

**Licht- und Temperatureinfluß auf den enzymatischen
Oxidationsschutz der antarktischen Eisdiatomee
Entomoneis kufferathii Manguin**

**Effect of Light and Temperature on the Enzymatic
Antioxidative Defense Systems in the Antarctic Ice
Diatom *Entomoneis kufferathii* Manguin**

Raimund Schriek

**Ber. Polarforsch. 349 (2000)
ISSN 0176 - 5027**

Raimund Schriek
Universität Bremen
Fachbereich Biologie/Chemie
Meeresbotanik
Postfach 330440
28334 Bremen

*Die vorliegende Arbeit ist die inhaltlich unveränderte Fassung einer Dissertation, die 1998 dem Fachbereich Biologie/Chemie vorgelegt wurde.
Der Titel der Dissertation lautet:
Enzymatischer Oxidationsschutz an antarktischen Eisdiatomeen, insbesondere Entomoneis kufferathii
Manguin: Einfluß von Licht und Temperatur*

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	IV
Zusammenfassung	VI
Summary	VIII
1 Einleitung	1
1.1 Lebensraum Antarktis	1
1.2 „Was ist Streß?“	6
1.3 Reaktive Sauerstoffverbindungen	8
1.4 Enzymatischer Oxidationsschutz	10
1.5 Lokalisierung des enzymatischen Oxidationsschutzes	19
1.6 Zielsetzung	22
2 Experimenteller Teil	23
2.1 Die Untersuchungsobjekte <i>Chaetoceros</i> sp. und <i>Entomoneis kufferathii</i> MANGUIN	23
2.2 Kultivierung	25
2.2.1 Kulturbedingungen	27
2.2.2 Extraktion	27
2.3 Photometrie	30
2.3.1 Catalase	31
2.3.2 Peroxidase	32
2.3.3 Ascorbat Peroxidase	33
2.3.4 Glutathion Peroxidase	33
2.3.5 Glutathion Reduktase	34
2.3.6 Superoxid Dismutase	35
2.4 Polyacrylamidgelelektrophorese	36
2.4.1 Catalase	37
2.4.2 Peroxidase	38
2.4.3 Ascorbat Peroxidase	38
2.4.4 Glutathion Reduktase	38
2.4.5 Superoxid Dismutase	39

2.5	Charakterisierung der Enzyme	39
2.5.1	Substratsättigungskurven	39
2.5.2	Aufnahme von pH-Wert-Kurven	39
2.5.3	Aufnahme von Temperaturkurven	40
2.5.4	Berechnung der V_{\max} - und K_M -Werte	40
2.5.5	Berechnung der Aktivierungsenergie E_a	40
2.5.6	Stabilitätstests	41
2.6	Physiologische Untersuchungen	41
2.6.1	Oxidationsschutzenzyme im Tagesgang	42
2.6.2	Temperatureinfluß auf die Oxidationsschutzenzyme in <i>E. kufferathii</i>	42
2.6.3	Lichteinfluß auf die Oxidationsschutzenzyme in <i>E. kufferathii</i>	42
3	Ergebnisse	43
3.1	Oxidationsschutzenzyme in <i>E. kufferathii</i>	43
3.2	Oxidationsschutzenzyme in <i>Chaetoceros</i> sp.	45
3.3	Charakterisierung der Oxidationsschutzenzyme aus <i>E. kufferathii</i>	47
3.3.1	Catalase	47
3.3.2	Glutathion Peroxidase	48
3.3.3	Glutathion Reduktase	51
3.3.4	Superoxid Dismutase	53
3.3.5	Peroxidase	55
3.4	Physiologische Untersuchungen	56
3.4.1	Oxidationsschutzenzyme im Tagesgang in <i>E. kufferathii</i> und <i>Chaetoceros</i> sp.	56
3.4.2	Temperatureinfluß auf die Oxidationsschutzenzyme in <i>E. kufferathii</i>	62
3.4.3	Lichteinfluß auf die Oxidationsschutzenzyme in <i>E. kufferathii</i>	69
3.5	<i>E. kufferathii</i> und Epibakterien	74

4	Diskussion	76
4.1	Charakterisierung der Oxidationsschutzenzyme aus <i>E. kufferathii</i>	76
4.1.1	Catalase	76
4.1.2	Peroxidase	77
4.1.3	Ascorbat Peroxidase	77
4.1.4	Glutathion Peroxidase	78
4.1.5	Glutathion Reduktase	80
4.1.6	Superoxid Dismutase	83
4.2	Catalase und Algen	85
4.3	Wasserstoffperoxidentgiftung in <i>E. kufferathii</i>	90
4.3.1	<i>E. kufferathii</i> und Epibakterien	91
4.3.2	Temperatureinfluß auf die Wasserstoffperoxidentgiftung	92
4.3.3	Lichteinfluß auf die Wasserstoffperoxidentgiftung	94
4.4	Physiologische Untersuchungen	96
4.4.1	Temperatureinfluß auf die Oxidationsschutzenzyme in <i>E. kufferathii</i>	96
4.4.2	Lichteinfluß auf die Oxidationsschutzenzyme in <i>E. kufferathii</i>	97
4.5	Vergleich der Oxidationsschutzenzyme aus <i>E. kufferathii</i> und <i>Chaetoceros</i> sp.	99
5	Literaturverzeichnis	106

Abkürzungsverzeichnis

ABTS	2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonsäure)
APX	Ascorbat Peroxidase
AsA	Ascorbat
BIS	N,N'-Methylendiacylamid
BSA	Bovine Serum Albumin
CA	Carbonic Anhydrase
CAPS	3-[N-Cyclohexylamino]-1-propan-sulfonsäure
CAT	Catalase
CAT-Bak	bakterielle Catalase
CHES	2-[N-Cyclohexylamino]ethan-sulfonsäure
DAsA	Dehydroascorbat
DHR	Dehydroascorbat Reduktase
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTNB	5,5'-Dithiobis-2-nitrobenzoesäure, Ellmans Reagenz
EDTA	Ethylendiamin-tetraessigsäure
EGTA	Ethylenglykol-bis(β -aminoethylether)-tetraessigsäure
EPC	European Phycological Congress
GPX	Glutathion Peroxidase
GR	Glutathion Reduktase
GSH	Glutathion reduziert
GSSG	Glutathion oxidiert
MDR	Monodehydroascorbat Reduktase
MES	2-[N-Morpholino]ethan-sulfonsäure
MOPS	3-[N-Morpholino]propan-sulfonsäure
NADPH	Dihydrogennicotinamid-adenin-dinucleotid-phosphat
NADP ⁺	Nicotinamid-adenin-dinucleotid-phosphat
NBT	Nitrobluetetrazoliumchlorid
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
<i>p</i> -CMB	<i>p</i> -Chloromercuriphenylsulfonsäure
PSU	Practical Salinity Unit
PX	Peroxidase
RT	Raumtemperatur

SIMCO	Sea Ice Microbial Community
SOD	Superoxid Dismutase
TEMED	Tetramethylethylendiamin
U	Unit
VHC	Volatile Halogenated Compound
WWSP	Winter Weddell Sea Project

Zusammenfassung

Eisdiatomeen sind in ihrem natürlichen Lebensraum Bedingungen ausgesetzt (niedrigen Temperaturen, stark schwankenden Lichtintensitäten, hohen Salinitäten und erhöhten Konzentrationen reaktiver Sauerstoffverbindungen), die zu oxidativem Streß führen können. Oxidativer Streß ist durch Auftreten und Reaktionen reaktiver Sauerstoffverbindungen ($^1\text{O}_2$, O_2^- , OH^- und H_2O_2) gekennzeichnet. Von anderen aeroben Organismen ist bekannt, daß sie sich vor oxidativen Streß antioxidativ (Glutathion, Ascorbat, α -Tocopherol) und / oder enzymatisch (Catalase, Peroxidasen, Glutathion Reduktase und Superoxid Dismutase) schützen.

Der enzymatische Oxidationsschutz wurde an den antarktischen Eisdiatomeen *Entomoneis kufferathii* MANGUIN und *Chaetoceros* sp. aufgezeigt. Die Oxidationsschutzenzyme Catalase (CAT, EC 1.11.1.6), Glutathion Peroxidase (GPX, EC 1.11.1.9), Glutathion Reduktase (GR, EC 1.6.4.2) und Superoxid Dismutase (SOD, EC 1.15.1.1) wurden in beiden Eisdiatomeen photometrisch nachgewiesen. *Chaetoceros* sp. hatte außerdem Peroxidase (PX, EC 1.11.1.7). *E. kufferathii* und *Chaetoceros* sp. enthielten keine Ascorbat Peroxidase (APX, EC 1.11.1.11). Aktivitätsfärbungen nach gelelektrophoretischer Trennung gaben Aufschluß über die Anzahl der Isoenzyme (jeweils eine CAT, GR und mehrere SOD) und deren apparente Molekulargewichte; PX, APX und GPX waren gelelektrophoretisch nicht nachweisbar.

Die Eigenschaften der Oxidationsschutzenzyme aus *E. kufferathii* sind den entsprechenden Enzymausstattungen in temperierten Organismen (höheren Pflanzen und anderen Algen) ähnlich. Die Temperaturoptima (CAT, GPX, GR und SOD) lagen deutlich höher als die durchschnittlichen antarktischen Wassertemperaturen. Die Anpassung der Oxidationsschutzenzyme aus *E. kufferathii* an den Lebensraum antarktisches Meereis konnte belegt werden, weil auch bei tiefen Temperaturen (-4 bis 4 °C) hohe Aktivitäten gemessen wurden. Darüber hinaus wurden für die SOD ($16.4 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$) und CAT ($17.5 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$) besonders niedrige Aktivierungsenergien gemessen, die der Eisdiatomee auch bei tiefen Temperaturen ermöglichen, leicht auf erhöhte Superoxidanionen- und Wasserstoffperoxidkonzentrationen zu reagieren und damit entscheidend zum Oxidationsschutz beitragen. Die Aktivierungsenergien der GPX und GR (31.1 und $34.0 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$) lagen ebenfalls unterhalb den für enzymatische Reaktionen üblichen Werten von 40 bis $80 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$.

Untersuchungen an verschiedenen Bacillariophyceae belegen, daß CAT meistens fehlte. Im Gegensatz dazu wurde an antarktischen Eisdiatomeen erstmals bewiesen, daß auch Heterokontophyta der Klasse der Bacillariophyceae CAT-Aktivität aufweisen.

Der enzymatische Oxidationsschutz der gleichmäßig über die Eisdicke verteilt vorkommenden *Chaetoceros* sp. wurde mit der oft in der Boden- und Untereisgesellschaft anzutreffenden *E. kufferathii* vergleichend untersucht.

Höhere GPX- (11%) und GR-Aktivitäten (12%) in *Chaetoceros* sp. legen nahe, daß der Entgiftung über den Ascorbat-Glutathion-Zyklus und / oder GSH als Reduktions- oder Antioxidationsmittel größere Bedeutung zukommt als in *E. kufferathii*. Andererseits wurden 25% höhere SOD-Aktivitäten in *E. kufferathii* gemessen, obwohl die CAT-Aktivitäten 23% niedriger waren. Die vergleichsweise niedrigen CAT-Aktivitäten wurden durch eine andere Form des Wasserstoffperoxidabbaus erklärt: *E. kufferathii* umgab sich im Gegensatz zu *Chaetoceros* sp. mit epiphytischen Bakterien. Der Einfluß der Epibakterien konnte untersucht werden, weil die CAT der *E. kufferathii*-Zellen und der Bakterien aufgrund unterschiedlicher apparenter Molekulargewichte gelelektrophoretisch getrennt werden konnten. Der Wasserstoffperoxidabbau in *E. kufferathii* erfolgte über intramolekulare CAT, GPX und die CAT der Epibakterien. In *Chaetoceros* sp.-Zellen hingegen verläuft die Entgiftung über CAT, GPX und evtl. auch über PX. Darüber hinaus hatte die SOD beider Eisdiatomeen unterschiedliche prosthetische Gruppen: *Chaetoceros* sp. enthielt nur die als kälteresistent geltende Mn-SOD, *E. kufferathii* zusätzlich Fe-SOD.

Die Oxidationsschutzenzyme der beiden Eisdiatomeen unterschieden sich im Tagesgang: *E. kufferathii* hatte im Licht höhere SOD- und CAT-Aktivitäten, *Chaetoceros* sp. dagegen in der Dunkelphase. Die GPX- und GR-Aktivitäten beider Eisdiatomeen waren in der Dunkelphase erhöht.

Der Einfluß von Temperatur (-4, 0 und 4 °C) und Licht (6, 30, 60, 90 und 150 $\mu\text{mol Photonen} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) wurde nach 2, 4 und 8 Tagen auf die CAT, GPX und GR der *E. kufferathii*-Zellen untersucht. Die Eisdiatomee zeigte unter Akklimatisationsbedingungen (0 °C, 30 $\mu\text{mol Photonen} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) niedrigste Enzymaktivitäten. Tiefe Temperaturen erhöhten die Aktivitäten dabei besonders. Schwach- (6 $\mu\text{mol Photonen} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) und Starklicht (90 und 150 $\mu\text{mol Photonen} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) führten zu höchsten Aktivitäten, die mit steigender Temperatur abnahmen. Hervorzuheben war die an tiefe Temperaturen angepaßte *Entomoneis*-CAT, die auf weitere Temperaturerniedrigung im Gegensatz zu CAT vieler anderer Organismen durch Aktivitätserhöhung reagierte und damit als temperaturresistent einzustufen war.

Summary

Ice diatoms in their natural environment are exposed to oxidative stress which is a result of low temperatures, changing light intensities, high salinities and high concentrations of reactive oxygen species ($^1\text{O}_2$, O_2^- , OH^\cdot and H_2O_2). Protection of aerobic organisms against oxidative stress are antioxidative (glutathione, ascorbate, α -tocopherol) and / or enzymatic (catalase, peroxidases, glutathione reductase and superoxide dismutase) defense systems.

The antarctic ice diatoms *Entomoneis kufferathii* MANGUIN and *Chaetoceros* sp. were investigated with respect to their enzymatic defense systems. The presence of the antioxidative enzymes catalase (CAT, EC 1.11.1.6), glutathione peroxidase (GPX, EC 1.11.1.9), glutathione reductase (GR, EC 1.6.4.2) and superoxide dismutase (SOD, EC 1.15.1.1) was detected by spectrophotometry in both ice diatoms. *Chaetoceros* sp. contained in addition peroxidase (PX, EC 1.11.1.7). Ascorbate peroxidase activity (APX, EC 1.11.1.11) was not found in *E. kufferathii* and *Chaetoceros* sp.. With activity staining after gel electrophoretic protein separation the number of isoenzymes (one CAT and GR respectively, several SOD) was observed and their apparent molecular weight was estimated; PX, APX and GPX were not detectable by gel electrophoresis.

Properties of the antioxidative enzymes in *E. kufferathii* are comparable to defense systems in temperate organisms (higher plants and other algae). The temperature-maxima of the enzymes (CAT, GPX, GR and SOD) were clearly above the average of antarctic water temperatures. The adaptation of *E. kufferathii*-cells antioxidative defense systems to the antarctic sea ice was demonstrated by high enzyme activities even at low temperatures (-4 to 4 °C). Particularly low activation energies were determined for SOD (16.4 kJ * mol⁻¹) and CAT (17.5 kJ * mol⁻¹). Therefore, they easily can respond to higher superoxide anion and hydrogen peroxide concentrations and were decisively involved in antioxidative defense. The activation energies for GPX and GR (31.1 and 34.0 kJ * mol⁻¹) were also lower compared to typical values for enzyme reactions ranging between 40 and 80 kJ * mol⁻¹.

Former investigations with Bacillariophyceae revealed, that usually CAT is lacking. In this work it was demonstrated the first time with antarctic ice diatoms that Heterokontophyta of the class of Bacillariophyceae showed also CAT-activity.

The enzymatic antioxidative defense systems of *Chaetoceros* sp. (distributed over the thickness of ice) were compared with those of *E. kufferathii*, which frequently occur in the bottom assemblage.

Higher GPX- (11%) and GR-activities (12%) in *Chaetoceros* sp. suggest that the hydrogen peroxide decomposition via ascorbate-glutathione-cycle and / or GSH as reducing agent or antioxidant is more important than in *E. kufferathii*. On the other hand 25% higher SOD-activities were measured in *E. kufferathii*, although the CAT-activities were 23% lower. The comparatively low CAT-activities could be explained by another mechanism of hydrogen peroxide reduction: In contrast to *Chaetoceros* sp. *E. kufferathii*-cells were surrounded by epiphytic bacteria. The influence of epibacteria could be estimated because of the difference in the apparent molecular weight of the CAT of *E. kufferathii*-cells and bacteria after gel electrophoretic protein separation. The hydrogen peroxide decomposition in *E. kufferathii* was achieved by intramolecular CAT, GPX and the CAT of the epibacteria. In cells of *Chaetoceros* sp. on the other hand hydrogen peroxide is reduced by CAT, GPX and possibly also by PX. Besides, different prosthetic groups were present in the diatoms SOD: *Chaetoceros* sp. contained the as cold resistant classified Mn-SOD and *E. kufferathii* had in addition Fe-SOD.

The antioxidative enzymes of both the ice diatoms differ during the cycle of a day: *E. kufferathii* showed higher SOD- and CAT-activities in the light, in *Chaetoceros* sp., in contrast the enzymes were active in the dark. The GPX- and GR-activities of both ice diatoms were elevated during the dark period.

The effects of temperature (-4, 0 and 4 °C) and light (6, 30, 60, 90 and 150 $\mu\text{mol photons} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) were investigated after 2, 4 and 8 days with respect to CAT, GPX and GR of the *E. kufferathii*-cells. The ice diatom exhibited lowest enzyme activities under conditions of acclimation (0 °C, 30 $\mu\text{mol photons} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$). The activities increased especially at low temperatures. Low (6 $\mu\text{mol photons} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) and high light conditions (90 and 150 $\mu\text{mol photons} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) resulted in highest activities, while with increasing temperatures the activities decreased. In contrast to CAT of many other organisms the *Entomoneis*-CAT reacted to further decreasing temperatures with higher activities and was therefore classified as temperature resistant.

1 Einleitung

1.1 Lebensraum Antarktis

Die Antarktis bildet den größten in sich geschlossenen Lebensraum der Erde. Umgeben wird der 14.2 Millionen Quadratkilometer große antarktische Kontinent vom Südpolarmeer (SPINDLER und DIECKMANN, 1991). Das mächtigste Strömungssystem der Erde, der antarktische Zirkumpolarstrom (ACIERNO *et al.*, 1997), umfließt in west-östliche Richtung dieses erdgeschichtlich alte und durch extreme Umweltbedingungen gekennzeichnete Ökosystem (BOYSEN-ENNEN, 1987).

Die Eisbedeckung des Südpolarmeeres schwankt im Jahresgang zwischen vier Millionen Quadratkilometern im Februar gegen Ende des südlichen Sommers und 20 Millionen im September gegen Ende des Südwinters. Das Meereis erreicht dabei Dicken von durchschnittlich einem Meter (SPINDLER und DIECKMANN, 1991) und besteht zu mehr als 90% aus einjährigem Eis (HORNER *et al.*, 1992).

Meereis bildet sich beim Gefrieren von Meerwasser unter der für seinen Salzgehalt kritischen Temperatur. Da bis zu 90% der im Meerwasser enthaltenen Elektrolyte konzentriert werden, steigt der Salzgehalt des Wassers, das die entstehende Eisschicht unterlagert. Ein Teil der Sole verbleibt in der Eisschicht. Sie ist in ihrer Konzentration abhängig von der Ausgangssalinität, dem Alter des Eises und der Geschwindigkeit des Gefrierprozesses. Junges Meereis, das sich bei Lufttemperaturen von -30 bis -40 °C schnell gebildet hat, kann noch Salinitäten von bis zu 20 practical salinity unit (PSU) aufweisen. Meistens liegen die Werte zwischen 3 und 8 PSU (TARDENT, 1993). Je nach Eistemperatur können Salinitäten von 70 bis 145 PSU erreicht werden (SPINDLER und DIECKMANN, 1991).

Das antarktische Meereis ist ein wichtiger Lebensraum für Einzeller und kleinere Mehrzeller (TARDENT, 1993). Seevögel, Pinguinen und Robben dient das Meereis als Ruheplatz und für die Aufzucht ihrer Jungen (SPINDLER und DIECKMANN, 1991). Der antarktische Krill gilt als mit dem Meereis assoziierter Organismus. Flohkrebse, Tintenfische (DALY und MACAULAY, 1988), der Polardorsch und größere Fleischfresser bis hin zu den Walen nutzen die im oder am Meereis lebenden Organismen als Nahrungsquelle (SPINDLER und DIECKMANN, 1991).

Eine Vielfalt an Organismen lebt im Eis oder an seiner Unterseite. In mikrobiellen Gemeinschaften, den sea ice microbial communities (SIMCOs), leben Algen, Bakterien, Pilze, Protozoen und andere Mikroorganismen zusammen (GARRISON *et al.*, 1986; HORNER *et al.*, 1992). Diatomeen dominieren nach Zahl und Vielfalt. Sie färben das Eis braun oder durchziehen es mit braunen Streifen. Im antarktischen Meereis sind rund 200 verschiedene Diatomeenarten bekannt. Den größten Teil bilden dabei pennate Diatomeen. Centrische Diatomeen besiedeln ebenfalls das Meereis, sind jedoch häufiger in der Wassersäule anzutreffen (SPINDLER und DIECKMANN, 1991).

Die Wassertemperaturen liegen in der antarktischen Region im Jahreslauf zwischen -2 und +1 °C (LÜNING, 1985). Die im Eis lebenden Organismen sind in Abhängigkeit von der Eisdicke und der Schneeaufgabe sehr niedrigen Temperaturen (bis zu -10 °C) (SPINDLER und DIECKMANN, 1991), im oberen Eissäulenbereich bis zu -30 °C ausgesetzt. Dort können Bestrahlungsstärken von nur 0.2 $\mu\text{mol Photonen} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ gemessen werden (NOTHNAGEL, 1995).

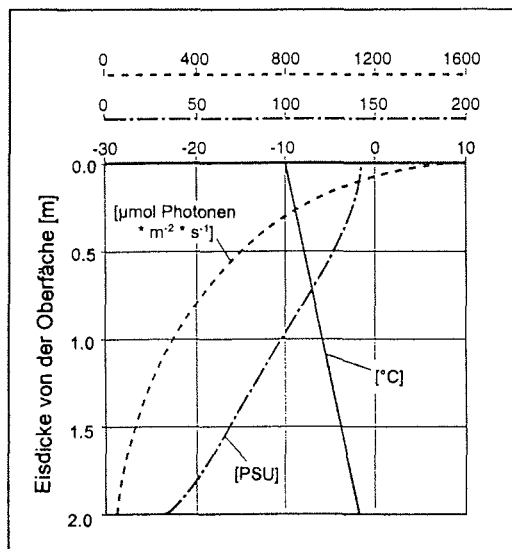


Abb. 1.1: Gradienten der Bestrahlungsstärke in $\mu\text{mol Photonen} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ (---), der Salinität in PSU (-.-.-) und der Temperatur in °C (—) in der Eissäule (aus McGRATH GROSSI und SULLIVAN, 1985; modifiziert nach KIRST, 1992).

Die Albedo des Meereises liegt etwa fünfmal so hoch wie die der offenen See (SPINDLER und DIECKMANN, 1991). Nur ein geringer Teil des die Meereisoberfläche erreichenden Lichts dringt in die Eisschicht ein. Daher ist für die im Meereis lebenden Organismen nur ein geringes Lichtangebot verfügbar, dennoch können die schwachlichtakklimatisierten Algen Photosynthese betreiben.

Antarktische Eisalgen leben nach HORNER und Mitarbeitern (1988) im Eis angeheftet an Eiskristalle, im interstitialen Wasser zwischen Eiskristallen oder assoziiert an die Oberfläche der Eisunterseite, wobei sich verschiedene Typen von Gesellschaften unterscheiden lassen (vgl. Abb. 1.2).

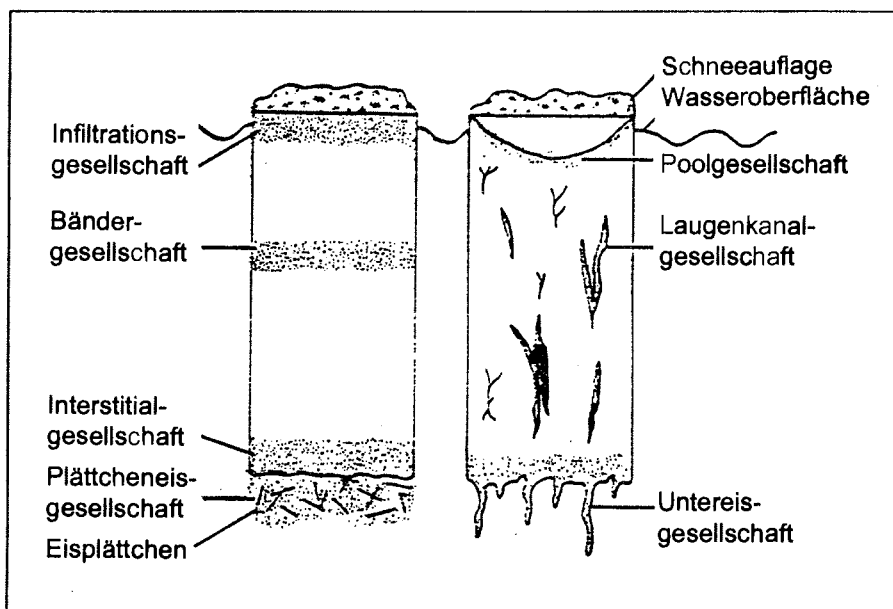


Abb. 1.2: Schematische Darstellung der Lebensgemeinschaften im Meereis. Die Lebensgemeinschaften werden nach ihrer Lage in der Eissäule in Oberflächen-, Innereis- und Bodengesellschaft unterteilt. Zur Oberflächengesellschaft gehören die Infiltrations- und die Schmelztümpelgesellschaft, zur Innereisgesellschaft die Bänder- und die Laugenkanalgesellschaft und zur Bodeneisgesellschaft die Interstitial- und die Untereisgesellschaft (aus HORNER *et al.*, 1988; modifiziert nach BARTSCH, 1989).

Auf der Eisoberseite befinden sich die *Schmelztümpel-* und *Infiltrationsgesellschaften*, im Eis die *Bänder-* und *Laugenkanalgesellschaften*. An der Eis-Wasser-Grenze (Unterseite der Eissäule) liegen die *Interstitial-* und *Untereisgesellschaften*. Jeder Gesellschaftstyp ist für sich speziellen jahreszeitlichen Schwankungen seiner Lebensbedingungen (Temperatur, Licht, Salinität, Wasserstoffperoxidkonzentration) ausgesetzt.

Die *Schmelztümpelgesellschaften*, die durch Eisschmelze an der Oberfläche, durch Überflutung oder einer Kombination aus beidem gebildet werden, gehören ebenfalls zur Oberflächengesellschaft (HORNER *et al.*, 1992). Da das antarktische Eis im Gegensatz zum arktischen durch die immer wehenden abkühlenden Winde nur sehr selten an der Oberseite schmilzt, spielt die Schmelztümpelgesellschaft in der Antarktis nur eine untergeordnete Rolle (SPINDLER und DIECKMANN, 1991). An der Eisoberseite sind die Organismen hohen Salinitäten bei sehr tiefen Temperaturen ausgesetzt.

Die *Infiltrationsgesellschaft* entsteht an der Schnee-Eis-Grenze durch Überflutung des Schnees oder Eises mit Meerwasser. Durch das Gewicht der zunehmenden Schneedecke wird die Eisoberfläche heruntergedrückt und Meerwasser kann in den Schnee eindringen (HORNER *et al.*, 1992).

In der Eissäule sind die *Bänder-* und *Laugenkanalgesellschaften* bedeutsam. Laugenkanäle entstehen bei Meereisbildung und Temperaturveränderungen im Eis. Organismen werden bei der Eisbildung umschlossen oder vom Meerwasser ins Eis eingespült.

Die Organismen der *Bändergesellschaft* werden in einem frühen Stadium der Eisbildung von Eiskristallen an der Wasseroberfläche eingeschlossen oder durch Anwachsen von Eis an einer mehrjährigen Eissäule aus einer ehemaligen Bodengesellschaft gebildet (HORNER *et al.*, 1992). Innerhalb der Eissäule bilden sich Gradienten in Bezug auf Temperatur, Salinität und Bestrahlungsstärke (vgl. Abb. 1.1). Mit zunehmender Entfernung von der Eisoberfläche sinken Salinität und Bestrahlungsstärke bei Zunahme der Temperatur. Tiefer im Eis lebende Gesellschaften sind zwar weniger tiefen Temperaturen und auch geringerer Salinität unterworfen, das Lichtangebot nimmt jedoch ab.

Die *Interstitialgesellschaft* wird wie die Bändergesellschaft in einer frühen Phase der Eisbildung eingeschlossen oder entsteht durch Anheften von Eiskristallen an eine Organismenschicht, die sich bereits an der Eisunterseite befindet.

Durch loses Anheften von Algen oder Anlagern ganzer Algenmatten an die Eisunterseite entstehen die *Untereisgesellschaften* (HORNER *et al.*, 1992). In den unteren Bereichen der Eissäule leben die Organismen bei konstanten Temperaturen und Salinitäten und sehr niedrigen Bestrahlungsstärken.

Wasserstoffperoxid (H_2O_2) ist eine stabile Sauerstoffverbindung, die in der Antarktis in der Atmosphäre, im Schnee, eingeschlossen im Eis und im Wasser gelöst vorkommt. H_2O_2 gehört zu den höchst konzentrierten Verunreinigungen des polaren Eises (SIGG und NEFTEL, 1988) und wird verstärkt bei höheren Bestrahlungsstärken gebildet (PAMATMAT, 1989). Darüber hinaus ist der Eintrag über die Atmosphäre und die Bildung durch Mikroorganismen bedeutsam. Erste H_2O_2 -Messungen wurden 1874, erste systematische Untersuchungen zu Beginn der 80er Jahre dieses Jahrhunderts durchgeführt (in NEFTEL *et al.*, 1984).

Frischer antarktischer Schnee enthält 200 bis 1200 $\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Wasserstoffperoxid (PAMATMAT, 1989; RESING *et al.*, 1993; TIEN und KARL, 1993). In 65 antarktischen Schneeproben wurden auch sehr viel höhere H_2O_2 -Konzentrationen (bis zu $5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) gemessen (EICKEN *et al.*, 1994). In Polareis verschiedener Tiefen wurden 350 bis 500 $\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ nachgewiesen (NEFTEL *et al.*, 1984). Oberflächenwasser hat vermutlich Wasserstoffperoxidkonzentrationen um $100 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$, die mit der Tiefe abnehmen (300 m: $5 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$) (WELLER und SCHREMS, 1993). PAMATMAT (1989) konnte unterhalb von 200 m noch 12 bis 18 $\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ messen. In antarktischen Rockpools wurden zeitweise Konzentrationen von bis zu $2 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ (ABELE, persönliche Mitteilung), in subantarktischen Seen wurden bei der oberflächennahen H_2O_2 -Bildung Konzentrationen von $620 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ gemessen.

Die H_2O_2 -Konzentrationen im grönländischen Eis sind bedeutend höher (4 bis $5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, im Oberflächeneis bis zu $13 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) als im antarktischen Meereis. Außerdem verdoppelten sich die Wasserstoffperoxidkonzentrationen im grönländischen Eis in den letzten 200 Jahren, wobei der entscheidende Anstieg in den letzten 20 Jahren stattfand (SIGG und NEFTEL, 1991).

Tiefe Temperaturen begünstigen die Eisbildung und damit steigende Salinitäten in Bändern und Laugenkanälen. Die im Eis lebenden Organismen rücken näher zusammen, und die Bildung reaktiver Sauerstoffverbindungen nimmt unvermeidlich zu. Druck, Licht, Salinitätserhöhung durch tiefe Temperaturen und erhöhte Konzentrationen reaktiver Sauerstoffverbindungen sind Beispiele für Streß, die auf die Organismen wirken.

1.2 „Was ist Streß?“,

eine Frage, die Wissenschaftler seit Jahrhunderten beschäftigt und bis heute unbeantwortet ist. Streß ist ein 1936 von SEYLE entdecktes und mit diesem Namen bezeichnetes Syndrom vielfältiger physiologischer Anpassungen an unspezifische innere und äußere Reize (Lexikon der Biochemie und Molekularbiologie, 1995). Moderne Streßforschung beim Menschen zeigt: Streß entsteht, wenn sich der Geist gegen das wehrt, was ist. Die meisten Menschen versuchen den Strom ihres Lebens mit aller Kraft zu beschleunigen oder leisten Widerstand ... Dieser Widerstand führt zu Turbulenzen, die wir als physische, geistige oder emotionale Anspannung spüren (MÜLLER-SPUDE, persönliche Mitteilung).

LEVITT (1972) schrieb ein Buch, in dem ausschließlich die Antwort von Pflanzen auf Umweltfaktoren aufgezeigt wird („... biologists have adopted the term *stress* for any environmental factor potentially unfavorable to living organisms and *stress resistance* for the ability of the plant to survive the unfavorable factor.“). Definitionen beispielsweise von GRIME (in MIYAKE und ASADA, 1994) („... mechanisms that limit the plant biomass by causing its partial or complete destruction ...“, oder „... external constraints limiting the resource acquisition, growth or reproduction of organisms ...“) wurden aufgegriffen und erweitert (DAVISON und PEARSON, 1996). HIPPELI und ELSTNER (1996) definieren sieben Streßfelder, wobei die Einflüsse von Sonne, Mond und magnetischen Feldern in Abbildung 1.3 unberücksichtigt bleiben.

Kältestreß beispielsweise wurde vermutlich erstmals 1778 an Pflanzen dokumentiert (LEVITT, 1972), doch erfrieren Lebewesen seit Menschen-gedenken. Verschiedene Übersichtsartikel belegen das Interesse am Temperatur- (ARAGNO, 1981; HÄLLGREN und ÖQUIST, 1990; LI *et al.*, 1991; BURKE, 1995), Licht- (DEMMIG-ADAMS und ADAMS, 1992; SCHÄFER und SCHMID, 1993; HÄDER, 1997) und Salzstreß (HASEGAWA *et al.*, 1994; BISSON und KIRST, 1996; GENTER, 1996) höherer Pflanzen und auch Algen.

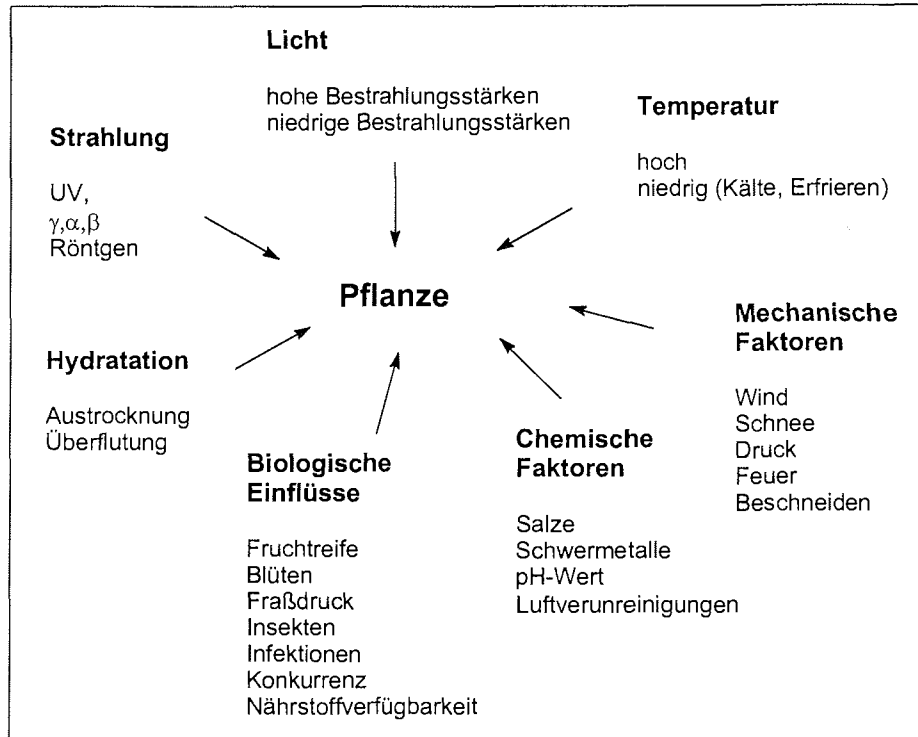


Abb. 1.3: Die sieben Stressfelder für Pflanzen, modifiziert nach HIPPELI und ELSTNER, 1996.

Die Veröffentlichungen zum Streßeinfluß auf die Oxidationsschutzenzyme verschiedener Kulturpflanzen sind besonders durch Temperatur- (VOLK und FEIERABEND, 1989; FEIERABEND *et al.*, 1992; JAHNKE *et al.*, 1991; WALKER *et al.*, 1991; MISHRA *et al.*, 1993; ANDERSON *et al.*, 1995; SARUYAMA und TANIDA, 1995; FADZILLAH *et al.*, 1996; O'KANE *et al.*, 1996; TANIDA, 1996; FRYER *et al.*, 1998), Licht- (VOLK und FEIERABEND, 1989; MISHRA *et al.*, 1993; MISHRA *et al.*, 1995; RAO *et al.*, 1996; CHANG und KAO, 1998), Salz- (LUTTS und GUERRIER, 1995; SANCHO *et al.*, 1996; STREB und FEIERABEND, 1996; PIQUERAS *et al.*, 1996; GUETA-DAHAN *et al.*, 1997; MISZALSKI *et al.*, 1998) und Austrocknungsuntersuchungen (ZHANG und KIRKHAM, 1996A; ZHANG und KIRKHAM, 1996B; LI und VANSTADEN, 1998) dokumentiert.

Auch für Algen ist der Streßeinfluß von Temperatur (CLARE *et al.*, 1984; CHO *et al.*, 1994), erhöhter Sauerstoffkonzentration (MARQUEZ *et al.*, 1995), Salz (MURTHY *et al.*, 1988), Austrocknung (MURTHY und SHARMA, 1989) und Licht (COLLEN und PEDERSEN, 1996, besonders unter UV-Belastung: LESSER und SHICK, 1989; LESSER, 1996A; LESSER, 1996B) auf den enzymatischen Oxidationsschutz beschrieben.

Streß verursacht oxidativen Streß, der durch Auftreten und Reaktionen reaktiver Sauerstoffverbindungen gekennzeichnet ist (BOWLER *et al.*, 1992).

1.3 Reaktive Sauerstoffverbindungen

Reduzierte Sauerstoffformen wie das Superoxidanion (O_2^-), Wasserstoffperoxid und das Hydroxylradikal (OH^\cdot) wurden in den letzten Jahren intensiv untersucht (Übersichtsartikel: CADENAS, 1989). Superoxidanionen und Wasserstoffperoxid sind in physiologischen Konzentrationen unbedenklich (ASADA *et al.*, 1973), dennoch werden *in vivo* aus Wasserstoffperoxid und Superoxidanionen durch die eisenionenkatalysierte HABER-WEISS-Reaktion ($H_2O_2 + O_2^- \rightarrow O_2 + OH^- + OH^\cdot$) Hydroxylradikale gebildet.

Hydroxylradikale sind hochreaktiv (CADENAS, 1989; HALLIWELL und GUTTERIDGE, 1989) und können Proteine denaturieren, zu DNA-Mutationen und Lipidperoxidationen führen. Der durch Licht aktivierte Singulett-Sauerstoff (1O_2) wirkt ebenso zerstörend (CADENAS, 1989; HALLIWELL und GUTTERIDGE, 1989).

Sauerstoffradikale werden durch viele verschiedene biologische Oxidationen gebildet, besonders in der Elektronentransportkette der Chloroplasten, aber auch in der Atmungskette in den Mitochondrien, dem endoplasmatischen Reticulum und den Microbodies (ELSTNER, 1990). Die Sauerstoffradikalbildung nimmt unter Streßbedingungen in Pflanzen stark zu (Übersichtsartikel: BOWLER *et al.*, 1992).

Organismen produzieren auch extrazellulär H_2O_2 , wie beispielsweise der marine Phytoplankter *Hymenomonas carterae* (bis $2 \cdot 10^{-8} \mu\text{mol} \cdot \text{Zelle}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$), der erheblich zur Wasserstoffperoxidbildung im Wasser beiträgt. Von 38 untersuchten Cyanobakterien produzieren mehr als die Hälfte H_2O_2 (STEVENS *et al.*, 1973). In Organellen (Mitochondrien und Chloroplasten) von *Euglena gracilis* wird Wasserstoffperoxid gebildet, das sofort ins Cytosol diffundieren kann. Superoxidanionen und H_2O_2 entstehen in Mitochondrien, Mikrosomen und Chloroplasten (ISHIKAWA *et al.*, 1993B). ZEPP und Mitarbeiter (1986)

zeigten, daß Grünalgen und Cyanobakterien Wasserstoffperoxid bilden und auch extern zugegebenes H_2O_2 abbauen können.

Die Wasserstoffperoxiddiskussion wird kontrovers geführt: Wasserstoffperoxid ist an der Hydroxylradikalbildung beteiligt. Untersuchungen an Maiskeimblattscheiden zeigen: Wasserstoffperoxid hemmt *in vivo* das Zellwandstreckungswachstum und setzt *in vitro* die Zellwandausdehnbarkeit bei extern zugegebenen Konzentrationen von 10 bis 10,000 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ herab (SCHOPFER, 1996). SCHRECK und Mitarbeiter (1996) nahmen die H_2O_2 -Produktion als erste Reaktion auf Streß an. Dennoch hat die Wasserstoffperoxidbildung auch positive Aspekte: H_2O_2 ist die erste Verteidigungslinie gegen einwandernde Pathogene und kann schnell durch biologische Membranen diffundieren (APOSTOL *et al.*, 1989). JUVEN und PIERSON (1997) zeigten ebenfalls, daß Wasserstoffperoxid bakterizide Effekte aufweist, weil das Wachstum von Bakterien gehemmt und einwandernde Mikroorganismen getötet werden. Laboruntersuchungen belegen, daß die Entwicklung einer Pflanze von der Wasserstoffperoxidkonzentration im Medium abhängig ist (APASHEVA und KOMMISSAROW, 1996).

Vermutlich wird die Bildung von flüchtigen halogenierten Verbindungen (volatile halogenated compounds, VHC) durch H_2O_2 induziert (COLLEN *et al.*, 1994). BERG und Mitarbeiter (1983) führen einen Bromanstieg im Sommer in der antarktischen Troposphäre auf die Emission von Bromoform aus roten benthischen Makroalgen zurück. STURGES und Mitarbeiter (1992) belegten in Laborversuchen, daß Eisalgen der Eisunterseite (vorwiegend pennate Diatomeen) Bromoform freisetzen. Eisalgen tragen damit erheblich zur Produktion organischer Bromverbindungen bei, die vergleichbar mit den Emissionen anthropogenen Ursprungs und aus Makrophyten sind.

Aerobe Organismen, besonders Pflanzen, verfügen über beeindruckende Verteidigungsmechanismen (enzymatisch und nichtenzymatisch), die beispielsweise verhindern, daß sich das überaus zerstörerische Hydroxylradikal bildet. Die Verteidigungsstrategien nach SIES (1993) bestehen in Vorbeugen, Abfangen und Reparieren. Pflanzen enthalten hohe Konzentrationen an Antioxidantien wie Glutathion (GSH), Ascorbat (AsA) und α -Tocopherol, neben weniger wichtigen antioxidativ wirkenden Verbindungen (Carotenoide, Polyphenole). Enzymatischer Oxidationsschutz wird durch Catalase (CAT), Peroxidase (PX), Ascorbat Peroxidase (APX), Glutathion Peroxidase (GPX), Glutathion Reduktase (GR) und Superoxid Dismutase (SOD) gesichert.

1.4 Enzymatischer Oxidationsschutz

Catalase und Peroxidasen sind die Enzyme, die Wasserstoffperoxid in Pflanzen entgiften. Catalase dismutiert Wasserstoffperoxid zu Wasser und Sauerstoff ($2 \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow 2 \text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$). In den Peroxisomen wird Wasserstoffperoxid durch Catalase, außerhalb in der Regel von Peroxidasen entgiftet. Catalase ist für geringe H_2O_2 -Konzentrationen weniger geeignet, weil das reaktive Zentrum des Enzyms zwei Wasserstoffperoxidmoleküle benötigt (DALTON *et al.*, 1987).

Peroxidasen wandeln Wasserstoffperoxid mit Hilfe eines reduzierenden Substrats (RH_2) zu Wasser um ($\text{RH}_2 + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{R} + 2 \text{H}_2\text{O}$). Peroxidasen werden nach ihrer Substratspezifität klassifiziert.

Catalase (CAT, EC 1.11.1.6): Catalaseaktivität wurde erstmals 1818 von THENARD in pflanzlichem Gewebe beobachtet. 1901 gab LOEW dem einzelnen, trennbaren Enzym, das Wasserstoffperoxid abbaute, den Namen Catalase. WARBURG schlug vor, daß CAT Eisen enthält, weil das Enzym durch Cyanidionen gehemmt wurde (in SCANDALIOS, 1994).

In Pflanzen entgiftet Catalase Wasserstoffperoxid, das während der Photorespiration und β -Oxidation von Fettsäuren gebildet wird. Darüber hinaus sind Catalasen bei der Entgiftung reaktiver Sauerstoffverbindungen bedeutsam, die bei Streß verstärkt entstehen. Obwohl Catalasen die intrazelluläre Wasserstoffperoxidkonzentration kontrollieren, ist wenig über die Funktion des Enzyms unter Streß bekannt (MacRAE und FERGUSON, 1985; FEIERABEND und ENGEL, 1986; VOLK und FEIERABEND, 1989; FEIERABEND *et al.*, 1992). Das liegt vermutlich daran, daß Catalasen in der Regel in Peroxisomen lokalisiert sind, Streßuntersuchungen jedoch meistens an Chloroplasten und Mitochondrien (Superoxidanionenquellen) durchgeführt werden (WILLEKENS *et al.*, 1995).

Die meisten bislang beschriebenen Catalasen sind tetramer mit Molekulargewichten von 220 bis 270 kDa. Abgesehen von der mitochondrialen CAT3 aus Mais (SCANDALIOS *et al.*, 1980) und der 1997 in *Chlamydomonas reinhardtii* (KATO *et al.*) entdeckten dimeren Catalase sind Pflanzencatalasen in Microbodies lokalisiert. Die Übersichtsartikel von SCANDALIOS (1994) und WILLEKENS (1995) beschreiben ausführlich Regulation und Eigenschaften von Pflanzencatalasen.

Catalase in Algen: In vielen Algenabteilungen (VAN DEN HOEK *et al.*, 1993) konnte CAT nachgewiesen werden: Glaucophyta (BETSCHKE *et al.*, 1992), Rhodophyta (MIURA *et al.*, 1978; STABENAU, 1992A; NAKANO *et al.*, 1995), Dinophyta (MATTA und TRENCH, 1991; BUTOW *et al.*, 1994; MATTA, 1995; BUTOW *et al.*, 1997A). Die meisten CAT-Untersuchungen wurden an Vertretern der Chlorophyta (insbesondere Chlorophyceae) durchgeführt (mehr als 30 Veröffentlichungen). CAT-Aktivität wurde auch an Zygnematophyceae (STABENAU, 1976; STABENAU und SÄFTEL, 1981; STABENAU, 1984; STABENAU *et al.*, 1984) gemessen, die anderen Klassen der Chlorophyta wurden kaum oder bislang nicht untersucht. Außerdem wurde in allen bisher untersuchten Klassen der Heterokontophyta CAT nachgewiesen (LUI *et al.*, 1968; GROSS *et al.*, 1985; BACKESHOF und STABENAU, 1990; STABENAU, 1992C; STABENAU, 1992D). In vielen Bacillariophyceae konnte das Enzym nicht detektiert werden (PAUL *et al.*, 1975; GROSS *et al.*, 1985; SUZUKI *et al.*, 1991; STABENAU, 1992B; WINKLER und STABENAU, 1995). Catalaseaktivität in Diatomeen wurde erstmals von HAZZARD (1992) in *Chaetoceros* gemessen. Der Posterbeitrag „Antioxidative Defense in Ice Algae: Catalase (EC 1.11.1.6) in *Entomoneis kufferathii*“ (SCHRIEK und KIRST) auf dem EPC 1 in Köln 1996 zeigte, daß eine weitere Bacillariophyceae Catalase enthält. HAZZARD und Mitarbeiter (1997) haben Catalaseaktivität bei *Chaetoceros gracilis* in Streißversuchen gemessen (vgl. Kap. 4.2). In Haptophyta wurde CAT in niedriger Konzentration (SUZUKI *et al.*, 1991) gefunden; in Chryptophyta (SUZUKI *et al.*, 1991) und Euglenophyta (YOKOTA, 1992) konnte bislang keine Catalase nachgewiesen werden; Chlorarachnophyta wurden nicht untersucht.

STABENAU und Mitarbeiter führten viele CAT-Untersuchungen zur Lokalisierung, Isolierung und Charakterisierung an Microbodies durch. Eine Algen-CAT wurde erstmals von NAKANO und Mitarbeitern (1995) aus *Porphyra yezoensis* gereinigt. Eine erste dimere mitochondriale Catalase wurde bei der Charakterisierung der Grünalge *Chlamydomonas reinhardtii* nachgewiesen. Darüber hinaus wurde eine weitere cytosolische CAT entdeckt (KATO *et al.*, 1997). TAKEDA und Mitarbeiter (1997) entwickelten ein Modell für den Wasserstoffperoxid-Metabolismus in *Chlamydomonas reinhardtii*, in dem sie ebenfalls eine cytosolische Catalase postulieren (vgl. Kap. 1.5).

Peroxidasen (PX, EC 1.11.1.7) sind Glykoproteine (35 bis 100 kDa), die im Pflanzen- und Tierreich weit verbreitet sind (VAN HUYSTEE, 1987) und geringe Substrat- und hohe Wasserstoffperoxidspezifität haben. PX wird gleichnamig mit Guaiacol Peroxidase und Horse Radish Peroxidase verwendet. Bislang sind mehr als zehn (vermutlich sogar 40) Isoenzyme bekannt, die in verschiedenen Kompartimenten lokalisiert sind (NESSEL und MÄDER, 1977). PX reagiert mit verschiedenen anorganischen und organischen Substanzen (BANCI, 1997).

Peroxidase in Algen: PX-Aktivität wurde in *Ulva lactuca* nachgewiesen (MURTHY *et al.*, 1988).

In marinen Algen kommen eher Haloperoxidasen als PX vor, weil sie eine bedeutende Rolle bei der Produktion organischer halogener Verbindungen spielen, die in marinen Organismen weit verbreitet sind. Die erste Reinigung einer Haloperoxidase gelang aus *Ascophyllum nodosum* (VILTER, 1983), auch *Laminaria digitata* und *Laminaria saccharina* enthalten verschiedene Isoformen (in ALMEIDA *et al.*, 1998). Drei vanadiumabhängige Iodo-PX (EC, 1.11.1.8) wurden aus *Saccorhiza polyschides* (Phaeophyceae) gereinigt (ALMEIDA *et al.*, 1998). Bromo-PX (gehört zur Unter-Unterklasse EC 1.11.1) ist in verschiedenen marinen Algen enthalten und wurde aus *Corallina pilulifera* charakterisiert (ITOH *et al.*, 1987). Von 72 auf Bromo-PX untersuchten Algen wiesen 55 PX-Aktivität auf. Rotalgen hatten in der Gruppe die höchsten Aktivitäten, Braunalgen die niedrigsten (HEWSON und HAGER, 1980).

Ascorbat Peroxidase (APX, EC 1.11.1.11) ist eine Wasserstoffperoxid entgiftende Peroxidase, die Ascorbat (AsA) als Elektronenspender in höheren Pflanzen und Algen nutzt (ASADA, 1992). AsA wurde in den Chloroplasten höherer Pflanzen in Konzentrationen von 10 bis 50 mM nachgewiesen (FOYER *et al.*, 1983). Bisher wurden vier APX-Isoenzyme gefunden:

1. in den *Chloroplasten*, eine thylakoidgebundene (tAPX) (MIYAKE und ASADA, 1992; MIYAKE *et al.*, 1993) und eine lösliche Form im Stroma (sAPX) (NAKANO und ASADA, 1987; CHEN und ASADA, 1989).
2. eine *cytosolische* APX, die das im Cytosol gebildete Wasserstoffperoxid reduziert (cAPX).
3. ein *membrangebundenes Isoenzym* in Kürbis (YAMAGUCHI *et al.*, 1995) und Baumwolle (BUNKELMANN und TRELEASE, 1996).

tAPX und sAPX haben eine höhere AsA-Substratspezifität als die cytosolische APX, die ein größeres Substratspektrum aufweist (NAKANO und ASADA, 1987; CHEN und ASADA, 1989; MIYAKE und ASADA, 1992). APX verliert seine Aktivität, wenn die Konzentration von AsA unterhalb von 20 μM liegt (MIYAKE und ASADA, 1996). Die Halbinaktivierungszeiten liegen für tAPX und sAPX bei 15 s und für cAPX bei 40 bis 60 min, wenn die AsA-Konzentration unterhalb von 2 μM liegt (NAKANO und ASADA, 1987; CHEN und ASADA, 1989; MIYAKE und ASADA, 1992).

Chloroplastische APX wird durch Wasserstoffperoxidkonzentrationen im nM-Bereich gehemmt (MIYAKE und ASADA, 1996).

