

Berichte
aus dem
Institut für Meereskunde
an der
Christian-Albrechts-Universität
zu Kiel

Nr. 226

MECHANISMEN BIOCHEMISCHER TEMPERATURANPASSUNG

**Ein Vergleich der Enzymeigenschaften bei Crustaceen aus
verschiedenen Klimazonen**

DOI 10.3289/IFM_BER_226

von
RALF-ACHIM VETTER

Kopien dieser Arbeit können bezogen werden von

Institut für Meereskunde
Abteilung Meereszoologie
Düsternbrooker Weg 20
D-W-2300 Kiel 1

ISSN 0341-8561

Diese Arbeit wurde von der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität Kiel
als Dissertation angenommen

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Acetyl-CoA	Acetyl-Coenzym A
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
CPP	Citrat-Phosphat-Puffer
CS	Citratsynthase
DTNBA	5,5'-Dithio-bis-2-nitrobenzoic acid
E_a	Aktivierungsenergie
EC	Enzyme-Classification: Einteilung der Enzyme nach der internationalen Enzymnomenklatur
EDTA	Ethylen-Dinitrilo-Tetraacetat
FPLC	Fast-Protein-Liquid-Chromatography
kDa	Einheit des Molekulargewichtes: 1 kDa = 1000 g pro mol
K_i	Inhibitorkonstante
K_M^{app}	apparente Michaelis-Konstante
LC	Liquid-Chromatography
MOCNESS	Multiple opening-closing net and environmental sensing system
M_{rel}	relatives Molekulargewicht
NAG	N-Acetyl- β -D-Glucosamin
NAGase	N-Acetyl- β -D-Glucosaminidase
pNp	para-Nitrophenol
pNp-NAG	para-Nitrophenyl-N-Acetyl- β -D-Glucosamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Einheit der Enzymaktivität: 1 U = 1 μ mol umgesetztes Substrat pro Minute
V_{max}	maximale Reaktionsgeschwindigkeit (Enzymaktivität)

INHALTSVERZEICHNIS

EINLEITUNG	1
MATERIAL UND METHODEN	5
<u>Tiermaterial</u>	5
<u>Tierhaltung</u>	6
<u>Chemikalien</u>	7
<u>Gewebepräparation</u>	7
<u>Enzymreinigung</u>	8
<u>Extraktion</u>	8
<u>Chromatographie</u>	9
<u>Molekulargewichtsbestimmung durch Gelfiltration</u>	10
<u>Proteinbestimmung</u>	10
<u>Bestimmung der Enzymaktivitäten</u>	11
N-Acetyl- β -D-Glucosaminidase	11
Citrat-Synthase	13
<u>Berechnung der Aktivierungsenergie</u>	16
<u>Bestimmung der kinetischen Konstanten</u>	16
<u>pH-Messung der Haemolymphe</u>	17
ERGEBNISSE	19
N-Acetyl- β -D-Glucosaminidase	19
<u>Chromatographie</u>	19
<u>Temperaturabhängigkeit</u>	22
<u>pH-Abhängigkeit</u>	26
<u>Kinetische Eigenschaften</u>	29
Substrathemmung	29
Substrataffinität	32

Citrat-Synthase	35
<u>Chromatographie</u>	35
<u>Temperaturabhängigkeit</u>	37
<u>pH-Abhängigkeit</u>	40
<u>Kinetische Eigenschaften</u>	41
Substrataffinität	41
Einfluß von ATP	43
<u>Einfluß der Hälterungstemperatur auf die kinetischen Eigenschaften</u>	49
Substrataffinität	49
ATP-Hemmung	51
Spezifische Aktivität	53
pH-Werte der Haemolymphe	56
<u>DISKUSSION</u>	59
<u>Eigenschaften der N-Acetyl-β-D-Glucosaminidase</u>	60
<u>Eigenschaften der Citrat-Synthase</u>	70
<u>Schlußbetrachtung</u>	82
<u>ZUSAMMENFASSUNG</u>	85
<u>LITERATUR</u>	87

EINLEITUNG

In der Biologie spielt die Temperatur als abiotischer Faktor eine beherrschende Rolle, da sie unter anderem die Geschwindigkeit biochemischer Reaktionen beeinflusst. Deshalb müssen polare Tiere besondere physiologische Anpassungsmechanismen entwickelt haben, um die Kälte langfristig tolerieren zu können. Vor allem die poikilothermen Organismen müssen ihren gesamten Metabolismus auf diese Temperaturen einstellen, da ihre Körpertemperatur von der Umgebungstemperatur bestimmt wird. So ist beispielsweise der pelagisch lebende antarktische Krill *Euphausia superba* trotz der niedrigen Temperaturen sehr leistungsfähig und besitzt einen hohen Energieumsatz. Dies zeigen Respirationsmessungen, die vergleichsweise hohe Stoffwechselraten für *E. superba* ergaben (Rakusa-Suszczewski und Opalinski 1978, Kils 1979, Clarke und Morris 1983). Außerdem weist er bei entsprechendem Nahrungsangebot ein schnelles Wachstum mit kurzen Häutungszyklen auf (Buchholz et al. 1989, Buchholz 1991).

Am Beispiel von Fischen aus unterschiedlichen Klimazonen zeigten Hochachka und Somero (1980, 1984), daß bei den jeweils ambienten Temperaturen der Sauerstoffverbrauch aller Tiere vergleichbar ist, d.h. daß polare Arten in der Lage sind, in der Kälte die gleichen physiologischen Leistungen zu vollbringen, wie ihre tropischen Verwandten bei höheren Temperaturen. Diese als metabolische Kompensation bezeichnete Anpassung (Hochachka und Somero 1980) beinhaltet einen direkten Widerspruch: Obwohl bei niedrigen Temperaturen chemische Reaktionen langsamer verlaufen als bei höheren (Mortimer 1983), sinkt die Leistungsfähigkeit der polaren Arten im Vergleich zu ihren tropischen Vertretern nicht (Hochachka und Somero 1984). Demnach müssen die Tiere, die im Kalten leben, biochemische Anpassungsmechanismen entwickelt haben, so daß sie die negativen Effekte niedriger Temperaturen vollständig ausgleichen können. Diese aus Experimenten mit Fischen gewonnenen Erkenntnisse resultieren im wesentlichen aus Respirationsmessungen, z.T. auch aus Analysen von Enzymen in Rohextrakten. Die entsprechenden Schlußfolgerungen werden jedoch kontrovers diskutiert (Clarke 1983).

Enzyme haben im gesamten anabolen und katabolen Metabolismus wichtige Funktionen als Bio-Katalysatoren. Sie bestimmen die meisten chemischen Reaktionen in einem Organismus. Daher können temperaturbedingte Adaptationen auf enzymatischer Ebene bei

der Anpassung an niedrige Temperaturen eine entscheidende Rolle spielen. Als denkbare Mechanismen der Temperaturkompensation kommen solche in Frage, die bereits bei konstanten Temperaturen an der Regulation der enzymatischen Aktivität beteiligt sind. Hochachka und Somero (1980) stellten in diesem Zusammenhang drei Strategien biochemischer Anpassung vor, über die eine Temperaturadaptation erfolgen könnte: die quantitative, qualitative und modulative Enzymregulation. Bei der quantitativen Strategie wird die Syntheserate der Enzyme mit abnehmender Temperatur gesteigert, um insgesamt höhere Aktivitäten zu erzielen (siehe auch: Clarke 1983). Dagegen werden bei der qualitativen Strategie bevorzugt solche Enzyme oder Isoenzyme synthetisiert, die unter den vorherrschenden Bedingungen eine ideale Funktionsweise ermöglichen, z.B. die Verschiebung des Temperaturoptimums in den ambienten Bereich (Cleffmann 1979) oder Senkung der Aktivierungsenergie bei kaltadaptierten Tieren (Hochachka und Somero 1980, Clarke 1983). Die dritte Strategie umfaßt all jene Vorgänge, die direkt für die Modulation der Enzymaktivität verantwortlich sind, z.B. durch Variation der Enzym-Substrat-Affinität (Baldwin und Hochachka 1970) oder durch den Einfluß von Effektoren (Clarke 1983). Die drei Strategien kommen oft in Kombinationen vor und schließen sich nicht gegenseitig aus. Das gilt sowohl für kurzzeitige Akklimationen als auch für langfristige Adaptationen.

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, am Beispiel von Crustaceen erstmals die Vielfalt der Regulations- und Anpassungsmechanismen aufzuzeigen, mit deren Hilfe es diesen Invertebraten gelang, die Polargebiete erfolgreich zu besiedeln. Dazu wurden ausgewählte Enzyme des antarktischen Krills *Euphausia superba* intensiv untersucht und die enzymespezifischen Charakteristika mit denen anderer Crustaceen verglichen. Als Vergleichsorganismen wurden Euphausiiden aus dem Kattegat und aus dem Mittelmeer herangezogen, die der Gattung *Meganyctiphanes* angehören. Es wurden zusätzlich eine tropische Krabbe *Ocyroide ryderi* (Decapoda) sowie zwei Isopodenarten, *Serolis polita* aus der Antarktis und *Idotea baltica* aus der Ostsee, untersucht, um den Vergleich möglichst umfassend zu gestalten. Die daraus gewonnenen Ergebnisse ermöglichen den intraspezifischen Vergleich zwischen nahen Verwandten unterschiedlicher Klimate, den Vergleich zwischen extremen Klimaten tropisch - polar und den Vergleich der Lebensweise benthisch - pelagisch. Außer diesen Resultaten, die die langfristigen Adaptationen beschreiben, konnten durch Hälterungsversuche an *E. superba* und *M. norvegica* (katt.) Erkenntnisse über kurzfristige Akklimationsvorgänge gewonnen werden.

Für die Untersuchungen wurden zwei Enzyme ausgewählt, die aufgrund ihrer hohen Aktivität und Stabilität für die *in vitro*-Experimente gut geeignet sind und die außerdem unterschiedliche physiologische Aufgaben übernehmen: Die Hydrolase N-Acetyl- β -D-Glucosaminidase (NAGase, EC 3.2.1.30), die als Häutungs- und Verdauungsenzym eingesetzt wird (Buchholz 1989, Saborowski 1992), sowie die Citratsynthase (CS, EC 4.1.3.7), ein regulierendes Enzym des Energiestoffwechsels (Wiskich 1980). In der vorliegenden Arbeit sollten die temperaturabhängigen Charakteristika der beiden Modellenzyme studiert und die jeweiligen Mechanismen der Temperaturanpassung einander gegenübergestellt werden. Dazu wurden die Enzyme der Crustaceen aus unterschiedlichen Klimazonen chromatographisch aufgetrennt. Anschließend konnten die Enzymeigenschaften Aktivität, pH-Abhängigkeit und die kinetischen Parameter hinsichtlich ihrer Temperaturabhängigkeit untersucht werden. Die Ergebnisse wurden in Zusammenhang mit den besonderen Anforderungen der jeweiligen Lebensräume bewertet, um Rückschlüsse auf einzelne Anpassungsmechanismen ziehen zu können.

Mit Hilfe dieses Vorgehens, temperaturabhängige Anpassungsmechanismen anhand einzelner, gut kontrollierbarer enzymatischer Reaktionen nachzuweisen, sollen Möglichkeiten der biochemischen Temperaturanpassung bei Invertebraten aufgezeigt werden.

MATERIAL UND METHODEN

Tiermaterial

Antarktischer Krill, *Euphausia superba* (Crustaceae, Euphausiacea), wurde im Südsommer 1989/90 in der Admiralty Bay, King George Island, Süd-Shetland-Inseln, gefangen. Als Fanggerät diente ein Ringtrawl mit einer Öffnung von 1 m² und einer Maschenweite von 500 µm, welches von einem kleinen Stationsboot mit 0.8 bis 1 kn geschleppt wurde. Die frisch gefangenen Tiere wurden, sofern sie nicht für die Hälterung eingesetzt wurden (s. S. 6), direkt nach dem Fang bei -80 °C einzeln eingefroren und bis zur Analyse aufbewahrt.

Ebenfalls aus der Admiralty Bay stammte *Serolis polita* (Crustaceae, Isopoda). Diese benthisch lebenden Tiere wurden ebenfalls während des Südsommers 1989/90 bei der brasilianischen Station 'COMMANDANTE FERRAZ' von Tauchern in 2 - 5 m Tiefe per Hand gesammelt und nach kurzer Hälterung (maximal 24 h, 0 °C) bei -80 °C eingefroren und gelagert.

Ein weiterer Isopode, *Idotea baltica*, wurde in der Kieler Bucht nahe Laboe in 5 bis 10 m Tiefe gedredgt. Die Tiere wurden kurz nach dem Fang bei -80 °C eingefroren und binnen einer Woche biochemisch untersucht.

Der nordische Krill, *Meganyctiphanes norvegica* (katt.) (Crustaceae, Euphausiacea), wurde im nördlichen Kattegat südöstlich der Insel Læsø im August 1989 während einer Forschungsreise mit "FS Poseidon" mit einem MOCNESS (Wiebe et al. 1976) gefischt. Die Tiere wurden zunächst bei -20 °C eingefroren und maximal 10 Tage gelagert. Anschließend wurden die Proben bis zur Analyse bei -80 °C aufbewahrt.

Der mediterrane Vertreter des nordischen Krills, *M. norvegica* (med.), kommt unter anderem in den Gewässern rund um Korsika vor. Die untersuchten Tiere wurden vom 'OBSERVATOIRE OCEANOLOGIQUE', Villefranche-sur-Mer, Frankreich, zur Verfügung gestellt. Die Proben wurden auf Trockeneis (-60 °C) per Luftfracht verschickt und nach Erhalt bei -80 °C gelagert.

Als tropischer Vergleichsorganismus diente die Krabbe *Ocypode ryderi* (Crustaceae, Decapoda). Die Tiere wurden im Supralitoral der Küste von Kenia gefangen, lebend nach Deutschland transportiert, tiefgefroren und ebenfalls bei -80°C aufbewahrt.

Tierhaltung

Für die Tierhaltung bei definierten Temperaturen wurden zwei speziell für diesen Zweck umgerüstete Tiefkühltruhen eingesetzt. Dabei handelte es sich um handelsübliche Haushaltskühltruhen Gram HF 462 (Gram, Brødrene/Dänemark) mit einem Nutzinhalt von ca. 500 l, deren Steuerelektronik modifiziert wurde (Fa. Pschorn, Kiel), so daß eine sehr präzise Einstellung der Temperatur möglich war. Die Temperaturregulation in den Truhen erfolgte mit Hilfe einer externen Elektronikschaltung (voMar, Rastorfer-Passau). Ein Thermofühler wurde in ein Hälterungsgefäß gehängt und diente so zur Kontrolle und Regulation der Wassertemperatur. Die Steuereinheit schaltete bei Überschreiten des voreingestellten Maximalwertes um 0.1°C die Kühlung der Truhe ein, bis die Temperatur wieder den Schwellenwert erreicht hatte. So ermöglichte die Modifizierung der Steuerelektronik eine Konstanz von 0.1°C Wassertemperatur. Ein zusätzlicher Fühler im Innenraum der Truhe erfaßte die Lufttemperatur. Beide Fühler waren zugleich an Minimax-Thermometer angeschlossen und registrierten so die Bereiche größter Temperaturschwankungen.

Der Innenraum jeder Truhe war durch zwei Plexiglas-Gestelle derart unterteilt, daß jeweils 20 5-l-Bechergläser Duran® (Schott, Mainz) in zwei Etagen aufgestellt werden konnten. Ein am Truhendeckel befestigter Ventilator Typ DP 202 (Conrad, Hirschau) sorgte für permanente Luftzirkulation und somit auch für eine gleichmäßige Temperatur aller Behälter.

Die Hälterung von *E. superba* erfolgte während des Südsommers 1989/90 auf der polnischen Antarktisstation 'Henryk Arctowski'. Als Hälterungstemperaturen wurden -1 , $+2$, $+4$, $+6$ und $+8^{\circ}\text{C}$ gewählt. Die Hälterungsdauer betrug jeweils 11 Tage. Dabei wurden in jedes Becherglas 5 Tiere eingesetzt. Der Krill wurde während der Hälterung mit limnischen Grünalgen der Gattung *Chlorella* gefüttert, die in der Nähe der polnischen Station in ausreichender Menge verfügbar waren. Nach Ablauf des Versuchszeitraums

wurden die Tiere bei -80°C tiefgefroren und gelagert, bis sie im Kieler Labor aufgearbeitet wurden.

Ein weiteres Hälterungsexperiment wurde mit *M. norvegica* (katt.) in Kristineberg (Schweden) im Juni '91 durchgeführt. Der nordische Krill wurde mit dem Stationsboot "Oscar von Sydow" mit einem 'Isaacs-Kidd'-Trawl (Isaacs und Kidd 1953) im Gullmarn-Fjord gefangen. Die Hälterung erfolgte wiederum in den o.g. Tiefkühltruhen bei den Temperaturen 0, +4, +8 und $+16^{\circ}\text{C}$. Die Dauer betrug ebenfalls 11 Tage. Da *M. norvegica* (katt.) kleiner als *E. superba* ist, wurden 8 Tiere je Glasgefäß eingesetzt. Als Nahrung dienten frisch geschlüpfte *Artemia*-Nauplien, die in separaten Gefäßen gezüchtet wurden.

Chemikalien

Bei den verwendeten Feinbiochemika handelte es sich um Produkte der Firmen Sigma-Chemicals (St. Louis, USA) und Serva (Heidelberg). Acetyl-Coenzym-A und ATP wurden von Boehringer (Mannheim) bezogen. Die Firma Pharmacia-LKB (Freiburg) lieferte sämtliche Materialien für die Fast Protein Liquid Chromatography (FPLC®). Puffersubstanzen und anorganische Salze stammten von den Firmen Serva (Heidelberg) und Merck (Darmstadt).

Gewebepräparation

Für die enzymatischen Untersuchungen wurden von allen Euphausiiden und Isopoden Ganztierextrakte hergestellt, während bei *O. ryderi* nur das Hepatopankreas untersucht wurde. Hierzu wurde der Carapax der Tiere abgehoben und das Hepatopankreas im gefrorenen Zustand entnommen. Bei *E. superba* wurden zusätzlich Extrakte von Hepatopankreas, Magen und Kutikula untersucht. Die einzelnen Organe wurden aus tiefgefrorenen Tieren auf Eis präpariert (nach Saborowski 1991).

Enzymreinigung

Die Reinigung der Enzyme wurde mit weitgehend übereinstimmenden Methoden durchgeführt. Die Rohextrakte wurden nach Homogenisation der Gewebe entsalzt und anschließend chromatographisch gereinigt.

Anfangs stand für die Reinigung der N-Acetyl- β -D-Glucosaminidase (NAGase) eine Flüssigkeits-Chromatographie (LC) zur Verfügung, die bereits nach kurzer Zeit durch eine leistungsfähigere FPLC®-Anlage ersetzt werden konnte. Für die Citrat-Synthase (CS) wurde dann ausschließlich die FPLC® verwendet. Mit Ausnahme von *O. ryderi* (nur NAGase) und *I. baltica* (nur CS) wurden bei allen anderen Versuchstieren jeweils beide Enzyme, NAGase und CS, untersucht.

Die Puffer wurden für jedes Enzym individuell auf die Chromatographie angepasst:

<u>Enzym:</u>	CS (FPLC®)	NAGase (FPLC®)	NAGase (LC)
<u>Homogenisationspuffer:</u>	<u>Tris/HCl, pH 8.0</u> 50 mM Tris 100 mM KCl 1 mM EDTA	<u>CPP, pH 5.5</u> 100 mM Citrat mit 200 mM Na ₂ HPO ₄ pH 5.5 einstellen	<u>CPP, pH 5.5</u> 100 mM Citrat mit 200 mM Na ₂ HPO ₄ pH 5.5 einstellen
<u>Elutionspuffer A:</u>	<u>Tris/HCl, pH 7.0</u> 40 mM Tris 20 mM KCl 4 mM MgSO ₄	<u>Imidazol/HCl, pH 6.8</u> 10 mM Imidazol	<u>Phosphat, pH 6.8</u> 10 mM Na ₂ HPO ₄ mit 10 mM NaH ₂ PO ₄ pH 6.8 einstellen
<u>Elutionspuffer B:</u>	jeweils wie Elutionspuffer A, jedoch zusätzlich 1 M NaCl		

Extraktion

Die tiefgefrorenen Tiere bzw. die entnommenen Gewebe wurden in ca. 3-fachem Volumen Homogenisationspuffer aufgenommen und eisgekühlt mit einem Ultra-Turrax

(Jahnke & Kunkel, Staufen) 3 mal 20 Sekunden bei maximaler Drehzahl homogenisiert. Der Extrakt wurde 30 Minuten bei 80 000•g in einer Omikron-Zentrifuge, Rotor 9420 (Heraeus, Hamburg), zentrifugiert und der Überstand über Sephadex® G-25M/PD-10-Säulen (Pharmacia-LKB, Freiburg) entsalzt und gleichzeitig in Elutionspuffer A (für FPLC®) bzw. Homogenisationspuffer (LC) umgepuffert.

Chromatographie

Die LC wurde als Anionentauscher-Chromatographie mit einer Peristaltikpumpe PLG (Desaga, Heidelberg) betrieben. Das "G-25"-Eluat wurde auf eine mit Elutionspuffer A äquilibrierte XK26-Säule mit Q-Sepharose® FF (Pharmacia-LKB, Freiburg) aufgetragen. Nach dem Spülen der Säule mit 240 ml Puffer A wurden die gebundenen Proteine mit einem linearen Gradienten (Elutionspuffer A und B) von 0 bis 1 M NaCl bei einer Flußrate von 0.7 ml pro Minute mit insgesamt 400 ml eluiert. Den NaCl-Gradienten erstellte ein Gradientenmischer 250 B (GynkoteK, München). Das Eluat wurde von einem Fraktionssammler UltraRac® (Pharmacia-LKB, Freiburg) in Fraktionen zu je 7 ml aufgefangen und anschließend auf NAGase-Aktivität getestet.

Für die Chromatographie mit der FPLC® wurde das "G-25"-Eluat auf eine Anionentauscher-Säule HiLoad™ 16/10 Q-Sepharose® HP (Pharmacia-LKB, Freiburg) aufgetragen. Anschließend wurden nicht bindende Substanzen mit ca. 3 Säulenvolumina (70 ml) Elutionspuffer A ausgewaschen. Die gebundenen Proteine wurden mit einem linearen Gradienten (Elutionspuffer A und B) von 0 bis 0.85 M NaCl bei einer Flußrate von 3 ml pro Minute mit insgesamt 335 ml eluiert. Das Eluat wurde in Fraktionen zu je 4.3 ml aufgefangen und auf Enzym-Aktivität getestet. Die Fraktionen mit NAGase- bzw. CS-Aktivität wurden vereinigt. Für die vereinigten Fraktionen wurde fortan der in der Literatur gängige Begriff "Pool" verwendet.

In seltenen Fällen mußte das Volumen der NAGase-Pools eingengt werden, um genügend Aktivität zu erreichen. Die Volumenreduktion erfolgte mittels Druckfiltration in einer Amicon®-Druckzelle 8050, Diaflo®-Filter PM 10 (Amicon, Witten/Ruhr), mit einer

Ausschlußgrenze von 10 kDa. Die derart angereicherte NAGase-Lösung blieb im Kühlschrank bei +4 °C mindestens 1 Woche stabil.

Aufgrund der höheren Aktivität der CS mußte die Enzymlösung nicht eingeeengt werden. Die CS blieb bei +4 °C mindestens 5 Tage stabil.

Molekulargewichtsbestimmung durch Gelfiltration

Für die Gelfiltration wurde eine HiLoad™ 16/60 Superdex™200 Säule (Pharmacia-LKB, Freiburg) mit dem FPLC®-System verwendet. Anhand der Elutionsvolumina der Standardproteine (Gel Filtration Calibration Kit I und II, Pharmacia-LKB, Freiburg) Thyroglobulin ($M_{rs} = 669$ kDa), Ferritin (440 kDa), Aldolase (158 kDa), Rinderserumalbumin (67 kDa), Ovalbumin (43 kDa), Chymotrypsinogen A (25 kDa) und Ribonuclease A (13.7 kDa) wurden die Molekulargewichte der CS und NAGase aller im Experiment verwendeten Spezies bestimmt. Für sämtliche Enzyme wurde der gleiche Elutionspuffer (10 mM Imidazol/HCl, pH 6.8 mit 150 mM NaCl) eingesetzt. Die Fließgeschwindigkeit betrug 1 ml/min, die Fraktionsgröße 1 ml.

Proteinbestimmung

Der Proteingehalt der Proben wurde nach Bradford (1976) mit dem Bio-Rad-Protein-Assay (Bio-Rad, München) bestimmt. Die Eichkurve wurde mit 1 bis 20 µg/ml Rinderserumalbumin-Standard erstellt. Der Test wurde im Mikro-Verfahren entsprechend den Angaben des Herstellers durchgeführt, d.h. die zu untersuchende Probe wurde mit destilliertem Wasser auf 800 µl aufgefüllt, bevor die Farbreaktion durch Zusatz von 200 µl Reagenz gestartet wurde.

Bestimmung der Enzymaktivitäten

N-Acetyl- β -D-Glucosaminidase

Die Bestimmung der NAGase-Aktivität erfolgte zunächst in Anlehnung an Spindler (1976), wurde dann aber für die kinetischen Messungen modifiziert, um die Reproduzierbarkeit, vor allem im Bereich niedriger Substratkonzentrationen, zu erhöhen. Die einfachere Methode nach Spindler wurde jedoch weiterhin für die Bestimmung der Elutionsprofile nach den FPLC®-Läufen eingesetzt. In beiden Fällen wurde das künstliche Substrat p-Nitrophenyl-N-Acetyl- β -D-Glucosamin (pNp-NAG) durch NAGase-Aktivität in N-Acetyl- β -D-Glucosamin (NAG) und para-Nitrophenol (pNp) gespalten.



Obwohl die Messungen mit einem künstlichen Substrat durchgeführt wurden, sind die Ergebnisse direkt auf die natürlichen Bedingungen übertragbar, da auch Versuche mit dem natürlichen Substrat Chitobiose zu vergleichbaren Resultaten führten (Spindler, pers. Mitteilung). Das freigesetzte pNp besitzt in alkalischen Lösungen ein Extinktionsmaximum mit $\epsilon_{400} = 18.1 \text{ l} \cdot \text{mmol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ bei pH 10.2 (Borooah et al. 1961). Da die Testlösung bereits bei $\lambda = 400 \text{ nm}$ eine erhöhte Eigenabsorption zeigt, wurde für die Extinktionsmessungen die Wellenlänge von 410 nm gewählt. Außerdem schwankt der Extinktionskoeffizient in Abhängigkeit von den verwendeten Puffersubstanzen (Borooah et al. 1961), so daß die Extinktion mit Standard-Lösungen geeicht werden mußte. Die eingesetzten pNp-Konzentrationen wurden so gewählt, daß die jeweilige Extinktion zwischen 0.050 und 1.200 lag.

Die Inkubation der Proben erfolgte in einem temperierbaren Schüttelwasserbad SW-1 mit Tauchkühler FT 200 (Julabo, Seelbach/Schwarzwald). Anschließend wurde die Extinktion in einem Uvicon®-810P Photometer (Kontron Instruments, Hamburg) bei 25 °C gemessen. Bei den Extinktionsmessungen mußte auf Temperaturkonstanz geachtet werden, weil die pNp-Absorption stark temperaturabhängig ist. Die NAGase-Aktivität berechnet sich aus der Extinktionsdifferenz zwischen dem Meßwert der Probe und dem Blindwert, bezogen auf die Inkubationszeit.

Alle enzymespezifischen Parameter wurden mit dem modifizierten Test (nach Spindler 1976) bestimmt. Abweichend von der Originalvorschrift wurde die enzymatische Reaktion gestoppt, indem das Protein mit Ammoniumsulfat ausgefällt wurde. Anschließend mußte die Lösung alkalisiert werden, um das pNp detektieren zu können. Das präzipitierte Protein wurde vor der Extinktionsmessung in einer Biofuge A (Heraeus, Hamburg) abzentrifugiert. Daher mußten die Tests in 1.5-ml-Reaktionsgefäßen, Typ 3810 (Eppendorf, Hamburg) angesetzt werden.

		<u>Testansatz</u>
	- CPP, pH 5.5 (s.o.)	50 μ l
	- Probe	50 μ l
START:	- pNp-NAG (in CPP)	50 μ l
INKUBATION:	5 bis 60 min bei 0° C bis 65° C	
STOP (FÄLLUNG):	- (NH ₄) ₂ SO ₄ , 95% gesättigt	500 μ l
	nach 5 min.	
ALKALISIEREN:	- 1 M NaOH	500 μ l
ZENTRIFUGATION:	5 min bei 15 000•g	
MESSUNG:	Überstand bei E ₄₁₀ gegen Luft	

Die Blindwerte wurden ebenfalls nach diesem Schema angesetzt, allerdings wurde Ammoniumsulfat zeitgleich mit der Substrat-Lösung bereits beim Start der Reaktion zugesetzt.

Für die Dreifachbestimmungen der Enzymaktivität wurden unterschiedliche Probenvolumina zwischen 10 μ l und 50 μ l eingesetzt und das Puffervolumen entsprechend eingestellt. Da die einzelnen Enzymparameter (Temperatur-, pH-Optimum etc.) mit unterschiedlichen pNp-Konzentrationen bestimmt wurden, sind diese bei den Methoden der einzelnen Meßreihen jeweils beschrieben.

Abweichend von dem oben angeführten Pipettierschema wurden für die Bestimmung der pH-Optima Citrat-Phosphat-Puffer mit pH-Werten von 4.0 bis 8.5 in 0.5 pH-Schritten verwendet. Die pH-Werte wurden bei der jeweiligen Untersuchungstemperatur überprüft. Im Testansatz wurde eine 0.3 mM pNp-NAG-Endkonzentration eingesetzt.

Die Temperaturoptima mußten bei solchen Substratkonzentrationen bestimmt werden, die nicht limitierend auf die Enzymaktivität wirken. Daher wurde im Testansatz 3.0 mM pNp eingesetzt. Alle Messungen über 30 °C wurden maximal 5 Minuten inkubiert. Die gleiche Substrat-Konzentration (3.0 mM pNp) wurde auch zur Bestimmung der Hitze-stabilität verwendet. Dabei wurde die Probe zunächst 30 Minuten bei der gewünschten Temperatur inkubiert und anschließend die Enzymaktivität bei 25 °C gemessen. Die Ergebnisse wurden dann bezogen auf den Maximalwert in Prozent umgerechnet.

Bei den Messungen zur Berechnung der apparenten Michaelis-Konstanten (K_M^{app}) wurden pNp-Konzentrationen von 0.05 bis 3.33 mM eingesetzt.

Der Test zur Bestimmung der Elutionsprofile wurde in 3-ml-Reagenzgläsern folgendermaßen durchgeführt (nach Spindler 1976):

		<u>Testansatz</u>	<u>Blindwert</u>
	- CPP, pH 5.5 (s.o.)	50 µl	50 µl
	- Probe	50 µl	--
START:	- 0.3% pNp-NAG (in CPP)	50 µl	50 µl
INKUBATION:	15 Minuten bei 35 °C		
STOP:	- 0.01 M NaOH	2.5 ml	2.5 ml
	- Probe	--	50 µl
MESSUNG:	E_{410} gegen Luft		

Citrat-Synthase

Die CS-Aktivität wurde im enzymatisch-optischen Test, modifiziert nach Stitt (1984), über die Freisetzung von Coenzym A bestimmt. Das bei der Reaktion freigesetzte Coenzym A bindet mit der Sulfhydrylgruppe an das Hilfssubstrat 5,5'-Dithio-bis-2-nitrobenzoic acid (DTNBA). Die Bildung dieses Komplexes kann im Photometer bei 412 nm ($\epsilon_{412} = 13.6 \text{ l} \cdot \text{mmol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) nach Dawson et al. (1986) kontinuierlich verfolgt werden.

