

Gefrierschutzsubstanzen bei Fischen der Polarmeere und ihre Bedeutung für Evolution und Ökologie

Von Andreas P.A. Wöhrmann*

Zusammenfassung: Bei allen notothenioiden Fischen der Antarktis und gadiformen Fischen der Arktis wird ein Gefrieren durch das „Antifreeze Glykopeptid“ (AFGP) verhindert. Diese Gefrierschutzmakromoleküle sind aus Polymeren von $H_2N[Ala-Ala(\beta\text{-galactosyl}(1\rightarrow3)\alpha\text{-N-Acetylgalactosamin})Thr]_nAla-Ala-COOH$ aufgebaut. Vertreter der Liparididae, Zoarcidae, Cottidae und Pleuronectidae synthetisieren nicht-glykosylierte Gefrierschutzsubstanzen, die „Antifreeze Peptide“ (AFP). Am Beispiel des antarktischen Silberfisch *Pleuragramma antarcticum* konnte gezeigt werden, daß die Synthese der Gefrierschutzsubstanzen nicht wie bislang angenommen kontinuierlich abläuft, sondern vermutlich über die Wassertemperatur gesteuert wird. Darüberhinaus konnte ein neuartiges Glykopeptid isoliert und charakterisiert werden, das „*Pleuragramma*-Antifreeze Glykopeptid“ (PAGP). Die Konzentrationen von Gefrierschutzsubstanzen sind abhängig von der Wassertemperatur, der Tiefenverbreitung und dem Lebenszyklus der Art, sowie seiner Phylogenie. Der Nachweis von AFGP bei Perciformen der Antarktis und Gadiformen der Arktis und Antarktis veranlaßt zu der Annahme, daß es vor der Trennung der Kontinente ein „precursor“-Glykopeptid gegeben haben muß und daß bei einigen Arten der Gefrierschutz als Relikt vergangener Eiszeiten gewertet werden kann. Die weite Verbreitung und große Heterogenität der AFPs hingegen geben Anlaß zu der Annahme, daß die Peptide das Resultat von Stressantworten auf immer wieder auftretende „cold shock“-Ereignisse sind.

Summary: In the blood of Antarctic notothenioid and Arctic gadiform fishes, freezing is inhibited by antifreeze glycopeptide macromolecules (AFGP). These antifreeze molecules are built up of repeating tripeptide units ($Ala-Ala-Thr$)_n, to which the disaccharide β -D-galactosyl-(1→3) α -N-acetyl-D-galactosamine is linked through the hydroxyl oxygen of the threonyl residue. Species of Liparididae, Zoarcidae, Cottidae and Pleuronectidae synthesize only unglycosylated antifreeze peptides (AFP). It could be demonstrated for the Antarctic silverfish *Pleuragramma antarcticum* that the synthesis of AFGP is not constitutive but rather regulated by water temperature. Moreover a novel glycopeptid was isolated and characterised from *P. antarcticum*, the „*Pleuragramma*-antifreeze glycopeptid“ (PAGP). The level of antifreeze concentration was dependent on the ambient water temperature, the depth of distribution, the life cycle and the evolution of the species. Surprisingly, detectable AFGPs in perciform fish of the Antarctic and gadiform fish of the Arctic and Antarctic could illustrate, that before the continental drift occurred a precursor glycopeptid existed, and that the existence of freezing resistance in some species reflects the past glaciation. The wide distribution and high heterogeneity of AFPs point to the assumption that these peptides are results of cold shock stress responses.

1. EINLEITUNG

Die Ozeane der Arktis und Antarktis unterscheiden sich grundlegend in ihrer Entstehungsgeschichte. Ursprünglich war die Antarktis Teil des Urkontinents Gondwana. Mit ausgehendem Mesozoikum, vor etwa 120 Mio. Jahren, brach dieser Urkontinent auseinander, die Antarktisplatte driftete südwärts und

kühlte in mehreren Phasen ab (KENNETT 1977). Die letzte Verbindung zum alten Kontinent brach im Oligozän vor 28–23 Mio. Jahren auf (ELLIOT 1985), der zirkumantarktische Ozean entstand. Das Alter des arktischen Ökosystems ist weitaus geringer. Der Ozean ist nicht isoliert, sondern erhält ständigen Austausch mit Wassermassen aus dem Atlantik. Außerdem besteht eine Anbindung antarktischer Schelfe an boreale Schelfgebiete.

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

Bei den Teleostern der polaren Ozeane und der im Winter kalten Küstengewässer der gemäßigten nördlichen Zone findet man im Blutplasma große Mengen spezieller Proteine, die den Gefrierpunkt des Plasmas um mehrere Grad senken. Da Meerwasser bei etwa $-1,9\text{ }^{\circ}\text{C}$ gefriert, das Blutplasma der meisten marinen Teleostei seinem Gehalt an gelösten Substanzen entsprechend jedoch schon bei ca. $-0,8\text{ }^{\circ}\text{C}$, stünden weite Bereiche der kalten Meere den Teleostern ohne diese Anpassung nicht als Lebensraum zur Verfügung. Überraschenderweise gibt es mehrere Typen solcher Gefrierschutzpeptide, die trotz gleicher Wirkung ganz unterschiedliche Strukturen haben (ANANTHANARAYANAN 1989).

Der eine Typus sind Glykopeptide, wobei zwischen dem AFGP („antifreeze glycopeptid“) und PAGP („*Pleuragramma*-antifreeze glycopeptid“) unterschieden werden muß. Das AFGP konnte aus den meisten daraufhin untersuchten antarktischen Notothenioidei (DEVRIES 1988, WÖHRMANN 1996a, 1997a) isoliert und charakterisiert werden, sowie aus fünf arktischen Arten, die alle der Familie der Gadidae angehören (FLETCHER et al. 1982b,

* Dr. Andreas P.A. Wöhrmann, Institut für Polarökologie, Universität Kiel, Wischhofstraße 1-3, D-24148 Kiel

Manuskript eingegangen: 3. April 1996, angenommen: 20. Dezember 1996

GODDARD et al. 1992, HEW et al. 1981, OSUGA & FEENEY 1978, RAYMOND et al. 1975, VAN VOORHIES et al. 1978). Es handelt sich um Serien von meist acht Polypeptiden unterschiedlicher Größe zwischen 2,4 und 34 kDa, von denen die größeren nur aus den Bausteinen Alanin, Threonin, Galaktose und N-Acetylgalaktosamin bestehen und repetitiv aus glykosylierten Tripeptiden aufgebaut sind (Abb. 1). Dagegen enthalten die kleineren Polypeptide zusätzlich Prolin, bei *Eleginus* und *Microgadus* auch Arginin. Ihre Sequenzen aus 14-17 Aminosäuren sind nach dem Tripeptidschema der größeren aufgebaut, enthalten jedoch an ein oder zwei Positionen anstelle des Alanin ein Prolin (BUSH et al. 1984). Diese kleinen Polypeptide sind für sich allein fast ohne gefrierpunktniedrigende Wirkung, vermögen aber die Wirkung der größeren zwei- bis achtfach zu verstärken (BURCHAM et al. 1986). Das PAGP dagegen konnte bislang nur aus *Pleuragramma antarcticum* isoliert werden, und ist durch eine der Hyaluronsäure ähnliche Kohlenhydratstruktur charakterisiert. Der Peptidanteil, der nur ca. 5 % des 120 kDa großen Proteoglykan ausmacht, ist sehr heterogen aus verschiedenen Aminosäuren aufgebaut (WÖHRMANN et al. unveröffentl.).

Der zweite Typus von Gefrierschutzpeptiden ist frei von Kohlenhydraten. Diese AFPs („antifreeze peptides“) sind vor allem aus Fischen der nördlichen Meere bekannt, wie den Pleuronectidae, den Osmeridae, den Cottidae, den Zoarcidae und den Liparididae. Auch die AFPs sind kleine Moleküle von 3,3-17 kDa, sonst aber in zahlreichen chemischen und biologischen Eigenschaften von den AFGPs und dem PAGP verschieden; sie werden oft nur in der kalten Jahreszeit synthetisiert; sie enthalten ein komplexeres Aminosäurespektrum; sie differieren nicht nur in der Aminosäuresequenz, sondern auch in der Sekundär- und Tertiärstruktur (DEVRIES 1988). Im Gegensatz zu der bei allen Arten fast gleichen stereotypen Struktur der AFGPs zeigen die AFPs große artspezifische Differenzen (LI et al. 1985).

Literaturangaben zur Folge konnten beim pelagischen antarktischen Silberfisch *Pleuragramma antarcticum* (HASCHEMEYER & JANNASCH 1983) und bei einigen anderen Notothenioidei (u.a. *Lepidonotothen kempfi*) kein Gefrierschutz nachgewiesen werden (DEVRIES & LIN 1977, EASTMAN 1990). Populationen von *Pleuragramma* führen jedoch während eines Lebenszyklus vertikale Wanderungen im südöstlichen Weddellmeer durch, und kommen dabei mit sehr unterschiedlich temperierten Wassermassen und Eis in Berührung. Die Larven sind im kalten, mit Plättcheneis beladenen, Oberflächenwasser (< -1,8 °C) verbreitet, die Juvenilen halten sich dagegen bevorzugt im wärmeren Wasser (> -0,5 °C) der Ostwinddrift auf. Die Adulten schließlich leben auf dem Schelf bei Wassertemperaturen unter -2,0 °C (HUBOLD 1985, 1990, HUBOLD & TOMO 1989). Auch von anderen Arten ist bekannt (z.B. *L. kempfi*, *Cryodraco antarcticus*, *Gymnoscopelus opisthopterus*, nicht-Notothenioidei), daß sie während eines Lebenszyklusses Wassermassen unterschiedlicher Temperaturen aufsuchen, einige Arten führen vertikale Wanderungen innerhalb eines Tages durch (GON & HEEMSTRA 1990, WÖHRMANN & ZIMMERMANN 1992); eine potentielle Gefrierresistenz sollte demnach von allen Fischen der Polarmeere gefordert werden.

Aus diesen Gründen liegen die Schwerpunkte der hier vorgestellten Untersuchungen zum Gefrierschutz polarer Fische auf

- der weitgehend isolierten Fauna des Weddellmeers und der Hocharktis,
- der Vervollständigung bereits existierender Daten,
- dem Vergleich von Daten mit engem Bezug zur Lebensweise der Fische und
- der Interpretation im Zusammenhang mit der Evolution der (endemischen) Fischfamilien.

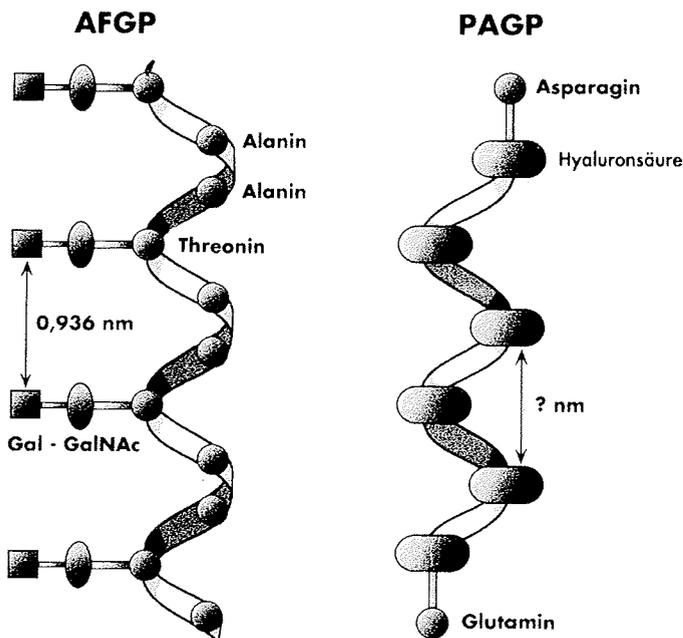


Abb. 1: Modell der Sekundärstruktur des Gefrierschutzglykoproteins AFGP der Notothenioidei und der Gadidae, sowie die des *Pleuragramma*-Gefrierschutzproteoglykans PAGP. Das AFGP besteht aus Peptiden mit der Sequenz Alanin-Alanin-Threonin. Jedes Threonin bindet ein Disaccharid. In den niedermolekularen AFGPs 6-8 (MW 7900 - 2668 Dalton) ersetzt ein Prolin das Alanin an der Position eines des Tripeptids. Das Gerüst des PAGP ist ein Hyaluronsäure-Typ, der aus D-Glucuronsäure und N-Acetylglucosamin mit einer $\beta(1\text{A}3)$ glykosidischen Bindung aufgebaut ist. Die Peptide sind vermutlich N-glycosidisch über das Asparagin bzw. Glutamin an den Zucker gebunden. Beachte, daß die hydrophobe stabartige Struktur des AFGP-Polypeptidgerüsts mit den hydrophilen Disaccharidanhängen eine eindimensionale Form erzeugt, die mit der Eisoberfläche interagieren kann. Verändert nach WÖHRMANN (1997b).