APX schützt die Enzyme des CO_2 -Fixierungszyklus vor Inaktivierung durch Wasserstoffperoxid (KAISER, 1979; CHARLES und HALLIWELL, 1980; TANAKA *et al.*, 1982). Konzentrationen von 10 μM Wasserstoffperoxid inhibieren thiolmodulierte Enzyme, wenn sie nicht durch APX in den Chloroplasten entgiftet werden (ISHIKAWA *et al.*, 1996B).

APX wurde aus verschiedenen höheren Pflanzen isoliert und gereinigt (Übersichtsartikel: ASADA, 1992; CREISSEN *et al.*, 1994). Das Enzym wurde ebenfalls in *Trypanosoma cruzi* (BOVERIS *et al.*, 1980) und in Cyanobakterien gefunden (TEL-OR *et al.*, 1986; MITTLER und TEL-OR, 1991; MIYAKE *et al.*, 1991). Cyanobakterien ohne APX bauen Wasserstoffperoxid durch Catalase ab. *Euglena* (SHIGEOKA *et al.*, 1980B) und nicht photosynthetische Gewebe pflanzlicher Organismen enthalten nur cAPX. Der Mangel an detaillierten Charakterisierungen cytosolischer APX begrenzt das Verständnis der physiologischen Vorgänge im Cytoplasma photosynthetischer Organismen und nicht photosynthetischer Gewebe pflanzlicher Organismen (ISHIKAWA *et al.*, 1996B).

APX in Algen: Euglena gracilis ist die einzige Alge, aus der APX gereinigt und charakterisiert wurde (SHIGEOKA *et al.*, 1980A). Die Untersuchungen an *Euglena* reichen bis zur molekularen APX-Charakterisierung (ISHIKAWA *et al.*, 1993A; AMAKO *et al.*, 1994; ISHIKAWA *et al.*, 1996A). *Euglena* enthält keine Catalase (SHIGEOKA *et al.*, 1980B). Weitere APX-Vorkommen wurden für verschiedene Dinoflagellaten (MATTA und TRENCH, 1991; LESSER, 1996B) beschrieben, von denen einige symbiotisch leben (MATTA, 1995; LESSER, 1996A). APX-Aktivität wurde ebenfalls in den Grünalgen *Chlamydomonas reinhardtii* (MIYAKE *et al.*, 1991; SÜLTEMEYER *et al.*, 1993), *Ulva rigida* (COLLEN und PEDERSEN, 1996) und *Selenastrum capricornutum* (SAUSER *et al.*, 1997) nachgewiesen und an verschiedenen Entwicklungsstadien von *Acetabularia mediterranea* erforscht (CASTILLO *et al.*, 1986).

Glutathion Peroxidase (GPX, EC 1.11.1.9) ist eine H₂O₂-entgiftende PX, die reduziertes Glutathion (GSH) als Substrat nutzt. GPX wurde 1957 in Schweineerythrocyten entdeckt (MILLS, 1957). Anfang der 70er Jahre isolierten FLOHE und Mitarbeiter aus Schweineerythrocyten die für Glutathion spezifische Peroxidase. GPX benötigt Selen als Cofaktor (ROTRUCK *et al.*, 1972). Bis 1976 wurde angenommen, daß GPX nur als Selenoproteine vorkommen. Die ersten selenunabhängigen GPX wurden 1976 in verschiedenen Geweben von Ratten nachgewiesen (in CARMAGNOL *et al.*, 1983). GPX sind vornehmlich im Cytosol und den Mitochondrien lokalisiert. Sie sind in tierischen Geweben (einschließlich Fisch) weit verbreitet (TAPPEL *et al.*, 1982) und wurden in allen untersuchten Säugetiergeweben gefunden (MANNERVIK, 1985), ebenso in Insekten (AHMAD *et al.*, 1989). RENNENBERG (1982) faßte die GPX-Vorkommen in Pflanzen zusammen. HALLIWELL und GUTTERIDGE (1989) zweifelten am allgemeinen Vorkommen von GPX in höheren Pflanzen, obwohl schon 1985 GPX in Spinat, Mais, Wasserlinse, Platane und Sojabohne nachgewiesen wurden (DROTAR *et al.*, 1985). Die erste Reinigung einer pflanzlichen GPX erfolgte aus *Aloe vera* (SABEH *et al.*, 1993).

GPX in Algen: 1982 wurde erstmals GPX in Mikroalgen (verschiedene *Euglena*-Stämme, *Astasia longa*) nachgewiesen (OVERBAUGH und FALL, 1982). Die erste Reinigung und Charakterisierung einer Algen-GPX erfolgte aus *Euglena gracilis* (OVERBAUGH und FALL, 1985). Das selenunabhängige Enzym ist im Cytosol lokalisiert. PRICE und HARRISON (1988) wiesen in der marinen Diatomee *Thalassiosira pseudonana* HUSEDT selenabhängige, membrangebundene und lösliche GPX nach. Selenabhängige GPX mit einer obligaten Substratspezifität für GSH wurde aus *Chlamydomonas reinhardtii* gereinigt (323fach) und charakterisiert (SHIGEOKA *et al.*, 1991). 1995 entdeckte MATTA im Dinoflagellaten *Ostreopsis lenticularis* GPX.

Glutathion Reduktase (GR, EC 1.6.4.2) gehört zu den wenigen Enzymen, bei denen der Weg des Elektronenflusses gut charakterisiert ist. GR ist ein sehr weit verbreitetes Enzym, das die NADPH-abhängige Reduktion von Glutathiondisulfid (GSSG) zu Glutathion katalysiert. GSH wirkt als intrazelluläres Reduktionsmittel. Die Inaktivierung von Proteinen mit S-H-Gruppen durch spontane Oxidation zu gemischten Disulfiden kann durch Disulfidaustausch mit GSH umgekehrt werden (VOET und VOET, 1992). Das Tripeptid GSH wird in fast allen lebenden Zellen gefunden und ist an zahlreichen biochemischen Reaktionen beteiligt.

GSH schützt Enzyme vor Oxidation. Das dabei gebildete oxidierte Glutathion (GSSG) kann durch GR ($\text{GSSG} + \text{NADPH} + \text{H}^+ \rightarrow 2 \text{GSH} + \text{NADP}^+$) reduziert werden (FOYER und HALLIWELL, 1976). GSH fungiert auch als Coenzym in mehreren enzymatisch katalysierten Reduktionen und spielt zudem beim Transport von Aminosäuren eine wichtige Rolle (VOET und VOET, 1992). Darüber hinaus ist GSH an der Wasserstoffperoxidentgiftung beteiligt (BIELAWSKI und JOY, 1986). GR-Vorkommen sind für viele Mikroorganismen und zahlreiche pflanzliche und tierische Gewebe beschrieben (WEIDEMANN, 1975). Das Enzym wurde beispielsweise aus Hefe, Spinatblättern, der Leber von Ratte und Kaninchen und menschlichen Erythrocyten isoliert und gereinigt (SHIGEOKA *et al.*, 1987). Die subzelluläre Lokalisation wurde intensiv an Tiergewebe untersucht. GR war in der Regel im Cytosol lokalisiert. GSH und GR wurden auch in den Chloroplasten von Spinat (FOYER und HALLIWELL, 1976) und Erbsenwurzeln nachgewiesen (BIELAWSKI und JOY, 1986).

GR in Algen: 1987 wurde erstmals eine GR aus Algen charakterisiert (*Euglena gracilis*). Die maximale Aktivität wurde bei pH 8.2 und einer Temperatur von 52 °C gemessen. Das Enzym hatte ein Molekulargewicht von 79 kDa und bestand aus zwei Untereinheiten (40 kDa, SDS). Die ersten und bislang einzigen Reinigungen von GR aus Algen erfolgten 1993 an der einzelligen Grünalge *Chlamydomonas reinhardtii*. SERRANO und LLOBELL (1993) entdeckten dabei zwei GR, lokalisiert in Cytoplasma und Plastiden, wohingegen TAKEDA und Mitarbeiter (1993A) nur eine cytoplasmatische GR nachweisen konnten.

Superoxid Dismutasen (SOD, EC 1.15.1.1) sind Metalloenzyme, die in allen Organismen die Disproportionierung von Superoxidanionen zu Wasserstoffperoxid und molekularem Sauerstoff katalysieren ($2 \text{O}_2^- + 2 \text{H}^+ \rightarrow \text{H}_2\text{O}_2 + \text{O}_2$).

SOD sind wahrscheinlich als Anpassung auf die O_2 -Atmosphäre entstanden und schützen die Zelle gegen O_2^- -Toxizität (FRIDOVICH, 1975). Superoxidanionen werden in Zellen unvermeidlich durch Einelektronenreduktionen aus molekularem Sauerstoff gebildet. Durch Disproportionierung entsteht Wasserstoffperoxid. Superoxidanionen und Wasserstoffperoxid erzeugen durch die eisenkatalysierte HABER-WEISS-Reaktion die hochreaktiven Hydroxylradikale. Die Hydroxylradikalbildung kann nur unterdrückt werden, wenn Superoxidanionen *in situ* entgiftet werden.

SOD wurde von McCORD und FRIDOVICH (1969) in Rindererythrocyten entdeckt (Cu/Zn-SOD, 32 kDa). SOD haben Molekulargewichte zwischen 21.5 und 105 kDa. Drei verschiedene SOD wurden gefunden, die nach den prosthetischen Metallatomen benannt wurden: Cu/Zn-, Mn-, und Fe-SOD. BEAUCHAMP und FRIDOVICH (1971) entwickelten eine Methode zur Färbung nativer SOD. Die verschiedenen SOD können durch Reaktionen mit KCN und H_2O_2 unterschieden werden (KANEMATSU und ASADA, 1990). Cu/Zn-SOD werden irreversibel durch KCN und H_2O_2 gehemmt, Fe-SOD durch H_2O_2 , während Mn-SOD nicht reagiert (FRIDOVICH, 1975). Außerdem wurde eine Fe/Mn-SOD (hydrid-SOD) aus *E. coli* isoliert. Die unterschiedlichen Enzyme sind in verschiedenen Zellkompartimenten lokalisiert, weil O_2^- nicht membrangängig ist.

SOD-Verteilung in Pflanzen: Fe-SOD ist ein dimeres Enzym, das in einigen höheren Pflanzen ausschließlich in Chloroplasten gefunden wurde (Übersichtsartikel: BOWLER *et al.*, 1994). Fe-SOD wurde in *E. coli*, marinen Bakterien und Cyanobakterien (*Plectonema*, *Spirulina*) nachgewiesen (FRIDOVICH, 1975). Fe-SOD- und Mn-SOD-Isoenzyme sind auch für verschiedene Zellen freilebender Cyanobakterien beschrieben (*Anabaena*, *Nostoc*). In allen untersuchten Cyanobakterien hat die Fe-SOD die höchsten Aktivitäten (GRILLI CAIOLA und CANINI, 1993). In Tieren wurde Fe-SOD bislang nicht detektiert.

Mn-SOD wurde intensiver erforscht und scheint in allen bisher untersuchten Pflanzenmitochondrien vorzukommen. Die di- oder tetrameren Mn-SOD kommen in den Thylakoidmembranen von Cyanobakterien (OKADA *et al.*, 1979), Grünalgen (KANEMATSU und ASADA, 1979) und Spinat (HAYAKAWA *et al.*, 1985) vor. Neben mitochondrialer Mn-SOD wurden auch glyoxysomale und peroxisomale Isoformen in Wassermelonen (SANDALIO und DEL RIO, 1987) und Erbsen (DEL RIO *et al.*, 1983) lokalisiert, obwohl Mn-SOD in Microbodies anderer höherer Pflanzen nicht gefunden wurde (ASADA *et al.*, 1973; BAUM und SCANDALIOS, 1979; BAUM und SCANDALIOS, 1981). Mn-SOD sind weit verbreitet unter prokaryotischen und eukaryotischen Organismen. Sie wurden in Bakterien und Mitochondrien von Pflanzen und Tieren nachgewiesen (WEISIGER und FRIDOVICH, 1973; FRIDOVICH, 1975; JACKSON *et al.*, 1978).

Cu/Zn-SOD bestehen aus zwei Untereinheiten (eine mit Zink, eine mit Kupfer) und sind die am intensivsten untersuchten SOD. Sie wurden in Säugetieren, Vögeln, Invertebraten, Pilzen und Pflanzen nachgewiesen. *Cu/Zn-SOD* kommen in verschiedenen Zellkompartimenten vor. Sie wurden in Chloroplasten und Mitochondrien lokalisiert, wo das Superoxid anion gebildet wird. Vermutlich sind *Cu/Zn-SOD* immer im Cytosol zu finden, weil die Mn- und Fe-SOD organellspezifisch sind. Cytosolische *Cu/Zn-SOD* ist für viele höhere Pflanzen beschrieben (Übersichtsartikel: BOWLER *et al.*, 1994), wie zum Beispiel für Reis (KANEMATSU und ASADA, 1989), aus dem das erste pflanzliche SOD-kodierende Gen isoliert wurde. Die cytosolische *Cu/Zn-SOD* in Spinat ist nahe der Vakuole, dem Kern und der apoplastischen Region lokalisiert (OGAWA *et al.*, 1996). Daneben verfügen viele höhere Pflanzen über *Cu/Zn-SOD* im Stroma der Chloroplasten (Übersichtsartikel: BOWLER *et al.*, 1994).

Weitere Vorkommen von *Cu/Zn-SOD* wurden in Membranzwischenräumen der Mitochondrien von *Helianthus tuberosus* (ARRON *et al.*, 1976), Spinat (ASADA *et al.*, 1973), Erbsen (SANDALIO *et al.*, 1987), *Brassica campestris* (BRIDGES und SALIN, 1981) und Wassermelonenglyoxysomen (SANDALIO und DEL RIO, 1987) beschrieben. Im Menschen wurde auch extrazelluläre *Cu/Zn-SOD* gefunden, die für Pflanzen bislang zweimal nachgewiesen wurde (CASTILLO *et al.*, 1987; SCHINKEL *et al.*, 1998).

Zusammengefaßt: Alle höheren Pflanzen scheinen eine mitochondriale Mn-SOD und eine cytosolische *Cu/Zn-SOD* mit Fe-SOD und / oder *Cu/Zn-SOD* im Stroma der Chloroplasten zu besitzen. Vermutlich haben Pflanzen auch peroxisomale SOD. Die Zahl der verschiedenen Isoenzyme der unterschiedlichen SOD variiert sehr von Pflanze zu Pflanze. Chloroplastische SOD ist in grünen Blättern, cytoplasmatische und mitochondriale sind in keimenden Pflanzensämlingen und in etiolierem Gewebe vorherrschend (JACKSON *et al.*, 1978; FOSTER und EDWARD, 1980; SANDALIO und DEL RIO, 1987; KANEMATSU und ASADA, 1989; KANEMATSU und ASADA, 1990). Prokaryotische SOD sind mit wenigen Ausnahmen Fe- und Mn-SOD, eukaryotische SOD ist cytosolische *Cu/Zn-SOD*.

Evolutionäre Betrachtung: Alle bislang untersuchten Prokaryoten enthalten Mn- und Fe-SOD, wobei Cu/Zn-SOD meistens fehlt. Eukaryotische Algen und Protozoen besitzen nur Fe- und Mn-SOD (ASADA *et al.*, 1977). Cu/Zn-SOD (cytosolisch) wurde in allen höheren Eukaryoten einschließlich dem Tierreich ebenso wie Mn-SOD (Mitochondrien) gefunden. Die phylogenetische Verteilung der SOD zeigt an, daß Mn- und Fe-SOD nahe verwandt sind, wohingegen die Cu/Zn-SOD unabhängig davon ist (ASADA *et al.*, 1980; BOWLER *et al.*, 1994).

SOD in Algen: Cu/Zn-SOD ist in höheren Pflanzen und Tieren weit verbreitet, in Algen meistens nicht nachzuweisen (LUMSDEN und HALL, 1975; ASADA *et al.*, 1977; HENRY und HALL, 1977), Ausnahmen bilden die Grünalgen *Chara* und *Spirogyra* (HENRY und HALL, 1977), sowie die bisher untersuchten Dinoflagellaten: *Symbiodinium microadriaticum* enthält Cu/Zn-, Mn- und Fe-SOD (MATTA *et al.*, 1992), in *Gonyaulax polyedra* und in *Peridinium gatunense* wurden lediglich Cu/Zn- und Mn-SOD gefunden (ASANO *et al.*, 1996; BUTOW *et al.*, 1997B). ASADA und Mitarbeiter (1977) konnten in verschiedenen Charo- (2), Chloro- (6), Eugleno- (1), Phaeo- (4), Chryso- (2) und Rhodophyta (5) keine Cu/Zn-SOD nachweisen.

Cu/Zn-SOD kommt in verschiedenen aquatischen Angiospermen und Farnen vor. Auch der Rotalge *Porphyridium cruentum* sowie den Grünalgen *Codium fragile* und *Scenedesmus obliquus* fehlt Cu/Zn-SOD (LUMSDEN und HALL, 1975). Untersuchungen an Grünalgen ergaben für *Scenedesmus obliquus* vier Fe- und fünf Mn-SOD (REDMOND *et al.*, 1985). Die erste aus Grünalgen gereinigte SOD war eine Fe-SOD (54fach, 40 kDa, zwei Untereinheiten), die neben drei Mn-SOD in *Chlamydomonas reinhardtii* vorkommt (SAKURAI *et al.*, 1993). Aus *Chlamydomonas reinhardtii* wurde auch das erste Fe-SOD kodierende Gen aus Algen isoliert (CHEN *et al.*, 1996).

Die erste Reinigung einer Algen-SOD (Mn-SOD, 239fach) erfolgte aus *Porphyridium cruentum* (MISRA und FRIDOVICH, 1977). KANEMATSU und ASADA (1979) reinigten erstmals eine Fe-SOD (*Euglena gracilis*, 350fach). *Euglena* enthielt auch eine thylakoidgebundene Mn-SOD.

1.5 Lokalisierung des enzymatischen Oxidationsschutzes

Die zelluläre Sauerstoffaktivierung findet in verschiedenen Kompartimenten statt (ELSTNER, 1990). In Pflanzen wurde besonders die Einelektronenreduktion von Sauerstoff (eine unvermeidliche Reaktion bei der Superoxid-anionen gebildet werden) in belichteten Chloroplasten untersucht (NAKANO und ASADA, 1987). SOD katalysiert im Stroma und Lumen die Disproportionierung von Superoxidanionen zu Wasserstoffperoxid und Sauerstoff (HAYAKAWA *et al.*, 1984). Das Wasserstoffperoxid wird durch eine Peroxidase reduziert, die einen in den Thylakoiden produzierten Elektronenspender nutzt (NAKANO und ASADA, 1980).

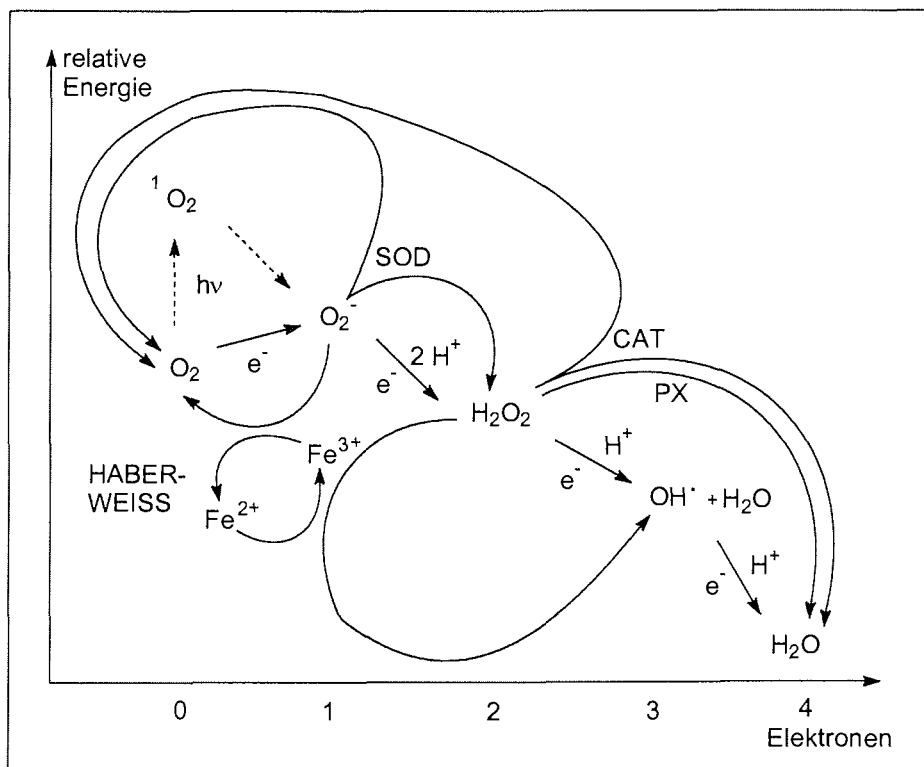


Abb. 1.4: Energetik der Sauerstoffreduktion und enzymatische Abbauewege reaktiver Sauerstoffverbindungen, modifiziert nach ELSTNER (1996).

Abbildung 1.4 zeigt die Energetik der Sauerstoffreduktion und die enzymatischen Abbaewege der reaktiven Sauerstoffverbindungen. Abgesehen von der ersten endergonischen monovalenten Reduktion des Sauerstoffs (O_2 zu O_2^-), laufen die weiteren Einelektronenschritte spontan ab oder finden in Gegenwart geeigneter Reaktionspartner statt, ohne weitere Energie zu verbrauchen. Im Verlauf der Reaktionssequenz entstehen Wasserstoffperoxid, das OH-Radikal und schließlich Wasser.

In vielen pflanzlichen und tierischen (meistens im Cytosol) Geweben wurden GR und GSH nachgewiesen. Seit Anfang der 50er Jahre ist bekannt, daß auch Spinat GR und GSH enthält, dennoch ist die subzelluläre Verteilung unbekannt. Die erste Untersuchung an Chloroplasten wurde von FOYER und HALLIWELL (1976) an Spinat durchgeführt, bei der GR und GSH in Chloroplasten nachgewiesen wurde. Das Vorkommen von Dehydroascorbat Reduktase (DHR), das die Reaktion $DAsA + 2 GSH \rightarrow GSSG + AsA$ katalysiert, war bereits für viele Pflanzen beschrieben. FOYER und HALLIWELL (1976) zeigten, daß die NADPH-abhängige Wasserstoffperoxidentgiftung über den Ascorbat-Glutathion-Zyklus erfolgt.

In Abbildung 1.5 ist der FOYER-HALLIWELL-Ascorbat-Glutathion-Zyklus dargestellt. Ascorbat reagiert mit Superoxidanionen und Wasserstoffperoxidmolekülen, wobei Dehydroascorbat (DAsA) entsteht. GSH reduziert DAsA. Das dabei gebildete GSSG wird durch die NADPH-abhängige Reaktion mit GR reduziert.

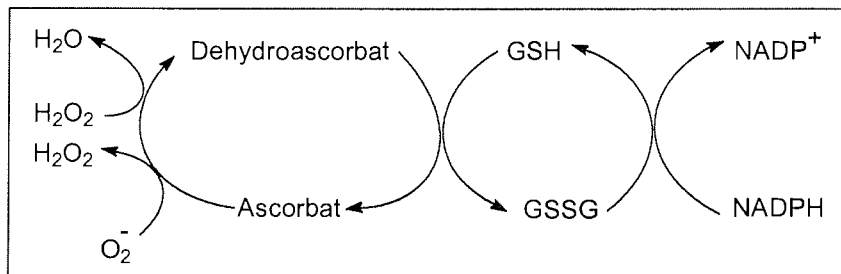


Abb. 1.5: Ascorbat-Glutathion-Zyklus in Spinatchloroplasten nach FOYER und HALLIWELL (1976).

Wasserstoffperoxid ist die stabilste reaktive Sauerstoffverbindung, die oxidierend und reduzierend wirken kann. In Abwesenheit von Metallionen reagiert Wasserstoffperoxid nur mit wenigen organischen Molekülen (SALIN, 1987). Die Elektronentransportkette in den Chloroplasten ist die am besten dokumentierte Quelle von Wasserstoffperoxid (MEHLER, 1951; ASADA, 1994). Das Wasserstoffperoxid reduzierende Schlüsselenzym im Licht ist APX. Zusammen mit SOD, Monodehydroascorbat Reduktase (MDR), DHR und GR bildet APX das Verteidigungssystem gegen reaktive Sauerstoffverbindungen in Chloroplasten (FOYER und MULLINEAUX, 1994). Auch Mitochondrien und Peroxisomen sind Wasserstoffperoxidquellen (CADENAS, 1989; DEL RIO *et al.*, 1992).

TAKEDA und Mitarbeiter (1997) untersuchten den Wasserstoffperoxid-Metabolismus an *Chlamydomonas reinhardtii* und fanden heraus, daß selenabhängige GPX und Catalase bei der H_2O_2 -Entgiftung im pseudozyklischen Elektronentransport von *Chlamydomonas reinhardtii* wichtige Rollen spielen (Abb. 1.6).

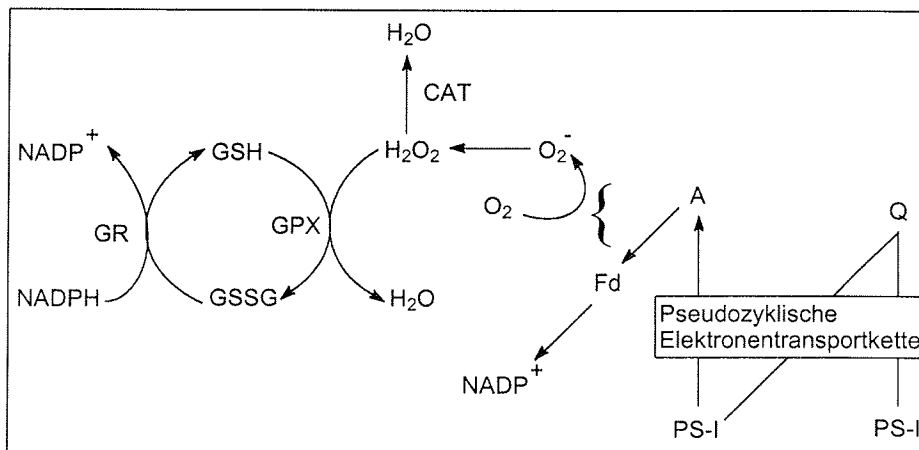


Abb. 1.6: Wasserstoffperoxid-Metabolismus in *Chlamydomonas reinhardtii* nach und Mitarbeitern (1997); A: Elektronenakzeptor; Fd: Ferredoxin; PS-I, PS-II: Photosysteme I und II; Q: Chinon.

Verschiedene Übersichtsartikel von FOYER belegen die Fortschritte in den Untersuchungen zum FOYER-HALLIWELL-Ascorbat-Glutathion-Zyklus in Pflanzen (FOYER *et al.*, 1994A und 1994B; FOYER *et al.*, 1997).

1.6 Zielsetzung

Die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Eisalgen *Entomoneis kufferathii* und *Chaetoceros* sp. leben unter extremen Umweltbedingungen: Niedrige Temperaturen, stark schwankende Lichtintensitäten, hohe Salinitäten und erhöhte Konzentrationen reaktiver Sauerstoffverbindungen (vgl. Kap. 1.1), legen nahe, daß Eisdiatomeen Abwehrmechanismen ausgebildet haben. Der enzymatische Oxidationsschutz sollte in *E. kufferathii* untersucht werden.

Zunächst sollte geklärt werden, welche Enzyme, die am Oxidationsschutz beteiligt sind, überhaupt in den Eisdiatomeen nachweisbar sind. Anschließend sollten die Enzyme näher charakterisiert werden (pH- und Temperaturoptima, K_M -Wert, V_{max} -Wert, Stabilitäten (25 °C und 37 °C) und Molekulargewichte (Gelelektrophorese)).

Danach sollte überprüft werden, ob Catalase und / oder Peroxidasen (PX, APX, GPX) an der Wasserstoffperoxidentgiftung in *E. kufferathii* beteiligt sind und wie stark ihre Substratspezifität ausgeprägt ist.

Die am enzymatischen Oxidationsschutz beteiligten SOD sollten in nativer Gelelektrophorese spezifisch gefärbt und nach SOD-Typ (Mn, Fe oder Cu/Zn als prosthetische Gruppe) eingeteilt werden.

Abschließend sollte die Frage: „Ist Oxidationsschutz induzierbar?“ gelöst werden. Dazu wurde der Einfluß von Licht (6, 30, 60, 90 und 150 $\mu\text{mol Photonen} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) und Temperatur (-4, 0 und 4 °C) auf die Oxidationsschutzenzyme in *E. kufferathii* nach 2, 4 und 8 Tagen untersucht. Im Tagesgang sollte der Lichteinfluß auf die Oxidationsschutzenzyme bei 0 °C gemessen werden.

Für vergleichende Untersuchungen wurde *Chaetoceros* sp. eingesetzt.

2 Experimenteller Teil

2.1 Die Untersuchungsobjekte *Chaetoceros* sp. und *Entomoneis kufferathii* MANGUIN

Die antarktischen Eisdiatomeen *Chaetoceros* sp. und *Entomoneis kufferathii* gehören zur Abteilung der Heterokontophyta und zur Klasse der *Bacillariophyceae*. Die Gattungen *Chaetoceros* und *Entomoneis* werden der Ordnung der *Centrales* zugesprochen (VAN DEN HOEK *et al.*, 1993).

E. kufferathii und *Chaetoceros* sp. wurden 1986 im Rahmen des „Winter Weddell Sea Project“ (WWSP) aus Packeisproben isoliert, die durch Wissenschaftler des Forschungsschiffs „Polarstern“ während der Antarktisexpedition ANT V2/3 genommen wurden.

Entomoneis kufferathii MANGUIN ist in der Literatur auch unter dem Namen *Amphiprora kufferathii* zu finden. Die Gattung *Entomoneis* besteht aus etwa 100 Arten, die meisten davon sind Brackwasser- und Meeresbewohner (KRAMMER, 1986).

Die Form der Kieselschale ist in der Gürtelbandansicht den Vorder- und Hinterflügeln eines Insekts ähnlich. Dieses insektenartige Aussehen hat EHRENBERG (in KRAMMER, 1986) zu dem Namen Entomoneis (Insekten-schiffchen) verleitet. Auf der Schalenoberseite sitzt ein s-förmig geschwungener Kiel, der die Raphe trägt. Diesen Kiel sieht man in der Gürtelbandansicht als zwei Höcker, die unter dem Mikroskop in verschiedenen optischen Ebenen liegen. In der Mitte senkt sich der Kiel bis zur Schalenoberfläche. Ein anderes Strukturmerkmal sind die zahlreich ornamentierten Gürtelbänder.

E. kufferathii ist als typischer Vertreter der Boden- und Untereisgesellschaften im antarktischen Meereis häufig (HORNER *et al.*, 1992), innerhalb der Eissäule jedoch nur vereinzelt anzutreffen (McGRATH GROSSI und SULLIVAN, 1985). BARTSCH (1989) beschreibt *E. kufferathii* als typischen, koloniebildenden Bewohner der Bodengesellschaft und der unteren Eisschichten mit verstärktem Vorkommen entlang der Schelfkante. Zelldichten bis zu $3 \cdot 10^8$ Zellen \cdot L⁻¹ wurden in den vertikal ausgerichteten Laugenkanälen des Säuleneises gemessen (McCONVILLE und WETHERBEE, 1983).

Im freien Wasser ist diese Art nur sehr selten anzutreffen (GARRISON *et al.*, 1993). Im Plankton tritt *E. kufferathii* nach KLÖSER (1990) nur im Zusammenhang mit Eisbedeckung auf. SCHAREK (1991) vermutet ein Übersommern von *E. kufferathii* auf dem Schelfboden, im Resteis oder auch selten im freien Wasser.

Nach McGRATH GROSSI und Mitarbeitern (1984) besteht eine enge Beziehung zwischen epiphytischen Bakterien und *E. kufferathii* im Meereis. Dabei sollen die Bakterien von Exoprodukten der Alge profitieren. Ein derartiges Zusammenleben von Epibakterien und *Entomoneis*-Arten innerhalb der SIMCO beschreiben auch GARRISON und Mitarbeiter (1986).

Als Vertreter der Boden- und Untereisgesellschaft ist *E. kufferathii* im Jahresgang nur geringen Schwankungen der Temperatur (-1.8 °C) und der Salinität (34 PSU) ausgesetzt. Im Frühjahr kann die einsetzende Eisschmelze zu kurzzeitigen hypoosmotischen Belastungen führen (WANZEK, 1994).

Die Lichtbedingungen dagegen verändern sich für *E. kufferathii* im Jahresgang erheblich, wobei die Alge durch ihr hauptsächlichliches Vorkommen an der Eisunterseite als Schwachlichtalge angesehen werden kann.

Chaetoceros sp. ist eine noch nicht näher beschriebene kleinzellige Form der Gattung *Chaetoceros*, die aufgrund fehlender taxonomischer Merkmale nicht bis zur Art bestimmt werden konnte (NOTHNAGEL, 1995). Möglicherweise handelt es sich um die bei THOMAS und Mitarbeitern (1992) beschriebene *Chaetoceros*-Art. Die kleinzelligen antarktischen Vertreter dieser Art werden auch häufig als *Chaetoceros neogracile* bezeichnet (NOTHNAGEL, 1995). NÖTHIG (1988), KLÖSER (1990), SCHAREK (1991) und BARTSCH (1989) erwähnen sie in ihren Arbeiten als *Chaetoceros* „Typ A“.

Als Lebensraum dient *Chaetoceros* sp. das Pelagial sowie die Plättcheneis-schicht, wo sie häufig gefunden wurde (SCHAREK, 1991). GARRISON und Mitarbeiter (1986) beschreiben ihr Vorkommen in der Wassersäule.

Im Meereis kommt *Chaetoceros* sp. über die gesamte Eisdicke gleichmäßig verteilt vor (BARTSCH, 1989).

Chaetoceros sp. ist in der Eissäule schwankenden Umweltbedingungen ausgesetzt. Ihr Vorkommen auch in den oberen Bereichen der Eissäule weist auf die Fähigkeit hin, hohe Salzkonzentrationen (34 bis 150 PSU) und tiefe Temperaturen (durchschnittliche Minimaltemperatur -5 bis -7 °C) tolerieren zu können (BARTSCH, 1989).

Der Lebensraum Pelagial zeichnet sich dagegen durch relativ konstante Bedingungen aus. Die Fähigkeit zur Besiedlung so unterschiedlicher

Lebensräume führt zur Annahme, daß *Chaetoceros* sp. über eine hohe Anpassungsfähigkeit verfügt.

2.2 Kultivierung

Medium

WIMEX, Wiegandt, Krefeld
Natriumhydrogencarbonat, Riedel-de Haën 31437
HEPES, Biomol 05288
Glycylglycin, Biomol 05008

Vitamine

Biotin, Merck 500030
Cyanocobalamin (Vitamin B₁₂), Merck 24592
Thiamin · HCl, Serva 36020

Spurenmehalle

Kupfersulfat Pentahydrat, Merck 102790
Zinksulfat Heptahydrat, Merck 8883
Cobaltchlorid Hexahydrat, Riedel-de Haën 31277
Manganchlorid Tetrahydrat, Merck 105927
Natriummolybdat Dihydrat, Merck 6521
Eisen(III)-citrat, Merck 3862
Citronensäure Monohydrat, Merck 244

Nährsalze

Natriumnitrat, Riedel-de Haën 31440
Natriumdihydrogenphosphat Monohydrat, Merck 6346
Natronwasserglas, Riedel-de Haën 13726

Geräte

Minifuge GL 4400, mit Schwenkbecherrotor 2150, Heraeus, Osterode
 Kühlbrutschrank, Typ 3500, Rumed, Hannover
 Kühltruhe (-80 °C), UF 85-170 T, Colora, Lorch
 Leuchtstoffröhren, Tageslicht Lumilux Daylight L36 W/11, Osram, Berlin
 Leuchtstoffröhren, Lumilux de Luxe, L36W/12-950, Tageslicht, Osram, Berlin
 Quantum Radiometer, Licor-185 B, mit 4 π -sphärischer Quantensensor Li-193
 SB, LI-COR, USA
 Kühltruhe, Comfort Plus, Siemens, München
 Graufolie, Strand Lighting, Wolfenbüttel

Tab. 2.1: Hauptnährstoffe, Spurenmetalle und Vitamine in der f/2 β -Nährlösung (GUILLARD, 1975).

Hauptnährstoffe	mg/L Seewasser	$\mu\text{mol/L}$
NaNO_3	75	88
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	5	36.3
$\text{Na}_2\text{SiO}_3 \cdot 9 \text{H}_2\text{O}$	30	107

Spurenmetalle	mg/L Seewasser	$\mu\text{mol/L}$
$\text{FeC}_6\text{H}_5\text{O}_7$	3.0	8.9
$\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$	16.8	80.1
$\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$	0.01	0.04
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	0.022	0.08
$\text{CoCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$	0.01	0.05
$\text{MnCl}_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$	0.18	0.9
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	0.006	0.03

Vitamine	$\mu\text{g/L}$ Seewasser	$\mu\text{mol/L}$
Thiamin $\cdot \text{HCl}$	100.0	$2.97 \cdot 10^{-7}$
Biotin	0.5	$2.05 \cdot 10^{-9}$
Vitamin B ₁₂ (Cyanocobalamin)	0.5	$3.69 \cdot 10^{-10}$

2.2.1 Kulturbedingungen

Die Algen wurden in synthetischem Meerwassermedium (WIMEX) mit einer Salinität von 34 PSU kultiviert. Das Medium wurde mit Nitrat, Phosphat, Silikat, Spurenmetallen und Vitaminen angereichert (f/2 β -Nährlösung nach GUILLARD, 1975, vgl. Tab. 2.1), um eine Nährstofflimitierung auszuschließen. Als Kohlenstoffquelle wurde 2.4 mM Natriumhydrogencarbonat zugegeben. Gepuffert wurde mit 5 mM Glycylglycin für die Kultivierung von *E. kufferathii* und mit 3 mM HEPES für *Chaetoceros* sp.. Das auf 0 °C gekühlte Medium wurde auf einen pH-Wert von 7.8 eingestellt, sterilfiltriert und bei 0 °C gelagert.

Die Anzucht der Algen erfolgte in einer Tiefkühltruhe (Comfort Plus) mit externer Temperatursteuerung (± 0.5 °C) bei einer Temperatur von 0 °C mit einer Bestrahlungsstärke von 30 $\mu\text{mol Photonen} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ in sterilen 1- bis 5-L-Erlenmeyerkolben bei einem Licht-Dunkel-Rhythmus von 12 zu 12 Stunden. Die Algen wurden täglich geschüttelt. Das Medium der Algen wurde alle sieben Tage entfernt (0 °C, 5 min, 320 * g, Minifuge GL), die Algen dreimal mit WIMEX f/2- β -Medium gewaschen und anschließend in Erlenmeyerkolben kultiviert, extrahiert (Kap. 2.2.2) oder in physiologischen Versuchen verwendet (Kap. 2.6).

Bezugsgröße: Zellzahl

Zählkammer, Neubauer Improved, Brandt, Wertheim

Die Zellzahl wurde mit Hilfe von Neubauer-Zählkammern ermittelt. Die Bestimmung erfolgte für *E. kufferathii* durch Auszählen von acht und für *Chaetoceros* sp. durch Auszählen von zwei Großquadraten mit einer Fläche von jeweils 1 mm² und einer Tiefe von 0.1 mm.

2.2.2 Extraktion

J2-HS Zentrifuge, Festwinkelrotor J-A18, Beckman

Minifuge GL 4400, mit Schwenkbecherrotor 2150, Heraeus, Osterrode

Biofuge fresco, Heraeus, Osterrode

PC-Zentrifugenbecher, Beckman, 357002

Adapter, Beckman, 347539

Extraktionspuffer

Calcium chloride dihydrate, Janssen 20.778.20
Complete™, Protease inhibitor cocktail tablets, Boehringer 1697498
EGTA, Sigma E-4378
Magnesiumchlorid Hexahydrat, Fluka 53065
Manganchlorid Tetrahydrat, Fluka 31422
MES, Sigma M-8250
Triton X-100, Sigma T-9284

Analysenpuffer

Complete™, Protease inhibitor cocktail tablets, Boehringer 1697498
Magnesiumchlorid Hexahydrat, Fluka 53065
MES, Sigma M-8250
D(+)-Sucrose, Acros 17714

E. kufferathii und *Chaetoceros* sp.

Die dreimal mit WIMEX f/2- β -Medium gewaschenen Algen wurden in 100 mM MES pH 6.5 resuspendiert und erneut zentrifugiert (0 °C, 5 s, 13,000 * g, Biofuge fresco). Der Überstand wurde verworfen, die Algen mit flüssigem Stickstoff gefroren und in einer Reibschale mit wenig Sand innerhalb von 1 min zerstoßen. Alle weiteren Arbeitsschritte wurden bei 4 °C durchgeführt. Die Suspension wurde mit Extraktionspuffer bestehend aus 100 mM MES pH 6.5, 50 mM Manganchlorid, 10 mM Magnesiumchlorid, 10 mM Calciumchlorid, 0.05% Triton-X-100, 1 mM EGTA und einer Proteaseinhibitortablette/50mL versetzt und 15 min inkubiert. Die farbige Suspension wurde in 70-mL-PC-Zentrifugengläser überführt und 15 min mit 47,900 * g zentrifugiert. Der Überstand wurde zur 0 - 80%- oder zur fraktionierten Ammoniumsulfatfällung (0 - 40 und 40 - 80%) eingesetzt. Dazu wurde festes Ammoniumsulfat portionsweise innerhalb von 15 min unter Rühren zugegeben. Die Suspension wurde noch 30 min gerührt und anschließend erneut 15 min zentrifugiert. Die gefällten Proteine wurden bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C eingefroren oder in Analysenpuffer bestehend aus 100 mM MES pH 6.5, 10 mM Magnesiumchlorid, 10% Saccharose und einer Proteaseinhibitortablette/50mL gelöst und untersucht.

Bezugsgröße: Protein

Puffer zur Proteinbestimmung

Proteinassay, Bio-Rad, München, 500-0006

Magnesiumchlorid Hexahydrat, Fluka 53065

MES, Sigma M-8250

Titriplex III, Merck 8418

Als Bezugsgröße für die Enzymversuche wurden die Proteingehalte mit einem auf der Proteinbestimmung nach BRADFORD (1976) beruhenden Test bestimmt. Als Puffer wurde 100 mM MES pH 6.5, versetzt mit 10 mM MgCl₂ und 1 mM EDTA verwendet. 800 µL 1 zu 100 verdünnter Enzymextrakt wurden in 1-mL-Plastikeinküvetten mit 200 µL Reagenz versetzt, geschüttelt, 10 min bei RT inkubiert und anschließend bei 595 nm gemessen.

Quantitative Proteinbestimmungen erfolgten mit Konzentrationen von 1, 2, 4 und 10 mg/mL BSA als Eichprotein.

Bakterien

Agar Agar, Serva 11396

Pepton, Serva 48614

Die Bakteriennachweise erfolgten durch Licht- und Epifluoreszenzmikroskopie nach Anfärben mit Acridin Orange (SHERR *et al.*, 1996).

Bakterien wurden bei 0 °C auf Agar-Pepton-Platten (1.5% Agar, 1% Pepton, Anumbraschale: Ø 20 cm) kultiviert. Die Bakterien wurden mit wenig Extraktionspuffer von den Agar-Pepton-Platten in eine Reibschale gespült und 1 min bei 4 °C mit Sand verrieben. Dann wurde 2 min bei 0 °C mit 13,000 * g zentrifugiert. 1 mL des Überstands wurde zur fraktionierten Ammoniumsulfatfällung (0 - 40 und 40 - 80%) eingesetzt. Die gefällten Proteine wurden bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C eingefroren, andernfalls in Analysenpuffer resuspendiert und untersucht.

2.3 Photometrie

Photometer UV-160A, Shimadzu
1-mL-Küvetten 104-QS und 104-OS, Hellma
Plastikeinmalküvetten
Transferpetten, Brand

Dikaliumhydrogenphosphat Trihydrat, Merck 5099
di-Natriumhydrogenphosphat-2-Hydrat, Merck 6580
Natriumdihydrogenphosphat Monohydrat, Merck 6346
Kaliumdihydrogenphosphat, Merck 4873

Catalase

Wasserstoffperoxid nicht stabilisiert, Fluka 95313

Peroxidase

ABTS, Sigma A-1888
Caffeic Acid, Sigma C-0625
CAPS, Sigma C-2632
CHES, Sigma C-2885
Citronensäure-Monohydrat, Merck 244
o-Dianisidine, Serva 19175
Essigsäureanhydrid, Merck 42
Ferulic Acid, Sigma F-3500
Guaiacol, Sigma G-5502
MES, Sigma M-8250
MOPS, Sigma M-1254
Natriumacetat wasserfrei, Merck 6268
Pyrogallol, Fluka 83130
Trisma-Base, Sigma T-1503
Wasserstoffperoxid nicht stabilisiert, Fluka 95313

Ascorbat Peroxidase

Natriumascorbat, Sigma A-7631
Wasserstoffperoxid nicht stabilisiert, Fluka 95313

Glutathion Peroxidase und Glutathion Reduktase

NADPH, Boehringer 107816
 Glutathion Reduktase, Sigma G-4751
 Glutathion reduziert, Boehringer 127744
 Glutathion oxidiert, Boehringer 105635
 Titriplex III, EDTA, Merck 8418
 Trisma-Base, Sigma T-1503

Superoxid Dismutase

Bernsteinsäure, Merck 682
 Pyrogallol, Fluka 83130
 Titriplex III, EDTA, Merck 8418
 Trisma-Base, Sigma T-1503

2.3.1 Catalase

Der Wasserstoffperoxidabbau durch Catalase zu Sauerstoff und Wasser ($2 \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow 2 \text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$) wurde photometrisch bei 240 nm verfolgt (AEBI, 1984).

Die Catalase-Aktivitätsbestimmung erfolgte in 1-mL-Quarzküvetten bei 25 °C in 100 mM Phosphatpuffer pH 7.0. Zu 610 bis 650 µL Puffer wurden 0.1 mM H_2O_2 , gelöst in 340 µL Puffer, gegeben. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 10 bis 50 µL Enzymextrakt gestartet. Das Gesamtküvettenvolumen betrug 1000 µL. Die Extinktionsabnahme ΔE wurde über 30 s aufgezeichnet.

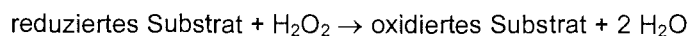
	µL	[mM]
100 mM Phosphatpuffer pH 7.0	610-650	
0.34 mM Wasserstoffperoxid	340	0.1
Enzymextrakt	10-50	

U in 1000 µl Enzymextrakt:
$$\frac{\Delta E/\text{min} * 1000 \mu\text{L}}{\epsilon_{\text{H}_2\text{O}_2} * \mu\text{L Enzymextrakt}}$$

$\epsilon_{\text{H}_2\text{O}_2} (240 \text{ nm}) = 39.4 [\text{mM}^{-1} * \text{cm}^{-1}]$

2.3.2 Peroxidase

PX sind spezifische Hydrogenakzeptoren mit geringer Substratspezifität, die Wasserstoffperoxid zu Wasser reduzieren:



Als künstliche Substrate wurden ABTS (RAO *et al.*, 1996), *o*-Dianisidin (NESSEL und MÄDER, 1977) und Guaiacol (RAO *et al.*, 1996) eingesetzt. Daneben wurden die natürlichen Substrate Ferulasäure (NESSEL und MÄDER, 1977), Kaffeesäure (NESSEL und MÄDER, 1977) und Pyrogallol (DALTON *et al.*, 1987) verwendet.

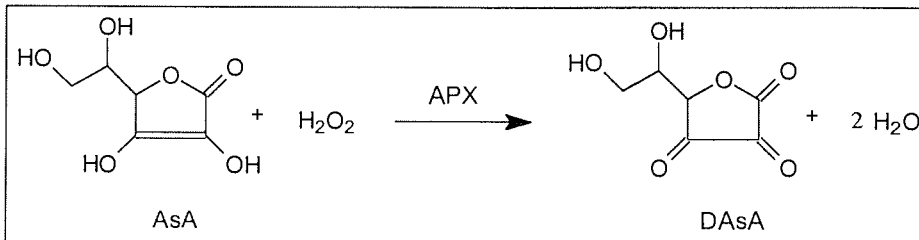
Die Substratspezifitätstests wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen bei 25 °C in 100 mM Citrat- pH 4.0, Acetat- pH 5.0, MES- pH 6.0, MOPS- pH 7.0, TRIS- pH 8.0, CHES- pH 9.0 und CAPS-Puffer pH 10.0 mit 0.1 mM Wasserstoffperoxid durchgeführt (Tab. 2.2). Die Reaktionen wurden 1 min verfolgt.

Tab. 2.2: Substrate, Substratkonzentrationen und eingesetzte Wellenlängen im PX-Test.

Substrat	[mM]	Wellenlänge [nm]	ϵ [mM ⁻¹ * cm ⁻¹]
ABTS	0.8	460	36.8
<i>o</i> -Dianisidin	0.05	460	11.3
Ferulasäure	0.05	320	
Guaiacol	10.0	470	25.2
Kaffeesäure	0.5	410	
Pyrogallol	10.0	430	2.47

2.3.3 Ascorbat Peroxidase

APX oxidiert Ascorbat zu Dehydroascorbat:



Die Oxidation wurde photometrisch bei 290 nm verfolgt (CHEN und ASADA, 1989).

Die Bestimmung erfolgte in 1-mL-Quarzküvetten bei 25 °C in 100 mM Phosphatpuffer pH 7.0. Zu 800 bis 840 μL Puffer wurden 50 μL 1 mM Natriumascorbat und 50 μL 1 mM Wasserstoffperoxid gegeben. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 10 bis 50 μL Enzymextrakt gestartet. Das Gesamtküvettenvolumen betrug 1000 μL . Die Extinktionsabnahme ΔE wurde über 5 min aufgezeichnet.

	μL	[mM]
100 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7.0	800-840	
1 mM Wasserstoffperoxid	50	0.05
1 mM Natriumascorbat	50	0.05
Enzymextrakt	10-50	

$$U \text{ in } 1000 \mu\text{L Enzymextrakt: } \frac{\Delta E/\text{min} * 1000 \mu\text{L}}{\epsilon_{\text{AsA}} * \mu\text{L Enzymextrakt}}$$

$$\epsilon_{\text{AsA}} (290 \text{ nm}) = 2.8 [\text{mM}^{-1} * \text{cm}^{-1}]$$

2.3.4 Glutathion Peroxidase

GPX nutzt reduziertes Glutathion zur Entgiftung von Wasserstoffperoxid ($2 \text{ GSH} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{GSSG} + 2 \text{H}_2\text{O}$). Dabei entsteht oxidiertes Glutathion, das durch GR reduziert wird ($\text{GSSG} + \text{NADPH} + \text{H}^+ \rightarrow 2 \text{GSH} + \text{NADP}^+$).

Die GPX-Aktivität wird indirekt über die GR-Aktivität bestimmt (OVERBAUGH und FALL, 1985).

Die GPX-Aktivitätsbestimmung erfolgte in 1-mL-Quarzküvetten bei 25 °C in 100 mM TRIS-Puffer pH 8.0 versetzt mit 2 U GR/mL. Zu 790 bis 795 µL Puffer wurden jeweils 50 µL 20 mM EDTA, 2 mM NADPH, 100 mM GSH und 10 mM H₂O₂ gegeben. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 5 bis 10 µL Enzymextrakt gestartet. Das Gesamtküvettenvolumen betrug 1000 µL. Die Extinktionsabnahme ΔE wurde über 1 min aufgezeichnet.

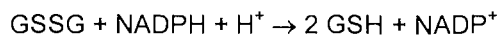
	µL	[mM]
100 mM TRIS-Puffer pH 8.0	790-795	
20 mM EDTA	50	1
100 mM GSH	50	5
2 mM NADPH	50	0.1
10 mM H ₂ O ₂	50	0.5
Glutathion Reduktase		2 U
Enzymextrakt	5-10	

U in 1000 µl Enzymextrakt:
$$\frac{\Delta E/\text{min} * 1000 \mu\text{L}}{\epsilon_{\text{NADPH}} * \mu\text{L Enzymextrakt}}$$

$\epsilon_{\text{NADPH}} (340 \text{ nm}) = 6.3 [\text{mM}^{-1} * \text{cm}^{-1}]$

2.3.5 Glutathion Reduktase

GR katalysiert die Reaktion von oxidiertem zu reduziertem Glutathion:



Die Oxidation von NADPH + H⁺ ist bei 340 nm photometrisch meßbar (GOLDBERG und SPOONER, 1983). Die Extinktionsabnahme ist proportional zum Substratverbrauch und damit ein Maß für die Enzymaktivität.

Die GR-Aktivitätsbestimmung erfolgte in 1-mL-Quarzküvetten bei 25 °C in 100 mM TRIS-Puffer pH 8.0. Zu 800 bis 840 µL Puffer wurden 50 µL 20 mM EDTA, 50 µL 2 mM NADPH und 50 µL 10 mM GSSG gegeben. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 10 bis 50 µL Enzymextrakt gestartet. Das Gesamtküvettenvolumen betrug 1000 µL. Die Extinktionsabnahme ΔE wurde über 1 min aufgezeichnet.