Die Reaktion verläuft nach folgendem Schema:



1 U Enzymaktivität entspricht 1 μmol Substratumsatz (DTNBA) pro Minute.

Pipettierschema:

- Homogenisationspuffer		505 μl
Tris/HCl, pH 8.0	50 mM	
incl. KCl	100 mM	
incl. EDTA	1 mM	
- DTNBA (in Tris-Puffer)	6.7 mM	15 μl
- Acetyl-CoA	5 mM	10 μl
- Probe		10 μl

Start: - Oxalacetat	10 mM	10 μl

Die für die Bestimmung der ATP-Hemmung benötigte Stammlösung (10 mM ATP) wurde in Homogenisationspuffer angesetzt. Daher konnte bei Zusatz der ATP-Lösung das Puffervolumen entsprechend reduziert werden. Auch bei Probenvolumina von mehr als 10 μl mußte die Puffermenge verringert werden, um das Gesamtvolumen konstant zu halten. Die Messungen wurden mit Halbmikro-Küvetten in einem Lambda 2 Photometer (Perkin-Elmer, Überlingen) durchgeführt. Um die enzymspezifischen Eigenschaften, wie z.B. den apparenten K_M -Wert (K_M^{app}), V_{max} , pH-Optimum etc., bei verschiedenen Temperaturen bestimmen zu können, wurden die Küvetten mit einem steuerbaren Peltier-Element PTP-6 (Perkin-Elmer, Überlingen) zwischen -1°C und $+65^\circ\text{C}$ auf $\pm 0.1^\circ\text{C}$ exakt temperiert. Aufgrund der hohen Wärmeleitfähigkeit der verwendeten Küvetten genügte Vorinkubationen von maximal 90 Sekunden, um den Küvetteninhalt auf die gewünschte Temperatur zu erwärmen oder abzukühlen. Dies wurde mit einem Sekunden-Thermometer 7200 (Testotherm, Lenzkirch) überprüft. Bei Temperaturen unter 20°C wurde Stickstoff

direkt aus einer Gasflasche in der Probenraum geleitet, um ein Beschlagen der Küvetten zu verhindern. Zusätzlich wurde ein Stickstoff-Strom durch justierbare Düsen direkt auf die Küvettenfenster gerichtet.

Die Hitzestabilität der CS wurde ermittelt, indem die Probe für 30 Minuten bei der zu untersuchenden Temperatur vorinkubiert wurde und anschließend in einem Aktivitätstest bei 25 °C eingesetzt wurde. Die gemessene Umsatzrate wurde dann in Relation zur Maximalaktivität berechnet.

Die pH-Optima wurden im Bereich von pH 7.0 bis 9.0 in 0.2 pH-Schritten bei verschiedenen Temperaturen bestimmt. Der verwendete Homogenisationspuffer (s.o.) wurde mit HCl auf den jeweils entsprechenden pH-Wert eingestellt.

Außerdem wurden die kinetischen Parameter K_M^{app} und V_{max} für die beiden Substrate Acetyl-CoA und Oxalacetat berechnet. Die Grundlage dafür bildeten Meßreihen mit variablen Substratkonzentrationen von 1.8 μ M bis 182 μ M Acetyl-CoA bei konstant 182 μ M Oxalacetat, bzw. 1.8 μ M bis 363.6 μ M Oxalacetat bei konstant 91 μ M Acetyl-CoA (Konzentrationen im Testansatz). Die Tests wurden als Doppelbestimmungen mit unterschiedlichen Probenvolumina durchgeführt. Die Bestimmung der K_i -Werte (ATP) erfolgte mit unterschiedlichen ATP-Konzentrationen von 0 bis 1.8 mM.

Die CS-Aktivitätsprofile der FPLC®-Läufe wurden nicht in Küvetten, sondern in Mikrotiter®-Platten gemessen. Dazu wurde das obige Pipettierschema wie folgt modifiziert:

Pipettierschema für Mikrotiter®-Platten:

- Homogenisationspuffer		160 μ l
Tris/HCl, pH 8.0	50 mM	
incl. KCl	100 mM	
incl. EDTA	1 mM	
- DTNBA (in Tris-Puffer)	6.7 mM	10 μ l
- Acetyl-CoA	2.5 mM	10 μ l
- Probe		50 μ l

Start: - Oxalacetat	5 mM	10 μ l

Die Aktivitätsmessung erfolgte mit einem MR 5000 Reader (Dynatech, Denkerdorf) mit integrierter Temperierung bei konstant 25 °C. Die Extinktionsänderungen wurden bei 405 nm kontinuierlich registriert und mit dem eingebauten Kinetik-Modul ausgewertet.

Berechnung der Aktivierungsenergie

Mit Hilfe der Arrheniusgleichung, die zunächst in die folgende Geradengleichung umgeformt werden mußte, wurde für jedes Enzym die Aktivierungsenergie berechnet:

$$\ln (\text{Enzymaktivität}) = - \frac{E_a}{R} \cdot \frac{1}{T} + \ln A$$

E_a = Aktivierungsenergie ($\text{J} \cdot \text{mol}^{-1}$)

R = allgemeine Gaskonstante ($8.3143 \text{ J} \cdot \text{K}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1}$)

T = absolute Temperatur (K)

A = charakteristische Konstante der Reaktion

Somit ergibt die Auftragung des natürlichen Logarithmus der Enzymaktivität gegen T^{-1} eine Gerade mit der Steigung $-E_a \cdot R^{-1}$ und dem Ordinatenabschnitt $\ln A$.

Zur Bestimmung der Aktivierungsenergie E_a wurde die Steigung der Geraden mittels linearer Regression berechnet und anschließend mit $-R$ multipliziert. Für diese Berechnung wurden die temperaturabhängigen Enzymaktivitäten im Bereich von 0 °C bis zum Maximum der Aktivität verwendet.

Bestimmung der kinetischen Konstanten

Zur Berechnung von K_M^{app} und V_{max} wurde das Verfahren von Wilkinson (1961) angewendet. Der große Vorteil dieser Methode besteht darin, daß die Aktivitätsmessungen entsprechend ihrer individuellen Streuung gewichtet werden. Somit können Abweichungen

einzelner Messungen, die beispielsweise bei niedrigen Substratkonzentrationen naturgemäß mit größeren Fehlern behaftet sind, das Endergebnis nicht so stark beeinflussen wie beim Lineweaver-Burk Verfahren (1934). Die Berechnung der linearen Regression und die Fehlerabschätzung der Wertepaare erfolgte mit einem Computerprogramm (Wilman 4). Sogenannte "Outlier", d.h. Meßwerte, deren Differenz zum kalkulierten Wert mindestens 2σ betrug, ermittelte das Programm selbstständig nach der Methode von Mannervik (1982). Diese Werte wurden dann bei der Bestimmung der kinetischen Parameter ignoriert.

Die Substrathemmung der NAGase wurde quantifiziert, indem die K_i -Werte graphisch mit dem Verfahren nach Dixon (1953) bestimmt wurden. Dagegen wurden die K_i -Werte der CS (kompetitive Hemmung durch ATP) rechnerisch ermittelt. Dazu stand das Programm "Leonora" (A. Cornish-Bowden, Marseille/Frankreich) zur Verfügung, welches mit Hilfe aller Einzelmessungen eine Funktion der folgenden Form berechnete:

$$v = \frac{V_{\max} \cdot [S]}{K_M \cdot \left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right) + [S]}$$

v = Enzymaktivität
 $[S]$ = Substratkonzentration
 $[I]$ = InhibitorKonzentration

Die Iteration der Werte für V_{\max} , K_M und K_i wurde solange fortgesetzt, bis die Summe der Abweichungsquadrate ($\Sigma (\text{Meßwert} - \text{kalkulierter Wert})^2$) ein Minimum erreichte (Wilkinson 1961).

Signifikante Unterschiede der einzelnen Werte wurden mit dem t-Test ermittelt (Sachs 1984).

pH-Messung der Haemolymphe

Der pH-Wert der Haemolymphe von *E. superba* und *M. norvegica* wurde mit einem pH-Meter E 632 (Metrohm, Herisau/Schweiz) gemessen. Da mit geringen Volumina von 30 μl bis 50 μl gearbeitet werden mußte, wurde für die Messung eine Mini-Elektrode U 402 M3 (Ingold, Steinbach/Taunus) verwendet, die bereits in einem Volumen von 20 μl den pH-Wert zuverlässig bestimmen konnte. Die Elektrode wurde bei den

jeweiligen Hälterungstemperaturen mit pH-Standard-Lösungen (Ingold, Steinbach/Taunus) äquilibriert.

Nach 11-tägiger Hälterung (s.o.) wurde den bei -1°C , $+4^{\circ}\text{C}$ und $+6^{\circ}\text{C}$ (*E. superba*), bzw. 0°C , $+4^{\circ}\text{C}$, $+8^{\circ}\text{C}$ und $+16^{\circ}\text{C}$ (*M. norvegica*) eingesetzten Tieren Haemolymphe entnommen, indem das Herz mit einer Hamilton-Spritze (Bonaduz/Schweiz) punktiert wurde. Die Haemolymphe wurde in Eppendorf-Gefäße, Typ 3810 (Eppendorf, Hamburg) überführt und entsprechend der Hälterungstemperatur vortemperiert. Im Anschluß daran konnte der pH-Wert bei der entsprechenden Temperatur bestimmt werden.

ERGEBNISSE**N-Acetyl- β -D-Glucosaminidase****Chromatographie**

Zunächst wurde die NAGase von *Euphausia superba* mittels Flüssigkeits-Chromatographie (LC) gereinigt. Das Enzym eluierte in drei deutlich voneinander abgesetzten Bereichen (Peaks) von der Anionentauscher-Säule Q-Sepharose® FF (Abb. 1).

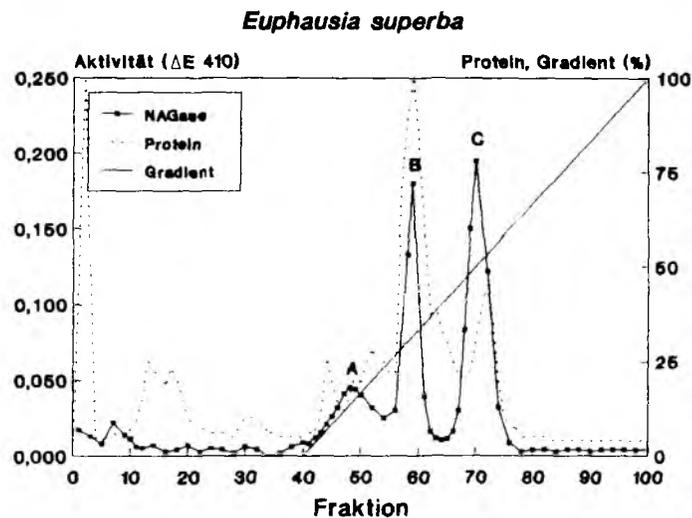


Abb. 1: Elutionsprofil des NAGase-Extraktes von *Euphausia superba* nach der Flüssigkeits-Chromatographie (LC) mit Q-Sepharose® FF

—■— = NAGase-Aktivität (linke Ordinate); = Proteinprofil (E_{280} , rechte Ordinate);
 ——— = Salzgradient 0 - 1 M NaCl (rechte Ordinate). Die NAGase-Aktivität eluierte in drei getrennten Maxima (A, B und C).

Die aktivitätshaltigen Fraktionen wurden zu drei Pools A, B und C vereinigt. Der Reinigungseffekt der Säule wird beim Vergleich der Elutionsprofile für NAGase-Aktivität und Proteinkonzentration deutlich. In den Fraktionen 0 bis 40 trat keine nennenswerte NAGase-Aktivität auf. Hier erkennt man jedoch ausgeprägte Proteingipfel (Peaks), die deutlich von den NAGase-Pools getrennt wurden. Ähnliche Ergebnisse lieferte auch die FPLC mit Q-Sepharose® HP (HiLoad™).

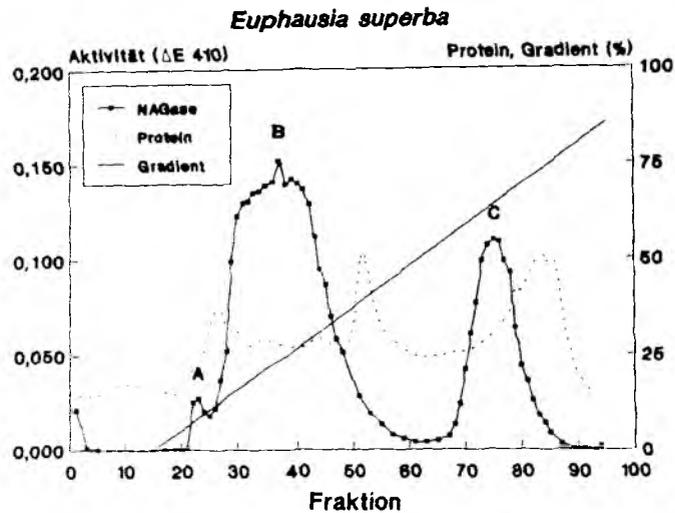


Abb. 2: Elutionsprofil des NAGase-Extraktes von *Euphausia superba* nach der FPLC® mit Q-Sepharose® HP

—■— = NAGase-Aktivität (linke Ordinate); = Proteinprofil (E_{280} , rechte Ordinate); — = Salzgradient 0 - 0.85 M NaCl (rechte Ordinate). Die NAGase-Aktivität eluierte in drei getrennten Maxima (A, B und C).

Abweichend von der Trennung mit der LC eluierte Pool B in einem breiteren Peak (Abb. 2). Unabhängig vom verwendeten Verfahren, LC oder FPLC, konnten die Pools reproduzierbar aufgetrennt werden. Allerdings war Pool A häufig nur in geringer Menge vertreten. Auch die kinetischen Parameter, sowie pH und Temperatureigenschaften der LC-Pools stimmten mit denen der FPLC überein. Aufgrund der Vorteile der FPLC gegenüber der LC-Anlage, wie z.B. kürzere Laufzeiten, bessere Reproduzierbarkeit etc., wurde daher für die Reinigung der NAGase aus weiteren Crustaceen-Arten routinemäßig nur noch die FPLC verwendet.

Die Anionentauscher-Chromatographie lieferte bei *E. superba* vergleichbare Elutionsprofile der NAGase, sowohl bei Extrakten aus ganzen Tieren als auch bei Kutikula-, Magen- und Hepatopankreas-Präparaten. Lediglich die Höhe der Gipfel differierte geringfügig. Demnach kommen die Pools gemeinsam in den untersuchten Organen vor.

In Extrakten aus nordischem Krill konnten jeweils zwei NAGase-Pools nachgewiesen werden: Pool II und III in *Meganyctiphanes norvegica* (katt.), Pool 2 und 3 in

Spezies	Pool	Aktivität maximal bei (Fraktion)	Bereich von - bis (Fraktionen)	entspricht mM NaCl	Molekulargewicht (kDa)
<i>Euphausia superba</i>	A n=4	24 ± 1	22 - 26	120 ± 10	120 ± 10
	B n=12	43 ± 3	31 - 51	310 ± 20	243 ± 17 164 ± 12 120 ± 10 70 ± 7
	C n=12	76 ± 2	71 - 83	680 ± 40	150 ± 12
<i>Meganyctiphanes norvegica</i> (katt.)	II n=2	42	34 - 49	300	131 ± 11
	III n=2	82	74 - 84	720	152 ± 12
<i>Meganyctiphanes norvegica</i> (med.)	2 n=3	41	40 - 50	290	141 ± 11
	3 n=3	80	75 - 85	700	131 ± 11
<i>Serolis polita</i>	X n=3	28	26 - 32	100	152 ± 12
	Y n=3	45	41 - 55	350	111 ± 10
<i>Ocypode ryderi</i>	Z n=3	55	50 - 70	450	140 ± 11

Tabelle 1: Elutionsparameter der NAGase unterschiedlicher Spezies

Alle Daten, mit Ausnahme der Molekulargewichte, wurden mit Hilfe der Anionentauscher-Chromatographie (FPLC®, HiLoad™ Q-Sepharose® HP) ermittelt (n: Anzahl der analysierten Extrakte). Die Molekulargewichtsbestimmung erfolgte mit einer FPLC®-Gelfiltration, HiLoad™ Superdex™200.

M. norvegica (med.). Die chromatographischen Eigenschaften dieser Pools zeigten große Übereinstimmungen mit den entsprechenden Pools B und C aus *E. superba* (Tab. 1).

Auch die NAGase von *Serolis polita* eluierte in zwei deutlich abgesetzten Gipfeln, X und Y. Diese traten ebenfalls bei geringen Salzkonzentrationen auf, so daß ihre Elutionscharakteristika mit denen der Pools A und B aus *E. superba* vergleichbar sind (Tab. 1).

Bei *Ocypode ryderi* eluierte die gesamte NAGase-Aktivität in einem einzigen Gipfel (Z), der sich, verglichen mit Elutionsprofilen aus *E. superba*, zwischen Pool B und C befand. Dieser Pool ist aufgrund seines Elutionsverhaltens mit keinem anderen NAGase-Pool der übrigen Spezies vergleichbar.

Die Molekulargewichte der einzelnen NAGase-Pools wurden mit Hilfe der Gelfiltration chromatographisch bestimmt. Mit Ausnahme von Pool B (*E. superba*) zeigten die Elutionsprofile der NAGase-Aktivität jeweils nur einen Gipfel. Die aus den Elutionsvolumina berechneten Molekulargewichte liegen alle im Bereich zwischen 110 kDa und 160 kDa (rechte Spalte, Tab. 1). Pool B eluierte in vier voneinander getrennten Gipfeln, deren Molekulargewichte als Vielfache von 60 kDa angesehen werden können (70, 120, 164 und 243 kDa).

Temperaturabhängigkeit

Die graphische Darstellung der NAGase-Aktivität in Abhängigkeit von der Inkubationstemperatur liefert für alle untersuchten Isoenzyme und Vollhomogenate ein ähnliches Bild: Die Aktivität steigt von 0 °C bis zum Maximum exponentiell an und fällt dann steil ab (Abb. 3 und 4). Die Aktivitätsabnahme bei höheren Temperaturen ist auf thermische Instabilität zurückzuführen (Abb. 3). Dies gilt nicht nur für *E. superba*, sondern auch für alle anderen untersuchten Crustaceen. Mit Werten zwischen 30 °C und 53 °C liegen die Aktivitäts-Maxima stets deutlich über den ambienten Temperaturen (Tab. 2). Sofern vorhanden, besitzen die Isoenzyme einer Art unterschiedliche Maxima, deren Mittelwerte mit den Ergebnissen der Vollhomogenate mehr oder weniger übereinstimmen (Tab. 2).

Die einzelnen Isoenzyme der drei untersuchten Euphausiiden sind direkt miteinander vergleichbar. Während die Maxima der zuerst eluierenden Pools B, II und 2

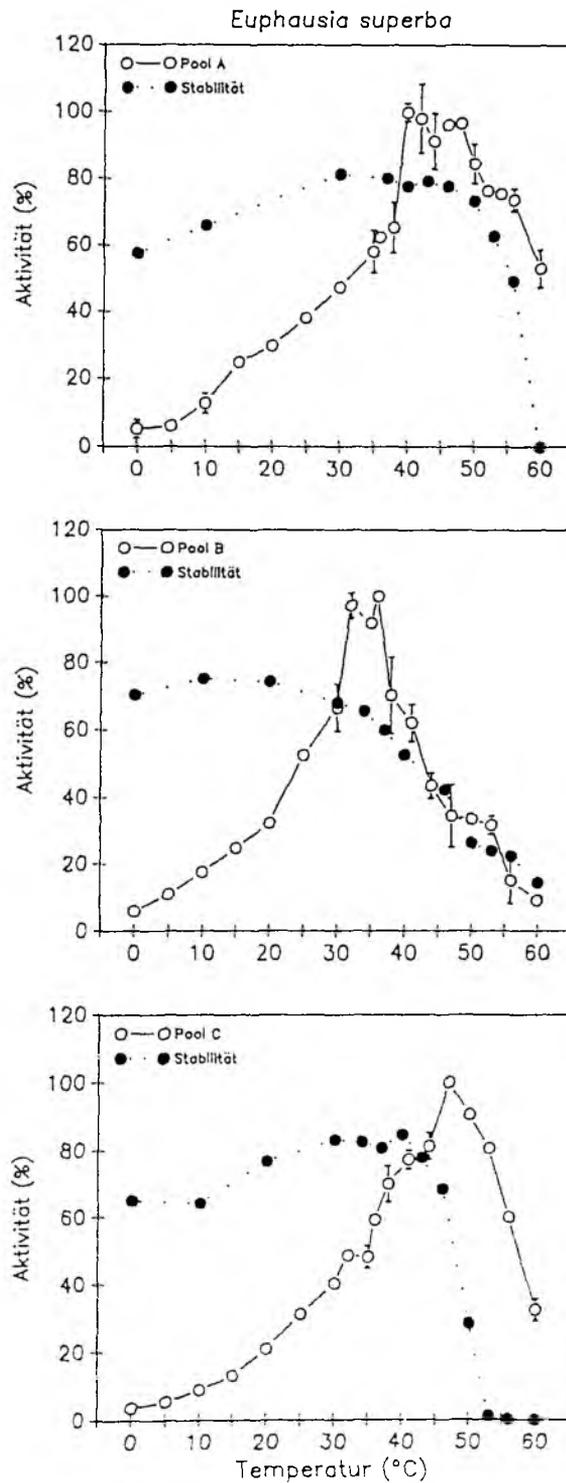


Abb. 3: Einfluß der Temperatur auf die Aktivität (○) und Hitzestabilität (●) der NAGase-Pools A, B und C von *Euphausia superba*. Bei Werten ohne Fehlerbalken ist die Standardabweichung kleiner als das Symbol (n=3).

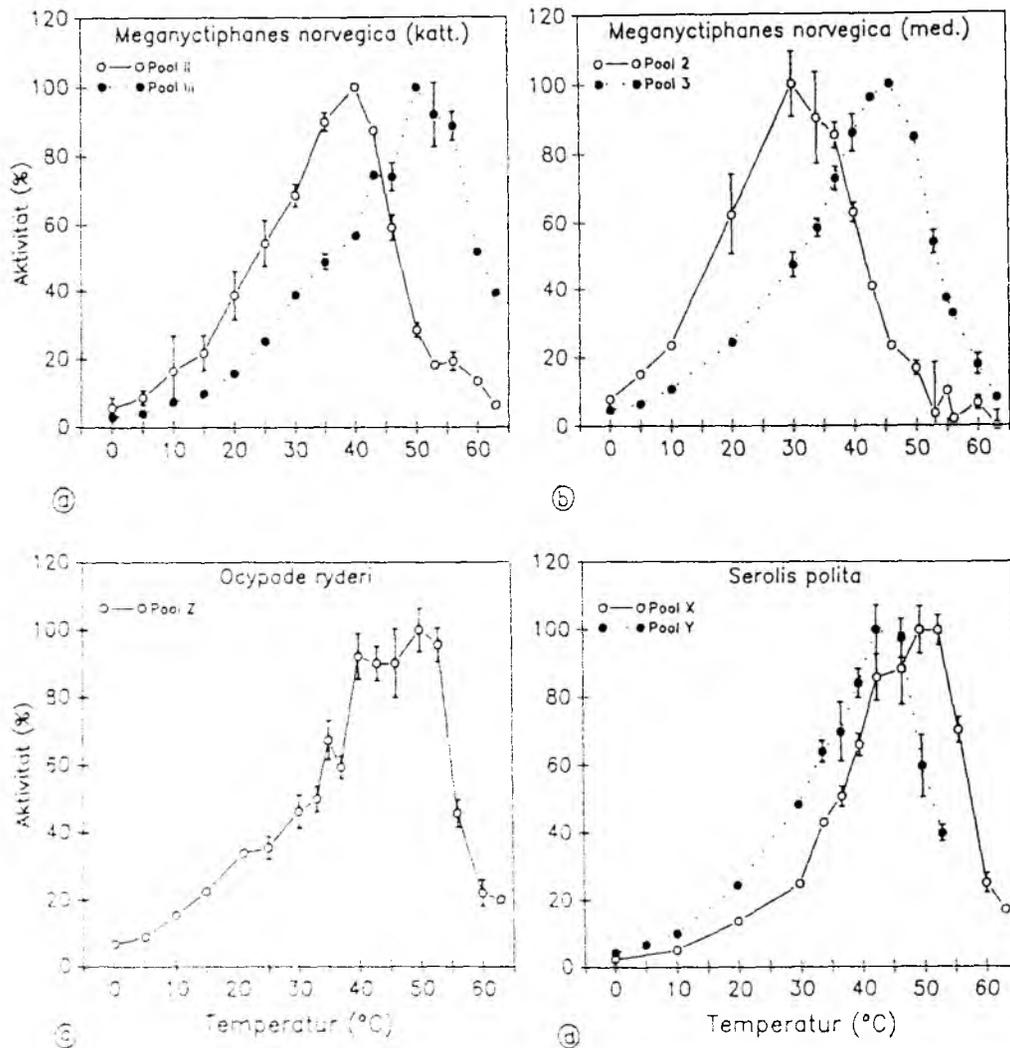


Abb. 4: Einfluß der Temperatur auf die Aktivität der NAGase-Pools aus (a) *Meganyctiphanes norvegica* (katt.), (b) *M. norvegica* (med.), (c) *Ocypode ryderi* und (d) *Serolis polita*. Bei Werten ohne Fehlerbalken ist die Standardabweichung kleiner als das Symbol ($n=3$).

zwischen 30°C und 40°C liegen, sind die der späteren Pools C, III und 3 um mindestens 10°C höher und betragen 46°C bis 53°C . Pool A (*E. superba*) nimmt mit 40°C einen mittleren Wert an.

Davon abweichend zeigt das frühzeitig eluierende Isoenzym X von *S. polita* erst bei 50°C sein Maximum und liegt somit annähernd 10°C über dem von Isoenzym Y. Das Maximum der NAGase von *O. ryderi* (Pool Z) liegt bei 50°C und somit auch bei dem tropischen Vertreter deutlich über der ambienten Temperatur von 25°C bis 40°C (Tab. 2).

Spezies	Pool	ambienter Temperatur- Bereich	Temperatur- Maximum °C	Aktivierungs- Energie E _a kJ/mol	Korrelations- koeffizient r (%)
<i>Euphausia superba</i>	A	ca. 0°C	40	47.0	98.3
	B		36	53.9	99.5
	C		47	51.8	99.6
	Voll		40	38.6	94.1
<i>Meganycti- phanes norvegica (katt.)</i>	II	0 - 15°C	40	51.4	99.3
	III		53	49.7	99.4
	Voll		43	45.5	94.7
<i>Meganycti- phanes norvegica (med.)</i>	2	12 - 13°C	30	59.1	99.1
	3		46	50.5	99.8
	Voll		43	42.7	98.2
<i>Serolis polita</i>	X	ca. 0°C	50	58.0	99.6
	Y		43	52.3	99.8
	Voll		43	56.1	94.1
<i>Ocypode ryderi</i>	Z	25 - 40°C	50	40.7	98.7
	Voll		47	50.7	98.4

Tabelle 2: Temperaturspezifische Parameter der NAGase-Isoenzyme

Der ambiente Temperaturbereich gibt die durchschnittlich zu erwartende Temperatur des natürlichen Lebensraumes an.

Das Temperaturmaximum beschreibt die Temperatur, bei der die höchste NAGase-Aktivität gemessen wurde. Für die Berechnung der Aktivierungsenergie E_a wurden alle Meßwerte zwischen dem Temperaturmaximum und 0°C in einem Arrhenius-Plot aufgetragen und die Steigung der Geraden bestimmt. Die Korrelationskoeffizienten r dieser linearen Regression sind in der rechten Spalte der Tabelle aufgelistet (Angaben in %).

Voll = Vollhomogenat

Aus den Temperaturkurven wurden mit Hilfe der Arrhenius-Gleichung die Aktivierungsenergien (E_a) für alle Vollhomogenate und jedes einzelne Isoenzym berechnet (Tab. 2). Grundlage der Berechnung waren die Werte zwischen 0°C und der Maximalaktivität. Auch dieser Parameter zeigt große Übereinstimmungen bei den Euphausiiden-Arten: Pools B, II und 2 besitzen nur geringfügig niedrigere Aktivierungsenergien als C, III und 3.

Für diese Isoenzyme ergibt sich folgender Zusammenhang: Je niedriger das temperaturabhängige Aktivitätsmaximum ist, desto größer ist die Aktivierungsenergie (Tab. 2). Allerdings treten zum Teil nur geringe Unterschiede bei den E_a -Werten auf, z.B. B = 53.9 kJ/mol; C = 51.8 kJ/mol. Besonders auffällig ist die Tatsache, daß die für die Vollhomogenate errechneten Aktivierungsenergien immer deutlich niedriger liegen als die der einzelnen Isoenzyme. Die Differenz zum Isoenzym mit der jeweils niedrigsten E_a beträgt zwischen 4.2 kJ/mol (*M. norvegica (katt.)*) und 8.4 kJ/mol (*E. superba*).

Der für die Euphausiiden beschriebene Zusammenhang gilt nicht für *S. polita*, denn das Isoenzym X mit dem höheren Temperaturmaximum weist mit 58.0 kJ/mol eine deutlich höhere Aktivierungsenergie als das Isoenzym Y (52.3 kJ/mol) auf. Außerdem beträgt die E_a des Vollhomogenates 56.1 kJ/mol und liegt somit, im Gegensatz zu den Euphausiiden, zwischen den Werten der isolierten Isoenzyme.