Fig. 1: Model of the secondary structure of the antifreeze glycopeptides (AFGPs) of notothenioids and gadids and of the *Pleuragramma*-antifreeze glycopeptide (PAGP). The AFGP consists of amino acids in the sequence [alanyl-alanyl-threonine]_n. Each threonine is joined to a disaccharide through a glycosidic linkage. In low molecular weight AFGPs 6-8 (MW 7900 - 2668 dalton), proline is periodically substituted for alanine at position one of the tripeptide. The PAGP with the disaccharide unit hyaluronic acid consists of D-glucuronic acid and N-acetyl-D-glucosamine with a $\beta(1\text{A}3)$ glycosidic linkage. The peptides are presumably linked to the glycan by asparagine through a N-glycosidic linkage. Note that the hydrophobic rod-like structure of the AFGP polypeptide backbone with the hydrophilic disaccharide appendages form a one-dimensional array capable of interacting with the ice surface. Redrawn from WÖHRMANN (1997b).

2. MATERIAL UND METHODEN

Die Fische wurden mit dem kommerziellen Grundschleppnetz (GSN), dem benthopelagischen Trawl (BPN) und dem Agassiz-trawl (AGT) während verschiedener *Polarstern*-Expeditionen in die Antarktis und Arktis gefangen. Der Großteil der Fische stammt vom Weddellmeer vor Halley Bay und Vestkapp, sowie vom Lazarevmeer zwischen Kap Norvegia und Astrid-Rücken. Die südlichste Station lag bei 76° 08' S und 28° 23' W, die nördlichste bei 69° 40' S und 00° 51' E. Es wurde in Tiefen zwischen 161 m (Lazarevmeer) und 2000 m (Halley Bay) gefischt. Die arktischen Fische wurden in der Region um Nordost-Grönland gefangen. Die Stationen lagen zwischen 77° 59' N, 15° 25' W und 81° 48' N, 10° 52' W in Tiefen von 91-491 m. Genaue Angaben zu den Stationen mit Position, Wassertiefe, Wassertemperatur und Fangzusammensetzung sind den Fahrtberichten ARNTZ et al. (1990), BATHMANN et al. (1992) und KRAUSE (1991) zu entnehmen.

Die Fische wurden direkt nach dem Fang sortiert, zum großen Teil bestimmt und vermessen. Als Bestimmungsschlüssel dienten die FAO Species Identification Sheets (FISCHER & HUREAU 1985), „The Fishes of the Southern Ocean“ (GON & HEEMSTRA 1990) und ein von KOCK (unpubl.) zusammengestellter Schlüssel. Es wurde die Totallänge und die Standardlänge (auf den nächsten unteren cm) gemessen und das Total- und Schlachtgewicht bestimmt (auf 1 g genau). Es wurden sowohl Ganzfische als auch Leber und Blutserum getrennt bei -30 °C tiefgefroren.

Die weitere Bearbeitung erfolgte in Zusammenarbeit mit Dr. Haselbeck, Boehringer Mannheim GmbH, in den biotechnologischen Forschungslabors in Penzberg. Die Proben wurden mit Ethanol extrahiert, mit TCA gefällt und mittels der DEAE-Anionenaustauschchromatographie aufgereinigt (Abb. 2). Mit der „reversed-phase HPLC“ konnten die Gefrierschutzsubstanzen rein dargestellt werden. Die gereinigten und lyophilisierten Gefrierschutzproteine wurden gewogen (mg), und ihr Gehalt im Ganzfisch (mg/kg Frischgewicht FRG oder % FRG) bzw. im Blutserum (mg/ml) berechnet.

Die lyophilisierten (Glyko)Peptide wurden daraufhin auf ihre Primär- und Sekundärstruktur hin untersucht. Die Kohlenhydrate wurden, soweit vorhanden, von dem Peptid getrennt, und anschließend auf ihre Struktur und Zusammensetzung mit der „high performance anion exchange chromatography with pulsed amperometric detection“ (HPAEC-PAD) analysiert. Die Aminosäurezusammensetzung und die Aminosäuresequenz wurden bestimmt. Das Molekulargewicht wurde mit der SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-Page), der Kapillarelektrophorese (CE), der Plasma Desorption-Massen Spektrometrie (PD-MS) und der HPLC-gekoppelten Lichtstreuung (MALLS) bestimmt. Die Sekundärstruktur wurde mit Hilfe der Spektralfluorimetrie und dem Circular Dichroismus (CD) untersucht, zur Bestimmung der thermalen Hysterese, d.h. der Gefrierschutzaktivität, wurde die Differential Scanning Calorimetrie (DSC) angewendet. Genauere Angaben sind den Arbei-

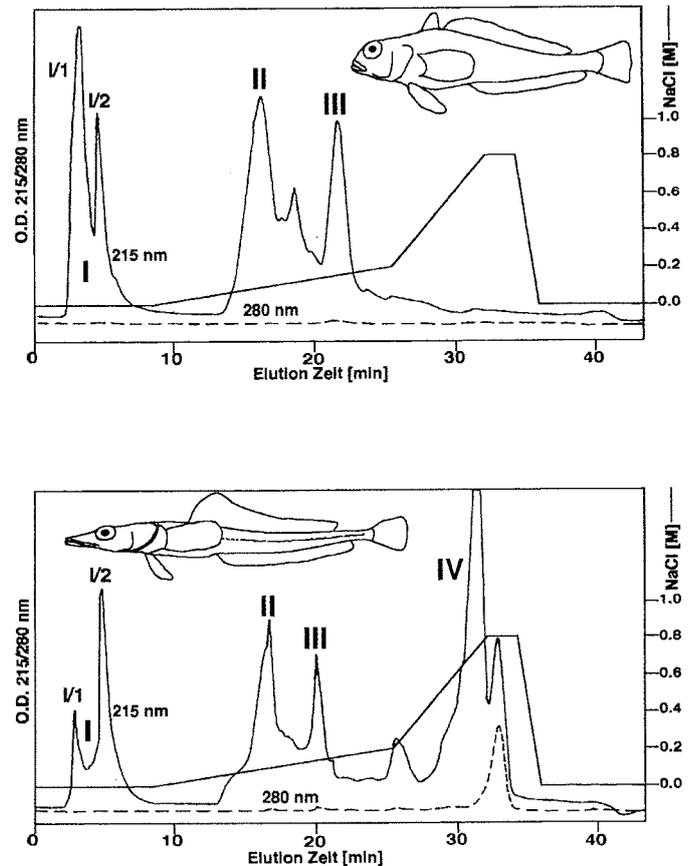


Abb. 2: Elutionsprofil der DEAE-Anionenaustauschchromatographie der Gefrierschutzsubstanzen aus *Lepidonotothen kempi* und *Bathyraco marri*. Aktive Fraktionen, gemessen mit der Differential Scanning Calorimetrie DSC, wurden gepoolt und lyophilisiert. Nur der erste Peak (I) enthält das AFGP mit dem Disaccharid Gal-GalNAc, die weiteren Peaks (II - IV) zeigen Antifreeze Peptide (AFP).

Fig. 2: Elution profile on DEAE anion-exchange HPLC of antifreeze substances of *Lepidonotothen kempi* and *Bathyraco marri*. Active fractions, as measured by differential scanning calorimetry DSC, were pooled and lyophilized. Only the first peak (I) contains the AFGPs with the disaccharid Gal-GalNAc, further peaks (II - IV) indicate antifreeze peptides (AFP).

ten von WÖHRMANN (1993, 1995, 1996a) und WÖHRMANN & HASELBECK (1992) zu entnehmen.

3. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

3.1 Das AFGP arbeitet bei pelagischen und benthopelagischen Notothenioidei effektiver als das der benthischen Arten.

In Tab. 1 fällt auf, daß trotz gleicher Peptidkonzentration die thermale Hysterese der Gefrierschutzsubstanzen sehr unterschiedlich ist. Bei *L. kempi* z.B. beträgt die maximale thermale Hysterese 0,52 °C, bei *P. antarcticum* dagegen 1,20 °C bei der selben Peptidkonzentration (20 mg/ml). Die AFGP 1-4 von *D. mawsoni* zeigen eine deutlichere Hysterese als die AFGP 5-8 (Abb. 3). Um diesen Zusammenhang zu verstehen, ist eine Diskussion der möglichen Mechanismen der Gefrierschutzwirkung nötig.

Fischart	AF-Typ	% FRG	TH	Serum	Fangregion	ø Temp.	Verbreitung	Lebensweise	Quelle
ANTARKTIS			[°C]	TH [°C]		[°C]	[m]		
Nototheniidae									
<i>Gobionotothen gibberifrons</i>	AFGP	0,0270	n.d.	n.d.	Elephant Island	-1/+1	5- 750	benthisch	*
<i>Notothenia coriiceps</i>	AFGP	n.d.	n.d.	n.d.	Balleny Islands	-1/+1	0- 550	benthisch	1,2,14,33
<i>N. angustata</i>	-	-	-	0	Neuseeland	≥ +5		benthisch	1,2,33
<i>Lepidonotothen kempfi</i>	AFGP	0,0636	0,52	n.d.	Lasarewmeer	-1,2	100- 900	benthisch	*
<i>L. larseni</i>	AFGP	n.d.	n.d.	0,40	Balleny Islands	-1/+1	30- 550	benthisch	1,2,33,39
<i>Aethotaxis mitopteryx</i>	AFGP	0,0356	0,89	1,31	Lasarewmeer	-1,9	100- 850	pelagisch	*
<i>Pleuragramma antarcticum</i>	AFGP	0,0267	1,20	0,97	Weddellmeer	-1,9	0- 900	pelagisch	*
<i>P. antarcticum</i>	PAGP	0,0143	0,12	-					*
<i>Dissostichus mawsoni</i>	AFGP	0,1053	1,10	1,15	Weddellmeer	-1,9	80-1600	pelagisch	*,1-3,15
<i>D. eleginoides</i>	-	-	-	0	Chile	≥ +5	70-1500	pelagisch	1,2,33
<i>Pagothenia borchgrevinki</i>	AFGP	n.d.	n.d.	1,23	McMurdo	-1,9	0- 30	cryopelag.	1,2,15,39
<i>Trematomus bernacchii</i>	AFGP	0,1021	1,01	1,12	Weddellmeer	-1,9	100- 700	benthisch	*,2,27,39
<i>T. hansonii</i>	AFGP	n.d.	n.d.	0,95	McMurdo	-1,9	5- 550	benthisch	1-3,7,40
<i>T. eulepidotus</i>	AFGP	0,1989	1,02	1,02	Weddellmeer	-1,8	70- 550	benthopel.	*
<i>T. lepidorhinus</i>	AFGP	0,1351	0,97	0,97	Weddellmeer	-1,9	200- 900	benthopel.	*
<i>T. loembergii</i>	AFGP	0,1204	0,95	0,95	Weddellmeer	-1,9	60- 830	benthopel.	*
<i>T. newnesi</i>	AFGP	n.d.	n.d.	n.d.	McMurdo	-1,9	0- 400	benthisch	1,2,27,33
<i>T. nicolai</i>	AFGP	n.d.	n.d.	n.d.	McMurdo	-1,9	0- 420	benthisch	1,2,33
<i>T. pennellii</i>	AFGP	0,3337	1,06	1,26	Weddellmeer	-1,9	0- 7 30	benthisch	*
Artedidraconidae									
<i>Artedidracono orianae</i>	AFGP	n.d.	n.d.	n.d.	Ross Meer	-1,9	80- 800	benthisch	27
<i>A. loembergii</i>	AFGP	0,0977	0,85	n.d.	Weddellmeer	-1,9	230- 600	benthisch	*
<i>Histiodracono velifer</i>	AFGP	n.d.	n.d.	n.d.	Ross Meer	-1,9	200- 680	benthisch	27
<i>Dolloidracono longedorsalis</i>	AFGP	0,0879	0,81	n.d.	Weddellmeer	-1,9	200-2250	benthisch	*
<i>P. marmorata</i>	AFGP	0,1595	0,87	n.d.	Weddellmeer	-1,9	140-1400	benthisch	*
<i>P. scotti</i>	AFGP	0,1627	0,89	n.d.	Weddellmeer	-1,9	110-1200	benthisch	*
<i>P. dolichobranchiata</i>	AFGP	n.d.	n.d.	n.d.	Ross Meer	-1,9	200- 550	benthisch	27
Bathydraconidae									
<i>Bathydraco marri</i>	AFGP	0,0279	0,85	n.d.	Weddellmeer	-1,9	300-1250	benthisch	*
<i>B. marri</i>	AF II	0,0651	0,84	n.d.					*
<i>Gymnodracono acuticeps</i>	AFGP	0,1973	0,90	n.d.	McMurdo	-1,9	0- 550	benthisch	*,1-3,39
<i>Gerlachea australis</i>	AFGP	0,1643	0,84	0,91	Weddellmeer	-1,9	200- 670	benthisch	*
<i>Racovitzia glacialis</i>	AFGP	0,1147	0,84	0,92	Weddellmeer	-1,9	220- 610	benthisch	*,40
<i>Prionodracono evansii</i>	AFGP	n.d.	n.d.	0,74	Weddellmeer	-1,9	70- 550	benthisch	40
Channichthyidae									
<i>Chaenodracono wilsoni</i>	AFGP	0,2835	0,57	0,80	Weddellmeer	-1,9	200- 800	benthopel.	*,40
<i>Chaenocephalus aceratus</i>	AFGP	n.d.	n.d.	0,56	Subantarktis	-1/+1	5- 770	benthopel.	7,13
<i>Chionoedracono myersi</i>	AFGP	0,1544	0,89	n.d.	Weddellmeer	-1,9	200- 800	benthopel.	*
<i>C. hamatus</i>	AFGP	0,2576	0,80	n.d.	Weddellmeer	-1,9	0- 600	benthopel.	*,7,27
<i>C. rastrospinosus</i>	AFGP	n.d.	n.d.	0,80	Subantarktis	-1/+1	0-1000	benthopel.	27,40
<i>Cryodracono antarcticus</i>	AFGP	0,0920	0,65	n.d.	Weddellmeer	-1,9	200- 800	benthopel.	*
<i>Dacodraco hunteri</i>	AFGP	0,0809	1,00	n.d.	Lazarewmeer	-1,9	300- 800	pelagisch	*
<i>Neopagetopsis ionah</i>	AFGP	0,0621	0,52	n.d.	Weddellmeer	-1,9	20- 900	benthopel.	*
<i>Pagetopsis maculatus</i>	AFGP	0,1796	0,94	n.d.	Weddellmeer	-1,9	200- 800	benthisch	*
<i>P. macropterus</i>	AFGP	0,2498	0,97	n.d.	Weddellmeer	-1,9	0- 650	benthisch	*
Muraenolepididae									
<i>Muraenolepis marmoratus</i>	(AFGP)	0,0076	0,56	n.d.	Lazarewmeer	≈ +0,5	20-1600	benthisch	*
Zoarcidae									
<i>Lycodichthys dearborni</i>	AFP III	n.d.	n.d.	0,78	McMurdo	≈ +0,5	550- 590	benthisch	5,13,39
<i>Pachycara brachycephalum</i>	AFP III	n.d.	n.d.	0,42	McMurdo	≈ +0,5	200-1800	benthisch	4
<i>Lycenchelys hureaui</i>	AFP	0,0041	≈ 0,1	n.d.	Lazarewmeer	≈ +0,5	560- 940	benthisch	*
Liparididae									
<i>Paraliparis somovi</i>	AFP	0,0103	0,54	n.d.	Lazarewmeer	≈ +0,5	400- 850	pelagisch	*
<i>P. devriesi</i>	n.d.	n.d.	n.d.	0,08	McMurdo	≈ +0,5	500- 700	pelagisch	39
Myctophidae									
<i>Gymnoscopelus opisthopterus</i>	AFP	0,0070	≈ 0,1	n.d.	Lazarewmeer	≈ +0,5	≥ 500	pelagisch	*
Macrouridae									
<i>Macrourus holotrachys</i>	(AFGP)	0,0031	≈ 0,1	n.d.	Lazarewmeer	≈ +0,5	150-1100	benthopel.	*
Rajidae									
<i>Bathyraja maccaini</i>	n.d.	<0,001	n.d.	n.d.	Lazarewmeer	-1/+1	≈ 500	benthisch	*