	μL	[mM]
100 mM TRIS-Puffer pH 8.0	800-840	
20 mM EDTA	50	1
10 mM GSSG	50	0.5
2 mM NADPH	50	0.1
Enzymextrakt	10-50	

$$U \text{ in } 1000 \mu\text{l Enzymextrakt: } \frac{\Delta E/\text{min} * 1000 \mu\text{L}}{\epsilon_{\text{NADPH}} * \mu\text{L Enzymextrakt}}$$

$$\epsilon_{\text{NADPH}} (340 \text{ nm}) = 6.3 [\text{mM}^{-1} * \text{cm}^{-1}]$$

2.3.6 Superoxid Dismutase

Die Methode nach MARKLUND und MARKLUND (1974) beruht auf der Autoxidation von Pyrogallol durch Sauerstoff, wobei Superoxidanionen gebildet werden, die wiederum die Autoxidationsrate des Pyrogallols erhöhen. Die Autoxidationsrate von Pyrogallol wurde photometrisch bei 420 nm gemessen. Die SOD-Aktivität läßt sich aus der Hemmung der Autoxidationsrate bestimmen.

Die Enzymbestimmung erfolgte in 1-mL-Glasküvetten bei 25 °C in mit 1 mM EDTA versetztem 0.5 M TRIS-Bernsteinsäure-Puffer pH 8.2. Der Puffer wurde vor Beginn der Messung zur Sauerstoffsättigung 30 min mit Druckluft begast. Zu 930 bis 970 μL Puffer wurden 20 μL 8 mM Pyrogallol gegeben und die Reaktion durch Zugabe von 10 bis 50 μL Enzymextrakt gestartet. Das Gesamtküvettenvolumen betrug 1000 μL . Die Extinktionszunahme ΔE wurde 2 min aufgezeichnet.

Aktivitäts-Berechnung:

$$\begin{aligned} \text{Standard:} & \quad [\Delta E/\text{min}^{-1} (100\%) - \Delta E/\text{min}^{-1} (50\%)] \\ \text{Enzymextrakt:} & \quad [\Delta E/\text{min}^{-1} (100\%) - \Delta E/\text{min}^{-1} (\text{Enzymextrakt})] \end{aligned}$$

$$U \text{ in } 10\text{-}50 \mu\text{L Enzymextrakt: } \frac{\text{Enzymextrakt} * 1 \text{ U}}{\text{Standard}}$$

$$U \text{ in } 1000 \mu\text{L Enzymextrakt: } \frac{\text{Enzymextrakt} * 1 \text{ U} * 1000 \mu\text{L}}{\text{Standard} * \text{eingesetzte } \mu\text{L Enzymextrakt}}$$

2.4 Polyacrylamidgelelektrophorese

EPS 3500, Pharmacia
Protean II xi Cell, Bio-Rad
Mini-Protean II Cell, Bio-Rad 165-2940

Acrylamid, Merck 10784
Ammoniumperoxodisulfat, Merck 1201
Bromphenol Blue, Sigma B-6131
Coomassie Brilliant Blue G-250, Serva 17524
Glycerin, Riedel-de Haën 33224
Glycin, Biomol 04943
N,N'-Methylendiacrylamid, BIS, Merck 10897
N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine, Fluka 87689
Trisma-Base, Sigma T-1503

Die Polyacrylamidgele wurden nach einem Rezept basierend auf der Methode nach LAEMMLI (1970) angefertigt:

(<http://www.nwfsc.mvaa.gov/protocols/sds-page.html>).

Parameter für zwei Gele

Sammelgel: 700 V, 32 A, 35 W
Trenngel: 700 V, 40 A, 35 W
große Gele: 16 * 20, 18 * 20 cm Glasplatten, Spacer 1 mm
kleine Gele: 7 * 10, 8 * 10 cm Glasplatten, Spacer 0.75 und 1.5 mm

30% Acrylamid/0.8%BIS
10% Ammoniumperoxodisulfat
0.5 M TRIS-HCl pH 6.8
1.0 M TRIS-HCl pH 8.6

Probenpuffer 5fach: 3.1 mL 1 M TRIS-HCl pH 6.8
 5.0 mL Glycerin
 0.5 mL 1% Bromphenolblau
 1.4 mL bidest

Kathodenpuffer 5fach: 50 mM TRIS-Glycin pH 8.3

Anodenpuffer 10fach: 50 mM TRIS-HCl pH 8.3

Standards: α -Lactalbumin, Sigma L-4385
 Albumin (Bovine Serum), Sigma A-8654
 Albumin (Chicken Egg), Sigma A-8529
 Carbonic Anhydrase, Sigma C-5024

<i>Coomassie-Färbelösung:</i>	Coomassie Brilliant Blue G 250	0.04%
	Essigsäure	10%
	bidest	90%

<i>Entfärber:</i>	Eisessig	8%
	EtOH	25%
	bidest	67%

Riboflavin, Sigma R-4500
 5,5'-Dithio-bis-(2-nitrobenzoic acid), Sigma D-8130
 Nitro Blue Tetrazolium, Sigma N-6876
 Eisen(III)-chlorid-6-hydrat, Riedel-de Haën 31232
 Kaliumhexacyanoferrat(III), Merck 4973
p-Chloromercuriphenylsulfonic acid, Sigma C-4503

Alle weiteren Chemikalien zur Färbung von CAT, PX, APX, GR und SOD sind im Kapitel 2.3 beschrieben.

2.4.1 Catalase

Die Aktivität der Catalase-Isoenzyme wurde nach WOODBURY und Mitarbeitern (1971) bestimmt. Das Gel wurde zunächst 10 min bei RT in 0.003% Wasserstoffperoxid, anschließend 10 min in einer 2%igen Mischung aus FeCl_3 und $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ geschüttelt. Die CAT-Aktivität zeigte sich als gelbe Banden, der Hintergrund färbte sich als Berliner Blau $\text{Fe}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]_3$.

2.4.2 Peroxidase

Färbung mit o-Dianisidin: Der PX-Isoenzymnachweis wurde nach RAO und Mitarbeitern (1996) durchgeführt. Die Gele wurden mit 2 mM 3,3'-Dimethoxybenzidin (*o*-Dianisidin, gelöst in DMSO) in 50 mM Natriumcitratpuffer pH 4.5 versetzt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 3 mM Wasserstoffperoxid gestartet. Nach 20 min Schütteln bei RT zeigen braune Banden PX an.

Färbung mit Pyrogallol: Die Färbung der Gele erfolgte nach MITTLER und ZILINSKAS (1993) mit 20 mM Pyrogallol in 50 mM Natriumphosphatpuffer pH 7.0 nach Zugabe von 4 mM Wasserstoffperoxid. Orange Banden zeigen nach 30 min bei RT PX-Aktivität an.

Färbung mit Guaiacol: Die Färbung der Gele erfolgte mit 0.1 mM Guaiacol in 50 mM Natriumphosphatpuffer pH 6.0. Die Reaktion wurde mit 1 mM Wasserstoffperoxid gestartet. Nach 30 min Schütteln bei RT zeigten orange Banden PX an.

2.4.3 Ascorbat Peroxidase

APX wurde nach MITTLER und ZILINSKAS (1993) gefärbt.

Zunächst wurde mit 50 mM Natriumphosphatpuffer pH 7.0, versetzt mit 2 mM AsA, anschließend im gleichen Puffer mit 4 mM AsA und 2 mM Wasserstoffperoxid, 20 min bei RT geschüttelt. Das Gel wurde mit 50 mM Natriumphosphatpuffer pH 7.0 gewaschen und danach 10 min mit 0.1% NBT und 28 mM TEMED in 50 mM Natriumphosphatpuffer pH 7.8 geschüttelt.

APX-Inhibierung: Das Gel wurde in 2 mM AsA in 50 mM Natriumphosphatpuffer pH 7.0 und anschließend in 0.5 mM *p*-CMB im gleichen Puffer 20 min geschüttelt. Alle weiteren Schritte wurden wie beschrieben durchgeführt.

2.4.4 Glutathion Reduktase

GR wurde nach FOYER und Mitarbeitern (1991) gefärbt. Die Gele wurden 10 min in 250 mM TRIS-Puffer pH 8.0 versetzt mit 10 mM GSSG, 2 mM NADPH und 2 mM DTNB bei RT geschüttelt. GR zeigte sich als gelbe Banden. *Kontrolle:* Die Gele wurden wie beschrieben jedoch ohne GSSG gefärbt.

2.4.5 Superoxid Dismutase

Die *SOD-Färbung* erfolgte bei RT nach BEAUCHAMP und FRIDOVICH (1971). Die Gele wurden zunächst 10 min in 0.1% NBT, anschließend weitere 10 min in mit 28 mM TEMED und 28 μ M Riboflavin versetztem 36 mM Phosphatpuffer pH 8.0 geschüttelt.

Die *Entwicklung* erfolgte bei 560 nm. SOD-Aktivität zeigte sich als gelbe Banden, der Hintergrund färbte sich blauviolett.

Die *Unterscheidung* von Cu/Zn-, Mn- und Fe-SOD erfolgte durch Reaktionen mit Kaliumcyanid und Wasserstoffperoxid. 1 mM KCN inhibiert Cu/Zn-SOD, 2 mM H₂O₂ inhibiert Cu/Zn- und Fe-SOD.

2.5 Charakterisierung der Enzyme

2.5.1 Substratsättigungskurven

Für GPX und GR wurden bei 25 °C Substratsättigungskurven aufgenommen.

Der K_M (GSSG)-Wert für GR wurde mit 20, 30, 40, 50, 100, 250, 500 und 1000 μ M GSSG, der K_M (NADPH)-Wert mit 1, 10, 25, 37.5, 50, 75 und 100 μ M NADPH bestimmt.

Die Substratsättigungskurve für GPX wurde mit 50, 100, 250, 500, 1000, 2000, 3000 und 4000 μ M GSH durchgeführt. Der K_M (H₂O₂)-Wert wurde mit 50, 75, 100, 150, 200, 300, 375 und 500 μ M H₂O₂ bestimmt. Die Enzymtests wurden wie in den Kapiteln 2.3.4 und 2.3.5 beschrieben durchgeführt. Die Messungen erfolgten vierfach.

2.5.2 Aufnahme von pH-Wert-Kurven

Zur Aufnahme von pH-Wert-Kurven wurden verschiedene 50 mM Puffer eingesetzt. Die Enzyme GR und GPX wurden bei 25 °C bei pH-Werten von 5.0 bis 11.0 untersucht. Die Abstufungen liefen in 0.5 pH-Wert-Einheiten. Für die pH-Wert-Kurven wurde MES im Bereich von 5.0 bis 7.0, HEPES bei pH-Werten von 6.5 bis 8.0, Glycylglycin von pH 7.0 bis 9.0 und CAPS für pH-Werte bis 11.0 verwendet.

Die pH-Wert-Kurve für SOD wurde nur oberhalb von pH 8.0 aufgenommen, weil der Enzymtest bei niedrigen pH-Werten versagte. Die Enzymtests erfolgten vierfach und wurden wie beschrieben durchgeführt (Kap. 2.3.4 bis 2.3.6).

2.5.3 Aufnahme von Temperaturkurven

Temperaturkurven wurden für die Enzyme CAT (-4 bis 80 °C), GPX (-4 bis 65 °C), GR (-4 bis 60 °C) und SOD (-4 bis 60 °C) nach den in Kapiteln 2.3.1 und 2.3.4 bis 2.3.6 beschriebenen photometrischen Tests durchgeführt. Die Messungen wurden vierfach durchgeführt.

2.5.4 Berechnung der V_{\max} - und K_M -Werte

Zur Bestimmung der Konstanten V_{\max} und K_M wurden die gemessenen Initialgeschwindigkeiten bei unterschiedlichen Substratkonzentrationen (Kap. 2.5.1) in eine linearisierte Form ($y = mx + b$) gebracht. Die MICHAELIS-MENTEN-Gleichung kann in verschiedene Geradengleichungen umgeformt werden, die eine graphische Bestimmung von V_{\max} und K_M erlauben. In der vorliegenden Arbeit wurde für die Auswertung der Meßergebnisse die Umformung nach HANES (1932) verwendet, bei der S/V gegen S aufgetragen wurde (LASCH, 1987). V ist die Reaktionsgeschwindigkeit, S die Substratkonzentration. Die wichtigsten Eigenschaften der Geraden zeigt Tabelle 2.3.

Tab. 2.3: Koordinaten, Steigungen und Koordinatenschnittpunkte der sich durch Umformung der MICHAELIS-MENTEN-Gleichung ergebenden Geraden.

x-Achse	y-Achse	Steigung	x-Achsen-Schnittpunkt	y-Achsen-Schnittpunkt
S	S/V	$1/V_{\max}$	$-K_M$	K_M/V_{\max}

Die graphische Auswertung nach HANES wurde gewählt, weil alle Meßpunkte gleichmäßig gewichtet werden. Die vielfach verwendete Darstellung nach LINEWEAVER-BURK hat den Nachteil, daß sich die Meßpunkte im Sättigungsbereich drängen, während sie bei niedrigen Substratkonzentrationen stark gedehnt und damit überbewertet werden.

2.5.5 Berechnung der Aktivierungsenergie E_a

Die Meßdaten aus den Temperaturversuchen (Kap. 2.5.3) wurden nach der ARRHENIUS-Gleichung ausgewertet. Die Gleichung beschreibt die Temperaturabhängigkeit enzymatischer Untersuchungen: $k = A \cdot e^{-E_a/RT}$. Dabei ist A eine für die untersuchte Reaktion charakteristische Konstante, e die Basis des natürlichen Logarithmus, E_a die Aktivierungsenergie in $J \cdot mol^{-1}$, R die

allgemeine Gaskonstante ($8.314 \text{ J} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$) und T die absolute Temperatur in K. Der Faktor $e^{-E_a/RT}$ gibt den Bruchteil an, deren Energie gleich oder größer der Aktivierungsenergie E_a ist (MAXWELL-Verteilungsgesetz).

Die Aktivierungsenergie wurde aus $E_a = 2.303 \cdot R \cdot (T_1 \cdot T_2)/(T_2 - T_1) \cdot \log(k_2/k_1)$ berechnet. T_1 , ist die tiefere, T_2 , höhere die Temperatur in K, k_1 und k_2 sind die dazugehörigen Reaktionskonstanten. R ist die allgemeine Gaskonstante.

Graphisch kann die Aktivierungsenergie direkt als Steigung der Geraden abgelesen werden. Aufgetragen wird der natürliche Logarithmus der Reaktionsgeschwindigkeit $\ln V$ gegen den reziproken Wert der absoluten Temperatur $1/T$ in K.

2.5.6 Stabilitätstests

Stabilitätstests wurden für die Enzyme GPX, GR und SOD nach den in Kapiteln 2.3.4 bis 2.3.6 beschriebenen photometrischen Tests durchgeführt. Die Reaktionsgeschwindigkeiten der Enzyme wurden bei unterschiedlichen Temperaturen (25°C und / oder 37°C) bis zu 8 Stunden untersucht, die Messungen erfolgten vierfach.

2.6 Physiologische Untersuchungen

Die dreimal mit WIMEX f/2- β gewaschenen Algen (Kap. 2.2.1) wurden in Medium aufgenommen. Die Zellzahl (Kap. 2.2.1) wurde bestimmt, um durch Verdünnen Zelldichten von 40,000 (*E. kufferathii*) und 160,000 Zellen/mL (*Chaetoceros* sp.) herzustellen. Davon wurden je 200 mL in sterilisierte 250-mL-Kristallisierschalen (\varnothing 9 cm) gegeben und mit Petrischalen abgedeckt.

Die Versuche wurden in einem Kühlbrutschrank (Typ 3500) durchgeführt. Die Kulturen wurden von zwei Seiten mit Leuchtstoffröhren (je vier Tageslicht Lumilux Daylight L36 W/11 und Lumilux de Luxe, L36W/12-950, Tageslicht) in einem Licht-Dunkel-Rhythmus von 12 zu 12 Stunden belichtet.

Die Bestrahlungsstärken wurden mit einem Quantum Radiometer (Licor-185 B, 4π -sphärischer Quantensensor Li-193 SB) bestimmt, nachdem die Leuchtstoffröhren einige Stunden bei konstanter Lichtemission glühten. Die unterschiedlichen Bestrahlungsstärken wurde durch Graufolie erreicht.

Nach Entfernen des Mediums (0 °C, 5 min, 320 * g, Minifuge GL) wurde das Zentrifugat in 100 mM MES pH 6.5 aufgenommen und erneut zentrifugiert (0 °C, 5 s, 13,000 * g, Biofuge fresco). Der Überstand wurde verworfen, die Algen in flüssigem Stickstoff gefroren und bis zur Extraktion (Kap. 2.2.2) bei -80 °C gelagert.

2.6.1 Oxidationsschutzenzyme im Tagesgang

Die Oxidationsschutzenzyme in *E. kufferathii* und *Chaetoceros* sp. wurden nach fünftägiger Akklimatisation alle 3 Stunden im Tagesgang untersucht. Die Temperatur (0 °C), Bestrahlungsstärke (*E. kufferathii*: 30 und 150 $\mu\text{mol Photonen} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, *Chaetoceros* sp.: 150 $\mu\text{mol Photonen} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) und Salinität (34 PSU) wurden konstant gehalten.

2.6.2 Temperatureinfluß auf die Oxidationsschutzenzyme in *E. kufferathii*

Der Temperatureinfluß auf die Oxidationsschutzenzyme in *E. kufferathii* wurde bei -4, 0 und 4 °C untersucht. Die Algen wurden bei den verschiedenen Temperaturen 2, 4 und 8 Tage bei Bestrahlungsstärken von 6, 30, 60, 90 und 150 $\mu\text{mol Photonen} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ kultiviert. Die Salinität (34 PSU) war konstant.

2.6.3 Lichteinfluß auf die Oxidationsschutzenzyme in *E. kufferathii*

Der Lichteinfluß auf die Oxidationsschutzenzyme in *E. kufferathii* wurde bei 6, 30, 60, 90 und 150 $\mu\text{mol Photonen} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ nach 2, 4 und 8 Tagen untersucht. Die Temperaturen wurden konstant gehalten (-4, 0 und 4 °C), die Salinität betrug 34 PSU.

3 Ergebnisse

3.1 Oxidationsschutzenzyme in *E. kufferathii*

Der enzymatische Oxidationsschutz wurde anhand der 0 - 80%-Ammoniumsulfatfällungen aus *Entomoneis*-Extrakt untersucht. Die Oxidationsschutzenzyme CAT, GPX, GR und SOD wurden photometrisch nachgewiesen und quantifiziert. CAT, GR und SOD wurden außerdem durch spezifische Färbung nach nativer Gelelektrophorese detektiert. Bovine Serum Albumin (BSA, dimer: 132 kDa, monomer: 66 kDa), Hühnerei Albumin (45 kDa), Carbonic Anhydrase (CA, 29 kDa) und α -Lactalbumin (14.2 kDa) wurden als Proteinstandards zur Bestimmung des apparenten Molekulargewichts verwendet (Abb. 3.1).

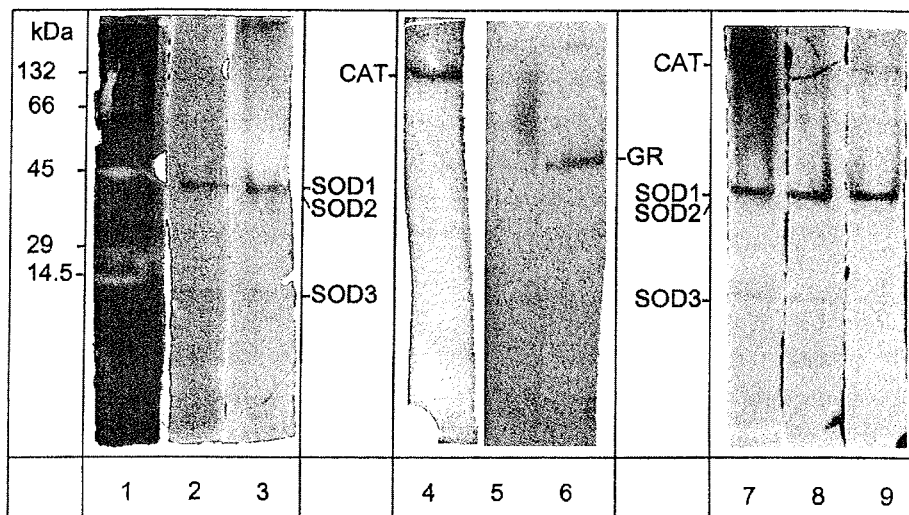


Abb. 3.1: *E. kufferathii*: Native PAGE mit 0 - 80%-Ammoniumsulfatfällung, 12% Gel, Bahn 1: Standard (je 5 μ g BSA, Hühnerei Albumin, CA, α -Lactalbumin), Coomassie; Bahn 2: APX mit Inhibitor; Bahn 3: APX; Bahn 4: CAT; Bahn 5: GR ohne GSSG; Bahn 6: GR; Bahn 7: SOD; Bahn 8: SOD mit KCN; Bahn 9: SOD mit H_2O_2 ; Bahnen 2 - 4, 7 - 9: 120 μ g Protein, Bahnen 5 und 6: 60 μ g Protein;

Die photometrisch und gelelektrophoretisch nachgewiesenen Oxidationsschutzenzyme, die Anzahl der Isoenzyme und deren Molekulargewichte sind in Tabelle 3.1 gezeigt. Die Enzyme mit größter Aktivität sind kursiv gedruckt.

Ergebnisse

Tab. 3.1: *E. kufferathii*: Oxidationsschutzenzyme, photometrische und gelelektrophoretische Nachweise; n. n.: nicht nachweisbar, k. M.: keine Methode, Kursivdruck des Molekulargewichts: Enzym mit höchster Aktivität;

Enzym	CAT	PX	APX	GPX	GR	SOD
Photometrisch nachweisbar	ja	nein	nein	ja	ja	ja
Spezifische Aktivität [U/mg Protein]	0.026 ± 0.008	n. n.	n. n.	0.453 ± 0.055	0.714 ± 0.025	32.4 ± 2.00
Nachweisbar nach PAGE	ja	nein	nein	k. M.	ja	ja
Anzahl Isoenzyme						3
Molekulargewicht [kDa]	160				70	46
						41
						15

CAT konnte photometrisch (0.026 ± 0.008 U/mg Protein) und gelelektrophoretisch (apparentes Molekulargewicht: 160 kDa) nachgewiesen werden.

PX-Aktivität wurde nach Gelelektrophorese und Färbung mit *o*-Dianisidin, Guaiacol und Pyrogallol nicht gefunden. Auch photometrisch war mit ABTS als Substrat keine PX-Aktivität nachzuweisen.

APX-Aktivität wurde ebenfalls nicht gefunden.

Die GPX-Aktivitätsbestimmung erfolgte photometrisch (0.453 ± 0.055 U/mg Protein). Eine Methode zum nativen GPX-Nachweis fehlt bislang.

GR-Aktivität wurde photometrisch (0.714 ± 0.025 U/mg Protein) bestimmt. Der gelelektrophoretische Nachweis ergab ein Enzym mit einem apparenten Molekulargewicht von 70 kDa.

Die photometrisch bestimmte SOD-Aktivität betrug 32.4 ± 2.00 U/mg Protein. Nach nativer PAGE konnten bis zu 13 Isoenzyme nachgewiesen werden, von denen viele Banden geringe Intensität hatten. Für drei Isoenzyme mit höherer Aktivität wurden apparente Molekulargewichte von 46 (höchste Aktivität), 41 und 15 kDa bestimmt. Die Isoenzyme mit 46 und 41 kDa hatten Mn als prosthetische Gruppe. Das 15-kDa-Isoenzym war eine Fe-SOD. Cu/Zn-SOD wurde nicht nachgewiesen.

3.2 Oxidationsschutzenzyme in *Chaetoceros* sp.

Als Oxidationsschutzenzyme wurden in *Chaetoceros* sp. CAT, GPX, PX, GR und SOD photometrisch aus 0 - 80%-Ammoniumsulfatfällungen nachgewiesen und quantifiziert. Darüber hinaus wurden CAT, GR und SOD nach nativer Gelelektrophorese (0 - 80%-Ammoniumsulfatfällungen aus *Chaetoceros*-Extrakt) spezifisch gefärbt. Als Proteinstandards zur Bestimmung des apparenten Molekulargewichts dienen BSA (dimer: 132 kDa, monomer: 66 kDa), Hühnerei Albumin (45 kDa), CA (29 kDa) und α -Lactalbumin (14.2 kDa) (Abb. 3.2).

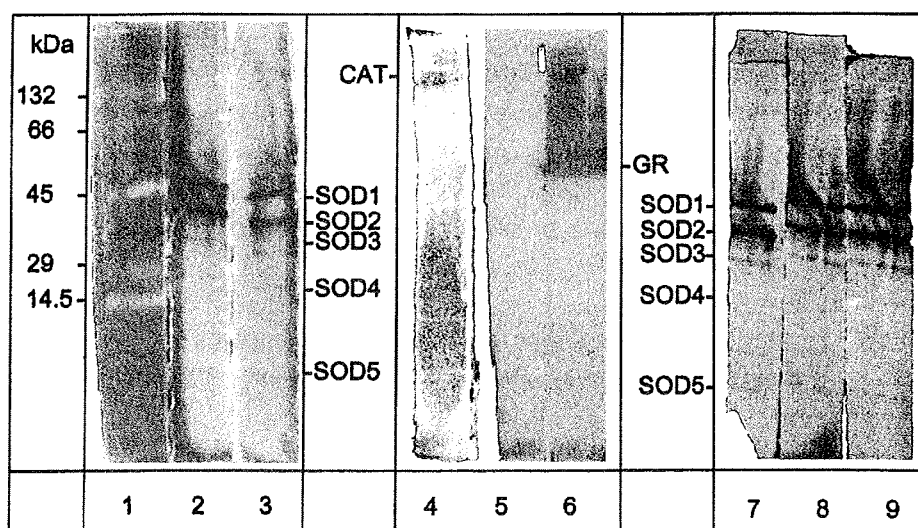


Abb. 3.2: *Chaetoceros* sp.: Native PAGE mit 0 - 80%-Ammoniumsulfatfällung, 12% Gel, Bahn 1: Standard (je 5 μ g BSA, Hühnerei Albumin, CA, α -Lactalbumin), Coomassie; Bahn 2: APX mit Inhibitor; Bahn 3: APX; Bahn 4: CAT; Bahn 5: GR ohne GSSG; Bahn 6: GR; Bahn 7: SOD; Bahn 8: SOD mit KCN; Bahn 9: SOD mit H₂O₂; Bahnen 2 - 4, 7 - 9: 120 μ g Protein, Bahnen 5 und 6: 60 μ g Protein;

In Tabelle 3.2 sind die photometrisch und gelelektrophoretisch bestimmten Oxidationsschutzenzyme (Anzahl der Isoenzyme und Molekulargewichte) wiedergegeben. PX wurde gelelektrophoretisch nicht nachgewiesen.

Ergebnisse

Tab. 3.2: *Chaetoceros* sp.: Oxidationsschutzenzyme, photometrische und gelelektrophoretische Nachweise; n. n.: nicht nachweisbar, k. M.: keine Methode, Kursivdruck des Molekulargewichts: Enzym mit höchster Aktivität;

Enzym	CAT	PX	APX	GPX	GR	SOD
Photometrisch nachweisbar	ja	ja	nein	ja	ja	ja
Spezifische Aktivität [U/mg Protein]	0.020 ± 0.0055	0.003 ± 0.0001	n. n.	0.505 ± 0.039	0.792 ± 0.016	24.4 ± 1.68
Nachweisbar nach PAGE	ja	nein	nein	k. M.	ja	ja
Anzahl Isoenzyme						5
Molekulargewicht [kDa]	135				67	42
						33
						24
						17
						8

CAT wurde photometrisch mit 0.020 ± 0.0055 U/mg Protein und nach nativer Gelelektrophorese als ein Enzym mit einem apparenten Molekulargewicht von 135 kDa nachgewiesen.

PX-Aktivität konnte nach nativer PAGE durch Färbung mit *o*-Dianisidin, Guaiacol und Pyrogallol nicht detektiert werden. Photometrische PX-Bestimmungen mit ABTS als Substrat ergaben Aktivitäten von 0.003 ± 0.0001 U/mg Protein.

APX wurde nicht nachgewiesen.

Die Messung der GPX-Aktivität erfolgte lediglich photometrisch (0.505 ± 0.039 U/mg Protein), weil eine Methode zum nativen GPX-Nachweis bislang fehlt.

GR wurde photometrisch (0.792 ± 0.016 U/mg Protein) und nach nativer PAGE gefärbt (ein Enzym, apparentes Molekulargewicht: 67 kDa).

Der gelelektrophoretische Nachweis ergab fünf Mn-SOD-Isoenzyme mit apparenten Molekulargewichten von 42, 33, 24, 17 und 8 kDa. Die beiden Isoenzyme mit höheren apparenten Molekulargewichten wiesen die höchsten Aktivitäten auf. Photometrische SOD-Bestimmungen führten zu Aktivitäten von 24.4 ± 1.68 U/mg Protein.

3.3 Charakterisierung der Oxidationsschutzenzyme aus *E. kufferathii*

Gelelektrophorese mit Extrakt, 0 - 80%- und 40 - 80%-Ammoniumsulfatfällungen führten zu gleichen Ergebnissen. 40 - 80%-Ammoniumsulfatfällungen wiesen die höchsten Aktivitäten auf (verglichen mit dem Extrakt und 0 - 80%-Ammoniumsulfatfällungen) und wurden daher zur Charakterisierung der Oxidationsschutzenzyme aus *E. kufferathii* eingesetzt:

CAT (Temperaturkurve), GPX (pH-Wert- und Temperaturkurve, Substratsättigungskurven mit GSH und H₂O₂, Stabilität bei 37 °C), GR (pH-Wert- und Temperaturkurve, Substratsättigungskurven mit GSSG und NADPH, Stabilitäten bei 25 und 37 °C, Einfluß der Puffermolarität) und SOD (Temperaturkurve, Stabilitäten bei 25 und 37 °C, Einfluß der Puffermolarität).

Die aus den Substratsättigungskurven abgeleiteten MICHAELIS-MENTEN-Konstanten K_M und maximalen Reaktionsgeschwindigkeiten V_{max} sind in Tabelle 3.3 zusammengefaßt.

Tab. 3.3: *E. kufferathii*: Substrate, Co-Substrate, MICHAELIS-MENTEN-Konstanten K_M und maximale Reaktionsgeschwindigkeiten V_{max} der GPX und GR;
* = [mmol NADPH/min * mg Protein];

Enzym	Substrat/Co-	K_M [μ M]	V_{max} *
GPX	GSH	575	0.33
	H ₂ O ₂	126	0.33
GR	NADPH	20	0.60
	GSSG	62.5	0.30

PX-Aktivität wurde in Substratspezifitätstests mit ABTS, *o*-Dianisidin, Guaiacol, Ferulasäure, Kaffeesäure und Pyrogallol bestimmt.

3.3.1 Catalase

In Abbildung 3.3 ist die Temperaturabhängigkeit der CAT wiedergegeben. Temperaturoptima für die Enzymaktivität lagen bei 0 und 60 °C. Das starke Absinken der Aktivität oberhalb von 60 °C war auf thermische Denaturierung der CAT zurückzuführen. Bei Temperaturen über 70 °C konnte keine Aktivität gemessen werden. Die maximale CAT-Aktivität lag bei 0 °C (100%), bei -4 °C

konnte noch 35% Enzymaktivität nachgewiesen werden.

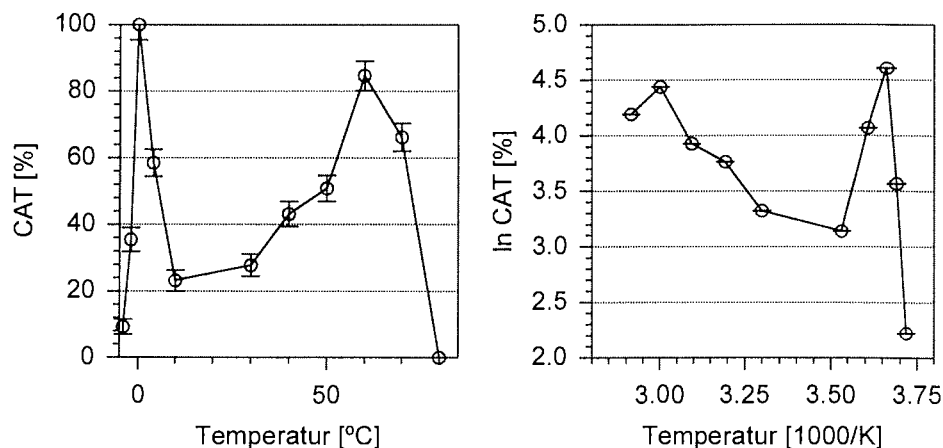


Abb. 3.3: *E. kufferathii*: Temperatureinfluß auf die Aktivität der CAT, gemessen aus einer 40 - 80%-Ammoniumsulfatfällung in 100 mM Phosphatpuffer pH 7.0, n = 4;

Die Enzymaktivitäten wurden in den Bereichen von -4 bis 0 °C (3.72 bis $3.66 \cdot 10^3 \text{ K}^{-1}$) und 10 bis 60 °C (3.53 bis $3.00 \cdot 10^3 \text{ K}^{-1}$) nur von der Temperatur bestimmt und folgten der ARRHENIUS-Beziehung. Die Aktivierungsenergien E_A wurden für die Temperaturbereiche von -4 bis 0 °C ($363.8 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$, $r = 0.9977$) und von 10 bis 60 °C ($17.5 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$, $r = 0.9423$) bestimmt.

Die zwei Temperaturoptima bei 0 und 60 °C lassen auf unterschiedliche CAT-Isoenzyme schließen. Weil von sich überlagernden Effekten verschiedener Enzyme ausgegangen werden muß, wurden keine weiteren Enzymeigenschaften bestimmt.

3.3.2 Glutathion Peroxidase

Die Messung der GPX-Aktivität erfolgte aus drei unterschiedlichen Puffern im pH-Bereich von 7.0 bis 11.0 (Abb. 3.4). Das pH-Optimum für die Oxidation von GSH lag mit Glycylglycin bei pH 9.0, mit CAPS bei 10.0. Die GPX in CAPS zeigte niedrigere Aktivitäten. HEPES pufferte unterhalb des pH-Optimums mit geringerer Enzymaktivität. Oberhalb von pH 11.0 und unterhalb von pH 7.0 konnte keine GPX gemessen werden.

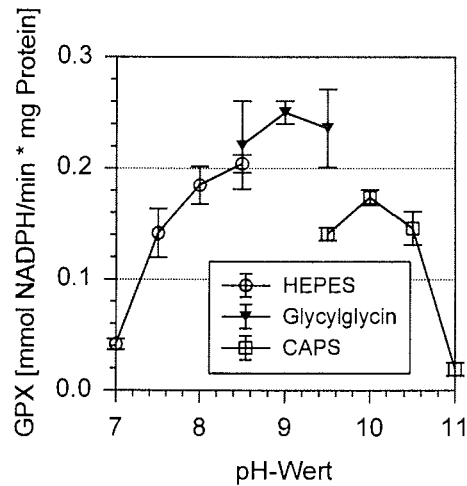


Abb. 3.4: *E. kufferathii*: Einfluß des pH-Werts auf die Aktivität der GPX, gemessen aus einer 40 - 80%-Ammoniumsulfatfällung bei 25 °C, n = 4;

In Abbildung 3.5 ist die Temperaturabhängigkeit der GPX dargestellt. Im Bereich von -4 bis 45 °C wurde die Enzymaktivität nur von der Temperatur bestimmt und folgte der ARRHENIUS-Beziehung. Das Temperaturoptimum lag bei 45 °C.

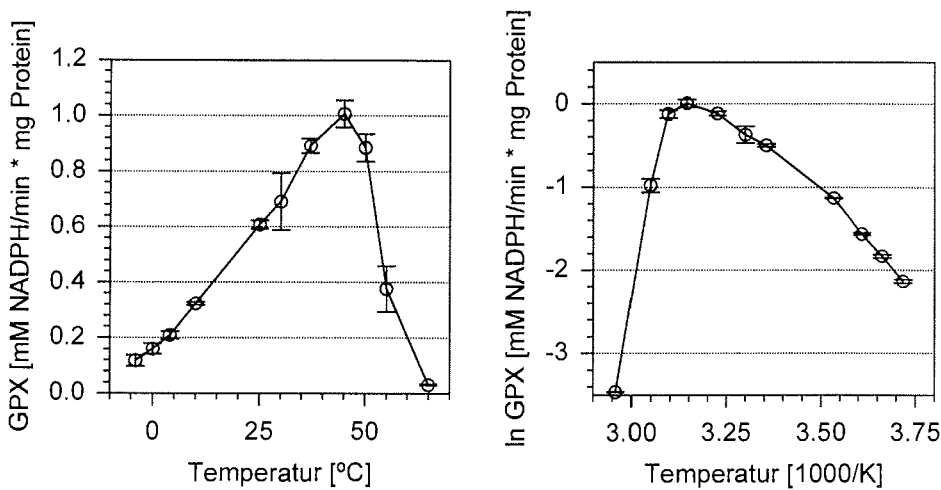


Abb. 3.5: *E. kufferathii*: Temperatureinfluß auf die Aktivität der GPX, gemessen aus einer 40 - 80%-Ammoniumsulfatfällung in 50 mM Glycylglycin bei pH 9.0, n = 4;

Das starke Absinken der Aktivität oberhalb von 45 °C war auf thermische Denaturierung der GPX zurückzuführen. Oberhalb von 65 °C konnte keine Aktivität gemessen werden. Auch bei tiefen Temperaturen wurden GPX-Aktivitäten gemessen (-4 °C: 12%, 0 °C: 16%, 4 °C: 21%). Die Aktivierungsenergie E_A wurde für den Temperaturbereich von -4 bis 45 °C (3.72 bis $3.15 \cdot 10^3 \text{ K}^{-1}$) mit $31.1 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ ($r = 0.9946$) bestimmt.

Der GSH- und Wasserstoffperoxideinfluß auf die GPX-Aktivität ist in Abbildung 3.6 wiedergegeben. Die maximalen Reaktionsgeschwindigkeiten $V_{\max}(\text{GSH})$ und $V_{\max}(\text{H}_2\text{O}_2)$ waren $0.33 \text{ mmol NADPH/min} \cdot \text{mg Protein}$, die MICHAELIS-MENTEN-Konstanten $K_M(\text{GSH})$ und $K_M(\text{H}_2\text{O}_2)$ lagen bei 575 und $126 \mu\text{M}$. Die Substratsättigungskurve mit GSH folgte der klassischen MICHAELIS-MENTEN-Kinetik, Konzentrationen oberhalb von $400 \mu\text{M}$ Wasserstoffperoxid hemmten die GPX-Aktivität.

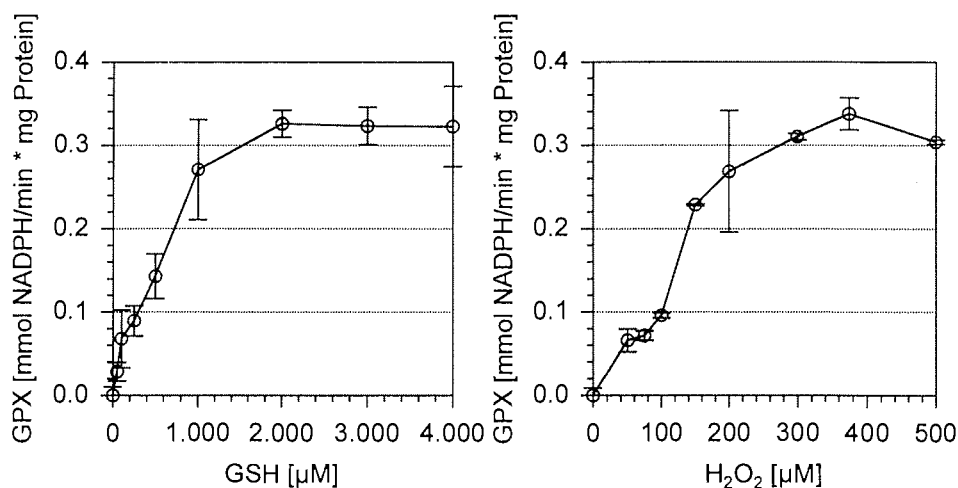


Abb. 3.6: *E. kufferathii*: Substrateinfluß (links GSH, rechts H_2O_2) auf die GPX-Aktivität, gemessen aus einer 40 - 80%-Ammoniumsulfatfällung in 100 mM TRIS-Puffer pH 9.0 bei 25 °C, $n = 4$;

Die Thermostabilitätsmessungen von GPX erfolgten in 50 mM Glycylglycin pH 9.0 bei 37 °C ($n = 4$). Die Enzymaktivität nach 480 min lag bei 92% (bezogen auf die Messung nach 15 min).

3.3.3 Glutathion Reduktase

Die GR-Aktivität wurde aus drei unterschiedlichen Puffern im pH-Bereich von 6.5 bis 10.0 gemessen (Abb. 3.7). Das pH-Optimum für die GSH-Reduktion lag mit HEPES und Glycylglycin bei pH 8.0. CAPS pufferte oberhalb des pH-Optimums mit geringerer Enzymaktivität. Oberhalb von pH 10.0 und unterhalb von pH 6.5 konnte keine GR-Aktivität gemessen werden.

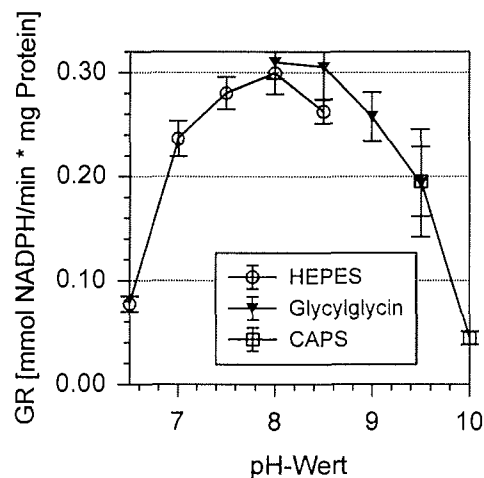


Abb. 3.7: *E. kufferathii*: Einfluß des pH-Werts auf die Aktivität der GR, gemessen aus einer 40 - 80%-Ammoniumsulfatfällung bei 25 °C, n = 4;

Die Temperaturabhängigkeit der GR ist in Abbildung 3.8 zu sehen. Ein breites Temperaturoptimum liegt zwischen 35 und 45 °C. Thermische Denaturierung der GR führte zum Absinken der Enzymaktivität bei Temperaturen über 45 °C. Oberhalb von 65 °C konnte keine Aktivität gemessen werden. Die GR-Aktivität bei 0 °C betrug 29%, die bei 5 °C noch 20% bezogen auf die maximal gemessene Aktivität bei 45 °C.

Im Bereich von -4 bis 37 °C wurde die Enzymaktivität nur von der Temperatur bestimmt und folgte der ARRHENIUS-Beziehung. Die für den Temperaturbereich von -4 bis 37 °C (3.72 bis $3.23 \cdot 10^3 \text{ K}^{-1}$) berechnete Aktivierungsenergie E_A war $34.0 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ ($r = 0.9926$) und lag damit in der gleichen Größenordnung wie die des enzymatischen Gegenspieler GPX (vgl. Kap. 3.3.2).

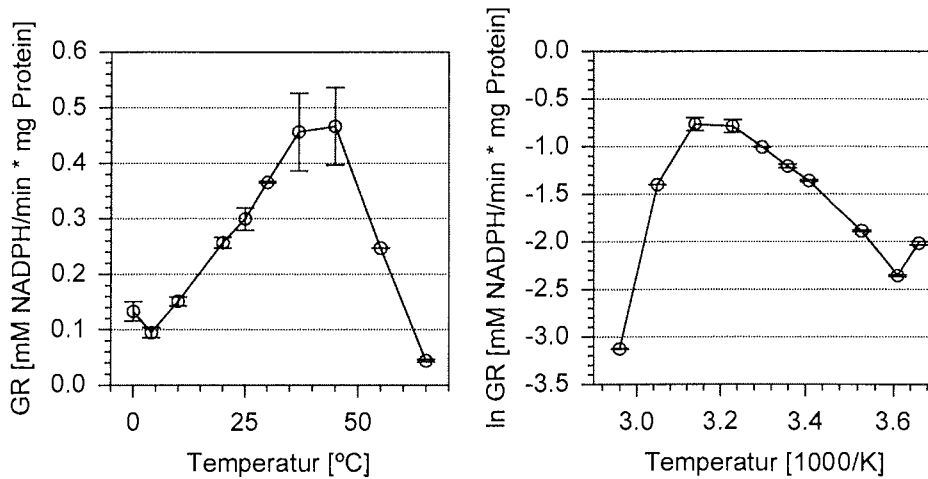


Abb. 3.8: *E. kufferathii*: Temperatureinfluß auf die Aktivität der GR, gemessen aus einer 40 -80%-Ammoniumsulfatfällung in 100 mM TRIS pH 8.0, n = 4;

Die Einflüsse von GSSG und NADPH auf die GR-Aktivität sind in Abbildung 3.9 gezeigt.

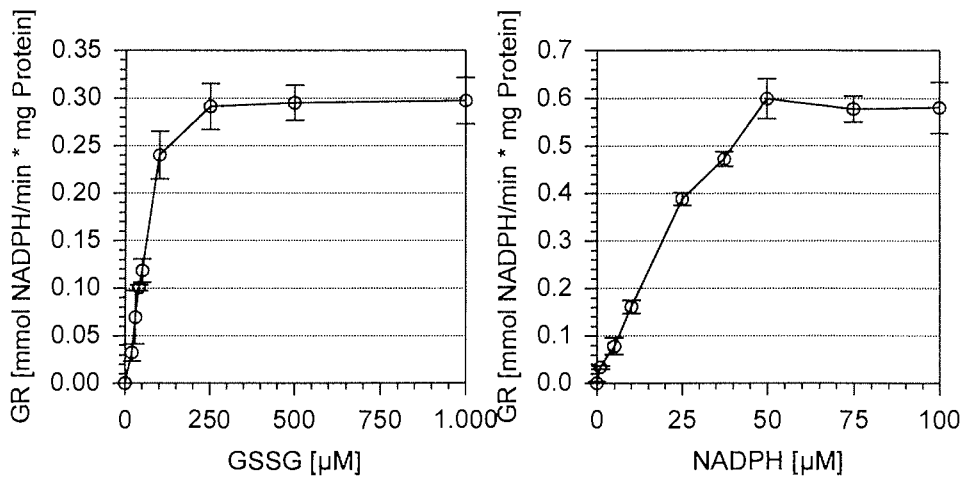


Abb. 3.9: *E. kufferathii*: Substrat- und Co-Substrateinfluß (links GSSG, rechts NADPH) auf die GR-Aktivität, gemessen aus einer 40 - 80%-Ammoniumsulfatfällung in 100 mM TRIS pH 8.0 bei 25 °C, n = 4;

Die maximalen Reaktionsgeschwindigkeiten $V_{\max}(\text{GSSG})$ und $V_{\max}(\text{NADPH})$ lagen bei 0.30 und 0.60 mmol NADPH/min * mg Protein. Die MICHAELIS-MENTEN-Konstanten $K_M(\text{GSSG})$ und $K_M(\text{NADPH})$ betragen 62.5 und 20 µM.

Die Substratsättigungskurve für GSSG folgte der klassischen MICHAELIS-MENTEN-Kinetik, Konzentrationen oberhalb von 50 μM Co-Substrat hemmten die GR.

Die GR-Thermostabilität wurde bei 25 und 37 °C gemessen. Das Enzym zeigte bei 25 °C nach 15 bis 120 min noch 85% Aktivität (bezogen auf die Messung nach 0 min). Nach 240 min Inkubation bei 37 °C konnte noch 50% GR-Aktivität gemessen werden, nach 480 min war bei beiden Temperaturen lediglich noch 20% Aktivität vorhanden (Abb. 3.10).

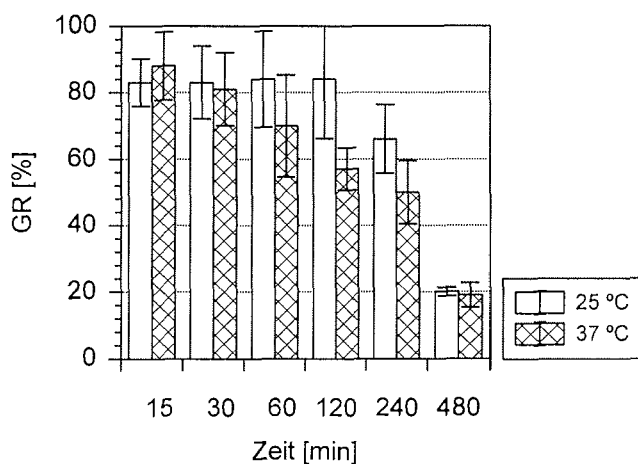


Abb. 3.10: *E. kufferathii*: Thermostabilität von GR gemessen aus einer 40 - 80%-Ammoniumsulfatfällung in 100 mM TRIS pH 8.0 bei 25 und 37 °C, n = 4;

Messungen zum Einfluß der Puffermolarität ergaben, daß 50 bis 100 mM TRIS-Puffer pH 8.0 geeignet waren, 250 und 500 mM hemmten die Enzymaktivität deutlich, aus 1 M TRIS-Puffer pH 8.0 konnte GR nicht gemessen werden.

3.3.4 Superoxid Dismutase

In Abbildung 3.11 ist die Temperaturabhängigkeit der SOD wiedergegeben. Das Temperaturoptimum lag bei 37 °C. Im Bereich von 4 bis 37 °C wurde die Enzymaktivität nur von der Temperatur bestimmt und folgte der ARRHENIUS-Beziehung. Das starke Absinken der Aktivität oberhalb von 37 °C war auf thermische Inhibierung der SOD zurückzuführen. Oberhalb von 60 °C konnte keine Aktivität gemessen werden.

Auch bei tiefen Temperaturen wurden SOD-Aktivitäten gemessen (-4 °C: 41%, 0 °C: 55%, 4 °C: 40%). Die Aktivierungsenergie E_A betrug für den Temperaturbereich von -4 bis 37 °C (3.72 bis $3.23 \cdot 10^3 \text{ K}^{-1}$) $16.4 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ ($r = 0.9940$).

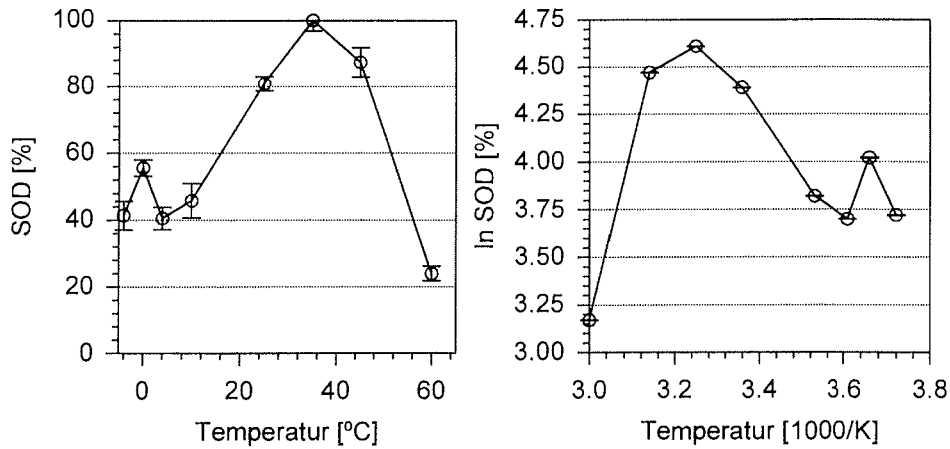


Abb. 3.11: *E. kufferathii*: Temperatureinfluß auf die SOD-Aktivität, gemessen aus einer 40 - 80%-Ammoniumsulfatfällung in 0.5 M TRIS-Bernsteinsäure-Puffer pH 8.2, $n = 4$;

Die SOD-Thermostabilitäten bei 25 und 37 °C sind in Abbildung 3.12 wiedergegeben. Die SOD-Aktivitäten nahmen kontinuierlich ab.

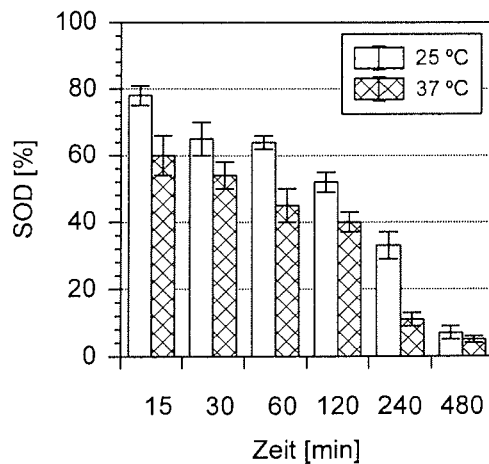


Abb. 3.12: *E. kufferathii*: Thermostabilität von SOD gemessen aus einer 40 - 80%-Ammoniumsulfatfällung in 0.5 M TRIS-Bernsteinsäure-Puffer pH 8.2 bei 25 und 37 °C, $n = 4$;

Das Enzym war bei 25 °C nach 60 min noch zu 65% aktiv (bezogen auf die Messung nach 0 min), nach 480 min wurden 7% Aktivität gemessen. Die bei 37 °C inkubierte SOD zeigte nach 15 min nur noch 60% Aktivität. Nach 240 min betrug die SOD-Inhibierung bereits 90%, nach 480 min wurde lediglich noch 5% Aktivität gemessen.

Messungen zum Einfluß der Puffermolarität ergaben, daß 0.5 M TRIS-Bernsteinsäure-Puffer pH 8.2 geeignet war, 250 und 100 mM hemmten die SOD-Aktivität deutlich, bei 50 mM TRIS-Bernsteinsäure-Puffer pH 8.2 war Aktivität nicht mehr nachweisbar.

pH-Wert-Kurven wurden für SOD nicht aufgenommen, weil der photometrische Test nur oberhalb von pH 7.5 angewendet werden konnte. pH-Wert-Messungen ergaben die höchsten SOD-Aktivitäten bei pH 8.2.