Der niedrigste E_a -Wert für ein isoliertes Isoenzym wurde mit 40.7 kJ/mol für das Isoenzym Z von *O. ryderi* berechnet. Er liegt damit deutlich unter dem nächst höheren Wert von *E. superba* (A = 47.0 kJ/mol). Allerdings beträgt die Aktivierungsenergie des Vollhomogenates von *O. ryderi* 50.7 kJ/mol und ist somit höher als die E_a -Werte der Euphausiiden.

pH-Abhängigkeit

Die pH-Abhängigkeit der NAGase-Aktivität wurde bei verschiedenen Temperaturen zwischen 0°C und 35°C ermittelt. Dabei zeigte es sich, daß die Existenz von ausgeprägten pH-Optima auf Temperatureffekte zurückzuführen ist. Bei *E. superba*, *M. norvegica (katt.)* und *M. norvegica (med.)* zeigt keines der Isoenzyme bei 0°C ein ausgeprägtes pH-Optimum (Abb. 5). Dagegen erkennt man bei der höchsten Untersuchungstemperatur von 35°C typische Optimumskurven (Abb. 5). Der Zusammenhang zwischen Temperatur und

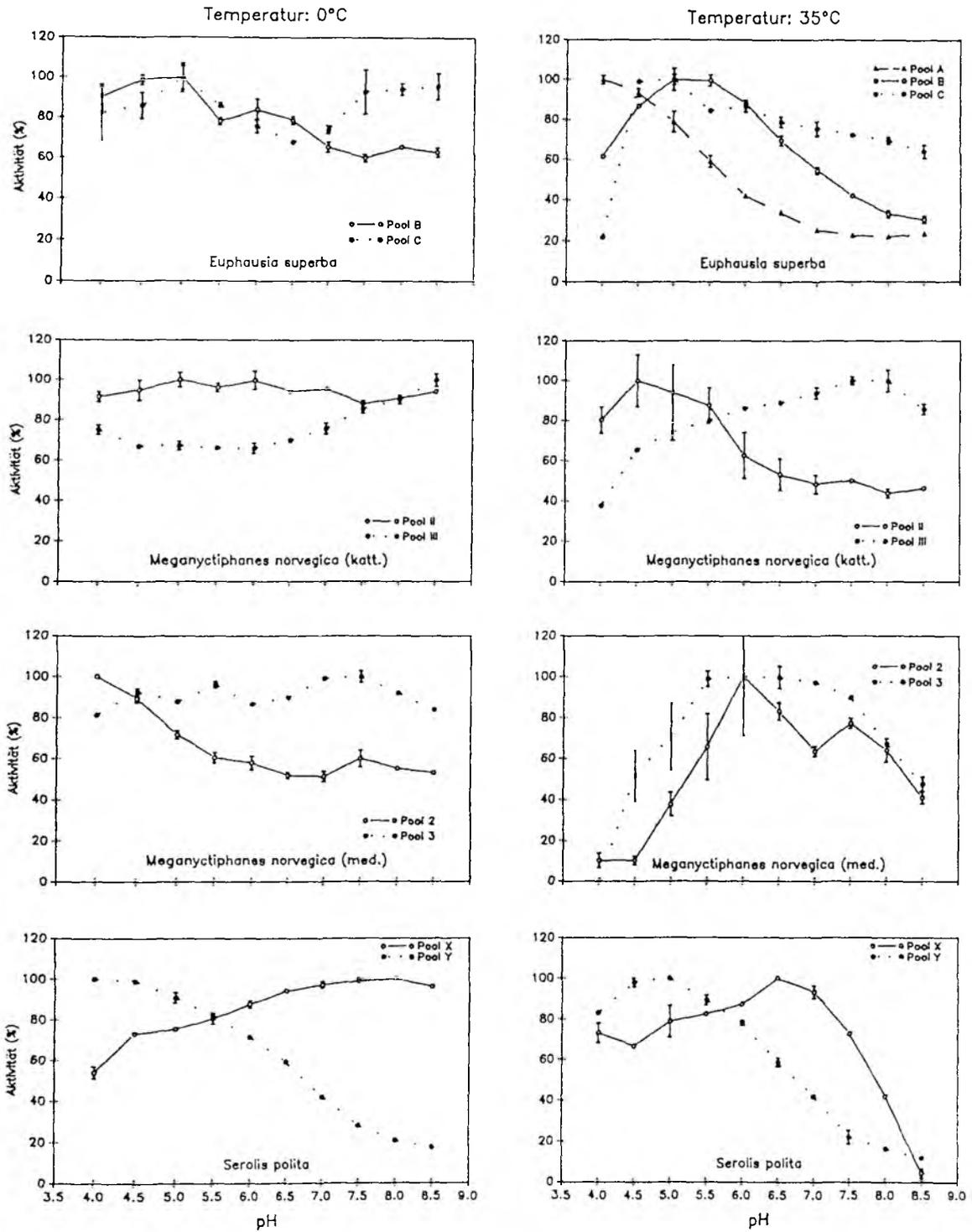


Abb. 5: Einfluß des pH-Wertes auf die Aktivität der NAGase-Pools bei verschiedenen Temperaturen. Von oben: *Euphausia superba*, *Meganyctiphanes norvegica* (katt.), *M. norvegica* (med.) und *Serolis polita*. Die Graphiken auf der linken Seite zeigen die pH-Abhängigkeit bei 0°C, die auf der rechten bei 35°C. Bei Werten ohne Fehlerbalken ist die Standardabweichung kleiner als das Symbol (n=3).

pH-Optimum wird besonders anschaulich, wenn man die Enzymaktivität in Abhängigkeit beider Parameter in einer dreidimensionalen Grafik aufträgt. In Abbildung 6 läßt sich der Verlauf der pH-Optima des Isoenzym C (*E. superba*) bei verschiedenen Temperaturen gut

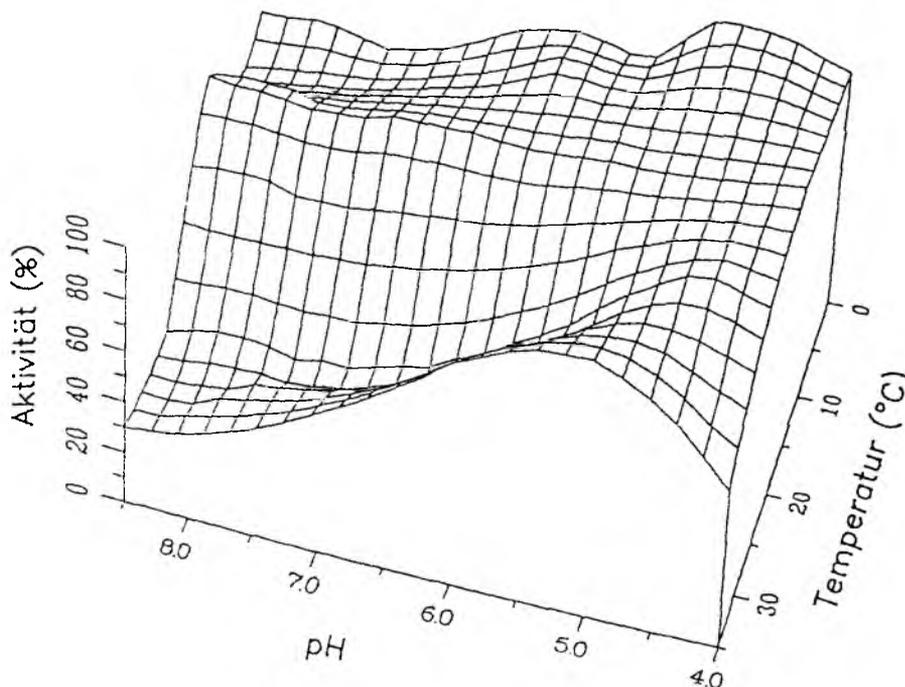


Abb. 6: Dreidimensionale Darstellung der Aktivität des NAGase-Pools C (*Euphausia superba*) in Abhängigkeit von Temperatur und pH-Wert

Die relativen Aktivitäten der NAGase wurden bei unterschiedlichen Temperaturen gegen den pH-Wert aufgetragen.

verfolgen. Im Bereich zwischen 0 °C und 15 °C erkennt man ein Plateau gleichbleibender Aktivität, das mit steigender Temperatur partiell abfällt und somit bei 35 °C zur Bildung eines Optimums bei pH 5.5 führt. Ein solcher Zusammenhang gilt für alle Isoenzyme der Euphausiiden. Allerdings differieren die pH-Werte der einzelnen Optima bei 35 °C von pH 4.0 bis 8.0 (Tab. 3). Auch bei *S. polita* kann man eine derartige Koppelung zwischen Temperatur und pH feststellen: Isoenzym X zeigt die gleichen, bereits beschriebenen

Charakteristika, Y weist dagegen als einziges der untersuchten Isoenzyme schon bei 0 °C ein deutliches pH-Optimum auf, welches sich mit steigender Temperatur geringfügig in den alkalischen Bereich verschiebt (Abb. 5).

Spezies	Pool	pH-Optimum
<i>Euphausia superba</i>	A	4.0
	B	5.0 - 5.5
	C	4.5 - 5.0
<i>Meganyctiphanes norvegica</i> (katt.)	II	4.5
	III	7.5 - 8.0
<i>Meganyctiphanes norvegica</i> (med.)	2	6.0
	3	6.0
<i>Serolis polita</i>	X	6.5
	Y	5.0

Tabelle 3: pH-Optima der NAGase-Isoenzyme bei 35 °C
Typische Optimumskurven zeigten sich erst über 15 °C. Bei weiterer Erwärmung bis 35 °C blieb die Lage der Optima unverändert, allerdings waren sie bei höheren Temperaturen stärker ausgeprägt als bei niedrigeren. Daher sind in der Tabelle nur die pH-Optima für 35 °C aufgeführt.

Kinetische Eigenschaften

Substrathemmung

Mit allen Isoenzymen wurden kinetische Messungen bei Temperaturen zwischen 0 °C und 35 °C durchgeführt. Dabei zeigten sich unterschiedliche Charakteristika. Im Falle von *E. superba* folgt Pool A stets der Michaelis-Menten Kinetik (Michaelis und Menten 1913), während B und C einer auffälligen Substrathemmung unterliegen (Abb. 7). Die

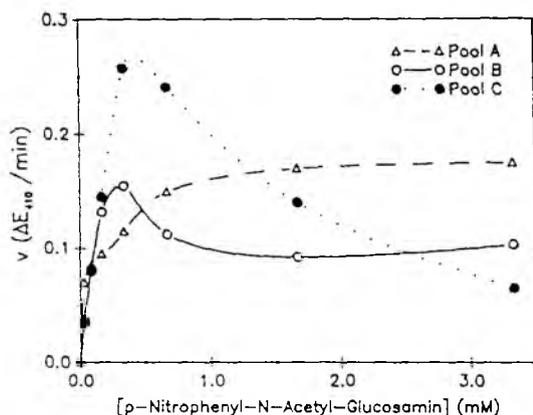


Abb. 7: Darstellung der NAGase-Aktivität als Funktion der Substratkonzentration

Die Auftragung der Enzymaktivität gegen die Substratkonzentration [pNp-NAG] zeigt das kinetische Verhalten der Pools von *Euphausia superba*: A folgt der Michaelis-Menten Kinetik, B und C weisen bei höheren pNp-NAG-Konzentrationen eine Substrathemmung auf.

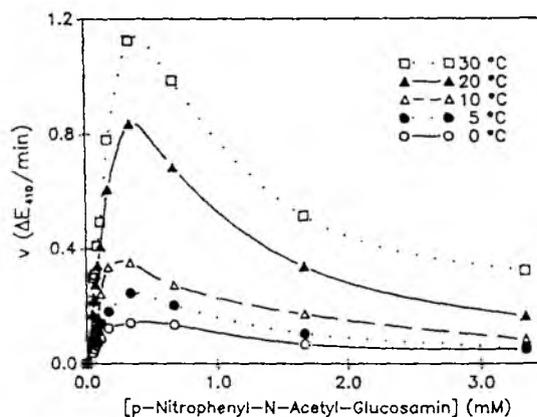


Abb. 8: Kinetik der NAGase C von *Euphausia superba* bei verschiedenen Temperaturen

Die Hemmung der Enzymaktivität (v) durch hohe Substratkonzentrationen ([pNp-NAG]) trat bei allen Untersuchungstemperaturen auf.

Isoenzyme der übrigen Euphausiiden und auch die von *S. polita* werden durch hohe Substrat-Konzentrationen in gleicher Weise inhibiert: Die zuerst eluierenden Isoenzyme B, II, 2 und X werden nicht so stark gehemmt wie C, III, 3 und Y. Im Gegensatz zu den pH-Effekten stellt die Substrathemmung keinen Artefakt höherer Temperaturen dar: Bei allen untersuchten Temperaturen trat Inhibition auf, wie es am Beispiel von Pool C (*E. superba*) in Abb. 8 dargestellt wird. Mit Ausnahme der Pools B (*E. superba*), X und Y (*S. polita*) variierten die Inhibitorkonstanten (K_i -Werte) aller Isoenzyme in Abhängigkeit von der Temperatur (Tab. 4). Die Werte lagen im Bereich der pNp-NAG-Konzentrationen von 0.1 mM (*S. polita* X, sowie *M. norvegica (med.)* 2 und 3) bis über 6 mM (*S. polita* Y und *E. superba* B).

Auffällig sind die beiden Isoenzyme X und Y von *S. polita*, da sie über den gesamten Temperaturbereich mit mehr als 6 mM (Y) den höchsten und mit 0.1 mM (X)

den niedrigsten K_i -Wert aller untersuchten Isoenzyme aufweisen. Der K_i -Wert für *O. ryderi* (Z) liegt mit ca. 2 - 3 mM in einem mittleren Bereich.

Spezies	Pool	Temperatur					Bereich von - bis
		0°C	5°C	10°C	20°C	30°C	
<i>Euphausia superba</i>	B	> 6	> 6	> 6	> 6	> 6	> 6
	C	2.7±0.2	1.4±0.2	1.8±0.2	1.5±0.1	1.4±0.1	1 - 3
<i>Meganycti- phanes norvegica (katt.)</i>	II	1.4±0.3	> 6	5.6±0.2	1.9±0.2	5.7±0.4	1 - 6
	III	0.3±0.1	0.9±0.1	0.5±0.1	0.7±0.1	0.2±0.1	0.2 - 1
<i>Meganycti- phanes norvegica (med.)</i>	2	0.7±0.1	0.9±0.2	1.2±0.2	0.9±0.1	0.1±0.1	0.1 - 1.2
	3	0.6±0.2	0.3±0.1	0.1±0.1	0.2±0.1	0.3±0.1	0.1 - 0.6
		0°C	15°C	35°C			
<i>Serolis polita</i>	X	0.1±0.1	0.1±0.1	0.2±0.1	0.1 - 0.2		
	Y	> 6	> 6	> 6	> 6		
<i>Ocypode ryderi</i>	Z	2.7±0.2	2.5±0.2	1.9±0.2	2 - 3		

Tabelle 4: Inhibitorkonstanten (K_i) der Substrathemmung bei NAGase-Isoenzymen in Abhängigkeit von unterschiedlichen Inkubationstemperaturen
Die K_i -Werte wurden aus den Ergebnissen der Aktivitätsmessungen mit Substratkonzentrationen über 0.5 mmol·l⁻¹ nach Dixon (1953) berechnet. Alle K_i -Werte in mmol·l⁻¹.

In Abhängigkeit vom Lebensraum zeigt sich bei den Euphausiiden folgender Zusammenhang: das polare Tier *E. superba* besitzt die höchsten K_i -Werte, also die geringste Hemmung, während die niedrigsten K_i -Werte bei dem Vertreter aus dem Mittelmeer, *M. norvegica (med.)*, vorkommen.

Substrataffinität

Weiterhin wurden anhand der Aktivitätsmessungen bei niedrigen Substratkonzentrationen (0.05 mM bis 0.33 mM) die apparenten Michaelis-Konstanten (K_M^{app} -Werte) berechnet. Dabei zeigten sich sowohl inter- als auch intraspezifische Unterschiede der K_M^{app} -Werte in Abhängigkeit von der Inkubationstemperatur (Abb. 9 und 10). Bei *E. superba* steigen die K_M^{app} -Werte beider Isoenzyme mit zunehmender Temperatur. Das Minimum liegt jeweils bei der ambienten Temperatur von 0°C (Abb. 9). Allerdings ist der Wert für Pool C bei 0°C mehr als doppelt so groß, wie der von B. Erst bei höheren Temperaturen steigt der K_M^{app} -Wert von C über den von B.

Die Kurven der Isoenzyme von *S. polita* verlaufen fast deckungsgleich. Sie weisen beide ein Minimum bei ca. 5°C auf, das nur geringfügig unter dem K_M^{app} -Wert der ambienten Temperatur von 0°C liegt.

Die NAGase von *O. ryderi* (Z) zeigt bei Erhöhung der Temperatur von 0°C bis 30°C einen linearen Anstieg des K_M^{app} , der dann zwischen 30°C und 35°C erheblich steiler wird. Der maximale Wert des K_M^{app} liegt bei 35°C und somit im ambienten Temperaturbereich (25°C - 40°C) dieser tropischen Krabbe.

Von *M. norvegica (katt.)* standen Sommer- und Wintertiere zur Verfügung, die getrennt untersucht wurden. In beiden Fällen liegen die K_M^{app} -Werte von Pool III zwischen 0°C und 20°C über denen von Pool II (Abb. 10). Erst bei 30°C steigen die Werte für Pool II über die von Pool III. Neben dieser Gemeinsamkeit fallen aber auch Unterschiede bezüglich der Enzym-Substrat-Affinität auf. Die K_M^{app} -Werte der Sommertiere (0.13 mM bis 0.62 mM) sind stets deutlich höher als die der Wintertiere (0.08 mM bis 0.35 mM). Zudem ist die U-Form der Kurven bei den Sommertieren stärker ausgeprägt. Einen solchen U-förmigen Kurvenverlauf findet man auch bei Pool 3 von *M. norvegica (med.)*. Dagegen zeigt Pool 2 eine lineare Zunahme der K_M^{app} -Werte mit steigender Temperatur (bis 20°C). Die Kurven der beiden Pools liegen zwischen 5°C und 20°C nahe beieinander.

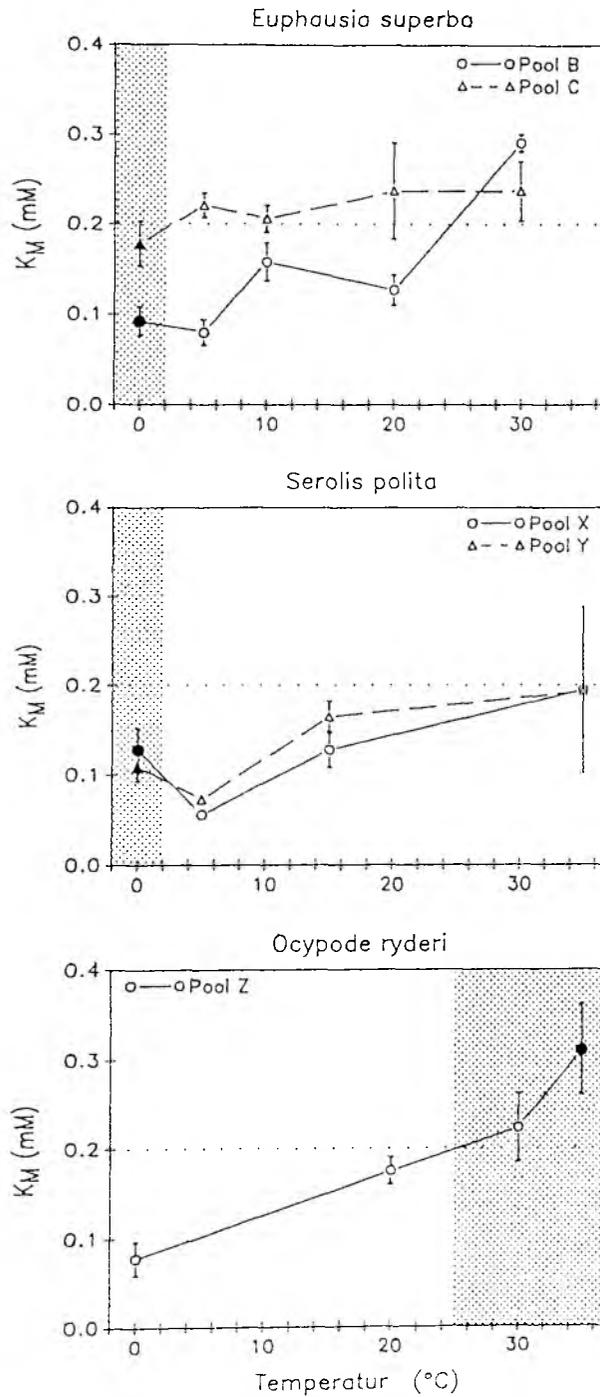


Abb. 9: Temperaturabhängigkeit der K_M^{app} -Werte für die NAGase-Pools

Von oben nach unten: *Euphausia superba*, *Serolis polita* und *Ocypode ryderi*. Die Bereiche der jeweiligen ambienten Temperatur sind schraffiert. Bei Werten ohne Fehlerbalken ist der Vertrauensbereich kleiner als das Symbol. Die maximalen und minimalen Werte sind signifikant voneinander verschieden (t-Test, $p \leq 0.5$).

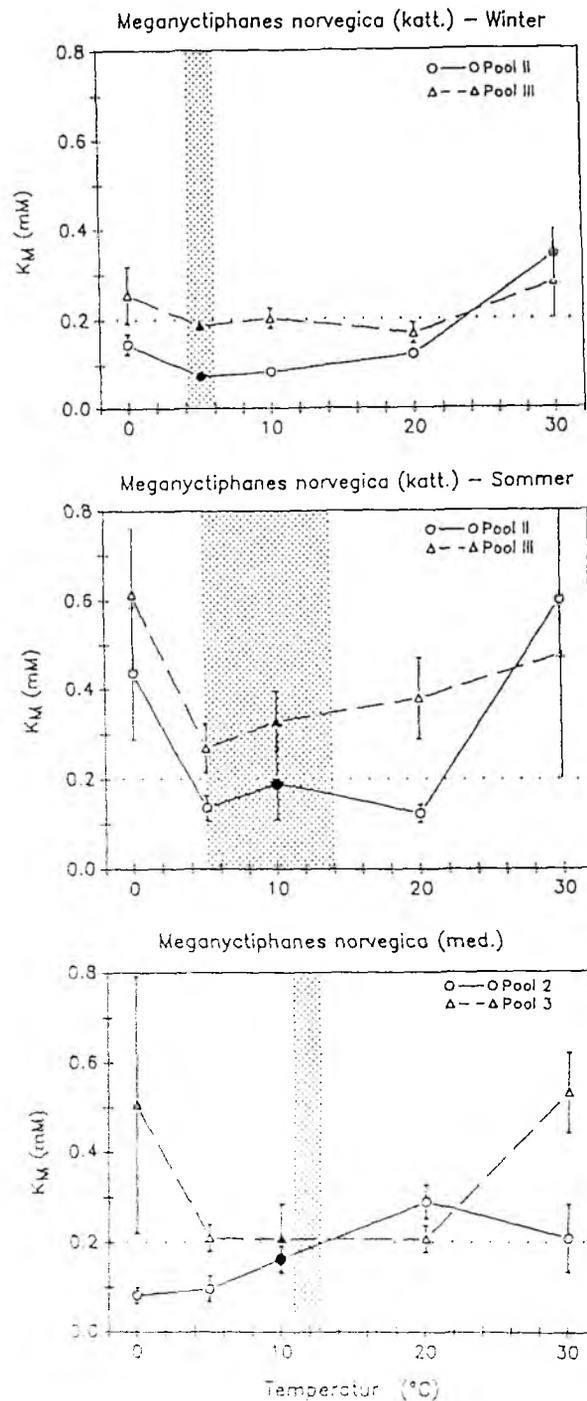


Abb. 10: Temperaturabhängigkeit der K_M^{app} -Werte für die NAGase-Pools

Oben: Wintertiere *Meganyctiphanes norvegica* (katt.), mitte: Sommertiere *M. norvegica* (katt.), unten: *M. norvegica* (med.). Die Bereiche der jeweiligen ambienten Temperatur sind schraffiert. Bei Werten ohne Fehlerbalken ist der Vertrauensbereich kleiner als das Symbol. Die maximalen und minimalen Werte sind signifikant voneinander verschieden (t-Test, $p \leq 0.5$).

Ein intraspezifischer Vergleich der Ergebnisse zeigt deutliche Unterschiede in Form und Höhe der temperaturabhängigen K_M^{app} -Kurven bei den einzelnen Spezies, obwohl die Werte selbst nur zwischen 0.05 mM und 0.65 mM variieren. Die statistische Auswertung der K_M^{app} -Werte ergab bei jedem Pool signifikante Unterschiede zwischen den jeweils höchsten Werten und dem Minimum (t-Test, $p \leq 0.5$).

Citrat-Synthase

Chromatographie

Die Citrat-Synthase (CS) wurde ausschließlich mit dem FPLC-System gereinigt. Bei Verwendung der Anionenaustauscher-Säule Q-Sepharose® HP (HiLoad™) eluierte die CS aller Versuchstiere in jeweils einem einzigen Gipfel von maximal 5 Fraktionen (Ausnahme *I. baltica*: 11 Fraktionen). Am Beispiel von *E. superba* ist das Laufprofil einer typischen

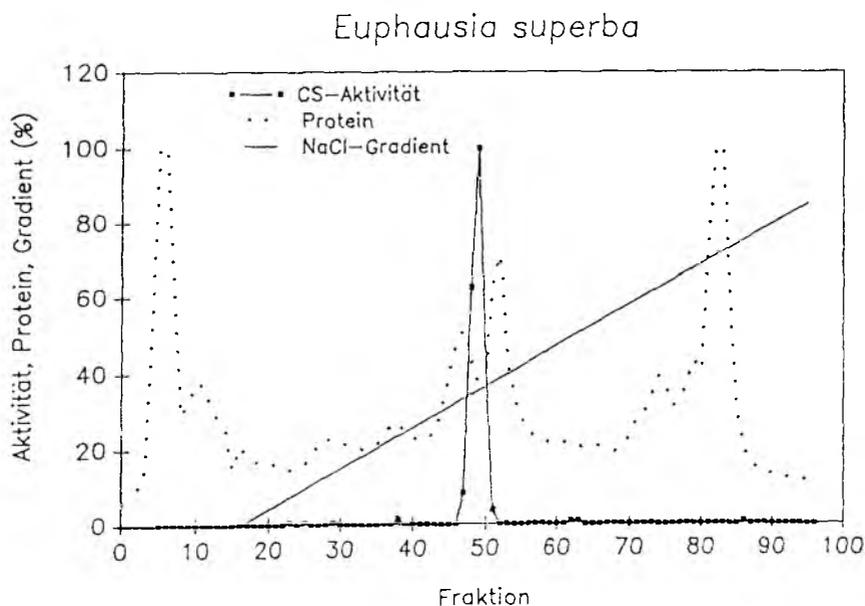


Abb. 11: Elutionsprofil des CS-Extraktes von *Euphausia superba* nach der FPLC® mit Q-Sepharose® HP

—■— = relative CS-Aktivität; = Proteinprofil (E_{280}); — = Salzgradient 0 - 0.85 M NaCl. Die CS eluierte in einem einzigen Aktivitätsmaximum.

CS-Reinigung dargestellt (Abb. 11). Die artspezifischen Elutionsparameter sind detailliert in Tabelle 5 aufgeführt. Die CS der Euphausiiden-Arten weisen nahezu identische Elutionseigenschaften auf. Die Maximalaktivität befindet sich stets in Fraktion 48 oder 49, die gesamte Aktivität eluiert von Fraktion 47 bis 51. Die CS von *I. baltica* zeigt ein Maximum bereits bei Fraktion 38. Dieses Enzym eluiert in einem sehr breiten Peak (Fraktion 37 bis 48). *S. polita* besitzt wiederum einen sehr schmalen Peak (Fraktion 37 bis 41), der die höchste Aktivität ebenfalls bei Fraktion 38 aufweist (Tab. 5).

Die Molekulargewichte der CS wurden ebenfalls mit Hilfe der Gelfiltration chromatographisch bestimmt. Für jedes Enzym konnte jeweils ein einzelner Aktivitätsgipfel nachgewiesen werden. Die aus den Elutionszeiten berechneten Molekulargewichte liegen im Bereich zwischen 50 und 63 kDa (rechte Spalte, Tab. 5)

Spezies	Aktivität maximal bei (Fraktion)	Bereich von - bis (Fraktionen)	entspricht mM NaCl	Molekulargewicht (kDa)
<i>Euphausia superba</i>	49	47 - 50	380	63 ± 5
<i>Meganyctiphanes norvegica</i> (katt.)	49	47 - 51	380	60 ± 4
<i>Meganyctiphanes norvegica</i> (med.)	48	47 - 51	360	56 ± 4
<i>Serolis polita</i>	38	37 - 41	220	50 ± 4
<i>Idotea baltica</i>	38	37 - 48	220	48 ± 4

Tabelle 5: Elutionsparameter der Citrat-Synthase unterschiedlicher Spezies
 Alle Daten, mit Ausnahme der Molekulargewichte, wurden mit Hilfe der Anionentauscher-Chromatographie (FPLC®, HiLoad™ Q-Sepharose® HP) ermittelt. Die Molekulargewichtsbestimmung erfolgte mit einer Gelfiltration (FPLC®, HiLoad™ Superdex™200).

Temperaturabhängigkeit

Zunächst wurde die CS-Aktivität in Abhängigkeit von der Temperatur untersucht. Die Optimumskurven zeigen für alle Enzyme einen nahezu identischen Verlauf (Abb. 12): Mit steigender Temperatur erfolgt eine annähernd exponentielle Zunahme der CS-Aktivität, bis ein Maximum bei ca. 40°C erreicht ist. Bei weiterer Temperaturerhöhung um ca. 15°C sinkt die Aktivität rapide auf Werte unter 10% der Maximalaktivität (Abb. 12).

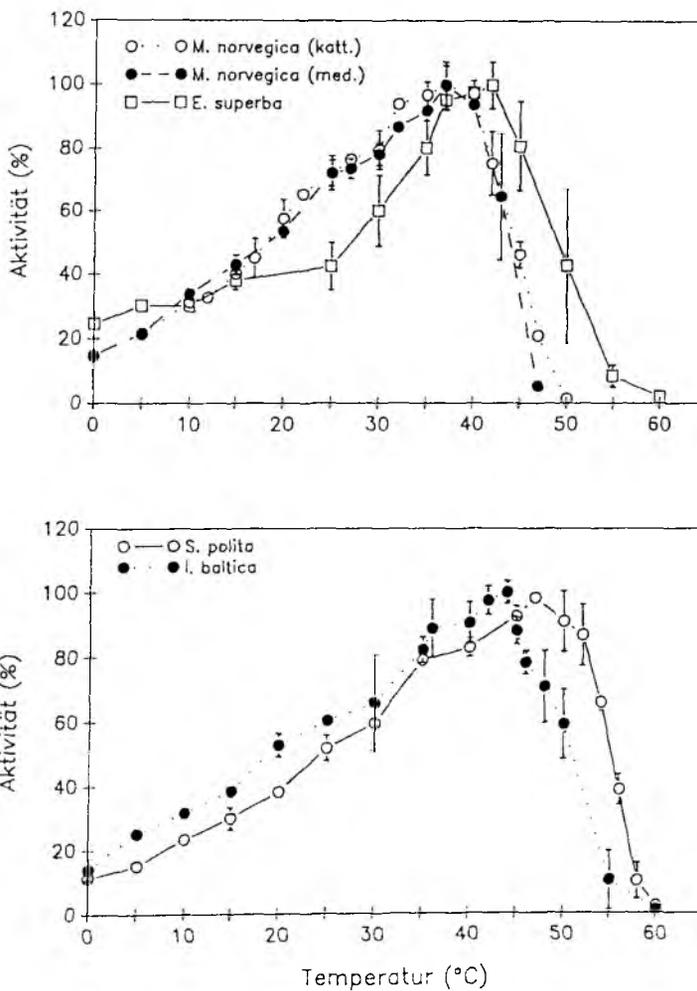


Abb. 12: Einfluß der Temperatur auf die CS-Aktivität

Oben: *Meganyctiphanes norvegica* (katt.), *M. norvegica* (med.) und *Euphausia superba*; **unten:** *Serolis polita* und *Idotea baltica*. Bei Werten ohne Fehlerbalken ist die Standardabweichung kleiner als das Symbol (n=3).

Diese Aktivitätsabnahme ist eindeutig auf die thermische Instabilität der Proteine zurückzuführen. Nach 30-minütiger Inkubation bei Temperaturen über 30 °C zeigt die CS bereits große Aktivitätsverluste (Abb. 13). Der für *E. superba* und *M. norvegica* (katt.) aufgezeigte Zusammenhang zwischen Hitzestabilität und temperaturabhängiger Aktivität gilt ebenso für alle anderen Spezies.