Fischart	AF-Typ	% FRG	TH [°C]	Serum TH [°C]	Fangregion	ø Temp. [°C]	Verbreitung [m]	Lebensweise	Quelle
ARKTIS / nord-boreal									
Gadidae									
<i>Arctogadus glacialis</i>	AFGP	0,2856	0,63	n.d.	N/O-Grönland	-1,9/+1	90-490	benthopel.	*
<i>Boreogadus saida</i>	AFGP	n.d.	n.d.	0,67	Barentsee	-1,9/+2	0-100	cryopelag.	12,28
<i>Gadus ogac</i>	AFGP	n.d.	n.d.	1,18	Labrador	-1,9/+4	20-150	benthopel.	10
<i>G. morhua</i>	AFGP	n.d.	n.d.	n.d.	Neufundland	0/+6	30-200	benthopel.	26,42
<i>Microgadus tomcod</i>	AFGP	n.d.	n.d.	0,54	New Brunswick			benthopel.	25
<i>Eleginus gracilis</i>	AFGP	n.d.	n.d.	0,57	Alaska	-1,9/+2	0-100	benthopel.	11,29
Pleuronectidae									
<i>Pleuronectes platessa</i>	AFP	n.d.	n.d.	0,78	Nordsee	0/+12	0-200	benthisch	40
<i>Pl. quadrituberculatus</i>	AFP I	n.d.	n.d.	n.d.	Neufundland	0/+12	0-200	benthisch	8,34-37
<i>Pseudopl. americanus</i>	AFP I	n.d.	n.d.	0,50	Neufundland	0/+12	0-200	benthisch	9,24,30
<i>Limanda ferruginea</i>	AFP I	n.d.	n.d.	n.d.	Labrador		20-180	benthisch	22,34-37
Cottidae									
<i>Icelus bicornis</i>	AFP	0,0146	n.d.	0	N/O-Grönland	-1/+1	10-560	benthisch	*
<i>Triglops nybelini</i>	AFP	0,0137	n.d.	0	N/O-Grönland	-1/+1	50-300	benthisch	*
<i>Myoxocephalus scorpius</i>	AFP I	n.d.	n.d.	0,60	Labrador	0/+12	0- 60	benthisch	18,19,31
<i>M. aeneus</i>	AFP I	n.d.	n.d.	n.d.	Neufundland	0/+12	15- 20	benthisch	20,41
<i>M. scorpiodes</i>	AFP I	n.d.	n.d.	n.d.	Neufundland	0/+12	0- 30	benthisch	21,34-37
<i>Hemitripterus americanus</i>	AFP II	n.d.	n.d.	0,53	Neufundland	0/+12	0- 50	benthisch	17,32
Zoarcidae									
<i>Lycodes polaris</i>	AFP III	n.d.	n.d.	n.d.	Labrador	-1/+1	100-300	benthisch	5,8,38
<i>Macrozoarces americanus</i>	AFP III	n.d.	n.d.	0,92	Neufundland	0/+12		benthisch	6,16,38
Liparididae									
<i>Liparis fabricii</i>	AFP	0,0106	<0,1	n.d.	N/O-Grönland	-1/+1	200	benthopel.	*
Clupeidae									
<i>Clupea harengus harengus</i>	AFP	n.d.	n.d.	n.d.	Nord-Atlantik	0/+12	0-200	pelagisch	43
Osmeridae									
<i>Osmerus mordax</i>	AFP	n.d.	n.d.	n.d.	Nord-Atlantik	0/+12	0-150	pelagisch	43

Tab. 1: Zusammenfassung der verfügbaren Daten über Gefrierschutzsubstanzen polarer Fische. AF-Typ = Gefrierschutzsubstanz, TH = thermale Hysterese [°C] von Blutserum oder Proteinlösung (20 mg/ml), n.d. = keine Untersuchungen. Angaben zur min/max Tiefe [m], Verbreitung und Lebensweise stammen aus GON & HEEMSTRA (1990), Fangregion und ø Temp [°C] sind den jeweiligen Arbeiten entnommen.

Tab. 1: Summary of available data about antifreeze peptides of polar fish. AF-Typ = antifreeze substance; TH = thermal hysteresis [°C] of blood serum and peptide solution (20 mg/ml); n.d. = not determined; data about depth of distribution [m], habitat and life style are given in GON & HEEMSTRA (1990); region of catch and ambient water temperature are of cited literature.

* = vorliegende Arbeit, 1 = DOBBS et al. 1974, 2 = DOBBS & DeVRIES 1975, 3 = EASTMAN & DeVRIES 1986, 4 = CHENG & DeVRIES 1989, 5 = SCHRAG et al. 1987, 6 = ANANTHANARAYANAN et al. 1986, 7 = SCHNEPPENHEIM & THEEDE 1982, 8 = DeVRIES 1980, 9 = DUMAN & DeVRIES 1976, 10 = VANVOORHIES et al. 1978, 11 = RAYMOND et al. 1975, 12 = OSUGA & FEENEY 1978, 13 = DeVRIES & SOMERO 1970, 14 = FRANKS & MORRIS 1978, 15 = DeVRIES et al. 1970, 16 = HEW et al. 1984, 17 = SLAUGHTER et al. 1981, 18 = HEW et al. 1980, 19 = HEW et al. 1985, 20 = HEW et al. 1987, 21 = FLETCHER et al. 1982a, 22 = SCOTT et al. 1987, 24 = HEW & YIP 1976, 25 = FLETCHER et al. 1982b, 26 = HEW et al. 1981, 27 = HASCHEMEYER & JANNASCH 1983, 28 = MORRIS et al. 1978, 29 = BURCHAM et al. 1986, 30 = HEW et al. 1986a, 31 = HEW & FLETCHER 1985, 32 = NG et al. 1986, 33 = EASTMAN 1990, 34 = HEW et al. 1986b, 35 = SCOTT et al. 1986, 36 = DAVIES et al. 1982, 37 = PICKETT et al. 1984, 38 = LI et al. 1985, 39 = DeVRIES & LIN 1977, 40 = RAHMANN et al. 1984, 41 = CHAKRABARTY et al. 1988, 42 = FLETCHER et al. 1987, 43 = EWART & FLETCHER 1990.

Obwohl die Primärstruktur des AFGP schon früh bekannt war (FRANKS & MORRIS 1978), ist erst in den letzten Jahren ein Einblick in den Mechanismus dieser Gefrierschutzglykopeptide gelungen (FEENEY 1988). Ein Phänomen ist der nicht-colligative Effekt, d.h. ein AFGP-Molekül erniedrigt den Gefrierpunkt um ein Vielfaches gegenüber z.B. einer Salzlösung, wenn Proteinkonzentration und Molekulargewicht berücksichtigt werden. AFGP bindet mehr Wassermoleküle als andere gewöhnliche Proteine, z.B. Hämoglobin. Es wird mittlerweile allgemein akzeptiert, daß ein „adsorption-inhibition“-Prozess für das Wirken von AFGP verantwortlich ist (FEENEY et al. 1986). Die Adsorption des AFGP an der Eisoberfläche wird vermutlich über Wasserstoffbrücken zwischen den Hydroxyl-Gruppen der Zucker und den Wassermolekülen des Eis bewerkstelligt.

Von Bedeutung für die Gefrierpunktserniedrigung ist die Größe des AFGP-Moleküls. Die kleinen AFGP 6-8, bei denen an einigen Stellen Alanin durch Prolin ersetzt ist, zeigen eine maximale Hysterese von 0,6 °C. Die AFGP 1-5 lösen eine Hysterese von fast 1,5 °C aus. Die großen Moleküle sind besonders wirksam bei stark unterkühlten Lösungen, bei viel Eis und bei schnellen Temperaturwechseln (HANSEN et al. 1991). Es scheint gesichert, daß alle AFGP 1-8 in einer ausgestreckten stabförmigen Struktur in Form einer linksgedrehten α -Helix vorliegen (BUSH et al. 1984, RAO & BUSH 1987). Vermutlich blockieren AFGP-Moleküle ein Eiskristallwachstum entlang den α -Achsen des Kristalls, sodaß nadelartige Kristalle entstehen (Wachstum nur entlang der c -Achse); bei weiterer Unterkühlung findet auch ein Wachstum entlang der α -Achsen statt. Dieses Phänomen

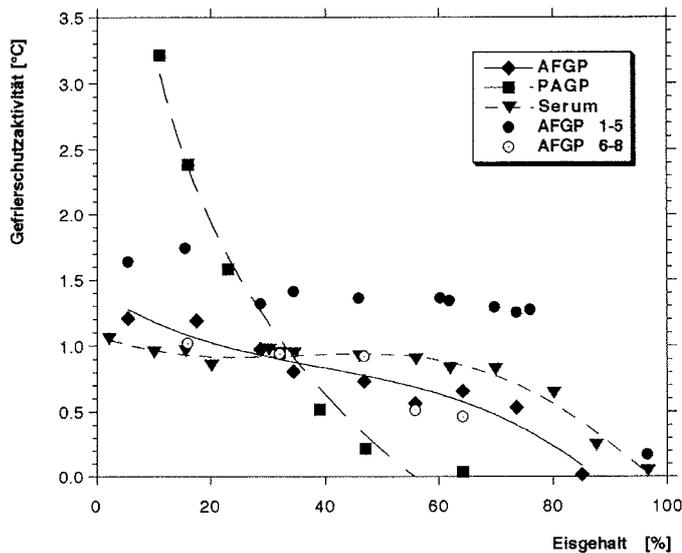


Abb. 3: Grafik der Gefrierschutzaktivität (thermale Hysterese) von verschiedenen Gefrierschutzsubstanzen in Abhängigkeit vom Eisgehalt (%) in der Lösung. AFGP = Antifreeze Glykopeptid (1-5 hochmolekulare Fraktion, 6-8 niedermolekulare Fraktion), PAGP = *Pleuragramma*-Antifreeze Glycopeptid. Alle Proben wurden mit $1,0\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$ gescannt.