3.3.5 Peroxidase

Die PX-Substratspezifitätstests wurden mit den künstlichen Substraten ABTS, *o*-Dianisidin, Guaiacol und den natürlichen Substraten Ferulasäure, Kaffeesäure und Pyrogallol bei pH-Werten von 4.0 bis 10.0 durchgeführt.

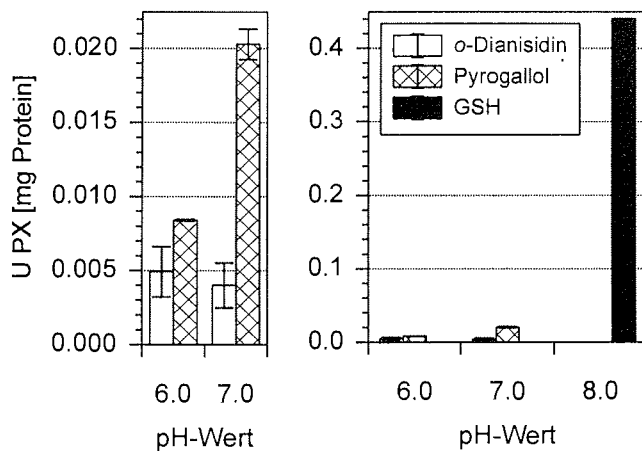


Abb. 3.13: *E. kufferathii*: PX-Substratspezifitätstest, gemessen aus einer 40 - 80%-Ammoniumsulfatfällung in verschiedenen 100 mM Puffern bei 25 °C, n = 4;

Bei pH-Werten von 4, 5 und 8 bis 10 wurde keine PX-Aktivität nachgewiesen. PX zeigte mit *o*-Dianisidin und Pyrogallol bei pH-Werten von 6 und 7 eine

geringe Substratspezifität. PX-Aktivität mit ABTS, Guaiacol, Ferula- und Kaffeesäure konnte nicht bestimmt werden. In Abbildung 3.13 sind die PX-Aktivitäten mit *o*-Dianisidin und Pyrogallol dargestellt. Die GPX-Aktivität mit GSH als Substrat dient zum Vergleich.

Gesamtperoxidaseaktivität wird in der Regel mit ABTS, Guaiacol und / oder *o*-Dianisidin bestimmt.

3.4 Physiologische Untersuchungen

Die physiologischen Untersuchungen erfolgten aus 0 - 80%-Ammoniumsulfatfällungen.

3.4.1 Oxidationsschutzenzyme im Tagesgang in *E. kufferathii* und *Chaetoceros* sp.

Die Oxidationsschutzenzyme (CAT, GR, GPX und SOD) wurden nach fünf-tägiger Akklimatisation bei einem Licht-Dunkel-Rhythmus von 12 zu 12 Stunden im Tagesgang aus *E. kufferathii* (Bestrahlungsstärken: 30 und 150 $\mu\text{mol Photonen} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) und *Chaetoceros* sp. (150 $\mu\text{mol Photonen} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) untersucht. Die Temperatur betrug 0 °C, die Salinität 34 PSU. CAT und SOD wurden gelelektrophoretisch, GR und GPX photometrisch nachgewiesen.

Catalase

Abbildung 3.14 zeigt auf jeder Bahn für den 30- μmol -Ansatz von *E. kufferathii* eine CAT-Bande, die im Belichtungszeitraum stärker ist als in der Dunkelphase. Der 150- μmol -Ansatz von *E. kufferathii* ergab das gleiche Bild. Die CAT-Aktivitäten des 150- μmol -Ansatzes waren in der Lichtphase höher als die des 30- μmol -Ansatzes.

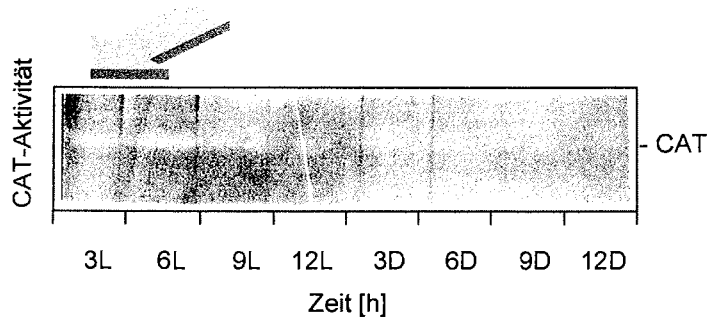


Abb. 3.14: *E. kufferathii*: kultiviert bei $30 \mu\text{mol Photonen} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, Ausschnitt aus einem 12% Gel nach CAT-Färbung, aufgetragen wurden $60 \mu\text{g Protein/Bahn}$ der 0 - 80%-Ammoniumsulfatfällung, D = Dunkel, L = Licht;

Der *Chaetoceros*-Ansatz hat auf jeder Bahn eine CAT-Bande, die am stärksten nach neun und zwölf Stunden Dunkelphase sind (Abb. 3.15). Die CAT-Aktivitäten waren in den zwölf Stunden Licht niedriger als in der Dunkelphase.

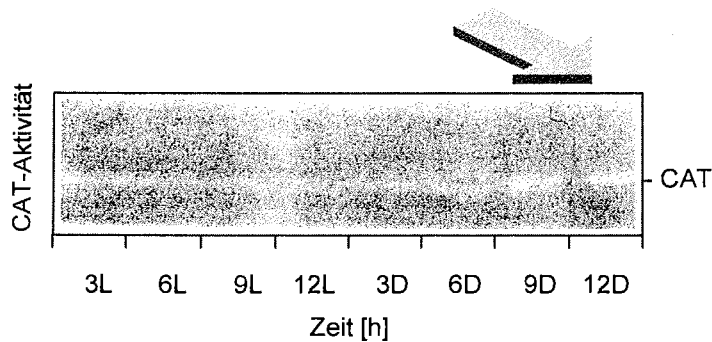


Abb. 3.15: *Chaetoceros* sp.: kultiviert bei $150 \mu\text{mol Photonen} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, Ausschnitt aus einem 12% Gel nach CAT-Färbung, aufgetragen wurden $60 \mu\text{g Protein/Bahn}$ der 0 - 80%-Ammoniumsulfatfällung, D = Dunkel, L = Licht;

Superoxid Dismutase

Die SOD-Isoenzyme des $150\text{-}\mu\text{mol-}$ *Chaetoceros*-Ansatzes zeigen in der Dunkelphase höhere Aktivitäten als in der Lichtphase (Abb. 3.16 oben). Zwei Isoenzyme (SOD 1 und SOD 2) hatten erhöhte Intensitäten. Die Banden von SOD 4 und 5 waren sehr schwach.

In Abbildung 3.16 unten sind auf jeder Bahn für den $150\text{-}\mu\text{mol-}$ *Entomoneis*-Ansatz fünf SOD-Banden zu sehen, deren Intensitäten im Beleuchtungs-

Ergebnisse

zeitraum höher sind als in der Dunkelpphase. Die Banden der SOD 3, 4 und 5 waren sehr schwach. Die höchsten Aktivitäten wurden in den ersten sechs Stunden Licht nachgewiesen. Das Isoenzym SOD 2 machte mehr als 90% der Aktivität aus. Der 30- μmol -Ansatz ergab das gleiche Bild.

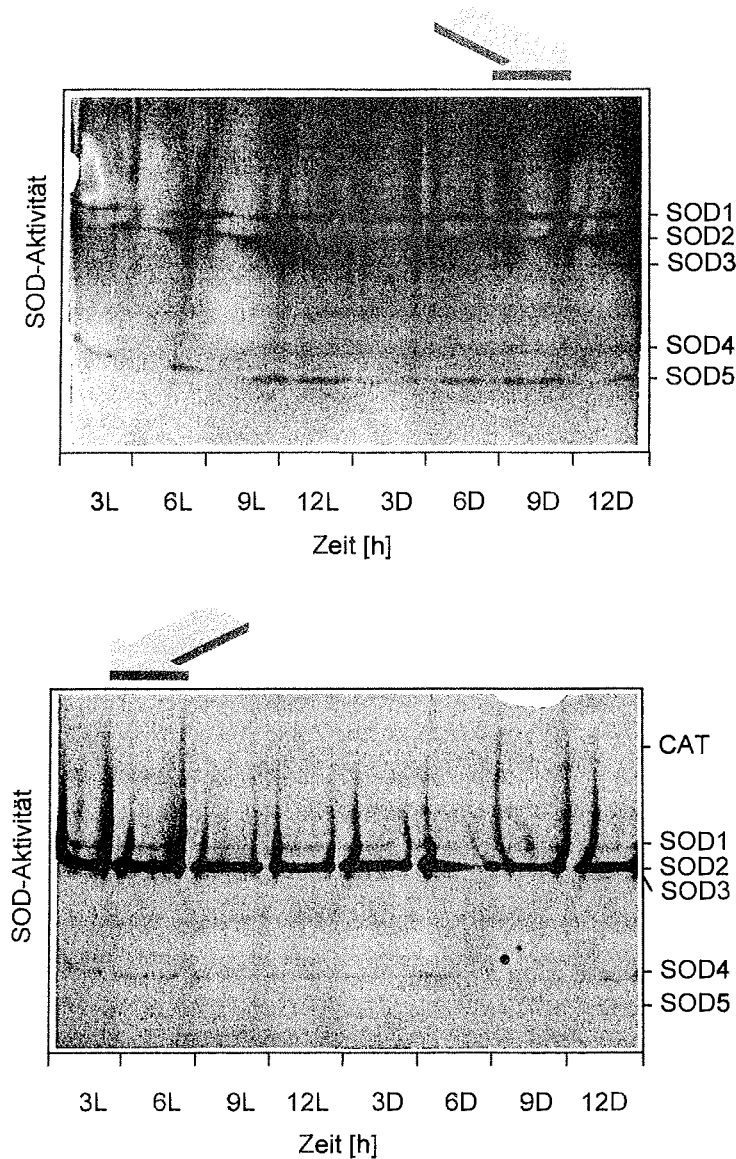


Abb. 3.16: *Chaetoceros* sp. (oben), *E. kufferathii* (unten): kultiviert bei $150 \mu\text{mol}$ Photonen $\cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$; 12% Gel nach SOD-Färbung, aufgetragen wurden $60 \mu\text{g}$ Protein/Bahn der 0 - 80%-Ammoniumsulfatfällung, D = Dunkel, L = Licht;

Glutathion Reduktase

Die GR-Aktivitäten waren im 150- $\mu\text{mol-Entomoneis}$ -Ansatz bis zu 20% höher als im 30- μmol -Ansatz (Abb. 3.17).

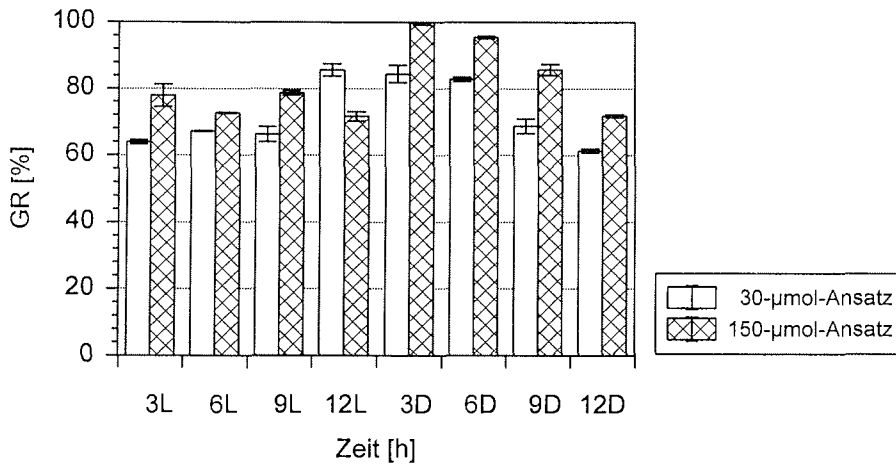


Abb. 3.17: *E. kufferathii*: kultiviert bei 30 und 150 $\mu\text{mol Photonen} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$; GR gemessen aus der 0 - 80%-Ammoniumsulfatfällung, D = Dunkel, L = Licht, n = 4;

Der 30- μmol -Ansatz hatte in den ersten neun Stunden der Lichtphase (64 bis 68%), der 150- μmol -Ansatz im gesamten Beleuchtungszeitraum (72 bis 79%) nahezu konstante Aktivitäten. Die höchsten Enzymaktivitäten wurden für den 30- μmol -Ansatz nach zwölf Stunden Licht und in den ersten sechs Stunden der Dunkelphase gemessen. Für den 150- μmol -Ansatz ergaben sich ebenfalls in den ersten sechs Stunden der Dunkelphase höchste Aktivitäten. Die GR-Aktivitäten nahmen für beide Ansätze nach 9 und 12 Stunden der Dunkelphase kontinuierlich ab und erreichten Werte, wie sie zu Beginn der Lichtphase gemessen wurden.

Im 150- μmol -*Chaetoceros*-Ansatz stieg die GR-Aktivität im Beleuchtungszeitraum (von 70 auf 100%). In der Dunkelphase wurden mindestens 85% Aktivität gemessen (Abb. 3.18). Die höchsten Aktivitäten ergaben sich nach zwölf Stunden Licht (100%) und in den letzten sechs Stunden der Dunkelphase.

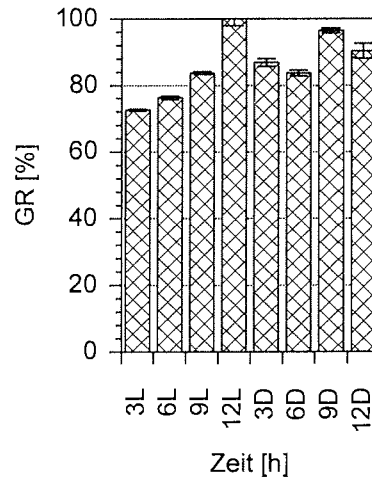


Abb. 3.18: *Chaetoceros* sp.: kultiviert bei 150 μmol Photonen $\cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$; GR gemessen aus der 0 - 80%-Ammoniumsulfatfällung, D = Dunkel, L = Licht, n = 4;

Glutathion Peroxidase

Die GPX-Aktivitäten waren im 150- μmol -*Entomoneis*-Ansatz bis zu 40% höher als im 30- μmol -Ansatz (Abb. 3.19). Die GPX-Aktivitäten nahmen für beide Ansätze während der Lichtphase kontinuierlich zu, zeigten nach zwölf Stunden Licht und in den ersten sechs Stunden der Dunkelphase die höchsten Werte und hatten nach zwölf Stunden Dunkelphase ähnliche GPX-Aktivitäten wie zu Beginn der Lichtphase.

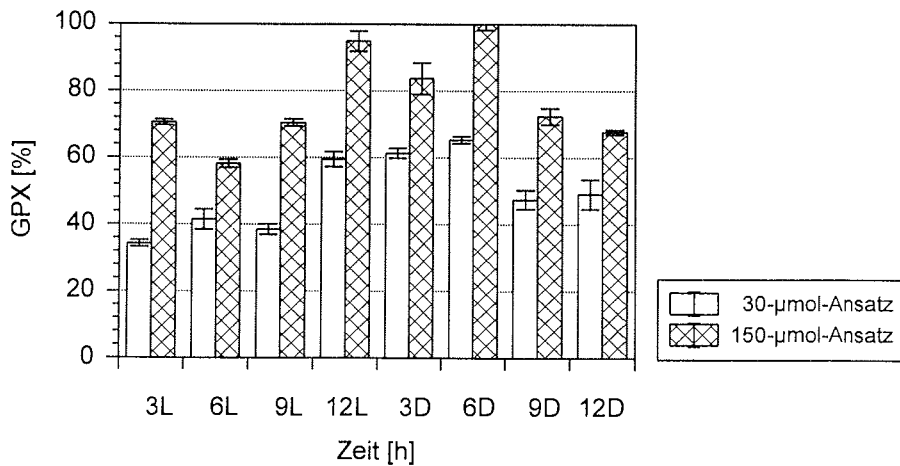


Abb. 3.19: *E. kufferathii*; kultiviert bei 30 und 150 $\mu\text{mol Photonen} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$; GPX gemessen aus der 0 - 80%-Ammoniumsulfatfällung, D = Dunkel, L = Licht, n = 4;

Die GPX-Aktivitäten im 150- $\mu\text{mol-Chaetoceros}$ -Ansatz sind in den ersten neun Stunden Licht (Abb. 3.20) mit 48 bis 55% (bezogen auf die maximale Aktivität nach zwölf Stunden Licht) am niedrigsten. Die höchsten GPX-Aktivitäten wurden nach 12 Stunden Licht und zu Beginn der Dunkelphase gemessen.

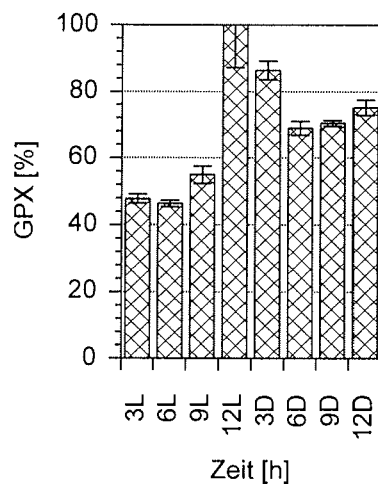


Abb. 3.20: *Chaetoceros* sp.: kultiviert bei 150 $\mu\text{mol Photonen} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$; GPX gemessen aus der 0 - 80%-Ammoniumsulfatfällung, D = Dunkel, L = Licht, n = 4;

Tabelle 3.4 faßt das Verhalten der Oxidationsschutzenzyme CAT, SOD, GR und GPX im Tagesgang für die 30- und 150- μmol -Ansätze von *E. kufferathii* und *Chaetoceros* sp. (150- μmol -Ansatz) zusammen.

Tab. 3.4: *E. kufferathii* (30- und 150- μmol -Ansätze) und *Chaetoceros* sp. (150- μmol -Ansatz): Aktivitäten der Oxidationsschutzenzyme CAT, SOD, GR und GPX im Licht und im Dunkeln, \uparrow = Aktivität höher, \downarrow = Aktivität niedriger;

	Licht		Dunkel	
<i>E. kufferathii</i> 30- und 150- μmol -Ansätze	CAT	\uparrow	CAT	\downarrow
	SOD	\uparrow	SOD	\downarrow
	GR	\downarrow	GR	\uparrow
	GPX	\downarrow	GPX	\uparrow
<i>Chaetoceros</i> sp. 150- μmol -Ansatz	CAT	\downarrow	CAT	\uparrow
	SOD	\downarrow	SOD	\uparrow
	GR	\downarrow	GR	\uparrow
	GPX	\downarrow	GPX	\uparrow

Die Oxidationsschutzenzyme aus *E. kufferathii* verhielten sich in der Licht- und Dunkelphase in beiden Ansätzen ähnlich. CAT und SOD zeigten im Beleuchtungszeitraum höhere Aktivitäten als in der Dunkelphase. Im *Chaetoceros* sp.-Ansatz wurden jedoch im Dunkeln höhere CAT- und SOD-Aktivitäten gefunden.

Die GR- und GPX-Aktivitäten waren in allen Ansätzen im Licht niedriger als im Dunkeln.

3.4.2 Temperatureinfluß auf die Oxidationsschutzenzyme in *E. kufferathii*

Der Temperatureinfluß (-4, 0 und 4 °C) auf die Oxidationsschutzenzyme (CAT, GPX und GR) in *E. kufferathii* wurde bei 6, 30, 60, 90 und 150 μmol Photonen $\cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ nach 2, 4 und 8 Tagen untersucht. Die Salinität betrug 34 PSU. CAT wurde gelelektrophoretisch, GPX und GR photometrisch bestimmt. Die im Text beschriebenen GPX- und GR-Aktivitäten (Kap. 3.4.2 und 3.4.3) sind die gemittelten Werte der Messungen nach 2, 4 und 8 Tagen.

In Abbildung 3.21 ist der Einfluß von Temperatur (-4, 0 und 4 °C) und Licht (6, 30, 60, 90 und 150 μmol Photonen $\cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) auf die CAT der *E. kufferathii*-Zellen und der Epibakterien nach 2, 4 und 8 Tagen dargestellt.

Catalase

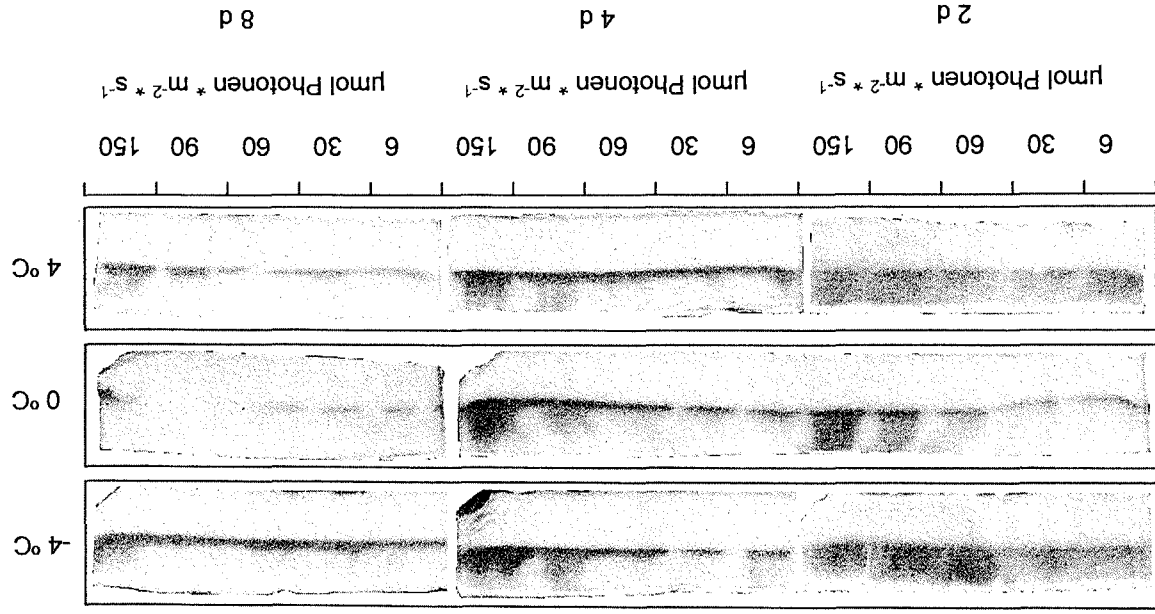


Abb. 3.21: *E. kufferathii*: kultiviert mit 6, 30, 60, 90, 150 $\mu\text{mol Photonen} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ bei -4, 0 und 4 °C, Ausschnitte aus 12% Gelen nach CAT-Färbung, aufgetragen wurden 90 $\mu\text{g Protein/Bahn}$ der 0 - 80%-Ammoniumsulfatfällung;

E. kufferathii-CAT und bakterielle CAT (CAT-Bak) kann gelelektrophoretisch unterschieden werden (vgl. Kap. 3.5). Die Bakterien-CAT liegt diffus oberhalb der CAT-Banden von *E. kufferathii*.

Entomoneis-Catalase

2 Tage: Die CAT-Banden bei 4 und -4 °C waren intensiver als bei 0 °C. Die höchsten Aktivitäten hatten die mit 60, 90 und 150 $\mu\text{mol Photonen} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ (-4 und 4 °C) und die mit 6 $\mu\text{mol Photonen} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ (4 °C) kultivierten Algen.

4 Tage: Die bei 0 °C kultivierten *Entomoneis*-Zellen zeigten für alle Bestrahlungsstärken niedrigere CAT-Aktivitäten als nach 2 Tagen. Die -4 und 4 °C ausgesetzten Algen hatten höhere Aktivitäten als die bei 0 °C kultivierten. Die höchsten CAT-Aktivitäten wurden bei 4 °C bei Bestrahlungsstärken von 90 und 150 $\mu\text{mol Photonen} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ gemessen.

8 Tage: Die CAT-Banden der mit -4 und 4 °C kultivierten *Entomoneis*-Zellen waren intensiver als die des 0 °C-Ansatzes. Die höchsten Aktivitäten im 4 °C-Ansatz ergaben sich für die 90- und 150- μmol -Ansätze. Im -4 °C-Ansatz wurde für alle Bestrahlungsstärken hohe Aktivitäten gemessen.

Die CAT-Aktivitäten waren bei den mit -4 und 4 °C kultivierten *Entomoneis*-Zellen bei allen Bestrahlungsstärken höher als bei 0 °C.

Bakterien-Catalase

Nach 2 Tagen wurde bei allen Temperaturen die höchsten CAT-Aktivitäten gemessen. Die -4 und 4 °C-Ansätze zeigen: CAT wurde nach 2 Tagen bei allen Bestrahlungsstärken und nach 4 Tagen in den 6-, 90- und 150- μmol -Ansätzen nachgewiesen. Nach 8 Tagen enthielten lediglich die 150- μmol -Ansätze CAT. Die CAT-Aktivität nahm mit der Zeit ab. Der 0 °C-Ansatz hatte niedrigere CAT-Aktivitäten als die -4 °C- und 4 °C-Ansätze. CAT-Aktivität wurde nach 2 Tagen für die höheren Bestrahlungsstärken (60, 90 und 150 $\mu\text{mol Photonen} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) nachgewiesen, nach 8 Tagen wurde keine CAT-Aktivität gemessen.

Glutathion Peroxidase

In Abbildung 3.22 ist der Temperatureinfluß (-4, 0 und 4 °C) bei Bestrahlungsstärken von 6, 30, 60, 90 und 150 $\mu\text{mol Photonen} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ auf die GPX-Aktivität der *E. kufferathii*-Zellen nach 2, 4 und 8 Tagen wiedergegeben.

Tab. 3.5: *E. kufferathii*: Prozentuale Abnahme der GPX-Aktivitäten mit steigender Temperatur, gemittelt aus den Aktivitäten nach 2, 4 und 8 Tagen, * = [$\mu\text{mol Photonen} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$];

Bestrahlungsstärke *	GPX-Abnahme [%]
6	64
30	nahezu keine
60	28
90	36
150	53

Höchste GPX-Aktivitäten wurden bei -4 °C, niedrigste bei 4 °C gemessen. Die GPX-Aktivitäten nahmen mit steigender Temperatur ab. Niedrige (6 $\mu\text{mol Photonen} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) und hohe (150 $\mu\text{mol Photonen} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) Bestrahlungsstärken führten zu höchsten GPX-Aktivitäten (Tab. 3.5). Die durchschnittlichen über alle Bestrahlungsstärken gemittelten Aktivitäten waren bei 4 °C bei 0.26, bei 0 °C bei 0.29 und bei -4 °C bei 0.36 U/mg Protein (vgl. Abb. 3.24).

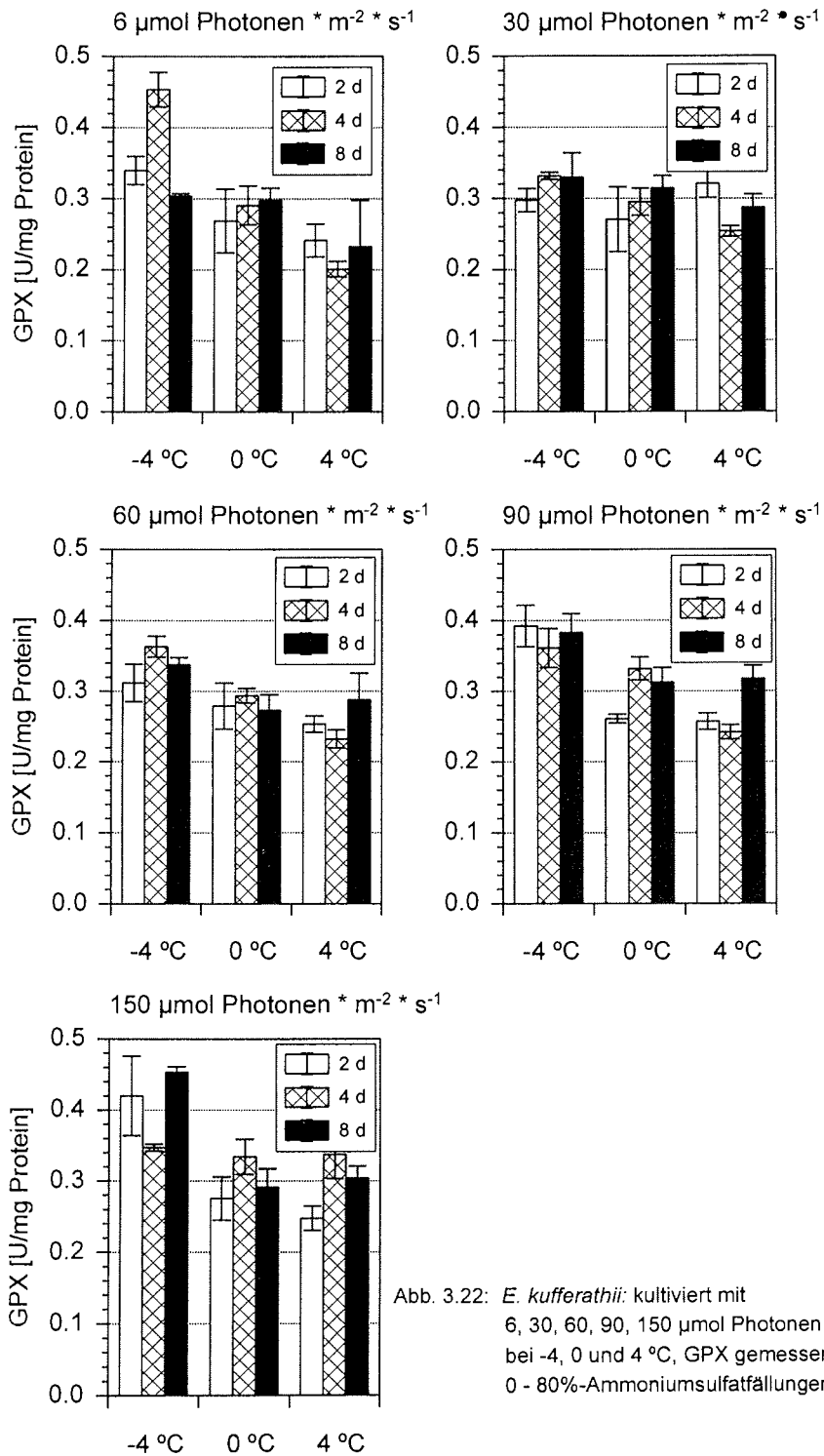


Abb. 3.22: *E. kufferathii*: kultiviert mit 6, 30, 60, 90, 150 $\mu\text{mol Photonen} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ bei -4, 0 und 4 °C, GPX gemessen aus 0 - 80%-Ammoniumsulfatfällungen, n = 4;

Glutathion Reduktase

Der Temperatureinfluß (-4, 0 und 4 °C) bei Bestrahlungsstärken von 6, 30, 60, 90 und 150 $\mu\text{mol Photonen} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ auf die GR-Aktivität der *E. kufferathii*-Zellen nach 2, 4 und 8 Tagen ist in Abbildung 3.23 wiedergegeben.

Tab. 3.6: *E. kufferathii*: Prozentuale Abnahme der GR-Aktivitäten mit steigender Temperatur, gemittelt aus den Aktivitäten nach 2, 4 und 8 Tagen, * = [$\mu\text{mol Photonen} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$];

Bestrahlungsstärke *	GR-Abnahme [%]
6	106
30	20
60	27
90	45
150	44

Die GR-Aktivitäten nahmen für alle Bestrahlungsstärken mit steigender Temperatur ab. Beim 6- μmol -Ansatz waren die größten Unterschiede zwischen dem -4 °C- und dem 4 °C-Ansatz (Tab. 3.6).

Die durchschnittlichen GR-Aktivitäten gemittelt über alle Bestrahlungsstärken lagen bei 4 °C bei 0.37, bei 0 °C bei 0.46 und bei -4 °C bei 0.53 U/mg Protein (vgl. Abb. 3.25).

Erebnisse

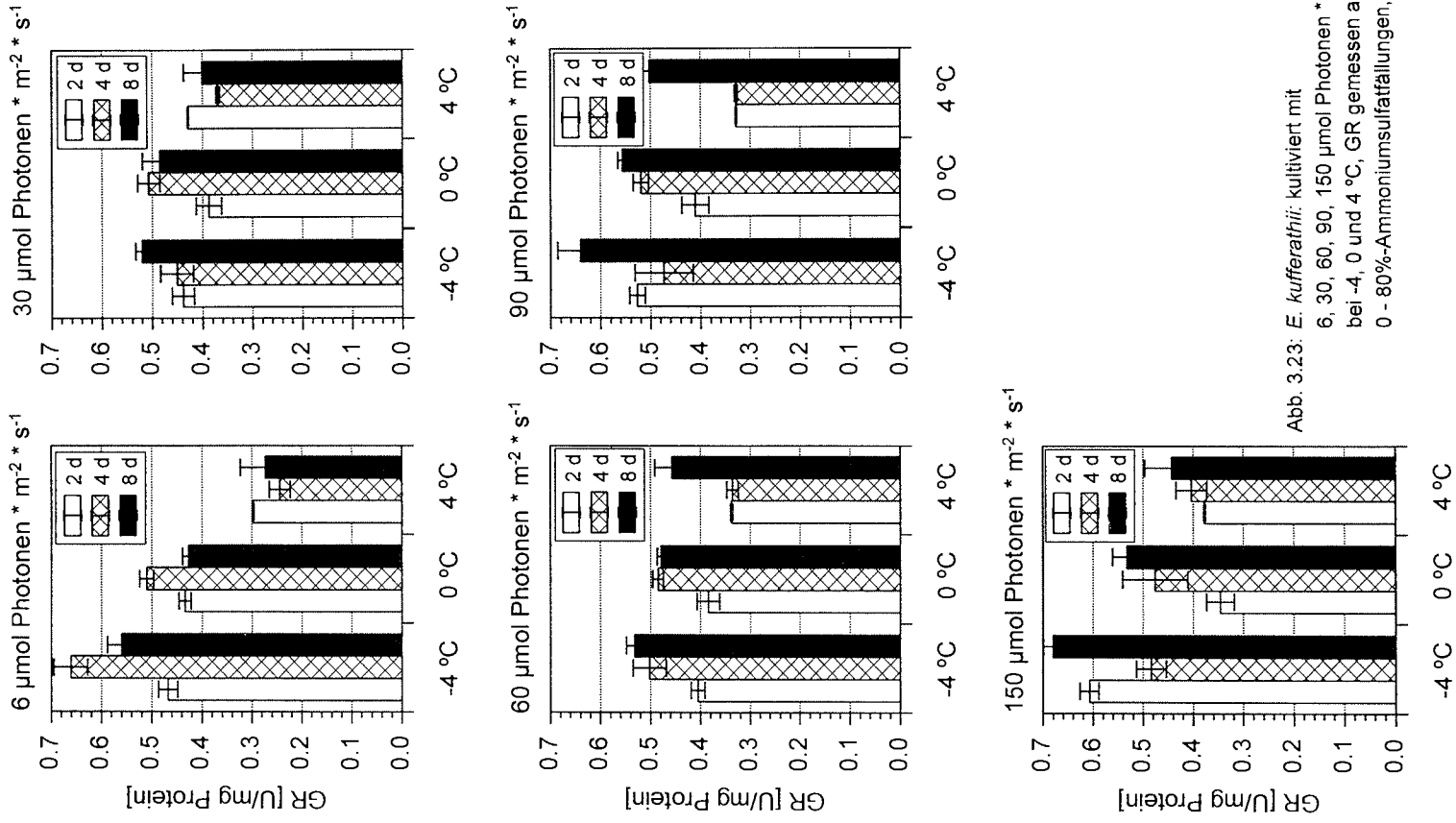


Abb. 3.23: *E. kufferathii*: kultiviert mit
 6, 30, 60, 90, 150 μmol Photonen * m⁻² * s⁻¹
 bei -4, 0 und 4 °C, GR gemessen aus
 0 - 80%-Ammoniumsulfatfällungen, n = 4;

3.4.3 Lichteinfluß auf die Oxidationsschutzenzyme in *E. kufferathii*

Catalase

Temperatur- (-4, 0 und 4 °C) und Lichteinfluß (6, 30, 60, 90 und 150 $\mu\text{mol Photonen} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) auf die CAT-Aktivität der *E. kufferathii*-Zellen und der Epibakterien nach 2, 4 und 8 Tagen sind in Abbildung 3.21 auf Seite 63 wiedergegeben.

Entomoneis-Catalase

-4 °C: Die CAT-Aktivität war für alle Bestrahlungsstärken nach 2, 4 und 8 Tagen ähnlich.

0 °C: Die höchsten *Entomoneis*-CAT-Banden waren nach 2 und 4 Tagen bei höheren Bestrahlungsstärken (60, 90 und 150 $\mu\text{mol Photonen} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) zu sehen. Die Aktivität nahm mit der Bestrahlungsstärke zu.

4 °C: Nach 2 und 4 Tagen waren die Aktivitäten der *Entomoneis*-CAT für alle Bestrahlungsstärken höher als nach 8 Tagen. Höchste Aktivitäten wurden nach 2, 4 und 8 Tagen an den 90 und 150 $\mu\text{mol Photonen} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ ausgesetzten *Entomoneis*-Zellen nachgewiesen.

Höchste CAT-Aktivitäten zeigten die 90- und 150- μmol -Ansätze.

Bakterien-Catalase

-4 °C: CAT konnte nach 2 Tagen für jede Bestrahlungsstärke nachgewiesen werden. Nach 4 Tagen zeigten die 6-, 90- und 150- μmol -Ansätze CAT (höchste Aktivität: 150- μmol -Ansatz). Nach 8 Tagen war lediglich im 150- μmol -Ansatz CAT nachweisbar.

0 °C: Nach 2 Tagen wurden höchste CAT-Aktivitäten gemessen. Die Aktivitäten nahmen mit der Bestrahlungsstärke zu (2 und 4 Tage). Nach 8 Tagen war keine Bakterien-CAT aktiv.

4 °C: CAT war nach 2 Tagen für alle Bestrahlungsstärken nachweisbar. Die CAT-Aktivität nahm mit der Zeit ab. Nach 4 und 8 Tagen war lediglich in den 90- und 150- μmol -Ansätzen CAT zu sehen.

Die bakterielle CAT wies nach 2 Tagen höchste Aktivitäten auf. Nach 4 Tagen war CAT-Bak lediglich in den 6-, 90- und 150- μmol -Ansätzen zu erkennen (höchste CAT-Aktivität: 150- μmol Ansatz). Die CAT-Aktivitäten nahmen mit der Zeit ab und konnten nach 8 Tagen nur noch in den 150- μmol -Ansätzen (-4 und 4 °C) gemessen werden.

Glutathion Peroxidase

In Abbildung 3.24 ist der Lichteinfluß (6, 30, 60, 90 und 150 μmol Photonen $\cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) auf die GPX-Aktivität der *E. kufferathii*-Zellen bei Temperaturen von -4, 0 und 4 °C nach 2, 4 und 8 Tagen zu sehen.

-4 °C: Die niedrigsten GPX-Aktivitäten wurden im 30- μmol -Ansatz gemessen. Die Zunahme der GPX-Aktivitäten vom 30- zum 150- μmol -Ansatz betrug 29% (30- μmol -Ansatz: 0.31, 150- μmol -Ansatz: 0.40 U/mg Protein). Der 6- μmol -Ansatz wies 26% höhere Aktivitäten als der 30- μmol -*Entomoneis*-Ansatz auf.

0 °C: Nach zwei Tagen waren die Aktivitäten bei Zunahme der Bestrahlungsstärken nahezu konstant, nach 4 und 8 Tagen waren sie gegenüber den GPX-Aktivitäten nach 2 Tagen leicht erhöht. Die GPX-Aktivität lag bei allen Bestrahlungsstärken zwischen 0.28 und 0.30 U/mg Protein.

4 °C: Die GPX-Aktivitäten wiesen bei Bestrahlungsstärken von 30, 60, 90 und 150 μmol Photonen $\cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ Werte zwischen 0.26 und 0.29 U/mg Protein auf und waren damit nahezu konstant. Lediglich der 6- μmol -Ansatz zeigte niedrigere GPX-Aktivitäten (0.22 U/mg Protein).

Die GPX-Aktivitäten waren bei 0 und 4 °C mit Zunahme der Bestrahlungsstärke nahezu konstant. Lediglich der 6- μmol -Ansatz (4 °C) zeigte deutlich niedrigere Enzymaktivität. Bei -4 °C wurden die geringsten GPX-Aktivitäten im 30- μmol -Ansatz gemessen, alle weiteren Ansätze hatten höhere Aktivitäten, die mit der Bestrahlungsstärke zunahmen (Abb. 3.24).

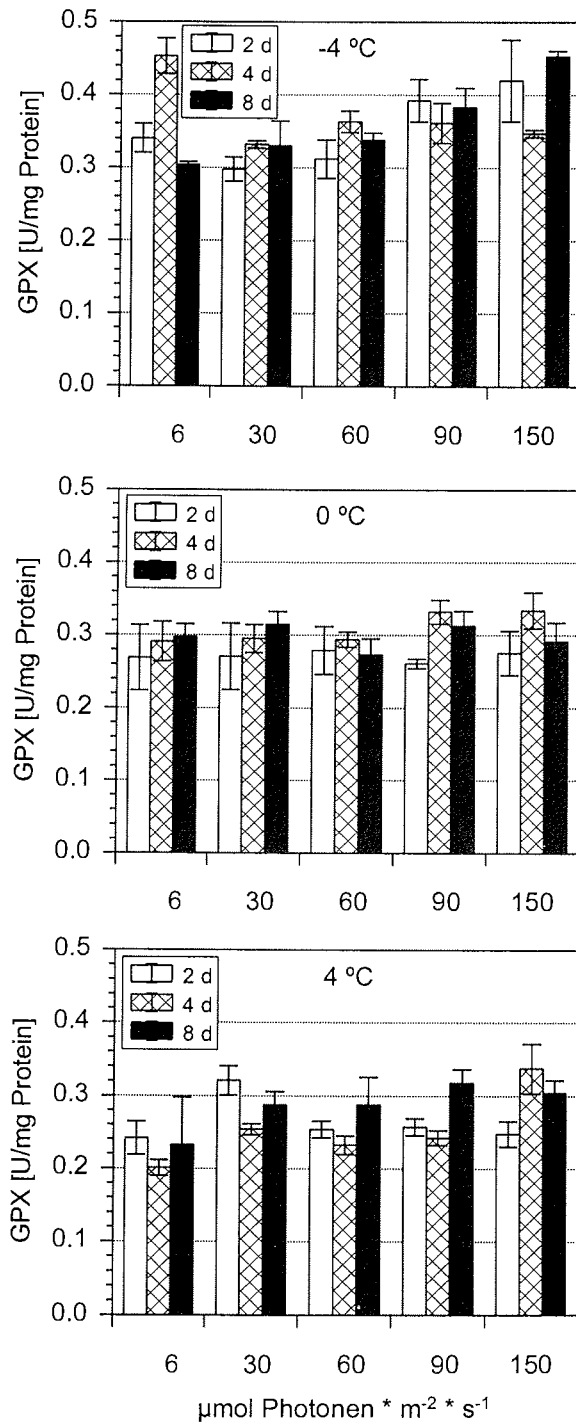


Abb. 3.24: *E. kufferathii*: kultiviert mit 6, 30, 60, 90, 150 $\mu\text{mol Photonen} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ bei -4, 0 und 4 °C, GPX gemessen aus 0 - 80%-Ammoniumsulfatfällungen, n = 4;

Glutathion Reduktase

Der Lichteinfluß (6, 30, 60, 90 und 150 $\mu\text{mol Photonen} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) bei Temperaturen von -4, 0 und 4 °C auf die GR-Aktivität der *E. kufferathii*-Zellen nach 2, 4 und 8 Tagen ist in Abbildung 3.25 gezeigt.

-4 °C: Die GR-Aktivitäten nahmen in den 30- bis 150- μmol -Ansätzen um 32% zu (30- μmol -Ansatz: 0.47, 150- μmol -Ansatz: 0.62 U/mg Protein). Die höchsten Aktivitäten wurden nach 8 Tagen gemessen. Der 6- μmol -Ansatz hatte 18% höhere GR-Aktivitäten als der 30- μmol -*Entomoneis*-Ansatz.

0 °C: Nach zwei Tagen nahmen die GR-Aktivitäten mit zunehmender Bestrahlungsstärke geringfügig ab: Der 6- μmol -Ansatz zeigte 9% höhere Aktivitäten als der 150- μmol -Ansatz. Die GR-Aktivitäten waren nach 4 Tagen nahezu konstant und nahmen nach 8 Tagen mit der Bestrahlungsstärke um 25% zu. Die GR-Aktivitäten lagen bei allen Bestrahlungsstärken bei 0.45 U/mg Protein.

4 °C: Die GR-Aktivitäten wiesen bei den Bestrahlungsstärken 30, 60, 90 und 150 $\mu\text{mol Photonen} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ Werte zwischen 0.37 und 0.41 U/mg Protein auf und waren damit nahezu konstant. Der 6- μmol -Ansatz zeigte 40% niedrigere GR-Aktivitäten (0.28 U/mg Protein). Höchste Aktivitäten wurden nach 8 Tagen gemessen. Nach 2 und 4 Tagen zeigten die 60-, 90- und 150- μmol -Ansätze ähnliche GR-Aktivitäten, die nach 8 Tagen bis zu 56% höher waren.

Die GR-Aktivitäten waren bei 4 °C mit Zunahme der Bestrahlungsstärke nahezu konstant. Lediglich der 6- μmol -Ansatz zeigte deutlich niedrigere Enzymaktivität. Bei 0 °C wurde kein Einfluß der Bestrahlungsstärke auf die Aktivität der *Entomoneis*-GR festgestellt. Bei -4 °C wurden die geringsten GR-Konzentrationen im 30- μmol -Ansatz gemessen, alle weiteren Ansätze zeigten höhere Aktivitäten, die mit der Bestrahlungsstärke zunahmen. Die höchsten Aktivitäten wurden in der Regel nach 8 Tagen gemessen (Abb. 3.25).

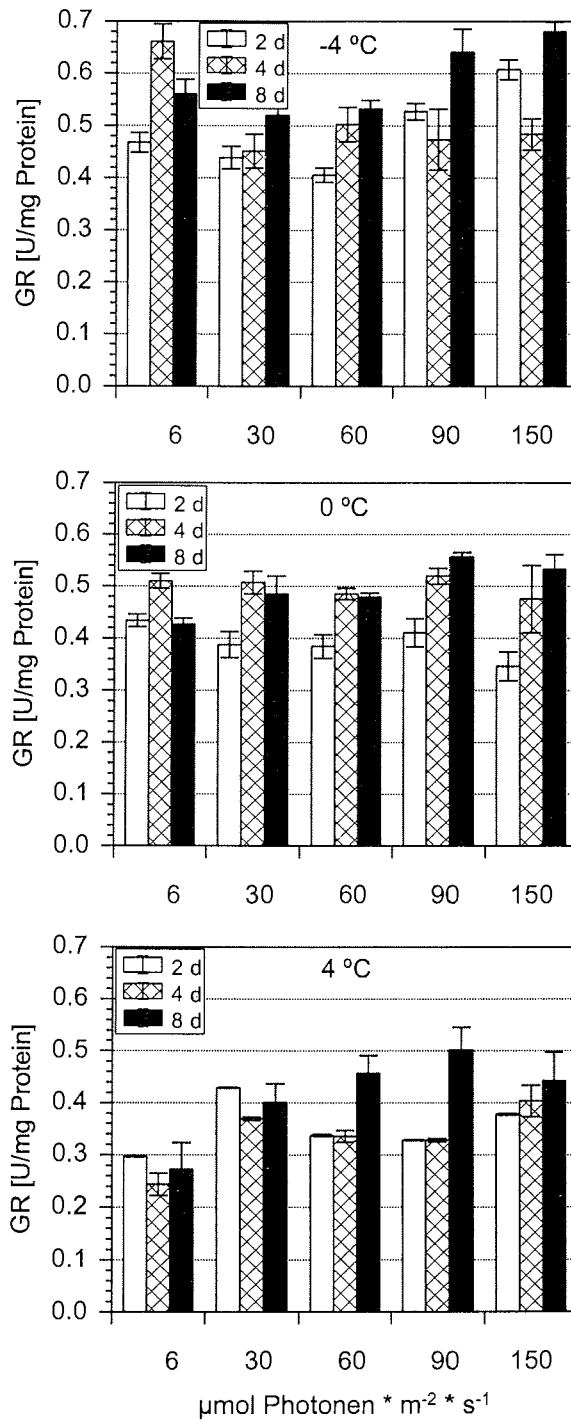


Abb. 3.25: *E. kufferathii*: kultiviert mit 6, 30, 60, 90, 150 $\mu\text{mol Photonen} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ bei -4, 0 und 4 °C, GR gemessen aus 0 - 80%-Ammoniumsulfatfällungen, n = 4;

3.5 *E. kufferathii* und Epibakterien

Die unialgare *E. kufferathii*-Kultur enthielt auch epiphytisch wachsende Bakterien. Der photometrische CAT-Nachweis reichte darum nicht aus (Kap. 3.3.1), weil die gemessene Aktivität auch durch CAT-haltige Bakterien verursacht sein konnte.

Die Bakterien wurden daher auf Agar-Pepton-Platten kultiviert und extrahiert (Kap. 2.2). Der Extrakt und konzentrierte Fraktionen (0 – 40%- und 40 - 80%-Ammoniumsulfatfällungen) wurden gelelektrophoretisch getrennt und nach Aktivitätsfärbung mit dem Extrakt und den konzentrierten Fraktionen aus *E. kufferathii* verglichen. Das Ergebnis waren zwei CAT unterschiedlicher Molekulargewichte, eine CAT aus *E. kufferathii* und eine Bakterien-CAT:

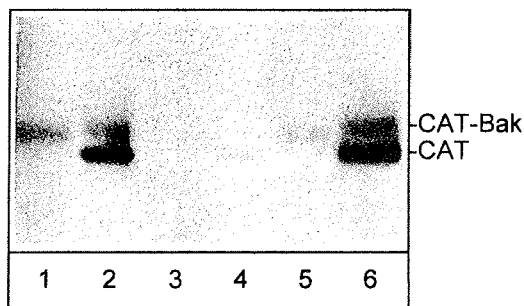


Abb. 3.26: *E. kufferathii* und Bakterien:

Native PAGE, Ausschnitt aus einem 8% Gel nach CAT-Färbung,
 Bahn 1: Bakterienextrakt; Bahn 2: *E. kufferathii*-Extrakt;
 Bahn 3: Bakterien: 0 - 40%-Ammoniumsulfatfällung;
 Bahn 4: *E. kufferathii*: 0 - 40%-Ammoniumsulfatfällung;
 Bahn 5: Bakterien: 40 - 80%-Ammoniumsulfatfällung;
 Bahn 6: *E. kufferathii*: 40 - 80%-Ammoniumsulfatfällung;
 Bahn 1: 30 µg Protein, Bahnen 2 - 6: 100 µg Protein;

Abbildung 3.26 zeigt ein auf CAT gefärbtes Gel. Bakterien- und *E. kufferathii*-Extrakte wurden in den Bahnen 1 und 2 aufgetragen. Die Bahnen 3 bis 6 enthielten Ammoniumsulfatfällungen: aus Bakterien (Bahn 3: 0 - 40%, Bahn 5: 40 - 80%) und *E. kufferathii* (Bahn 4: 0 - 40%, Bahn 6: 40 - 80%).

Der Rohextrakt der Bakterien (Bahn 1) zeigte eine Bande (niedriger R_F -Wert, bakterielle CAT, CAT-Bak), der *E. kufferathii*-Rohextrakt zwei Banden (Bahn 2). Die Bande mit niedrigerem R_F -Wert korrespondierte mit der CAT-Bak, die Bande mit höherem R_F -Wert war intensiver.

Die 0 - 40%-Ammoniumsulfatfällung der Bakterien (Bahn 3) zeigte keine Bande. Bahn 4 (0 - 40%-Ammoniumsulfatfällung aus *E. kufferathii*) enthielt eine schwache Bande mit höherem R_F -Wert.

Die 40 - 80%-Ammoniumsulfatfällung der Bakterien wies eine schwache Bande mit niedrigem R_F -Wert auf (Bahn 5). Die 40 - 80%-Ammoniumsulfatfällung aus *E. kufferathii* glich dem Bild des *E. kufferathii*-Rohextrakts (Bahn 2).

Für die Bakterien konnte eine CAT-Bande mit niedrigerem R_F -Wert nachgewiesen werden, die nicht in der 0 - 40%-Ammoniumsulfatfällung gefunden wurde. Die 0 - 40%-Ammoniumsulfatfällung der *E. kufferathii*-Zellen (Bahn 4) hatte die Bande mit niedrigerem R_F -Wert ebenfalls nicht. Die Bande mit höherem R_F -Wert konnte in allen *E. kufferathii*-Ansätzen nachgewiesen werden.

4 Diskussion

Die Charakterisierung der Oxidationsschutzenzyme aus *E. kufferathii* erfolgte aus 40 - 80%-Ammoniumsulfatfällungen (Kap. 4.1). Die Aktivität der Oxidationsschutzenzyme (Photometrie), die Anzahl der Isoenzyme und deren Molekulargewichte (Gelelektrophorese) wurden aus 0 - 80%-Ammoniumsulfatfällungen bestimmt (Kap. 4.5). Physiologische Untersuchungen wurden ebenfalls aus 0 - 80%-Ammoniumsulfatfällungen vorgenommen (Kap. 4.4).

