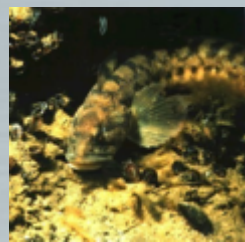
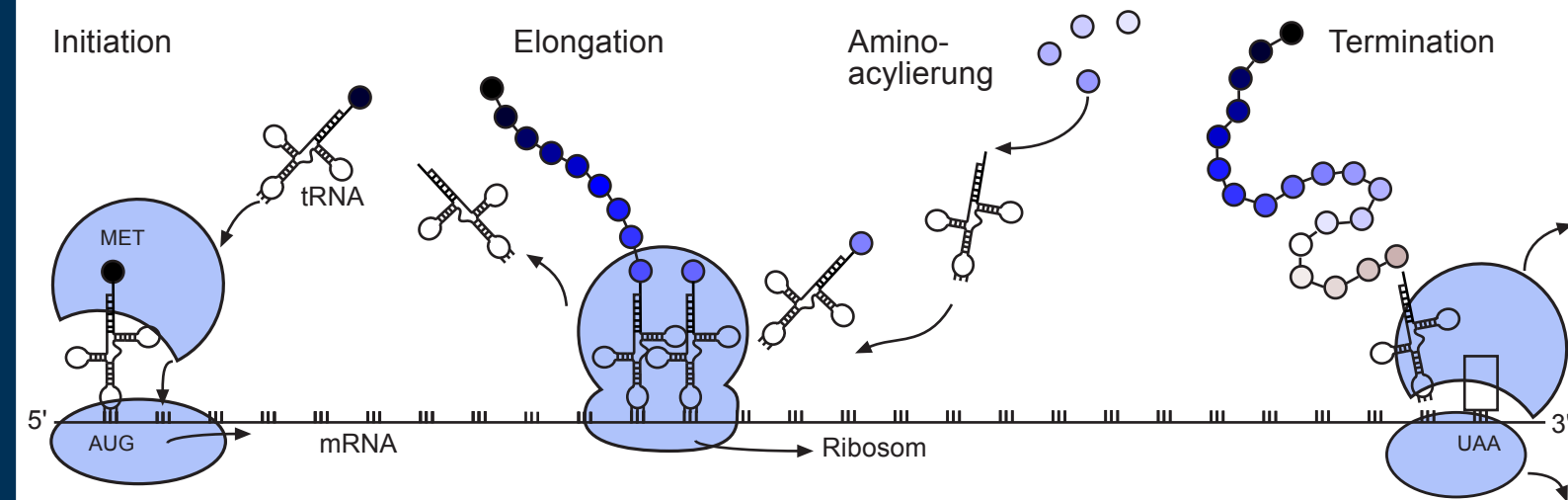
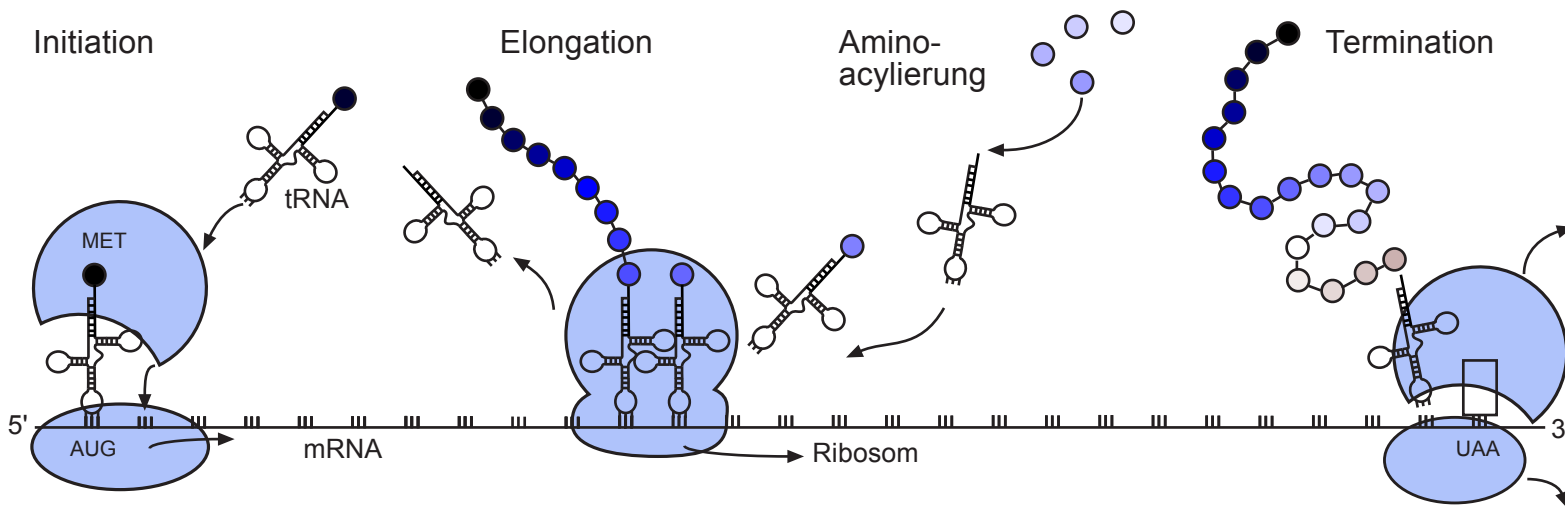


Proteinsynthesekapazität und Wachstum bei Kammuscheln (Pectiniden) und Fischen (Zoarciden) aus polaren und gemäßigten Breiten