Fig. 3: Graph of antifreeze activity (thermal hysteresis) of different antifreezes in relation to the ice content (%) in the solution. AFGP = antifreeze glycopeptide (1-5 high molecular fraction, 6-8 low molecular fraction), PAGP = *Pleuragramma*-antifreeze glycopeptide. All samples shown were run at a scan rate of $1.0\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$.

kann indirekt auch mit der „differential scanning calorimetry“ beobachtet werden (Abb. 4). Die Schulter kennzeichnet das langsame Wachstum entlang der *c*-Achse. Kurzfristig wird das Eiskristallwachstum gestoppt; ein Plateau entsteht. Bei einer weiteren Abkühlung gefriert die Probe vollständig, ein Wachstum findet auch entlang der *a*-Achse statt.

Die meisten der danach untersuchten Notothenioidei besitzen die AFGP 1-8. SCHNEPPENHEIM & THEEDE (1982) konnten bei *C. rastrospinosus* und *C. hamatus* AFGP-Moleküle mit einem MW von 50-60 kDa isolieren. Bei eigenen Untersuchungen wurden ebenfalls bei Channichthyiden (*C. myersi* und *P. maculatus*) AFGP-Moleküle mit höherem MW beobachtet. Bekannt ist, daß das AFGP 1 (MW 33.700) bei geringster Osmolarität die höchste Hysterese auslöst, also am effektivsten arbeitet (FEENEY et al. 1986). Andererseits muß berücksichtigt werden, daß die Viskosität einer Flüssigkeit nahe dem Gefrierpunkt stark ansteigt. Hohe Konzentrationen hochmolekularer Substanzen im Blut erschweren eine Zirkulation. Die Channichthyiden zeigen physiologische Besonderheiten (Reduktion der Erythrocyten, Erweiterung des Gefäßsystems, Vergrößerung des Blutvolumens), die die Synthese und den Transport großer Mengen der effektiver arbeitenden hochmolekularen AFGPs begünstigen könnten.

3.2 Die Zusammensetzung der Gefrierschutzsubstanzen ist von der Lebensweise des Fisches abhängig.

Die qualitative und quantitative Zusammensetzung der Gefrier-

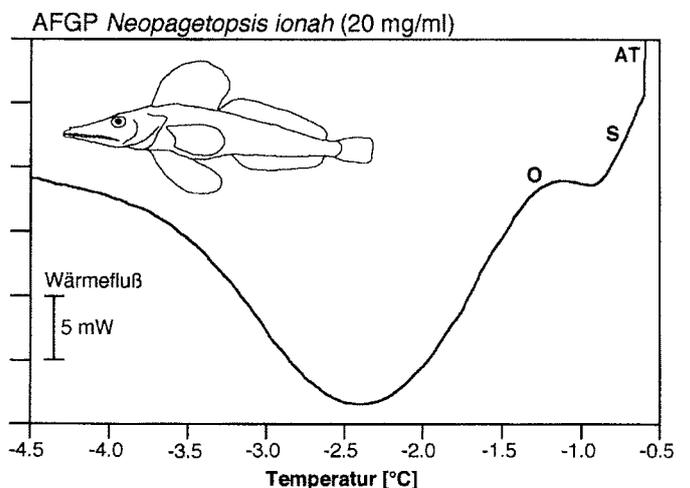
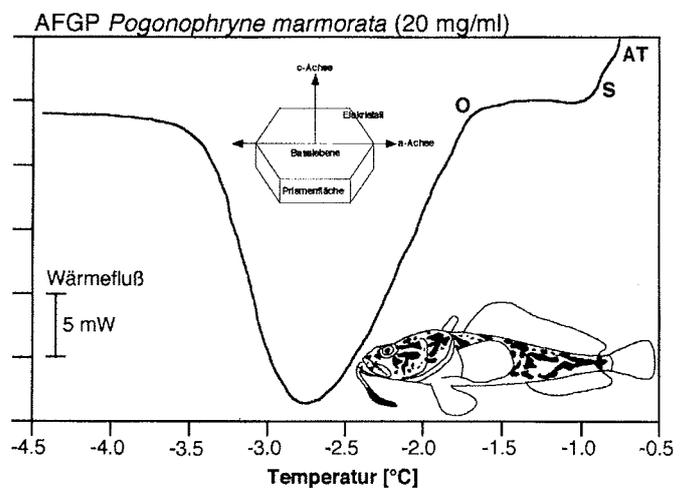
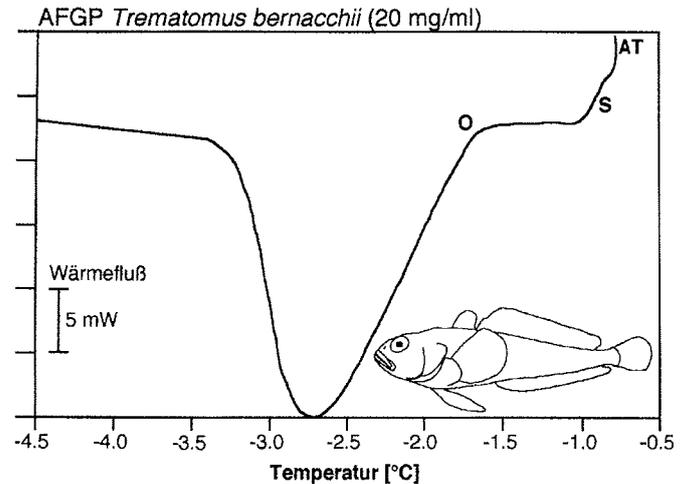


Abb. 4: Differential Scanning Calorimetric (DSC) des AFGP (20 mg ml^{-1}) von *Trematomus bernacchii*, *Pogonophryne marmorata* und *Neopagetopsis ionah*. Das typische Thermogramm ist gekennzeichnet durch eine Schulter und ein Plateau vor dem Exotherm bei einer Abkühlungsrate von $1\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$. Die Skala an der y-Achse gibt den Wärmefluß in Milliwatt an. AT = Einfädungstemperatur, S = Schulter, O = Onset.

Fig. 4: Differential scanning calorimetry (DSC) of AFGP (20 mg ml^{-1}) of *Trematomus bernacchii*, *Pogonophryne marmorata* and *Neopagetopsis ionah*. The typical thermogram revealed a shoulder and a delay in the exotherm onset upon cooling at $1\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$. Scale bars next to the thermograms represent heat flow in milliwatts. AT = annealing temperature, S = shoulder, O = onset.

schutzglykopeptide variiert von Art zu Art stark (Tab. 1, Abb. 5). Bei *Trematomus pennellii* (0,334 % FRG) und *Arctogadus glacialis* (0,286 % FRG) wurden z.B. große Mengen AFGP isoliert, während *Gobionotothen gibberifrons* weniger als ein Zehntel davon besitzt (0,027 % FRG). Das deutet auf eine Beziehung zwischen dem Gefrierpunkt des Blutes, d.h. der Temperatur, bei der der Fisch in der Anwesenheit von Eis gefriert und dem Lebensraum bzw. der Lebensweise des Fisches hin. Die antarktischen Notothenioidei und der arktische Gadide *A. glacialis* besitzen ganzjährig einen Gefrierschutz aus AFGP, die arktischen Fische - vermutlich mit Ausnahme der Gadiden *Boreogadus saida* und *Arctogadus glacialis* - dagegen synthetisieren Gefrierschutz nur im Winter.

Die Konzentrationen dieser Substanzen werden entsprechend der Lebensweise nur auf den tatsächlich notwendigen Gefrierschutz eingestellt. So ist bekannt, daß im selben Lebensraum (Rossmeer) der oberflächennah in ständigem Eiskontakt lebende *Pagothenia borchgrevinki* einen stärkeren Gefrierschutz unterhält als die Bodenarten *Trematomus hansonii*, *T. loennbergii* und

T. bernacchii (DEVRIES & LIN 1977). Aber nicht nur der absolute Gehalt von AFGP ist bei dieser cryopelagischen Art erhöht (>25 mg/ml Blutserum), sondern auch der Anteil der höhermolekularen AFGP 1-5.

Weiterhin werden AFGP-Moleküle bei den hoch-antarktischen Notothenioidei und den arktischen Gadiden *Boreogadus saida* (CHRISTIANSEN et al. 1996) und *Arctogadus glacialis* nicht ausgeschieden, sondern durch aglomeruläre Nieren zurückgehalten (DOBBS et al. 1974, DOBBS & DEVRIES 1975). Der physiologische Aufwand, der zur Synthese dieser Moleküle in hohen Konzentrationen (20 mg/ml Blutserum und mehr) getrieben wird, weist auf einen aufwendigen Stoffwechselprozeß hin, der sich im Ruhesauerstoffverbrauch niederschlägt. So konnten CHRISTIANSEN et al. (1996) zeigen, daß Individuen von *Boreogadus saida*, die AFGP synthetisieren, mehr Sauerstoff veratmen als vergleichbare Tiere, die keinen Gefrierschutz synthetisieren (Zimmermann, pers. Mitt.).

Die meisten antarktischen Fischarten zeigen eine starke Tie-

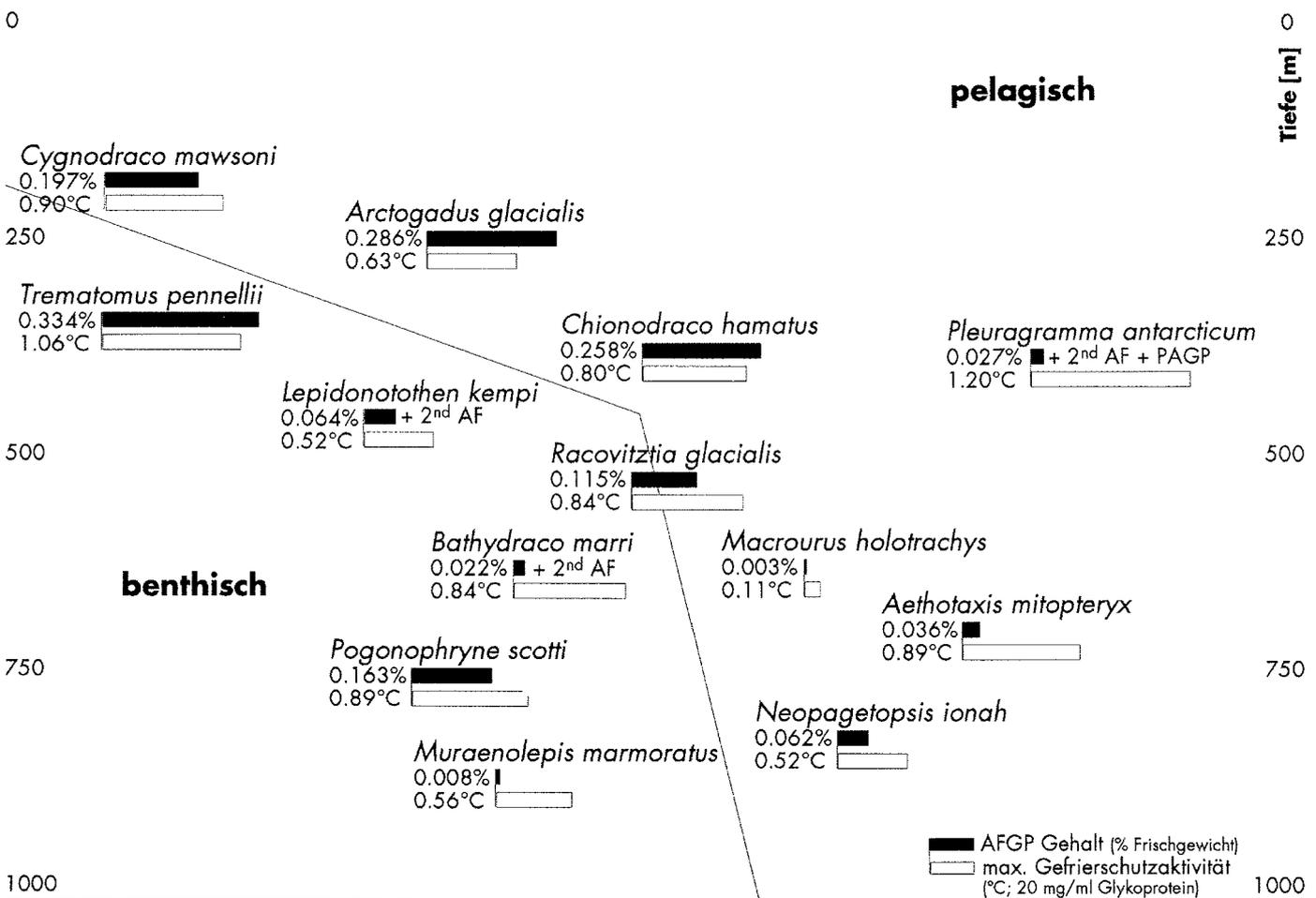


Abb. 5: Gefrierschutzglykopeptide einiger untersuchter Fischarten in Abhängigkeit von Wassertiefe und Lebensweise. Die gezeigten Arten sind repräsentativ für die meisten ökologischen Habitate. Die Konzentration von AFGP ist in % Frischgewicht angegeben, die Gefrierschutzaktivität (°C) wurde in einer wässrigen Lösung mit einer Proteinkonzentration von 20 mg ml⁻¹ mit der Differential Scanning Calorimetrie bestimmt.