4.1 Charakterisierung der Oxidationsschutzenzyme aus *E. kufferathii*

4.1.1 Catalase

CAT baut Wasserstoffperoxid in Peroxisomen ab. Der Nachweis mitochondrialer CAT zeigte, daß CAT nicht uneingeschränkt als peroxisomaler Marker gilt. SCANDALIOS (1994) nimmt an, daß CAT auch cytosolisch vorkommt. CAT wurde an höheren Pflanzen und Algen intensiv untersucht (vgl. Kap. 4.2). SCANDALIOS (1994) und WILLEKENS (1995) fassen die Eigenschaften von Pflanzencatalasen in Übersichtsartikeln zusammen.

CAT wurde aus *E. kufferathii* photometrisch (0.020 ± 0.005 U/mg Protein) und auch gelelektrophoretisch (apparentes Molekulargewicht: 160 kDa) nachgewiesen. Hohe apparente Molekulargewichte sind für CAT charakteristisch.

CAT-Aktivität konnte über einen breiten Temperaturbereich (-4 bis 70 °C) gemessen werden (Abb. 3.3). Photometrische CAT-Messungen ergaben zwei Temperaturoptima (0 und 60 °C), die vermutlich zu zwei Isoenzymen gehören, denn die *E. kufferathii*-Kultur enthielt auch epiphytische Bakterien.

Die hohen CAT-Aktivitäten bei tiefen Temperaturen (0 °C: 100%, -4 °C: 35%) setzen sich vermutlich additiv zusammen. Die Aktivierungsenergien E_A wurden aus der Temperaturkurve für die Bereiche von -4 bis 0 °C ($363.8 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$) und von 10 bis 60 °C ($17.5 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$) ermittelt. Aktivierungsenergien enzymatischer Reaktionen liegen in der Regel zwischen 40 und 80 $\text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ (BETZ, 1974). Enzyme mit hohen Aktivierungsenergien können sensitiv auf Temperaturschwankungen reagieren. Die mit $363.8 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ ermittelte Aktivierungsenergie ist vermutlich fehlerbehaftet, weil der gewählte Temperaturbereich nur 4 °C umfaßt und sich die Aktivitäten verschiedener CAT überlagern. Die niedrige Aktivierungsenergie ($17.5 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$) ermöglicht selbst Reaktionen bei

tiefen Temperaturen und zeigt auch, daß CAT bei der Wasserstoffperoxidentgiftung eine entscheidende Rolle spielt. CAT arbeitet in der Regel bei hohen Wasserstoffperoxidkonzentrationen, weil zwei Moleküle am reaktiven Zentrum benötigt werden. Die niedrige Aktivierungsenergie ist vermutlich eine Anpassung auf hohe Wasserstoffperoxidkonzentrationen, die bei tiefen Temperaturen durch SOD aus Superoxidanionen gebildet werden. Darüber hinaus ist anzunehmen, daß die für 10 bis 60 °C ermittelte Aktivierungsenergie auch noch bei tieferen Temperaturen gilt. Das konnte nicht bewiesen werden, weil sich die Enzymaktivitäten beider CAT im Bereich unterhalb von 10 °C überlagerten. Aus den Temperaturkurven und den daraus berechneten Aktivierungsenergien kann keine Unterscheidung zwischen bakterieller und Algen-CAT am Temperaturoptimum bei 0 °C abgeleitet werden. Pro- und eukaryotische CAT konnte jedoch gelelektrophoretisch unterschieden werden (vgl. Kap. 4.2).

4.1.2 Peroxidase

Peroxidasen weisen geringe Substratspezifität auf, so daß in der vorliegenden Arbeit verschiedene natürliche und künstliche Substrate getestet wurden. Die Gesamtperoxidaseaktivität wird in der Regel mit ABTS, Guaiacol und / oder *o*-Dianisidin photometrisch bestimmt.

Geringe PX-Aktivitäten konnten lediglich mit *o*-Dianisidin und Pyrogallol bei pH-Werten von 6 und 7 festgestellt werden (Abb. 3.13). Die PX-Aktivität mit *o*-Dianisidin war kleiner als 0.005 U/mg Protein und lag nahe der Nachweisgrenze. *E. kufferathii* enthält vermutlich keine PX, evtl. in Spuren.

PX-Aktivität nach gelelektrophoretischer Proteintrennung und Färbung mit *o*-Dianisidin, Guaiacol und Pyrogallol wurde ebenfalls nicht gefunden, obwohl Aktivitätsfärbungen in der Regel empfindlicher als photometrische Tests sind.

Die Untersuchungen belegen, daß PX in *E. kufferathii* nicht am Oxidationsschutz beteiligt ist.

4.1.3 Ascorbat Peroxidase

APX ist an der Wasserstoffperoxidentgiftung in den Chloroplasten und im Cytosol beteiligt und wurde aus verschiedenen höheren Pflanzen gereinigt (ASADA, 1992; CREISSEN *et al.*, 1994). Algen enthalten ebenfalls APX-Aktivität wie beispielsweise Dinoflagellaten (LESSER und SHICK, 1989;

MATTA und TRENCH, 1991; LESSER, 1996B), die auch symbiotisch vorkommen (LESSER 1996A; MATTA, 1995). APX wurde außerdem in den Grünalgen *Chlamydomonas reinhardtii* (MIYAKE *et al.*, 1991), *Ulva rigida* (COLLEN und PEDERSEN, 1996) und an verschiedenen Entwicklungsstufen von *Acetabularia mediterranea* (CASTILLO *et al.*, 1986) erforscht. Die APX-Vorkommen in Algen sind in Tabelle 4.1 zusammengestellt.

Tab. 4.1: Vorkommen von APX in Algen;

Alge	Referenz
<i>Euglena gracilis</i>	SHIGEOKA <i>et al.</i> , 1980A
<i>Acetabularia mediterranea</i>	CASTILLO <i>et al.</i> , 1986
<i>Symbiodinium sp.</i>	LESSER und SHICK, 1989
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	MIYAKE <i>et al.</i> , 1991
<i>Euglena gracilis</i>	
<i>Symbiodinium microadriaticum</i>	MATTA und TRENCH, 1991
<i>Ostreopsis lenticularis</i>	MATTA, 1995
<i>Prorocentrum micans</i>	LESSER, 1996A
<i>Symbiodinium burmudense</i>	LESSER, 1996B
<i>Ulva rigida</i>	COLLEN und PEDERSEN, 1996

Euglena gracilis ist die einzige Alge, aus der APX gereinigt und näher charakterisiert wurde: $K_m(\text{AsA})$: 0.41 mM; $K_m(\text{H}_2\text{O}_2)$: 0.056 mM; pH-Optimum: 6.2; Temperaturoptimum: 32 - 34 °C; apparentes Molekulargewicht: 76 kDa (SHIGEOKA *et al.*, 1980A).

Das Oxidationsschutzenzym APX wurde in *E. kufferathii* nicht nachgewiesen.

4.1.4 Glutathion Peroxidase

GPX ist an der cytosolischen und mitochondrialen Wasserstoffperoxid-entgiftung beteiligt. Das allgemeine Vorkommen von GPX in höheren Pflanzen wurde lange bezweifelt (HALLIWELL und GUTTERIDGE, 1989), obwohl schon 1985 GPX-Aktivität in verschiedenen höheren Pflanzen festgestellt wurde (DROTAR *et al.*, 1985).

GPX-Aktivität wurde auch in Algen, besonders in Mikroalgen gefunden (OVERBAUGH und FALL, 1982; PRICE und HARRISON, 1988; MATTA, 1995). In Tabelle 4.2 sind die GPX-Vorkommen in Algen wiedergegeben.

Tab. 4.2: GPX-Vorkommen in Algen;

Alge	Referenz
<i>Euglena gracilis</i> (UTEX753)	OVERBAUGH und FALL, 1982
<i>Euglena gracilis</i> var. <i>bacillaris</i> (UTEX884)	
<i>Euglena gracilis</i> var. <i>bacillaris</i> W3BUL	
<i>Astasia longa</i> (UTEX512)	
<i>Euglena gracilis</i>	OVERBAUGH und FALL, 1985
<i>Thalassiosira pseudonana</i> HUSEDT	PRICE und HARRISON, 1988
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	SHIGEOKA <i>et al.</i> , 1991
	TAKEDA <i>et al.</i> , 1993B
<i>Ostreopsis lenticularis</i>	MATTA, 1995

GPX-Reinigungen erfolgten aus *Euglena gracilis* (OVERBAUGH und FALL, 1985) und *Chlamydomonas reinhardtii* (SHIGEOKA *et al.*, 1991). Die cytosolische *Euglena*-GPX zeigte ein breites Substratspektrum mit AsA, NADPH, Pyrogallol, Guaiacol und *o*-Dianisidin. Die Eigenschaften bislang gereinigter Algen-GPX sind in Tabelle 4.3 zusammengestellt:

Tab. 4.3: Eigenschaften der aus *Euglena gracilis* (OVERBAUGH und FALL, 1985) und *Chlamydomonas reinhardtii* (SHIGEOKA *et al.*, 1991) gereinigten GPX;

Alge	K _M (GSH) [mM]	K _M (H ₂ O ₂) [mM]	pH- Optimum	MW [kDa]
<i>Euglena gracilis</i>	0.7	0.03	8.2	130
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	3.7	0.24	8.3	67

Die GPX-Aktivität aus *E. kufferathii* wurde photometrisch mit 0.453 ± 0.055 U/mg Protein bestimmt. Die Anzahl der Isoenzyme und der Molekulargewichte konnte nicht bestimmt werden, weil eine Methode zum nativen GPX-Nachweis fehlt.

Das pH-Optimum für die Oxidation von GSH lag mit Glycylglycin bei pH 9.0, mit CAPS bei 10.0. In CAPS war die Aktivität geringer (Abb. 3.4). Daher konnte das pH-Optimum nicht eindeutig bestimmt werden. Das pH-Optimum liegt vermutlich höher als in *Chlamydomonas reinhardtii* (pH 8.3, 50 mM TRIS) oder *Euglena gracilis* (pH 8.2). Außerdem können *in vitro*- nicht auf *in vivo*-Enzymuntersuchungen übertragen werden. Die *in vitro*-Bestimmungen der pH-Optima

der Enzyme unterscheiden sich vermutlich von den *in vivo*-pH-Werten in den Kompartimenten.

Das Temperaturoptimum lag bei 45 °C (Abb. 3.5). Auch bei tiefen Temperaturen wurden GPX-Aktivitäten gemessen (-4 °C: 12%, 0 °C: 16%, 4 °C: 21%). Das Temperaturoptimum liegt damit deutlich höher als die durchschnittlichen antarktischen Wassertemperaturen.

Die Aktivierungsenergie E_A wurde für den Temperaturbereich von -4 bis 45 °C mit $31.1 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ bestimmt, war damit deutlich höher als für CAT und lag in ähnlicher Größenordnung wie die für GR ermittelte. GPX ist vermutlich als GR-Gegenspieler (Reduktion von GSSG) wichtiger als in der Wasserstoffperoxidgiftung, die in *E. kufferathii* wesentlich durch CAT bestimmt wird.

Die GPX-Thermostabilität war sehr viel höher als die der anderen Oxidationsschutzenzyme (GR und SOD nach 480 min bei 37 °C: 10%; GPX: 92% Aktivität). GPX kann als thermostabil eingestuft werden.

Anhand der MICHAELIS-MENTEN-Konstanten kann gesehen werden, daß Wasserstoffperoxid eine sehr viel höhere Affinität zum Enzym als GSH (fast 5fach höherer K_M -Wert) aufweist. Der $K_M(\text{GSH})$ -Wert belegt, daß die GSH-Konzentration hoch gehalten wird, denn GSH hat noch weitere Aufgaben (Oxidationsschutz, Protein stabilisierung). Die Sättigungskurve des Substrats folgte der klassischen MICHAELIS-MENTEN-Kinetik, Konzentrationen oberhalb von 400 μM H_2O_2 hemmten die GPX. Der hemmende Einfluß des Wasserstoffperoxids unterstreicht die wichtige Funktion der CAT in der Wasserstoffperoxidgiftung. GPX-Untersuchungen an höheren Pflanzen und Algen sind kaum verfügbar.

4.1.5 Glutathion Reduktase

GR ist ein weit verbreitetes Enzym, das die NADPH-abhängige Reduktion von Glutathiondisulfid zu Glutathion katalysiert. GSH wirkt als intrazelluläres Reduktionsmittel, wird in fast allen lebenden Zellen gefunden und ist an zahlreichen biochemischen Reaktionen beteiligt. GR wurde aus höheren Pflanzen gereinigt und ist im Cytosol und / oder in den Chloroplasten lokalisiert.

Anreicherungen von GR aus Algen erfolgten aus *Euglena gracilis* (SHIGEOKA *et al.*, 1987) und *Chlamydomonas reinhardtii* (SERRANO und LLOBELL, 1993; TAKEDA *et al.*, 1993A). Tabelle 4.4 zeigt die Eigenschaften der GR-Isoenzyme.

Tab. 4.4: Eigenschaften der aus *Chlamydomonas reinhardtii* und *Euglena gracilis* gereinigten und charakterisierten GR; - nicht bestimmt;

Referenz	SHIGEOKA <i>et al.</i> , 1987	TAKEDA <i>et al.</i> , 1993A	SERRANO und LLOBELL, 1993	
Alge	<i>Euglena gracilis</i>	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	
K _M (GSSG) [μM]	55	54.1	50	50
K _M (NADPH) [μM]	14	10.6	7	28
pH-Optimum	8.2	8.2	7.0	8.5
Temperatur-optimum [°C]	52	49	-	-
MW [kDa]	79	54 - 56	127	127
Lokalisation	Cytosol	-	Cytoplasma	Plastiden

GR wurde photometrisch (0.714 ± 0.025 U/mg Protein) und gelelektrophoretisch (ein Enzym, apparentes Molekulargewicht: 70 kDa) nachgewiesen.

CREISSEN (1994) beschreibt die Eigenschaften gereinigter GR höherer Pflanzen. Die apparenten Molekulargewichte liegen zwischen 60 und 190 kDa. Algen-GR zeigt apparente Molekulargewichte von 54 bis 127 kDa. Die GR aus *E. kufferathii* (70 kDa) hat ein ähnliches apparentes Molekulargewicht wie die in *Euglena gracilis* (79 kDa).

Das pH-Optimum lag für die Reduktion von GSH in HEPES und Glycylglycin bei pH 8.0. In CAPS hatten die Enzyme niedrigere Aktivitäten (pH 9.5 bis 11.0, Abb. 3.7). Gereinigte GR höherer Pflanzen zeigen pH-Optima von 7.25 bis 9.0 (CREISSEN *et al.*, 1994). Die GR aus *Euglena* und *Chlamydomonas* haben ähnliche pH-Optima. pH-Werte sind stark von den Eigenschaften der Puffer, den Molaritäten und den Inkubationszeiten abhängig. Das pH-Optimum der GR aus *E. kufferathii* befindet sich in einem für GR typischen Bereich.

Ein breites Temperaturoptimum lag zwischen 35 und 45 °C (Abb. 3.8). Die Temperaturoptima der bislang gereinigten Algen-GR liegen um 50 °C. Unter Berücksichtigung der Puffer (Eigenschaften und Molarität) zeigten GR ähnliche Temperaturoptima. Auch bei tiefen Temperaturen war die GR-Aktivität in *E. kufferathii* (0 °C: 29%, 5 °C: 20%) hoch. Vergleichswerte zu GR höherer Pflanzen oder Algen liegen nicht vor. Das GR-Temperaturoptimum war deutlich höher als die durchschnittlichen antarktischen Wassertemperaturen. Die Aktivierungsenergie E_A war mit $34.0 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ (Temperaturbereich: 4 bis 37 °C) vergleichbar mit der des enzymatischen Gegenspielers GPX und kann für

enzymatische Reaktionen als niedrig bezeichnet werden (meistens zwischen 40 und 80 kJ * mol⁻¹, BETZ, 1974), so daß GPX selbst bei tiefen Temperaturen gegen Wasserstoffperoxid wirksam sein kann.

Die maximalen Reaktionsgeschwindigkeiten $V_{\max}(\text{GSSG})$ und $V_{\max}(\text{NADPH})$ lagen bei 0.30 und 0.60 mmol NADPH/min * mg Protein (Abb. 3.9). Die für V_{\max} notwendige Substratkonzentration ist mit der von GPX vergleichbar (GR benötigt allerdings doppelt soviel Co-Substrat).

Die MICHAELIS-MENTEN-Konstanten $K_M(\text{GSSG})$ und $K_M(\text{NADPH})$ betragen 62.5 und 20 μM . Die $K_M(\text{GSSG})$ -Werte verschiedener gereinigter GR höherer Pflanzen liegen zwischen 11 und 196 μM , die meisten davon zwischen 11 und 40 μM (CREISSEN *et al.*, 1994). GR aus *Euglena gracilis* und *Chlamydomonas reinhardtii* verfügt über vergleichbare $K_M(\text{GSSG})$ -Werte (ca. 50 μM). Die $K_M(\text{NADPH})$ -Werte des Enzyms aus höheren Pflanzen (bis 9 μM NADPH, CREISSEN *et al.*, 1994) und Algen (bis 28 μM NADPH, Tab. 4.4) sind niedriger als die $K_M(\text{GSSG})$ -Werte. Die GR aus *E. kufferathii* zeigte ähnliche Eigenschaften wie die cytosolische GR aus *Euglena gracilis* (Tab. 4.4). Wenn ein Gleichgewicht zwischen GSH und GSSG besteht, zeigen der $K_M(\text{GSSG})$ - und der $K_M(\text{GSH})$ -Wert, daß das Gleichgewicht weit auf der Seite des GSH liegt (575 zu 62.5 μM). Das stimmt mit den bisher in höheren Pflanzen gefundenen GSSG-Konzentrationen überein, die in der Regel zwischen 1 und 10% vom Frischgewicht, in gestreßten Pflanzen bis zu 50% betragen können (MULLINEAUX, persönliche Mitteilung). Der für *E. kufferathii* ermittelte GSSG-Gehalt am Frischgewicht lag bei 6.5 bis 7% (HEINEMANN, 1998).

Die Thermostabilitätsmessungen (25 und 37 °C) wiesen GR als thermolabiles Enzym aus, weil nach 480 min bei beiden Temperaturen nur noch 10% Aktivität gemessen werden konnte (Abb. 3.10).

Messungen zum Einfluß der Puffermolarität ergaben, daß 50 bis 100 mM TRIS-Puffer pH 8.0 geeignet waren, 250 und 500 mM Puffer hemmten dagegen die Enzymaktivität deutlich. Aus 1 M TRIS-Puffer pH 8.0 konnte keine GR-Aktivität gemessen werden. Der Einfluß der Pufferkonzentration belegte, daß enzymatische Daten quantitativ nur verglichen werden können, wenn die Versuchsbedingungen der untersuchten Organismen gleich gewählt werden.

4.1.6 Superoxid Dismutase

Cu/Zn-SOD ist in höheren Pflanzen und Tieren weit verbreitet, in Algen meistens nicht nachzuweisen (LUMSDEN und HALL, 1975; ASADA *et al.*, 1977; HENRY und HALL, 1977). Ausnahmen bilden Grünalgen (HENRY und HALL, 1977) und Dinoflagellaten (MATTA *et al.*, 1992; ASANO *et al.*, 1996; BUTOW *et al.*, 1997B).

Andererseits ist das Vorkommen von Fe- und Mn-SOD ist für einige Algen beschrieben: *Scenedesmus obliquus* enthält vier Fe-SOD und fünf Mn-SOD (REDMOND *et al.*, 1985). Eine Fe-SOD und drei Mn-SOD kommen in *Chlamydomonas reinhardtii* vor (SAKURAI *et al.*, 1993).

Die erste Algen-SOD (40 kDa, Mn als prosthetische Gruppe) wurde aus *Porphyridium cruentum* gereinigt (MISRA und FRIDOVICH, 1977). Fe- und Mn-SOD (jeweils 45 kDa) wurden aus *Euglena gracilis* isoliert (KANEMATSU und ASADA, 1979). Die erste aus Grünalgen gereinigte SOD war eine 40 kDa Fe-SOD (SAKURAI *et al.*, 1993). In *Symbiodinium microadriaticum* wurde eine 49.5 kDa Mn-SOD nachgewiesen (MATTA *et al.*, 1992).

Photometrische Messungen aus *E. kufferathii* ergaben 32.4 ± 2.00 U/mg Protein SOD-Aktivität.

Der Oxidationsschutz vor Superoxidanionen ist in *E. kufferathii* besonders ausgeprägt. Bis zu 13 Isoenzyme konnten gelelektrophoretisch nachgewiesen werden. Viele Banden hatten jedoch eine geringe Intensität. Die SOD sind vermutlich über verschiedene Kompartimente verteilt. Die Isoenzyme mit höherer Aktivität zeigten apparente Molekulargewichte von 46 (höchste Aktivität), 41 und 15 kDa.

Die 46-kDa- und 41-kDa-Isoenzyme hatten Mn als prosthetische Gruppe. Die Isoenzyme hatten vergleichbare Molekulargewichte mit den aus Algen bekannten Mn-SOD (*Euglena gracilis*: 45 kDa, *Porphyridium cruentum* 40 kDa, *Symbiodinium microadriaticum*: 49.5 kDa). Das 15-kDa-Isoenzym wurde als Fe-SOD identifiziert. Das apparente Molekulargewicht der Fe-SOD war niedriger als die bisher in Algen gefundenen Fe-SOD (*Euglena gracilis*: 45 kDa, *Chlamydomonas reinhardtii*: 40 kDa). Cu/Zn-SOD war in *E. kufferathii* nicht nachweisbar.

Das SOD-Temperaturoptimum lag bei 37 °C. Verglichen mit den anderen Oxidationsschutzenzymen (abgesehen vom zweiten Temperaturoptimum der CAT), zeigte SOD bei tiefen Temperaturen besonders hohe Aktivitäten (-4 °C: 41%, 0 °C: 55%, 4 °C: 40%). Die niedrige Aktivierungsenergie (16.4 kJ * mol⁻¹, Temperaturbereich von -4 bis 37 °C) ermöglichte selbst Reaktionen bei tiefen Temperaturen und läßt vermuten, daß die SOD in *E. kufferathii* Superoxidationen effektiv zu Wasserstoffperoxid abbauten. Wasserstoffperoxidmoleküle haben gegenüber Superoxidationen den Vorteil, daß sie Membranen passieren und dadurch in andere Kompartimente oder aus der Zelle diffundieren können, wo sie von CAT und / oder Peroxidasen entgiftet werden. Die niedrige Aktivierungsenergie ist vermutlich eine Anpassung an tiefe Temperaturen, bei denen hohe Superoxidationenkonzentrationen auftreten.

Die SOD-Thermostabilitäten wurden bei 25 und 37 °C gemessen (Abb. 3.12). SOD zeigte bei beiden Temperaturen kontinuierliche Aktivitätsabnahmen. SOD ist thermolabil, weil bei beiden Temperaturen nach 480 min nur noch 10% Aktivität nachweisbar war.

Auch hier konnte ein Einfluß der Puffermolarität auf die Enzymaktivität nachgewiesen werden: 0.5 M TRIS-Bernsteinsäure-Puffer pH 8.2 war geeignet, 250 und 100 mM hemmten die SOD-Aktivität deutlich und in 50 mM TRIS-Bernsteinsäure-Puffer pH 8.2 konnte SOD nicht gemessen werden. Der Einfluß der Puffermolarität zeigte auch hier, daß enzymatische Daten nur sinnvoll verglichen werden können, wenn die Versuchsbedingungen der untersuchten Organismen gleich gewählt werden. Den vielen verschiedenen in der Literatur beschriebenen Tests zur SOD-Bestimmung liegen unterschiedliche Prinzipien zugrunde. Daher sind Aktivitätsvergleiche mit den SOD anderer Organismen problematisch.

pH-Wert-Kurven wurden für SOD nicht aufgenommen, weil der photometrische Test nur oberhalb von pH 7.5 angewendet werden konnte. pH-Wert-Messungen ergaben die höchsten SOD-Aktivitäten bei pH 8.2. Verschiedene gereinigte SOD-Präparate zeigen ebenfalls pH-Optima in schwach alkalischer Lösung (SCHOMBURG *et al.*, 1994).

4.2 Catalase in *E. kufferathii*

Die ersten CAT-Untersuchungen an *E. kufferathii* erfolgten aus zellfreien Extrakten nach AEBI (1984). CAT-Aktivität wurde durch Wasserstoffperoxidabbau nachgewiesen. Die Proteine wurden in weiteren Untersuchungen durch Ammoniumsulfatfällungen konzentriert. 90% der CAT-Aktivität war in der 40 - 80%-Fraktion, die zur Aufnahme einer Temperaturkurve eingesetzt wurde (Kap. 3.3.1, Abb. 3.3).

Die Kurve zeigte zwei Temperaturoptima (0 und 60 °C), die nach VILTER (persönliche Mitteilung) auf zwei CAT schließen ließ (vgl. Kap. 4.1). Die Annahme wurde dadurch gestützt, daß beispielsweise auch *Dunaliella* zwei Temperaturoptima aufwies, die zu verschiedenen Phosphatasen gehörten (NIELL, persönliche Mitteilung). Andererseits war bislang keine Art innerhalb der Bacillariophyceae bekannt, die überhaupt CAT enthielt (GROSS, 1993). Daher war fraglich, ob der gemessene Wasserstoffperoxidabbau auf CAT zurückzuführen war, denn PX reagieren in der gleichen Weise. CAT und PX sind aufgrund unterschiedlicher apparenter Molekulargewichte leicht chromatographisch zu trennen (GROSS, persönliche Mitteilung).

Eine Größenauslußchromatographie (Sephadex G-100, 80 * 1.6 cm) wurde mit einer 40 - 80%-Ammoniumsulfatfällung durchgeführt und ergab ein Molekulargewicht von größer als 100 kDa (SCHRIEK, unveröffentlicht). Das wasserstoffperoxidabbauende Enzym war dennoch eine CAT.

Schließlich wurde noch geprüft, ob die gemessene CAT-Aktivität tatsächlich aus den *E. kufferathii*-Zellen stammte und nicht auf epiphytisch wachsende Bakterien zurückzuführen war. Dazu wurden Bakterien- und *E. kufferathii*-Extrakte und die konzentrierten Fraktionen beider Extrakte (0 - 40- und 40 - 80%-Ammoniumsulfatfällungen) gelelektrophoretisch getrennt und nach Aktivitätsfärbung verglichen, mit dem Ergebnis zweier CAT unterschiedlicher Molekulargewichte: eine CAT aus *E. kufferathii* und eine Bakterien-CAT (Kap. 3.5).

Die CAT-Bak fehlte in den 0 - 40%-Ammoniumsulfatfällungen (*E. kufferathii*-Zellen und Bakterien). Der Schluß lag nahe, daß die CAT-Bak weniger hydrophob als die CAT aus *E. kufferathii* ist, so daß die CAT-Bak bei 0 - 40% Ammoniumsulfat nicht selektiv gefällt werden konnte.

Die CAT aus *E. kufferathii* ist damit die erste CAT, die in der Abteilung der Heterokontophyta in der Klasse der Bacillariophyceae gelelektrophoretisch nachgewiesen wurde.

Catalase in Algen

CAT wurde in verschiedenen Algenabteilungen nachgewiesen, Zusammenstellung in Tabelle 4.5. Bisher konnte lediglich in den Chrypto- und Euglenophyta keine CAT-Aktivität nachgewiesen werden, Chlorarachniophyta wurden noch nicht untersucht.

Tab. 4.5: CAT-Untersuchungen an Algen, Abteilung und Klasse nach VAN DEN HOEK und Mitarbeitern (1995), n = Klassennummer;

Abteilung	n	Klasse	Referenz
Glaucophyta	1	Glaucophyceae	BETSCHKE <i>et al.</i> , 1992
Rhodophyta	1	Bangiophyceae	MIURA <i>et al.</i> , 1978
			STABENAU, 1992A
			NAKANO <i>et al.</i> , 1995
	2	Florideophyceae	
Heterokontophyta	1	Chrysophyceae	LUI <i>et al.</i> , 1968
			SUZUKI <i>et al.</i> , 1991
			GROSS, 1993
	2	Parmophyceae	
	3	Sarcinochrysidophyceae	
	4	Xanthophyceae	GROSS <i>et al.</i> , 1985
			BACKESHOF und STABENAU, 1990
			STABENAU, 1992C
			STABENAU, 1992D
			GROSS, 1993
	5	Eustigmatophyceae	STABENAU, 1992D
	6	Bacillariophyceae	HAZZARD, 1992
			SCHRIEK und KIRST, 1996, EPC 1
			HAZZARD <i>et al.</i> , 1997
			SCHRIEK und KIRST, 1998
			keine CAT nachgewiesen:
			PAUL <i>et al.</i> , 1975
			GROSS <i>et al.</i> , 1985
			SUZUKI <i>et al.</i> , 1991
			STABENAU, 1992B
			WINKLER und STABENAU, 1995
	7	Raphidophyceae	
	8	Dictyochophyceae	
	9	Phaeophyceae	STABENAU, 1992C
			STABENAU, 1992D
			in GROSS, 1993
	10	Oomycetes	
Haptophyta	1	Haptophyceae	SUZUKI <i>et al.</i> , 1991
Chryptophyta	1	Chryptophyceae	keine CAT nachgewiesen
			in GROSS, 1993

Dinophyta	1	Dinophyceae	MATTA und TRENCH, 1991
			BUTOW <i>et al.</i> , 1994
			MATTA, 1995
			BUTOW <i>et al.</i> , 1997A
Euglenophyta	1	Euglenophyceae	keine CAT nachgewiesen
			YOKOTA, 1992
			in GROSS, 1993
Chlorarachniophyta	1	Chlorarachniophyceae	
Chlorophyta	1	Prasinophyceae	keine CAT nachgewiesen
			STABENAU <i>et al.</i> , 1989
			STABENAU, 1992C
			in GROSS, 1993
	2	Chlorophyceae	STABENAU und BEEVERS, 1974
			STABENAU, 1974
			HORNUNG <i>et al.</i> , 1977
			STABENAU und SÄFTEL, 1981
			STABENAU <i>et al.</i> , 1984
			TAKEDA <i>et al.</i> , 1992
			GROSS, 1993
			HOSETTI <i>et al.</i> , 1993
			SHAISH <i>et al.</i> , 1993
			STABENAU <i>et al.</i> , 1993
			TAKEDA <i>et al.</i> , 1993B
			BAKARDJIEVA <i>et al.</i> , 1994
			MALANGA und PUNTARULO, 1995
			KATO <i>et al.</i> , 1997
			TAKEDA <i>et al.</i> , 1997
	3	Ulvophyceae	STABENAU, 1992E
			COLLEN und PEDERSEN, 1996
	4	Chladophorophyceae	
	5	Bryopsidophyceae	
	6	Dasycladophyceae	
	7	Trentepohliophyceae	
	8	Pleurastrorphyceae	STABENAU, 1984
	9	Klebsormidiophyceae	
	10	Zygnematophyceae	STABENAU, 1976
			STABENAU und SÄFTEL, 1981
			STABENAU <i>et al.</i> , 1984
			STABENAU, 1984
	11	Charophyceae	STABENAU <i>et al.</i> , 1984
			STABENAU, 1992E
			STABENAU, 1992C

Catalase in Heterokontophyta

Die Abteilung der Heterokontophyta ist in zehn Klassen unterteilt (VAN DEN HOEK *et al.*, 1995). In allen auf Catalase untersuchten Klassen (Chryso-phyceae, Xanthophyceae, Eustigmatophyceae, Bacillariophyceae und Phaeo-phyceae) wurde CAT nachgewiesen. Parmophyceae, Sarcinochrysidophyceae, Raphidophyceae, Dictyochophyceae und Oomycetes wurden bislang nicht auf Catalase untersucht.

Catalase in Bacillariophyceae

PAUL und Mitarbeiter (1975) berichteten erstmals von Untersuchungen an den Bacillariophyceae *Cylindrotheca fusiformis* und *Nitzschia alba*, in denen keine CAT nachweisbar war. Das wurde mit *Achnanthes minutissima* und *Coscinodiscus* bestätigt (APX wurde nachgewiesen) (SUZUKI *et al.*, 1991). Weitere Untersuchungen von STABENAU (1992B; 1992C) ergaben, daß in Bacillariophyceae offenbar keine CAT nachweisbar war. *Nitzschia laevis* und *Thalassiosira fluvialis* enthielten ebenfalls keine CAT (WINKLER und STABENAU, 1995).

Tab. 4.6: Bacillariophyceae, die auf CAT untersucht wurden, Chl = Chloroplasten, Ext = Extrakt, Mit = Mitochondrien, Per = Peroxisomen, Ves = Vesikel, n = nein;

Alge	Organell	CAT	Referenz
<i>Cylindrotheca fusiformis</i>	Chl	n	PAUL <i>et al.</i> , 1975
	Mit	n	
	Ves	n	
	Per	n	
<i>Nitzschia alba</i>	Mit	n	PAUL <i>et al.</i> , 1975
	Ves	n	
	Per	n	
<i>Achnanthes minutissima</i>		n	SUZUKI <i>et al.</i> , 1991
<i>Coscinodiscus</i>		n	SUZUKI <i>et al.</i> , 1991
<i>Chaetoceros gracilis</i>	Ext	ja	HAZZARD, 1992
<i>Fragilaria</i>	Per	n	STABENAU, 1992B
<i>Thalassiosira sp.</i>		n	STABENAU, 1992C
<i>Nitzschia laevis</i>	Per	n	WINKLER und STABENAU, 1995
<i>Thalassiosira fluvialis</i>	Per	n	WINKLER und STABENAU, 1995
<i>Entomoneis kufferathii</i>	Ext	ja	SCHRIEK und KIRST, 1996, EPC 1
<i>Chaetoceros gracilis</i>	Ext	ja	HAZZARD <i>et al.</i> , 1997
<i>Chaetoceros sp.</i>	Ext	ja	SCHRIEK und KIRST, 1998

CAT-Aktivität in Bacillariophyceae wurde vermutlich erstmals von HAZZARD (1992) aus *Chaetoceros gracilis* gemessen. Die in der vorliegenden Arbeit untersuchte *E. kufferathii* ist damit die zweite Bacillariophyceae, in der CAT-Aktivität gemessen und die erste aus der CAT gelelektrophoretisch nachgewiesen wurde. CAT-Aktivität aus *Chaetoceros gracilis* wurde in Streßversuchen gemessen (HAZZARD *et al.*, 1997). Mit der in der vorliegenden Arbeit untersuchten *Chaetoceros* sp., eine weitere Bacillariophyceae, konnte CAT ebenfalls gelelektrophoretisch nachgewiesen werden.

In Tabelle 4.6 sind die Ergebnisse der Tests auf CAT bei Bacillariophyceae zusammengestellt.

Peroxisomen

Peroxisomen sind Organelle mit strukturellen Merkmalen von Microbodies. Microbodies enthalten Enzyme, eine einfache Membran und eine fein granuliert Matrix von geringer oder hoher Dichte, die manchmal amorphe oder parakristalline Einschlüsse enthält. Der Name Microbody deutet keine bestimmte Funktion an. Elektronenmikroskopische Untersuchungen an Pflanzen belegten das weitverbreitete Vorkommen von Microbodies in höheren Pflanzen, Farnen, Moosen und auch Algen. Microbodies höherer Pflanzen (variabler Enzymgehalt) wurden häufig isoliert, biochemisch charakterisiert und werden als unspezifische Peroxisomen, Glyoxysomen und Blattperoxisomen unterschieden. Wurzelknöllchenperoxisomen (nur bei Leguminosen) werden als vierter Typ angesehen.

DE DUVE (1969) prägte den Begriff Peroxisom, weil er annahm, daß alle Microbodies mindestens eine Wasserstoffperoxid produzierende Oxidase und eine abbauende CAT besitzen.

Peroxisomen in Algen

Auch Algen enthalten Peroxisomen. Die Algen-Microbodies wurden seltener isoliert und biochemisch charakterisiert als die höherer Pflanzen. Abgesehen von der mitochondrialen CAT3 aus Mais (SCANDALIOS *et al.*, 1980) und der in *Chlamydomonas reinhardtii* (KATO *et al.*, 1997) entdeckten CAT sind Pflanzencatalasen in Microbodies lokalisiert. SCANDALIOS (1994) vermutete, daß CAT auch cytosolisch vorkommt. Einige Algen haben keine CAT und damit vermutlich auch keine Peroxisomen.

Peroxisomen in Bacillariophyceae

Das Vorkommen von Peroxisomen in Bacillariophyceae war lange unsicher, weil weder charakteristische peroxisomale Strukturen noch CAT gefunden wurde (PAUL *et al.*, 1975). Peroxisomen aus Bacillariophyceae wurden 1992 erstmals elektronenmikroskopisch nachgewiesen (STABENAU, 1992B).

Der Begriff Peroxisom wurde erweitert, weil auch Algen gefunden wurden, die Microbodies enthielten, CAT dennoch nicht nachweisbar war (WINKLER und STABENAU, 1995).

4.3 Wasserstoffperoxidentgiftung in *E. kufferathii*

Sauerstoff ist für aerobe Organismen lebensnotwendig, andererseits sind reaktive Sauerstoffverbindungen lebensbedrohlich. Aerobier verfügen daher über enzymatische (CAT, PX, APX, GPX, GR und / oder SOD) und nicht-enzymatische Verteidigungsmechanismen gegen oxidativen Streß.

ZEPP und Mitarbeiter (1986) zeigten, daß Grünalgen und Cyanobakterien Wasserstoffperoxid bildeten und auch extern zugegebenes Wasserstoffperoxid abbauen konnten. Verschiedene marine Organismen produzieren auch extrazellulär Wasserstoffperoxid (STEVENS *et al.*, 1973). SCHRECK und Mitarbeiter (1996) nahmen an, daß die Wasserstoffperoxidbildung die erste Reaktion auf Streß sein kann. Wasserstoffperoxid wird schnell gebildet, kann durch biologische Membranen diffundieren (APOSTOL *et al.*, 1989) und weist bakterizide Effekte auf (APOSTOL *et al.*, 1989; JUVEN und PIERSON, 1997).

Bakterien können das Wachstum von Mikroalgen stimulieren oder auch hemmen (FUKAMI *et al.*, 1997). Die Bildung reaktiver Sauerstoffverbindungen wird in Pflanzen / Bakterien-Wechselwirkungen als symbiotisch (BUFFARD *et al.*, 1996), pathogen (MEHDY, 1994; BAKER und ORLANDI, 1995), saprophytisch oder kommensalistisch eingeordnet (in BAKER *et al.*, 1998). Untersuchungen zeigen, daß Bakterien entscheidend an der Wasserstoffperoxidentgiftung beteiligt sind, was bei Pflanzen / Bakterien-Wechselwirkungen oft übersehen wird. Bakterielle CAT spielt eine entscheidende Rolle bei der Entgiftung hoher H₂O₂-Konzentrationen (BAKER *et al.*, 1998).

Die antarktische Eisdiatomee *E. kufferathii* ist ein Beispiel für eine Pflanzen / Bakterien-Wechselwirkung, denn in Kultur wurden auch epiphytische Bakterien gefunden. Der Nachweis epiphytischer Bakterien erfolgte licht- und fluoreszenzmikroskopisch nach Anfärbung mit Acridin Orange. CAT wurde in *E. kufferathii* und Epibakterien nachgewiesen (vgl. Kap. 4.2).

4.3.1 *E. kufferathii* und Epibakterien

E. kufferathii ist ein Organismus der Boden- und Untereisgesellschaften des antarktischen Meereises (HORNER *et al.*, 1992). Zelldichten bis zu $3 \cdot 10^5$ Zellen $\cdot \text{mL}^{-1}$ wurden in den vertikal ausgerichteten Laugenkanälen des Säuleneises gemessen (McCONVILLE und WETHERBEE, 1983). Im freien Wasser ist *E. kufferathii* nur sehr selten anzutreffen (GARRISON *et al.*, 1993). *E. kufferathii* ist im Jahresgang in der Regel geringen Temperatur- und Salinitätsschwankungen ausgesetzt. Das Lichtangebot dagegen verändert sich im Jahresgang erheblich (PALMISANO *et al.*, 1985).

Nach McGRATH GROSSI und Mitarbeitern (1984) besteht eine enge Beziehung zwischen epiphytischen Bakterien und *E. kufferathii* im Meereis, was auch innerhalb der SIMCO gilt (GARRISON *et al.*, 1986).

SULLIVAN und PALMISANO (1984) wiesen eine reichliche und verschiedenartige Bakteriengemeinschaft in den Salzkanälen einjährigen Eises und an der Eis-Wasser-Grenze der Eisunterseite am McMurdo Sound nach. 93% der bakteriellen Biomasse wurde in den unteren 20 cm des Eises gefunden. 30% davon lebten angeheftet an Algen oder Detritus. Obwohl die Zellzahlen der Gattung *Entomoneis* nur 13% ausmachten, waren 54% der Epibakterien an der Eis-Wasser-Grenze an *Entomoneis* angeheftet (Eiskerne: 19%). Dennoch waren die *Entomoneis*-Zellen gesund, das Cytoplasma mit Acridin Orange gefärbter Zellen fluoreszierte, subzelluläre Organellen und Membranen waren intakt. SULLIVAN und PALMISANO (1984) diskutierten, ob *Entomoneis*-Zellen Photosyntheseprodukte an die Epibakterien abgeben oder sie antibakterielle wachstumshemmende Stoffe produzieren. Es ist anzunehmen, daß *Entomoneis*-Zellen keine antibakteriellen Stoffe produzieren, weil die epiphytischen Bakterien *Entomoneis kufferathii* MANGUIN bevorzugten (McGRATH GROSSI *et al.*, 1984). Wachstumsraten zeigten, daß die Eisdiatomeen das bakterielle Wachstum stimulierten (Wachstumsrate auf *Entomoneis* 50% höher als die durchschnittliche Wachstumsrate epiphytisch wachsender Bakterien).

Die Zahl epiphytischer Bakterien pro *Entomoneis*-Zelle verdoppelte sich während des exponentiellen Algenwachstums, was eine kommensalistische Beziehung, vielleicht sogar eine symbiotische Beziehung nahe legt. McGRATH GROSSI und Mitarbeiter (1984) nahmen an, daß *Entomoneis* die Epibakterien mit organischen Verbindungen (extrazelluläre polymere Substanzen und / oder Photosyntheseprodukte), die Epibakterien *Entomoneis* mit anorganischen Nährstoffen und / oder Vitaminen versorgen. McGRATH GROSSI und Mitarbeiter (1984) stellten fest, daß die durchschnittliche Zahl epiphytischer Bakterien pro

Algenzelle vom Frühlingsbeginn des Südwinters im Oktober bis zum Ende des Südsommers von 10 ± 1 auf 134 ± 31 stieg. Im April (Herbst des Südwinters) lag die Zahl epiphytischer Bakterien bei 167 ± 30 . Neben dem bislang vermuteten Austausch zwischen *E. kufferathii* und Epibakterien könnten die epiphytischen Bakterien einen entscheidenden Beitrag in der Wasserstoffperoxidentgiftung leisten.

4.3.2 Temperatureinfluß auf die Wasserstoffperoxidentgiftung

Temperaturänderungen führen in der Regel zu erhöhten Superoxidanionenkonzentrationen, die bei Tieftemperaturstreß besonders in den Mitochondrien gebildet werden. Höhere Pflanzen und Algen entgiften Superoxidanionen durch SOD zu membrangängigem Wasserstoffperoxid, das meistens durch APX abgebaut wird. Temperaturstreß ist daher mit erhöhten SOD- und APX-Aktivitäten verbunden. APX wurde in *E. kufferathii* nicht nachgewiesen. Weitere Wasserstoffperoxid abbauende Enzyme sind CAT, PX und GPX, wovon CAT und GPX in den *E. kufferathii*-Zellen vorkommen. Die CAT-Aktivitäten waren bei den mit -4 und 4 °C kultivierten Zellen bei allen Bestrahlungsstärken höher als bei 0 °C (Abb. 3.21). Die GPX-Aktivitäten nahmen bei konstanter Bestrahlungsstärke mit steigender Temperatur ab (Abb. 3.22). Neben der intrazellulären Wasserstoffperoxidentgiftung durch *E. kufferathii* spielen die extrazellulären CAT-haltigen Bakterien sicher auch eine Rolle bei der Entgiftung. Die höchste bakterielle CAT-Aktivität wurde bei allen Temperaturen nach 2 Tagen festgestellt (Abb. 3.21).

Der aus den Ergebnissen abgeleitete Temperatureinfluß auf das Leben der SIMCO im Salzlaugenkanal ist in Abbildung 4.1 zusammengefaßt: Epiphytische Bakterien auf *E. kufferathii*-Zellen, frei lebende Bakterien, gelöstes organisches Material und Wasserstoffperoxid befinden sich in der Salzlake (links).

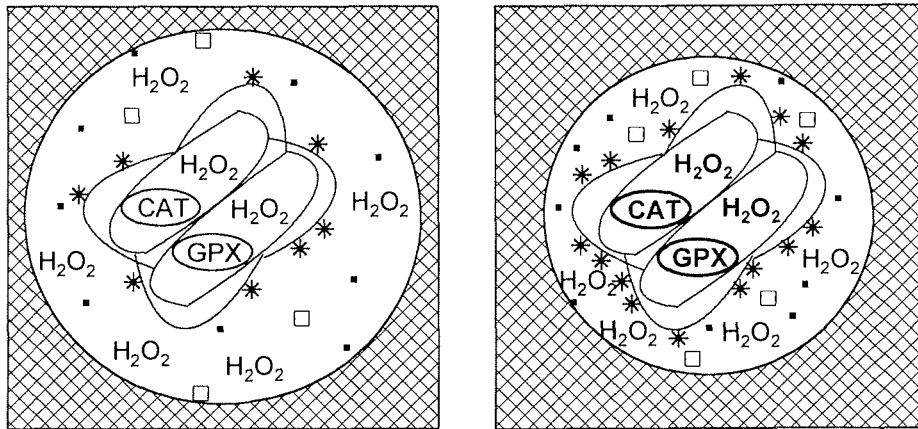



Abb. 4.1: Temperatureinfluß auf das Leben der SIMCO im Eiskanal,
links: höhere, rechts: niedrigere Temperatur;
⊗ = Meereis,  = *E. kufferathii*, H_2O_2 = Wasserstoffperoxid, □ = gelöstes
organisches Material, * = epiphytische Bakterien, ■ = frei lebende Bakterien;

Andererseits nimmt bei tiefen Temperaturen auch die intrazelluläre Wasserstoffperoxidbildung in den Kompartimenten zu. *E. kufferathii* reagiert darauf mit Aktivitätserhöhung der kompartimentierten Oxidationsschutzenzyme (CAT und GPX), die CAT-Aktivität der epiphytischen Bakterien ist ebenfalls erhöht. Die Eisdiatomee schafft sich so einen wasserstoffperoxidfreien Mikrokosmos. Die bakterielle CAT entgiftet das intrazellulär gebildete Wasserstoffperoxid, das vermutlich entlang des Konzentrationsgradienten von innen und außen diffundiert.

4.3.3 Lichteinfluß auf die Wasserstoffperoxidentgiftung

PX und APX wurden in *E. kufferathii* nicht nachgewiesen, während wie oben gezeigt CAT und GPX vorhanden sind. Höchste CAT-Aktivitäten wurden bei den 90- μmol - und 150- μmol -Ansätzen gemessen (Abb. 3.21). Die GPX-Aktivitäten ($-4\text{ }^{\circ}\text{C}$) nahmen mit dem Lichtangebot zu (30- bis 150- μmol -Ansatz) (Abb. 3.24). Die CAT-Bak zeigte nach 2 Tagen höchste Aktivitäten. Die Aktivitäten nahmen mit der Zeit ab und nach 8 Tagen konnte CAT-Bak lediglich in den 150- μmol -Ansätzen gemessen werden ($-4\text{ }^{\circ}\text{C}$ und $4\text{ }^{\circ}\text{C}$).

Der mögliche Einfluß des Lichts auf die SIMCO im Salzlaugenkanal ist in Abbildung 4.2 links wiedergegeben: Epiphytische Bakterien auf *E. kufferathii*-Zellen, frei lebende Bakterien, gelöstes organisches Material und Wasserstoffperoxid befinden sich in der Salzlauge.

In Abbildung 4.2 rechts ist das Leben der SIMCO im Salzlaugenkanal bei erhöhten Bestrahlungsstärken (90 und 150 $\mu\text{mol Photonen} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) dargestellt, bei denen die intra- und auch extrazelluläre Wasserstoffperoxidkonzentration erhöht ist.

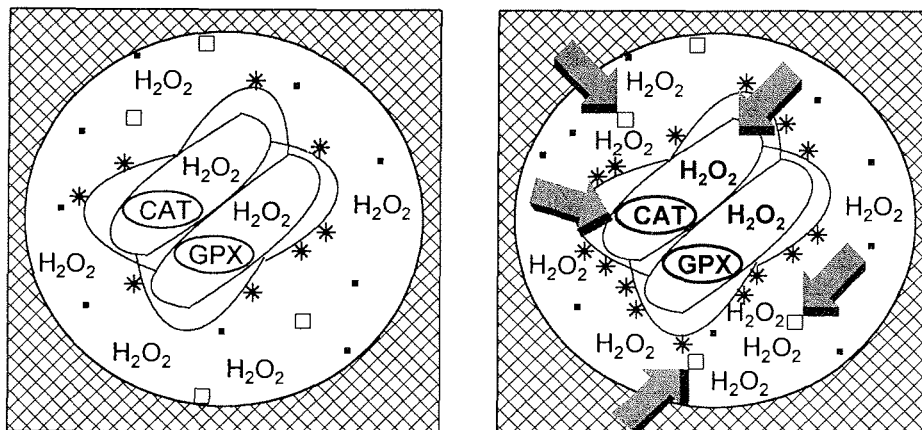


Abb. 4.2: Lichteinfluß auf das Leben der SIMCO im Eiskanal,
 ☒ = Meereis, = *E. kufferathii*, = erhöhte Bestrahlungsstärke,
 H_2O_2 = Wasserstoffperoxid, = gelöstes organisches Material,
 * = epiphytische Bakterien, = frei lebende Bakterien;

Die Erhöhung der extrazellulären Wasserstoffperoxidkonzentration ist dabei auf photochemisch gebildete Superoxidanionen zurückzuführen, die im Wasser zu Wasserstoffperoxid dismutieren (COOPER und ZIKA, 1983; PETASNE und ZIKA, 1987) und auch Konzentrationen im μM -Bereich annehmen können (in Tidewasserpflützen des Wattenmeers: 4 bis 10 μM Wasserstoffperoxid; ABELE, persönliche Mitteilung). Neben dem bereits beschriebenen Temperatureinfluß (Kap. 4.3.2) bewirken auch die erhöhten Wasserstoffperoxidkonzentrationen in den *E. kufferathii*-Zellen eine Aktivitätssteigerung der kompartimentierten Oxidationsschutzenzyme (CAT und GPX). Die Bildung epiphytischer Bakterien könnte ebenfalls zunehmen. Der epiphytische Bakterienfilm wirkt wie ein wasserstoffperoxidfreier Mikrokosmos und ermöglicht die Entgiftung des Wasserstoffperoxids entlang des Konzentrationsgradienten.

Zusammenfassung: *E. kufferathii* reagiert auf unterschiedlichen Streß durch Aktivitätserhöhung der kompartimentierten Oxidationsschutzenzyme (CAT und GPX). Streß steigert ebenfalls die CAT-Aktivität der epiphytischen Bakterien. Die Eisdiatomee profitiert von den Bakterien, die einen wasserstoffperoxidfreien Mikrokosmos erzeugen und die diffusionskontrollierte Wasserstoffperoxid-entgiftung begünstigen. Die Algen / Bakterien-Gesellschaft ist vermutlich kommensalistisch.

4.4 Physiologische Untersuchungen

4.4.1 Temperatureinfluß auf die Oxidationsschutzenzyme in *E. kufferathii*

Temperatureinflüsse (tiefe Temperaturen, Kälteakklimatisation, Frost) sind besonders auf die Oxidationsschutzenzyme in Kulturpflanzen beschrieben (vgl. Kap. 1.2). Die Ergebnisse sind von Pflanze zu Pflanze unterschiedlich und stark von den Untersuchungsbedingungen abhängig.

Catalase, Peroxidase, Glutathion Peroxidase und Ascorbat Peroxidase

Temperaturänderungen sind meistens mit erhöhten Superoxidanionen-konzentrationen verbunden, die in höheren Pflanzen und auch Algen durch SOD zu Wasserstoffperoxid reagieren und oftmals durch APX abgebaut werden (MISHRA *et al.*, 1993; MISHRA *et al.*, 1995; RAO *et al.*, 1996). *E. kufferathii* enthielt keine APX-Aktivität. CAT-Aktivität dagegen wurde an den 0 °C akklimatisierten *Entomoneis*-Zellen nachgewiesen, die mit erhöhten Aktivitäten auf erniedrigte (-4 °C) und erhöhte (4 °C) Temperaturen reagierten (Abb. 3.21). CAT-Aktivitäten sind in der Regel bei tiefen Temperaturen erniedrigt (SARUYAMA und TANIDA, 1995; FADZILLAH *et al.*, 1996; O'KANE *et al.*, 1996). Die CAT-Erhöhung bei tiefer Temperatur in *E. kufferathii* war eine Kältestreßantwort, die nahezu unabhängig von der gewählten Bestrahlungsstärke war. Die höchsten Aktivitäten im 4 °C-Ansatz hatten die 90 und 150 µmol Photonen * m⁻² * s⁻¹ ausgesetzten Algen. Erhöhte Temperaturen sind meistens mit gesteigerten CAT-Aktivitäten verbunden, die allerdings auch auf temperaturbedingte Aktivitätserhöhungen im Sinne der Q₁₀-Regel zurückgehen können und von einer enzymatischen Streßantwort schwierig zu unterscheiden sind. Zusammenfassend läßt sich feststellen: Die *E. kufferathii*-CAT war an tiefe Temperaturen (0 °C) angepaßt, reagierte auf weitere Temperaturerniedrigung im Gegensatz zu vielen anderen Organismen durch Aktivitätserhöhung und war als temperaturresistent einzustufen.

