1987) Chemical deglycosylation of glycoproteins. *Meth. Enzymol.* **138**, 341-359



- SOMERO GN (1990) Life at low volume change: hydrostatic pressure as a selective factor in the aquatic environment. *Amer. Zool.* **30**, 123-135
- SPIRO RG (1972) Study of the carbohydrates of glycoproteins. In: COLOWICK SP & KAPLAN NO (eds.) *Methods in Enzymology*, Vol. 28. Academic Press, New York London, pp 3-43
- SPRINGALL HD (1954) The structural chemistry of proteins. Academic Press, New York, pp 64
- STARR CM, D'ONOFRIO M, PARK MK & HANOVER JA (1990) Primary sequence and heterologous expression of nuclear pore glycoprotein p62. *J. Cell Biol.* **110**, 1861-1871
- STOREY KB (1990) Life in a frozen state: adaptive strategies for natural freeze tolerance in amphibians and reptiles. *Am. J. Physiol.* **258**, R559-R568
- STOREY KB & STOREY JM (1988) Freeze tolerance in animals. *Physiol. Rev.* **68**, 27-84
- TARVERDIYEVA MI & PINSKAYA A (1980) The feeding of fishes of the families Nototheniidae and Chaenichthyidae on the shelves of the Antarctic Peninsula and the South Shetlands. *J. Ichthyol.* **20**(4), 50-60
- TIEDTKE JE & KOCK K-H (1989) Structure and composition of the demersal fish fauna around Elephant Island. *Arch. FischWiss.* **39**(1), 143-169
- TOMCHANEY AP, MORRIS JP, KANG SH & DUMAN JG (1982) Purification, composition, and physical properties of a thermal hysteresis "antifreeze" protein from larvae of the beetle, *Tenebrio molitor*. *Biochemistry* **21**, 716-721
- TOMIMATSU Y, SCHERER JR, YEH Y & FEENEY RE (1976) Raman spectra of a solid antifreeze glycoprotein and its liquid and frozen aqueous solutions. *J. Biol. Chem.* **251**, 2290-2298
- TORRES C-R & HART GW (1984) Topography and polypeptide distribution of terminal N-acetylglucosamine residues on the surfaces of intact lymphocytes. *J. Biol. Chem.* **259**, 3308-3317
- TOWBIN H, STAHELIN T & GORDON J (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**, 1350-1354
- TOWNSEND RR & HARDY MR (1991) Analysis of glycoprotein oligosaccharides using high-pH anion exchange chromatography. *Glycobiology* **1**, 139-147
- TOWNSEND RR, HARDY MR, HINDSGAUL O & LEE YC (1988) High-performance anion-exchange chromatography of oligosaccharides using pellicular and pulsed amperometric detection. *Anal. Biochem.* **174**, 459-470
- TOWNSEND RR, HARDY MR, CUMMING DA, CRAVER JP & BENDIAK B (1989) Separation of branched sialylated oligosaccharides using high-pH anion-exchange chromatography with pulsed amperometric detection. *Anal. Biochem.* **182**, 1-8
- VAISIUS A, MARTIN-KEARLEY J & FLETCHER GL (1989) Antifreeze protein gene transcription in winter flounder is not responsive to temperature. *Cell. Mol. Biol.* **35**, 547-554
- VALERIO PF, FLETCHER GL & KAO MH (1989) The function of antifreeze proteins in preventing ice growth across fish skin. *Bull. Aquacult. Assoc. Can.* **89**, 28-30
- VANDENHEEDE JR, AHMED AI & FEENEY RE (1972) Structure and role of carbohydrate in freezing point-depressing glycoproteins from an Antarctic fish. *J. Biol. Chem.* **247**, 7885
- VAN VOORHIES WV, RAYMOND JA & DEVRIES AL (1978) Glycoproteins as biological antifreeze agents in the cod, *Gadus ogac* (Richardson). *Physiol. Zool.* **51**, 347-353
- WALTERS V (1961) Winter abundance of *Arctogadus glacialis* in the polar basin. *Copeia* **2**, 236-237
- WANG L (1989) Animal adaptation to cold. *Adv. Comp. Env. Phys.* Vol. 4&5. Springer Verlag, Berlin Heidelberg, 441 pp
- WEN D & LAURSEN RA (1992) Structure-function relationships in an antifreeze polypeptide. The role of neutral, polar amino acids. *J. Biol. Chem.* **267**, 14102-14108
- WHITT GS (1969) Homology of lactate dehydrogenase genes: E gene function in the teleost nervous system. *Science* **166**, 1156-1158
- WILLIAMS R (1988) The inshore fishes of the Vestfold Hills region, Antarctica. *Hydrobiologia* **165**, 161-167
- WÖHRMANN APA (1990) Maintenance of Antarctic fish (Notothenioidei). In: ARNTZ, W, ERNST, W & HEMPEL, I (eds.) The Expedition ANTARKTIS VII/4 (EPOS leg 3) and VII/5 of RV *Polarstern* in 1989. *Rep. Polar Res.* **68**, 204-205
- WÖHRMANN APA, HASELBECK A, PRINZ H & HÖSEL W (1991) Characterization of glycoproteins of *Pleuragramma antarcticum* (Pisces: Notothenioidei). Proc. EPOS Conf., Bremerhaven, 22.5.-27.5.1991