Fig. 5: Antifreeze glycopeptides of some investigated fish species in relation to water depth and mode of life. Species shown here are representative of most of the ecological habitats. The concentration of AFGP is given in % fresh weight, the antifreeze activity (°C) was measured at a water solution with a protein concentration of 20 mg ml⁻¹ with the differential scanning calorimetry.

fenverbreitung (z.B. *Dolloidraco longedorsalis* >2000 m). Zum Teil führen sie vertikale Wanderungen im Verlauf ihres Lebenszyklus (z.B. *P. antarcticum*), oder im Verlauf einer Tagesperiode (z.B. Myctophidae) durch, zum Teil sind sie an verschiedenen geographischen Orten in unterschiedlichen Tiefen anzutreffen (*T. hansonii*: McMurdo <100 m, Weddellmeer 200-300 m). Die Notothenioidei der vorliegenden Untersuchung kann man bezüglich ihres Vorkommens und ihrer AFGP-Konzentrationen in drei Gruppen einteilen: Arten, die vorwiegend auf dem Schelf in flacherem Wasser (100-400 m) leben, besitzen viel AFGP (*T. pennellii*, *Gymnodraco acuticeps*, *T. eulepidotus*, *Chaenodraco wilsoni*, *Chionodraco hamatus*, *Pagetopsis macropterus*). Arten der biomassenreichsten Zone am Kontinentalrand (400-600 m) im Weddellmeer und im Lazarewmeer besitzen mittlere Mengen an AFGP (*T. lepidorhinus*, *T. loennbergi*, *Gerlachea australis*, *Racovitzia glacialis*, *Chionodraco myersi*, *Pagetopsis maculatus*, *Cryodraco antarcticus*, *Dacodraco hunteri* und die Artedidraconidae). Arten der tieferen Zonen des Kontinentalabhangs synthetisieren die geringsten Mengen (*Bathydraco marri*, *Neopagetopsis ionah*, nicht-Notothenioidei).

Auch innerhalb der Familie der Channichthyidae ist die Tendenz zur Reduktion des AFGP-Gehalts mit zunehmender Tiefenverbreitung gut zu verfolgen. Arten (*Chaenodraco wilsoni*, *Chionodraco hamatus* und *Pagetopsis macropterus*), die bevorzugt auf dem flachen Schelf (200-300 m) vorkommen und die auch in oberflächennahem Wasser beobachtet werden (DEWITT 1971), besitzen viel AFGP. *C. myersi* und *P. maculatus*, zwei Charakterarten des Schelfhangs zwischen 500-600 m im Weddellmeer (HUBOLD 1991), haben ihr AFGP reduziert. *C. antarcticus*, *D. hunteri* und *N. ionah* zeigen die geringsten Gefrierschutzkonzentrationen. Sie sind im Weddellmeer vor allem am Kontinentalabhang zwischen 500-800 m im warmen Tiefenwasser (>0 °C, FAHRBACH et al. 1987) anzutreffen. Gefrierschutz ist bei diesen Arten allerdings auf Grund der Wassertemperatur über dem Gefrierpunkt und des hydrostatischen Drucks nicht notwendig. In einer Tiefe von 500 m (50 bar Druck) ist der Gefrierpunkt des Fischbluts um ca. 0,37 °C (LEWIS & PERKIN 1977) gesenkt. Ausschlaggebend für die Synthese von AFGP bei diesen Arten muß demnach die Verbreitung der Art auch in (A) kälteres und/oder (B) flacheres Wasser sein.

3.3 Die im Eisschelfwasser des Filchnergrabens lebenden Bathydraconiden synthetisieren nur geringe Mengen des AFGP.

Bathydraco marri besitzt in Bezug auf seinen Gefrierschutz eine Sonderstellung. Bei dieser Art wurden nur 279 mg AFGP/kg FRG gefunden (Tab. 1). Dies ist die geringste Menge AFGP aller untersuchten Notothenioidei, und beträgt nur ca. 20 % des AFGP der anderen Bathydraconiden. Allerdings wurden bei ihr ähnlich wie bei *Lepidonotothen kempfi* noch zwei weitere Fraktionen mit der DEAE-Ionenaustauscherchromatographie getrennt (AF II und III), wobei die Fraktion AF III eine fast ebenso hohe Hysterese auslöst wie das AFGP (Abb. 2). Diese Substanzen könnten eine additive Wirkung haben, wie es auch von den AFGP 1-8 bekannt ist (BURCHAM et al. 1986).

Die Bathydraconiden werden in größerer Zahl vor allem im südöstlichen Weddellmeer angetroffen. Dort sind sie in tieferem Wasser (>700 m) verbreitet. ANDRIASHEV (1965) gibt an, daß einige Arten der Gattung *Bathydraco* bis in Tiefen von 2600 m vorkommen. *B. marri* hat seine Hauptverbreitung zusammen mit *D. longedorsalis* im Bereich des Filchner-Grabens, einer tiefen Einkerbung, die vom Filchner-Eisschelf zum Kontinentalabhang verläuft. Die Hauptwassermasse ist das Eisschelfwasser mit Temperaturen bis -2,2 °C (HELLMER & BERSCH 1985), welches zudem häufig mit Eisplättchen versetzt ist. Die geringe Arten-Diversität (und damit relativ hohe Abundanz der Bathydraconidae) in der Gould Bay könnte seine Ursache in der sehr tiefen Temperatur haben. Untersuchungen zum Hämoglobin (KUNZMANN et al. 1991) und den Membranglykolipiden (BECKER et al. 1995) zeigen weitere Anpassungen, die ein Überleben von *B. marri* unter diesen Bedingungen begünstigen.

Neben der Temperatur kann auch der Wasserdruck von Bedeutung sein. SOMERO (1990) zeigt, daß der hydrostatische Druck selektiv auf unterschiedliche Peptide wirkt: „Normale“ Enzyme funktionieren nicht unter dem Druck, der in 500-600 m Tiefe herrscht. Die Kombination von tiefer Temperatur mit hohem Druck im Filchner-Graben könnte zu einer Selektion geführt haben, die u.a. *B. marri* mit ihrem ungewöhnlichen „Gefrierschutzbesteck“ bevorzugt hat. Die zusätzlichen Gefrierschutzpeptide (z.B. AF II und III), mit vermutlich anderen Struktureigenschaften, könnten die niedrigen Mengen an AFGP in *B. marri* erklären. Allerdings sind hier weitere Untersuchungen notwendig.

Ähnliches konnte bei dem antarktischen Silberfisch *Pleura-gramma antarcticum* beobachtet werden. Die beiden Gefrierschutzglykopeptide von *P. antarcticum*, AFGP und PAGP, ergänzen sich in ihrer Wirkung und zeigen damit eine bei Fischen bislang unbekannt Strategie des Gefrierschutzes auf: Das PAGP ist bei niedrigen Eisgehalten aktiv, das AFGP dagegen bei höheren (WÖHRMANN 1995). Dadurch ist es *P. antarcticum* möglich, bei niedrigeren Konzentrationen von Gefrierschutzsubstanzen sehr viel effektiver, ein Wachstum von Eiskristallen schon in einem frühen Stadium zu unterbinden. Da für das Erreichen einer maximal ausgeprägten Gefrierschutzwirkung ein Glykopeptidgemisch einen höheren Effekt bewirkt als einzelne rein isolierte aktive Substanzen, scheint hier eine komplexere Wirkungsweise zugrunde zu liegen. Man muß davon ausgehen, daß diese Substanzen miteinander in Wechselwirkung treten und erst dadurch eine maximale Hysterese entwickeln. Dies steht allerdings in Widerspruch mit einer Untersuchung von CHAO et al. (1995), die die Gefrierschutzwirkung in Abhängigkeit verschiedener AFP-Konzentrationen untersuchten. So stellten sie fest, daß es egal ist in welcher Zusammensetzung ein Gemisch aus AFP I, II und III vorliegt, um eine Gefrierpunktserniedrigung von 0,35 °C zu erzielen. Die niedrigen Konzentrationen bedingen zudem eine geringere Viskosität des Blutes und eine weniger energieaufwendige Synthese, vermutlich Voraussetzung für eine vollpelagische Lebensweise bei Wassertemperaturen nahe dem Gefrierpunkt.

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

Die Fischfauna des Nordpolarmeeres setzt sich aus Arten der nord-borealen Meere und wenigen endemischen Arten zusammen (DUNBAR 1968). Zu ihnen gehört, neben dem Polardorsch *Boreogadus saida*, der arktische Dorsch *Arctogadus glacialis*. Erstmalig konnte dieser Gadidae auf Gefrierschutz hin untersucht werden. Bei ihm wurden ebenfalls große Mengen AFGP (0,28 % FRG) isoliert, die an die maximalen Konzentrationen von AFGP der Notothenioidei (z. B. *C. wilsoni* 0,28 % FRG) heranreichen (Tab. 1).

In der Vergangenheit wurde AFGP aus einigen Gadidae der Arktis isoliert, das identisch zu dem der Notothenioidei ist. Aus *Gadus ogac* aus der Labradorsee (VANVOORHIES et al. 1978), *Gadus morhua* (HEW et al. 1981) und *Microgadus tomcod* (FLETCHER et al. 1982a) von Neufundland, *Boreogadus saida* (OSUGA & FEENEY 1978) und *Eleginus gracilis* (RAYMOND et al. 1975) von Alaska konnte AFGP in hohen Konzentrationen (40-50 mg/ml Serum) isoliert werden. Diese Konzentrationen liegen deutlich höher als die AFGP-Konzentrationen z.B. in der cryopelagischen Art *Pagothenia borchgrevinki*. Während die ganzjährige Synthese von AFGP zumindest bei einigen Notothenioidei gesichert ist (DEVRIES 1988), erscheint dies bei den Gadidae der Arktis fraglich. Die AFP-Synthese arktischer Arten wird über die Tageslänge reguliert und über den Hypothalamus gesteuert (DAVIES et al. 1988, FLETCHER et al. 1997, PRICE et al. 1990). Im Sommer findet keine Synthese statt. Bei Gadiden gefangen im Sommer wurde in der Leber, dem Hauptsyntheseort von AFGP, nur eine sehr verminderte Syntheseaktivität beobachtet. Trotzdem wurde bei den nördlicher vorkommenden Arten (*E. gracilis* und *B. saida*) eine deutliche thermale Hysterese des Blutserums festgestellt. Es wird spekuliert, daß der relativ hohe AFGP-Gehalt im Sommer durch die lange Halbwertszeit dieser Glykopeptide verursacht wird (ANANTHANARAYANAN 1989).

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

3.5 Vertreter der Familie Liparididae der Arktis und der Antarktis synthetisieren Gefrierschutzpeptide.

Neben den Notothenioidei kommen in der Antarktis noch Vertreter der Zoarcidae, Liparididae, Muraenolepididae, Macrouridae, Myctophidae und Rajidae vor. Arten weiterer Familien wurden bestimmt, sollen hier aber nicht weiter erläutert werden. Viele nicht-notothenioide Fische sind entweder in der Subantarktis oder im wärmeren Tiefenwasser des Kontinents verbreitet. Betrachtet man die Verbreitungskarte der Fische im Weddellmeer, so fällt auf, daß der Anteil nicht-notothenioider Arten nach Süden hin abnimmt bzw. in die Tiefe zunimmt (HUBOLD 1991). Diese Arten meiden kaltes Wasser. So wurde angenommen, daß diese Arten keinen Gefrierschutz benötigen. Die Untersuchungen an Teleosteen des Weddellmeers und Lazarevmeers erbrachten aber in allen Fällen Gefrierschutzsubstanzen. Erstmalig konnten bei einem Liparididen, Muraenolepididen, Macrouriden und Myctophiden Gefrierschutzsubstanzen nachgewiesen werden. Die Zoarciden *L. dearborni* (SCHRAG et al. 1987) und *P. brachycephalum* (CHENG & DEVRIES 1989) vom McMurdo Sound besitzen ebenfalls Gefrierschutz. Dies bedeutet gleichzeitig, daß alle untersuchten Teleostei der Antarktis und Arktis Gefrierschutz(glyko)peptide synthetisieren. Diese Substanzen sind also viel weiter verbreitet als bislang angenommen, was wiederum Konsequenzen für die Entstehungsgeschichte hat (siehe unten).