Temperatureinflüsse auf GPX sind bislang nicht beschrieben und wurden erstmals an *E. kufferathii* untersucht. Die höchsten GPX-Aktivitäten wurden bei -4 °C, die niedrigsten bei 4 °C gemessen (Abb. 3.22). Die GPX-Aktivitäten nahmen im Gegensatz zur CAT mit steigender Temperatur ab (keine temperaturbedingte Aktivitätsänderung nach der Q₁₀-Regel). Die Reaktionen der *E. kufferathii*-GPX bei tiefen Temperaturen sind temperaturabhängige

Streßantworten. Darüber hinaus ist GPX der enzymatische Gegenspieler der GR und spielt vermutlich eine wichtigere Rolle im Ascorbat-Glutathion-Zyklus.

Glutathion Reduktase

GR reduziert in höheren Pflanzen und Algen GSSG zu GSH. Die GR-Aktivitäten in *E. kufferathii* nahmen ebenso wie die GPX-Aktivitäten für alle Bestrahlungsstärken mit steigender Temperatur ab. Die GR-Aktivitätsänderungen sind also nicht temperaturbedingt im Sinne der Q₁₀-Regel. Das belegt auch die GR-Temperaturkurve, weil die Umsatzraten des Enzyms bei tiefen Temperaturen erniedrigt waren. Die gesteigerten Aktivitäten könnten aber auf Neusynthese zurückzuführen sein, womit auch die von WANZEK (1994) gemessenen erhöhten Proteingehalte bei tiefen Temperaturen erklärt werden könnten. Die GR-Aktivitätsabnahmen mit steigenden Temperaturen von bis zu 106% (im 6- μ mol-Ansatz) stützen die Annahme einer *de novo*-GR-Synthese. Die Belastung durch oxidativen Streß ist bei tiefen Temperaturen höher. WANZEK (1994) bestimmte das Wachstumsoptimum und die minimalen Proteinkonzentrationen für *E. kufferathii* bei 4 °C, bei der auch der oxidative Streß am niedrigsten war.

4.4.2 Lichteinfluß auf die Oxidationsschutzenzyme in *E. kufferathii*

Der Einfluß von Licht (Stark-, Schwach- und UV-) wurde intensiv an Oxidationsschutzenzymen in höheren Pflanzen erforscht. Die Ergebnisse sind je nach Versuchsbedingungen von Organismus zu Organismus unterschiedlich und lassen sich für die Wasserstoffperoxid abbauenden Enzyme folgendermaßen zusammenfassen:

Die CAT-Aktivitäten höherer Pflanzen können unter Starklicht erhöht (MISHRA *et al.*, 1995) oder sogar zur Neusynthese führen (VOLK und FEIERABEND, 1989). Andererseits sind auch erniedrigte CAT-Aktivitäten beschrieben (CHANG und KAO, 1998). Dieser Effekt wird durch tiefe Temperaturen noch verstärkt (VOLK und FEIERABEND, 1989; MISHRA *et al.*, 1993). Die APX-Aktivität höherer Pflanzen ist in der Regel bei großen Lichtangebot erhöht (MISHRA *et al.*, 1993; MISHRA *et al.*, 1995; CHANG und KAO, 1998). Licht kann zu höheren PX-Aktivitäten (CHANG und KAO, 1998), UV-Licht sogar zur PX-Neusynthese führen (RAO *et al.*, 1996).

Catalase, Peroxidase, Glutathion Peroxidase und Ascorbat Peroxidase

Sauerstoffradikale werden besonders in der Elektronentransportkette der Chloroplasten unter Stark- und UV-Licht gebildet. Wie bereits beschrieben (Kap. 4.4.1) wurden von den Wasserstoffperoxid abbauenden Enzymen CAT und GPX in *E. kufferathii* gefunden. Höchste CAT-Aktivitäten wurden bei allen Temperaturen (-4, 0 und 4 °C) in den 90- μ mol- und 150- μ mol-Ansätzen gemessen. Die oftmals beschriebenen erniedrigten und photoinaktivierten CAT bei hohen Bestrahlungsstärken (besonders bei tiefen Temperaturen) konnten in *E. kufferathii* nicht bestätigt werden. Die Streßantwort der *E. kufferathii*-Zellen besteht bei großem Lichtangebot und konstanter Temperatur in erhöhten CAT-Aktivitäten.

Die GPX-Aktivitäten in *E. kufferathii* waren bei 0 und 4 °C mit Zunahme der Bestrahlungsstärke nahezu konstant (abgesehen vom 6- μ mol-Ansatz bei 4 °C: 25% niedrigere GPX-Aktivitäten; Abb. 3.24). Die niedrigen Aktivitäten untermauern, die Einstufung von *E. kufferathii* als Schwachlichtalge mit einer optimalen Wachstumstemperatur von 4 °C (WANZEK, 1994), da der oxidative Streß unter diesen Bedingungen klein war. Andererseits führten tiefe Temperaturen (-4 °C) verbunden mit Änderungen der Bestrahlungsstärke (gegenüber den bei 30 μ mol Photonen * m⁻² * s⁻¹ akklimatisierten *E. kufferathii*-Zellen) zu oxidativem Streß, der bei niedriger und höchster Bestrahlungsstärke besonders groß war.

Glutathion Reduktase

Die GR-Aktivitäten nahmen bei -4 °C in den 30- μ mol- bis 150- μ mol-*Entomoneis*-Ansätzen um 32% zu. Der 6- μ mol-Ansatz zeigte 18% höhere GR-Aktivitäten als der 30- μ mol-Ansatz. *E. kufferathii* verbrauchte bei -4 °C vermutlich hohe GSH-Konzentrationen. Die GSSG-Reduktion war entscheidend von der Bestrahlungsstärke abhängig. *E. kufferathii* gab eine lichtabhängige Antwort auf oxidativen Streß. Bei anderen Temperaturen (0 und 4 °C) war lichtabhängiger Einfluß auf die Aktivität der *Entomoneis*-GR festzustellen. Lediglich der 6- μ mol-Ansatz wies 40% niedrigere Enzymaktivität auf (Abb. 3.25). GR war an höhere Bestrahlungsstärken bei Temperaturen von 0 bis 4 °C angepaßt. Das könnte damit erklärt werden, daß die als Schwachlichtalge geltende *E. kufferathii* nur bei schmelzendem Eis höherem Lichtangebot ausgesetzt ist. Die GSSG-Reduktion wurde erst bei Temperaturen unter 0 °C und extremen Lichtbedingungen verstärkt durchgeführt. Vermutlich wurde die GSH- und / oder

die GR-Synthese aktiviert, weil ein für die Zelle erforderlicher GSH-Schwellenwert unterschritten war.

4.5 Vergleich der Oxidationsschutzenzyme aus *E. kufferathii* und *Chaetoceros* sp.

Haben antarktische Eisdiatomeen Oxidationsschutzenzyme?

E. kufferathii und *Chaetoceros* sp. haben die Oxidationsschutzenzyme CAT, GPX, GR und SOD. In *Chaetoceros* sp. wurden darüber hinaus geringe Aktivitäten von PX gefunden.

Unterscheiden sich die Oxidationsschutzenzyme aus Chaetoceros sp. und E. kufferathii?

Die zwischen den Eisdiatomeen festgestellten Unterschiede sind in Tabelle 4.7 zusammengefasst.

Tab. 4.7: Oxidationsschutzenzyme in *E. kufferathii* und *Chaetoceros* sp. kultiviert mit $30 \mu\text{mol Photonen} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ bei $0 \text{ }^\circ\text{C}$, Zahl in Klammern = Anzahl der Isoenzyme, Prozentzahl in Klammern = Aktivität in U/mg Protein, n = nein, \uparrow = Aktivität höher, \downarrow = Aktivität niedriger;

	<i>E. kufferathii</i>		<i>Chaetoceros</i> sp.	
CAT	ja (1)	\downarrow (23%)	ja (1)	
PX	n		ja	
APX	n		n	
GPX	ja	\downarrow (11%)	ja	
GR	ja (1)	\downarrow (12%)	ja (1)	
SOD gesamt	ja (13)	\uparrow (25%)	ja (5)	
Cu/Zn-SOD	n		n	
Mn-SOD	ja (2)		ja (5)	
Fe-SOD	ja (1)		n	
H₂O₂-Entgiftung	<i>E. kufferathii</i> und Epibakterien		<i>Chaetoceros</i> sp.	
	Licht	Dunkel	Licht	Dunkel
CAT	\uparrow	\downarrow	\downarrow	\uparrow
SOD	\uparrow	\downarrow	\downarrow	\uparrow
GR	\downarrow	\uparrow	\downarrow	\uparrow
GPX	\downarrow	\uparrow	\downarrow	\uparrow

Chaetoceros sp. wies höhere GPX- und GR-Aktivitäten als *E. kufferathii* auf. Vermutlich spielt GSH in *Chaetoceros* sp. als Reduktions- oder Antioxidationsmittel eine größere Rolle. Die Wasserstoffperoxidentgiftung in *E. kufferathii* erfolgte über intramolekulare CAT, die CAT epiphytischer Bakterien und GPX (vgl. Kap. 4.3). *Chaetoceros* sp.-Zellen entgiften Wasserstoffperoxid über CAT, GPX und evtl. über PX. *Chaetoceros* sp. enthielt lediglich Mn-SOD, *E. kufferathii* daneben auch eine Fe-SOD. 90% der Gesamt-SOD-Aktivität in *Chaetoceros* sp. wiesen die 42-kDa- und 33-kDa-SOD auf, den gleichen Prozentsatz machte in *E. kufferathii* das 46-kDa-Enzym aus (vgl. Kap. 3.1 und 3.2).

Unterscheidet sich der Oxidationsschutz in Eisdiatomeen von anderen Diatomeen, Heterokontophyta, Algen und höheren Pflanzen?

Der herausragende Unterschied im Vergleich zu anderen Diatomeen ist, daß in *E. kufferathii* und *Chaetoceros* sp. CAT nachgewiesen werden konnte. Das Vorkommen von CAT in Algen ist in Kapitel 4.2 beschrieben. Die CAT beider Eisdiatomeen haben niedrigere apparente Molekulargewichte (*Chaetoceros* sp.: 135 kDa, *E. kufferathii*: 160 kDa) als die meisten bislang beschriebenen CAT höherer Pflanzen (220 bis 270 kDa).

APX wurde in vielen höheren Pflanzen und Algen nachgewiesen (ASADA, 1992), In *E. kufferathii* und *Chaetoceros* sp. jedoch fehlte APX ebenso wie in Cyanobakterien, die Wasserstoffperoxid ebenfalls mit CAT intrazellulär entgiften (MIYAKE *et al.*, 1991).

E. kufferathii und *Chaetoceros* sp. enthielten GPX. GPX-Aktivität wurde in verschiedenen Mikroalgen nachgewiesen (OVERBAUGH und FALL, 1982; PRICE und HARRISON, 1988; MATTA, 1995). Das allgemeine Vorkommen von GPX in höheren Pflanzen ist immer noch nicht gesichert (HALLIWELL und GUTTERIDGE, 1989), obwohl das Enzym in einigen höheren Pflanzen (Spinat, Mais, Wasserlinse, Platane und Sojabohne) gefunden wurde (DROTAR *et al.*, 1985).

GR sind weit verbreitete Enzyme, die in Algen und höheren Pflanzen gefunden wurden. Die aus *E. kufferathii* und *Chaetoceros* sp. nachgewiesenen GR hatten vergleichbare apparente Molekulargewichte wie die GR aus *Euglena gracilis* (SHIGEOKA *et al.*, 1987).

SOD ist wie GR weit verbreitet und hat in der Regel apparente Molekulargewichte von 21.5 und 105 kDa. Die Fe-SOD aus *E. kufferathii* hatte lediglich ein apparentes Molekulargewicht von 8 kDa. Mn-SOD scheint in allen bisher untersuchten Pflanzenmitochondrien vorzukommen und wurde auch in *E. kufferathii* und *Chaetoceros* sp. gefunden. Die Zahl der Isoenzyme unter-

schiedlicher SOD variiert sehr von Pflanze zu Pflanze wie auch an *E. kufferathii* und *Chaetoceros* sp. festgestellt werden konnte. Eukaryotische Algen besitzen nur Fe- und / oder Mn-SOD (ASADA *et al.*, 1977). Das trifft auch für die SOD aus *E. kufferathii* und *Chaetoceros* sp. zu. Cu/Zn-SOD ist dagegen in höheren Pflanzen weit verbreitet, in Algen jedoch meistens nicht nachzuweisen (LUMSDEN und HALL, 1975; ASADA *et al.*, 1977; HENRY und HALL, 1977). Ausnahmen bilden verschiedene Grünalgen (HENRY und HALL, 1977) und Dinoflagellaten (MATTA *et al.*, 1992; ASANO *et al.*, 1996; BUTOW *et al.*, 1997B). Die Grünalgen *Scenedesmus obliquus* (REDMOND *et al.*, 1985) und *Chlamydomonas reinhardtii* enthalten wie *E. kufferathii* SOD mit verschiedenen prosthetischen Gruppen (SAKURAI *et al.*, 1993).

Ist der Oxidationsschutz der Eisdiatomeen an die Bedingungen des Lebensraums Antarktis angepaßt?

Der Oxidationsschutz in *Chaetoceros* sp. und *E. kufferathii* ist an den Lebensraum Antarktis angepaßt (vgl. Kap. 1.1 und 2.1). Beide Eisdiatomeen enthielten GSH, das die S-H-Gruppen der Proteine stabilisiert (ANDERSON *et al.*, 1990) und vor Kälteinaktivierung schützt (LEVITT, 1972). Kälteinaktivierung wird durch irreversible Veränderungen an inter- oder intramolekularen S-H-Gruppen zu S-S-Gruppen durch Dehydratation beim Gefrieren hervorgerufen (LEVITT, 1972). Darüber hinaus enthielten beide Eisdiatomeen Mn-SOD, die bei kälteresistent eingestuft Algen nachgewiesen wurde (CLARE *et al.*, 1984). *Chaetoceros* sp. besiedelt unterschiedliche Lebensräume und verfügt vermutlich über eine höhere Anpassungsfähigkeit als *E. kufferathii*. Die höheren GR- und GPX-Aktivitäten in *Chaetoceros* sp. gegenüber *E. kufferathii* (1) belegen, daß *Chaetoceros* sp. mehr GSH umsetzt. GSH ist am Schutz vor Kälteinaktivierung beteiligt. Damit könnte erklärt werden, warum *Chaetoceros* sp. im Gegensatz zu *E. kufferathii* auch tiefe Temperaturen von bis zu -7 °C überleben kann (BARTSCH, 1989). GSH wird verbraucht, um vor Kälteinaktivierung zu schützen. GSH wirkt als Antioxidationsmittel und stabilisiert durch S-S-Gruppen-Reduktion S-H-Gruppen der Proteine und ermöglicht *Chaetoceros* sp. ein Überleben bei tieferen Temperaturen in oberen Eisschichten. Darüber hinaus verfügt *Chaetoceros* sp. über höhere CAT-Aktivitäten als *E. kufferathii* (2). Die Kälteakklimatisierung von Maissämlingen führte zu ebenfalls zu höheren CAT-Aktivitäten (ANDERSON *et al.*, 1995). *Chaetoceros* sp. enthielt außerdem PX (3), die bevorzugt bei tiefen Temperaturen synthetisiert werden. Neun PX wurden bei der Kälteakklimatisierung an Maissämlingen induziert (ANDERSON *et al.*, 1995). Der Oxidationsschutz

beider Eisdiatomeen wird vermutlich besonders durch die tiefen Temperaturen in der Antarktis bestimmt. Beim Vergleich kälteresistenter und -sensitiver *Chlorella ellipsoidea* enthielt der sensitive Stamm fast nur Fe-SOD, der resistente fast nur Mn-SOD. Die kältesensitiven Algen erlitten unter Bestrahlung SOD-Aktivitätsverluste, während in den resistenten die SOD-Aktivität konstant blieb (CLARE *et al.*, 1984). *Chaetoceros* sp. hatte zwei Mn-SOD, *E. kufferathii* dagegen eine Mn-SOD mit besonders hoher Aktivität (4). In *Chaetoceros* sp. wurde keine Fe-SOD gefunden, ähnlich wie bei der kälteresistenten *Chlorella*.

Während *Chaetoceros* sp. eine eigene Enzymausstattung gegen den oxidativen Streß bei tiefen Temperaturen hat, kann *E. kufferathii* auch auf den Oxidationsschutz epiphytischer Bakterien zurückgreifen (5).

Unterscheiden sich die Aktivitäten der Oxidationsschutzenzyme in Chaetoceros sp. und E. kufferathii im Tagesgang?

Die Oxidationsschutzenzyme (SOD, CAT, GR und GPX) aus *Chaetoceros* sp. (150- μ mol-Ansatz) und *E. kufferathii* (30- μ mol- und 150- μ mol-Ansätze) wurden nach fünftägiger Akklimatisation bei einem Licht-Dunkel-Rhythmus von 12 zu 12 Stunden im Tagesgang untersucht.

CAT- und SOD-Untersuchungen wurden an verschiedenen Organismen über Tage, Wochen und auch Jahre, selten jedoch im Tagesgang durchgeführt. Die Oxidationsschutzenzyme der beiden Eisdiatomeen unterschieden sich im Tagesgang, denn *E. kufferathii* hatte im Licht höhere SOD- und CAT-Aktivitäten, *Chaetoceros* sp. dagegen in der Dunkelphase. Die GPX- und GR-Aktivitäten beider Eisdiatomeen waren in der Dunkelphase erhöht.

Die *E. kufferathii*-Ansätze hatten in den ersten sechs Stunden der Lichtphase höchste SOD-Aktivitäten (Abb. 3.16 unten), vermutlich weil die Superoxid-anionenkonzentration erhöht war. *E. kufferathii* entgiftete die erhöhten Wasserstoffperoxidkonzentrationen durch CAT, die in den ersten Stunden der Lichtphase ebenfalls höchste Aktivitäten zeigte (Abb. 3.14). Die höheren CAT-Aktivitäten des 150- μ mol-Ansatzes im Vergleich zum 30- μ mol-Ansatz können auf erhöhte Wasserstoffperoxidbildung durch SOD zurückzuführen sein.

Der *Chaetoceros*-Ansatz hatte höchste CAT-Aktivitäten nach neun und zwölf Stunden Dunkelphase (Abb. 3.15), die SOD-Isoenzyme des *Chaetoceros*-Ansatzes zeigten ebenfalls in der Dunkelphase höhere Aktivitäten (Abb. 3.16 oben). Stark- und UV-Licht sind in der Regel mit erhöhten Superoxid-anionenkonzentrationen verbunden, die in höheren Pflanzen und Algen durch SOD zu Wasserstoffperoxid dismutieren. Sauerstoffradikale werden dabei besonders in der Elektronentransportkette der Chloroplasten

gebildet. Die in der Dunkelphase erhöhte CAT-Aktivität könnte durch eine CAT-Hemmung im Licht oder Photolabilität verursacht sein. Andererseits erfolgt zunächst die Entgiftung der Superoxidanionen durch SOD und anschließend baut CAT Wasserstoffperoxid ab. SOD-Hemmungen im Licht wurden bislang nicht beschrieben.

Die GR- und GPX-Aktivitäten waren für beide Eisdiatomeen im Dunkeln durchschnittlich höher als im Licht (Abb. 3.17 bis 3.20). *E. kufferathii* zeigte darüber hinaus im 150- μ mol-Ansatz höhere GR- und GPX-Aktivitäten als im 30- μ mol-Ansatz. Die höheren Aktivitäten im 150- μ mol-Ansatz waren auf den Einfluß der Bestrahlungsstärke und vermutlich auf erhöhten GSH-Umsatz zurückzuführen. GSSG wurde erst gegen Ende der Lichtphase verstärkt reduziert und obwohl in den ersten Stunden der Dunkelphase vermutlich keine höheren GSH-Konzentrationen verbraucht wurden, blieb die Aktivität der GR erhöht. Untersuchungen zum Lichteinfluß auf *E. kufferathii* zeigten, daß tiefe Temperaturen bei niedrigen Bestrahlungsstärken (6 μ mol) zu besonders hohen GPX-Aktivitäten führten (vgl. Kap. 4.4). Die Aktivitäten der Eisdiatomeen waren die ersten 9 Stunden der Lichtphase nahezu konstant. Die zur S-S-Gruppen-Reduktion benötigte GSH-Konzentration ist im Tagesgang vermutlich ebenfalls konstant. Darüber hinaus liegt die entscheidende Rolle des GSH vermutlich bei der Kälteakklimatisation. Andererseits könnte die ersten 9 Stunden der Lichtphase vermehrt GSH verbraucht werden, weil im Licht größerer Bedarf an GSH als Antioxidationsmittel gegen reaktive Sauerstoffverbindungen besteht als in der Dunkelphase. Die intrazelluläre GSH-Konzentration könnte dadurch so erniedrigt sein, daß daraus eine GR-Synthese und / oder Aktivitätserhöhung resultiert. GSH könnte aber auch synthetisiert oder aus Speichersubstanzen freigesetzt werden. Der enzymatische Gegenspieler der GR, die GPX, hatte ebenfalls gegen Ende der Licht- und in den ersten 6 Stunden der Dunkelphase erhöhte Aktivitäten. Nach 6 Stunden Dunkelphase sanken die GR-Aktivitäten: Vermutlich waren GSH-Verbrauch und Synthese im Gleichgewicht und zusätzliche GSSG-Reduktion wurde zum Zellschutz nicht benötigt. Die niedrigeren GR- und GPX-Aktivitäten im *Chaetoceros* sp.-Ansatz (gegenüber dem 150- μ mol-*E. kufferathii*-Ansatz) zeigten die Vorteile von *Chaetoceros* sp. bei der Akklimation an 0 °C.

Circadiane Oszillation in antarktischen Eisdiatomeen?

Die meisten physiologischen und biochemischen Vorgänge folgen biologischen Oszillationen (ROENNEBERG *et al.*, 1998) mit Periodenlängen im Bereich von Sekunden bis zu Jahren. Circadiane (Periodenlänge: 20 bis 28 Stunden) und ultradiane (kürzer als circadian) Oszillationen kommen oft vor und werden von Licht, Salz, tiefen Temperaturen und / oder Nährstoffmangel beeinflusst.

Alpine Pflanzen wiesen unter *in vivo*-Bedingungen (Kältestreß bei hohen Bestrahlungsstärken) eine circadiane Rhythmik auf, die durch maximale GSH-Konzentrationen am Mittag (11 Uhr) und minimale in der Nacht (nur noch ein Drittel der maximalen Aktivität) gekennzeichnet war. Die Erhöhung der GSH-Konzentration konnte ab 21 Uhr beobachtet werden. Der GSH-Anstieg im Licht wurde auf verstärkte Synthese, reduzierenden Abbau und / oder GSH-Import aus Blättern zurückgeführt. In der Untersuchung wurde nicht geklärt, ob die Oszillationen temperatur- und / oder lichtabhängig waren. Tiefe Temperatur verbunden mit höheren Lichtintensitäten führte ebenfalls zu erhöhten Konzentrationen an Antioxidationsmitteln (WILDI und LÜTZ, 1996).

Der marine Dinoflagellat *Gonyaulax polyedra* zeigte eine circadiane SOD-Rhythmik. Die höchsten SOD-Aktivitäten wurden tagsüber gemessen. Dabei wurde nicht geklärt, ob die Aktivitätserhöhungen auf Synthese oder SOD-Inaktivierung in der Nacht zurückzuführen waren (ASANO, *et al.*, 1996; HOLLNAGEL *et al.*, 1996).

Die GR- und GPX-Aktivitäten zeigten bei *Chaetoceros* sp. und *E. kufferathii* unabhängig von der Bestrahlungsstärke nach 12 Stunden Licht und in den ersten 6 Stunden der Dunkelphase höchste Aktivitäten. Niedrigste Aktivitäten wurden dagegen in den ersten 6 Stunden der Lichtphase nachgewiesen. Licht erhöht in der Regel die Konzentration reaktiver Sauerstoffverbindungen. Das Antioxidationsmittel GSH wird dabei vermutlich verbraucht und könnte zu erhöhten GR-Aktivitäten führen. Die GR-Aktivitäten waren jedoch in den ersten 9 Stunden der Lichtphase nahezu konstant. Die beiden Eisdiatomeen nutzten GSH im Licht solange, bis sie durch Synthese gezwungen sind, GSH zu bilden. Eine Neusynthese von Enzymen nach der Streßwahrnehmung dauert eine gewisse Zeit und könnte die 9 Stunden erklären. Andererseits wird die GSH-Synthese in der Regel vom Verbrauch bestimmt. Die GR- und GPX-Aktivitäten wurden vermutlich nicht durch das Lichtangebot geregelt (vgl. Kap. 4.4.2). Die entscheidende Rolle spielt GSH bei der Kälteakklimatisation als Antioxidationsmittel und / oder bei der S-S-Gruppen-Reduktion (LEVITT, 1972). Die Temperatur jedoch wurde im Tagesgang konstant gehalten. Weitere Untersuchungen

der GR- und GPX-Aktivitäten im Tagesgang könnten klären, ob der Oxidationsschutz beider Eisalgen einer circadianen Rhythmik unterliegt.

Ist enzymatischer Oxidationsschutz an antarktischen Eisalgen induzierbar?

Der enzymatische Oxidationsschutz war an *E. kufferathii* induzierbar. In Kapitel 4.4 sind Temperatur- und Lichteinfluß auf die CAT, GPX und GR aus *E. kufferathii* beschrieben und können wie folgt zusammengefaßt werden:

Die Eisdiatomee hatte unter Akklimatisationsbedingungen (0 °C, 30 $\mu\text{mol Photonen} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) die niedrigsten, bei tiefen Temperaturen besonders hohe Aktivitäten. Schwach- (6 $\mu\text{mol Photonen} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) und auch Starklicht (90 und 150 $\mu\text{mol Photonen} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) führten zu höchsten Aktivitäten und Aktivitätsabnahmen mit steigender Temperatur.

Oxidationsschutz durch Antioxidationsmittel in antarktischen Eisdiatomeen?

Oxidationsschutz durch Antioxidationsmittel wurde bislang erst einmal an antarktischen Eisalgen untersucht. HEINEMANN (1998) zeigte, daß AsA und GSH am Oxidationsschutz in *E. kufferathii* beteiligt waren. Die Zahl der Verbindungen, denen antioxidative Eigenschaften zugeschrieben werden, steigt täglich. Polyole sind oftmals am Oxidationsschutz beteiligt, fehlen jedoch in *N. lecoincei* und *E. kufferathii* (WANZEK, 1994). Das akzessorische Pigment Fucoxanthin ist vermutlich ein schwaches Antioxidationsmittel (LE TUTOUR *et al.*, 1998) und könnte auch in *E. kufferathii* wirksam sein.

5 Literaturverzeichnis

- ACIERNO, R., MAFFIA, M., SICURO, P., FIAMMATA, L., ROLLO, M., RONZINI, L. und STORELLI, C. (1997) Lipid and fatty acid composition of intestinal mucosa of two Antarctic teleosts. *Comp.Biochem.Physiol.* 115, 303-307.
- AEBI, H.E. (1984) Catalase *in Vitro*. *Methods Enzymol.* 105, 121-126.
- AHMAD, S., BEILSTEIN, S.A. und PARDINI, R.S. (1989) Glutathione Peroxidase Activity in Insects: A Reassessment. *Arch.Insect Biochem. Physiol.* 12, 31-49.
- ALMEIDA, M., HUMANES, M., MELO, R., SILVA, J.A., DA SILVA, J.J.R.F., VILTER, H. und WEVER, R. (1998) *Saccorhiza polyschides* (Phaeophyceae; Phyllariaceae) a new source for vanadium-dependent haloperoxidases. *Phytochemistry* 48, 229-239.
- AMAKO, K., CHEN, G.-X. und ASADA, K. (1994) Separate Assays Specific for Ascorbate Peroxidase and Guaiacol Peroxidase and for the Chloroplastic and Cytosolic Isozymes of Ascorbate Peroxidase in Plants. *Plant Cell Physiol.* 35, 497-504.
- ANDERSON, J.V., HESS, J.L. und CHEVONE, B.I. (1990) Purification, Characterization, and Immunological Properties for Two Isoforms of Glutathione Reductase from Eastern White Pine Needles. *Plant Physiol.* 94, 1402-1409.
- ANDERSON, M.D., PRASAD, T.K. und STEWART, C.R. (1995) Changes in Isozyme Profiles of Catalase, Peroxidase, and Glutathione Reductase during Acclimation to Chilling in Mesocotyls of Maize Seedlings. *Plant Physiol.* 109, 1247-1257.
- APASHEVA, L.M. und KOMISSAROV, G.G. (1996) Effect of hydrogen peroxide on Plant Development. *Biol.Bull.* 23, 518-519.
- APOSTOL, I., HEINSTEIN, P.F. und LOW, P.S. (1989) Rapid stimulation of an oxidative burst during elicitation of cultured plant cells. *Plant Physiol.* 90, 109-116.
- ARAGNO, M. (1981) Responses of Microorganisms to Temperature. In: Lange, O.L., P.S. Nobel, C.B. Osmond und H. Ziegler (Hrsg.) *Physiological plant ecology*. Heidelberg, Springer-Verlag, 339-369.

- ARRON, G.P., HENRY, L., PALMER, J.M. und HALL, D.O. (1976) Superoxide dismutases in mitochondria from *Helianthus tuberosus* and *Neurospora crassa*. *Biochem.Soc.Trans.* 4, 618-620.
- ASADA, K. (1992) Ascorbate peroxidase - a hydrogen peroxide-scavenging enzyme in plants. *Physiol.Plant.* 85, 235-241.
- ASADA, K. (1994) Production and action of active oxygen species in photosynthetic tissues. In: Foyer, C.H. und P.M. Mullineaux (Hrsg.) *Causes of Photooxidative Stress and Amelioration of Defense Systems in Plants*. Boca Raton, CRC Press, 77-103.
- ASADA, K., KANEMATSU, S., OKADA, S. und HAYAKAWA, T. (1980) Phylogenetic distribution of three types of superoxide dismutase in organisms and in cell organelles. In: Bannister, J.V. und H.A.O. Hill (Hrsg.) *Chemical and Biochemical Aspects of Superoxide Dismutase*. New York, Elsevier-Verlag, 136-153.
- ASADA, K., KANEMATSU, S. und UCHIDA, K. (1977) Superoxide Dismutases in Photosynthetic Organisms: Absence of the Cuprozinc Enzyme in Eukaryotic Algae. *Arch.Biochem.Biophys.* 179, 243-256.
- ASADA, K., URANO, M. und TAKAHASHI, M. (1973) Subcellular Location of Superoxide Dismutase in Spinach Leaves and Preparation and Properties of Crystalline Spinach Superoxide Dismutase. *Eur.J.Biochem.* 36, 257-266.
- ASANO, C.S., OKAMOTO, O.K., HOLLNAGEL, H.C., STRINGHER, C.G., OLIVEIRA, M.C. und COLEPICOLO, P. (1996) The activity of superoxide dismutase oscillates in the marine dinoflagellate *Gonyaulax polyedra*. *Ciencia è Cultura* 48, 64-67.
- AUTORENKOLLEKTIV (1995) *Lexikon der Biochemie und Molekularbiologie*. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg.
- BACKESHOFF, K. und STABENAU, H. (1990) Peroxisomes in the Alga *Vaucheria* are Neither of the Leaf Peroxisomal Nor of the Glyoxysomal Type. *Bot.Acta* 103, 190-196.
- BAKARDJIEVA, N., CHRISTOVA, N. und CHRISTOV, K. (1994) Effect of calcium and zinc ions on the thermosensitivity of peroxidase, superoxide dismutase and catalase in *Scendesmus acutus* cells. *Dokladi na Bulgarskata Akademiya na Naukite* 47, 83-86.

- BAKER, C.J. und ORLANDI, E.W. (1995) Active oxygen in plant pathogenesis. *Annu.Rev.Phytopathol.* 33, 299-321.
- BAKER, C.J., ORLANDI, E.W. und ANDERSON, A.J. (1998) Oxygen metabolism in plant cell culture/bacteria interactions: role of bacterial concentration and H₂O₂-scavenging in survival under biological and artificial oxidative stress. *Physiol.Mol.Plant Pathol.* 51, 401-415.
- BANCI, L. (1997) Structural properties of peroxidases. *J.Biotechnol.* 53, 253-263.
- BARTSCH, A. (1989) Die Eisalgenflora des Weddellmeeres (Antarktis): Artenzusammensetzung und Biomasse sowie Ökophysiologie ausgewählter Arten. *Ber.Polarforsch.* 63, 1-110.
- BAUM, J.A. und SCANDALIOS, J.G. (1979) Developmental expression and intracellular localization of superoxide dismutases in maize. *Differentiation* 13, 133.
- BAUM, J.A. und SCANDALIOS, J.G. (1981) Isolation and Characterization of the Cytosolic and Mitochondrial Superoxide Dismutases of Maize. *Arch. Biochem.Biophys.* 209, 249-264.
- BEAUCHAMP, C. und FRIDOVICH, I. (1971) Superoxide Dismutase: Improved Assay and an Assay Applicable to Acrylamid Gels. *Anal.Biochem.* 44, 276-287.
- BERG, W.W., SPERRY, P.D., RAHN, K.A. und GLADNEY, E.S. (1983) Atmospheric Bromine in the Arctic. *J.Geophys.Res.* 88, 6719-6736.
- BETSCHKE, T., SCHALLER, D. und MELKONIAN, M. (1992) Identification and characterization of glycolate oxidase and related enzymes from the endocyanotic alga *Cyanophora paradoxa* and from pea leaves. *Plant Physiol.* 98, 887-893.
- BETZ, A. (1974) *Enzyme*. VCH, Weinheim.
- BIELAWSKI, W. und JOY, K.W. (1986) Properties of Glutathione Reductase from chloroplasts and Roots of Pea. *Phytochemistry* 25, 2261-2265.
- BISSON, M.A. und KIRST, G.O. (1996) Osmotic Acclimation and Turgor Pressure Regulation in Algae. *Naturwissenschaften* 82, 461-471.
- BOVERIS, A., SIES, H., MARTINO, E.E., DOCAMPO, R., TURRENS, J.F. und STOPPANI, A.O.M. (1980) Deficient metabolic utilization of hydrogen peroxide in *Trypanosoma cruzi*. *Biochem.J.* 188, 643-648.

- BOWLER, C., CAMP, W.V., MONTAGU, M.V. und INZE, D. (1994) Superoxide Dismutase in Plants. *Crit.Rev.Plant Sci.* 13, 199-218.
- BOWLER, C., VAN MONTAGU, M. und INZE, D. (1992) Superoxide Dismutase and Stress Tolerance. *Annu.Rev.Plant Physiol.Plant Mol.Biol.* 43, 83-116.
- BOYSEN-ENNEN, E. (1987) Zur Verbreitung des Meso- und Makrozooplanktons im Oberflächenwasser der Weddell See (Antarktis). *Ber.Polarforsch.* 35, 1-126.
- 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.
- BRIDGES, S.M. und SALIN, M.L. (1981) Distribution of iron-containing superoxide dismutase in vascular plants. *Plant Physiol.* 687, 275-278.
- BUNKELMANN, J.R. und TRELEASE, R.N. (1996) Ascorbate Peroxidase: A Prominent Membrane Protein in Oilseed Glyoxysomes. *Plant Physiol.* 110, 589-598.
- BUFFARD, D., ESNAULT, R. und KONDOROSI, A. (1996) Role of plant defence in alfalfa during symbiosis. *World J.Microbiol.Biotechnol.* 12, 175-188.
- BURKE, J.J. (1995) Enzyme adaptation to temperature. In: Davies, W.J. (Hrsg.) *Environment and Plant Metabolism*. Oxford, Bios Scientific Publishers, 63-78.
- BUTOW, B., WYNNE, D. und TEL-OR, E. (1994) Response of catalase activity to environmental stress in the freshwater dinoflagellate *Peridinium gatunense*. *J.Phycol.* 30, 17-22.
- BUTOW, B.J., WYNNE, D. und TEL-OR, E. (1997A) Antioxidative protection of *Peridinium gatunense* in Lake Kinneret: Seasonal and daily variation. *J.Phycol.* 33, 780-786.
- BUTOW, B.J., WYNNE, D. und TEL-OR, E. (1997B) Superoxide dismutase activity in *Peridinium gatunense* in Lake Kinneret: Effect of light regime and carbon dioxide concentration. *J.Phycol.* 33, 787-793.
- CADENAS, E. (1989) Biochemistry of oxygen toxicity. *Annu.Rev.Biochem.* 58, 79-110.
- CARMAGNOL, F., SINET, P.M. und JEROME, H. (1983) Selenium-dependent and nonselenium-dependent glutathione peroxidases in human tissue extracts. *Biochim.Biophys.Acta* 759, 49-57.

- CASTILLO, F.J., COTTON, G., KEVERS, C., GREPPIN, H., GASPAR, T. und DRIESCHE, T.V. (1986) Changes in ascorbic content and ascorbate peroxidase activity during the development of *Acetabularia mediterranea*. *Differentiation* 33, 17-23.
- CASTILLO, F.J., MILLER, P.R. und GREPPIN, H. (1987) Extracellular biochemical markers of photochemical oxidant air pollution damage to *Norway spruce*. *Experientia* 43, 111-115.
- CHANG, C.J. und KAO, C.H. (1998) H₂O₂ metabolism during senescence of rice leaves: changes in enzyme activities in light and darkness. *Plant Growth Regul.* 25, 11-15.
- CHARLES, S.A. und HALLIWELL, B. (1980) Effect of hydrogen peroxide on spinach (*Spinacia oleracea*) chloroplast bisphosphat bisphosphatase. *Biochem.J.* 189, 373-376.
- CHEN, G.-X. und ASADA, K. (1989) Ascorbate Peroxidase in Tea Leaves: Occurrence of Two Isozymes and the Differences in Their Enzymatic and Molecular Properties. *Plant Cell Physiol.* 30, 987-998.
- CHEN, H., ROMO-LEROUX, P.A. und SALIN, M.L. (1996) The iron-containing superoxide dismutase-encoding gene from *Chlamydomonas reinhardtii* obtained by direct and inverse PCR. *Gene* 168, 113-116.
- CHO, H.S., KIM, C.S. und JUNG, J. (1994) A Mechanistic Study on the Early Stage-Events Involved in Low Temperature Stress in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Agric.Chem.Biotechnol.* 37, 433-440.
- CLARE, D.A., RABINOWITCH, H.D. und FRIDOVICH, I. (1984) Superoxide Dismutase and Chilling Injury in *Chlorella ellipsoidea*. *Arch.Biochem.Biophys.* 231, 158-163.
- COLLEN, J., EKDAHL, A., ABRAHAMSSON, K. und PEDERSEN, M. (1994) The involvement of hydrogen peroxide in the production of volatile halogenated compounds by *Meristiella gelidium*. *Phytochemistry* 36, 1197-1202.
- COLLEN, J. und PEDERSEN, M. (1996) Production, scavenging and toxicity of hydrogen peroxide in the green seaweed *Ulva rigida*. *Eur.J.Phycol.* 31, 265-271.
- COOPER, W.J. und ZIKA, R.G. (1983) Photochemical Formation of Hydrogen Peroxide in Surface and Ground Waters Exposed to Sunlight. *Science* 220, 711-712.

- CREISSEN, G.P., EDWARDS, E.A. und MULLINEAUX, P.M. (1994) Glutathione reductase and ascorbate peroxidase. In: Foyer, C.H. und P.M. Mullineaux (Hrsg.) *Causes of Photooxidative Stress and Amelioration of Defense Systems in Plants*. Boca Raton, CRC Press, 343-364.
- DALTON, D.A., HANUS, F.J., RUSSELL, S.A. und EVANS, H.J. (1987) Purification, Properties, and Distribution of Ascorbate Peroxidase in Legume Root Nodules. *Plant Physiol.* 83, 789-794.
- DALY, K.L. und MACAULAY, M.C. (1988) Abundance and distribution of krill in the ice edge zone of the Weddell Sea, austral spring 1983. *Deep-Sea Res.* 35, 21-41.
- DAVISON, I.R. und PEARSON, G.A. (1996) Stress tolerance in intertidal seaweeds. *J. Phycol.* 32, 197-211.
- DE DUVE, C. (1969) Evolution of the peroxisome. *Ann.N.Y.Ac.Sci.* 168, 369-381.
- DEL RIO, L.A., LYON, D.S., OLAH, L., GLICK, B. und SALIN, M.L. (1983) Immunocytochemical evidence for peroxisomal localization of manganese superoxide dismutase in leaf protoplasts from a higher plant. *Planta* 158, 216-224.
- DEL RIO, L.A., SANDALIO, L.M., PALMA, J.M., BUENO, P. und CORPAS, F.J. (1992) Metabolism of oxygen radicals in peroxisomes and cellular implications. *Free Rad.Biol.Med.* 13, 557-580.
- DEMMIG-ADAMS, B. und ADAMS, W.W.I. (1992) Photoprotection and other responses of plants to high light stress. *Annu.Rev.Plant Physiol.Plant Mol.Biol.* 43, 599-626.
- DROTAR, A., PHELPS, P. und FALL, R. (1985) Evidence for glutathione peroxidase activities in cultured plant cells. *Plant Sci.* 42, 35-40.
- EICKEN, H., LANGE, M.A., HUBBERTEN, H.-W. und WADHAMS, P. (1994) Characteristics and distribution pattern of snow and meteoric ice in the Weddell Sea and their contribution to the mass balance of sea ice. *Ann.Geophys.* 12, 80-93.
- ELSTNER, E.F. (1990) *Der Sauerstoff*. Wissenschaftsverlag, Mannheim.
- FADZILLAH, N.M., GILL, V., FINCH, R.P. und BURDON, R.H. (1996) Chilling, oxidative stress and antioxidant responses in shoot cultures of rice. *Planta* 199, 552-556.

- FEIERABEND, J. und ENGEL, S. (1986) Photoinactivation of Catalase *in Vitro* and in Leaves. Arch.Biochem.Biophys. 251, 567-576.
- FEIERABEND, J., SCHAAN, C. und HERTWIG, B. (1992) Photoinactivation of Catalase Occurs under Both High- and Low-Temperature Stress Conditions and Accompanies Photoinhibition of Photosystem II. Plant Physiol. 100, 1554-1561.
- FLOHE, L., GÜNZLER, W.A., JUNG, G., SCHAICH, E. und SCHNEIDER, F. (1971) Glutathione Peroxidase. II. Substratspezifität und Hemmbarkeit durch Substratanaloga. Z.Physiol.Chem. 352, 159-169.
- FOSTER, J.G. und EDWARD, G.E. (1980) Localization of superoxide dismutase in leaves of C₃ and C₄ plants. Plant Cell Physiol. 21, 895-906.
- FOYER, C.H., DESCOURVIERES, P. und KUNERT, K.J. (1994A) Protection against oxygen radicals: an important defence mechanism studied in transgenic plants. Plant Cell Environ. 17, 507-523.
- FOYER, C.H. und HALLIWELL, B. (1976) The Presence of Glutathione and Glutathione Reductase in Chloroplasts: A Proposed Role in Ascorbic Acid Metabolism. Planta 133, 21-25.
- FOYER, C.H., LELANDAIS, M. und KUNERT, K.J. (1994B) Photooxidative stress in plants. Physiol.Plant. 92, 696-717.
- FOYER, C.H., LELANDAIS, M., GALAP, C. und KUNERT, K.J. (1991) Effects of Elevated Cytosolic Glutathione Reductase Activity on the Cellular Glutathione Pool and Photosynthesis in Leaves under Normal and Stress Conditions. Plant Physiol. 97, 863-872.
- FOYER, C.H., LOPEZ-DELGADO, H., DAT, J.F. und SCOTT, I.M. (1997) Hydrogen peroxide- and glutathione-associated mechanisms of acclimatory stress tolerance and signalling. Physiol.Plant. 100, 241-254.
- FOYER, C.H. und MULLINEAUX, P.M. (1994) *Causes of Photooxidative Stress and Amelioration of Defense Systems in Plants*. CRC Press, Boca Raton.
- FOYER, C.H., ROWELL, J. und WALKER, D. (1983) Measurement of ascorbate content of spinach leaf protoplasts and chloroplasts during illumination. Planta 157, 239-244.
- FRIDOVICH, I. (1975) Superoxide dismutases. Annu.Rev.Biochem. 44, 147-159.

- FRYER, M.J., ANDREWS, J.R., OXBOROUGH, K., BLOWERS, D.A. und BAKER, N.R. (1998) Relationship between CO₂ Assimilation, Photosynthetic Electron Transport, and Active O₂ Metabolism in Leaves of Maize in the Field during Periods of Low Temperature. *Plant Physiol.* 116, 571-580.
- FUKAMI, K., NISHIJIMA, T. und ISHIDA, Y. (1997) Stimulative and inhibitory effects of bacteria on the growth of microalgae. *Hydrobiol.* 358, 185-191.
- GARRISON, D.L., BUCK, K.R. und GOWING, M.M. (1993) Winter plankton assemblage in the ice edge zone of the Weddell and Scotia Seas - composition, biomass and spatial distributions. *Deep-Sea Res.* 40, 311-338.
- GARRISON, D.L., SULLIVAN, C.W. und ACKLEY, S.F. (1986) Sea Ice Microbial Communities in Antarctica. *Bioscience* 4, 243-250.
- GENTER, R.B. (1996) Ecotoxicology of inorganic chemical stress to algae. In: Stevenson, R.J., M.L. Bothwell und R.L. Lowe (Hrsg.) *Algal Ecology*. New York, Academic Press, 403-468.
- GOLDBERG, D.M. und SPOONER, R.J. (1983) Glutathione Reductase. In: Bergmeyer, J. und M. Grassl (Hrsg.) *Enzymes 1: Oxidoreductases, Transferases*. Weinheim, VCH, 258-265.
- GRILLI CAIOLA, M. und CANINI, A. (1993) Immunocytochemical localization of Fe-SOD in different cells of *Anabaena cylindrica* Lemm. grown at two different photon irradiances. *New Phytol.* 125, 361-366.
- GROSS, W. (1993) Peroxisomes in algae: their distribution, biochemical function and phylogenetic importance. In: Round, F.E. und D.J. Chapman (Hrsg.) *Progress in Phycological Research*, 9. Amsterdam, Elsevier-Verlag, 47-78.
- GROSS, W., WINKLER, U. und STABENAU, H. (1985) Characterization of Peroxisomes from the Alga *Bumilleriopsis filiformis*. *Plant Physiol.* 77, 296-299.
- GUETA-DAHAN, Y., YANIV, Z., ZILINSKAS, B.A. und BEN-HAYYIM, G. (1997) Salt and oxidative stress: similar and specific responses and their relation to salt tolerance in Citrus. *Planta* 203, 460-469.
- GUILLARD, R.R.L. (1975) Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates. In: Smith, W.L. und M.H. Chanley (Hrsg.) *Culture of Marine Invertebrate Animals*. New York, Plenum Press, 29-60.
- HÄDER, D.-P. (1997) Effects of UV Radiation on Phytoplankton. In: Jones, J.G. (Hrsg.) *Advances in Microbial Ecology*. New York, Plenum Press, 1-26.

- HÄLLGREN, J.-E. und ÖQUIST, G. (1990) Adaptations to Low Temperatures. In: Alscher, R. (Hrsg.) *Stress Responses in Plants: Adaptation and Acclimation Mechanisms*. New York, Wiley-Verlag, 265-293.
- HALLIWELL, B. und GUTTERIDGE, J.M.C. (1989) *Free Radicals in Biology and Medicine*. 2. Aufl., Clarendon Press, Oxford.
- HANES, C.S. (1932) Studies on plant amylases. I. The effect of starch concentration upon the velocity of hydrolysis by the amylase of germinated barley. *Biochem.J.* 26, 1406-1421.
- HASEGAWA, P.M., BRESSAN, R.A., NELSON, D.E., SAMARAS, Y. und RHODES, D. (1994) Tissue Culture in the Improvement of Salt Tolerance in Plants. In: Yeo, A.R. und T.J. Flowers (Hrsg.) *Soil Mineral Stresses*. Heidelberg, Springer-Verlag, 83-125.
- HAYAKAWA, T., KANEMATSU, S. und ASADA, K. (1984) Occurrence of Cu,Zn-Superoxide Dismutase in the Intrathylakoid Space of Spinach Chloroplasts. *Plant Cell Physiol.* 25, 883-889.
- HAYAKAWA, T., KANEMATSU, S. und ASADA, K. (1985) Purification and characterization of thylakoid-bound Mn-superoxide dismutase in spinach chloroplasts. *Planta* 166, 111-116.
- HAZZARD, C.E. (1992) Role of oxygen defence in the acclimation of a marine diatom to UV radiation. *J.Phycol.* 28, 9.
- HAZZARD, C., LESSER, M.P. und KINZIE, R.A. (1997) Effects of ultraviolet radiation on photosynthesis in the subtropical marine diatom, *Chaetoceros gracilis* (Bacillariophyceae). *J.Phycol.* 33, 960-968.
- HEINEMANN, U. (1998) Einfluß von Temperatur, Bestrahlungsstärke und Wasserstoffperoxid auf den Gesamtgehalt und Redoxstatus von Ascorbat und Glutathion in der antarktischen Eisalge *Entomoneis kufferathii* MANGUIN (Bacillariophyceae). Diplomarbeit, Universität Bremen.
- HENRY, L.E.A. und HALL, D.O. (1977) Superoxide dismutases in green algae: An evolutionary survey. In: Miyachi, S., S. Katoh, Y. Fujita und K. Sibata (Hrsg.) *Photosynthetic Organelles*. Japan, Japanese Society of Plant Biologists, 377-382.
- HEWSON, W.D. und HAGER, L.P. (1980) Bromoperoxidases and halogenated lipids in marine algae. *J.Phycol.* 16, 340-345.

- HIPPELI, S. und ELSTNER, E.F. (1996) Mechanism of Oxygen Activation during Plant Stress: Biochemical Effects of Air Pollutants. *J.Plant Physiol.* 148, 249-257.
- HOLLNAGEL, H.C., DI MASCIO, P., ASANO, C.S., OKAMOTO, O.K., STRINGHER, C.G., OLIVEIRA, M.C. und COLEPICOLO, P. (1996) The effect of light on the biosynthesis of β -carotene and superoxide dismutase activity in the photosynthetic alga *Gonyaulax polyedra*. *Braz.J.Med.Biol.Res.* 29, 105-110.
- HORNER, R., ACKLEY, S.F., DIECKMANN, G.S., GULLIKSEN, B., HOSHIAI, T., LEGENDRE, L., MELNIKOV, I.A., REEBURGH, W.S., SPINDLER, M. und SULLIVAN, C.W. (1992) Ecology of the sea-ice biota 1. Habitat, terminology, and methodology. *Polar Biol.* 12, 417-427.
- HORNER, R.A., SYVERTSEN, E.E., THOMAS, D.P. und LANGE, C. (1988) Proposed Terminology and Reporting Units for Sea Ice Algal Assemblages. *Polar Biol.* 8, 249-253.
- HORNUNG, R.L., HANZELY, L. und LYNCH, D.L. (1977) Occurrence of Microbodies in the Green Alga *Bracteacoccus cinnabarinus* Grown Heterotrophically. *Protoplasma* 93, 135-145.
- HOSETTI, B.B., SHIVARAJ, K.M. und PATIL, H.S. (1993) Toxicity of cobalt chloride on *Scenedesmus quadricauda* (Turp) Breb during sewage purification. *Indian J.Exp.Biol.* 31, 627-631.
- ISHIKAWA, T., TAKEDA, T., KOHNO, H. und SHIGEOKA, S. (1996A) Molecular characterization of *Euglena* ascorbate peroxidase using monoclonal antibody. *Biochim.Biophys.Acta* 1290, 69-75.
- ISHIKAWA, T., TAKEDA, T. und SHIGEOKA, S. (1996B) Purification and characterization of cytosolic ascorbate peroxidase from komatsuna (*Brassica rapa*). *Plant Sci.* 120, 11-18.
- ISHIKAWA, T., TAKEDA, T., SHIGEOKA, S., HIRAYAMA, O. und MITSUNAGA, T. (1993A) Requirement for iron and its effect on ascorbate peroxidase in *Euglena gracilis*. *Plant Sci.* 93, 25-29.
- ISHIKAWA, T., TAKEDA, T., SHIGEOKA, S., HIRAYAMA, O. und MITSUNAGA, T. (1993B) Hydrogen peroxide generation in organelles of *Euglena gracilis*. *Phytochemistry* 33, 1297-1299.