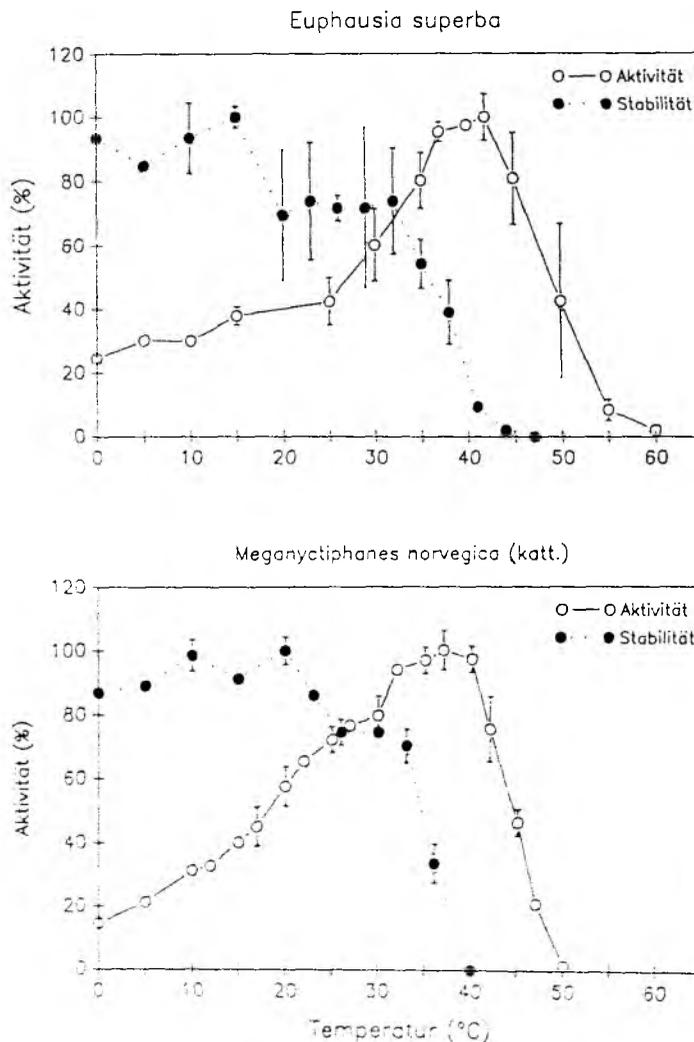


Abb. 13. Einfluß der Temperatur auf die Aktivität (○) und Hitzestabilität (●) der CS von *Euphausia superba* (oben) und *Meganyctiphanes norvegica* (katt.) (unten). Bei Werten ohne Fehlerbalken ist die Standardabweichung kleiner als das Symbol ($n=3$).

Die maximale Aktivität der CS wurde bei allen untersuchten Arten zwischen 37°C und 45°C gemessen. Somit liegen die Maxima nah beieinander und jeweils deutlich über den ambienten Temperaturen (Tab. 6).

Aus den Ergebnissen der Aktivitätsmessungen zwischen 0°C und 25°C wurde mit Hilfe der Arrhenius-Gleichung die Aktivierungsenergie (E_a) für jedes Enzym berechnet (Tab. 6). Die Aktivierungsenergien der untersuchten Crustaceen-Enzyme lagen zwischen 41 kJ·mol⁻¹ und 46 kJ·mol⁻¹. Die Ausnahme bildet *E. superba* mit 10.9 kJ·mol⁻¹. Somit ist die E_a sowohl bei den Isopoden als auch bei *Meganyctiphanes* um den Faktor 4 höher als bei *E. superba*.

Spezies	ambienter Temperatur-Bereich	Temperatur-Maximum °C	Aktivierungs-Energie E_a kJ/mol	Korrelationskoeffizient r (%)
<i>Euphausia superba</i>	ca. 0°C	40	10.9	98.2
<i>Meganyctiphanes norvegica</i> (katt.)	0 - 15°C	40	45.1	99.8
<i>Meganyctiphanes norvegica</i> (med.)	12 - 13°C	37	43.3	99.1
<i>Serolis polita</i>	ca. 0°C	45	41.8	99.5
<i>Idotea baltica</i>	0 - 20°C	43	43.7	99.3

Tabelle 6: Temperaturspezifische Parameter der Citrat-Synthase

Der ambiente Temperaturbereich gibt die durchschnittlich zu erwartende Temperatur des natürlichen Lebensraumes an.

Das Temperaturmaximum beschreibt die Temperatur, bei der die höchste CS-Aktivität gemessen wurde. Für die Berechnung der Aktivierungsenergie E_a wurden alle Meßwerte zwischen 0°C und 25°C in einem Arrhenius-Plot aufgetragen und die Steigung der Geraden bestimmt. Die Korrelationskoeffizienten r dieser linearen Regression sind in der rechten Spalte der Tabelle aufgelistet (Angaben in %).

pH-Abhängigkeit

Die CS-Aktivität wurde im Bereich von pH 7.0 bis pH 9.0 bei verschiedenen Temperaturen zwischen 0°C und 35°C ermittelt. Es stellte sich heraus, daß die CS nur geringfügig durch pH-Änderungen beeinflusst wurde. Bei keiner Temperatur existierten ausgeprägte pH-Optima (Abb. 14). Alle untersuchten Crustaceen wiesen unabhängig von der Inkubationstemperatur breite Plateaus mit annähernd konstanter Aktivität auf. Zwischen pH 7.4 und 8.6 sank die Aktivität nie unter 80% des Maximalwertes. Lediglich bei pH 7.0 bzw. 9.0 wurden niedrigere Werte gemessen (Abb. 14). Vor allem bei *I. baltica* ging die Aktivität sogar auf weniger als 10% zurück.

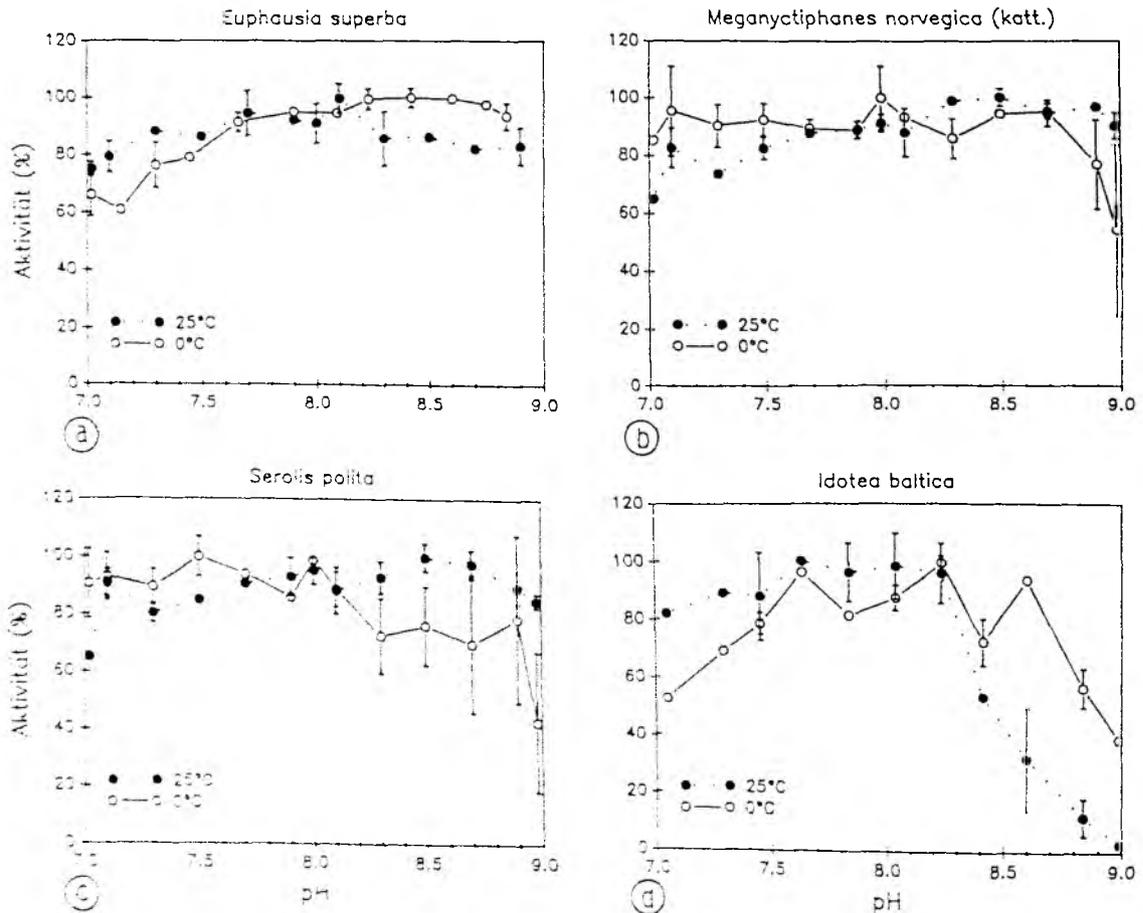


Abb. 14: Einfluß des pH-Wertes auf die CS-Aktivität bei verschiedenen Temperaturen
 Jede einzelne Graphik enthält zwei Kurven, die die pH-Abhängigkeit bei 0°C (○) und bei 25°C (●) zeigen. (a) *Euphausia superba*, (b) *Meganyctiphanes norvegica* (katt.), (c) *Serolis polita* und (d) *Idotea baltica*. Bei Werten ohne Fehlerbalken ist die Standardabweichung kleiner als das Symbol (n=3).

Kinetische Eigenschaften

Substrataffinität

Bei der CS wurden außer den K_M^{app} -Werten für die Substrate Oxalacetat und Acetyl-Coenzym A (Acetyl-CoA) auch die K_i -Werte für den Inhibitor Adenosin-5'-triphosphat (ATP) bestimmt. Die Messungen wurden zwischen 0°C und 35°C durchgeführt, um den Einfluß der Temperatur auf diese kinetischen Parameter zu untersuchen.

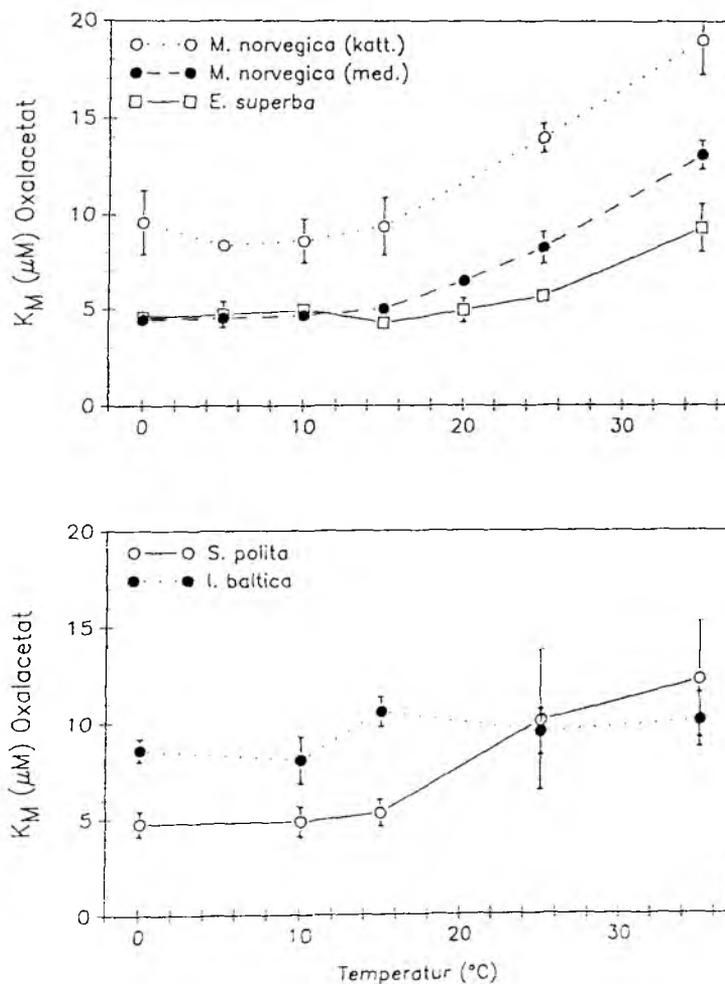


Abb. 15: Apparente K_M -Werte der CS für Oxalacetat in Abhängigkeit von der Inkubationstemperatur

Oben: *Meganyctiphanes norvegica* (katt.), *M. norvegica* (med.) und *Euphausia superba*; **unten:** *Serolis polita* und *Idotea baltica*. Bei Werten ohne Fehlerbalken ist der Vertrauensbereich kleiner als das Symbol.

Zunächst wurden die K_M^{app} -Werte für Oxalacetat bestimmt. Dabei stellte sich heraus, daß die Temperatur die K_M^{app} -Werte aller untersuchten Arten gleichermaßen beeinflusste: Zwischen 0°C und 15°C - 20°C blieb der K_M^{app} überwiegend konstant und stieg erst bei weiterer Temperaturerhöhung an. Alle Kurven in Abbildung 15 zeigen diesen J-förmigen Verlauf. Auch die absoluten K_M^{app} -Werte der einzelnen Tiere sind sehr ähnlich. So liegt das Plateau zwischen 0°C und 20°C stets im Bereich bei ca. $5\ \mu\text{M}$ Oxalacetat (Ausnahme *M. norvegica* (katt.) und *I. baltica*: $10\ \mu\text{M}$ Oxalacetat). Lediglich die Werte bei höheren Temperaturen zeigen größere Schwankungen, liegen aber immer zwischen $8\ \mu\text{M}$ Oxalacetat (*E. superba*) und $20\ \mu\text{M}$ Oxalacetat (*M. norvegica* (katt.)).

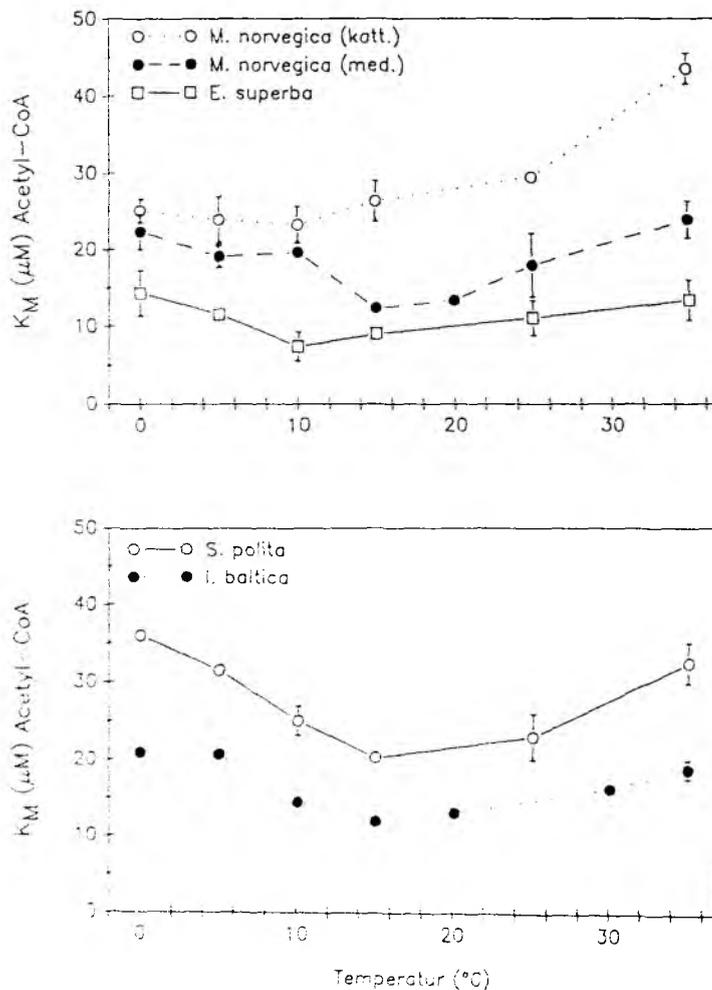


Abb. 16: Apparente K_M -Werte der CS für Acetyl-CoA in Abhängigkeit von der Inkubationstemperatur

Oben: *Meganyctiphanes norvegica* (katt.), *M. norvegica* (med.) und *Euphausia superba*; unten: *Serolis polita* und *Idotea baltica*. Bei Werten ohne Fehlerbalken ist der Vertrauensbereich kleiner als das Symbol.

Weitere Übereinstimmungen fanden sich bei den K_M^{app} -Werten für Acetyl-CoA. Die Enzym-Affinität dieses Substrates wurde bei fast allen Tieren in der gleichen Weise durch die Temperatur beeinflusst. In Abbildung 16 erkennt man außer bei *M. norvegica* (*katt.*) jeweils einen annähernd U-förmigen Verlauf der Kurven mit einem flachen Minimum zwischen 10°C und 20°C. Die Werte dieser Minima schwanken allerdings erheblich zwischen 8 μ M Acetyl-CoA (*E. superba*) und 20 μ M Acetyl-CoA (*S. polita*). Die maximalen K_M^{app} -Werte treten bei allen untersuchten Tieren bis auf *M. norvegica* (*katt.*) sowohl bei 0°C als auch bei der jeweils höchsten Untersuchungstemperatur auf. Die CS von *M. norvegica* (*katt.*) weist für Acetyl-CoA bei 0°C kein Maximum auf. Die Maxima erreichen Werte von 15 μ M Acetyl-CoA (*E. superba*) bis ca. 40 μ M Acetyl-CoA (*M. norvegica* (*katt.*) und *S. polita*). Die CS von *S. polita* zeigt bei fast allen Temperaturen die höchsten, die von *E. superba* stets die niedrigsten K_M^{app} -Werte aller Versuchstiere.

Ein Vergleich der Ergebnisse beider Substrate zeigt bei den Euphausiiden weitgehende Übereinstimmungen. Nicht nur die Kurvenverläufe entsprechen sich, sondern auch die Lage der einzelnen Kurven stehen immer in derselben Beziehung zueinander. So weist *E. superba* die niedrigsten und *M. norvegica* (*katt.*) stets die höchsten K_M^{app} -Werte auf. Die Werte von *M. norvegica* (*med.*) liegen meistens dazwischen (Abb. 16). Bei den Isopoden zeigt sich hierbei ein Unterschied: die geringeren K_M^{app} -Werte für Oxalacetat treten bei *I. baltica* auf, während *S. polita* überwiegend die niedrigeren K_M^{app} -Werte für Acetyl-CoA besitzt.

Zwischen den K_M^{app} -Werten der beiden Substrate besteht ein wesentlicher Unterschied: die K_M^{app} -Werte für Acetyl-CoA liegen stets um den Faktor 2 bis 3 höher als die für Oxalacetat. Die größte Differenz ergibt sich bei 0°C für *S. polita* mit einem 7-mal höheren K_M^{app} -Wert für Acetyl-CoA.

Einfluß von ATP

Da die CS durch ATP gehemmt wird (Stitt 1984), wurde auch dessen Einfluß als Inhibitor näher untersucht. Zur Charakterisierung des Hemmechanismus wurden die berechneten Werte für K_M^{app} und V_{max} in einem Lineweaver-Burk Diagramm aufgetragen und der Verlauf der Geraden bei verschiedenen ATP-Konzentrationen verglichen. Bei einer

kompetitiven Hemmung bleibt V_{\max} konstant und die Geraden rotieren mit steigender Inhibitor-konzentration gegen den Uhrzeigersinn um den Punkt $1/V_{\max}$ (Abb. 17a), bei einer unkompetitiven Hemmung erfolgt eine Parallelverschiebung der Geraden nach links (Abb. 17b).

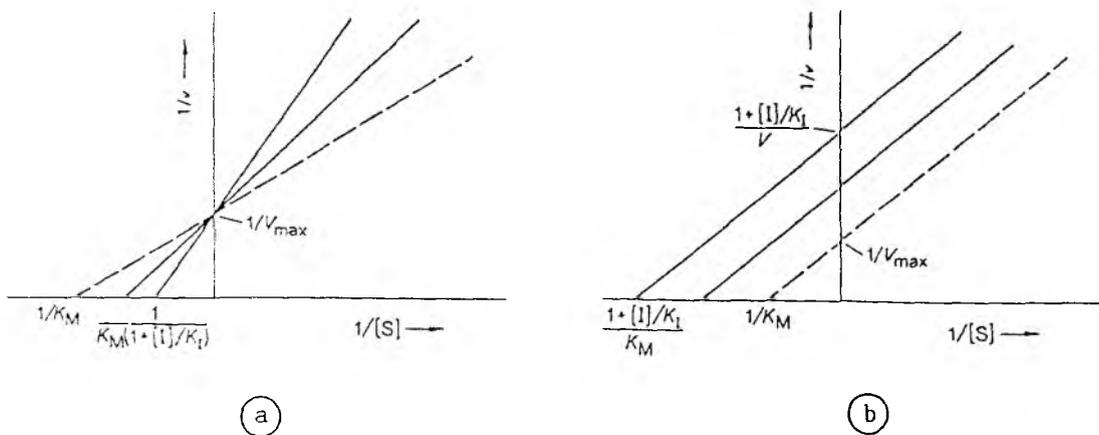


Abb. 17: Lineweaver-Burk Diagramme inhibierter Enzymreaktionen

Die unterbrochene Linie (---) steht für die unbeeinflusste Reaktion, die durchgezogenen Geraden (—) repräsentieren die Reaktionen bei zwei unterschiedlichen Inhibitor-konzentrationen $[I]$. **a)**: Kompetitive Hemmung, **b)**: Unkompetitive Hemmung; K_I = Inhibitor-konstante (aus: Michal 1984).

Das Besondere an der unkompetitiven Hemmung besteht darin, daß der Quotient V_{\max}/K_M konstant bleibt, d.h. die Initialsteigung der Michaelis-Menten Kinetik und somit auch die Aktivitäten bei niedrigen Substratkonzentrationen bleiben absolut betrachtet gleich (Abb. 18). Allerdings wird bei höheren Substratkonzentrationen die maximale Aktivität V_{\max} erniedrigt.

Unter ATP-Einfluß zeigten die CS der Euphausiiden ein auffälliges Verhalten, das nicht auf Temperatureffekte zurückzuführen war. Im Bereich niedriger Konzentrationen von 0 mM bis 0.2 mM ATP aktivierte dieser Effektor die CS: Der K_M^{app} für Acetyl-CoA stieg bei gleichzeitiger Erhöhung von V_{\max} . Dies führt bei einer graphischen Auftragung nach Lineweaver-Burk zu einer Parallelverschiebung der Geraden nach rechts (Abb. 19).

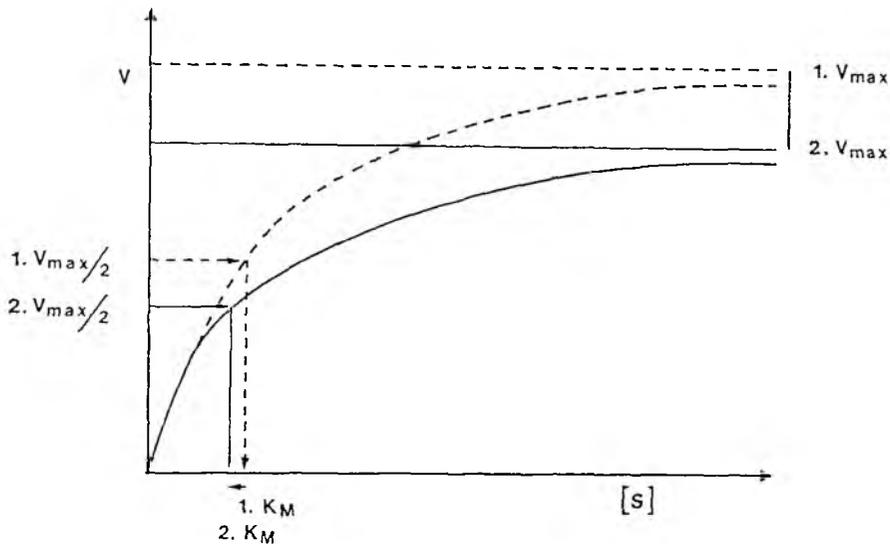


Abb. 18: Darstellung der Reaktionsgeschwindigkeit V als Funktion der Substratkonzentration $[S]$ eines Enzyms, das durch einen unkompetitiven Inhibitor gehemmt wird. Die maximale Reaktionsgeschwindigkeit V_{max} sinkt durch den Einfluß des Inhibitors im gleichen Maße wie der K_M -Wert. Daher bleibt die Initialsteigung der Kurve konstant (verändert nach: Michal 1984).

Das entspricht dem umgekehrten Vorgang der unkompetitiven Hemmung und ist einer Aktivierung gleichzusetzen. Im gleichen Diagramm erkennt man bei ATP-Konzentrationen über 0.2 mM (bis 1.8 mM) den typischen Effekt einer kompetitiven Hemmung (Abb. 19): Während V_{max} nahezu unverändert bleibt, steigt der K_M^{app} mit zunehmender ATP-Konzentration (d.h. $-1/K_M^{app}$ sinkt). Der ATP-Einfluß auf die CS der Euphausiiden kann zusammenfassend wie folgt beschrieben werden: Durch geringen Zusatz von ATP bis zu 0.2 mM steigen K_M^{app} und V_{max} . Eine weitere Erhöhung der ATP-Konzentration bewirkt dann aber nur noch eine Steigerung der K_M^{app} -Werte, während V_{max} auf dem erhöhten Niveau konstant bleibt. Dieses Verhalten, kompetitive Hemmung bei hohen und Aktivierung bei niedrigen ATP-Konzentrationen, konnte bei allen Versuchstemperaturen nachgewiesen werden.

Anders verhielt es sich bei den Isopoden *S. polita* und *I. baltica*, deren CS bei keiner Temperatur durch ATP aktiviert wurden. Es trat bei jeder getesteten ATP-Konzentration stets eine kompetitive Hemmung auf (Abb. 20). Dies galt für alle Untersuchungstemperaturen.

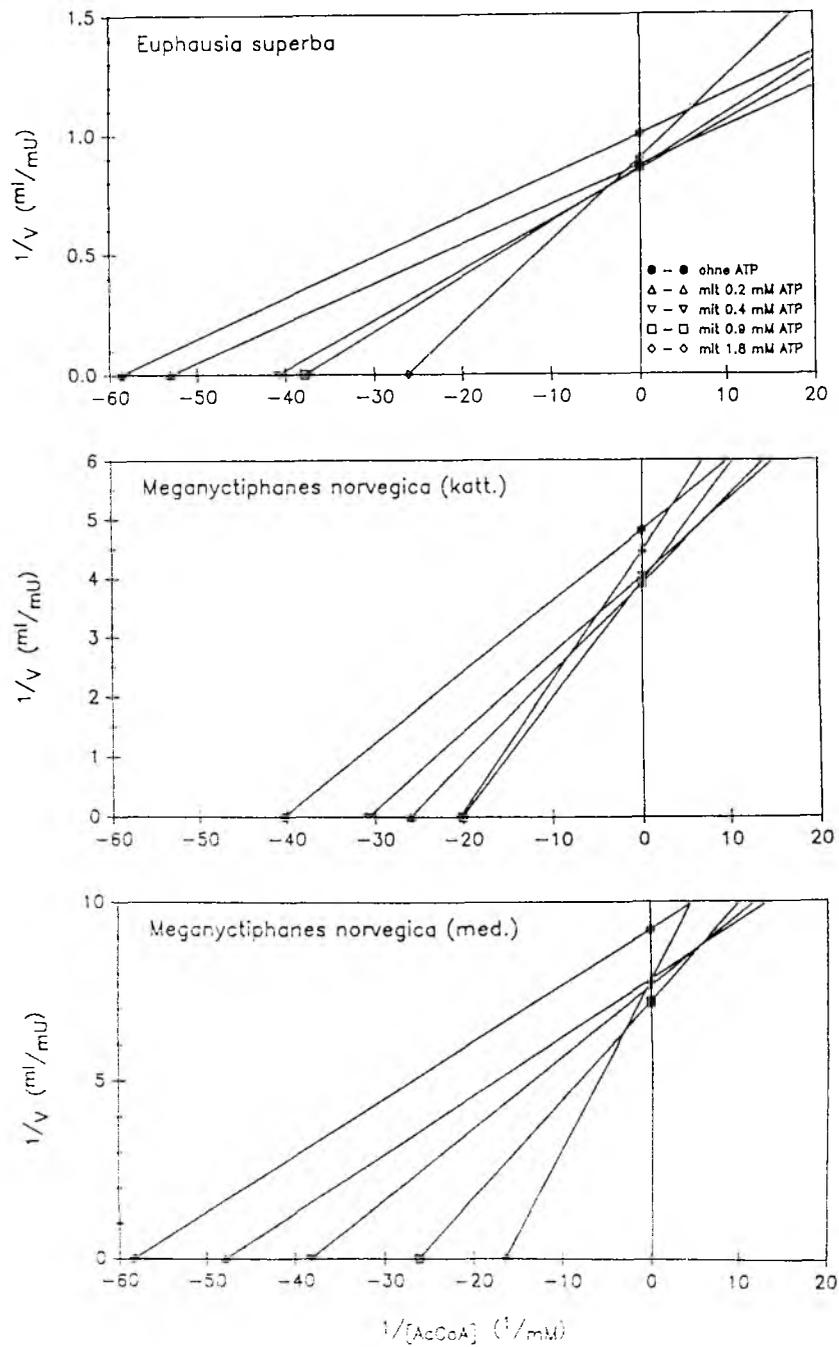


Abb. 19: Lineweaver-Burk Diagramme der CS-Kinetik unter Einfluß von ATP bei Krill

Die in den Graphiken dargestellten Geraden resultieren aus den berechneten V_{max} und K_M^{app} -Werten bei verschiedenen ATP-Konzentrationen (alle Messungen bei 15°C).
 Oben: *Euphausia superba*, mitte: *Meganyctiphanes norvegica* (katt.) und unten: *M. norvegica* (med.).

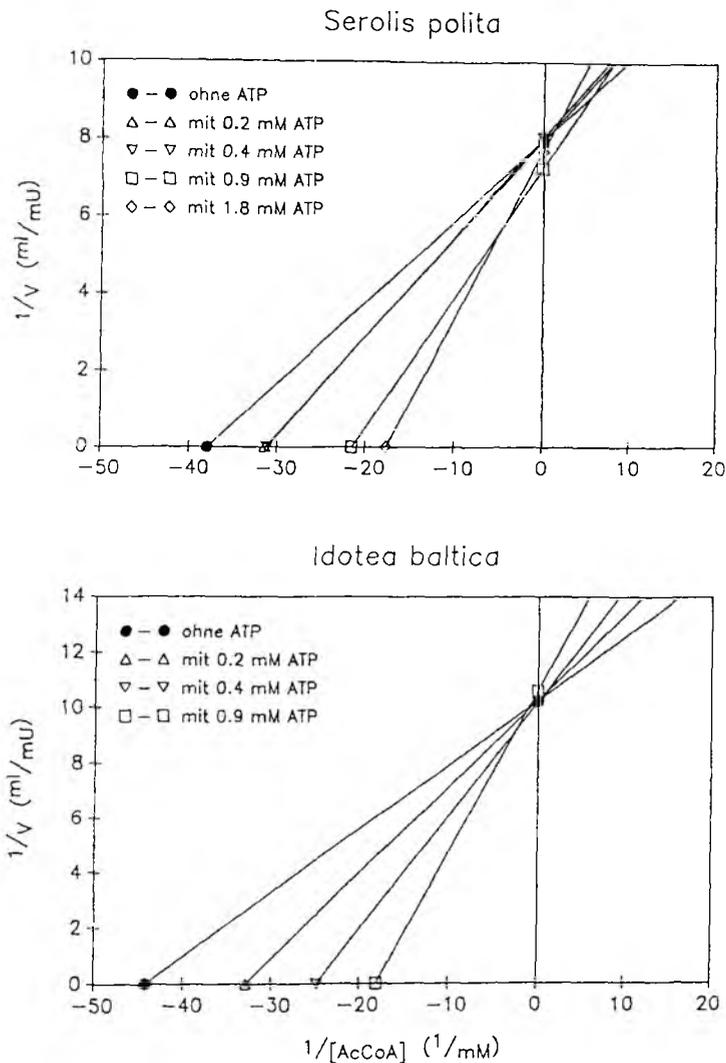


Abb. 20: Lineweaver-Burk Diagramme der CS-Kinetik unter Einfluß von ATP bei Isopoden. Die in den Graphiken dargestellten Geraden resultieren aus den berechneten V_{\max} und K_M^{app} -Werten bei verschiedenen ATP-Konzentrationen (alle Messungen bei 15°C). **Oben:** *Serolis polita* und **unten:** *Idotea baltica*.