Zu den demersalen Charakterarten im Weddellmeer und Lazarevmeer zwischen 500 - 800 m zählen *M. holotrachys* und Arten der Gattung *Muraenolepis*. *M. holotrachys* ist auch aus der Magellanstraße bekannt, *G. opisthopterus* ist circumpolar südlich der antarktischen Konvergenz verbreitet (GON & HEEMSTRA 1990) und gehört zu den charakteristischen pelagischen Arten des östlichen Weddellmeeres (HUBOLD 1991). Von diesen Arten ist bekannt, daß sie zumindest als Larven und Juvenile auch in flacheren Zonen (<100 m) vorkommen. Eine Mischfauna wurde im Lazarevmeer gefunden. Die Subantarktischen Arten *L. hureaui* (Kerguelen: ANDRIASHEV 1979), *P. somovi* (Süd-Shetland: ANDRIASHEV & NEELOV 1979) und *M. marmoratus* (Scotiameer: CHIU & MARKLE in GON & HEEMSTRA 1990) konnten aus den Fängen identifiziert werden, gefangen in Tiefen zwischen 400-800 m und Temperaturen von -1,0 bis +0,75 °C.

Die Verbreitung nicht-notothenioider Arten vor allem in wärmeren und tieferen Wasser erklärt somit die niedrigen Konzentrationen von AFP im Serum, die zum Teil an der Nachweisgrenze liegen (JUNG et al. 1995, WÖHRMANN 1991). So erscheint es auch verständlich, daß diese Nachweise bislang nur an Zoarciden und Liparididen der Hochantarktis durchgeführt werden konnten. Berücksichtigt man zudem, daß wir uns gegenwärtig in einer Warmzeit befinden, so ist es nicht verwunderlich, daß bei subantarktischen bzw. subarktischen Arten keine Gefrierresistenz nachgewiesen werden konnte. An dieser Stelle kann nur noch die molekulargenetische Analyse zum Ursprung der AFP weitere Informationen zur Synthese von Gefrierschutzpeptiden geben.

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

Die bislang beschriebenen Gefrierschutzsubstanzen sind auf sieben Unterordnungen verteilt. Berücksichtigt man die noch nicht charakterisierten Substanzen, ergeben sich neun Unterordnungen bzw. drei Klassen (Abb. 6). SCOTT et al. (1986) vermuten, daß die ersten Gefrierschutzglykopeptide während der ersten dramatischen Abkühlung vor ungefähr 30 Mio Jahren zwischen dem Eozän und dem Oligozän entstanden sind. Eine weitere Abkühlungsphase trat im ausgehenden Pliozän (4-5 Mio Jahre) ein. Die Evolution vor allem der arktischen AFPs soll während der Glacialzeit vor 2 Mio Jahren mehrmals unabhängig voneinander stattgefunden haben (DAVIES et al. 1988).

Als gesichert kann man annehmen, daß antarktische Arten vor ca. 15-20 Mio (KENNETT 1977) und arktische Arten vor ca. 2,5 Mio Jahren (SHACKLETON et al. 1984) intensiv mit der Vereisung

konfrontiert wurden, und während dieser Zeiten unter dem Selektionsdruck u.a. der Temperatur eine Radiation auf Gattungs- und Artenebene aller Organismen stattgefunden hat (CLARKE & CRAME 1989, CLARKE 1990). Unter der Voraussetzung, daß nur drei Familien der Unterordnung Notothenioidei einen identischen Gefrierschutz (AFGP) synthetisieren (EASTMAN 1990), wurde angenommen, daß während der Diversifikation der Familien unter klimatischem Streß das AFGP entstand. Arten mit der Anlage zur AFGP-Synthese konnten in kalte Regionen vordringen, andere nicht. Diese Hypothese muß allerdings insofern überdacht werden, als daß zum einen alle bislang untersuchten antarktischen Notothenioidei AFGP besitzen, so z.B. auch der in warmen Tiefenwasser (+0,5 °C) lebende Channichthyide *N. ionah* und die Arten der Gattung *Pogonophryne*. Zum anderen haben *P. antarcticum*, *L. kemp* und *B. marri* zusätzliche Gefrierschutzsubstanzen entwickelt.

Weiterhin ist bemerkenswert, daß auf der Nordhemisphäre Vertreter der Gadiformes dasselbe AFGP synthetisieren wie die

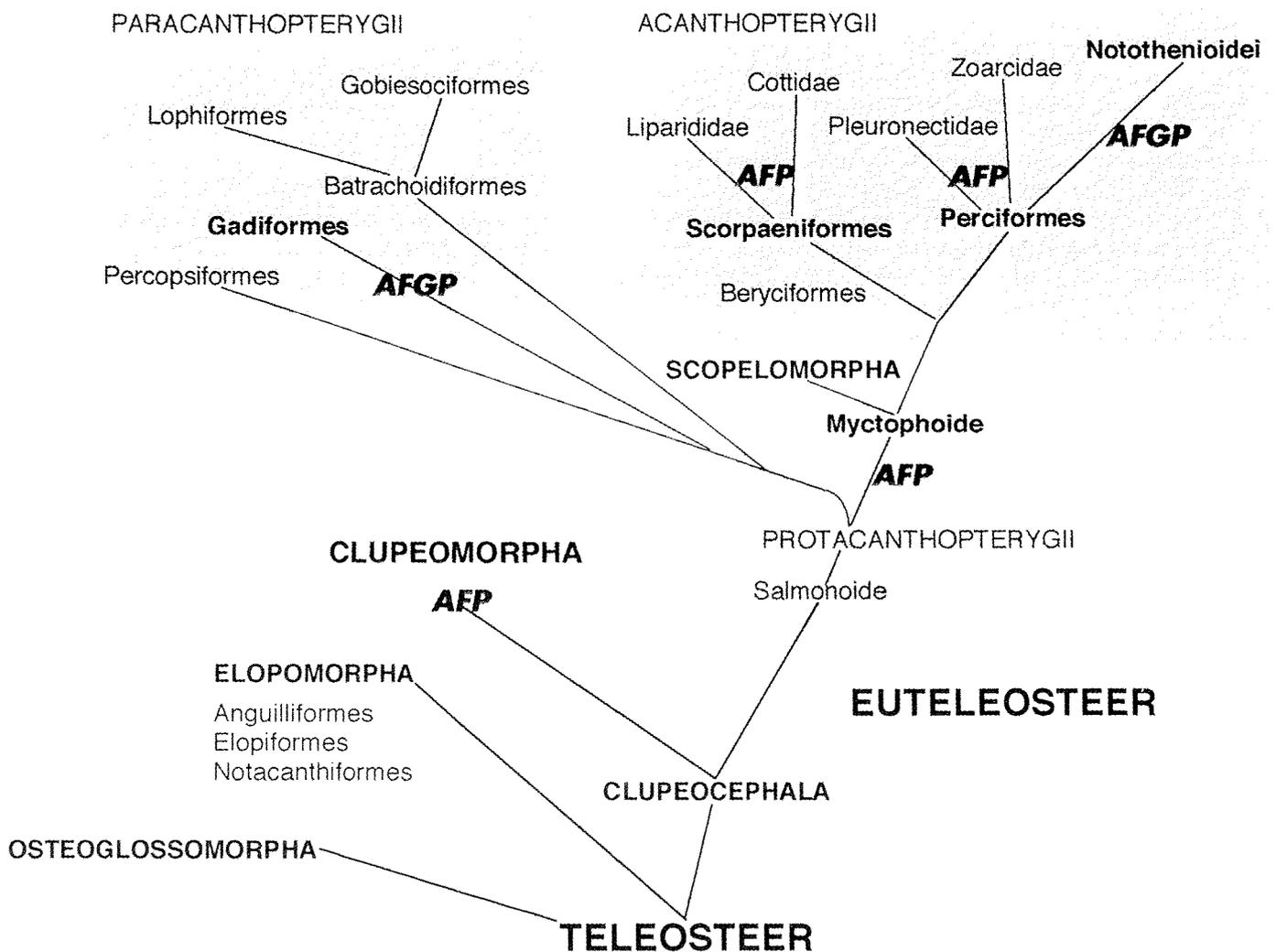


Abb. 6: Schematische Darstellung der phylogenetischen Beziehungen rezenter Fischordnungen (nach LECOINTRE 1994), die Gefrierschutzsubstanzen synthetisieren.

Fig. 6: Schematic outline showing the phylogenetic relationships of present-day fish (after LECOINTRE 1994) that possess antifreeze peptides or glycopeptides.

antarktischen Notothenioidei, die nach morphologischen Merkmalen zu den Perciformes gerechnet werden. Andererseits fand die Trennung der Perciformes und Gadiformes vor der Vereisung der Antarktis statt. Eine Zuordnung der Notothenioidei zu den primitiveren Gadiformes wird von SCOTT et al. (1986) unter der Berücksichtigung enzymatischer Untersuchungen an der Lactatdehydrogenase diskutiert. Danach wurden schon vor 30-40 Mio Jahren die AFGP-Gene angelegt. Im Verlauf der Vereisung wanderten Vorfahren der heutigen Gadiformes nach Norden und breiteten sich in der Arktis aus. Dort representieren sie heute die dominierende Ordnung, ebenso wie die Notothenioidei in der Antarktis.

EASTMAN & GRANDE (1989) argumentieren gegen die Hypothese von SCOTT et al. (1986), daß während der ersten Abkühlung im Eozän/Oligozän das Wasser für die Entwicklung von Gefrierschutzsubstanzen zu warm (5-7 °C) war. Die Anlagen zum AFGP hätten sich demnach erst in den letzten 10 Mio Jahren während der Abkühlungsphase im Miozän auf Grund der Wassertemperaturen nahe dem Gefrierpunkt entwickeln können. Während der letzten Abkühlungsphase im Pliozän konnte eine starke Radiation nur der notothenioiden Arten stattfinden, die AFGP synthetisieren. EASTMAN & GRANDE (1989) beriefen sich dabei auf ältere Untersuchungen, wonach Gefrierschutz nur in einigen Notothenioiden (15 Arten) vorkommt (DEVRIES & LIN 1977, AHLGREN & DEVRIES 1984).

3.7 Die Gefrierschutzsubstanzen könnten in Folge einer "cold-shock-response" aus Lektinen evoluiert sein.

Die konvergente Entwicklung eines identischen Glykopeptids ist unwahrscheinlich. Vielmehr wird sich das AFGP der Perciformes und Gadiformes aus einem precursor-(Glyko)Peptid (z.B. Blutproteine oder Lektine) entwickelt haben, welches schon vor der Kontinentaldrift existiert hat. Während der drei vergangenen Abkühlungsphasen vor 36 Mio, 16 Mio und 2,5 Mio Jahren fand eine Proteinevolution zu dem heute existierenden AFGP statt. Bei nahe verwandten Arten bestehen die Veränderungen meist darin, daß eine Aminosäure gegen eine andere ausgetauscht ist, die ähnliche Eigenschaften besitzt (AFGP 8: Prolin ersetzt Alanin); die Gesamtstruktur des Moleküls bleibt folglich unverändert. Mit zunehmendem evolutionärem Abstand zwischen den Arten weichen die Sequenzen jedoch immer stärker voneinander ab (AFGP bei *Eleginus*). Schließlich mag die Verwandtschaft überhaupt nicht mehr ersichtlich sein, obwohl sich die beiden Proteine in ihrer Sekundär- bzw. Tertiärstruktur unverkennbar ähneln. Das bedeutet nichts anderes, als daß sich verschiedene Aminosäuresequenzen in dieselbe Form falten können (DOOLITTLE 1994). Diesen Prozeß können wir bei den rezenten AFGP beobachten.

Die evolutive Anpassung von Proteinen an veränderte Bedingungen (z.B. Abkühlung) beruht auf dem Wirken positiver Selektion. Hierfür sind in der Regel keine neuen, adaptiven genetischen Änderungen erforderlich. Die molekulare Adaptation kann auf die bereits in der Population vorhandene Variabilität

zurückgreifen, indem vorher neutrale Varianten unter den neuen Bedingungen einen positiven Selektionswert erhalten (KIMURA 1983). Wenn man verschiedene Proteine innerhalb einer Art vergleicht, wird deutlich, daß es große Familien verwandter Moleküle gibt. So weisen etwa die sechs Polypeptide, aus denen sich die unterschiedlichen Hämoglobinformen aufbauen, sowie die Polypeptidkette des Myoglobins unübersehbare Gemeinsamkeiten auf (RICHARDSON 1981). Eine Homologie konnte auch zwischen dem AFP II und einem Ca²⁺-bindenden Lektin nachgewiesen werden (SÖNNICHSEN et al. 1995).