## Literatur

---

- WÖHRMANN APA, HILBIG R & RAHMANN H (1990a) Brain gangliosides of high-Antarctic notothenioids. Proc. 2nd Int. Conf. Biol. Ant. Fishes, Ravello, 30.5.-1.6.1990
- WÖHRMANN APA, HILBIG R & RAHMANN H (1990b) Glycoconjugates and cold adaptation in high-Antarctic fish. Proc. 2nd Int. Conf. Glycoconj., Bonn, 25.10.-26.10.1990
- WÖHRMANN APA & ZIMMERMANN C (1992) Comparative investigations on fishes of the Weddell Sea and the Lazarev Sea. *Rep. Polar Res.* **100**, 208-222
- YANG DSC, SAX M, CHAKRABARTY A & HEW CL (1988) Crystal structure of an antifreeze polypeptide and its mechanistic implications. *Nature* **333**, 232-237
- YONEDA Y, IMAMOTO-SONOBE N, YAMAIZUMI M & UCHIDA T (1987) Reversible inhibition of protein import into the nucleus by wheat germ agglutinin injected into cultured cells. *Exp. Cell Res.* **173**, 586-595

## DANKSAGUNG

Diese Arbeit wäre ohne die Unterstützung und Mithilfe einiger Arbeitsgruppen und Personen in dieser Form nicht zustande gekommen. So gilt mein Dank vor allem Prof. G. Hempel, der trotz einiger logistischer Schwierigkeiten und trotz der für das Institut für Polarökologie (IPÖ) ungewöhnlich biochemischen Fragestellung immer zuversichtlich war, und mir die Teilnahme an zwei Antarktis-Expeditionen ermöglichte.

Mein Dank gilt auch Dr. W. Hösel, der die Kooperation zwischen IPÖ und Boehringer Mannheim GmbH (BM) erst ins Rollen brachte, und zusammen mit dem Hauptabteilungsleiter Dr. Wolf mir eine Anstellung in seiner Abteilung NP-RE in Tutzing ermöglichte und einen Arbeitsplatz zur Verfügung stellte.

Mein besonderer Dank geht an Dr. A. Haselbeck, der mir meine Arbeiten bei BM in den vergangenen Jahren weiter ermöglichte, einen Arbeitsplatz in den Forschungswerken Tutzing und Penzberg zur Verfügung stellte und mir immer mit viel Einsatz und wissenschaftlichem Rat zur Seite stand. Dr. M. Wotzny aus seiner Abteilung gab mir wertvolle Ratschläge bei der Interpretation der Daten zum Zirkulardichroismus und den strukturellen Untersuchungen.

Schließlich geht mein Dank an die Belegschaften der Abteilungen NP-RE (Dr. Hösel), BB-EB (Dr. Haselbeck) und BB-EC3 (Dr. Schmuck), im besonderen an die technischen Assistenten R. Gießler, S. Wolf, P. Kratzsch, D. Reusch und K. Tandler, die mir zu jeder Zeit bei der Durchführung der biochemischen Analysen geduldig zur Seite standen, und mir den Aufenthalt bei BM in schöner Erinnerung halten.

Dr. K.-H. Kock und Dr. D. Piepenburg danke ich für die ständige Diskussionsbereitschaft und die wertvollen Anregungen während der Anfertigung der Dissertation, Dr. A. Kunzmann und C. Zimmermann für die gute Zusammenarbeit während der vergangenen Antarktis-Expeditionen und C. von Dorrien für die Probennahme der arktischen Fische.

Allen weiteren Kollegen am Institut für Polarökologie in Kiel, am Alfred-Wegener-Institut in Bremerhaven und in den Forschungswerken Tutzing und Penzberg von BM sowie der Besatzung vom FS *Polarstern* schulde ich meinen herzlichen Dank für die ständige Kooperation und Hilfsbereitschaft.

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

Verkaufspreis/DM

- \* **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 11,50
- Heft Nr. 2/1982** – „Deutsche Antarktis-Expedition 1980/81 mit FS ‚Meteor‘“  
First International BIOMASS Experiment (FIBEX) – Liste der Zooplankton- und Mikronektonnetzfüge  
zusammengestellt von Norbert Klages 10,—
- 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 19,50
- Heft Nr. 4/1982** – „Filchner-Schelfeis-Expedition 1980/81“  
Liste der Planktonfänge und Lichtstärkemessungen  
zusammengestellt von Gerd Hubold und H. Eberhard Drescher 12,50
- \* **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 ‚Polar-  
sirkel‘ (Pre-Site Survey)“ – Stationslisten der Mikronekton- und Zooplanktonfänge sowie der Bodenfischerei  
zusammengestellt von R. Schneppenheim 13,—
- 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 10,—
- 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 15,—
- Heft Nr. 10/1983** – „Fluor im antarktischen Ökosystem“ – DFG-Symposium November 1982  
zusammengestellt von Dieter Adelung 23,—
- Heft Nr. 11/1983** – „Joint Biological Expedition on RRS ‚John Biscoe‘, February 1982 (II)“  
Data of micronekton and zooplankton hauls, by Uwe Piatkowski 16,—
- Heft Nr. 12/1983** – „Das biologische Programm der ANTARKTIS-I-Expedition 1983 mit FS ‚Polarstern‘“  
Stationslisten der Plankton-, Benthos- und Grundschleppnetzfüge und Liste der Probennahme an Robben  
und Vögeln, von H. E. Drescher, G. Hubold, U. Piatkowski, J. Plötz und J. Voß 14,—
- \* **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 Fahrleiters 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 40,—
- 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 75,—
- 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 22,50
- Sonderheft Nr. 5/1984** – „The observatories of the Georg von Neumayer Station“, by Ernst Augstein 8,—
- Heft Nr. 16/1984** – „FIBEX cruise zooplankton data“  
by U. Piatkowski, I. Hempel and S. Rakusa-Suszczewski 19,—
- Heft Nr. 17/1984** – „Fahrtbericht (cruise report) der ‚Polarstern‘-Reise ARKTIS I, 1983“  
von E. Augstein, G. Hempel und J. Thiede 29,—
- 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 25,—
- 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 41,—
- 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 42,—