Zwei weitere Gemeinsamkeiten wiesen alle untersuchten CS auf: 1.) Die Affinität von Oxalacetat wurde durch ATP nicht nennenswert beeinflusst; 2.) Der Zusatz von Magnesium (0.2 mM bis 2 mM) bewirkte weder mit noch ohne ATP eine Änderung der kinetischen Eigenschaften der CS.

Das Ausmaß der durch ATP verursachten kompetitiven Hemmung der CS, die bei allen untersuchten Tieren beobachtet wurde, kann über den K_i -Wert für ATP quantifiziert werden. Da die kompetitive Hemmung bei den Euphausiiden erst bei höheren ATP-Konzentrationen einsetzte, wurden nur die Meßreihen mit $\text{ATP} \geq 0.2 \text{ mM}$ für die K_i -Bestimmung verwendet. Im Falle der Isopoden konnten sämtliche Meßreihen für die Berechnung der K_i -Werte benutzt werden, auch die ohne ATP-Zusatz.

Die K_i -Werte aller Crustaceen verhielten sich mehr oder weniger temperaturunabhängig. Abgesehen von hohen K_i -Werten für *S. polita*, die zudem von 2.2 mM bis 3.8 mM ATP stark schwankten, lagen die Werte der anderen Arten bei allen getesteten Temperaturen annähernd konstant zwischen 0.6 mM und 1.1 mM ATP (Abb. 21).

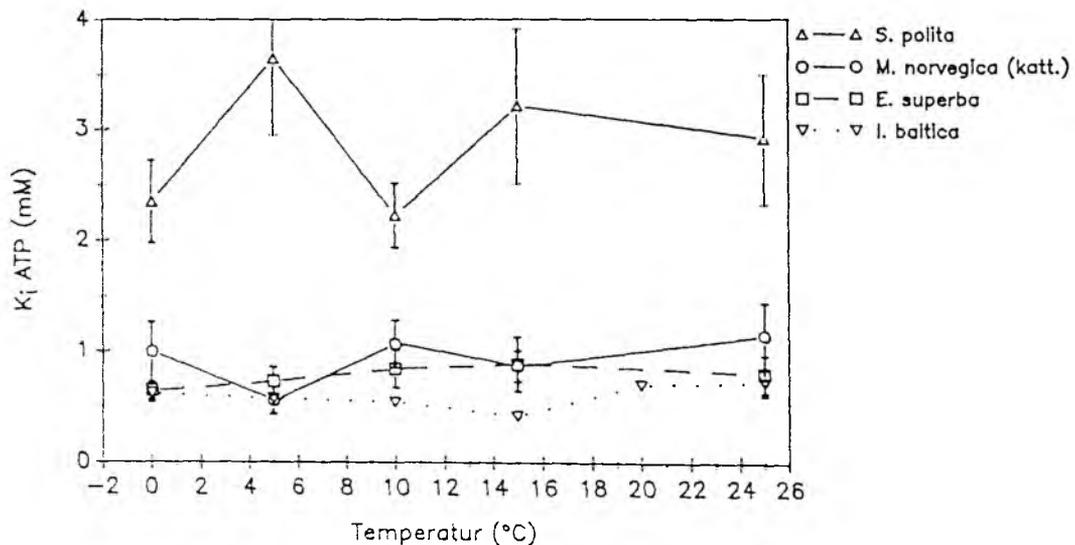


Abb. 21: K_i -Werte der CS für ATP in Abhängigkeit von der Temperatur

Δ = *Serolis polita*, ○ = *Meganyctiphanes norvegica* (katt.), □ = *Euphausia superba* und ▽ = *Idotea baltica*. Bei Werten ohne Fehlerbalken ist der Vertrauensbereich kleiner als das Symbol.

Zur besseren Übersicht sind die Daten für *M. norvegica* (med.) nicht eingezeichnet, da sie mit denen für *M. norvegica* (katt.) vergleichbar sind. Die über den gesamten Temperaturbereich gemittelten K_i -Werte sind in der folgenden Tabelle aufgeführt:

Spezies	K_f -Werte \pm Std.abw. (in mM ATP)
<i>E. superba</i>	0.779 ± 0.097
<i>M. norvegica</i> (katt.)	0.927 ± 0.234
<i>M. norvegica</i> (med.)	1.036 ± 0.399
<i>S. polita</i>	2.867 ± 0.594
<i>I. baltica</i>	0.594 ± 0.114

Tabelle 7: K_f -Werte der CS für ATP bei verschiedenen Spezies

Die statistische Analyse der obigen K_f -Werte ergab, daß die Differenzen bei den Euphausiiden untereinander nicht signifikant waren (t-Test, $p \leq 0.5$). Die Werte der Isopoden liegen dagegen signifikant höher (*S. polita*) bzw. signifikant niedriger (*I. baltica*) als die übrigen.

Einfluß der Hälterungstemperatur auf die kinetischen Eigenschaften

Substrataffinität

Außer den pH-Werten der Haemolymphe (s. ERGEBNISSE, S. 56) wurden bei den gehälterten Tieren (*M. norvegica* (katt.) und *E. superba*) auch kinetische Parameter der CS untersucht. Für die CS wurden die K_m^{app} -Werte (für Acetyl-CoA), sowie die K_f -Werte (für ATP) bei verschiedenen Hälterungstemperaturen bestimmt. Dabei fiel auf, daß die bei den Freilandtieren beobachteten Einflüsse durch ATP - Aktivierung bei niedrigen Konzentrationen, kompetitive Hemmung bei höheren Konzentrationen - in der gleichen Weise bei den unterschiedlich gehälterten Euphausiiden zu beobachten war.

Die einzelnen Inkubationstemperaturen (*M. norvegica* (katt): 0, 10 und 15 °C; *E. superba*: 0, 5, und 10 °C) wurden jeweils so gewählt, daß sie jeweils nahe der Hälterungstemperatur lagen (*M. norvegica* (katt): 0, 8 und 16 °C; *E. superba*: -1, +2, und 10 °C). In Abbildung 22 sind die K_m^{app} -Werte der einzelnen Versuchsreihen, also bei

konstanter Temperatur gehälterten Tieren, in Abhängigkeit von der Inkubationstemperatur der CS-Aktivitätstests dargestellt. Zum Vergleich sind auch die Werte für die Freilandtiere eingezeichnet (vgl. Abb. 16). Zur besseren Übersichtlichkeit wurden nur die Werte bei vergleichbaren Temperaturen übernommen.

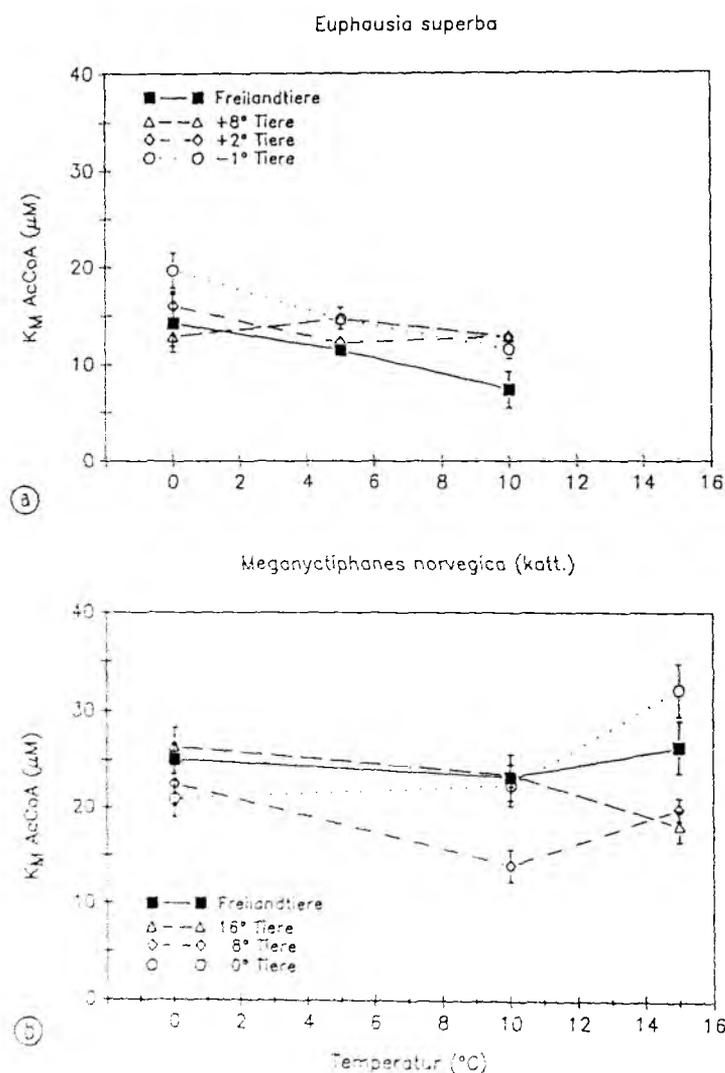


Abb. 22: Temperaturabhängige K_M^{app} -Werte der CS für Acetyl-CoA bei gehälterten Tieren. Aufgetragen sind die apparenten K_M -Werte für Acetyl-CoA gegen die Untersuchungstemperatur des Aktivitätstests bei drei Versuchsreihen mit unterschiedlich gehältertem Krill. Die Werte der Freilandtiere wurden aus Abb. 16 übernommen. a): *Euphausia superba* und b): *Meganyctiphanes norvegica* (katt.). Bei Werten ohne Fehlerbalken ist der Vertrauensbereich kleiner als das Symbol.

Mit einer Ausnahme (0°C : $+8^{\circ}\text{C}$ Tiere) waren bei *E. superba* die K_M^{app} -Werte der Freilandtiere stets geringfügig niedriger als die der gehälterten Tiere (Abb. 22a). Diese Differenzen waren nicht signifikant (t-Test, $p \leq 0.5$). Die niedrigsten K_M^{app} -Werte wurden bei allen vier Versuchsgruppen bei 10°C gemessen, die höchsten Werte lagen in drei Fällen bei 0°C .

Ein anderes Verhalten zeigten die Werte für *M. norvegica* (katt.). Abgesehen davon, daß die K_M^{app} -Werte der Vergleichstiere eher über den anderen lagen, zeigte sich ein Zusammenhang zwischen Hälterungs- und Inkubationstemperatur. So wiesen die Kurven stets bei den Inkubationstemperaturen Minima auf, die den Temperaturen während der Hälterung entsprachen (Abb. 22b). Dieser Zusammenhang geht auch deutlich aus der folgenden Tabelle hervor:

Hälterungstemperatur	minimaler K_M^{app} bei
0°C	0°C
8°C	10°C
16°C	15°C

Tabelle 8: Einfluß der Hälterungstemperatur auf den K_M^{app} -Wert bei *M. norvegica* (katt.)

Die Minima der bei 8°C und 16°C gehälterten Tiere waren signifikant niedriger (t-Test, $p \leq 0.5$) als die übrigen Werte der gleichen Meßreihe. Für die bei 0°C gehälterten Tiere konnte eine signifikante Senkung des K_M^{app} nur zwischen 0°C und 15°C nachgewiesen werden, aber nicht zwischen 0°C und 10°C .

ATP-Hemmung

Außerdem wurde für die Tiere der Hälterungsexperimente auch der ATP-Einfluß auf die CS bestimmt. Bei *E. superba* lagen die K_r -Werte der -1°C Tiere bei niedrigen Temperaturen (0°C und 5°C) über den Werten der Vergleichstiere aus dem Freiland, bei 10°C war der K_r -Wert der $+2^{\circ}\text{C}$ Tiere erhöht (Abb. 23a). Die übrigen K_r -Werte

unterschieden sich nicht signifikant (t -Test, $p \leq 0.5$) von den Werten der Freilandtiere. Insgesamt lagen die Werte in einem engen Bereich zwischen 0.6 mM und 0.8 mM ATP und bildeten mehr oder weniger parallele Geraden zur X-Achse.

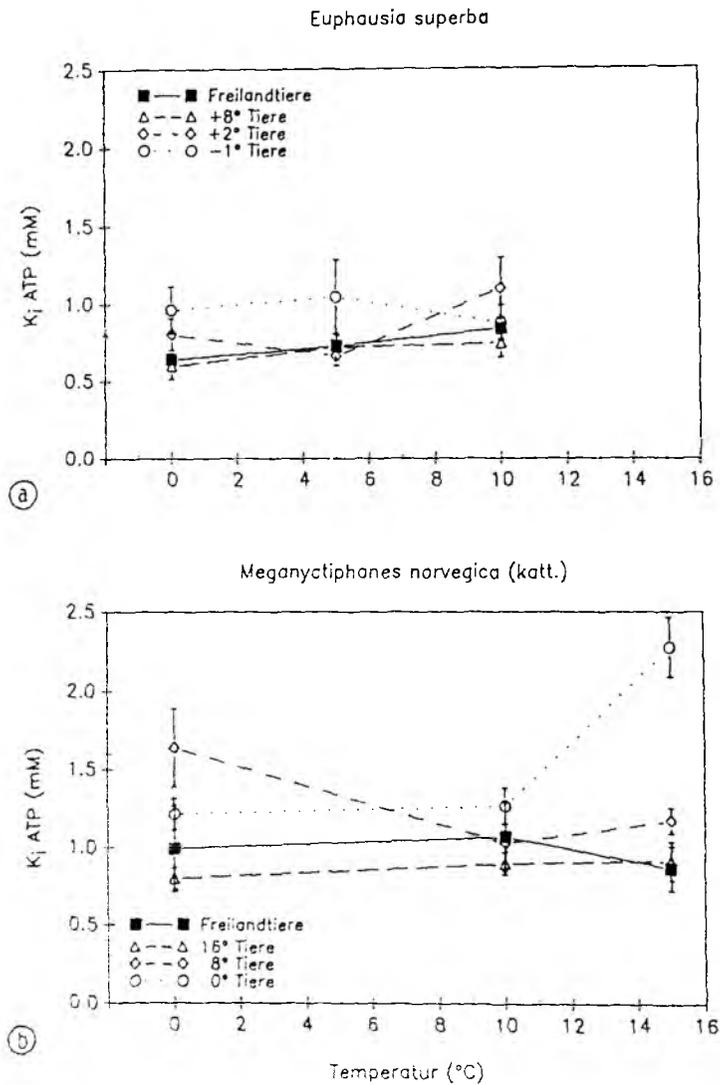


Abb. 23: Temperaturabhängige K_1 -Werte für ATP bei der CS von gehälterten Tieren

Aufgetragen sind die K_1 -Werte gegen die Untersuchungstemperatur des Aktivitätstests bei drei Versuchsreihen mit unterschiedlich gehältertem Krill. Die Werte der Freilandtiere wurden aus Abb. 21 übernommen. a): *Euphausia superba* und b): *Meganyctiphanes norvegica* (katt.). Bei Werten ohne Fehlerbalken ist der Vertrauensbereich kleiner als das Symbol.

Auch bei *M. norvegica* (katt.) gab es nur wenige signifikante (t-Test, $p \leq 0.5$) Abweichungen zwischen den K_i -Werten der gehälterten und der Freilandtiere. Bei 15°C lagen die Werte der 0°C und 8°C Tiere über den Vergleichswerten. Die K_i -Werte der 8°C Tiere waren außerdem noch bei 0°C deutlich erhöht (Abb. 23b).

Im Gegensatz zu den K_M^{app} -Werten (Acetyl-CoA) bestand bei den K_i -Werten (ATP) von *M. norvegica* (katt.) kein Zusammenhang zwischen Hälterungs- und Inkubationstemperatur. Bei diesem Parameter ergab sich, wie schon bei den K_i -Werten von *E. superba*, keine Temperaturabhängigkeit. Die Kurven verlaufen vorwiegend achsenparallel zur Abszisse (Abb. 23b).

Spezifische Aktivität

Für die Berechnung der spezifischen Aktivität wurden die Werte der Maximal-Aktivität (V_{max}) benutzt. Die Verwendung von V_{max} als Aktivitätsangabe hat gegenüber einer Mehrfachbestimmung bei sättigenden Substratkonzentrationen den Vorteil, daß V_{max} mit Hilfe einer Meßreihe berechnet wurde, die aus mindestens 14 Meßpunkten unterschiedlicher Substratkonzentrationen bestand. Dadurch ist dieser theoretisch berechnete Wert gegenüber Streuungen bei einzelnen Messungen weniger anfällig. Die spezifische Aktivität der CS wurde dann berechnet, indem die Maximal-Aktivität V_{max} auf den Proteingehalt bezogen wurde. Der resultierende Quotient erhielt die Einheit $\text{U}/\text{mg}_{\text{Protein}}$. Die Bestimmung der spezifischen Aktivität wurde bei allen gehälterten Tieren durchgeführt.

Die größten spezifischen CS-Aktivitäten wurden sowohl für *E. superba* als auch für *M. norvegica* (katt.) immer bei den höchsten Inkubationstemperaturen ermittelt (Abb. 24a und 24b). Auch bei den gehälterten Tieren konnte bei jeder Temperatur, wie schon bei den Freilandtieren (vgl. S. 44), eine Steigerung der Aktivität durch Zusatz von ATP erzielt werden.

Die spezifischen Aktivitäten von *E. superba* und *M. norvegica* (katt.) sind nicht direkt miteinander vergleichbar, da die einzelnen Enzymfraktionen unterschiedlich viel Fremdprotein enthalten. Somit ist nur der Vergleich innerhalb einer Tierart möglich.

Neben den Gemeinsamkeiten zeigten sich aber auch deutliche Unterschiede zwischen den beiden Euphausiiden. Bei *E. superba* war die spezifische Aktivität nahezu unabhängig von der Hälterungstemperatur. Die Werte blieben bei gleicher Inkubations-

temperatur annähernd konstant (Abb. 24a). Nur die Aktivitäten der bei $+2^{\circ}\text{C}$ gehälterten Tiere lag stets ein wenig höher. Im Gegensatz dazu beeinflusste die Hälterungstemperatur die spezifische Aktivität der CS von *M. norvegica* (katt.). Die 0°C -Tiere wiesen stets die

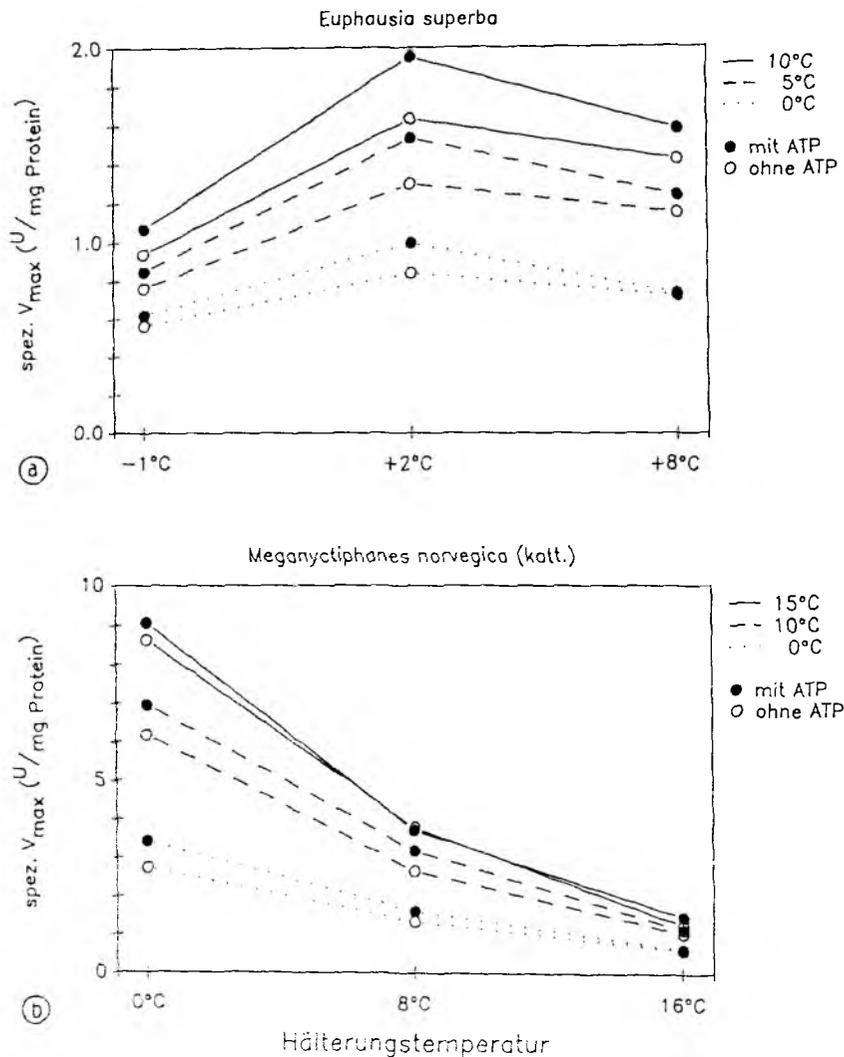


Abb. 24: Temperaturabhängigkeit der spezifischen V_{\max} der CS bei gehältertem Krill

Dargestellt sind die spezifischen V_{\max} -Werte bei verschiedenen Inkubationstemperaturen für Versuchsreihen ohne (○) und mit 0.4 mM ATP (●) in Abhängigkeit von der Hälterungstemperatur (Abszisse). Die Inkubationstemperaturen bei *Euphausia superba* (a) betragen 0°C (.....), 5°C (----) und 10°C (—). Bei *Meganyctiphanes norvegica* (katt.) (b) wurde bei 0°C (.....), 10°C (----) und 15°C (—) gemessen. Die Vertrauensbereiche sind wegen der besseren Übersichtlichkeit nicht eingezeichnet. Sie machten höchstens 5% des jeweiligen Wertes aus.

höchsten, die 16°C-Tiere stets die niedrigsten Werte auf. Vergleicht man die Aktivitäten dieser beiden Gruppen bei den Inkubationstemperaturen 0°C und 15°C, so fällt folgendes auf: Während die spezifische Aktivität der 0°C-Tiere von ca. 3 auf ca. 9 U/mg_{Protein} steigt,

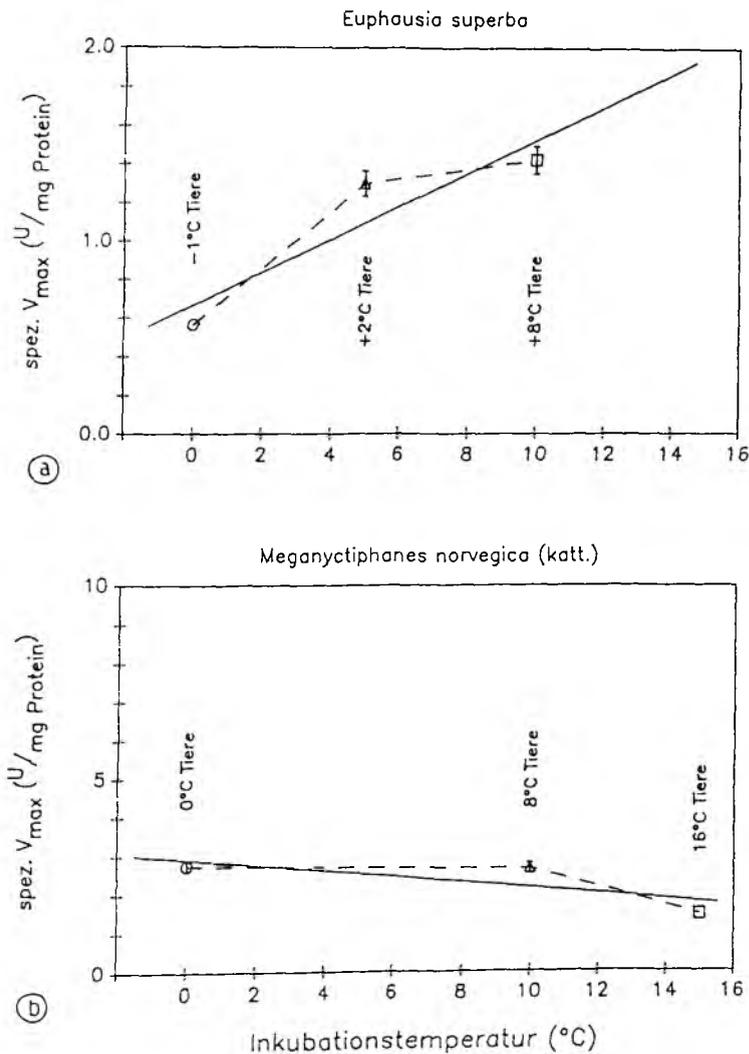


Abb. 25: Temperaturabhängigkeit der spezifischen V_{max} der CS bei gehältertem Krill
 Dargestellt sind die spezifischen V_{max} -Werte bei gehälterten Tieren in Abhängigkeit von der Inkubationstemperatur. Bei jeder Inkubationstemperatur wurde nur der Wert jener Versuchsgruppe eingezeichnet, deren Hälterungstemperatur mit der Inkubationstemperatur in etwa übereinstimmte. Die durchgezogene Linie (—) entspricht der Regressionsgeraden durch die drei Punkte. (a): *Euphausia superba* und (b): *Meganyctiphanes norvegica* (katt.). Bei Werten ohne Fehlerbalken ist der Vertrauensbereich kleiner als das Symbol.

erhöht sich der Wert der 16 °C-Tiere nur unwesentlich von 1 auf annähernd 2 U/mg_{Protein} (Abb. 24b). Das Verhältnis der spezifischen Aktivitäten der beiden Hälterungsgruppen 0 °C:16 °C-Tiere steigt somit vom dreifachen (bei 0 °C) auf das fünffache (bei 15 °C).

Aus diesen Ergebnissen kann man folgenden Zusammenhang ableiten: Die spezifische Aktivität steigt bei beiden Euphausiiden-Arten mit zunehmender Inkubationstemperatur. Diese Steigerung ist bei kalt gehälterten *M. norvegica* (katt.) erheblich höher als bei warm gehälterten, während bei *E. superba* keine derartige Beziehung zwischen Hälterungstemperatur und spezifischer Aktivität besteht.

Ein weiterer Einfluß der Hälterungstemperatur zeigt sich, wenn die Werte der spezifischen Aktivität gegen die Inkubationstemperatur aufgetragen werden, die annähernd der Hälterungstemperatur entsprach (Abb. 25). Bei *E. superba* steigen die Werte mit zunehmender Temperatur (Abb. 25a). Die Steigung der Regressionsgeraden beträgt 0.086 U/(mg_{Protein} • °C). Dagegen liegen die Werte bei *M. norvegica* (katt.) bis 10 °C annähernd achsenparallel zur Abszisse und werden bei ca. 2.7 U/mg_{Protein} konstant gehalten (Abb. 25b). Dieser Wert sinkt bei einer Temperaturerhöhung auf 15 °C unter 2 U/mg_{Protein}. Die über den gesamten Bereich kalkulierte Ausgleichsgerade weist eine negative Steigung von -0.075 U/(mg_{Protein} • °C) auf. Berücksichtigt man nur die Werte bis 10 °C, so ergibt die Steigung nur noch -0.009 U/(mg_{Protein} • °C). Demnach wird die spezifische Aktivität der CS von *M. norvegica* (katt.) bei ambienten Temperaturen annähernd konstant gehalten und sinkt bei Hälterungstemperaturen über 10 °C leicht ab.

pH-Werte der Haemolymphe

Die pH-Werte der Haemolymphe der bei verschiedenen Temperaturen gehälterten Versuchstiere wurden im Anschluß an die Hälterung gemessen, um den Einfluß der Hälterungstemperatur auf den Protonenhaushalt zu bestimmen. In der nachfolgenden Tabelle sind die Mittelwerte und Standardabweichungen der Einzelmessungen von jeweils ca. 15 Tieren aufgeführt.

Temperatur °C	<i>Euphausia superba</i>	<i>Meganyctiphanes norvegica</i> (katt.)
- 1	8.10 ± 0.07 (n = 15)	**
0	**	7.74 ± 0.18 (n = 15)
+ 4	8.07 ± 0.04 (n = 15)	7.75 ± 0.21 (n = 16)
+ 6	8.07 ± 0.04 (n = 15)	**
+ 8	**	7.82 ± 0.07 (n = 16)
+16	**	7.89 ± 0.12 (n = 14)

Tabelle 9: pH-Werte der Haemolymphe von *E. superba* und *M. norvegica* (katt.), gemessen nach elf-tägiger Hälterung bei verschiedenen konstanten Temperaturen

** : Keine Versuchsreihe durchgeführt.

Intraspezifisch waren die Meßwerte des Haemolymphe-pH nicht signifikant voneinander verschieden (One-way ANOVA, $p = 0.24$). Daher konnte aus allen Einzelwerten ein artspezifischer Mittelwert bestimmt werden:

E. superba: pH 8.08 ± 0.05 (n = 45)

M. norvegica (katt.): pH 7.80 ± 0.16 (n = 61)

Verglichen mit der Haemolymphe von *E. superba* weist die von *M. norvegica* (katt.) einen signifikant niedrigeren pH-Wert auf (t-Test, $p \leq 0.5$).

DISKUSSION

Der Stand der Forschung in der polaren Ökophysiologie bietet zur Zeit folgendes Bild: Zwar liegt über die vergleichende Physiologie der polaren Fische bereits eine recht umfangreiche Literatur vor (z.B. Dunbar 1968, Baldwin und Hochachka 1970, Shaklee et al. 1977, Hochachka und Somero 1980, Graves und Somero 1982, Macdonald et al. 1987), jedoch ist das Wissen über die Adaptationsmechanismen bei polaren Invertebraten noch sehr lückenhaft (Clarke 1989). Vor allem mangelt es an systematisch vergleichenden Arbeiten. So liegen beispielsweise nur einige unzusammenhängende Informationen über die Adaptationen von Wirbellosen vor (Clarke 1983). Demgegenüber steht ein großer Formenreichtum sowie eine immense Biomasse von polaren Invertebraten.

Bereits seit einiger Zeit wird die Kälteadaptation der polaren, ektothermen Meerestiere kontrovers diskutiert. Einerseits wird postuliert, daß der Stoffwechsel auf sehr niedrigem Niveau verläuft (Clarke 1983). Andererseits wird vermutet, daß die Stoffwechselraten der polaren Tiere gegenüber den Warmwasserformen durch metabolische Kompensation erhöht sein könnten (Hochachka und Somero 1984). Beide Hypothesen beruhen im wesentlichen auf Respirationsmessungen. Diese experimentellen Verfahren können allerdings die im Freiland vorherrschenden Umwelteinflüsse nie vollständig in ihrer Gesamtheit simulieren. Daher ist es günstiger, Stoffwechselleistungen mit Hilfe einzelner, gut kontrollierbarer biochemisch-physiologischer Reaktionen zu bestimmen. Es bietet sich an, dem Ansatz der vorliegenden Arbeit entsprechend, den Einfluß der Temperatur auf Enzyme zu analysieren, weil diese Bio-Katalysatoren den gesamten Stoffwechsel regulieren.