Lektine sind Proteine oder Glykoproteine, die spezifisch an Kohlenhydrate binden. Sie sind in allen Organismen von den Viren bis zu den Säugetieren zu finden (LIENER et al. 1986). Ein Lektinmolekül kann Zellen agglutinieren und Glykokonjugate präzipitieren. Sie sind eine heterogene Proteingruppe, zeigen aber in vielen Fällen eine signifikante Homologie. Lektine können als integrale Membranproteine vorliegen, aber vor allem auch in Körperflüssigkeiten (Blut, Hämolymphe etc.) gelöst sein. Eine Entwicklung aus Lektinen könnte auch die hohe Diversität und weite Verbreitung der AFP erklären. AFPs sind mittlerweile nicht nur aus so unterschiedlichen Teleostern wie Clupeomorpha oder Paracanthopterygii bekannt, sondern auch aus Amphibien, Reptilien und terrestrischen Arthropoden. So könnten diese Peptide in Folge einer "cold-shock-response" während der globalen Abkühlungsphasen aus den Lektinfamilien evoluiert sein. Weitergehende Aufschlüsse zur antifreeze-Evolution erhofft man sich nun von der genetischen Analyse der für die Gefrierschutzsubstanzen codierenden DNA.

4. DANKSAGUNG

Mein Dank geht an die Arbeitsgruppen von Dr. Haselbeck bei Boehringer Mannheim GmbH in Penzberg/Obb. für die wertvolle Unterstützung bei den biochemischen Analysen der Glykopeptide, und an Herrn Zimmermann für seinen Einsatz bei der Erstellung der Grafiken. Dem Alfred-Wegener-Institut in Bremerhaven und der Besatzung von FS *Polarstern* danke ich für die logistische Unterstützung während der Expeditionen ANT-VII/4 und ANT-IX/3, die zum Teil finanziell von der European Science Foundation (ESF) unterstützt wurde.

Literatur

- Ahlgren, J.A. & DeVries, A.L. (1984): Comparisons of antifreeze glycopeptides from several antarctic fishes. - *Polar Biol.* 3: 93-97.
- Andersen, N.C. (1984): Genera and subfamilies of the family Nototheniidae (Pisces, Perciformes) from the Antarctic and Subantarctic. - *Steenstrupia* 10: 1-34.
- Andriashev, A.P. (1965): A general review of the Antarctic fish fauna. In: OYE, P.VAN & MIEGHEM, J.VAN (eds.) *Biogeography and ecology in Antarctica*, Junk Publ., The Hague, Monographiae Biologicae 15, 491-550.
- Andriashev, A.P. (1979): On the occurrence of fishes belonging to the families Zoarcidae (*Apodolycus hureaui* gen. et sp. n.) and Liparidae (*Paraliparis operculosus* sp. n.) off Kerguelen Island. - *Mar. Biol.* (Vladivostok) 6: 28-34.
- Andriashev, A.P. (1987): A general review of the Antarctic bottom fish fauna. In: KULLANDER, SO. & FERNHOLM, B. (eds.), *Proceedings of the 5th*

- Congress of European Ichthyologists. Stockholm 1985, 357-372
- Andriashev, A.P. & Neelov, A.V. (1979): New species of the genus *Paraliparis* (Liparidae) from the western Antarctic.- J. Ichthyol. 19: 10-19.
- Ananthanarayanan, V.S. (1989): Antifreeze proteins: structural diversity and mechanism of action.- Life Chem. Rep. 7: 1-32.
- Ananthanarayanan, V.S., Slaughter, D. & Hew, C.L. (1986): Antifreeze proteins from the ocean pout, *Macrozoarces americanus*: circular dichroism spectral studies on the native and denatured states.- Biochim. Biophys. Acta 870: 154-159.
- Arntz, W., Ernst, E. & Hempel, I. (1990): The expedition ANTARKTIS VII/4 (Epos leg 3) and VII/5 of RV Polarstern in 1989.- Ber. Polarforsch. 68: 214 pp.
- Bathmann, U., Schulz-Baldes, M., Fahrbach, E., Smetacek, V. & Hubberten, H.-W. (1992): The expedition Antarktis IX/1-4 of the Research Vessel *Polarstern* in 1990/91.- Ber. Polarforsch. 100: 254 pp.
- Becker, K., Wöhrmann, A.P.A. & Rahmann, H. (1995): Brain gangliosides and cold-adaptation in high-Antarctic fish.- Biochem. System. Ecol. 23: 695-707.
- Bone, G. & Marshall, N.B. (1985): Biologie der Fische.- Gustav Fischer, Stuttgart New York.
- Borkin, I.V. & Mel'yantsev, R.V. (1984): New data on the distribution of polar cod, *Arctogadus glacialis* (Gadidae), in the Arctic region.- J. Ichthyol. 24: 101-103.
- Burcham, T.S., Osuga, D.T., Rao, B.N.N., Bush, C.A. & Feeney, R.E. (1986): Purification and primary sequences of the major arginine-containing antifreeze glycopeptides from the fish *Eleginus gracilis*.- J. Biol. Chem. 261: 6384-6389.
- Bush, C.A., Ralapati, S., Matson, G.M., Yamasaki, R.B. & Osuga, D.T. (1984): Conformation of the antifreeze glycoprotein of polar fish.- Arch. Biochem. Biophys. 232: 624-631.
- Chakrabarty, A., Hew, C.L., Shears, M. & Fletcher, G. (1988): Primary structures of the alanine-rich antifreeze polypeptides from grubby sculpin, *Myoxocephalus aeneus*.- Can. J. Zool. 66: 403-408.
- Chao, H., DeLuca, C.I. & Davies, P.L. (1995): Mixing antifreeze protein types changes ice crystal morphology without affecting antifreeze activity.- FEBS Letters 357: 183-186.
- Cheng, C.C. & DeVries, A.L. (1989): Structures of antifreeze peptides from the antarctic eel pout, *Austrolyctichys brachycephalus*.- Biochim. Biophys. Acta 997: 55-64.
- Christiansen, J.S., Dalmo, R.A. & Ingebrigtsen, K. (1996): Xenobiotic excretion in fish with aglomerular kidneys.- Mar. Ecol. Progr. Ser. 136: 303-304.
- Clarke, A. (1990): Temperature and evolution: Southern Ocean cooling and the Antarctic marine fauna.- In: KERRY, K.R. & HEMPEL, G. (eds.), Antarctic ecosystems: change and conservation, 9-22, Springer, Berlin.
- Clarke, A. & Crame, J.A. (1989): The origin of the Southern Ocean marine fauna.- In: CRAME, J.A. (ed.), Origins and evolution of the Antarctic biota, 253-268, Geological Society Publications No 47.
- Davies, P.L., Roach, A.H. & Hew, C.L. (1982): DNA sequence coding for an antifreeze protein precursor from winter flounder.- Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79: 335-339.
- Davies, P.L., Hew, C.L. & Fletcher, G.L. (1988): Fish antifreeze proteins: physiology and evolutionary biology.- Can. J. Zool. 66: 2611-2617.
- DeVries, A.L. (1980): Biological antifreezes and survival in freezing environments.- In: GILLES, R. (ed.), Animals and Environmental Fitness, 583-607, Pergamon Press, Oxford.
- DeVries, A.L. (1988): The role of antifreeze glycopeptides and peptides in the freezing avoidance of antarctic fishes.- Comp. Biochem. Physiol. B 90: 611-621.
- DeVries, A.L. & Somero, G.N. (1970): The physiology and biochemistry of low temperature adaptation in Antarctic marine organisms.- In: DEACON, R. (ed.), Symposium on Antarctic ice and water masses, 101-111, Sci Commun. Antarct. Res., Cambridge.
- DeVries, A.L., Komatsu, S.K. & Feeney, R.E. (1970): Chemical and physical properties of freezing point-depression glycoproteins from Antarctic fishes.- J. Biol. Chem. 245: 2901-2913.
- DeVries, A.L. & Lin, Y. (1977): The role of glycoprotein antifreezes in the survival of Antarctic fishes.- In: LLANO, G.A. (ed.), Adaptations within Antarctic ecosystems, 439-458, Gulf Houston, Texas.
- DeWitt, H.H. (1970): The character of the midwater fish fauna of the Ross Sea, Antarctica.- In: HOLDGATE, M.W. (ed.), Antarctic ecology, Vol. 1, 305-314, Academic Press, London.
- DeWitt, H.H. (1971): Coastal and deep-water benthic fishes of the Antarctic.- Antarctic Map Folio Series 15: 1-10.
- Dobbs, G.H. III & DeVries, A.L. (1975): The aglomerular nephron of Antarctic teleosts: a light and electron microscopic study.- Tissue Cell 7: 159-170.
- Dobbs, G.H. III, Lin, Y. & DeVries, A.L. (1974): Agglomerularism in Antarctic fish.- Science 185: 793-794.
- Doolittle, R.F. (1994): Convergent evolution: the need to be explicit.- TIBS 19: 15-18.
- Dorrien, C.F. von, Piepenburg, D. & Schmid, M.K. (1991) On the abundance of Arctic cod *Arctogadus glacialis* in Northeast water.- Polar Record 27: 362-364.
- Duman, J.G. & DeVries, A.L. (1976): Isolation, characterization and physical properties of protein antifreezes from the winter flounder, *Pseudopleuronectes americanus*.- Comp. Biochem. Physiol. 54B: 375-380.
- Dunbar, M.J. (1968): Ecological development in polar regions. A study in evolution.- Prentice-Hall, Englewood Cliffs, New York.
- Eastman, J.T. (1990): The biology and physiological ecology of notothenioid fishes.- In: GON, O. & HEEMSTRA, P.C. (eds.), Fishes of the Southern Ocean, 34-52, J.L.B. Smith Institute of Ichthyology, Grahamstown.
- Eastman, J.T. & DeVries, A.L. (1986a): Antarctic fishes.- Scientific American 254(11): 106-114.
- Eastman, J.T. & Grande, L. (1989): Evolution of the Antarctic fish fauna with emphasis on the recent notothenioids.- In: CRAME, J.A. (ed.), Origins and evolution of the Antarctic Biota, 241-252, Geol. Soc. Spec. Publ. No 47.
- Elliot, D.H. (1985): Physical geography - geological evolution.- In: BONNER, W.N. & WALTON, D.W.H. (eds.), Key environments, Antarctica, 39-61.
- Ewart, K.V. & Fletcher, G.L. (1990): Isolation and characterization of antifreeze proteins from smelt (*Osmerus mordax*) and Atlantic herring (*Clupea harengus harengus*).- Can. J. Zool. 68: 1652-1658.
- Fahrbach, E., Klindt, H., Muus, D., Rohardt, G. & Salameh, P. (1987): Physical oceanography.- Ber. Polarforsch. 39: 156-169.
- Feeney, R.E. (1988): Inhibition and promotion of freezing: fish antifreeze proteins and ice-nucleating proteins.- Comments Agric. & Food Chemistry 1(3): 147-181.
- Feeney, R.E., Burcham, T.S. & Yeh, Y. (1986): Antifreeze glycoproteins from polar fish blood.- Ann. Rev. Biophys. Biophys. Chem. 15: 59-78.
- Fischer, W. & Hureau, J.C. (1985): FAO species identification sheets for fishery purposes.- Southern Ocean. FAO, Rome.
- Fletcher, G.L., Addison, R.F., Slaughter, D. & Hew, C.L. (1982a): Antifreeze proteins in the arctic shorthorn sculpin (*Myoxocephalus scorpius*).- Arctic 35: 302-306.
- Fletcher, G.L., Goddard, S.V., Davies, P.L., Gong, Z., Ewart, K.V. & Hew, C.L. (1997): Antifreeze proteins in fish; new insights into molecular regulation and physiological significance.
- Fletcher, G.L., Hew, C.L. & Joshi, S.B. (1982b): Isolation and characterization of antifreeze glycoproteins from the Frostfish, *Microgadus tomcod*.- Can. J. Zool. 60: 348-355.
- Fletcher, G.L., King, M.J. & Kao, M.H. (1987): Low temperature regulation of antifreeze glycopeptide levels in Atlantic cod (*Gadus morhua*).- Can. J. Zool. 65: 227-233.
- Franks, F. & Morris, E.R. (1978): Blood glycoprotein from antarctic fish possible conformational origin of antifreeze activity.- Biochim. Biophys Acta 540: 346-356.
- Goddard, S.V., Kao, M.H. & Fletcher, G.L. (1992): Antifreeze production, freeze resistance, and overwintering of juvenile northern atlantic cod (*Gadus morhua*).- Can. J. Fish. Aquat. Sci. 49: 516-522.
- Gon, O. & Heemstra, P.C. (1990): Fishes of the Southern Ocean.- J.L.B. Smith Institute of Ichthyology, Grahamstown.
- Hansen, T.N., DeVries, A.L. & Baust, J.G. (1991): Calorimetric analysis of antifreeze glycoproteins of the polar fish, *Dissostichus mawsoni*.- Biochim.-Biophys. Acta 1079: 169-173.
- Haschemeyer, A.E.V. & Jannasch, H.W. (1983): Antifreeze glycopeptides of antarctic fishes.- Comp. Biochem. Physiol. B 76: 545-548.
- Hellmer, H. & Bersch, M. (1985): The Southern Ocean. A survey of oceanographic and marine meteorological research work.- Ber. Polarforsch. 26: 115 pp.
- Hew, C.L. & Fletcher, G.L. (1985): Biochemical adaptation to the freezing en-