- ITOH, N., IZUMI, Y. und YAMADA, H. (1987) Characterization of Nonheme Iron and Reaction Mechanism of Bromoperoxidase in *Corallina pilulifera*. J.Biol. Chem. 262, 11982-11987.
- JACKSON, C., DENCH, J., MOORE, A.L., HALLIWELL, B., FOYER, C. und HALL, D.O. (1978) Subcellular localization and identification of superoxide dismutase in the leaves of higher plants. Eur.J.Biochem. 91, 339-344.
- JAHNKE, L.S., HULL, M.R. und LONG, S.P. (1991) Chilling stress and oxygen metabolizing enzymes in *Zea mays* and *Zea diploperennis*. Plant Cell Environ. 14, 97-104.
- JUVEN, B.J. und PIERSON, M.D. (1997) Antibacterial Effects of Hydrogen Peroxide and Methods for Its Detection and Quantitation. J.Food Prot. 59, 1233-1241.
- KAISER, W.M. (1979) Reversible Inhibition of the Calvin Cycle and Activation of Oxidative Pentose Phosphate Cycle in Isolated Intact Chloroplasts by Hydrogen Peroxide. Planta 145, 377-382.
- KANEMATSU, S. und ASADA, K. (1979) Ferric and manganic superoxide dismutases in *Euglena gracilis*. Arch.Biochem.Biophys. 195, 535-545.
- KANEMATSU, S. und ASADA, K. (1989) Cu/Zn-Superoxide Dismutases in Rice: Occurrence of an Active, Monomeric Enzyme and Two Types of Isozyme in Leaf and Non-Photosynthetic Tissues. Plant Cell Physiol. 30, 381-391.
- KANEMATSU, S. und ASADA, K. (1990) Characteristic amino acid sequences of chloroplast and cytosol CuZn-superoxide dismutases in spinach, rice and horsetail. Plant Cell Physiol. 31, 99-112.
- KATO, J., YAMAHARA, T., TANAKA, K., TAKIO, S. und SATOH, T. (1997) Characterization of Catalase from Green Algae *Chlamydomonas reinhardtii*. J.Plant Physiol. 151, 262-268.
- KIRST, G.O. (1992) Die Phytoplankton-Klima-Beziehung am Beispiel der Algen im Meereis. Geograph.Rundschau 44, 486-492.
- KLÖSER, H. (1990) Verbreitung von Mikroplankton-Organismen nordwestlich der Antarktischen Halbinsel unter dem Einfluß sich ändernder Umweltbedingungen im Herbst. Ber.Polarforsch. 77, 1-255.
- KRAMMER, K. (1986) *Kieselalgen*. Franckh'sche Verlagshandlung, Stuttgart.

- LAEMMLI, .K. (1970) Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- LASCH, J. (1987) *Enzymkinetik*. Springer-Verlag, Berlin.
- LESSER, M.P. (1996A) Acclimation of phytoplankton. to UV-B radiation: oxidative stress and photoinhibition of photosynthesis are not prevented by UV-absorbing compounds in the dinoflagellate *Prorocentrum micans*. *Mar.Ecol.Prog.Ser.* 132, 287-297.
- LESSER, M.P. (1996B) Elevated temperatures and ultraviolet radiation cause oxidative stress and inhibit photosynthesis in symbiotic dinoflagellates. *Limnol.Oceanogr.* 41, 271-283.
- LESSER, M.P. und SHICK, J.M. (1989) Effects of irradiance and ultraviolet radiation on photoadaptation in the zooxanthellae of *Aiptasia pallida*: primary production, photoinhibition, and enzymic defenses against oxygen toxicity. *Mar.Biol.* 102, 243-255.
- LE TUTOUR, B., BENSLIMANE, F., GOULEAU, M.P., GOUYGOU, J.P., SAADAN, B. und QUEMENEUR, F. (1998) Antioxidant and pro-oxidant activities of the brown algae, *Laminaria digitata*, *Himantalia elongata*, *Fucus vesiculosus*, *Fucus serratus* and *Ascophyllum nodosum*. *J.Appl.Phycol.* 10, 121-129.
- LEVITT, J. (1972) *Responses of plant to environmental stresses*. Academic Press, New York.
- LI, L. und VAN STADEN, J. (1998) Effects of plant growth regulators on the antioxidant system in callus of two maize cultivars subjected to water stress. *Plant Growth Regul.* 24, 55-66.
- LI, X., FENG, Y. und BOERSMA, L. (1991) Activation Energy as a Measure of Plant Response to Temperature and Water Stresses. *Ann.Bot.* 68, 151-157.
- LÜNING, K. (1985) *Meeresbotanik*. Thieme-Verlag, Stuttgart.
- LUI, N.S.T., ROELS, O.A., TROUT, M.E. und ANDERSON, O.R. (1968) Subcellular distribution of enzymes in *Ochromonas malhamensis*. *Ann.N.Y.Ac.Sci.* 168, 369-381.
- LUMSDEN, J. und HALL, D.O. (1975) Superoxide dismutase in photosynthetic organisms provides an evolutionary hypothesis. *Nature* 257, 670-671.

- LUTTS, S. und GUERRIER, G. (1995) Peroxidase activities of two rice cultivars differing in salinity tolerance as affected by proline and NaCl. *Biol.Plant.* 37, 577-586.
- MacRAE, E.A. und FERGUSON, I.B. (1985) Changes in catalase activity and hydrogen peroxide concentration in plants in response to low temperature. *Plant Physiol.* 65, 51-56.
- MALANGA, G. und PUNTARULO, S. (1995) Oxidative stress and antioxidant content in *Chlorella vulgaris* after exposure to ultraviolet-B radiation. *Physiol. Plant.* 94, 672-679.
- MANNERVIK, B. (1985) Glutathione Peroxidase. *Methods Enzymol.* 113, 490-495.
- MARKLUND, S. und MARKLUND, G. (1974) Involvement of the Superoxide Anion Radical in the Autoxidation of Pyrogallol and a Convenient Assay for Superoxide Dismutase. *Eur.J.Biochem.* 47, 469-477.
- MARQUEZ, F.J., SASAKI, K., NISHIO, N. und NAGAI, S. (1995) Inhibitory effect of oxygen accumulation on the growth of *Spirulina platensis*. *Biotechnol.Lett.* 17, 225-228.
- MATTA, J.L. (1995) Oxygen-derived free radicals as regulators of toxicity in the dinoflagellate *Ostreopsis lenticularis*. In: LASSUS, P., G. ARZUL, P. ERARD, P. GENTIEN, und C. MARCAILLOU (Hrsg.) *Harmful Marine Algal Blooms*. Proceedings 6th International Meeting on Toxic Phytoplankton, Paris, Lavosier-Verlag, 469-474.
- MATTA, J.L., GOVIND, N.S. und TRENCH, R.K. (1992) Polyclonal antibodies against iron-superoxide dismutase from *Escherichia coli* B cross-react with superoxide dismutases from *Symbiodinium microadriaticum* (Dinophyceae). *J.Phycol.* 28, 343-346.
- MATTA, J.L. und TRENCH, R.K. (1991) The Enzymatic Response of the Symbiotic Dinoflagellate *Symbiodinium microadriaticum* (Freudenthal) to Growth *in vitro* Under Varied Oxygen Tensions. *Symbiosis* 11, 31-46.
- McCONVILLE, M.J. und WETHERBEE, R. (1983) The bottom-ice microalgal community from annual ice in the inshore water of East-Antarctica. *J.Phycol.* 19, 431-439.
- McCORD, J.M. und FRIDOVICH, I. (1969) Superoxide Dismutase. *J.Biol.Chem.* 244, 6049-6055.

- McGRATH GROSSI, S., KOTTMEIER, S.T. und SULLIVAN, C.W. (1984) Sea Ice Microbial Communities. III. Seasonal Abundance of Microalgae and Associated Bacteria, McMurdo Sound, Antarctica. *Microb.Ecol.* 10, 231-242.
- McGRATH GROSSI, S. und SULLIVAN, C.W. (1985) Sea ice microbial communities. V. The vertical zonation of diatoms in an Antarctic fast ice community. *J.Phycol.* 21, 401-409.
- MEHDY, M.C. (1994) Active Oxygen Species in Plant Defense against Pathogens. *Plant Physiol.* 105, 467-472.
- MEHLER, A.H. (1951) Studies on Reactions of Illuminated Chloroplasts. I. Mechanism of the Reduction of Oxygen and Other Hill Reagents. *Arch. Biochem.Biophys.* 33, 65-77.
- MILLS, G.C. (1957) Hemoglobin catabolism. I. Glutathione peroxidase, an erythrocyte enzyme which protects hemoglobin from oxidative breakdown. *J.Biol.Chem.* 229, 189-197.
- MISHRA, N.P., FATMA, T. und SINGHAL, G.S. (1995) Development of anti-oxidative defense system of wheat seedlings in response to high light. *Physiol.Plant.* 95, 77-82.
- MISHRA, N.P., MISHRA, R.K. und SINGHAL, G.S. (1993) Changes in the Activities of Anti-Oxidant Enzymes during Exposure of Intact Wheat Leaves to Strong Visible Light at Different Temperatures in the Presence of Protein Synthesis Inhibitors. *Plant Physiol.* 102, 903-910.
- MISRA, H.P. und FRIDOVICH, I. (1977) Purification and properties of superoxide dismutase from a red alga, *Porphyridium cruentum*. *J.Biol.Chem.* 252, 6421-6423.
- MISZALSKI, Z., SLESIAK, I., NIEWIADOMSKA, E., BACZEK-KWINTA, R., LÜTTGE, U. und RATAJCZAK, R. (1998) Subcellular localization and stress responses of superoxide dismutase isoforms from leaves in the C₃-CAM intermediate halophyte *Mesembryanthemum crystallinum* L.. *Plant Cell Environ.* 21, 169-179.
- MITTLER, R. und TEL-OR, E. (1991) Oxidative stress responses and shock proteins in the unicellular cyanobacterium *Synechococcus* R2 (PCC-7942). *Arch.Microbiol.* 155, 125-130.

- MITTLER, R. und ZILINSKAS, B.A. (1993) Detection of Ascorbate Peroxidase Activity in native Gels by Inhibition of the Ascorbate-Dependent Reduction of Nitroblue Tetrazolium. *Biochemistry* 212, 540-546.
- MIURA, W., FUJIO, Y. und SUTO, S. (1978) Polymorphism of Catalase Isoenzyme in *Porphyra*. *Tohoku J.Agr.Res.* 29, 159-166.
- MIYAKE, C. und ASADA, K. (1992) Thylakoid-Bound Ascorbate Peroxidase in Spinach Chloroplasts and Photoreduction of Its Primary Oxidation Product Monodehydroascorbate Radical in Thylakoids. *Plant Cell Physiol.* 33, 541-553.
- MIYAKE, C. und ASADA, K. (1994) Ferredoxin-Dependent Photoreduction of the Monodehydroascorbate Radical in Spinach Thylakoids. *Plant Cell Physiol.* 35, 539-549.
- MIYAKE, C. und ASADA, K. (1996) Inactivation Mechanism of Ascorbate Peroxidase at Low Concentrations of Ascorbate; Hydrogen Peroxide Decomposes Compound I of Ascorbate Peroxidase. *Plant Cell Physiol.* 37, 423-430.
- MIYAKE, C., CAO, W.-H. und ASADA, K. (1993) Purification and Molecular Properties of Thylakoid-Bound Ascorbate Peroxidase in Spinach Chloroplasts. *Plant Cell Physiol.* 34, 881-889.
- MIYAKE, C., MICHIHATA, F. und ASADA, K. (1991) Scavenging of Hydrogen Peroxide in Prokaryotic and Eukaryotic Algae: Acquisition of Ascorbate Peroxidase during the Evolution of Cyanobacteria. *Plant Cell Physiol.* 32, 33-44.
- MURTHY, M.S. und SHARMA, C.L.N.S. (1989) Peroxidase Activity in *Ulva lactuca* under Desiccation. *Bot.Mar.* 32, 511-513.
- MURTHY, M.S., SHARMA, C.L.N.S. und RAO, Y.N. (1988) Salinity Induced Changes in Peroxidase Activity in the Green Seaweed *Ulva lactuca*. *Bot.Mar.* 31, 307-310.
- NAKANO, T., WATANABE, M., SATO, M. und TAKEUCHI, M. (1995) Characterization of catalase from the seaweed *Porphyra yezoensis*. *Plant Sci.* 104, 127-133.
- NAKANO, Y. und ASADA, K. (1980) Spinach chloroplasts scavenge hydrogen peroxide on illumination. *Plant Cell Physiol.* 21, 1295-1307.
- NAKANO, Y. und ASADA, K. (1987) Purification of Ascorbate Peroxidase in Spinach Chloroplasts; Its Inactivation in Ascorbate-Depleted Medium and Re-activation by Monodehydroascorbate Radical. *Plant Cell Physiol.* 28, 131-140.

- NEFTEL, A., JACOB, P. und KLOCKOW, D. (1984) Measurements of hydrogen peroxide in polar ice samples. *Nature* 311, 43-45.
- NESSEL, A. und MÄDER, M. (1977) Über die physiologische Bedeutung der Peroxidase-Isoenzymgruppen des Tabaks anhand einiger biochemischer Eigenschaften. *Z.Pflanzenphysiol.* 82, 235-246.
- NÖTHIG, E.-M. (1988) Untersuchungen zur Ökologie des Phytoplanktons im südöstlichen Weddellmeer im Januar/Februar 1985. *Ber.Polarforsch.* 53, 1-118.
- NOTHNAGEL, J. (1995) Der Einfluß von Salinität und Lichtintensität auf die Osmolytkonzentrationen, die Zellvolumina und die Wachstumsraten der antarktischen Eisdiatomeen *Chaetoceros* sp. und *Navicula* sp. unter besonderer Berücksichtigung der Aminosäure Prolin. *Ber.Polarforsch.* 161, 1-115.
- OGAWA, K., KANEMATSU, S. und ASADA, K. (1996) Intra- and extra-cellular localization of "cytosolic" CuZn-superoxide dismutase in spinach leaf and hypocotyl. *Plant Cell Physiol.* 37, 790-799.
- OKADA, S., KANEMATSU, S. und ASADA, K. (1979) Intracellular distribution of manganese and ferric superoxide dismutases in blue-green algae. *FEBS Lett.* 103, 106-110.
- O'KANE, D., GILL, V., BOYD, P. und BURDON, R. (1996) Chilling, oxidative stress and antioxidant responses in *Arabidopsis thaliana* callus. *Planta* 198, 371-377.
- OVERBAUGH, J.M. und FALL, R. (1982) Detection of glutathione peroxidases in some microalgae. *FEMS Microbiol.Lett.* 13, 371-375.
- OVERBAUGH, J.M. und FALL, R. (1985) Characterization of a Selenium-Independent Glutathione Peroxidase From *Euglena gracilis*. *Plant Physiol.* 77, 437-442.
- PALMISANO, A.C., KOTTMEIER, S.T., MOE, R.L. und SULLIVAN, C.W. (1985) Sea ice microbial communities. IV. The effect of light perturbation on microalgae at the ice-seawater interface in McMurdo Sound, Antarctica. *Mar.Ecol.Prog.Ser.* 21, 37-45.
- PAMATMAT, M.M. (1989) Oxygen Production and Uptake; Hydrogen Peroxide. *Ber.Polarforsch.* 65, 25-33.
- PAUL, J.S., SULLIVAN, C.W. und VOLCANI, B.E. (1975) Photorespiration in Diatoms. *Arch.Biochem.Biophys.* 169, 152-159.

- PETASNE, R.G. und ZIKA, R.G. (1987) Fate of superoxide in coastal sea water. *Nature* 325, 516-518.
- PIQUERAS, A., HERNÁNDEZ, J.A., OLMOS, E., HELLIN, E. und SEVILLA, F. (1996) Changes in antioxidant enzymes and organic solutes associated with adaptation of citrus cells to salt stress. *Plant Cell Tiss.Org.Cult.* 45, 53-60.
- PRICE, M.L. und HARRISON, P.J. (1988) Specific Selenium-Containing Macromolecules in the Marine Diatom *Thalassiosira pseudonana*. *Plant Physiol.* 86, 192-199.
- RAO, M.V., PALIYATH, C. und ORMROD, D.P. (1996) Ultraviolet-B- and ozone-induced biochemical changes in antioxidant enzymes of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol.* 110, 125-136.
- REDMOND, M.J., McEUEEN, A.R. und POWLS, R. (1985) Superoxide dismutase in *Scenedesmus obliquus*. *Planta* 163, 405-410.
- RENNENBERG, H. (1982) Glutathione metabolism and possible biological roles in higher plants. *Phytochemistry* 21, 2771-2781.
- RESING, J., LETELIER, R. und KARL, D.M. (1993) Palmer LTER: Hydrogen peroxide in the Palmer LTER region: II. Water column distribution. *Antarct.J.* 28, 227-229.
- ROENNEBERG, T., MERROW, M. und EISENSAMER, B. (1998) Cellular mechanisms of circadian systems. *Zoology* 100, 273-286.
- ROTRUCK, J.T., HOEKSTRA, W.G., POPE, A.L., GANTHER, H., SWANSON, A. und HAFEMAN, D. (1972) Relationship of selenium to GSH peroxidase. *Federation Proc.* 31, 691.
- SABEH, F., WRIGHT, T. und NORTON, S.J. (1993) Purification and Characterization of a Glutathione Peroxidase from the *Aloe vera* Plant. *Enzyme Protein* 47, 92-98.
- SAKURAI, H., KUSUMOTO, N., KITAYAMA, K. und TOGASAKI, R.K. (1993) Isoenzymes of Superoxide Dismutase in *Chlamydomonas* and Purification of One of the Major Isoenzymes Containing Fe. *Plant Cell Physiol.* 34, 1133-1137.
- SALIN, M.L. (1987) Toxic oxygen species and protective systems of the chloroplast. *Plant Physiol.* 72, 943-952.

- SANCHÓ, M.A., DE FORCHETTI, S.M., PLIEGO, F., VALPUESTA, V. und QUESADA, M.A. (1996) Peroxidase activity and isoenzymes in the culture medium of NaCl adapted tomato suspension cells. *Plant Cell Tiss.Org.Cult.* 44, 161-167.
- SANDALIO, L.M. und DEL RIO, L.A. (1987) Localisation of superoxide dismutase in glyoxysomes from *Citrullus vulgaris*. Functional implications in cellular metabolism. *J.Plant Physiol.* 127, 395-409.
- SANDALIO, L.M., PALMA, J.M. und DEL RIO, L.A. (1987) Localization of a manganese superoxide dismutase in peroxisomes isolated from *Pisum sativum* L. *Plant Sci.* 51, 1-8.
- SARUYAMA, H. und TANIDA, M. (1995) Effect of chilling on activated oxygen-scavenging enzymes in low temperature-sensitive and -tolerant cultivars of rice (*Oryza sativa* L.). *Plant Sci.* 109, 105-113.
- SAUSER, K.R., LIU, J.K. und WONG, T.-Y. (1997) Identification of a copper-sensitive ascorbate peroxidase in the unicellular green alga *Selenastrum capricornutum*. *BioMetals* 10, 163-168.
- SCANDALIOS, J.G. (1994) Regulation and properties of plant catalases. In: Foyer, C.H. und P.M. Mullineaux (Hrsg.) *Causes of Photooxidative Stress and Amelioration of Defense Systems in Plants*. Boca Raton, CRC Press, 275-315.
- SCANDALIOS, J.G., TONG, W.-F. und ROUPAKIAS, D.G. (1980) *Cat3*, a third gene locus coding for a tissue-specific catalase in maize: genetics, intracellular location, and some biochemical properties. *Mol.Gen.Genet.* 179, 33-41.
- SCHÄFER, C. und SCHMID, V.H.R. (1993) Pflanzen im Lichtstreß. *Biol.Unserer Zeit* 1, 55-62.
- SCHAREK, R. (1991) Die Entwicklung des Phytoplanktons im östlichen Weddellmeer (Antarktis) beim Übergang vom Spätwinter zum Frühjahr. *Ber. Polarforsch.* 94, 1-195.
- SCHINKEL, H., STRELLER, S. und WINGSLE, G. (1998) Multiple forms of extracellular superoxide dismutase in needles, stem tissues and seedlings of Scots pine. *J.Exp.Bot.* 49, 931-936.
- SCHOMBURG, D., SALZMANN, M. und STEPHAN, D. (1994) *Enzyme Handbook 8, Class 1.13-1.97: Oxidoreductases*. Springer-Verlag, Heidelberg.

- SCHOPFER, P. (1996) Hydrogen peroxide-mediated cell-wall stiffening *in vitro* in maize coleoptiles. *Planta* 199, 43-49.
- SCHRECK, S., DORNENBURG, H. und KNORR, D. (1996) Evaluation of hydrogen peroxide production in tomato (*Lycopersicon esculentum*) suspension cultures as a stress reaction to high pressure treatment. *Food Biotechnol.* 10, 163-171.
- SCHRIEK, R. und KIRST, G.O. (1998) Enzymatischer Oxidationsschutz in den antarktischen Eisdiatomeen *Entomoneis kufferathii* MANGUIN und *Chaetoceros* sp.. *Ber.Polarforsch.* 277, 100.
- SERRANO, A. und LLOBELL, A. (1993) Occurrence of two isoforms of glutathione reductase in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Planta* 190, 199-205.
- SHAISH, A., AVRON, M., PICK, U. und BEN-AMOTZ, A. (1993) Are active oxygen species involved in induction of β -carotene in *Dunaliella bardawil*? *Planta* 190, 363-368.
- SHERR, E.B., CARON, D.A. und SHERR, B.F. (1996) Staining of Heterotrophic Protists for Visualization via Epifluorescence Microscopy. In: Kemp, P.F., B.F. Sherr, E.B. Sherr und J.J. Cole (Hrsg.) *Handbook of Methods in Aquatic Microbial Ecology*. Boca Raton, Lewis-Verlag, 213-227.
- SHIGEOKA, S., NAKANO, Y. und KITAOKA, S. (1980A) Purification and Some Properties of L-Ascorbic Acid-Specific Peroxidase in *Euglena gracilis* z. *Arch.Biochem.Biophys.* 201, 121-127.
- SHIGEOKA, S., NAKANO, Y. und KITAOKA, S. (1980B) Metabolism of Hydrogen Peroxide in *Euglena gracilis* z by L-Ascorbic Acid Peroxidase. *Biochem.J.* 186, 377-380.
- SHIGEOKA, S., ONISHI, T., NAKANO, Y. und KITAOKA, S. (1987) Characterization and physiological function of glutathione reductase in *Euglena gracilis* z. *Biochem.J.* 242, 511-515.
- SHIGEOKA, S., TAKEDA, T. und HANAOKA, T. (1991) Characterization and immunological properties of selenium containing glutathione peroxidase induced by selenite in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Biochem.J.* 275, 623-627.
- SIES, H. (1993) Strategies of antioxidant defense. *Eur.J.Biochem.* 215, 213-219.
- SIGG, A. und NEFTEL, A. (1988) Seasonal variations in hydrogen peroxide in polar ice cores. *Ann.Glaciol.* 10, 1-6.

- SIGG, A. und NEFTEL, A. (1991) Evidence for a 50% increase in H₂O₂ over the past 200 years from a Greenland ice core. *Nature* 351, 557-559.
- SPINDLER, M. und DIECKMANN, G.S. (1991) Das Meereis als Lebensraum. *Spektrum der Wissenschaft* 2, 48-57.
- STABENAU, H. (1974) Verteilung von Microbody-Enzymen aus *Chlamydomonas* in Dichtegradienten. *Planta* 118, 35-42.
- STABENAU, H. (1976) Microbodies from *Spirogyra* Organelles of a filamentous alga similar to leaf peroxisomes. *Plant Physiol.* 58, 693-695.
- STABENAU, H. (1984) Microbodies in Different Algae. In: Wiessner, W., D. Robinson und R.C. Starr (Hrsg.) *Compartments in Algal Cells and Their Interaction*. Berlin, Springer-Verlag, 183-190.
- STABENAU, H. (1992A) Peroxisomes of *Rhodophyta*. In: Stabenau, H. (Hrsg.) *Phylogenetic Changes in Peroxisomes of Algae Phylogeny of Plant Peroxisomes*. Oldenburg, Universität Oldenburg, 106-111.
- STABENAU, H. (1992B) Compartmentation of peroxisomal enzymes in the diatom *Fragilaria*. In: Stabenau, H. (Hrsg.) *Phylogenetic Changes in Peroxisomes of Algae Phylogeny of Plant Peroxisomes*. Oldenburg, Universität Oldenburg, 130-139.
- STABENAU, H. (1992C) Peroxisomes in algae. In: Stabenau, H. (Hrsg.) *Phylogenetic Changes in Peroxisomes of Algae Phylogeny of Plant Peroxisomes*. Oldenburg, Universität Oldenburg, 42-62.
- STABENAU, H. (1992D) Peroxisomes of *Heterokontophyta*. In: Stabenau, H. (Hrsg.) *Phylogenetic Changes in Peroxisomes of Algae Phylogeny of Plant Peroxisomes*. Oldenburg, Universität Oldenburg, 112-129.
- STABENAU, H. (1992E) Evolutionary changes of enzymes in peroxisomes and mitochondria of green algae. In: Stabenau, H. (Hrsg.) *Phylogenetic Changes in Peroxisomes of Algae Phylogeny of Plant Peroxisomes*. Oldenburg, Universität Oldenburg, 63-79.
- STABENAU, H. und BEEVERS, H. (1974) Isolation and Characterization of Microbodies from the Alga *Chlorogonium elongatum*. *Plant Physiol.* 53, 866-869.
- STABENAU, H. und SÄFTEL, W. (1981) Lokalisation von Enzymen des Glykolatstoffwechsels in *Mougeotia*. *Ber.Dtsch.Bot.Ges.* 94, 59-64.

- STABENAU, H., WINKLER, U. und SÄFTEL, W. (1984) Enzymes of β -Oxidation in Different Types of Algal Microbodies. *Plant Physiol.* 75, 531-533.
- STABENAU, H., WINKLER, U. und SÄFTEL, W. (1989) Compartmentation of Peroxisomal Enzymes in Algae of the Group of Prasinophyceae. *Plant Physiol.* 90, 754-759.
- STABENAU, H., WINKLER, U. und SÄFTEL, W. (1993) Localization of glycolate dehydrogenase in two species of *Dunaliella*. *Planta* 191, 362-364.
- STEVENS, S.E.J., PATTERSON, C.O.P. und MYERS, J. (1973) The production of hydrogen peroxide by blue-green algae: A survey. *J. Phycol.* 9, 427-430.
- STREB, P. und FEIERABEND, J. (1996) Oxidative Stress Responses Accompanying Photoinactivation of Catalase in NaCl-treated Rye Leaves. *Bot. Acta* 109, 125-132.
- STURGES, W.T., COTA, G.F. und BUCKLEY, P.T. (1992) Bromoform emission from Arctic ice algae. *Nature* 358, 660-662.
- SÜLTEMEYER, D., BIEHLER, K. und FOCK, H.P. (1993) Evidence for the contribution of pseudocyclic photophosphorylation to the energy requirement of the mechanism for concentrating inorganic carbon in *Chlamydomonas*. *Planta* 189, 235-242.
- SULLIVAN, C.W. und PALMISANO, A.C. (1984) Sea Ice Microbial Communities: Distribution, Abundance, and Diversity of Ice Bacteria in McMurdo Sound, Antarctica, in 1980. *Appl. Environ. Microbiol.* 47, 788-795.
- SUZUKI, K., IWAMOTO, K., YOKOYAMA, S. und IKAWA, T. (1991) Glycolate-oxidizing enzymes in algae. *J. Phycol.* 27, 492-498.
- TAKEDA, T., ISHIKAWA, T. und SHIGEOKA, S. (1997) Metabolism of hydrogen peroxide by the scavenging system in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Physiol. Plant.* 99, 49-55.
- TAKEDA, T., ISHIKAWA, T., SHIGEOKA, S., HIRAYAMA, O. und MITSUNAGA, T. (1993A) Purification and characterization of glutathione reductase from *Chlamydomonas reinhardtii*. *Physiol. Plant.* 99, 49-55.
- TAKEDA, T., NAKANO, Y. und SHIGEOKA, S. (1993B) Effects of selenite, CO₂ and illumination on the induction of selenium-dependent glutathione peroxidase in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Sci.* 94, 81-88.

- TAKEDA, T., SHIGEOKA, S., HIRAYAMA, O. und MITSUNAGA, T. (1992) The Presence of Enzymes Related to Glutathione Metabolism and Oxygen Metabolism in *Chlamydomonas reinhardtii*. Biosci.Biotech.Biochem. 56, 1662-1663.
- TANAKA, K., OTSUBO, T. und KONDO, N. (1982) Participation of Hydrogen Peroxide in the Inactivation of Calvin-Cycle SH Enzymes in SO₂-Fumigated Spinach Leaves. Plant Cell Physiol. 23, 1009-1018.
- TANIDA, M. (1996) Catalase Activity of Rice Seed Embryo and Its Relation to Germination Rate at a Low Temperature. Breeding Sci. 46, 23-27.
- TAPPEL, M.E., CHAUDIERE, J. und TAPPEL, A.L. (1982) Glutathione peroxidase activities of animal tissues. Comp.Biochem.Physiol. 73B, 945-949.
- TARDENT, P. (1993) *Meeresbiologie*. 2. Aufl., Thieme-Verlag, Stuttgart.
- TEL-OR, E., HUFLEJT, M.E. und PACKER, L. (1986) Hydroperoxide Metabolism in Cyanobacteria. Arch.Biochem.Biophys. 246, 396-402.
- THOMAS, D.N., BAUMANN, M.E.M. und GLEITZ, M. (1992) Efficiency of carbon assimilation and photoacclimation in a small unicellular *Chaetoceros* species from the Weddell Sea (Antarctica): influence of temperature and irradiance. J.Exp.Mar.Biol.Ecol. 157, 195-209.
- TIEN, G. und KARL, D.M. (1993) Palmer LTER: Hydrogen peroxide in the Palmer LTER region: III. Local sources and sinks. Antarct.J. 28, 229-230.
- VAN DEN HOEK, C.V., JAHNS, H.M. und MANN, D.G. (1993) *Algen*. 3. Aufl., Thieme-Verlag, Stuttgart.
- VAN DEN HOEK, C.V., MANN, D.G. und JAHNS, H.M. (1995) *Algae*. Cambridge University Press, New York.
- VAN HUUSTEE, R.B. (1987) Some molecular aspects of plant peroxidase biosynthetic studies. Ann.Rev.Plant Physiol. 38, 205-219.
- VILTER, H. (1983) Peroxidases from Phaeophyceae IV. Fractionation and Location of Peroxidase Isoenzymes in *Ascophyllum nodosum* (L.) Le Jol. Bot.Mar. 26, 451-455.
- VOET, D. und VOET, J.G. (1992) *Biochemie*. VCH, Weinheim.
- VOLK, S. und FEIERABEND, J. (1989) Photoinactivation of catalase at low temperature and its relevance to photosynthetic and peroxide metabolism in leaves. Plant Cell Environ. 12, 701-712.

- WALKER, M.A., McKERSIE, B.D. und PAULS, K.P. (1991) Effects of Chilling on the Biochemical and Functional Properties of Thylakoid Membranes. *Plant Physiol.* 97, 663-669.
- WANZEK, M. (1994) Der Einfluß unterschiedlicher Temperaturen auf Wachstum, Photosynthese, Respiration und ausgewählte Inhaltsstoffe der antarktischen Diatomeen *Entomoneis kufferathii* MANGUIN und *Nitzschia lecointei* VAN HEURCK. Dissertation, Universität Bremen.
- WEIDEMANN, G. (1975) Optimierte Bestimmung und Eigenschaften der NADPH-abhängigen Glutathion-Reduktase im Serum. *Z.Klin.Chem.Klin. Biochem.* 123-128.
- WEISIGER, R.A. und FRIDOVICH, I. (1973) Mitochondrial Superoxide Dismutase Site of synthesis and intermitochondrial localization. *J.Biol.Chem.* 248, 4793-4796.
- WELLER, R. und SCHREMS, O. (1993) H₂O₂ in the marine troposphere and seawater of the atlantic and antarctic ocean (48°N-63°S). *Geophys.Res.Lett.* 20, 125-128.
- WILDI, B. und LÜTZ, C. (1996) Antioxidant composition of selected high alpine plant species from different altitudes. *Plant Cell Environ.* 19, 138-146.
- WILLEKENS, H., INZE, D., VANMONTAGU, M. und VANCAMP, W. (1995) Catalases in plants. *Mol.Breeding* 1, 207-228.
- WINKLER, U. und STABENAU, H. (1995) Isolation and characterization of peroxisomes from diatoms. *Planta* 195, 403-407.
- WOODBURY, W., SPENCER, A.K. und STAHMANN, M.A. (1971) An Improved Procedure Using Ferricyanide for Detecting Catalase Isozymes. *Anal. Biochem.* 44, 301-305.
- YAMAGUCHI, K., MORI, H. und NISHIMURA, M. (1995) A Novel Isoenzyme of Ascorbate Peroxidase Localized on Glyoxysomal and Leaf Peroxisomal Membranes in Pumpkin. *Plant Cell Physiol.* 36, 1157-1162.
- YOKOTA, A. (1992) Glycolate dehydrogenase and glycolate metabolism in *Euglena*. In: Stabenau, H. (Hrsg.) *Phylogenetic Changes in Peroxisomes of Algae Phylogeny of Plant Peroxisomes*. Oldenburg, Universität Oldenburg, 92-105.

ZEPP, R.G., SKURLATOV, Y.I. und PIERCE, J.T. (1986) Algal-Induced Decay and Formation of Hydrogen Peroxide in Water: Its Possible Role in Oxidation of Anilines by Algae. In: American Chemical Society Symposium Series 327, 215-224.

ZHANG, J. und KIRKHAM, M.B. (1996A) Enzymatic responses of the ascorbate-glutathione cycle to drought in sorghum and sunflower plants. *Plant Sci.* 113, 139-147.

ZHANG, J. und KIRKHAM, M.B. (1996B) Antioxidant responses to drought in sunflower and sorghum seedlings. *New Phytol.* 132, 361-373.

Danksagung

Ich bedanke mich bei Herrn Prof. Dr. Gunter O. Kirst (1. Gutachter meiner Dissertation, Vorsitzender des Promotionsausschusses), der mir meinen Wunsch, in der Meeresforschung zu dissertieren, erfüllte, mir Studenten anvertraute (Vielen Dank an Ute, meine Streßdiplomandin, Ascorbat- und Glutathion-Testentwicklerin, Microsoft-Excel-Fan) und mir zutraute, die gestreßten Eisalgen selbstverantwortlich zu untersuchen.

Herr Priv.-Doz. Dr. Christian Wiencke begutachtete meine Dissertation und bildete mit Herrn Prof. Dr. Wolfgang Heyser, Herrn Priv.-Doz. Dr. Dieter Hanelt, Herrn Dr. Oliver Nixdorf und Frau Vanessa Grabowski den Promotionsausschuß. Vielen Dank.

Der Arbeitsgruppe Kirst (angenehmes Arbeitsklima, trotz frostiger Temperaturen) danke ich für die logistische und praktische Unterstützung bei meiner Dissertation und die lustigen Mittagsrunden.

Ich bedanke mich bei Frau Vanessa Grabowski und Herrn Dr. Oliver Nixdorf (Abstract-, Poster- und Dissertationsleser, die biologischen Worte), Herrn Jochen Warlich (Meeresbotanik-Logo, Internetseite und AO-Poster), bei Frau Dr. Nicole Warlich (Mikroskopiekunst, Kunstfotographie), Herrn Dr. Jan Brix (biochemischer e-mail-Service) und Herrn Kai Schmidt (Scannen der Gele).

Von ganzen Herzen danke ich meinen Freunden und meiner Familie, die mich in Liebe begleiten und unterstützen.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft und der FNK der Universität Bremen danke ich für die finanzielle Unterstützung.

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

- **Sonderheft Nr. 1/1981** – „Die Antarktis und ihr Lebensraum“
Eine Einführung für Besucher – Herausgegeben im Auftrag von SCAR
- **Heft Nr. 1/1982** – „Die Filchner-Schelfeis-Expedition 1980/81“
zusammengestellt von Heinz Köhnen
- **Heft Nr. 2/1982** – „Deutsche Antarktis-Expedition 1980/81 mit FS ‚Meteor‘“
First International BIOMASS Experiment (FIBEX) – Liste der Zooplankton- und Mikronektonnetzfüge
zusammengestellt von Norbert Klages
- **Heft Nr. 3/1982** – „Digitale und analoge Krill-Echolot-Rohdatenerfassung an Bord des Forschungsschiffes ‚Meteor‘“ (im Rahmen von FIBEX 1980/81, Fahrtrabschnitt ANT III), von Bodo Morgenstern
- **Heft Nr. 4/1982** – „Filchner-Schelfeis-Expedition 1980/81“
Liste der Planktonfänge und Lichtstärkemessungen
zusammengestellt von Gerd Hubold und H. Eberhard Drescher
- **Heft Nr. 5/1982** – „Joint Biological Expedition on RRS ‚John Biscoe‘, February 1982“
by G. Hempel and R. B. Heywood
- **Heft Nr. 6/1982** – „Antarktis-Expedition 1981/82 (Unternehmen ‚Eiswarte‘)“
zusammengestellt von Gode Gravenhorst
- **Heft Nr. 7/1982** – „Marin-Biologisches Begleitprogramm zur Standorterkundung 1979/80 mit MS ‚Polar-
sirkef‘ (Pre-Site Survey)“ – Stationslisten der Mikronekton- und Zooplanktonfänge sowie der Bodenfischerei
zusammengestellt von R. Schneppenheim
- **Heft Nr. 8/1983** – „The Post-Fibex Data Interpretation Workshop“
by D. L. Cram and J. C. Freytag with the collaboration of J. W. Schmidt, M. Mall, R. Kresse, T. Schwinghammer
- **Heft Nr. 9/1983** – „Distribution of some groups of zooplankton in the inner Weddell Sea in summer 1979/80“
by I. Hempel, G. Hubold, B. Kaczmaruk, R. Keller, R. Weigmann-Haass
- **Heft Nr. 10/1983** – „Fluor im antarktischen Ökosystem“ – DFG-Symposium November 1982
zusammengestellt von Dieter Adelung
- **Heft Nr. 11/1983** – „Joint Biological Expedition on RRS ‚John Biscoe‘, February 1982 (II)“
Data of micronekton and zooplankton hauls, by Uwe Piatkowski
- **Heft Nr. 12/1983** – „Das biologische Programm der ANTARKTIS-I-Expedition 1983 mit FS ‚Polarstern‘“
Stationslisten der Plankton-, Benthos- und Grundsleppnetzfüge und Liste der Probennahme an Robben
und Vögeln, von H. E. Drescher, G. Hubold, U. Piatkowski, J. Plötz und J. Voß
- **Heft Nr. 13/1983** – „Die Antarktis-Expedition von MS ‚Polarbjörn‘ 1982/83“ (Sommerkampagne zur
Aika-Bucht und zu den Kraul-Bergen), zusammengestellt von Heinz Köhnen
- **Sonderheft Nr. 2/1983** – „Die erste Antarktis-Expedition von FS ‚Polarstern‘ (Kapstadt, 20. Januar 1983 –
Rio de Janeiro, 25. März 1983)“, Bericht des Fahrleiters Prof. Dr. Gotthilf Hempel
- **Sonderheft Nr. 3/1983** – „Sicherheit und Überleben bei Polarexpeditionen“
zusammengestellt von Heinz Köhnen
- **Heft Nr. 14/1983** – „Die erste Antarktis-Expedition (ANTARKTIS I) von FS ‚Polarstern‘ 1982/83“
herausgegeben von Gotthilf Hempel
- **Sonderheft Nr. 4/1983** – „On the Biology of Krill *Euphausia superba*“ – Proceedings of the Seminar
and Report of the Krill Ecology Group, Bremerhaven 12. - 16. May 1983, edited by S. B. Schnack
- **Heft Nr. 15/1983** – „German Antarctic Expedition 1980/81 with FRV ‚Walther Herwig‘ and RV ‚Meteor‘ –
First International BIOMASS Experiment (FIBEX) – Data of micronekton and zooplankton hauls
by Uwe Piatkowski and Norbert Klages
- **Sonderheft Nr. 5/1984** – „The observatories of the Georg von Neumayer Station“, by Ernst Augstein
- **Heft Nr. 16/1984** – „FIBEX cruise zooplankton data“
by U. Piatkowski, I. Hempel and S. Rakusa-Suszczewski
- **Heft Nr. 17/1984** – „Fahrbericht (cruise report) der ‚Polarstern‘-Reise ARKTIS I, 1983“
von E. Augstein, G. Hempel und J. Thiede
- **Heft Nr. 18/1984** – „Die Expedition ANTARKTIS II mit FS ‚Polarstern‘ 1983/84“,
Bericht von den Fahrtrabschnitten 1, 2 und 3, herausgegeben von D. Fütterer
- **Heft Nr. 19/1984** – „Die Expedition ANTARKTIS II mit FS ‚Polarstern‘ 1983/84“,
Bericht vom Fahrtrabschnitt 4, Punta Arenas-Kapstadt (Ant-II/4), herausgegeben von H. Köhnen
- **Heft Nr. 20/1984** – „Die Expedition ARKTIS II des FS ‚Polarstern‘ 1984, mit Beiträgen des FS ‚Valdivia‘
und des Forschungsflugzeuges ‚Falcon 20‘ zum Marginal Ice Zone Experiment 1984 (MIZEX)“
von E. Augstein, G. Hempel, J. Schwarz, J. Thiede und W. Weigel
- **Heft Nr. 21/1985** – „Euphausiid larvae in plankton from the vicinity of the Antarctic Peninsula,
February 1982“ by Sigrid Marschall and Elke Mizdalski
- **Heft Nr. 22/1985** – „Maps of the geographical distribution of macrozooplankton in the Atlantic sector of
the Southern Ocean“ by Uwe Piatkowski
- **Heft Nr. 23/1985** – „Untersuchungen zur Funktionsmorphologie und Nahrungsaufnahme der Larven
des Antarktischen Krills *Euphausia superba* Dana“ von Hans-Peter Marschall

- Heft Nr. 24/1985** – „Untersuchungen zum Periglazial auf der König-Georg-Insel Südshetlandinseln/ Antarktika. Deutsche physiogeographische Forschungen in der Antarktis. – Bericht über die Kampagne 1983/84“ von Dietrich Barsch, Wolf-Dieter Blümel, Wolfgang Flügel, Roland Mäusbacher, Gerhard Stäblein, Wolfgang Zick
- **Heft Nr. 25/1985** – „Die Expedition ANTARKTIS III mit FS ‚Polarstern‘ 1984/1985“ herausgegeben von Gotthilf Hempel.
 - **Heft Nr. 26/1985** – „The Southern Ocean“; A survey of oceanographic and marine meteorological research work by Hellmer et al.
 - **Heft Nr. 27/1986** – „Spätpleistozäne Sedimentationsprozesse am antarktischen Kontinentalhang vor Kapp Norvegia, östliche Weddell-See“ von Hannes Grobe
 - **Heft Nr. 28/1986** – „Die Expedition ARKTIS III mit ‚Polarstern‘ 1985 mit Beiträgen der Fahrtteilnehmer, herausgegeben von Rainer Gersonde
 - **Heft Nr. 29/1986** – „5 Jahre Schwerpunktprogramm ‚Antarktisforschung‘ der Deutschen Forschungsgemeinschaft.“ Rückblick und Ausblick. Zusammengestellt von Gotthilf Hempel, Sprecher des Schwerpunktprogramms
 - **Heft Nr. 30/1986** – „The Meteorological Data of the Georg-von-Neumayer-Station for 1981 and 1982“ by Marianne Gube and Friedrich Obleitner
 - **Heft Nr. 31/1986** – „Zur Biologie der Jugendstadien der Notothenioiden (Pisces) an der Antarktischen Halbinsel“ von A. Kellermann
 - **Heft Nr. 32/1986** – „Die Expedition ANTARKTIS IV mit FS ‚Polarstern‘ 1985/86“ mit Beiträgen der Fahrtteilnehmer, herausgegeben von Dieter Fütterer
 - **Heft Nr. 33/1987** – „Die Expedition ANTARKTIS-IV mit FS ‚Polarstern‘ 1985/86 – Bericht zu den Fahrtabschnitten ANT-IV/3-4“ von Dieter Karl Fütterer
 - **Heft Nr. 34/1987** – „Zoogeographische Untersuchungen und Gemeinschaftsanalysen an antarktischen Makroplankton“ von U. Piatkowski
 - **Heft Nr. 35/1987** – „Zur Verbreitung des Meso- und Makrozooplanktons in Oberflächenwasser der Weddell See (Antarktis)“ von E. Boysen-Ennen
 - **Heft Nr. 36/1987** – „Zur Nahrungs- und Bewegungsphysiologie von *Salpa thompsoni* und *Salpa fusiformis*“ von M. Reinke
 - **Heft Nr. 37/1987** – „The Eastern Weddell Sea Drifting Buoy Data Set of the Winter Weddell Sea Project (WWSP)“ 1986 by Heinrich Hoerber und Marianne Gube-Lehnhardt
 - **Heft Nr. 38/1987** – „The Meteorological Data of the Georg von Neumayer Station for 1983 and 1984“ by M. Gube-Lehnhardt
 - **Heft Nr. 39/1987** – „Die Winter-Expedition mit FS ‚Polarstern‘ in die Antarktis (ANT V/1-3)“ herausgegeben von Sigrid Schnack-Schiel
 - **Heft Nr. 40/1987** – „Weather and Synoptic Situation during Winter Weddell Sea Project 1986 (ANT V/2) July 16 - September 10, 1986“ by Werner Rabe
 - **Heft Nr. 41/1988** – „Zur Verbreitung und Ökologie der Seegurken im Weddellmeer (Antarktis)“ von Julian Gutt
 - **Heft Nr. 42/1988** – „The zooplankton community in the deep bathyal and abyssal zones of the eastern North Atlantic“ by Werner Beckmann
 - **Heft Nr. 43/1988** – „Scientific cruise report of Arctic Expedition ARK IV/3“ Wissenschaftlicher Fahrtbericht der Arktis-Expedition ARK IV/3, compiled by Jörn Thiede
 - **Heft Nr. 44/1988** – „Data Report for FV ‚Polarstern‘ Cruise ARK IV/1, 1987 to the Arctic and Polar Fronts“ by Hans-Jürgen Hirche
 - **Heft Nr. 45/1988** – „Zoogeographie und Gemeinschaftsanalyse des Makrozoobenthos des Weddellmeeres (Antarktis)“ von Joachim Voß
 - **Heft Nr. 46/1988** – „Meteorological and Oceanographic Data of the Winter-Weddell-Sea Project 1986 (ANT V/3)“ by Eberhard Fahrbach
 - **Heft Nr. 47/1988** – „Verteilung und Herkunft glazial-mariner Gerölle am Antarktischen Kontinentalrand des östlichen Weddellmeeres“ von Wolfgang Oskierski
 - **Heft Nr. 48/1988** – „Variationen des Erdmagnetfeldes an der GvN-Station“ von Arnold Brodscholl
 - **Heft Nr. 49/1988** – „Zur Bedeutung der Lipide im antarktischen Zooplankton“ von Wilhelm Hagen
 - **Heft Nr. 50/1988** – „Die gezeitenbedingte Dynamik des Ekström-Schelfeises, Antarktis“ von Wolfgang Kobarg
 - **Heft Nr. 51/1988** – „Ökomorphologie nototheniider Fische aus dem Weddellmeer, Antarktis“ von Werner Ekau
 - **Heft Nr. 52/1988** – „Zusammensetzung der Bodenfauna in der westlichen Fram-Straße“ von Dieter Piepenburg
 - **Heft Nr. 53/1988** – „Untersuchungen zur Ökologie des Phytoplanktons im südöstlichen Weddellmeer (Antarktis) im Jan./Febr. 1985“ von Eva-Maria Nöthig
 - **Heft Nr. 54/1988** – „Die Fischfauna des östlichen und südlichen Weddellmeeres: geographische Verbreitung, Nahrung und trophische Stellung der Fischarten“ von Wiebke Schwarzbach
 - **Heft Nr. 55/1988** – „Weight and length data of zooplankton in the Weddell Sea in austral spring 1986 (Ant. V/3)“ by Elke Mizdalski
 - **Heft Nr. 56/1989** – „Scientific cruise report of Arctic expeditions ARK IV/1, 2 & 3“ by G. Krause, J. Meinke und J. Thiede

- Heft Nr. 57/1989** – „Die Expedition ANTARKTIS V mit FS ‚Polarstern‘ 1986/87“
Bericht von den Fahrtabschnitten ANT V/4-5 von H. Miller und H. Oerter
- **Heft Nr. 58/1989** – „Die Expedition ANTARKTIS VI mit FS ‚Polarstern‘ 1987/88“
von D. K. Fütterer
 - Heft Nr. 59/1989** – „Die Expedition ARKTIS V/1a, 1b und 2 mit FS ‚Polarstern‘ 1988“
von M. Spindler
 - Heft Nr. 60/1989** – „Ein zweidimensionales Modell zur thermohalinen Zirkulation unter dem Schelfeis“
von H. H. Hellmer
 - Heft Nr. 61/1989** – „Die Vulkanite im westlichen und mittleren Neuschwabenland, Vestfjella und Ahlmannryggen, Antarktika“ von M. Peters
 - **Heft Nr. 62/1989** – „The Expedition ANTARKTIS VII/1 and 2 (EPOS I) of RV ‚Polarstern‘
in 1988/89“, by I. Hempel
 - Heft Nr. 63/1989** – „Die Eisalgenflora des Weddellmeeres (Antarktis): Artenzusammensetzung und Biomasse
sowie Ökophysiologie ausgewählter Arten“ von Annette Bartsch
 - Heft Nr. 64/1989** – „Meteorological Data of the G.-v.-Neumayer-Station (Antarctica)“ by L. Helmes
 - Heft Nr. 65/1989** – „Expedition Antarktis VII/3 in 1988/89“ by I. Hempel, P. H. Schalk, V. Smetacek
 - Heft Nr. 66/1989** – „Geomorphologisch-glaziologische Detailkartierung
des arid-hochpolaren Borgmassivet, Neuschwabenland, Antarktika“ von Karsten Brunk
 - Heft Nr. 67/1990** – „Identification key and catalogue of larval Antarctic fishes“,
edited by Adolf Kellermann
 - Heft Nr. 68/1990** – „The Expedition Antarktis VII/4 (Epos leg 3) and VII/5 of RV ‚Polarstern‘ in 1989“,
edited by W. Arntz, W. Ernst, I. Hempel
 - Heft Nr. 69/1990** – „Abhängigkeiten elastischer und rheologischer Eigenschaften des Meereises vom
Eisgefüge“, von Harald Hellmann
 - **Heft Nr. 70/1990** – „Die besetzten benthischen Mollusken (Gastropoda und Bivalvia) des
Weddellmeeres, Antarktis“, von Stefan Hain
 - Heft Nr. 71/1990** – „Sedimentologie und Paläomagnetik an Sedimenten der Maudkuppe (Nordöstliches
Weddellmeer)“, von Dieter Cordes
 - Heft Nr. 72/1990** – „Distribution and abundance of planktonic copepods (Crustacea) in the Weddell Sea
in summer 1980/81“, by F. Kurbjeweit and S. Ali-Khan
 - Heft Nr. 73/1990** – „Zur Frühdiagenese von organischem Kohlenstoff und Opal in Sedimenten des südlichen
und östlichen Weddellmeeres“, von M. Schlüter
 - Heft Nr. 74/1990** – „Expeditionen ANTARKTIS-VIII/3 und VIII/4 mit FS ‚Polarstern‘ 1989“
von Rainer Gersonde und Gotthilf Hempel
 - Heft Nr. 75/1991** – „Quartäre Sedimentationsprozesse am Kontinentalhang des Süd-Orkey-Plateaus im
nordwestlichen Weddellmeer (Antarktis)“, von Sigrun Grünig
 - Heft Nr. 76/1990** – „Ergebnisse der faunistischen Arbeiten im Benthal von King George Island
(Südschottlandinseln, Antarktis)“, von Martin Rauschert
 - Heft Nr. 77/1990** – „Verteilung von Mikroplankton-Organismen nordwestlich der Antarktischen Halbinsel
unter dem Einfluß sich ändernder Umweltbedingungen im Herbst“, von Heinz Klöser
 - Heft Nr. 78/1991** – „Hochauflösende Magnetostratigraphie spätquartärer Sedimente arktischer
Meeresgebiete“, von Norbert R. Nowaczyk
 - Heft Nr. 79/1991** – „Ökophysiologische Untersuchungen zur Salinitäts- und Temperaturtoleranz
antarktischer Grünalgen unter besonderer Berücksichtigung des β -Dimethylsulfoniumpropionat
(DMSP) - Stoffwechsels“, von Ulf Karsten
 - Heft Nr. 80/1991** – „Die Expedition ARKTIS VII/1 mit FS ‚Polarstern‘ 1990“,
herausgegeben von Jörn Thiede und Gotthilf Hempel
 - Heft Nr. 81/1991** – „Paläoglazialogie und Paläozoanographie im Spätquartär am Kontinentalrand des
südlichen Weddellmeeres, Antarktis“, von Martin Melles
 - Heft Nr. 82/1991** – „Quantifizierung von Meereseigenschaften: Automatische Bildanalyse von
Dünnschnitten und Parametrisierung von Chlorophyll- und Salzgehaltsverteilungen“, von Hajo Eicken
 - Heft Nr. 83/1991** – „Das Fließen von Schelfeisen - numerische Simulationen
mit der Methode der finiten Differenzen“, von Jürgen Determann
 - Heft Nr. 84/1991** – „Die Expedition ANTARKTIS-VIII/1-2, 1989 mit der Winter Weddell Gyre Study
der Forschungsschiffe ‚Polarstern‘ und ‚Akademik Fedorov‘“, von Ernst Augstein,
Nikolai Bagriantsev und Hans Werner Schenke
 - Heft Nr. 85/1991** – „Zur Entstehung von Unterwassereis und das Wachstum und die Energiebilanz
des Meereises in der Atka Bucht, Antarktis“, von Josef Kipfstuhl
 - **Heft Nr. 86/1991** – „Die Expedition ANTARKTIS-VIII mit FS ‚Polarstern‘ 1989/90. Bericht vom
Fahrtabschnitt ANT-VIII/5“, von Heinz Miller und Hans Oerter
 - Heft Nr. 87/1991** – „Scientific cruise reports of Arctic expeditions ARK VI/1-4 of RV ‚Polarstern‘
in 1989“, edited by G. Krause, J. Meincke & H. J. Schwarz
 - Heft Nr. 88/1991** – „Zur Lebensgeschichte dominanter Copepodenarten (*Calanus finmarchicus*,
C. glacialis, *C. hyperboreus*, *Metridia longa*) in der Framstraße“, von Sabine Diel

- Heft Nr. 89/1991** – „Detaillierte seismische Untersuchungen am östlichen Kontinentalrand des Weddell-Meereres vor Kapp Norvegia, Antarktis“, von Norbert E. Kaul
- Heft Nr. 90/1991** – „Die Expedition ANTARKTIS-VIII mit FS ‚Polarstern‘ 1989/90. Bericht von den Fahrtabschnitten ANT-VIII/6-7“, herausgegeben von Dieter Karl Fütterer und Otto Schrems
- Heft Nr. 91/1991** – “Blood physiology and ecological consequences in Weddell Sea fishes (Antarctica)”, by Andreas Kunzmann
- Heft Nr. 92/1991** – „Zur sommerlichen Verteilung des Mesozooplanktons im Nansen-Becken, Nordpolarmeer“, von Nicolai Mumm
- Heft Nr. 93/1991** – „Die Expedition ARKTIS VII mit FS ‚Polarstern‘, 1990. Bericht vom Fahrtabschnitt ARK VII/2“, herausgegeben von Gunther Krause
- Heft Nr. 94/1991** – „Die Entwicklung des Phytoplanktons im östlichen Weddellmeer (Antarktis) beim Übergang vom Spätwinter zum Frühjahr“, von Renate Scharek
- Heft Nr. 95/1991** – „Radioisotopenstratigraphie, Sedimentologie und Geochemie jungquartärer Sedimente des östlichen Arktischen Ozeans“, von Horst Bohrmann
- Heft Nr. 96/1991** – „Holozäne Sedimentationsentwicklung im Scoresby Sund, Ost-Grönland“, von Peter Marienfeld
- Heft Nr. 97/1991** – „Strukturelle Entwicklung und Abkühlungsgeschichte von Heimefrontfjella (Westliches Dronning Maud Land/Antarktika)“, von Joachim Jacobs
- Heft Nr. 98/1991** – „Zur Besiedlungsgeschichte des antarktischen Schelfeis am Beispiel der Isopoda (Crustacea, Malacostraca)“, von Angelika Brandt
- * **Heft Nr. 99/1992** – “The Antarctic ice sheet and environmental change: a three-dimensional modelling study”, by Philippe Huybrechts
 - * **Heft Nr. 100/1992** – „Die Expeditionen ANTARKTIS IX/1-4 des Forschungsschiffes ‚Polarstern‘ 1990/91“ herausgegeben von Ulrich Bathmann, Meinhard Schulz-Baldes, Eberhard Fahrbach, Victor Smetacek und Hans-Wolfgang Hubberten
 - Heft Nr. 101/1992** – „Wechselbeziehungen zwischen Schwermetallkonzentrationen (Cd, Cu, Pb, Zn) im Meerwasser und in Zooplanktonorganismen (Copepoda) der Arktis und des Atlantiks“, von Christa Pohl
 - Heft Nr. 102/1992** – „Physiologie und Ultrastruktur der antarktischen Grünalge *Prasiola crispa* ssp. *antarctica* unter osmotischem Streß und Austrocknung“, von Andreas Jacob
 - * **Heft Nr. 103/1992** – „Zur Ökologie der Fische im Weddellmeer“, von Gerd Hubold
 - Heft Nr. 104/1992** – „Mehrkanaelige adaptive Filter für die Unterdrückung von multiplen Reflexionen in Verbindung mit der freien Oberfläche in marinen Seismogrammen“, von Andreas Rosenberger
 - Heft Nr. 105/1992** – “Radiation and Eddy Flux Experiment 1991 (REFLEX I)”, von Jörg Hartmann, Christoph Kottmeier und Christian Wamser
 - Heft Nr. 106/1992** – „Ostracoden im Epipelagial vor der Antarktischen Halbinsel - ein Beitrag zur Systematik sowie zur Verbreitung und Populationsstruktur unter Berücksichtigung der Saisonalität“, von Rüdiger Kock
 - * **Heft Nr. 107/1992** – „ARCTIC '91: Die Expedition ARK-VIII/3 mit FS ‚Polarstern‘ 1991“, von Dieter K. Fütterer
 - Heft Nr. 108/1992** – „Dehnungsbeben an einer Störungszone im Ekström-Schelfeis nördlich der Georg-von-Neumayer-Station, Antarktis. – Eine Untersuchung mit seismologischen und geodätischen Methoden“, von Uwe Nixdorf.
 - * **Heft Nr. 109/1992** – „Spätquartäre Sedimentation am Kontinentalrand des südöstlichen Weddellmeeres, Antarktis“, von Michael Weber.
 - * **Heft Nr. 110/1992** – „Sedimentfazies und Bodenwasserstrom am Kontinentalhang des norwestlichen Weddellmeeres“, von Isa Brehme.
 - Heft Nr. 111/1992** – „Die Lebensbedingungen in den Solekanälchen des antarktischen Meereises“, von Jürgen Weissenberger.
 - Heft Nr. 112/1992** – „Zur Taxonomie von rezenten benthischen Foraminiferen aus dem Nansen Becken, Arktischer Ozean“, von Jutta Wollenburg.
 - Heft Nr. 113/1992** – „Die Expedition ARKTIS VIII/1 mit FS ‚Polarstern‘ 1991“, herausgegeben von Gerhard Kattner.
 - * **Heft Nr. 114/1992** – „Die Gründungsphase deutscher Polarforschung, 1865 - 1875“, von Reinhard A. Krause.
 - Heft Nr. 115/1992** – “Scientific Cruise Report of the 1991 Arctic Expedition ARK VIII/2 of RV ‚Polarstern‘ (EPOS II)”, by Eike Rachor.
 - Heft Nr. 116/1992** – “The Meteorological Data of the Georg-von-Neumayer-Station (Antarctica) for 1988, 1989, 1990 and 1991”, by Gert König-Langlo.
 - Heft Nr. 117/1992** – „Petrogenese des metamorphen Grundgebirges der zentralen Heimefrontfjella (westliches Dronning Maud Land / Antarktis)“, von Peter Schulze.
 - Heft Nr. 118/1993** – „Die mafischen Gänge der Shackleton Range / Antarktika: Petrographie, Geochemie, Isotopengeochemie und Paläomagnetik“, von Rüdiger Hotten.
 - * **Heft Nr. 119/1993** – „Gefrierschutz bei Fischen der Polarmeere“, von Andreas P. A. Wöhrmann.
 - * **Heft Nr. 120/1993** – “East Siberian Arctic Region Expedition '92: The Laptev Sea - its Significance for Arctic Sea-Ice Formation and Transpolar Sediment Flux”, by D. Dethleff, D. Nürnberg, E. Reimnitz, M. Saarso and Y. P. Saachenko. – “Expedition to Novaja Zemlja and Franz Josef Land with RV ‚Dalnie Zelentsy““, by D. Nürnberg and E. Groth.