Die bisher vorliegenden Erkenntnisse über enzymatische Temperaturanpassung wurden überwiegend aus Experimenten an Fischen gewonnen. Dabei wurde entweder mit ungereinigten Enzymen aus Rohextrakten gearbeitet (z.B. Baldwin 1971, Hochachka und Somero 1984, Dittrich 1992), oder es wurden mit Hilfe elektrophoretischer Trennmethode die Isoenzymmuster unterschiedlich adaptierter Tiere bestimmt (z.B. Graves und Somero 1982). In der vorliegenden Arbeit wurde zum ersten Mal die enzymatische Temperaturanpassung bei Invertebraten detailliert untersucht. Dazu wurden Enzyme des Energiestoffwechsels sowie aus dem Häutungszyklus bzw. Verdauungstrakt isoliert und eingehend analysiert. Für diese Untersuchung war vor allem der Einfluß der Temperatur auf die Eigenschaften der Enzyme von besonderem Interesse.

Eigenschaften der N-Acetyl- β -D-Glucosaminidase

Für das Häutungs- und Verdauungsenzym NAGase (Buchholz 1989, Saborowski und Buchholz 1991) konnten bei den unterschiedlichen Crustaceen zwei bis drei Pools nachgewiesen werden. Untersuchungen von Saborowski et al. (1992) zeigten am Beispiel von *Meganyctiphanes norvegica* (katt.), daß es sich bei den Pools um endogene Enzyme des Krills handelt, die nicht von symbiontischen Bakterien des Verdauungstraktes produziert werden. Die NAGase-Elutionsprofile (Q-Sepharose® HP) von Tieren, die mit Antibiotika behandelt wurden, zeigten keine Differenzen zu den Profilen von Freilandtieren. Zudem wies die aus den symbiontischen Bakterien isolierte NAGase nach der Anionentauscherchromatographie völlig andere Elutionscharakteristika auf als die NAGase des nordischen Krills.

Bei den Euphausiiden traten jeweils zwei NAGase-Pools auf, deren chromatographische Eigenschaften und Molekulargewichte interspezifisch vergleichbar waren. Weitere Übereinstimmungen zeigten sich sowohl bei den temperaturabhängigen Parametern Temperaturoptimum und Aktivierungsenergie als auch bei der Enzymkinetik. Alle sechs Enzym-Varianten wurden durch hohe Substratkonzentrationen inhibiert und folgten nur partiell der Michaelis-Menten Kinetik. Die Ähnlichkeiten der chromatographischen und kinetischen Merkmale deuten darauf hin, daß große strukturelle Übereinstimmungen bei den Enzymen dieser nah verwandten Arten unabhängig vom Lebensraum bestehen. Dies bestätigt den konservativen Charakter der NAGase, wie er bereits für das gesamte Chitinase-System vermutet wird (Spindler und Buchholz 1988).

Die Temperaturprofile zeigen Gemeinsamkeiten bei allen untersuchten NAGase-Pools. Die höchsten Aktivitäten, auch die der polaren Arten, liegen stets über 30°C. Es erfolgt keine Verschiebung der Optima in den ambienten Temperaturbereich (vgl. Abb. 3 und 4). Somit wird dieser Mechanismus der Temperaturanpassung (DeVries 1977, Cleffmann 1979) bei der NAGase nicht eingesetzt. Das gleiche Phänomen wurde auch bei Enzymen antarktischer Bakterien beobachtet, deren Temperaturoptima ebenfalls über 30°C lagen (Reichardt 1987). Im Falle der NAGase wird die Lage der Optima hauptsächlich durch die thermische Stabilität bestimmt, und da auch die Enzyme der polaren Arten ungewöhnlich temperaturstabil sind, resultieren daraus entsprechend hohe Temperatur-optima. Es ist fraglich, ob der Begriff "Optimum" richtig gewählt ist, da es sich vielmehr

um ein temperaturabhängiges "Maximum" handelt, das sich aus der Wechselwirkung zwischen Stabilität und Aktivität ergibt.

Ein Vergleich der Enzymaktivitäten bei 0 °C zeigt wiederum auffallende Übereinstimmungen: Bei allen untersuchten Crustaceen beträgt die Restaktivität zwischen 5% und 10% der Maximalaktivität. Auch für eine trypsinähnliche Protease wurden vergleichbare Werte von 5% bis 10% bei Crustaceen aus polaren und gemäßigten Breiten gefunden (Dittrich 1992). Daraus folgt, daß den antarktischen Arten bei ambienten Temperaturen nur ein Zehntel ihrer potentiellen Aktivität zur Verfügung steht, während die Vertreter aus gemäßigten und tropischen Breiten im ambienten Bereich bis zu 60% der Maximalaktivität (*Ocypode ryderi*) nutzen können. Bei einem solchen Vergleich darf nicht übersehen werden, daß es sich um relative Angaben, jeweils bezogen auf das Maximum der Aktivität, handelt. So würde als Folge einer geringeren Temperaturstabilität bei den polaren Arten rechnerisch eine höhere Restaktivität resultieren. Dies kann an einem Beispiel verdeutlicht werden: Wenn Pool C (*Euphausia superba*) nicht erst bei 40 °C sondern bereits bei 30 °C denaturieren würde, so würde sich auch der Bereich maximaler Aktivität um ca. 10 °C zu niedrigeren Temperaturen verschieben. Das Maximum läge somit bei ca. 35 °C, d.h. bei 35 °C wäre die Aktivität mit 100% statt mit 50% gleichzusetzen (vgl. Abb. 3). Dementsprechend würde sich auch die Restaktivität bei 0 °C verdoppeln, da in diesem Fall eine andere Bezugsgröße zugrunde gelegt wird.

Eine weitere Möglichkeit, aus den Temperaturprofilen Rückschlüsse auf enzymatische Anpassungsmechanismen zu ziehen, besteht darin, das Verhalten einzelner Isoenzyme zu vergleichen. Bei Anwendung der von Hochachka und Somero (1984) vorgestellten qualitativen Strategie werden bevorzugt solche Isoenzyme synthetisiert, die unter den vorherrschenden Bedingungen eine ideale Funktionsweise gewährleisten. Bei der NAGase der Euphausiiden konnten 2 bis 3 Pools voneinander getrennt werden, die unterschiedliche Temperatur-"Maxima" mit Differenzen von maximal 16 °C (*M. norvegica* (med.)) aufwiesen. Obwohl bei keinem der Enzyme eine Verschiebung des Maximums in den ambienten Bereich erfolgte, könnte dennoch eine kurzfristige Temperaturregulation mit Hilfe der unterschiedlichen Pools möglich sein. Ein eurythermer Organismus wie beispielsweise *M. norvegica* (katt.) könnte bei verschiedenen Temperaturen, z.B. zwischen 0 °C und 15 °C, gezielt das eine oder das andere Isoenzym einsetzen, um konstante Enzymaktivitäten aufrecht zu erhalten (vgl. Abb. 4). Für die NAGase würde dies bedeuten, daß bei niedrigen Temperaturen vermehrt Pool II, bei höheren dagegen Pool III synthetisiert werden

müßte. Dies kann allerdings nicht ohne größeren Aufwand überprüft werden, da hierzu die tatsächlich vorhandene Enzymmenge quantifiziert werden müßte (Clarke 1983). Entsprechende Untersuchungen mit spezifischen NAGase-Antikörpern sind in Vorbereitung (Peters 1992).

Des weiteren kann die qualitative Strategie bei der Adaptation an niedrige Temperaturen eingesetzt werden, indem die Aktivierungsenergie (E_a) eines Enzyms gesenkt wird (Hochachka und Somero 1984). Für die Euphausiiden und *Serolis polita* trifft dies bei der NAGase aufgrund der vorliegenden Ergebnisse nicht zu. Die isolierten Pools wiesen vergleichbare E_a -Werte von ca. 50 kJ/mol auf. Der niedrigste E_a -Wert wurde mit 40.7 kJ/mol bei der tropischen Krabbe *O. ryderi* gefunden. Etwas anders stellt sich die Situation bei einem Vergleich der E_a -Werte für die Vollhomogenate dar. Der niedrigste E_a -Wert aller Meßreihen wurde mit 38.6 kJ/mol bei *E. superba* ermittelt. Dieser scheinbare Widerspruch der Ergebnisse für die Pools und für das Vollhomogenat ist jedoch leicht zu erklären. Im Vollhomogenat wird für die NAGase-Aktivität ein Wert gemessen, der sich aus der Aktivität der drei Pools A, B und C zusammensetzt. So kommt es zu einer Überlagerung von drei Kurven. Werden die Werte in einem Arrhenius-Diagramm aufgetragen, so ergeben sich zwei Bereiche unterschiedlicher Steigung: Von 0 °C bis 10 °C verläuft die Gerade erheblich flacher als zwischen 20 °C und 40 °C (Spindler und Buchholz 1988). Daraus resultiert eine geringe Aktivierungsenergie von nur 9.5 kJ/mol bei niedrigen Temperaturen, während für die höheren Temperaturen ein E_a -Wert von 65.2 kJ/mol berechnet wurde (Spindler und Buchholz 1988). In dieser Arbeit wurden für die Berechnung der Aktivierungsenergie des Vollhomogenates alle Werte von 0 °C bis zum Maximum verwendet, so daß sich rechnerisch ein mittlerer Wert von 38.6 kJ/mol ergab. Jedoch ist dieser Wert völlig irrelevant, da er zwar aus den Ergebnissen der Temperaturkurven für das Vollhomogenat berechnet werden kann, die Arrheniusgleichung bei derartigen Enzymgemischen aber gar nicht angewendet werden dürfte. Der resultierende Korrelationskoeffizient liegt mit 94.1% auch deutlich unter den Werten für die einzelnen Pools (98.3% bis 99.6%, vgl. Tab. 2). Diese Erniedrigung der Korrelation für die Werte der Vollhomogenate konnte nicht nur bei *E. superba*, sondern bei allen untersuchten Arten beobachtet werden. Der Unterschied zwischen dem Vollhomogenat und den einzelnen Pools ist bei *O. ryderi*, dem Tier mit nur einem NAGase-Pool, am geringsten. Die größten Abweichungen treten bei *E. superba* und *S. polita* auf (3 bzw. 2 Pools). Als Folge der

Überlagerung mehrerer Pools ist der Anteil jedes einzelnen an der Gesamtaktivität bei verschiedenen Temperaturen unterschiedlich. Daraus resultieren größere Schwankungen bei den Vollhomogenaten, denn es handelt sich um ein Gemisch und nicht um ein einheitliches Enzym.

Ähnlich hohe E_a -Werte wurden von Thébault (1984) für die Lactat-Dehydrogenase aus *Palaemon serratus* bestimmt. Diese änderten sich auch nicht bei Tieren, die an unterschiedliche Temperaturen adaptiert waren. Der mittlere E_a -Wert lag bei 56 kJ/mol. Auch in diesem Fall konnte keine temperaturabhängige Anpassung über die Aktivierungsenergie festgestellt werden. Darüberhinaus gibt es weitere Beispiele, daß auch bei einigen anderen Enzymen die Aktivierungsenergie im Zusammenhang mit der Temperaturadaptation keine Rolle spielt (z.B. Van Wormhoudt 1980).

Eine Temperaturanpassung kann auch über den pH-Wert erfolgen (qualitative Strategie), da dieser Parameter temperaturabhängig ist (Hochachka und Somero 1984, Clarke 1983). Die pH-Werte von Cytosol und Blut sinken mit steigender Temperatur (Reeves 1977). Voraussetzung für diesen Anpassungsmechanismus ist die Existenz ausgeprägter pH-Optima bei den zu regulierenden Enzymen. Diese Optima müßten annähernd im Bereich des pH-Wertes *in vivo* liegen, dürften aber nicht identisch sein. Nur so können geringfügige Änderungen des pH-Wertes um 0.1 eine wesentliche Erhöhung von 20% auf 80% der maximalen Enzymaktivität bewirken (Freed 1971). Die vorliegenden Ergebnisse über die pH-Abhängigkeit der NAGase lassen den Rückschluß zu, daß dieses Enzym bei den untersuchten Crustaceen nicht über den pH-Wert reguliert wird, da bei ambienten Temperaturen keine pH-Optima auftreten. Erst bei Temperaturen über 15°C, die für die Arten aus polaren und gemäßigten Breiten unphysiologisch sind, treten erkennbare Optima mit großen Steigungen auf (vgl. Abb. 5). Somit besteht keine Abhängigkeit zwischen pH und NAGase-Aktivität bei den für die Tiere relevanten Temperaturen. Dementsprechend ist auch eine Temperaturanpassung über eine Erhöhung des pH bei niedrigen Temperaturen auszuschließen. Dies wird auch durch die Ergebnisse der Hälterungsexperimente bestätigt. Obwohl aus den pH-Werten der Haemolymphe nicht direkt auf den pH-Wert am Wirkort (Kutikula bzw. Verdauungstrakt) geschlossen werden kann, so gibt der Haemolymphe-pH jedoch einen Anhaltspunkt für die temperaturabhängige Variabilität des pH-Wertes. Im Gegensatz zu vielen anderen Crustaceen, z.B. *Carcinus maenas* und *Callinectes sapidus*, deren Haemolymphe-pH um ca. 0.2 Einheiten pro 10°C Erwärmung sinkt (Truchot 1983),

konnte bei Krill, der bei unterschiedlichen Temperaturen gehältert wurde, keine signifikante pH-Änderung gemessen werden. Der Haemolymph-pH blieb konstant. Die durchschnittlichen pH-Werte von 7.80 bei *M. norvegica* (katt.) bzw. 8.08 bei *E. superba* entsprechen den Werten anderer Crustaceen vergleichbarer Klimazonen aus gemäßigten bzw. polaren Breiten. So wurde für *C. maenas* (Nordsee) in der Haemolymph ein pH-Wert von 7.60 bis 7.73 bestimmt (Taylor und Butler 1978, Taylor 1977). Der Haemolymph-pH des polaren Isopoden *Glyptonotus antarcticus* liegt mit 8.07 (Jokumsen et al. 1981) nahe dem für *E. superba* ermittelten Wert.

Die vorliegenden Ergebnisse über die Temperaturoptima, Aktivierungsenergien und pH-Abhängigkeit der NAGasen verschiedener Crustaceen lassen vermuten, daß dieses Enzymsystem nicht qualitativ reguliert wird, zumindest nicht bei den untersuchten Arten. Als nächstes wurde überprüft, ob eine Temperaturanpassung der NAGase über modulative Mechanismen erfolgt. In einem solchen Fall müßte die Enzymaktivität beispielsweise durch variable Enzym-Substrat-Affinitäten reguliert werden, die anhand der apparenten Michaelis-Konstanten K_M^{app} nachgewiesen werden können (Hochachka und Somero 1980). Daher wurden die K_M^{app} -Werte der NAGase bei verschiedenen Temperaturen ermittelt und in Beziehung zur ambienten Temperatur der untersuchten Crustaceen gesetzt. Obwohl die K_M^{app} -Werte mit einem künstlichen Substrat bestimmt wurden, sind die Ergebnisse direkt auf die natürlichen Bedingungen übertragbar, da auch Versuche mit dem natürlichen Substrat Chitobiose zu vergleichbaren Resultaten führten (vgl. S. 11).

Die K_M^{app} -Werte zeigten Temperaturabhängigkeiten, die eine Anpassung an die Temperatur des Lebensraumes ermöglichen könnten (vgl. Abb. 9 und 10). *E. superba* lebt ganzjährig stenotherm bei Temperaturen zwischen -1.9°C (Gefrierpunkt des Seewassers) und $+2^{\circ}\text{C}$ (Hedgpeth 1969). Das gilt auch für *S. polita* aus dem gleichen Fanggebiet. Für alle NAGase-Pools der beiden Crustaceen wurden minimale K_M^{app} -Werte bei niedrigen Temperaturen (0°C bzw. $+5^{\circ}\text{C}$) bestimmt. Der gleiche Zusammenhang zwischen K_M^{app} -Minimum und ambienter Temperatur besteht auch bei *Meganyctiphanes*. Die eurythermen Tiere aus dem Kattegat unterliegen bei ihrer täglichen Vertikalwanderung erheblichen Temperaturschwankungen: im Sommer zwischen $+8^{\circ}\text{C}$ und $+14^{\circ}\text{C}$; im Winter zwischen $+4^{\circ}\text{C}$ und $+6^{\circ}\text{C}$ (Boysen und Buchholz 1984, Buchholz und Boysen-Ennen 1988). Dagegen wandert *M. norvegica* (med.) nicht in die oberflächennahen, wärmeren Wasserschichten und lebt stenotherm bei konstant 12°C bis 13°C (Cuzin-Roudy, pers. Mitteilung). Die

temperaturabhängigen K_M^{app} -Werte zeigen auch in diesen Fällen eine gute Übereinstimmung zwischen den ambienten Temperaturen und den auftretenden Minima. Die einzige untersuchte Art, die diesem Schema nicht entspricht, ist *O. ryderi*. Hier liegt das K_M^{app} -Minimum bei 0°C und somit weit außerhalb der Temperaturen des natürlichen Lebensraumes, die zwischen 25°C und 40°C betragen (Langer, pers. Mitteilung). Diese Erkenntnisse, abgesehen von der Ausnahme bei *O. ryderi*, sprechen für einen möglichen Anpassungsmechanismus im Sinne der modulativen Strategie nach Hochachka und Somero (1980), wie er bereits bei Fischen beschrieben wurde: Verlagerung der minimalen K_M^{app} -Werte in den Bereich ambienter Temperaturen. Auch bei *Palaemon serratus* wurde eine derartige Verschiebung der K_M^{app} -Werte bei α -Amylase (Van Wormhoudt 1980) und Lactat-Dehydrogenase (Thébault 1984) gefunden. Außerdem konnte Dittrich (1992) in einer detaillierten Vergleichsstudie mit Verdauungsenzymen aus Crustaceen unterschiedlicher Klimazonen nachweisen, daß die absoluten K_M^{app} -Werte bei kaltadaptierten Arten deutlich geringer sind als bei Tieren aus wärmeren Regionen. Demnach scheint dieser Mechanismus der Temperaturadaptation auch bei Invertebraten verbreitet zu sein.

Nach Hoffmann (1976) besteht zudem ein Zusammenhang zwischen der Kurvenform der temperaturabhängigen K_M^{app} -Werte und den Temperaturschwankungen im Lebensraum eines Tieres. Seine Untersuchungen über die Pyruvatkinase aus Arthropoden und Mollusken ergaben bei stenothermen Tieren U-förmige Kurven, während bei eurythermen Arten J-förmige Kurven dominierten. Die Minima bzw. Plateaus der Minima lagen stets bei ambienten Temperaturen. Dieser Zusammenhang ist bei der NAGase der untersuchten Crustaceen nur bedingt zu erkennen. Bei *Meganyciophanes* wurden, auch bei dem eurythermen Vertreter aus dem Kattegat, ausschließlich U-förmige Kurven mit Minima in den ambienten Bereichen gefunden. J-förmige Kurven traten nicht auf (vgl. Abb. 10). Andeutungsweise trifft der beschriebene Zusammenhang bei den stenothermen Arten *E. superba* und *S. polita* zu, obwohl die Kurven vor allem bei *E. superba* nicht typisch U-förmig sind (vgl. Abb. 9). Dies hängt damit zusammen, daß die Messungen nicht bei Temperaturen unter 0°C durchgeführt werden konnten und somit ein möglicher Anstieg der K_M^{app} -Werte bei niedrigeren Temperaturen nicht nachgewiesen werden kann. Insgesamt verlaufen die Kurven für *E. superba* eher waagrecht mit einem über einen weiten Bereich gestreckten Minimum. Dies könnte allerdings darauf hindeuten, daß *E. superba* potentiell in der Lage ist, größere Temperaturschwankungen als die des natürlichen Lebensraumes zu tolerieren. Dafür spricht auch die Tatsache, daß die Tiere ohne Probleme bei $+8^\circ\text{C}$ gehältert werden

konnten. Ähnliche Ergebnisse über die Temperaturtoleranz liegen für weitere antarktische Crustaceen vor, z.B. *Bovallia gigantea* (Vetter et al. 1992).

Die Ergebnisse von *O. ryderi* passen in kein bekanntes Schema. Bei der tropischen Krabbe waren die K_M^{app} -Werte bei ambienten Temperaturen am höchsten (vgl. Abb. 9). Während bei den anderen Arten im ambienten Bereich eine Erhöhung der Substrataffinität erfolgt, wird sie hier sogar gesenkt. Dies kann folgende Gründe haben: die Tiere aus kälteren Regionen müssen die durch niedrige Temperaturen verursachten Nachteile, z.B. Senkung der Umsatzrate, durch adaptive Mechanismen wieder ausgleichen. Dies geschieht über eine signifikante Erhöhung der Substrataffinität bei ambienten Temperaturen, so daß bei gleichem Substratangebot eine höhere Enzymaktivität erzielt wird. Ganz anders stellt sich die Situation bei *O. ryderi* dar. Die bei Temperaturen zwischen 25°C und 40°C lebende Krabbe muß nicht erst durch Optimierung der Enzymeigenschaften die Umsatzraten erhöhen, da die Enzyme in ihrer Wirkung nicht durch die Temperatur limitiert werden. Ganz im Gegenteil könnte in diesem Fall die hohe Enzymaktivität sogar negative Auswirkungen haben, indem mehr Substrat als nötig umgesetzt wird. Die verringerte Substrataffinität bei hohen Temperaturen führt dazu, daß die Aktivität erniedrigt wird und ermöglicht somit eine Regulation des Metabolismus. Dieser Mechanismus widerspricht zwar der Hypothese von Hochachka und Somero (1980), aber er wäre bei einem tropischen Tier durchaus sinnvoll.

Ein Vergleich der K_M^{app} -Werte bei jeweils ambienten Temperaturen zeigt weitgehende Übereinstimmungen. Die K_M^{app} -Werte von *S. polita*, *M. norvegica* (*med.*) und der Wintertiere von *M. norvegica* (*katt.*) sind im ambienten Bereich ähnlich. Dies spricht für eine "Konservierung" (engl.: "conservation"; nach Hochachka und Somero 1984) der Werte, d.h. unabhängig vom Organismus wird der K_M^{app} bei ambienten Temperaturen auf einem vergleichbaren, niedrigen Niveau gehalten. Eine solche Konstanz der K_M^{app} -Werte findet man nur teilweise bei *E. superba* und den Sommertieren von *M. norvegica* (*katt.*): Der K_M^{app} -Wert von jeweils einem Pool ist mit den übrigen vergleichbar. Für *M. norvegica* (*katt.*) ergibt sich daraus folgender Zusammenhang: Während der sommerlichen Vertikalwanderung durch die Wassersäule sind die Tiere täglich Temperaturschwankungen bis zu 6°C ausgesetzt. Dementsprechend könnte die Existenz der beiden unterschiedlichen Pools von Vorteil sein, um die Umsatzrate konstant zu halten. Dazu müßte bei höheren Temperaturen das Enzym mit dem hohen K_M^{app} -Wert (Pool III) verwendet werden und bei niedrigen das andere (Pool II). Der gleiche Sachverhalt, Pool III bei höheren und Pool II bei

niedrigen Temperaturen einzusetzen, wurde schon in Zusammenhang mit den unterschiedlichen Temperaturmaxima der beiden Pools diskutiert (vgl. S. 61). Im Winter entfällt eine entsprechende Regulation, da die täglichen Temperaturschwankungen viel geringer sind als im Sommer. Die Kurven der K_M^{app} -Werte der beiden Pools verlaufen bei den Wintertieren flacher und liegen etwas näher zusammen. Bei den stenothermen *M. norvegica (med.)* wird dies noch deutlicher: Konstante Umgebungstemperaturen verursachen ähnliche K_M^{app} -Werte. Allerdings trifft diese Beobachtung nicht auf *E. superba* zu, denn es zeigt sich eine große Differenz zwischen den K_M^{app} -Werten der beiden Pools bei ambienten Temperaturen. Auch bei den Hälterungsexperimenten mit verschiedenen konstanten Temperaturen war diese Differenz der K_M^{app} -Werte zu beobachten und die Werte blieben für jeden einzelnen Pool im Bereich von -1°C bis $+8^\circ\text{C}$ nahezu konstant (Peters 1992). Dies könnte neben den bereits erwähnten Anzeichen (J-förmiger Kurvenverlauf der temperaturabhängigen K_M^{app} -Werte, $+8^\circ\text{C}$ -Hälterung) ein weiterer Hinweis darauf sein, daß die Temperaturtoleranz von *E. superba* eher der eines eurythermen Organismus entspricht.

Zusammenfassend können die Resultate aus den K_M^{app} -Bestimmungen wie folgt beschrieben werden: Mit Ausnahme von *O. ryderi* weisen die untersuchten Crustaceen bei ambienten Temperaturen vergleichbar niedrige K_M^{app} -Werte auf. Dementsprechend kann eine genotypische Temperaturkompensation auf enzymatischer Ebene erfolgen. Im Falle der tropischen Krabbe ist die verminderte Substrataffinität möglicherweise als Anpassung an hohe Umgebungstemperaturen zu verstehen. Als weiterer Regulationsmechanismus ist denkbar, daß bei eurythermen Arten gezielt Enzyme mit unterschiedlichen Substrataffinitäten eingesetzt werden. Dennoch muß berücksichtigt werden, daß die Differenzen zwischen den K_M^{app} -Werten unterschiedlicher Temperaturen insgesamt nur sehr gering sind. Daher ist anzunehmen, daß die Anpassung an niedrige Temperaturen nicht ausschließlich über die apparenten K_M -Werte erfolgt, sondern noch weitere Mechanismen beteiligt sind.

Mit Ausnahme von Pool A aus *E. superba* wurden alle untersuchten NAGase-Pools durch hohe Substratkonzentrationen gehemmt. Eine solche Hemmung tritt ein, wenn ein zweites Substratmolekül an das Enzym bindet, so daß ein katalytisch inaktiver Enzym-Substrat-Substrat-Komplex entsteht (Fersht 1985). Häufig tritt dieser Effekt nur als experimentelles Artefakt bei unphysiologisch hohen Konzentrationen auf (Kontro und Oja 1981). Bei der NAGase setzt die Hemmung z.T. bereits im Bereich des K_M^{app} -Wertes ein. Dies wurde nicht nur bei dem künstlichen Substrat pNp-NAG beobachtet, sondern auch

bei dem natürlichen Substrat Chitobiose (Spindler, pers. Mitteilung). Daher spielt diese Inhibition bei der Häutung möglicherweise eine wichtige Rolle: Das Chitin im Exoskelett wird durch die Chitinase (EC 3.2.1.14) in Aminozucker-Oligomere gespalten. Die Dimere (Chitobiose) stehen dann als Substrat für die NAGase zur Verfügung. Eine Inhibition der NAGase durch hohe Chitobiose-Konzentrationen hat zur Folge, daß die Dimere nicht vollständig abgebaut werden können. Somit stehen für die Synthese der neuen Kutikula neben Monomeren auch noch Dimere zur Verfügung. Beim Einbau von Chitobiose in das neue Chitingerüst müssen natürlich nur halb so viele Bindungen neu geknüpft werden, wie bei der Verwendung der Monomere, so daß der Neuaufbau des Chitinpanzers schneller und energiesparender erfolgen kann. Dieser Effekt könnte dadurch unterstützt werden, daß kurz vor und während der Häutung die Synthese der NAGase mit dem niedrigeren K_m -Wert induziert wird. Bisher liegen leider nur Ergebnisse über die Induktion der Gesamtaktivität vor, ohne nach Isoformen zu unterscheiden (Buchholz 1989).

Daneben interessiert natürlich auch, ob die Substrathemmung eine Funktion bei der Temperaturanpassung übernimmt. Jedoch war anhand der K_m -Werte keine Anpassung an die Untersuchungstemperatur zu erkennen. Lediglich beim interspezifischen Vergleich der Euphausiiden könnte ein Zusammenhang zwischen der Substrathemmung und der Herkunft der Versuchstiere bestehen. So liegen die durchschnittlichen Werte für *E. superba* stets höher als bei den vergleichbaren Pools von *Meganyctiphanes* (vgl. Tab. 4), d.h. die Hemmung ist beim antarktischen Krill am geringsten. Der Krill aus dem wärmsten Klima, *M. norvegica* (med.), weist stets die geringsten K_m -Werte auf. Dennoch läßt sich keine eindeutige Aussage über eine mögliche Temperaturanpassung mittels Substrathemmung treffen, da bei allen untersuchten Arten Pools mit hohen und niedrigen K_m -Werten gemeinsam vorkommen.

In Zusammenhang mit der Substrathemmung fällt weiterhin auf, daß die drei Pools bei *E. superba* völlig unterschiedliche kinetische Verhalten aufzeigen. Während A der Michaelis-Menten Kinetik folgt, wird C stark durch hohe Substratkonzentrationen gehemmt. Pool B nimmt eine Zwischenstellung ein (vgl. Abb. 7). Möglicherweise hängt dies damit zusammen, daß Pool B aus Untereinheiten aufgebaut ist, die sowohl bei Pool A als auch bei Pool C vorkommen. Beispielsweise treten bei der Lactat-Dehydrogenase, einem tetrameren Enzym, fünf Isoenzyme auf, die durch die Kombination von nur 2 verschiedenen Untereinheiten gebildet werden (Wilkinson 1974). Auch die NAGasen bzw.

Hexosaminidasen einiger anderer Arthropoden setzen sich aus Untereinheiten zusammen, z.B. bei *Bombyx mori* (Kimura 1976) und *Manduca sexta* (Dziadik-Turner et al. 1981). Die Molekulargewichte liegen zwischen 56 kDa bei *Artemia salina* und 150 kDa bei *Bombyx mori* (Übersicht in: Peters 1992). Für die NAGase aus *E. superba* wäre ein Modell denkbar, bei dem Pool A und C aus völlig verschiedenen Untereinheiten aufgebaut sein könnten, während B eine Kombination aus beiden darstellt. So wäre nicht nur das kinetische Verhalten erklärbar, sondern auch die Tatsache, daß Pool B eine mittlere Ionenladung trägt und daher zwischen A und C von der Ionentauscher-Säule eluiert. Auch die Ergebnisse der Molekulargewichtsbestimmung mittels Gelfiltration können unter diesem Gesichtspunkt interpretiert werden. Während A und C als jeweils einheitliches Enzym eluieren, verhielt sich B wie ein Gemisch aus 4 verschiedenen großen Molekülen. Diese könnten Aggregate aus Untereinheiten der Pools A und C sein. In einem solchen Fall müßten die einzelnen Fraktionen nach der Gelfiltration unterschiedliche kinetische Eigenschaften besitzen, die z.T. mit denen von Pool A und C vergleichbar sein müßten. Doch dies ist nicht der Fall, wie Peters (pers. Mitteilung) nachweisen konnte. Die einzelnen Fraktionen weisen das gleiche kinetische Verhalten wie Pool B auf. Demnach muß es sich bei Pool B auch um ein eigenständiges Enzym handeln, das nicht einfach durch Kombination aus A und C entstanden ist.