- environment - structure, biosynthesis and regulation of fish antifreeze polypeptides.- In: GILLES, R. (ed.), Proceedings in life science, 553-563, Springer, Heidelberg.
- Hew, C.L. & Yip, C. (1976): The synthesis of freezing-point-depressing protein of the winter flounder *Pseudopleuronectes americanus* in *Xenopus laevis* oocytes.- *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 71: 845-850.
- Hew, C.L., Fletcher, G.L. & Ananthanarayanan, V.S. (1980): Antifreeze proteins from the shorthorn sculpin, *Myoxocephalus scorpius*: isolation and characterization.- *Can. J. Biochem.* 58: 377-383.
- Hew, C.L., Slaughter, D., Fletcher, G.L. & Joshi, S.B. (1981): Antifreeze glycoproteins in the plasma of Newfoundland Atlantic cod (*Gadus morhua*).- *Can. J. Zool.* 59: 2186-2192.
- Hew, C.L., Slaughter, D., Joshi, S.B., Fletcher, G.L. & Ananthanarayanan, V.S. (1984): Antifreeze polypeptides from the Newfoundland ocean pout, *Macrozoarces americanus*: presence of multiple and compositionally diverse components.- *J. Comp. Physiol. B* 155: 81-88.
- Hew, C.L., Joshi, S., Wang, N.C., Kao, M.H. & Ananthanarayanan, V.S. (1985): Structures of shorthorn sculpin antifreeze polypeptides.- *Eur. J. Biochem.* 151: 167-172.
- Hew, C.L., Wang, N.C., Yan, S., Cai, H., Sclater, A. & Fletcher, G.L. (1986a): Biosynthesis of antifreeze polypeptides in the winter flounder.- *Eur. J. Biochem.* 160: 267.
- Hew, C.L., Scott, G.K. & Davies, P.L. (1986b): Molecular biology of antifreeze.- In: HELLER, H.C., MUSACCHIA, X.J. & WANG, L.C.H. (eds.), Living in the cold: physiology and biochemical adaptations, 117-123, Elsevier, New York.
- Hew, C.L., Chakrabarty, A. & Yang, D.S. (1987): Biochemical adaptation to the freezing environment: structure and function relationship of antifreeze polypeptides.- In: CON, X., KON, O.L., CHUNG, M.C.M., HWANG, P.L.H., LEONG, S.F., LOKE, K.H., THIYAGARAJAH, P. & WONG, P.T.H. (eds.), Integration and control of metabolic systems, 299-309, Cambridge University Press, Cambridge.
- Hubold, G. (1985): The early life-history of the high-Antarctic silverfish, *Pleurogramma antarcticum*.- In: SIEGFRIED, W.R., CONDY, P.R. & LAWS, R.M. (eds.), Antarctic nutrient cycles and food webs, 445-451, Springer, Berlin-Heidelberg.
- Hubold, G. (1990): Seasonal patterns of ichthyoplankton distribution and abundance in the Southern Weddell Sea. In: KERRY, K.R. & HEMPEL, G. (eds.), Antarctic ecosystems: Ecological change and conservation, 149-159, Springer, Berlin-Heidelberg.
- Hubold, G. (1991): Zur Ökologie der Fische im Weddellmeer.- Habilitationsschrift, Math.-Nat. Fakultät, Universität Kiel.
- Hubold, G. & Tomo, A.P. (1989): Age and growth of Antarctic silverfish *Pleurogramma antarcticum* Boulenger, 1902, from the southern Weddell Sea and Antarctic Peninsula.- *Polar Biol.* 9: 205-212
- Jung, A., Johnson, P., Eastman, J.T. & DeVries, A.L. (1995): Protein content and freezing properties of the subdermal extracellular matrix and serum of the Antarctic snailfish, *Paraliparis devriesi*.- *Fish Physiol. Biochem.* 14: 71-80.
- Kennett, J.P. (1977): Cenozoic evolution of antarctic glaciation, the circum antarctic ocean and their impact on global palaeoceanography.- *J. Geophys. Res.* 82: 3843-3876.
- Kimura, M. (1983): The neutral theory of molecular evolution.- Cambridge University Press, Cambridge.
- Kock, K.-H. (1992): Antarctic fish and fisheries.- Cambridge University Press, Cambridge, New York.
- Krause, G. (1991): The expedition ARKTIS VII of „RV Polarstern“ in 1990. Report of leg ARK VII/2.- *Ber. Polarforsch.* 93: 55 pp.
- Kunzmann, A., Caruso, C. & di Prisco, G. (1991): Haematological studies on a high-Antarctic fish: *Bathyraco marri* Norman.- *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 152: 243-255.
- Lecoinre, G. (1994): Aspects historiques et heuristiques de l'ichthyologie systématique.- *Cybius* 18: 339-431.
- Lewis, E.L. & Perkin, R.G. (1985): The winter oceanography of McMurdo Sound, Antarctica.- In: JACOBS, S.S. (ed.), Oceanology of the Antarctic Continental Shelf, 145-165, Antarctic Research Series, Vol. 43, American Geophysical Union, Washington.
- Li, X.M., Trinh, K.V., Hew, C.L., Buettner, B., Baenzinger, J. & Davies, P.L. (1985): Structure of an antifreeze polypeptide and its precursor from the ocean pout, *Macrozoarces americanus*.- *J. Biol. Chem.* 260: 12902-12909.
- Liener, I.E., Sharon, N. & Goldstein, I.J. (1986): The lectins: properties, functions, and applications.- Academic Press, New York.
- Morris, H.R., Thompson, M.R., Osuga, D.T., Ahmed, A.I., Chan, S.M., Vandenhede, J.R. & Feeney, R.E. (1978): Antifreeze glycoproteins from the blood of an Antarctic fish.- *J. Biol. Chem.* 253: 5155.
- Ng, N.F.L., Trinh, K.-Y. & Hew, C.L. (1986): Structure of an antifreeze polypeptide precursor from the sea raven, *Hemitripterus americanus*.- *J. Biol. Chem.* 261: 15690-15695.
- Osuga, D.T. & Feeney, R.E. (1978): Antifreeze glycoproteins from arctic fish.- *J. Biol. Chem.* 253: 5338-5343
- Pickett, M., Scott, G., Davies, P., Wang, N., Joshi, S. & Hew, C.L. (1984): Sequence of an antifreeze protein messenger RNA at 4 °C *in vivo* and *in vitro*.- *Physiol. Zool.* 59: 679-695.
- Price, J.L., Lyons, C.E. & Huang, R.C.C. (1990): Seasonal cycle and regulation by temperature of antifreeze protein mRNA in a Long Island population of winter flounder.- *Fish Physiol. Biochem.* 8: 187-198.
- Rahmann, H., Schneppenheim, R., Hilbig, R. & Lauke, G. (1984): Variability in brain ganglioside composition: a further molecular mechanism beside serum antifreeze glycoproteins for adaptation to cold in antarctic and arctic-boreal fishes.- *Polar Biol.* 3: 119-125.
- Rao, B.N. & Bush, C.A. (1987): Comparison by H-NMR spectroscopy of the conformation of the 2600 Dalton antifreeze glycopeptide of polar cod with that of the high molecular weight.- *Biopolymers* 26: 1227-1244.
- Raymond, J.A., Lin, Y. & DeVries, A.L. (1975): Glycoproteins and protein antifreezes in two Alaskan fishes.- *J. Exp. Zool.* 193: 125-130.
- Richardson, J.S. (1981): The anatomy and taxonomy of protein structure.- *Adv. Prot. Chem.* 34: 167-339.
- Schneppenheim, R. & Theede, H. (1982): Freezing-point depressing peptides and glycoproteins from arctic-boreal and antarctic fish.- *Polar Biol.* 1: 115-123.
- Schrag, J.D., Cheng, C.-H.C., Panico, M., Morris, H.R. & DeVries, A.L. (1987): Primary and secondary structure of antifreeze peptides from arctic and antarctic zoarcid fishes.- *Biochim. Biophys. Acta* 915: 357-370.
- Scott, G.K., Fletcher, G.L. & Davies, P.L. (1986): Fish antifreeze proteins: Recent gene evolution.- *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 43: 1028-1034.
- Scott, G.K., Davies, P.L., Shears, M.A. & Fletcher, G.L. (1987): Structural variations in the alanine-rich antifreeze proteins of the Pleuronectinae.- *Eur. J. Biochem.* 168: 629-633.
- Shackleton, N.J., Backman, J., Zimmerman, H., Kent, D.V., Hall, M.A., Roberts, D.G., Schmitker, D., Baldauf, J.G., Desprairies, A., Homrighausen, R., Huddleston, P., Keene, J.B., Kaltenback, A.J., Krumsiek, K.A.O., Morton, A.C., Murray, J.W. & Westberg-Smith, J. (1984): Oxygen isotope calibration of the onset of ice-rafting and history of glaciation in the North Atlantic region.- *Nature* 307: 620-623.
- Slaughter, D., Fletcher, G.L., Ananthanarayanan, V.S. & Hew, C.L. (1981): Antifreeze proteins from the Sea Raven, *Hemitripterus americanus*. Further evidence for diversity among fish polypeptide antifreezes.- *J. Biol. Chem.* 256: 2022-2026.
- Sönnichsen, F.D., Sykes, B.D. & Davies, P.L. (1995): Comparative modeling of the three-dimensional structure of type II antifreeze protein.- *Protein Science* 4: 460-471.
- Somero, G.N. (1990): Life at low volume change: hydrostatic pressure as a selective factor in the aquatic environment.- *Amer. Zool.* 30: 123-135.
- Van Voorhies, W.V., Raymond, J.A. & DeVries, A.L. (1978): Glycoproteins as biological antifreeze agents in the cod, *Gadus ogac* (Richardson).- *Physiol. Zool.* 51: 347-353.
- Walters, V. (1961): Winter abundance of *Arctogadus glacialis* in the polar basin.- *Copeia* 2: 236-237.
- Wöhrmann, A.P.A. (1993): Gefrierschutz bei Fischen der Polarmeere.- *Ber. Polarforsch.* 119: 99 pp.
- Wöhrmann, A.P.A. (1995): Antifreeze glycopeptides of the high-Antarctic silverfish *Pleurogramma antarcticum* (Notothenioidei).- *Comp. Biochem. Physiol.* 111C: 121-129.
- Wöhrmann, A.P.A. (1996a): Antifreeze glycopeptides and peptides in Antarctic fish species from the Weddell Sea and the Lazarev Sea.- *Mar. Ecol. Progr. Ser.* 130: 47-59.
- Wöhrmann, A.P.A. (1996b): Freezing resistance in Antarctic fish.- In: BATTAGLIA, B., VALENCIA, J. & WALTON, D.W.H. (eds.), Antarctic Communities: Species, Structure and Survival, Cambridge University Press, Cambridge (in press).

- Wöhrmann, A.P.A. (1997a): Antifreeze glycopeptides and peptides in Antarctic fishes: the Weddell Sea as a case history. - In: PÖRTNER, H.O. & PLAYLE, R. (eds.), Cold Ocean Physiology. Cambridge University Press, Cambridge (in press).
- Wöhrmann, A.P.A. (1997b): Freezing resistance in Antarctic and Arctic fishes: its relation to mode of life, ecology and evolution. - CYBIUM (submitted).
- Wöhrmann, A.P.A. & Haselbeck, A. (1992): Characterization of antifreeze glycoproteins of *Pleuragramma antarcticum* (Pisces: Notothenioidei).- Biol. Chem. Hoppe-Seyler 373: 854.
- Wöhrmann, A.P.A. & Zimmermann, C. (1992): Comparative investigations on fishes of the Weddell Sea and the Lazarev Sea.- Ber. Polarforsch. 100: 208-222.
- Wöhrmann, A.P.A., Geyer, R., Hösel, W. & Haselbeck, A. (in prep): Identification of an additional antifreeze substance in an Antarctic fish *Pleuragramma antarcticum* (Pisces: Nototheniidae): preliminary characterization of a novel glycoconjugate.