- * **Heft Nr. 121/1993** – „Die Expedition ANTARKTIS X/3 mit FS ‚Polarstern‘ 1992“, herausgegeben von Michael Spindler, Gerhard Dieckmann und David Thomas
- Heft Nr. 122/1993** – „Die Beschreibung der Korngestalt mit Hilfe der Fourier-Analyse: Parametrisierung der morphologischen Eigenschaften von Sedimentpartikeln“, von Michael Diepenbroek.
- * **Heft Nr. 123/1993** – „Zerstörungsfreie hochauflösende Dichteuntersuchungen mariner Sedimente“, von Sebastian Gerland.
- Heft Nr. 124/1993** – „Umsatz und Verteilung von Lipiden in arktischen marinen Organismen unter besonderer Berücksichtigung unterer trophischer Stufen“, von Martin Graeve.
- Heft Nr. 125/1993** – „Ökologie und Respiration ausgewählter arktischer Bodenfischarten“, von Christian F. von Dorrien.
- Heft Nr. 126/1993** – „Quantitative Bestimmung von Paläoumweltparametern des Antarktischen Oberflächenwassers im Spätquartier anhand von Transferfunktionen mit Diatomeen“, von Ulrich Zielinski
- * **Heft Nr. 127/1993** – „Sedimenttransport durch das arktische Meereis: Die rezente lithogene und biogene Materialfracht“, von Ingo Wollenburg.
- Heft Nr. 128/1993** – „Cruise ANTARKTIS X/3 of RV ‚Polarstern‘: CTD-Report“, von Marek Zwierz.
- Heft Nr. 129/1993** – „Reproduktion und Lebenszyklen dominanter Copepodenarten aus dem Weddellmeer, Antarktis“, von Frank Kurbjeweit
- Heft Nr. 130/1993** – „Untersuchungen zu Temperaturregime und Massenhaushalt des Filchner-Ronne-Schelfeises, Antarktis, unter besonderer Berücksichtigung von Anfríer- und Abschmelzprozessen“, von Klaus Grosfeld
- Heft Nr. 131/1993** – „Die Expedition ANTARKTIS X/5 mit FS ‚Polarstern‘ 1992“, herausgegeben von Rainer Gersonde
- Heft Nr. 132/1993** – „Bildung und Abgabe kurzketziger halogener Kohlenwasserstoffe durch Makroalgen der Polarregionen“, von Frank Laturnus
- Heft Nr. 133/1994** – „Radiation and Eddy Flux Experiment 1993 (REFLEX II)“, by Christoph Koltmeier, Jörg Hartmann, Christian Wamser, Axel Bochert, Christof Lüpkes, Dietmar Freese and Wolfgang Cohrs
- * **Heft Nr. 134/1994** – „The Expedition ARKTIS-IX/1“, edited by Hajo Eicken and Jens Meincke
- Heft Nr. 135/1994** – „Die Expeditionen ANTARKTIS X/6-8“, herausgegeben von Ulrich Bathmann, Victor Smetacek, Hein de Baar, Eberhard Fahrbach und Gunter Krause
- Heft Nr. 136/1994** – „Untersuchungen zur Ernährungsökologie von Kaiserpinguinen (*Aptenodytes forsteri*) und Königspinguinen (*Aptenodytes patagonicus*)“, von Klemens Pütz
- * **Heft Nr. 137/1994** – „Die kánozoische Vereisungsgeschichte der Antarktis“, von Werner U. Ehrmann
- Heft Nr. 138/1994** – „Untersuchungen stratosphärischer Aerosole vulkanischen Ursprungs und polarer stratosphärischer Wolken mit einem Mehrwellenlängen-Lidar auf Spitzbergen (79° N, 12° E)“, von Georg Beyerle
- Heft Nr. 139/1994** – „Charakterisierung der Isopodenfauna (Crustacea, Malacostraca) des Scotia-Bogens aus biogeographischer Sicht: Ein multivariater Ansatz“, von Holger Winkler.
- Heft Nr. 140/1994** – „Die Expedition ANTARKTIS X/4 mit FS ‚Polarstern‘ 1992“, herausgegeben von Peter Lemke
- Heft Nr. 141/1994** – „Satellitenaltimetrie über Eis – Anwendung des GEOSAT-Altimeters über dem Ekströmisen, Antarktis“, von Clemens Heidland
- Heft Nr. 142/1994** – „The 1993 Northeast Water Expedition. Scientific cruise report of RV ‚Polarstern‘ Arctic cruises ARK IX/2 and 3, USCG ‚Polar Bear‘ cruise NEWP and the NEWLand expedition“, edited by Hans-Jürgen Hirche and Gerhard Kattner
- Heft Nr. 143/1994** – „Detaillierte refraktionsseismische Untersuchungen im inneren Scoresby Sund Ost-Grönland“, von Notker Fechner
- Heft Nr. 144/1994** – „Russian-German Cooperation in the Siberian Shelf Seas: Geo-System Laptev Sea“, edited by Heidemarie Kassens, Hans-Wolfgang Hubberten, Sergey M. Pryamikov and Rüdiger Stein
- * **Heft Nr. 145/1994** – „The 1993 Northeast Water Expedition. Data Report of RV ‚Polarstern‘ Arctic Cruises IX/2 and 3“, edited by Gerhard Kattner and Hans-Jürgen Hirche.
- Heft Nr. 146/1994** – „Radiation Measurements at the German Antarctic Station Neumayer 1982 - 1992“, by Torsten Schmidt and Gerd König-Langlo.
- Heft Nr. 147/1994** – „Krustenstrukturen und Verlauf des Kontinentalrandes im Weddell-See / Antarktis“, von Christian Hübscher.
- * **Heft Nr. 148/1994** – „The expeditions NORILSK/TAYMYR 1993 and BUNGER OASIS 1993/94 of the AWI Research Unit Potsdam“, edited by Martin Melles.
- ** **Heft Nr. 149/1994** – „Die Expedition ARCTIC '93. Der Fahrtabschnitt ARK-IX/4 mit FS ‚Polarstern‘ 1993“, herausgegeben von Dieter K. Fütterer.
- Heft Nr. 150/1994** – „Der Energiebedarf der Pygoscelis-Pinguine: eine Synopse“, von Boris M. Culik.
- Heft Nr. 151/1994** – „Russian-German Cooperation: The Transdrift I Expedition to the Laptev Sea“, edited by Heidemarie Kassens and Valeriy Y. Karpiy.
- Heft Nr. 152/1994** – „Die Expedition ANTARKTIS-X mit FS ‚Polarstern‘ 1992. Bericht von den Fahrtabschnitten / ANT-X / 1a und 2“, herausgegeben von Heinz Miller.
- Heft Nr. 153/1994** – „Aminosäuren und Huminstoffe im Stickstoffkreislauf polarer Meere“, von Ulrike Hubberten.
- Heft Nr. 154/1994** – „Regional and seasonal variability in the vertical distribution of mesozooplankton in the Greenland Sea“, by Claudio Richter.

- Heft Nr. 155/1995** – „Benthos in polaren Gewässern“, herausgegeben von Christian Wiencke und Wolf Arntz.
- Heft Nr. 156/1995** – „An adjoint model for the determination of the mean oceanic circulation, air-sea fluxes and mixing coefficients“, by Reiner Schlitzer.
- Heft Nr. 157/1995** – „Biochemische Untersuchungen zum Lipidstoffwechsel antarktischer Copepoden“, von Kirsten Fahl.
- **Heft Nr. 158/1995** – „Die Deutsche Polarforschung seit der Jahrhundertwende und der Einfluß Erich von Drygalskis“, von Cornelia Lüdecke.
 - **Heft Nr. 159/1995** – „The distribution of $\delta^{18}\text{O}$ in the Arctic Ocean: Implications for the freshwater balance of the halocline and the sources of deep and bottom waters“, by Dorothea Bauch.
 - **Heft Nr. 160/1995** – „Rekonstruktion der spätquartären Tiefenwasserzirkulation und Produktivität im östlichen Südatlantik anhand von benthischen Foraminiferenvergesellschaftungen“, von Gerhard Schmiedl.
 - Heft Nr. 161/1995** – „Der Einfluß von Salinität und Lichtintensität auf die Osmolytkonzentrationen, die Zellvolumina und die Wachstumsraten der antarktischen Eisdiatomeen *Chaetoceros sp.* und *Navicula sp.* unter besonderer Berücksichtigung der Aminosäure Prolin“, von Jürgen Nothnagel.
 - Heft Nr. 162/1995** – „Meereistransportiertes lithogenes Feinmaterial in spätquartären Tiefseesedimenten des zentralen östlichen Arktischen Ozeans und der Framstraße“, von Thomas Letzig.
 - Heft Nr. 163/1995** – „Die Expedition ANTARKTIS-XI/2 mit FS ‚Polarstern‘ 1993/94“, herausgegeben von Rainer Gersonde.
 - Heft Nr. 164/1995** – „Regionale und altersabhängige Variation gesteinsmagnetischer Parameter in marinen Sedimenten der Arktis“, von Thomas Frederichs.
 - Heft Nr. 165/1995** – „Vorkommen, Verteilung und Umsatz biogener organischer Spurenstoffe: Sterole in antarktischen Gewässern“, von Georg Hanke.
 - Heft Nr. 166/1995** – „Vergleichende Untersuchungen eines optimierten dynamisch-thermodynamischen Meereismodells mit Beobachtungen im Weddellmeer“, von Holger Fischer.
 - **Heft Nr. 167/1995** – „Rekonstruktionen von Paläo-Umweltparametern anhand von stabilen Isotopen und Faunen-Vergesellschaftungen planktischer Foraminiferen im Südatlantik“, von Hans-Stefan Niebler
 - Heft Nr. 168/1995** – „Die Expedition ANTARKTIS XII mit FS ‚Polarstern‘ 1993/94. Bericht von den Fahrtabschnitten ANT XII/1 und 2“, herausgegeben von Gerhard Kattner und Dieter Karl Fütterer
 - Heft Nr. 169/1995** – „Medizinische Untersuchung zur Circadianrhythmik und zum Verhalten bei Überwinterern auf einer antarktischen Forschungsstation“, von Hans Wortmann
 - Heft-Nr. 170/1995** – DFG-Kolloquium: Terrestrische Geowissenschaften – Geologie und Geophysik der Antarktis.
 - Heft Nr. 171/1995** – „Strukturentwicklung und Petrogenese des metamorphen Grundgebirges der nördlichen Heimfrontfjella (westliches Dronning Maud Land/Antarktika)“, von Wilfried Bauer.
 - Heft Nr. 172/1995** – „Die Struktur der Erdkruste im Bereich des Scoresby Sund, Ostgrönland: Ergebnisse refraktionseismischer und gravimetrischer Untersuchungen“, von Holger Mandler.
 - Heft Nr. 173/1995** – „Paläozoische Akkretion am paläopazifischen Kontinentalrand der Antarktis in Nordvictorialand – P-T-D-Geschichte und Deformationsmechanismen im Bowers Terrane“, von Stefan Matzer.
 - Heft Nr. 174/1995** – „The Expedition ARKTIS-X/2 of RV ‚Polarstern‘ in 1994“, edited by Hans-W. Hubberten
 - Heft Nr. 175/1995** – „Russian-German Cooperation: The Expedition TAYMYR 1994“, edited by Christine Siegert and Gmitry Bolshiyarov.
 - **Heft Nr. 176/1995** – „Russian-German Cooperation: Laptev Sea System“, edited by Heidemarie Kassens, Dieter Piepenburg, Jörn Thiede, Leonid Timokhov, Hans-Wolfgang Hubberten and Sergey M. Priamikov.
 - Heft Nr. 177/1995** – „Organischer Kohlenstoff in spätquartären Sedimenten des Arktischen Ozeans: Terrigener Eintrag und marine Produktivität“, von Carsten J. Schubert
 - Heft Nr. 178/1995** – „Cruise ANTARKTIS XII/4 of RV ‚Polarstern‘ in 1995: CTD-Report“, by Jüri Sildam.
 - Heft Nr. 179/1995** – „Benthische Foraminiferenfaunen als Wassermassen-, Produktions- und Eisdriftnanzeiger im Arktischen Ozean“, von Jutta Wollenburg.
 - Heft Nr. 180/1995** – „Biogenopal und biogenes Barium als Indikatoren für spätquartäre Produktivitätsänderungen am antarktischen Kontinentalhang, atlantischer Sektor“, von Wolfgang J. Bonn.
 - Heft Nr. 181/1995** – „Die Expedition ARKTIS X/1 des Forschungsschiffes ‚Polarstern‘ 1994“, herausgegeben von Eberhard Fahrbach.
 - Heft Nr. 182/1995** – „Laptev Sea System: Expeditions in 1994“, edited by Heidemarie Kassens.
 - Heft Nr. 183/1995** – „Interpretation digitaler Parasound Echolotaufzeichnungen im östlichen Arktischen Ozean auf der Grundlage physikalischer Sedimenteigenschaften“, von Uwe Bergmann.
 - Heft Nr. 184/1995** – „Distribution and dynamics of inorganic nitrogen compounds in the troposphere of continental, coastal, marine and Arctic areas“, by Maria Dolores Andrés Hernández.
 - Heft Nr. 185/1995** – „Verbreitung und Lebensweise der Aphroditen und Polynoiden (Polychaeta) im östlichen Weddellmeer und im Lazarevmeer (Antarktis)“, von Michael Stiller.
 - Heft Nr. 186/1995** – „Reconstruction of Late Quaternary environmental conditions applying the natural radionuclides ^{230}Th , ^{210}Pb , ^{210}Po and ^{239}Pu : A study of deep-sea sediments from the eastern sector of the Antarctic Circumpolar Current System“, by Martin Frank.
 - Heft Nr. 187/1995** – „The Meteorological Data of the Neumayer Station (Antarctica) for 1992, 1993 and 1994“, by Gert König-Langlo and Andreas Herber.
 - Heft Nr. 188/1995** – „Die Expedition ANTARKTIS-XI/3 mit FS ‚Polarstern‘ 1994“, herausgegeben von Heinz Müller und Hannes Grobe.
 - Heft Nr. 189/1995** – „Die Expedition ARKTIS-VII/3 mit FS ‚Polarstern‘ 1990“, herausgegeben von Heinz Müller und Hannes Grobe

- Heft Nr. 190/1996** – "Cruise report of the Joint Chilean-German-Italian Magellan 'Victor Hensen' Campaign in 1994", edited by Wolf Arntz and Matthias Gorny.
- Heft Nr. 191/1996** – „Leitfähigkeits- und Dichtemessung an Eisbohrkernen“, von Frank Wilhelms.
- Heft Nr. 192/1996** – „Photosynthese-Charakteristika und Lebensstrategie antarktischer Makroalgen“, von Gabriele Weykam.
- Heft Nr. 193/1996** – „Heterogene Reaktionen von N_2O_5 und HBr und ihr Einfluß auf den Ozonabbau in der polaren Stratosphäre“, von Sabine Seisel.
- Heft Nr. 194/1996** – „Ökologie und Populationsdynamik antarktischer Ophiuroiden (Echinodermata)“, von Corinna Dahm.
- Heft Nr. 195/1996** – „Die planktische Foraminifere *Neogloboquadrina pachyderma* (Ehrenberg) im Weddellmeer, Antarktis“, von Doris Berberich.
- Heft Nr. 196/1996** – „Untersuchungen zum Beitrag chemischer und dynamischer Prozesse zur Variabilität des stratosphärischen Ozons über der Arktis“, von Birgit Heese.
- Heft Nr. 197/1996** – "The Expedition ARKTIS-XI/2 of 'Polarstern' in 1995", edited by Gunther Krause.
- Heft Nr. 198/1996** – „Geodynamik des Westantarktischen Riftsystems basierend auf Apatit-Spaltspuranalysen“, von Frank Lisker.
- Heft Nr. 199/1996** – "The 1993 Northeast Water Expedition. Data Report on CTD Measurements of RV 'Polarstern' Cruises ARKTIS IX/2 and 3", by Gerion Budéus and Wolfgang Schneider.
- Heft Nr. 200/1996** – "Stability of the Thermohaline Circulation in analytical and numerical models", by Gerrit Lohmann.
- Heft Nr. 201/1996** – „Trophische Beziehungen zwischen Makroalgen und Herbivoren in der Potter Cove (King George-Insel, Antarktis)“, von Katrin Iken.
- Heft Nr. 202/1996** – „Zur Verbreitung und Respiration ökologisch wichtiger Bodentiere in den Gewässern um Svalbard (Arktis)“, von Michael K. Schmid.
- Heft Nr. 203/1996** – „Dynamik, Rauigkeit und Alter des Meereises in der Arktis – Numerische Untersuchungen mit einem großskaligen Modell“, von Markus Harder.
- Heft Nr. 204/1996** – „Zur Parametrisierung der stabilen atmosphärischen Grenzschicht über einem antarktischen Schelfeis“, von Dörthe Handorf.
- Heft Nr. 205/1996** – "Textures and fabrics in the GRIP ice core, in relation to climate history and ice deformation", by Thorsteinn Thorsteinsson.
- Heft Nr. 206/1996** – „Der Ozean als Teil des gekoppelten Klimasystems: Versuch der Rekonstruktion der glazialen Zirkulation mit verschiedenen komplexen Atmosphärenkomponenten“, von Kerstin Fiebig.
- Heft Nr. 207/1996** – „Lebensstrategien dominanter antarktischer Oithonidae (Cyclopoida, Copepoda) und Oncaeidae (Poecilostomatoida, Copepoda) im Bellingshausenmeer“, von Cornelia Metz.
- Heft Nr. 208/1996** – „Atmosphärenreinfluß bei der Fernerkundung von Meereis mit passiven Mikrowellenradiometern“, von Christoph Oelke.
- Heft Nr. 209/1996** – „Klassifikation von Radarsatellitendaten zur Meereiserkennung mit Hilfe von Line-Scanner-Messungen“, von Axel Bochert.
- Heft Nr. 210/1996** – „Die mit ausgewählten Schwämmen (Hexactinellida und Demospongiae) aus dem Weddellmeer, Antarktis, vergesellschaftete Fauna“, von Kathrin Kunzmann.
- Heft Nr. 211/1996** – "Russian-German Cooperation: The Expedition TAYMYR 1995 and the Expedition KOLYMA 1995", by Dima Yu. Bolshiyarov and Hans-W. Hubberten.
- Heft Nr. 212/1996** – "Surface-sediment composition and sedimentary processes in the central Arctic Ocean and along the Eurasian Continental Margin", by Ruediger Stein, Gennadij I. Ivanov, Michael A. Levitan, and Kirsten Fahl.
- Heft Nr. 213/1996** – „Gonadenentwicklung und Eiproduktion dreier *Calanus*-Arten (Copepoda): Freilandbeobachtungen, Histologie und Experimente“, von Barbara Niehoff.
- Heft Nr. 214/1996** – „Numerische Modellierung der Übergangszone zwischen Eisschild und Eisschelf“, von Christoph Mayer.
- Heft Nr. 215/1996** – „Arbeiten der AWI-Forschungsstelle Potsdam in Antarktika, 1994/95“, herausgegeben von Ulrich Wand.
- Heft Nr. 216/1996** – „Rekonstruktion quartärer Klimaänderungen im atlantischen Sektor des Südpolarmees anhand von Radiolarien“, von Uta Brathauer.
- Heft Nr. 217/1996** – „Adaptive Semi-Lagrange-Finite-Elemente-Methode zur Lösung der Flachwassergleichungen: Implementierung und Parallelisierung“, von Jörn Behrens.
- Heft Nr. 218/1997** – "Radiation and Eddy Flux Experiment 1995 (REFLEX III)", by Jörg Hartmann, Axel Bochert, Dietmar Freese, Christoph Kottmeier, Dagmar Nagel and Andreas Reuter.
- Heft Nr. 219/1997** – „Die Expedition ANTARKTIS-XII mit FS 'Polarstern' 1995. Bericht vom Fahrtabschnitt ANT-XII/3, herausgegeben von Wilfried Jokat und Hans Oerter.
- Heft Nr. 220/1997** – „Ein Beitrag zum Schwerfeld im Bereich des Weddellmeeres, Antarktis. Nutzung von Altimetermessungen des GEOSAT und ERS-1“, von Tilo Schöne.
- Heft Nr. 221/1997** – „Die Expeditionen ANTARKTIS-XIII/1-2 des Forschungsschiffes 'Polarstern' 1995/96“, herausgegeben von Ulrich Bathmann, Mike Lukas und Victor Smetacek.
- Heft Nr. 222/1997** – "Tectonic Structures and Glaciomarine Sedimentation in the South-Eastern Weddell Sea from Seismic Reflection Data", by László Oszkó.

- Heft Nr. 223/1997** – „Bestimmung der Meereisdicke mit seismischen und elektromagnetisch-induktiven Verfahren“, von Christian Haas.
- Heft Nr. 224/1997** – „Troposphärische Ozonvariationen in Polarregionen“, von Silke Wessel.
- Heft Nr. 225/1997** – „Biologische und ökologische Untersuchungen zur kryopelagischen Amphipodenfauna des arktischen Meereises“, von Michael Poltermann.
- Heft Nr. 226/1997** – „Scientific Cruise Report of the Arctic Expedition ARK-XI/1 of RV 'Polarstern' in 1995“, edited by Eike Rachor.
- Heft Nr. 227/1997** – „Der Einfluß kompatibler Substanzen und Kryoprotektoren auf die Enzyme Malatdehydrogenase (MDH) und Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase (G6P-DH) aus *Acrosiphonia arcta* (Chlorophyta) der Arktis“, von Katharina Kück.
- Heft Nr. 228/1997** – „Die Verbreitung epibenthischer Mollusken im chilenischen Beagle-Kanal“, von Katrin Linse.
- Heft Nr. 229/1997** – „Das Mesozooplankton im Laptevmeer und östlichen Nansen-Becken - Verteilung und Gemeinschaftsstrukturen im Spätsommer“, von Hinrich Hanssen.
- Heft Nr. 230/1997** – „Modell eines adaptierbaren, rechnergestützten, wissenschaftlichen Arbeitsplatzes am Alfred-Wegener-Institut für Polar- und Meeresforschung“, von Lutz-Peter Kurdelski.
- Heft Nr. 231/1997** – „Zur Ökologie arktischer und antarktischer Fische: Aktivität, Sinnesleistungen und Verhalten“, von Christopher Zimmermann.
- Heft Nr. 232/1997** – „Persistente chlororganische Verbindungen in hochantarktischen Fischen“, von Stephan Zimmermann.
- Heft Nr. 233/1997** – „Zur Ökologie des Dimethylsulfoniumpropionat (DMSP)-Gehaltes temperierter und polarer Phytoplanktongemeinschaften im Vergleich mit Laborkulturen der Coccolithophoride *Emiliania huxleyi* und der antarktischen Diatomee *Nitzschia lecontei*“, von Doris Meyerdierrks.
- Heft Nr. 234/1997** – „Die Expedition ARCTIC '96 des FS ‚Polarstern‘ (ARK XIII) mit der Arctic Climate System Study (ACSYS)“, von Ernst Augstein und den Fahrteilnehmern.
- Heft Nr. 235/1997** – „Polonium-210 und Blei-210 im Südpolarmeer: Natürliche Tracer für biologische und hydrographische Prozesse im Oberflächenwasser des Antarktischen Zirkumpolarstroms und des Weddellmeeres“, von Jana Friedrich.
- Heft Nr. 236/1997** – „Determination of atmospheric trace gas amounts and corresponding natural isotopic ratios by means of ground-based FTIR spectroscopy in the high Arctic“, by Arndt Meier.
- Heft Nr. 237/1997** – „Russian-German Cooperation: The Expedition TAYMYR/SEVERNAYA ZEMLYA 1996“, edited by Martin Melles, Birgit Hagedorn and Dmitri Yu. Bolshiyarov.
- Heft Nr. 238/1997** – „Life strategy and ecophysiology of Antarctic macroalgae“, by Iván M. Gómez.
- Heft Nr. 239/1997** – „Die Expedition ANTARKTIS XIII/4-5 des Forschungsschiffes ‚Polarstern‘ 1996“, herausgegeben von Eberhard Fahrbach und Dieter Gerdes.
- Heft Nr. 240/1997** – „Untersuchungen zur Chrom-Speziation in Meerwasser, Meereis und Schnee aus ausgewählten Gebieten der Arktis“, von Heide Giese.
- Heft Nr. 241/1997** – „Late Quaternary glacial history and paleoceanographic reconstructions along the East Greenland continental margin: Evidence from high-resolution records of stable isotopes and ice-rafted debris“, by Seung-Il Nam.
- Heft Nr. 242/1997** – „Thermal, hydrological and geochemical dynamics of the active layer at a continuous permafrost site, Taymyr Peninsula, Siberia“, by Julia Boike.
- Heft Nr. 243/1997** – „Zur Paläoozeanographie hoher Breiten: Stellvertreterdaten aus Foraminiferen“, von Andreas Mackensen.
- Heft Nr. 244/1997** – „The Geophysical Observatory at Neumayer Station, Antarctica, Geomagnetic and seismological observations in 1995 and 1996“, by Alfons Eckstaller, Thomas Schmidt, Viola Graw, Christian Müller and Johannes Rogenhagen.
- Heft Nr. 245/1997** – „Temperaturbedarf und Biogeographie mariner Makroalgen - Anpassung mariner Makroalgen an tiefe Temperaturen“, von Bettina Bischoff-Bäsmann.
- Heft Nr. 246/1997** – „Ökologische Untersuchungen zur Fauna des arktischen Meereises“, von Christine Friedrich.
- Heft Nr. 247/1997** – „Entstehung und Modifizierung von marinen gelösten organischen Substanzen“, von Berit Kirchhoff.
- Heft Nr. 248/1997** – „Laptev Sea System: Expeditions in 1995“, edited by Heidemarie Kassens.
- Heft Nr. 249/1997** – „The Expedition ANTARKTIS XIII/3 (EASIZ I) of RV 'Polarstern' to the eastern Weddell Sea in 1996“, edited by Wolf Arntz and Julian Gutt.
- Heft Nr. 250/1997** – „Vergleichende Untersuchungen zur Ökologie und Biodiversität des Mega-Epibenthos der Arktis und Antarktis“, von Adreas Starmans.
- Heft Nr. 251/1997** – „Zeitliche und räumliche Verteilung von Mineralvergesellschaftungen in spätquartären Sedimenten des Arktischen Ozeans und ihre Nützlichkeit als Klimaindikatoren während der Glazial/Interglazial-Wechsel“, von Christoph Vogt.
- Heft Nr. 252/1997** – „Solitäre Ascidien: in der Potter Cove (King George Island, Antarktis). Ihre ökologische Bedeutung und Populationsdynamik“, von Stephan Kühne.
- Heft Nr. 253/1997** – „Distribution and role of microprotozoa in the Southern Ocean“, by Christine Klaas.
- Heft Nr. 254/1997** – „Die spätquartäre Klima- und Umweltgeschichte der Bunger-Oase, Ostantarktis“, von Thomas Kulbe.

- Heft Nr. 255/1997** – "Scientific Cruise Report of the Arctic Expedition ARK-XIII/2 of RV 'Polarstern' in 1997", edited by Ruediger Stein and Kirsten Fahl.
- Heft Nr. 256/1998** – „Das Radionuklid Tritium im Ozean: Meßverfahren und Verteilung von Tritium im Südatlantik und im Weddellmeer“, von Jürgen Süttenfuß.
- Heft Nr. 257/1998** – „Untersuchungen der Saisonalität von atmosphärischem Dimethylsulfid in der Arktis und Antarktis“, von Christoph Kleefeld.
- Heft Nr. 258/1998** – „Bellingshausen- und Amundsenmeer: Entwicklung eines Sedimentationsmodells“, von Frank-Oliver Nitsche.
- Heft Nr. 259/1998** – "The Expedition ANTARKTIS-XIV/4 of RV 'Polarstern' in 1997", by Dieter K. Fütterer.
- Heft Nr. 260/1998** – „Die Diatomeen der Laptevsee (Arktischer Ozean): Taxonomie und biogeographische Verbreitung“, von Holger Cremer
- Heft Nr. 261/1998** – „Die Krustenstruktur und Sedimentdecke des Eurasischen Beckens, Arktischer Ozean: Resultate aus seismischen und gravimetrischen Untersuchungen“, von Estella Weigelt.
- Heft Nr. 262/1998** – "The Expedition ARKTIS-XIII/3 of RV 'Polarstern' in 1997", by Gunther Krause.
- Heft Nr. 263/1998** – „Thermo-tektonische Entwicklung von Oates Land und der Shackleton Range (Antarktis) basierend auf Spaltisuranalysen“, von Thorsten Schäfer.
- Heft Nr. 264/1998** – „Messungen der stratosphärischen Spurengase ClO, HCl, O₃, N₂O, H₂O und OH mittels flugzeuggetragener Submillimeterwellen-Radiometrie“, von Joachim Urban.
- Heft Nr. 265/1998** – „Untersuchungen zu Massenhaushalt und Dynamik des Ronne Ice Shelves, Antarktis“, von Astrid Lambrecht.
- Heft Nr. 266/1998** – "Scientific Cruise Report of the Kara Sea Expedition of RV 'Akademic Boris Petrov' in 1997", edited by Jens Matthiessen and Oleg Stepanets.
- Heft Nr. 267/1998** – „Die Expedition ANTARKTIS-XIV mit FS ‚Polarstern‘ 1997. Bericht vom Fahrtabschnitt ANT-XIV/3“, herausgegeben von Wilfried Jokat und Hans Oerter.
- Heft Nr. 268/1998** – „Numerische Modellierung der Wechselwirkung zwischen Atmosphäre und Meereis in der arktischen Eisrandzone“, von Gerit Birnbaum.
- Heft Nr. 269/1998** – "Katabatic wind and Boundary Layer Front Experiment around Greenland (KABEG '97)", by Günther Heinemann.
- Heft Nr. 270/1998** – "Architecture and evolution of the continental crust of East Greenland from integrated geophysical studies", by Vera Schilindwein.
- Heft Nr. 271/1998** – "Winter Expedition to the Southwestern Kara Sea - Investigations on Formation and Transport of Turbid Sea-Ice", by Dirk Dethleff, Per Loewe, Dominik Weiel, Hartmut Nies, Gesa Kuhlmann, Christian Bahe and Gennady Tarasov.
- Heft Nr. 272/1998** – "FTIR-Emissionsspektroskopische Untersuchungen der arktischen Atmosphäre", von Edo Becker.
- Heft Nr. 273/1998** – „Sedimentation und Tektonik im Gebiet des Agulhas Rückens und des Agulhas Plateaus („SETA-RAP“)", von Gabriele Uenzelmann-Neben.
- Heft Nr. 274/1998** – "The Expedition ANTARKTIS XIV/2", by Gerhard Kattner.
- Heft Nr. 275/1998** – „Die Auswirkung der 'NorthEastWater'-Polynya auf die Sedimentation von NO-Grönland und Untersuchungen zur Paläo-Ozeanographie seit dem Mittelweichsel“, von Hanne Notholt.
- Heft Nr. 276/1998** – „Interpretation und Analyse von Potentialfelddaten im Weddellmeer, Antarktis: der Zerfall des Superkontinents Gondwana“, von Michael Studinger.
- Heft Nr. 277/1998** – „Koordiniertes Programm Antarktisforschung“. Berichtskolloquium im Rahmen des Koordinierten Programms „Antarktisforschung mit vergleichenden Untersuchungen in arktischen Eisgebieten“, herausgegeben von Hubert Miller.
- Heft Nr. 278/1998** – „Messung stratosphärischer Spurengase über Ny-Ålesund, Spitzbergen, mit Hilfe eines bodengebundenen Mikrowellen-Radiometers“, von Uwe Raffalski.
- Heft Nr. 279/1998** – "Arctic Paleo-River Discharge (APARD). A New Research Programme of the Arctic Ocean Science Board (AOSB)", edited by Ruediger Stein.
- Heft Nr. 280/1998** – „Fernerkundungs- und GIS-Studien in Nordostgrönland“ von Friedrich Jung-Rothenhäusler.
- Heft Nr. 281/1998** – „Rekonstruktion der Oberflächenwassermassen der östlichen Laptevsee im Holozän anhand von aquatischen Palynomorphen“, von Martina Kunz-Pirrung.
- Heft Nr. 282/1998** – "Scavenging of ²³¹Pa and ²³⁰Th in the South Atlantic: Implications for the use of the ²³¹Pa/²³⁰Th ratio as a paleoproductivity proxy", by Hans-Jürgen Waller.
- Heft Nr. 283/1998** – „Sedimente im arktischen Meereis - Eintrag, Charakterisierung und Quantifizierung“, von Frank Lindemann.
- Heft Nr. 284/1998** – „Langzeitanalyse der antarktischen Meereisbedeckung aus passiven Mikrowellendaten“, von Christian H. Thomas.
- Heft Nr. 285/1998** – „Mechanismen und Grenzen der Temperaturanpassung beim Pierwurm *Arenicola marina* (L.)“, von Angela Sommer.
- Heft Nr. 286/1998** – „Energieumsätze benthischer Filtrierer der Potter Cove (King George Island, Antarktis)“, von Jens Kowalke.
- Heft Nr. 287/1998** – "Scientific Cooperation in the Russian Arctic: Research from the Barents Sea up to the Laptev Sea", edited by Eike Rachor.

- Heft Nr. 288/1998** – „Alfred Wegener. Kommentiertes Verzeichnis der schriftlichen Dokumente seines Lebens und Wirkens“, von Ulrich Wutzke.
- Heft Nr. 289/1998** – „Retrieval of Atmospheric Water Vapor Content in Polar Regions Using Spaceborne Microwave Radiometry“, by Jungang Miao.
- Heft Nr. 290/1998** – „Strukturelle Entwicklung und Petrogenese des nördlichen Kristallingürtels der Shackleton Range, Antarktis: Proterozoische und Ross-orogene Krustendynamik am Rand des Ostantarktischen Kratons“, von Axel Brommer.
- Heft Nr. 291/1998** – „Dynamik des arktischen Meereises - Validierung verschiedener Rheologieansätze für die Anwendung in Klimamodellen“, von Martin Kreyscher.
- Heft Nr. 292/1998** – „Anthropogene organische Spurenstoffe im Arktischen Ozean, Untersuchungen chlorierter Biphenyle und Pestizide in der Laptevsee, technische und methodische Entwicklungen zur Probenahme in der Arktis und zur Spurenstoffanalyse“, von Sven Utschakowski.
- Heft Nr. 293/1998** – „Rekonstruktion der spätquartären Klima- und Umweltgeschichte der Schirmacher Oase und des Wohlthat Massivs (Ostantarktika)“, von Markus Julius Schwab.
- Heft Nr. 294/1998** – „Besiedlungsmuster der benthischen Makrofauna auf dem ostgrönländischen Kontinentalhang“, von Klaus Schnack.
- Heft Nr. 295/1998** – „Gehäuseuntersuchungen an planktischen Foraminiferen hoher Breiten: Hinweise auf Umweltveränderungen während der letzten 140.000 Jahre“, von Harald Hommers.
- Heft Nr. 296/1998** – „Scientific Cruise Report of the Arctic Expedition ARK-XIII/1 of RV 'Polarstern' in 1997“, edited by Michael Spindler, Wilhelm Hagen and Dorothea Stübing.
- Heft Nr. 297/1998** – „Radiometrische Messungen im arktischen Ozean - Vergleich von Theorie und Experiment“, von Klaus-Peter Johnsen.
- Heft Nr. 298/1998** – „Patterns and Controls of CO₂ Fluxes in Wet Tundra Types of the Taimyr Peninsula, Siberia - the Contribution of Soils and Mosses“, by Martin Sommerkorn.
- Heft Nr. 299/1998** – „The Potter Cove coastal ecosystem, Antarctica. Synopsis of research performed within the frame of the Argentinean-German Cooperation at the Dallmann Laboratory and Jubany Station (King George Island, Antarctica, 1991 - 1997)“, by Christian Wiencke, Gustavo Ferreyra, Wolf Arntz & Carlos Rinaldi.
- Heft Nr. 300/1999** – „The Kara Sea Expedition of RV 'Akademik Boris Petrov' 1997: First Results of a Joint Russian-German Pilot Study“, edited by Jens Matthiessen, Oleg V. Stepanets, Ruediger Stein, Dieter K. Fütterer, and Eric M. Galimov.
- Heft Nr. 301/1999** – „The Expedition ANTARKTIS XV/3 (EASIZ II)“, edited by Wolf E. Arntz and Julian Gutt.
- Heft Nr. 302/1999** – „Sterole im herbstlichen Weddellmeer (Antarktis): Großräumige Verteilung, Vorkommen und Umsatz“, von Anneke Mühlebach.
- Heft Nr. 303/1999** – „Polare stratosphärische Wolken: Lidar-Beobachtungen, Charakterisierung von Entstehung und Entwicklung“, von Jens Biele.
- Heft Nr. 304/1999** – „Spätquartäre Paläoumweltbedingungen am nördlichen Kontinentalrand der Barents- und Kara-See. Eine Multi-Parameter-Analyse“, von Jochen Knies.
- Heft Nr. 305/1999** – „Arctic Radiation and Turbulence Interaction Study (ARTIST)“, by Jörg Hartmann, Frank Albers, Stefania Argenti, Axel Bocher, Ubaldo Bonafé, Wolfgang Cohrs, Alessandro Conidi, Dietmar Freese, Teodoro Georgiadis, Alessandro Ippoliti, Lars Kaleschke, Christof Lüpkes, Uwe Maixner, Giangiuseppe Mastrantonio, Fabrizio Ravegnani, Andreas Reuter, Giuliano Trivellone and Angelo Viola.
- Heft Nr. 306/1999** – „German-Russian Cooperation: Biogeographic and biostratigraphic investigations on selected sediment cores from the Eurasian continental margin and marginal seas to analyze the Late Quaternary climatic variability“, edited by Robert R. Spielhagen, Max S. Barash, Gennady I. Ivanov, and Jörn Thiede.
- Heft Nr. 307/1999** – „Struktur und Kohlenstoffbedarf des Makrobenthos am Kontinentalhang Ostgrönlands“, von Dan Seiler.
- Heft Nr. 308/1999** – „ARCTIC '98: The Expedition ARK-XIV/1a of RV 'Polarstern' in 1998“, edited by Wilfried Jokat.
- Heft Nr. 309/1999** – „Variabilität der arktischen Ozonschicht: Analyse und Interpretation bodengebundener Millimeterwellenmessungen“, von Björn-Martin Sinnhuber.
- Heft Nr. 310/1999** – „Rekonstruktion von Meereisdrift und terrigenem Sedimenteintrag im Spätquartär: Schwermineralassoziationen in Sedimenten des Laptev-See-Kontinentalrandes und des zentralen Arktischen Ozeans“, von Marion Behrends.
- Heft Nr. 311/1999** – „Parameterisierung atmosphärischer Grenzschichtprozesse in einem regionalen Klimamodell der Arktis“, von Christoph Abegg.
- Heft Nr. 312/1999** – „Solare und terrestrische Strahlungswechselwirkung zwischen arktischen Eisflächen und Wolken“, von Dietmar Freese.
- Heft Nr. 313/1999** – „Snow accumulation on Ekströmisen, Antarctica“, by Elisabeth Schlosser, Hans Oerter and Wolfgang Graf.
- Heft Nr. 314/1999** – „Die Expedition ANTARKTIS XV/4 des Forschungsschiffes 'Polarstern' 1998“, herausgegeben von Eberhard Fahrbach.
- Heft Nr. 315/1999** – „Expeditions in Siberia in 1998“, edited by Volker Rachold.
- Heft Nr. 316/1999** – „Die postglaziale Sedimentationsgeschichte der Laptevsee: schwermineralogische und sedimentpetrographische Untersuchungen“, von Bernhard Peregovich.
- Heft-Nr. 317/1999** – „Adaption an niedrige Temperaturen: Lipide in Eisdiatomeen“, von Heidi Lehmal.
- Heft-Nr. 318/1999** – „Effiziente parallele Lösungsverfahren für elliptische partielle Differentialgleichungen in der numerischen Ozeanmodellierung“, von Natalja Rakowsky.

- Heft-Nr. 319/1999** – „The Ecology of Arctic Deep-Sea Copepods (Euchaetidae and Aetideidae). Aspects of their Distribution, Trophodynamics and Effect on the Carbon Flux“, by Holger Auel.
- Heft-Nr. 320/1999** – „Modellstudien zur arktischen stratosphärischen Chemie im Vergleich mit Meßdaten“, von Veronika Eyring.
- Heft-Nr. 321/1999** – „Analyse der optischen Eigenschaften des arktischen Aerosols“, von Dagmar Nagel.
- Heft-Nr. 322/1999** – „Messungen des arktischen stratosphärischen Ozons: Vergleich der Ozonmessungen in Ny-Ålesund, Spitzbergen, 1997 und 1998“, von Jens Langer
- Heft-Nr. 323/1999** – „Untersuchung struktureller Elemente des südöstlichen Weddellmeeres / Antarktis auf der Basis mariner Potentialfelddaten“, von Uwe F. Meyer.
- Heft-Nr. 324/1999** – „Geochemische Verwitterungstrends eines basaltischen Ausgangsgesteins nach dem spätpleistozänen Gletscherrückzug auf der Taimyrhalbinsel (Zentralsibirien) - Rekonstruktion an einer sedimentären Abfolge des Lama Sees“, von Stefanie K. Harwart.
- Heft-Nr. 325/1999** – „Untersuchungen zur Hydrologie des arktischen Meereises - Konsequenzen für den kleinskaligen Stofftransport“, von Johannes Freitag.
- Heft-Nr. 326/1999** – „Die Expedition ANTARKTIS XIV/2 des Forschungsschiffes 'Polarstern' 1998“, herausgegeben von Eberhard Fahrbach.
- Heft-Nr. 327/1999** – „Gemeinschaftsanalytische Untersuchungen der Harpacticoidenfauna der Magellanregion, sowie erste similaritätsanalytische Vergleiche mit Assoziationen aus der Antarktis“, von Kai Horst George.
- Heft-Nr. 328/1999** – „Rekonstruktion der Paläo-Umweltbedingungen am Laptev-See-Kontinentalrand während der beiden letzten Glazial/Interglazial-Zyklen anhand sedimentologischer und mineralogischer Untersuchungen“, von Claudia Müller.
- Heft-Nr. 329/1999** – „Räumliche und zeitliche Variationen atmosphärischer Spurengase aus bodengebundenen Messungen mit Hilfe eines Michelson Interferometers“, von Justus Notholt.
- Heft-Nr. 330/1999** – „The 1998 Danish-German Excursion to Disko Island, West Greenland“, edited by Angelika Brandt, Helge A. Thomsen, Henning Heide-Jørgensen, Reinhardt M. Kristensen and Hlike Fluhberg.
- Heft-Nr. 331/1999** – „Poseidon“ Cruise No. 243 (Reykjavik - Greenland - Reykjavik, 24 August - 11 September 1998): Climate change and the Viking-age fjord environment of the Eastern Settlement, sw Greenland“, by Gerd Hoffmann, Antoon Kuijpers, and Jörn Thiede.
- Heft-Nr. 332/1999** – „Modeling of marine biogeochemical cycles with an emphasis on vertical particle fluxes“, by Regina Usbeck.
- Heft-Nr. 333/1999** – „Die Tanaidaceenfauna des Beagle-Kanals und ihre Beziehungen zur Fauna des antarktischen Festlandssockels“, von Anja Schmidt.
- Heft-Nr. 334/1999** – „D-Aminosäuren als Tracer für biogeochemische Prozesse im Fluß-Schelf-Ozean-System der Arktis“, von Hans Peter Fitznar.
- Heft-Nr. 335/1999** – „Ökophysiologische Ursachen der limitierten Verbreitung reptanter decapoder Krebse in der Antarktis“, von Markus Frederich.
- Heft-Nr. 336/1999** – „Ergebnisse der Untersuchung des grönländischen Inlandeises mit dem elektromagnetischen Reflexionsverfahren in der Umgebung von NGRIP“, von Fidan Göktas.
- Heft-Nr. 337/1999** – „Paleozoic and mesozoic tectono-thermal history of central Dronning Maud Land, East Antarctica, – evidence from fission-track thermochronology“, by Stefanie Meier.
- Heft-Nr. 338/1999** – „Probleme hoher Stoffwechselraten bei Cephalopoden aus verschiedenen geographischen Breiten“, von Susanne Zielinski.
- Heft-Nr. 339/1999** – „The Expedition ARKTIS XV/1“, edited by Gunther Krause.
- Heft-Nr. 340/1999** – „Microbial Properties and Habitats of Permafrost Soils on Taimyr Peninsula, Central Siberia“, by Nicolé Schmidt.
- Heft-Nr. 341/1999** – „Photoacclimation of phytoplankton in different biogeochemical provinces of the Southern Ocean and its significance for estimating primary production“, by Astrid Bracher.
- Heft-Nr. 342/1999** – „Modern and Late Quaternary Depositional Environment of the St. Anna Trough Area, Northern Kara Sea“, edited by Ruediger Stein, Kirsten Fahl, Gennadij I. Ivanov, Michael A. Levitan, and Gennady Tarasov.
- Heft-Nr. 343/1999** – „ESF-IMPACT Workshop/Oceanic impacts: mechanisms and environmental perturbations, 15 - 17 April 1999 in Bremerhaven“, edited by Rainer Gersonde and Alexander Deutsch.
- Heft-Nr. 344/1999** – „Die Klimageschichte der hohen nördlichen Breiten seit dem mittleren Miozän: Hinweise aus sedimentologischen- und mineralogischen Analysen (OPD Leg 151, zentrale Framstraße)“, von Amelie Winkler.
- Heft-Nr. 345/1999** – „Kurzfristige Klimaschwankungen im Scotiameer und Ergebnisse zur Kalbungsgeschichte der Antarktis während der letzten 200.000 Jahre“, von Annette Hofmann.
- Heft-Nr. 346/2000** – „Glazialmarine Sedimentationsentwicklung am westantarktischen Kontinentalrand im Amundsen- und Bellingshausenmeer - Hinweise auf Paläoumweltveränderungen während der quartären Klimazyklen“, von Claus-Dieter Hillenbrand
- Heft-Nr. 347/2000** – „Zur Ökologie des Phytoplanktons im arktischen Laptevmeer - ein jahreszeitlicher Vergleich“, von Kirsten Tuschling.
- Heft-Nr. 348/2000** – „Untersuchungen zum Fettstoffwechsel des Südlichen See-Elefanten (*Mirounga leonina* L.) in der Antarktis“, von Sven Ramdohr.
- Heft-Nr. 349/2000** – „Licht- und Temperatureinfluß auf den enzymatischen Oxidationsschutz der antarktischen Eisdiatomee *Entomoneis kufferathii* Manguin“, von Raimund Schriek.

* vergiffen/out of print.
 ** nur noch beim Autor/only from the author.