Die NAGase-Untersuchungen lieferten eine Vielzahl an Ergebnissen über die chromatographischen, strukturellen und kinetischen Charakteristika der Enzyme aus den unterschiedlichen Crustaceen. Die untersuchten Parameter zeigten häufig Übereinstimmungen bei den Enzymen der verschiedenen Spezies. Aufgrund dieser Gemeinsamkeiten lassen sich nur schwer spezielle Anpassungen an den jeweiligen Lebensraum ableiten. Abgesehen von den apparenten Michaelis-Konstanten, die jeweils im ambienten Bereich minimale Werte annahmen, wies keiner der übrigen Parameter eine Temperaturabhängigkeit auf, die einen Anpassungsmechanismus erkennen lassen würde. Da die NAGase-Synthese durch unterschiedliche Einflüsse induziert werden kann, z.B. durch Nahrungsaufnahme (Saborowski 1991, Saborowski und Buchholz 1991) oder durch Hormone bei der Häutung (Buchholz 1989), ist es durchaus denkbar, daß dieses Enzymsystem auch im Rahmen der Temperaturadaptation auf dem Wege der quantitativen Strategie reguliert wird: Bei niedrigen Temperaturen wird mehr Enzymprotein gebildet. Dieser Anpassungsmechanismus kann nur über die Quantifizierung der vorhandenen Enzymmenge nachgewiesen werden

(Clarke 1983). Entsprechende Untersuchungen mit Hilfe eines spezifischen NAGase-Antikörpers sind in Vorbereitung (Peters 1992). Möglicherweise erfolgt die Anpassung an niedrige Temperaturen im wesentlichen über die Enzymsynthese und die Modulation der kinetischen Parameter wird hauptsächlich für die Feinabstimmung eingesetzt.

Eigenschaften der Citrat-Synthase

Aus den vorgestellten Ergebnissen der NAGase ergibt sich außerdem die Frage, ob alle Enzyme mehr oder weniger einheitlich an die Umgebungstemperatur angepaßt sein müssen oder ob nicht bereits die Regulation einiger "wichtiger" Enzyme für eine erfolgreiche Temperaturadaptation ausreicht. Hydrolytische Enzyme wie die NAGase benötigen keine derart komplexen Regulationsmechanismen wie Enzyme des Energiestoffwechsels, die z.B. Teil eines permanent ablaufenden Stoffwechselweges oder -kreislaufes sind und die dem Einfluß unterschiedlicher Substrate und Modulatoren unterliegen. Möglicherweise werden einfache hydrolytische Enzyme durch Temperaturänderungen nicht so stark beeinträchtigt und zeigen daher auch kaum Abweichungen bei Arten aus unterschiedlichen Klimazonen (Hazel und Prosser 1970). Aus diesem Grund erscheint es sinnvoll, ein Enzym des Energiestoffwechsels, das eine Kontrollfunktion besitzt, auf mögliche Temperaturadaptation zu untersuchen. Die Citrat-Synthase (CS) reguliert den Citrat-Zyklus und übernimmt gemeinsam mit der α -Ketoglutarat-Dehydrogenase die Steuerung dieses zentralen Stoffwechselkreislaufes (Wiskich 1980). Daher wurden am Beispiel der CS verschiedene Regulationsmechanismen hinsichtlich möglicher Temperaturanpassungen untersucht.

Zunächst wurde die CS mit Hilfe der Anionentauscher-Chromatographie angereichert und die chromatographischen Eigenschaften wurden bestimmt. Die Elutionsparameter der CS aus den Euphausiiden waren nahezu identisch, die der Isopoden zeigten ebenfalls weitgehende Übereinstimmungen (vgl. Tab. 5). Jedoch traten deutliche Unterschiede zwischen diesen beiden Gruppen auf: Die CS der Isopoden eluieren ca. 10 Fraktionen früher als die der Euphausiiden. Außerdem bestehen hinsichtlich des Molekulargewichts Differenzen zwischen den beiden Crustaceen-Ordnungen. Die Euphausiiden-CS sind mit durchschnittlich 60 kDa geringfügig größer als die der Isopoden (50 kDa). Aufgrund der

Unterschiede bei den chromatographischen Merkmalen sind die Übereinstimmungen, die bei den meisten temperaturabhängigen Parametern und bei der Enzymkinetik auftreten, umso erstaunlicher.

Bei der CS besteht wie bei der NAGase kein Zusammenhang zwischen der Lage der Temperaturmaxima und der ambienten Temperatur der einzelnen Tiere (vgl. Abb. 12). Die thermische Stabilität dieses Enzyms ist mit der für NAGase vergleichbar. Im Gegensatz zur NAGase treten bei der CS der untersuchten Arten noch weniger Unterschiede bei den Temperaturcharakteristika auf. Die höchsten Aktivitäten liegen bei 40°C (Euphausiiden) bzw. geringfügig höher (Isopoden). Der Kurvenverlauf ist bei fast allen sehr ähnlich, bei *M. norvegica (katt.)* und *M. norvegica (med.)* sogar nahezu deckungsgleich. Die einzige Ausnahme bildet *E. superba*, deren CS bis 30°C einen deutlich geringeren Anstieg zeigt als alle anderen.

Daraus resultiert auch die niedrige Aktivierungsenergie (E_a) von nur 10.9 kJ/mol. Alle anderen E_a -Werte sind ca. 4-mal größer. Dies deutet eine Temperaturanpassung der CS an. Im Falle eines trypsinähnlichen Verdauungsenzymes konnte ebenfalls nachgewiesen werden, daß die Aktivierungsenergie eines antarktischen decapoden Krebses, *Chorismus antarcticus*, gegenüber Crustaceen wärmerer Klimate, z.B. *M. norvegica (katt.)*, um den Faktor 3 geringer ist (Dittrich 1992). Bei den antarktischen Arten ist die Aktivierungsenergie gegenüber den Krebsen aus gemäßigten Breiten stark erniedrigt. Da nur solche Moleküle reaktiv sind, deren Energie gleich E_a oder größer ist, führt die Erniedrigung der E_a zu einer Erhöhung der Anzahl reaktionsfähiger Moleküle (Hochachka und Somero 1980). Vor allem bei niedrigen Temperaturen, wenn die mittlere Energie der Moleküle geringer ist als bei höheren, bewirkt bereits eine geringe Senkung der E_a eine erhebliche Zunahme der reaktionsfähigen Teilchen (Hochachka und Somero 1984). Durch die Senkung auf ein Viertel des Vergleichswertes von *M. norvegica* könnte bei *E. superba* die niedrige E_a möglicherweise die Temperatureffekte bereits nahezu vollständig ausgleichen. Da eine solch große E_a -Erniedrigung bei dem antarktischen Isopoden *Serolis polita* gegenüber *Idotea baltica* (Ostsee) nicht auftrat, könnte der bei *E. superba* beschriebene Effekt auch auf die Lebensweise zurückgeführt werden. Als pelagisch lebender Organismus ist *E. superba* ständig darauf angewiesen, einen hohen Energiebedarf zu decken (Kils 1981, Clarke und Morris 1983). Dieses Problem besteht bei den benthischen Isopoden nicht im gleichen Maße, da sie viel weniger Energie für z.B. motorische

Leistungen aufbringen müssen. Dies zeigen auch die Respirationsmessungen an *S. polita* und *Glyptonotus antarcticus* (Übersicht in: Clarke 1983). Daher kann auf die Temperaturanpassung der CS über die Senkung der Aktivierungsenergie bei den Isopoden vermutlich verzichtet werden.

Die Ergebnisse über die pH-abhängige CS-Aktivität lassen, wie schon im Falle der NAGase, den Rückschluß zu, daß eine Temperaturanpassung nicht über pH-Änderungen erfolgt. Dies wäre nur möglich, wenn die CS eine ausgeprägte pH-Abhängigkeit aufweisen würde. Jedoch zeigt sie bei 0 °C im pH-Bereich von 7.0 bis 9.0 ein Plateau annähernd konstanter Aktivität zwischen 70% und 100% des Maximalwertes (vgl. Abb. 14). Dies gilt eingeschränkt auch bei 25 °C, denn nur bei pH-Werten über 8.5 sinkt die Aktivität geringfügig. Die einzige Ausnahme bildet *I. baltica*, deren CS-Aktivität bereits bei 0 °C nur von pH 7.5 bis 8.5 mindestens 70% des Maximums beträgt. Bei 25 °C erfolgt bei pH 9.0 sogar eine Aktivitätsabnahme auf 2%. Da in der Mitochondrienmatrix ein pH-Wert von ca. 8 vorliegt (Alberts et al. 1983), kann die CS aller untersuchten Crustaceen bei 0 °C und 25 °C unter optimalen pH-Bedingungen arbeiten. Eine Regulation der Aktivität über den pH-Wert kann daher sicherlich ausgeschlossen werden. Da dieser Parameter keine Abhängigkeit von der Temperatur zeigte, besteht vermutlich auch keine Möglichkeit der Temperaturanpassung mittels pH-Änderung wie sie von Freed (1971) und Clarke (1983) vorgestellt wurde.

Als nächstes wurde überprüft, ob bei der CS ähnlich wie bei der NAGase eine Modulation der K_M^{app} -Werte zur Anpassung an die Temperatur des natürlichen Lebensraumes führt. Da die CS eine Kondensationsreaktion katalysiert, an der zwei Substrate, Oxalacetat und Acetyl-CoA, beteiligt sind, wurden die temperaturabhängigen K_M^{app} -Werte für beide Substrate bestimmt.

Die K_M^{app} -Werte für Oxalacetat lassen keine Beziehung zur ambienten Temperatur der Tiere erkennen (vgl. Abb. 15). Bei den drei Euphausiiden und bei *S. polita* treten gleichförmige Kurvenverläufe mit einem sehr breiten Minimum von 0 °C bis ca. 15 °C auf. Oberhalb 15 °C steigt der K_M^{app} -Wert bei weiterer Temperaturerhöhung stetig an. Für *I. baltica* wurde bei allen untersuchten Temperaturen ein nahezu identischer K_M^{app} -Wert ermittelt. Ein ähnliches Bild liefert die Analyse der K_M^{app} -Werte für Acetyl-CoA (vgl. Abb. 16). Die Kurvenverläufe der einzelnen Arten unterscheiden sich kaum. Daraus ergibt

sich die Schlußfolgerung, daß keine Temperaturanpassung über die Konservierung der K_M^{app} -Werte (nach Hochachka und Somero 1984) erfolgt. Es existieren keine Minima bei ambienten Temperaturen. Im Falle von *M. norvegica (med.)* ist die Übereinstimmung eher zufällig, zumal das Minimum sehr flach ist und in ähnlicher Weise auch bei den anderen Euphausiiden zu beobachten ist. Eine mögliche Anpassung über eine Senkung des K_M^{app} -Wertes wäre im Falle von *E. superba* denkbar, da für den antarktischen Krill bei jeder Inkubationstemperatur die geringsten K_M^{app} -Werte bestimmt wurden. Allerdings müßte dann, falls eine solche Anpassung bei den Euphausiiden insgesamt verwirklicht wurde, der K_M^{app} -Wert der mediterranen Art am höchsten sein. Doch dies bestätigen die vorliegenden Ergebnisse nicht, da *M. norvegica (katt.)* stets die höchsten Werte bei beiden Substraten aufweist.

Auch im Falle der Isopoden trifft dieser Zusammenhang nicht ohne weiteres zu. Für Oxalacetat liegt bei 0 °C der K_M^{app} -Wert von *S. polita* zwar deutlich unter dem von *I. baltica*, doch für den K_M^{app} von Acetyl-CoA ist es genau umgekehrt (vgl. Abb. 15 und 16). Daraus ergibt sich die Frage, welches der beiden Substrate den größeren Einfluß auf die Regulation der CS ausübt. Wie die Ergebnisse der K_M^{app} -Bestimmungen bei allen Tieren zeigen, ist der K_M^{app} -Wert für Oxalacetat bei jeder Inkubationstemperatur um den Faktor 2 bis 7 geringer als der für Acetyl-CoA. Dementsprechend besitzt die CS eine wesentlich höhere Affinität für Oxalacetat, d.h. bereits bei geringen Konzentrationen von ca. 5 μ M Oxalacetat kann die CS mit halbmaximaler Geschwindigkeit arbeiten, vorausgesetzt, es steht Acetyl-CoA in sättigender Konzentration zur Verfügung. Somit wird selbst bei geringem Oxalacetat-Angebot die Katalyserate im wesentlichen durch die Acetyl-CoA-Konzentration bestimmt, weil Acetyl-CoA aufgrund des höheren K_M^{app} -Wertes eher limitierend auf die Enzymaktivität wirkt. Diese kinetischen Eigenschaften sind eine wichtige Voraussetzung für die Bedeutung der CS als Schlüsselenzym des Citratzyklus. Oxalacetat wird benötigt, um das Acetyl-CoA in diesen Kreislauf einzuschleusen. Während eines Zyklus wird das Acetyl-CoA abgebaut und das Oxalacetat wird wieder regeneriert. Dann steht es erneut zur Verfügung, um wieder mit Acetyl-CoA zu Citrat umgesetzt zu werden. Aus diesem Grund wäre es überflüssig, hohe Oxalacetat-Konzentrationen in den Mitochondrien zu erzeugen, weil dieses CS-Substrat permanent umgesetzt und regeneriert wird und somit mehr oder weniger konstant bleibt. Stattdessen bewirkt der niedrige K_M^{app} -Wert für Oxalacetat, daß bereits geringe Konzentrationen hohe Umsatzraten erlauben. Anders verhält es sich bei Acetyl-CoA. Dieses Substrat wird je nach Bedarf zur Verfügung

gestellt. Dann muß die CS über dieses Angebot reguliert werden: Je mehr Acetyl-CoA vorliegt, desto größer muß die CS-Aktivität werden. Nur so kann verhindert werden, daß Acetyl-CoA akkumuliert. Durch den niedrigen K_M^{app} -Wert für Oxalacetat bei gleichzeitig erhöhtem K_M^{app} für Acetyl-CoA kann somit die CS-Aktivität über das Acetyl-CoA-Angebot reguliert werden. Dabei bleibt zunächst einmal unberücksichtigt, daß die CS zusätzlich durch Effektoren gesteuert werden kann (Hofmann 1979, Stitt 1984).

Einer der wichtigsten Effektoren der CS ist das ATP (Stitt 1984). Bei hohen ATP-Konzentrationen wird die CS kompetitiv durch diesen Inhibitor gehemmt (Hofmann 1979). Unter diesem Gesichtspunkt betrachtet, erschien es möglich, daß eine Anpassung an niedrige Temperaturen nicht nur über die bisher vorgestellten Mechanismen wie z.B. qualitativer, quantitativer und modulierender Strategie, Kompensation und Konservierung (Hochachka und Somero 1980, Clarke 1983) erfolgen könnte. Alle Hypothesen über biochemische Temperaturanpassung basieren auf Modellen, die eine Optimierung der Enzymeigenschaften bei ambienten Temperaturen voraussetzen. Es wäre denkbar, daß auch die Inhibition einer biochemischen Reaktion temperaturabhängig verläuft und somit an einer Temperaturanpassung beteiligt sein könnte, falls diese Hemmung bei ambienten Temperaturen minimal wäre. Dies wurde für ATP als Inhibitor der CS untersucht. Da ATP das kinetische Verhalten von Oxalacetat nicht bemerkenswert verändert und Oxalacetat bei der Regulation der CS-Aktivität eine unbedeutende Rolle spielt (vgl. K_M^{app} -Werte), wurden die Studien zur ATP-Hemmung mit Acetyl-CoA als variablem Substrat bei konstanten Oxalacetat-Konzentrationen durchgeführt.

Zunächst fiel auf, daß der Zusatz von ATP auf die CS der Euphausiiden ungewöhnliche Auswirkungen zeigte. Bei allen Untersuchungstemperaturen war bei den Asseln stets eine kompetitive Hemmung zu beobachten, während minimale ATP-Konzentrationen beim Krill eine Steigerung der Maximalaktivität (V_{max}) bewirkten. Erst bei höherem ATP-Angebot setzte die kompetitive Hemmung ein, wobei die erhöhte V_{max} erhalten blieb (vgl. Abb. 19). Daraus kann eine physiologische Bedeutung für den Krill abgeleitet werden: Wenn der Energiebedarf steigt, wird mit Hilfe des Energiestoffwechsels (Glykolyse, Citratzyklus, Atmungskette etc.) ATP produziert. Geringe Mengen ATP erhöhen dann die maximale Katalyserate der CS. Dies hat bei niedrigen Substratkonzentrationen (Acetyl-CoA) zunächst keine Auswirkungen, sondern nur bei höheren. Das heißt also, nur wenn genügend Acetyl-CoA zur Verfügung steht, wird die Umsatzrate der CS erhöht. Damit wird erreicht, daß bei erhöhtem Energiebedarf das anfallende Acetyl-CoA schneller in den

Citratzyklus einfließt und schneller Energie bereit gestellt werden kann. Erst wenn die ATP-Konzentration in der Zelle einen bestimmten Schwellenwert erreicht, wird die Beeinflussung des Enzyms durch die kompetitive Hemmung erkennbar. Solange die Substratkonzentration hoch ist, macht sich diese Inhibition nur unwesentlich bemerkbar, da Acetyl-CoA und ATP um die gleiche Bindungsstelle des Enzyms konkurrieren. Erst bei sinkender Acetyl-CoA-Konzentration wird die CS-Aktivität spürbar verringert, so daß die Syntheserate von ATP abnimmt. Die Tatsache, daß die V_{\max} der CS noch erhöht ist, wirkt sich bei geringen Acetyl-CoA-Konzentrationen nicht aus, da die Initialsteigung (V_{\max}/K_M) konstant bleibt (vgl. Abb. 18). Die Rückkoppelung zwischen der CS und ATP erfolgt natürlich nicht nach einem einfachen "Ein-Aus"-Prinzip. Die Übergänge verlaufen fließend in Abhängigkeit von der jeweiligen ATP-Konzentration.

Für gewöhnlich treten Mischungen aus verschiedenen Inhibitor-Mechanismen gemeinsam bei allen Inhibitorkonzentrationen auf (Kontro und Oja 1981, Fersht 1985). Der wechselhafte Einfluß des ATP ist möglicherweise auf kooperative Effekte zurückzuführen. Dann müßten allerdings anstelle der Michaelis-Menten Kinetik sigmoide Aktivitätskurven auftreten (Ahlers et al. 1982). Solche Kurvenverläufe wurden jedoch nicht beobachtet. Daher ist der ATP-Einfluß nicht mit diesem Mechanismus zu erklären. Andererseits könnten auch allosterische Effekte bei der ATP-abhängigen Regulation eine Rolle spielen (Stitt 1984). In einem solchen Fall würde entweder V_{\max} oder der K_M^{app} -Wert beeinflusst (Jungermann und Möhler 1980). Doch auch dies trifft bei der CS der Euphausiiden nicht zu, da beide Parameter gleichzeitig variiert werden. Diese Tatsachen deuten auf einen anderen Mechanismus hin. Es wäre denkbar, daß die CS zwei unterschiedliche Bindungsstellen für ATP besitzt. Die erste Bindungsstelle mit einer hohen Affinität für ATP bewirkt die Aktivierung bei geringen Konzentrationen. Die zweite Bindungsstelle, an der es zu einer Konkurrenzreaktion zwischen ATP und Acetyl-CoA kommt, befindet sich vermutlich am aktiven Zentrum und besitzt eine geringere Affinität. Daher überwiegt bei niedrigen Inhibitorkonzentrationen der aktivierende Effekt, und die kompetitive Hemmung wird unbedeutend. Bei höheren ATP-Konzentrationen, wenn die erste Bindungsstelle bereits abgesättigt ist, tritt nur noch die kompetitive Hemmung in Erscheinung. Der erhöhte Wert für V_{\max} bleibt dabei natürlich erhalten. Die Existenz der beiden Bindungsstellen könnte anhand spezieller Bindungsstudien mit radioaktiv markiertem ATP nachgewiesen werden.

Für den Krill hat diese Koppelung aus Aktivierung und kompetitiver Hemmung den Vorteil, daß die Leistung der CS erhöht wird und die Regulationsfähigkeit erhalten bleibt. Verglichen mit den Isopoden, deren CS bereits mit beginnender ATP-Produktion eine kompetitive Hemmung zeigt, wird dieser Effekt bei den Euphausiiden durch die Aktivierung der CS bei geringen ATP-Konzentrationen vermieden. Aufgrund des stets hohen Energiebedarfs des Krills (Kils 1983) ist es sinnvoll, die CS auf die vorgestellte Art und Weise zu optimieren. Ein vergleichbarer Mechanismus ist bisher weder für andere Tiere, noch für ein anderes Enzym beschrieben worden. Diese Optimierung der CS kann als Anpassung an die pelagische Lebensweise des Krills angesehen werden. Inwiefern auch eine Adaptation an die ambiente Temperatur des Lebensraumes über den ATP-Einfluß erfolgt sein kann, wurde anhand der K_i -Werte für die kompetitive Hemmung überprüft.

Bei keiner untersuchten Art konnte eine Beziehung zwischen der ambienten Temperatur und den temperaturabhängigen K_i -Werten nachgewiesen werden. Die K_i -Werte blieben unabhängig von der Inkubationstemperatur über den gesamten Bereich von 0 °C bis 25 °C mehr oder weniger konstant (Abb. 21). Allerdings zeigten sich interspezifische Differenzen, die mit den unterschiedlichen Temperaturen der einzelnen Lebensräume in Zusammenhang stehen könnten. Während die durchschnittlichen K_i -Werte der Euphausiiden untereinander keine signifikanten Abweichungen aufwiesen, war der von *S. polita* signifikant erhöht, der von *I. baltica* erniedrigt.

Ein niedriger K_i -Wert bewirkt neben einer früh einsetzenden Hemmwirkung auch eine gute Regulation der Enzymaktivität durch den Inhibitor (Fersht 1985). Für die Isopoden läßt sich ableiten, daß bei der polaren Art auf die Regulation der CS-Aktivität durch ATP weitgehend verzichtet werden muß, um auch bei den niedrigen Temperaturen genügend hohe Umsatzraten zu erzielen. Selbst hohe ATP-Konzentrationen beeinflussen die CS-Aktivität nur geringfügig. Daraus resultiert eine verminderte Regulationsfähigkeit. Im Gegensatz dazu wird die CS der borealen Art aus dem gemäßigten Klima bereits bei geringen Mengen ATP wirksam inhibiert. Dies ermöglicht eine besonders gute Regulation in Abhängigkeit vom ATP-Angebot. Das bedeutet, daß der antarktische Isopode *S. polita* aufgrund der niedrigen Temperatur seines Lebensraumes einen Kompromiß zwischen Regulationsfähigkeit und angemessener Enzymaktivität schließen muß. Diesen Nachteil der verminderten Regulation kann er wahrscheinlich ohne weiteres in Kauf nehmen, da er als träger benthischer Organismus einen niedrigen Grundstoffwechsel besitzt (Clarke 1983), der nicht unbedingt über das ATP-Angebot gesteuert werden muß. *I. baltica* kann dagegen

auf eine höhere Regulationsfähigkeit zurückgreifen. Die Temperatur, der diese Art im natürlichen Lebensraum ausgesetzt ist, ermöglicht von vornherein höhere Aktivitäten, so daß sie sich diese Möglichkeit zur Regulation auf Kosten der Gesamtaktivität leisten kann. Ein solcher Zusammenhang zwischen ambienter Temperatur und den K_i -Werten besteht bei den Euphausiiden nicht. Bei diesen aktiven pelagischen Tieren ist die Regulation der Enzymaktivität über die ATP-Hemmung vermutlich essentiell. Die daraus resultierenden Nachteile können möglicherweise durch die bereits beschriebene ATP-Aktivierung teilweise ausgeglichen werden. Im Falle des antarktischen Krills *E. superba* muß ein weiterer Mechanismus eingesetzt werden, um die Kälte zu tolerieren. Dies ist mit Hilfe der erstaunlich niedrigen Aktivierungsenergie möglich, die nur ein Viertel des E_a -Wertes der anderen untersuchten Euphausiiden beträgt. Somit wird über die Koppelung verschiedener Mechanismen eine wirksame Anpassung erreicht.

Die bisher erörterten Ergebnisse über mögliche Adaptationen der CS deuten an, daß dieses Enzym über viele miteinander verknüpfte Anpassungsmechanismen verfügt, die je nach Lebensraum und Lebensweise eingesetzt werden müssen. Anhand der aufgezeigten Beispiele wäre für die CS der untersuchten Crustaceen der folgende, komplexe Mechanismus denkbar: Das konservativ vererbte Enzym des Energiestoffwechsels läßt nur geringen Spielraum für Variationsmöglichkeiten. Die kinetischen und chromatographischen Eigenschaften weisen mehrheitlich Übereinstimmungen auf. Die ersten Unterschiede, die im Zusammenhang mit Anpassungsmechanismen betrachtet werden könnten, treten bei den K_M^{app} -Werten für Acetyl-CoA auf, obwohl die Senkung der K_M^{app} -Werte bei *E. superba* ebensogut zufällig sein könnte. Dagegen zeigte sich eine erkennbare Abhängigkeit zwischen dem Einfluß von ATP und der Lebensweise bzw. der ambienten Temperatur. Es konnte nachgewiesen werden, daß bei der CS der ständig aktiven Euphausiiden durch geringe ATP-Konzentrationen eine Aktivierung erreicht wurde, die bei den trägen Isopoden nicht zu beobachten war. Andererseits konnte für die Isopoden eine Beziehung zwischen den K_i -Werten und der Temperatur des Lebensraumes hergestellt werden. Die CS des polaren Tieres wird nicht so stark durch ATP gehemmt wie die der verwandten Art aus der Ostsee. Dieser Zusammenhang besteht bei den Euphausiiden nicht, vermutlich weil die pelagischen Crustaceen auch bei niedrigen Temperaturen nicht auf die Regulation über die ATP-Hemmung verzichten können. Es wäre beispielsweise denkbar, daß sie ihre Stoffwechselrate für energieaufwendige Reaktionen erhöhen, wie z.B. bei der Flucht oder

bei der Häutung (Buchholz 1988), und anschließend, wenn der Energiebedarf wieder sinkt, das akkumulierende ATP für eine unverzügliche Hemmung des Citratzyklus sorgt. Stattdessen findet man beim antarktischen Krill eine extrem niedrige Aktivierungsenergie der CS. Möglicherweise kann auf diesem Weg der mit einem niedrigen K_t -Wert verbundene Nachteil wieder kompensiert werden. Demnach werden bei den einzelnen Tieren Anpassungsmechanismen unterschiedlichster Art kombiniert, um die mit der Lebensweise bzw. mit der Temperatur des Lebensraumes verbundenen Probleme optimal zu lösen.

Die abschließenden enzymatischen Untersuchungen wurden an den unterschiedlich gehälterten Tieren durchgeführt, um die kurzfristigen Temperaturanpassungen, sogenannte Akklimationen (Clarke 1983), zu studieren. Während Peters (1992) bei *E. superba* keine Einflüsse der Hälterungstemperatur auf die Eigenschaften der NAGase nachweisen konnte, zeigten die Ergebnisse der CS deutliche Unterschiede bei den vergleichend untersuchten Arten *E. superba* und *M. norvegica* (katt.). Am Beispiel der K_m^{app} -Werte für Acetyl-CoA konnten erste Abweichungen zwischen den beiden Tieren festgestellt werden. Im Gegensatz zur CS des antarktischen Krills, die über den gesamten Temperaturbereich annähernd gleiche Werte für die gehälterten Tieren wie für die Freilandtiere aufwies, bestand bei *M. norvegica* (katt.) ein Zusammenhang zwischen der Hälterungstemperatur und den temperaturabhängigen K_m^{app} -Werten (vgl. Abb. 22). Die Minima der K_m^{app} -Werte stimmten jeweils mit der Hälterungstemperatur überein (Tab. 8), so daß für die gehälterten Tiere bei ambienten Temperaturen die Substrataffinität am höchsten war. Dagegen zeigten die K_t -Werte bei beiden Krillarten keine Beziehung zur Hälterungstemperatur (vgl. Abb. 23). Diese Ergebnisse bestätigen die Vermutung, daß ein konstant niedriger K_t -Wert für den Krill essentiell ist, z.B. wegen der damit verbundenen Regulationsfähigkeit. Eine Variation der apparenten K_m -Werte zur Temperaturanpassung scheint dagegen möglich zu sein. Bei dem eurythermen nordischen Krill erfolgte innerhalb der 11-tägigen Hälterung bei konstanter Temperatur eine Akklimation an diese Verhältnisse, indem die Substrataffinität bei den jeweiligen Hälterungstemperaturen erhöht wurde.

Eine Adaptation der Freilandtiere, d.h. U-förmige Kurven mit Minima im ambienten Bereich, wie z.B. bei der NAGase, ist nicht zu bemerken. Dies könnte mit einer geringeren Variabilität der CS zusammenhängen. Dementsprechend fallen im Vergleich zur NAGase die Differenzen der K_m^{app} bei verschiedenen Temperaturen kleiner aus (vgl. Abb. 10 und 16). Die Unterschiede zwischen den gehälterten und den Freilandtieren sind damit

zu erklären, daß die eurythermen Tiere in ihrer natürlichen Umgebung viel größeren Temperaturschwankungen ausgesetzt sind als während der Hälterung bei konstanten Temperaturen. Daher könnte das gemeinsame Auftreten von Enzymen mit unterschiedlicher Affinität dazu führen, daß sich die einzelnen Effekte überlagern. Die K_m^{app} -Werte der Freilandtiere nehmen daher stets mittlere Werte an (vgl. Abb. 22b). Die für *M. norvegica* (*katt.*) beschriebene Akklimation konnte bei *E. superba* nicht beobachtet werden. Dies könnte in Zusammenhang mit der stenothermen Lebensweise des antarktischen Krills stehen. Unter natürlichen Bedingungen ist *E. superba* nur geringen Temperaturschwankungen ausgesetzt, während *M. norvegica* (*katt.*) ständig mit unterschiedlichen Wassertemperaturen konfrontiert wird. Daraus ergibt sich für das eurytherme Tier die Notwendigkeit, seine Enzyme auch kurzfristig anzupassen. Dies ist bei stenothermen Verhältnissen nicht notwendig, so daß *E. superba* auch keine entsprechenden Mechanismen ausgebildet hat.

Die Hälterungsexperimente mit den beiden Euphausiiden lieferten auch Ergebnisse über die spezifische Aktivität der CS, die im Zusammenhang mit den Temperaturschwankungen der jeweiligen Lebensräume interpretiert werden können. Wie zu erwarten war, stieg die spezifische Aktivität bei höheren Inkubationstemperaturen (vgl. Abb. 24). Der Zusatz von 0.4 mM ATP bewirkte bei allen Experimenten eine Erhöhung der spezifischen CS-Aktivität gegenüber den Versuchen ohne ATP-Zusatz. Neben dieser Gemeinsamkeit fällt ein deutlicher Unterschied zwischen beiden Tieren auf: Während bei *E. superba* bei allen Versuchsgruppen mit unterschiedlichen Hälterungstemperaturen eine annähernd gleichförmige Zunahme der spezifischen Aktivität mit steigender Inkubationstemperatur zu beobachten ist, gibt es bei *M. norvegica* (*katt.*) deutliche Unterschiede bei den einzelnen Versuchsreihen. Die spezifische Aktivität steigt mit zunehmender Inkubationstemperatur stärker, wenn die Tiere bei niedrigen Temperaturen gehältert wurden, d.h. im Gegensatz zu den bei 0°C gehälterten Tieren bewirkt die Erhöhung der Inkubationstemperatur bei den 16°C-Tieren nur einen geringfügigen Anstieg der spezifischen Aktivität (vgl. Abb. 24). Demnach bewirken niedrige Hälterungstemperaturen bei *M. norvegica* (*katt.*) entweder die Synthese einer CS mit höherer spezifischer Aktivität oder die CS-Synthese wird gegenüber anderen Proteinen gesteigert.

Anhand der vorliegenden Ergebnisse kann keine der beiden Möglichkeiten ausgeschlossen werden. Die erhöhte spezifische Aktivität könnte einfach darauf zurückzuführen sein, daß bei niedrigen Temperaturen ein modifiziertes CS-Molekül mit entsprechend hoher spezifischer Aktivität synthetisiert wird. Doch ebensogut ist die andere Möglichkeit

denkbar, daß nämlich die Synthese der CS bei niedrigen Temperaturen überproportional zu anderen Proteinen gesteigert wird. Das wäre wie folgt zu erklären: Die Untersuchungen wurden nicht mit hochgereinigten Enzymen durchgeführt, sondern mit angereicherten Lösungen nach nur einem Reinigungsschritt. Diese Lösungen enthielten mit Sicherheit außer der CS noch weitere Proteine. Angenommen, das Elutionsverhalten der CS wäre dem eines beliebigen Struktur- oder Muskelproteins ähnlich und die CS-Fractionen beinhalten nach dem FPLC-Lauf auch größere Mengen dieses Proteins, dann würde die gesteigerte CS-Synthese bei niedrigen Temperaturen dazu führen, daß sich das Verhältnis CS zu Strukturprotein zugunsten der CS verschieben würde, da die Konzentration des Strukturproteins als konstant angesehen werden kann. Die erhöhte CS-Konzentration würde bei einer Proteinbestimmung allerdings nur eine geringe Veränderung des Gesamtprotein-gehaltes verursachen, da sie im Vergleich zur Konzentration des Strukturproteins unbedeutend ist. Bei der Bestimmung von V_{\max} würde die CS aufgrund der gestiegenen CS-Konzentration natürlich höhere Aktivitäten erreichen. Somit würde der Quotient aus V_{\max} und Proteingehalt größer werden, und daraus resultierte eine höhere spezifische Aktivität. Ganz unabhängig davon, auf welche Weise *M. norvegica* (katt.) bei niedrigen Temperaturen die spezifische Aktivität der CS erhöht hat, bleibt festzustellen, daß dieser Effekt bei *E. superba* nicht auftrat.

Eine Steigerung der spezifischen CS-Aktivität bei niedrigen Temperaturen wurde auch beim Streifenbarsch *Morone saxatilis* gefunden (Jones und Sidell 1982). Allerdings war der Effekt bei diesem Fisch viel geringer als bei *M. norvegica* (katt.). Während beim Krill das Verhältnis der spezifischen Aktivitäten (gemessen bei 15 °C) zwischen Tieren, die bei 0 °C und 16 °C gehältert wurden, ca. 5:1 beträgt, wurde beim Barsch nur ein Quotient von ca. 1.6 ermittelt und das, obwohl die beiden Hälterungstemperaturen der Fische mit 5 °C und 25 °C eine größere Differenz aufwiesen. In der gleichen Arbeit (Jones und Sidell 1982) wurden auch noch die spezifischen Aktivitäten weiterer Enzyme bei *M. saxatilis* untersucht. Dabei wurden für das Verhältnis der spezifischen Aktivitäten der 5 °C-Tiere zu den 25 °C-Tieren Quotienten zwischen 0.97 (Lactat-Dehydrogenase) und 1.97 (Cytochrom-Oxidase) berechnet. Ähnliche Quotienten wurden auch für verschiedene andere Stoffwechsellenzyme bei diversen Fischen ermittelt (Übersicht in: Clarke 1983).

Ein weiterer Unterschied zwischen den beiden Euphausiiden besteht in der Höhe der Absolutwerte der spezifischen Aktivität. Die Werte sind bei *M. norvegica* (katt.) bis zu 5-mal höher als bei *E. superba*. Jedoch sind diese Zahlen nicht vergleichbar, weil auch

hierbei berücksichtigt werden muß, daß nicht mit hochgereinigten Enzymen gearbeitet wurde. Die spezifische Aktivität kann als Vergleichsgröße nur innerhalb einer Art angewendet werden, da der Anteil an Fremdprotein in den mit der Ionentauscher-Chromatographie gewonnenen CS-Lösungen bei zwei Arten stark variieren kann. Anhand des oben beschriebenen Beispiels mit dem Strukturprotein könnte auch die Differenz der spezifischen Aktivität zwischen den beiden Euphausiiden veranschaulicht werden. Die insgesamt höheren Werte der spezifischen Aktivität bei *M. norvegica* (katt.) könnten allein mit einem höheren Gehalt an Fremdprotein in der CS-Lösung von *E. superba* erklärt werden. Daher darf die Bezugsgröße "Gesamtprotein" bei diesen Untersuchungen nicht für einen interspezifischen Vergleich herangezogen werden.

Die unterschiedlichen Ergebnisse für die spezifischen Aktivitäten, die von der Hälterungstemperatur abhängig sind, deuten einen Zusammenhang mit den im natürlichen Lebensraum auftretenden Temperaturschwankungen an. Dieser Zusammenhang wird besonders deutlich, wenn nur die Werte einiger ausgewählter Experimente gegenübergestellt werden. Für einen solchen Vergleich wurden nur die spezifischen Aktivitäten berücksichtigt, die bei solchen Inkubationstemperaturen ermittelt wurden, die annähernd den Hälterungstemperaturen entsprachen, d.h. die Ergebnisse der 0°C-Tiere bei 0°C, die der 8°C-Tiere bei 10°C usw. (vgl. Abb. 25). Während die Werte bei *E. superba* mehr oder weniger kontinuierlich ansteigen, treten bei *M. norvegica* (katt.) bei steigender Inkubationstemperatur sogar sinkende spezifische Aktivitäten auf. Bei *E. superba* bewirkt eine Erhöhung der Inkubationstemperatur von 0°C auf 10°C eine Verdoppelung der spezifischen Aktivität. Dagegen bleibt der Wert bei *M. norvegica* (katt.) in diesem Temperaturbereich konstant. Das bedeutet, daß der eurytherme nordische Krill seine spezifische Aktivität an die Hälterungstemperatur anpaßt, indem dieser Wert bei den jeweils vorherrschenden Temperaturen konstant gehalten wird. Die spezifische Aktivität wird bei niedrigen Temperaturen erhöht, so daß die infolge der Kälte langsamere enzymatische Reaktion ausgeglichen werden kann. Eine derartige Anpassung an die Hälterungstemperatur konnte bei dem stenothermen Tier aus der Antarktis nicht beobachtet werden. Die Aktivität der CS von *E. superba* verdoppelt sich bei einer Temperaturerhöhung um 10°C und entspricht damit dem durchschnittlichen Q_{10} -Wert von annähernd 2.0 (Clarke 1983, Hochachka und Somero 1984).

Dieser gravierende Unterschied zwischen *E. superba* und *M. norvegica* (katt.) kann als Anpassung an die natürlichen Temperaturschwankungen angesehen werden. Das eury-

therme Tier muß in der Lage sein, sich periodisch auf unterschiedliche Temperaturen in seiner natürlichen Umgebung einzustellen. Dies geschieht mit Hilfe der variablen spezifischen Aktivität. Dadurch ist die Enzymaktivität nicht nur von der ambienten Temperatur abhängig, sondern kann auch über die gezielte CS-Synthese reguliert werden. Obwohl aus der spezifischen Aktivität nicht auf die tatsächlich vorhandene Menge an Enzym geschlossen werden kann, so deutet der oben beschriebene Zusammenhang die Möglichkeit der Regulation mit Hilfe der quantitativen Strategie an. Bei dem stenothermen Krill, der nur im jahreszeitlichen Wechsel Temperaturschwankungen von maximal 4 °C erfährt, erfolgte während der 11-tägigen Hälterung keine derartige Anpassung, da sie unter natürlichen Bedingungen in diesem Zeitraum auch nicht erforderlich ist. Möglicherweise könnten Unterschiede auftreten, wenn der Hälterungszeitraum länger gewählt würde oder wenn Sommer- und Wintertiere von *E. superba* bei entsprechender Hälterung gegenübergestellt werden könnten. Aufgrund der vorliegenden Ergebnisse ist jedoch zu vermuten, daß die Hälterung beim stenothermen antarktischen Krill stets geringere Auswirkungen hätte als bei der eurythermen nordischen Art. Besonders interessant wären unter diesem Gesichtspunkt Hälterungsexperimente mit dem stenothermen Krill *M. norvegica* (*med.*).

Schlußbetrachtung

Der Vergleich der beiden Enzyme NAGase und CS lieferte neben einigen Gemeinsamkeiten auch deutliche Unterschiede hinsichtlich möglicher temperaturbedingter Anpassungsmechanismen. Die Übereinstimmungen betrafen überwiegend die Parameter, die keine Beziehung zur jeweils ambienten Temperatur der Versuchstiere erkennen ließen: die Temperatur- und pH-Optima. Besonders auffällig waren die hohen Temperaturstabilitäten der Enzyme aus den Polargebieten, die mit denen der anderen Crustaceen absolut vergleichbar waren. Die Temperaturen maximaler Enzymaktivität lagen stets weit außerhalb des ambienten Bereiches, pH-Optima traten entweder gar nicht (CS) oder nur bei Temperaturen über 15 °C (NAGase) auf.

Abgesehen von diesen Übereinstimmungen unterschieden sich die einzelnen Anpassungsmechanismen der beiden Enzyme grundlegend. Während die NAGase hauptsächlich nur eine Modulation der K_M^{app} -Werte als Adaptation an ambiente Temperaturen aufwies, waren die einzelnen Anpassungen der CS wesentlich vielfältiger und komplex

miteinander verbunden. Mit Hilfe der Hälterungsversuche konnten auch kurzfristige Anpassungen (Akklimationen) der CS nachgewiesen werden, die bei der NAGase nicht zu beobachten waren. Die Anpassungen an ambiente Temperaturen und an die Lebensweise sind bei der CS über verschiedene Mechanismen möglich, die sich gegenseitig ergänzen. Neben der Aktivierungsenergie und der spezifischen Aktivität spielt vor allem der Effektor ATP eine entscheidende Rolle bei der biochemischen Anpassung der untersuchten Crustaceen. Obwohl die vorliegenden Ergebnisse keine direkten Rückschlüsse auf die Existenz der quantitativen Strategie zulassen, besteht jedoch die Möglichkeit, daß bei *M. norvegica* (*katt.*) die Erhöhung der spezifischen Aktivität bei niedrigen Temperaturen auf diesen Anpassungsmechanismus zurückzuführen ist. Die Tatsache, daß in ein und demselben Tier bei zwei Enzymen völlig verschiedene Mechanismen zur Temperaturanpassung eingesetzt werden können, erfordert detaillierte Untersuchungen an mehreren Enzymen oder Enzymsystemen, wenn Adaptationsmechanismen nachgewiesen werden sollen. Respirationsmessungen oder Untersuchungen an Rohextrakten allein können derart verknüpfte Zusammenhänge, die sowohl durch die Lebensweise, die Variabilität des Lebensraumes und das Temperaturregime bedingt werden, nicht erfassen.

Bei allen Untersuchungen über Mechanismen der Temperaturanpassung ist es notwendig, den Bezug zum Lebensraum herzustellen. Ergebnisse, die bei physiologisch irrelevanten Labortemperaturen ermittelt wurden, können bestenfalls als deskriptive Kenngröße verwendet werden. Es ist nicht selbstverständlich, daß die bei 25 °C gemessenen Effekte für die bei 0 °C bis 5 °C lebenden Tiere überhaupt von Bedeutung sind, wie am Beispiel der pH-Optima der NAGase gezeigt werden konnte. Daher sollten Anpassungsmechanismen, die auf pH-Optima oder pH-Änderungen zurückgeführt werden (z.B. Dittrich 1992), stets kritisch betrachtet werden, sofern sie nicht bei ambienten Temperaturen ermittelt wurden.

Die vorgestellten Mechanismen biochemischer Anpassung veranschaulichen die ökophysiologische Bedeutung der Enzymregulation. Gerade am Beispiel der CS konnte gezeigt werden, wie vielfältig die einzelnen Mechanismen sind, die bei unterschiedlichen Tieren zu einer Adaptation an den jeweiligen Lebensraum bzw. die Lebensweise geführt haben.

Mit Hilfe der vorliegenden Arbeit konnten zum ersten Mal komplexe Beziehungen bei der Temperaturadaptation nachgewiesen werden. Dies war nur dadurch möglich, daß einzelne, gut kontrollierbare Reaktionen untersucht wurden. Dabei zeigte sich, daß es für

den Nachweis derartiger Zusammenhänge unumgänglich ist, gezielt isolierte Enzyme zu charakterisieren. Nur so können Effekte, die nur geringfügig an einer Regulation beteiligt sind, erkannt werden. Darüberhinaus treten einige Mechanismen nur bei Vergleichsexperimenten in Erscheinung, die sonst leicht übersehen werden könnten. Daher sollten auch in Zukunft stets vergleichende Untersuchungen nah verwandter Arten im Vordergrund stehen.

Anhand der vorliegenden Ergebnisse konnte gezeigt werden, daß neben den bereits beschriebenen Strategien biochemischer Anpassung weitere Regulationsmechanismen bei den Crustaceen existieren, die sowohl eine Anpassung an die Lebensweise als auch an den Lebensraum darstellen. Diese Erkenntnisse konnten nur anhand der enzymatischen Untersuchungen erzielt werden. So wurde ein Grundstock für weitere Analysen von isolierten Enzymen gelegt, da auf diesem Wege die Anpassungsmechanismen am besten aufgezeigt werden können. Die Aussagekraft dieser Ergebnisse gegenüber Untersuchungen von Rohextrakten wurden am Beispiel der NAGase besonders deutlich.

Aufbauend auf diese Arbeit könnten weitere Untersuchungen an isolierten Enzymen des Energiestoffwechsels durchgeführt werden. Ebenso wichtig erscheint es, mit Hilfe von Antikörpern (Peters 1992) die in dieser Arbeit nicht untersuchte Möglichkeit der Temperaturanpassung mittels quantitativer Strategie zu überprüfen.

ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Arbeit sollten die Mechanismen der enzymatischen Temperaturanpassung bei Invertebraten am Beispiel der beiden Enzyme N-Acetyl- β -D-glucosaminidase und Citratsynthase modellhaft untersucht werden. Die Enzyme wurden chromatographisch angereichert und die enzymespezifischen Parameter auf Temperaturabhängigkeiten untersucht. Dazu gehörten die pH-Optima, Substrataffinität und -hemmung sowie der Einfluß von Effektoren. Außerdem wurden die Aktivierungsenergien anhand der sogenannten Temperaturoptimumskurven berechnet. Ein Vergleich der temperaturabhängigen Enzymeigenschaften ermöglichte es dann, Rückschlüsse auf die einzelnen Mechanismen der Temperaturanpassung zu ziehen.

Als Versuchstiere wurden Crustaceen aus verschiedenen Klimazonen ausgewählt, die sich hinsichtlich ihres Lebensraumes und ihrer Lebensweise unterscheiden: die pelagischen Euphausiiden *Euphausia superba* aus der Antarktis, *Meganyctiphanes norvegica* aus dem Kattegat und aus dem Mittelmeer, die benthischen Isopoden *Serolis polita* aus der Antarktis und *Idotea baltica* aus der Ostsee sowie die tropische Krabbe *Ocyropsis ryderi*.

Anhand der Ergebnisse konnten komplexe Vorgänge, die an der Regulation von Enzymaktivitäten beteiligt sind, detailliert dargestellt werden. Es wurden zum ersten Mal bei Invertebraten verschiedene Möglichkeiten der Temperaturanpassung auf enzymatischer Ebene aufgezeigt, die bei Akklimationen und Adaptationen von Bedeutung sind. Dabei stellte sich heraus, daß gleichzeitig verschiedene Mechanismen bei unterschiedlichen Enzymen einer Tierart auftreten können. Demnach können die einzelnen Enzyme völlig verschieden reguliert werden. Andererseits treten auch bei den gleichen Enzymen diverser Tiere unterschiedliche Anpassungsmechanismen auf.

Für die NAGase konnte nur ein Mechanismus nachgewiesen werden, mit dem eine Temperaturadaptation möglich ist: Erhöhung der Substrat-Affinität bei ambienten Temperaturen und Konservierung des minimalen K_m^{app} bei verschiedenen Crustaceen-Arten. Allerdings ist der daraus resultierende Effekt zu gering, um die Leistungsfähigkeit der kaltadaptierten Tiere vollständig zu erklären. Daher wird vermutet, daß eine weitere Anpassung,

beispielsweise über die Enzymsynthese, erforderlich ist. Weitergehende immunologische Arbeiten könnten den entsprechenden Nachweis für diesen Mechanismus erbringen.

Am Beispiel der CS wurde ein komplexer Regulationsweg nachgewiesen, der mehrere verschiedene Anpassungsformen beinhaltet. Diese Anpassungen stehen in engem Zusammenhang mit dem ambienten Temperaturregime und mit der Lebensweise. Daraus läßt sich der Einfluß der Ökologie auf die Physiologie der jeweiligen Tiere unmittelbar ableiten. Die einzelnen Mechanismen, wie z.B. Senkung der Aktivierungsenergie, verringerter Einfluß durch Inhibitoren etc., sind dabei eng miteinander verknüpft. Auf diese Weise können gleichzeitig mehrere Parameter bei der Anpassung beeinflusst werden, je nachdem ob das Tier benthisch oder pelagisch, eury- oder stenotherm lebt bzw. aus welcher Klimazone es stammt. Besonders auffällig war in diesem Zusammenhang die bisher unbekannte Aktivierung der CS durch ATP bei den Euphausiiden. Der Einfluß des kompetitiven Inhibitors ATP ermöglicht dem pelagischen Krill eine im Bedarfsfall erhöhte enzymatische Umsatzrate bei gleichzeitig guter Regulationsfähigkeit durch das Endprodukt des Energiestoffwechsels.

Es konnte gezeigt werden, daß neben den bereits bekannten Anpassungsmechanismen, die bei Fischen nachgewiesen wurden, bei den Invertebraten noch weitere adaptive Möglichkeiten bestehen. Die Ergebnisse verdeutlichen die Notwendigkeit, möglichst alle beeinflussenden Faktoren zu untersuchen. Dies ist nur mit Hilfe detaillierter Untersuchungen an einzelnen Enzymen möglich. Dabei sollte vermieden werden, enzymatische Parameter in Rohextrakten zu ermitteln, da bei derartigen Experimenten stets mit unvorhersehbaren Effekten gerechnet werden muß, wie am Beispiel der NAGase aufgezeigt werden konnte. Daher wäre es auch bei zukünftigen Untersuchungen notwendig, mit gereinigten Enzymen zu arbeiten, um die einzelnen Mechanismen biochemischer Temperaturanpassung zu erfassen.

LITERATUR

- AHLERS, J., ARNOLD, A., DÖHREN, R., FR. VON, PETER, H.W. (1982): Enzymkinetik. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 212 pp
- ALBERTS, B., BRAY, D., LEWIS, J., RAFF, M., ROBERTS, K., WATSON, J.D. (1983): Molecular biology of the cell. Garland Publishing, Inc., New York London, 1146 pp
- BALDWIN, J. (1971): Adaptation of enzymes to temperature: Acetylcholinesterases in the central nervous system of fishes. *Comp. Biochem. Physiol.* **40B**: 181-187
- BALDWIN, J., HOCHACHKA, P.W. (1970): Functional significance of isoenzymes in thermal acclimation: Acetylcholinesterase from trout brain. *Biochem. J.* **116**: 883-887
- BOROOAH, J., LEABACK, D.H., WALKER, P.G. (1961): Studies on Glucosaminidase: Substrates for N-Acetyl- β -Glucosaminidase. *Biochem. J.* **78**: 106-110
- BOYSEN, E., BUCHHOLZ, F. (1984): *Meganyctiphanes norvegica* in the Kattegat. Studies on the annual development of a pelagic population. *Mar. Biol.* **79**: 195-207
- BRADFORD, M.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
- BUCHHOLZ, F. (1988): Zur Lebensweise des antarktischen und nordischen Krills *Euphausia superba* und *Meganyctiphanes norvegica*: Vergleichende Untersuchungen der Häutungsphysiologie und des Wachstums im Freiland und Labor. Berichte aus dem Institut für Meereskunde an der Christian-Albrechts-Universität, Kiel, **185**: 245 pp
- BUCHHOLZ, F. (1989): Moults cycle and seasonal activities of chitinolytic enzymes in the integument and digestive tract of the Antarctic krill, *Euphausia superba*. *Polar Biol.* **9**: 311-317

- HOFFMANN, K.H. (1976): Catalytic efficiency and structural properties of invertebrate muscle pyruvate kinases: Correlation with body temperature and oxygen consumption rates. *J. Comp. Physiol.* **110**: 185-195
- HOFMANN, E. (1979): *Enzyme und Bioenergetik - Dynamische Biochemie, Teil II.* Akademie-Verlag, Berlin, 250 pp
- ISAACS, J.E., KIDD, L.W. (1953): Isaacs-Kidd midwater trawl. Univ. Calif. Scripps Institution of Oceanography, SCIO Ref. 53-3: 1-18
- JOKUMSEN, A., WELLS, R.M.G., ELLERTON, H.D., WEBER, R.E. (1981): Hemocyanin of the giant antarctic isopod, *Glyptonotus antarcticus*: Structure and effects of temperature and pH on its oxygen affinity. *Comp. Biochem. Physiol.* **22**: 261-272
- JUNGERMANN, K., MÖHLER, H. (1980): *Biochemie.* Springer Verlag, Berlin, 733 pp
- JONES, P.L., SIDELL, B.D. (1982): Metabolic responses of striped bass (*Morone saxatilis*) to temperature acclimation. II) Alterations in metabolic carbon sources and distributions of fiber types in locomotory muscle. *J. Exp. Zool.* **219**: 163-171
- KILS, U. (1979): Schwimmverhalten, Schwimmleistung und Energiebilanz des antarktischen Krills, *Euphausia superba*. Ergebnisse der 2. deutschen Antarktis-Expedition des FFS "Walther Herwig" im Südsommer 1977/78. Berichte aus dem Institut für Meereskunde an der Christian-Albrechts-Universität, Kiel, 147 pp
- KILS, U. (1981): Swimming behaviour, swimming performance and energy balance of Antarctic krill, *Euphausia superba*. *BIOMASS Sci. Ser.* Vol. 3, 122 pp
- KILS, U. (1983): Swimming and feeding of Antarctic krill, *Euphausia superba* - some outstanding energetics and dynamics, some unique morphological details. *Ber. Polarforsch. Sonderh.* **4**: 130-155
- KIMURA, S. (1976): Insect haemolymph exo- β -N-acetylglucosaminidase from *Bombyx mori*. Purification and properties. *Biochim. Biophys. Acta* **446**: 399-406

- KONTRO, P., OJA, S.S. (1981): Enzyme kinetics. In: Lahve, R. (ed.): *Methods in Neurobiology*, Vol. 1, Plenum Press, New York, 265-337
- LINEWEAVER, H., BURK, D. (1934): Determination of enzyme dissociation constants. *J. Amer. Chem. Soc.* **56**: 658-666
- MACDONALD, J.A., MONTGOMERY, J.C., WELLS, R.M.G. (1987): Comparative physiology of Antarctic fishes. *Adv. Mar. Biol.* **24**: 322-357
- MANNERVIK, B. (1982): Regression analysis, experimental error and statistical criteria in the design and analysis of experiments for discrimination between rival kinetic models. *Meth. Enzymol.* **87**: 370-390
- MICHAELIS, L., MENTEN, M.L. (1913): Kinetik der Invertasewirkung. *Biochem. Z.* **49**: 333-369
- MICHAL, G. (1984): Determination of michaelis constants and inhibitor constants. In: Bergmeyer, H.U. (ed.): *Methods of Enzymatic Analysis*, Vol. I, Verlag Chemie, Weinheim, 86-104
- MORTIMER, C.E. (1983): *Chemie*. Thieme Verlag, Stuttgart, 324-326
- PETERS, G. (1992): Zur enzymatischen Temperaturanpassung des antarktischen Krills, *Euphausia superba*: Reinigung und Untersuchung der Eigenschaften der N-Acetyl- β -D-Glucosaminidase. *Diplomarbeit*, Christian-Albrechts-Universität, Kiel, 92 pp
- RAKUSA-SUSZCZEWSKI, S., OPALINSKI, W. (1978): Oxygen consumption in *Euphausia superba*. *Pol. Arch. Hydrobiol.* **3**: 633-641
- REEVES, R.B. (1977): The interaction of body temperature and acid-base balance in ectothermic vertebrates. *Ann. Rev. Physiol.* **39**: 559-586
- REICHARDT, W. (1987): Differential temperature effects on the efficiency of carbon-pathways in Antarctic marine benthos. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **40**: 127-135

- SABOROWSKI, R. (1991): Chitin im Phytoplankton und die Induktion chitinolytischer Enzyme im Verdauungstrakt des antarktischen Krills, *Euphausia superba*. Diplomarbeit, Christian-Albrechts-Universität, Kiel, 118 pp
- SABOROWSKI, R., BUCHHOLZ, F. (1991): Induktion von Enzymen im Verdauungstrakt des antarktischen Krills, *Euphausia superba*. Verh. Dtsch. Zool. Ges. **84**: 422
- SABOROWSKI, R., DONACHI S., PETERS G., VETTER, R.A.H., BUCHHOLZ, F. (1992): Die Bedeutung der Bakterien im Verdauungstrakt von *Meganyctiphanes norvegica* bei der Enzymproduktion. Verh. Dtsch. Zool. Ges. **85.1**: 164
- SACHS, L. (1984): Angewandte Statistik. Springer Verlag, Berlin, 552 pp
- SHAKLEE, J., CHRISTIANSEN, J.A., SIDELL, B.D. (1977): Molecular aspects of temperature acclimation in fish: Contributions of changes in enzyme activities and isozyme patterns to metabolic reorganization in the green sunfish. J. Exp. Zool. **201**: 1-20
- SPINDLER, K.-D. (1976): Initial characterization of chitinase and chitobiase from the integument of *Drosophila hydei*. Insect. Biochem. **6**: 663-667
- SPINDLER, K.-D., BUCHHOLZ, F. (1988): Partial characterization of chitin degrading enzymes from two euphausiids, *Euphausia superba* and *Meganyctiphanes norvegica*. Polar Biol. **9**: 115-122
- STITT, M. (1984): Citrate Synthase (Condensing Enzyme). In: Bergmeyer, H.U. (ed.): Methods of Enzymatic Analysis, Vol. IV. Verlag Chemie, Weinheim, 353-358
- TAYLOR, A.C. (1977): The respiratory responses of *Carcinus maenas* (L.) to changes in environmental salinity. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. **29**: 197-210
- TAYLOR, E.W., BUTLER, P.J. (1978): Aquatic and aerial respiration in the shore crab, *Carcinus maenas* (L.), acclimated to 15°C. J. Comp. Physiol. **127**: 315-323

- THÉBAULT, M.T. (1984): Lactate content and lactate dehydrogenase activity in *Palaemon serratus* abdominal muscle during temperature changes. *J. Comp. Physiol.* **154B**: 85-89
- TRUCHOT, J.P. (1983): Regulation of acid-base balance. In: Bliss, D.E. (ed.): *The Biology of Crustacea*, Vol. 5, Academic Press, Inc., New York, 431-457
- VAN WORMHOUDT, A. (1980): Regulation d'Activité de l' α -Amylase à Différentes Températures d'Adaptation et en Fonction de l'Ablation des Pédoncules Oculaires et du Stade de Mue chez *Palaemon serratus*. *Biochemical Systematics and Ecology* **8**: 193-203
- VETTER, R.A.H., SABOROWSKI, R., PETERS, G., BUCHHOLZ, F. (1992): Antarctic convergence: a real temperature barrier? *Verh. Dtsch. Zool. Ges.* **85.1**: 47
- WIEBE, P.H., BURT, K.H., BOYD, S.H., MORTON, A.W. (1976): A multiple opening-closing net and environmental sensing system for sampling zooplankton. *J. Mar. Res.* **34 (3)**: 313-326
- WILKINSON, G.N. (1961): Statistical estimations in enzyme kinetics. *Biochem. J.* **80**: 324-332
- WILKINSON, J.H. (1974): Lactate dehydrogenase, isoenzymes: LDH₁ ("2-Hydroxybutyrate dehydrogenase") UV-assay. In: Bergmeyer, H.U. (ed.): *Methods of Enzymatic Analysis*, Vol. 2, Verlag Chemie, Weinheim, 603-607
- WISKICH, J.T. (1980): Control of the Krebs Cycle. In: Davies, D.D. (ed.): *The Biochemistry of Plants*, Vol. 2, Metabolism and Respiration, Academic Press, New York, 243-278

DANKSAGUNG

Herrn Prof. Dr. F. Buchholz danke ich herzlich für die Vergabe des interessanten Themas, für die gute Betreuung und für seine ständige Bereitschaft zur Diskussion. Außerdem danke ich ihm ganz besonders für das mir entgegengebrachte Vertrauen.

Mein herzlicher Dank gilt auch Herrn Prof. Dr. D. Adelung, der mir Räumlichkeiten und Arbeitsgeräte zur Verfügung stellte und bei vielen Problemen ein hilfsbereiter Ansprechpartner war.

Je remercie, bien sur, Dr. Janine Cuzin-Roudy de Villefranche-sur-Mer pour m'avoir aidé à acquérir *Meganyctiphanes norvegica* (med.).

Jag måste också säga många tak till Prof. Dr. Strömberg av Kristineberg. På grund av Prof. Dr. Strömberg kunde jag bo i Sverige och göra mina krill experimenter med *Meganyctiphanes norvegica* (katt.).

"Dziękuję bardzo" der polnischen Mannschaft, die mich bei meiner Arbeit auf der Antarktisstation "H. Arctowski" unterstützt hat sowie den Drs. A. Brandt, O. Coleman und G. Meurs für die Beschaffung von *Serolis polita*.

Ich danke Herrn Prof. Dr. H. Langer für die zur Verfügung gestellten *Ocypode ryderi*.

Für die zahlreichen konstruktiven und kritischen Diskussionen danke ich Herrn Priv. Doz. Dr. R. Mentlein und Herrn Prof. Dr. K.-D. Spindler.

Bedanken möchte ich mich bei allen Mitgliedern unserer Arbeitsgruppe: bei Reinhard Saborowski und Gerrit Peters, die nicht nur bei der Laborarbeit eine große Hilfe waren, sondern auch stets für eine gute Arbeitsatmosphäre sorgten sowie bei Sonja Böhm, die mich bei vielen Routinearbeiten unterstützte.

Des weiteren danke ich Maren, Heidi, Verena, Klemens, Marcus und Rory für die spontane Hilfe, und Gerrit sei ganz besonders für seine Mithilfe beim Layout der Arbeit gedankt.

Die Deutsche Forschungsgemeinschaft unterstützte das Vorhaben dankenswerterweise im Rahmen des Schwerpunktprogramms "Antarktisforschung" (DFG Bu 548/2), und bei der "Studienstiftung des deutschen Volkes" möchte ich mich vor allem für die ideelle Förderung bedanken.

Gewidmet meinen Eltern und meiner Freundin Susanne, weil ohne ihre Unterstützung diese Arbeit gar nicht möglich gewesen wäre.