D. Storch

Proteinsynthesekapazität bei Pectiniden und Zoarciden polarer und gemäßigter Breiten



**Proteinsynthesekapazität und Wachstum
bei Kammuscheln (Pectiniden) und Fischen (Zoarciden)
aus polaren und gemäßigten Breiten**

**Protein synthesis capacities and growth in
scallops (Pectinids) and eelpout (Zoarcids)
of polar and temperate zones**

Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades
– Dr. rer. nat. –

dem Fachbereich 2 Biologie/Chemie
der Universität Bremen
vorgelegt von

Daniela Storch

Bremen 2003

Gutachter:

1. Gutachter: Prof. Dr. H.O. Pörtner, Universität Bremen
Alfred-Wegener-Institut für Polar- und Meeresforschung, Columbusstr.
27568 Bremerhaven
2. Gutachter: Prof. Dr. W. Hagen, Universität Bremen
FB II: Biologie/Chemie Universität NW II A, Loebener Str.
28359 Bremen

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	III
Zusammenfassung.....	IV
1. Einleitung.....	1
1.1. Historischer Hintergrund.....	1
1.1. Temperaturanpassung.....	3
1.1. Energiebudget Hypothese.....	5
1.1. Ressourcenlimitierung.....	7
1.1. Ansatz.....	9
1.1. Ziel der Arbeit.....	11
2. Material und Methoden.....	12
2.1. Tiere und Hälterung.....	12
2.1.1. Pectinidae.....	12
2.1.2. Zoarcidae.....	12
2.2. Isolation des Proteinsyntheseapparates.....	13
2.3. Translationsassay.....	13
2.4. Analytische Methoden.....	15
2.5. Berechnungen.....	15
2.5.1. Kapazitäten der Proteinbiosynthese.....	15
2.5.2. Die energetischen Kosten der Proteinbiosynthese.....	15
2.5.3. Q_{10} Werte und Aktivierungsenergien.....	16
2.6. Statistik.....	17
3. Publikationen.....	18
I. The protein synthesis machinery operates at the same expense in eurythermal and cold stenothermal pectinids.....	19
II. In vitro protein synthesis capacities in a cold stenothermal and a temperate eurythermal pectinid.....	33
III. Temperature dependent protein synthesis capacities in cold stenothermal (Antarctic) and eurythermal (North Sea) fish (Zoarcidae).....	44

4. Diskussion	80
4.1. Die energetischen Kosten der Proteinbiosynthese.....	80
4.2. Temperaturkompensation.....	82
4.2.1. Temperaturabhängigkeit der Proteinbiosynthesekapazitäten.....	82
4.2.2. RNA Translationskapazitäten.....	85
4.3. Akklimatisation.....	86
4.4. Die drei Hypothesen.....	88
4.4.1. <i>In vivo</i> Temperaturanpassung.....	88
4.4.2. Energiebudget Hypothese.....	90
4.4.3. Ressourcenlimitierung.....	95
4.5. Fazit und Ausblick.....	98
5. Literatur	103
Danksagung	119

Abkürzungsverzeichnis

Abk.	Abkürzung
E_a	Aktivierungsenergie
PCr	Phosphokreatin
Phe	Phenylalanin
PLA	Phospho-L-Arginin
$k_{RNA \text{ in vitro}}$	RNA Translationskapazität, gemessen <i>in vitro</i>
$k_{RNA \text{ in vivo}}$	RNA Translationseffizienz, gemessen <i>in vivo</i>
k_s	Proteinsyntheserate
Q_{10}	Temperaturquotient, Maß für die Beschleunigung von physiologischen Prozessen bei einer Temperaturerhöhung um 10 °C
mRNA	messenger-RNA
tRNA	transfer-RNA
GF/C	Glasfaser Mikrofilter
T	Temperatur (°C)
T	Absolute Temperatur (Kelvin)
MCA	metabolic cold adaptation (englisch)
N	Nord
W	West
bzw.	Beziehungsweise
pHi	intrazellulärer pH
RNA	Ribonukleinsäure
R	allgemeine Gaskonstante
u. a.	unter anderem
Δt	Zeitintervall
t_0	Zum Zeitpunkt $t = 0$
<i>in vitro</i>	im Reagenzglasversuch; unter künstlichen Bedingungen
<i>in vivo</i>	im lebenden Organismus
O	Ost
S	Süd
AWI	Alfred-Wegener-Institut
Met	Methionin
Salinität	Salzgehalt
PSU	practical salinity unit (englisch)
^3H	Tritium
ATP	Adenosintriphosphat
GTP	Guanosintriphosphat
RP-HPLC	Reversed Phase High Performance Liquid Chromatography (englisch)
DPM	disintegrations per minute (englisch)
FW	Frischgewicht
P	Wachstumsleistung nach Pauly
EF	Elongationsfaktor
SW	Süßwasser

Zusammenfassung

Wachstum ist ein komplexer Prozess und wird auf vielen verschiedenen Ebenen kontrolliert und limitiert. In der Literatur werden drei Haupterklärungen für das langsame jährliche Wachstum polarer wechselwarmer Tiere diskutiert: 1. Der geschwindigkeitslimitierende Effekt der Temperatur, 2. Die ansteigenden Kosten für den Basalstoffwechsel, wodurch weniger Energie für Wachstum verfügbar ist (MCA), 3. Saisonale Ressourcenlimitierung.

Wachstum ist auf zellulärer Ebene eng an die Proteinbiosynthese gekoppelt. Der geschwindigkeitslimitierende Effekt der Temperatur auf das Wachstum konnte auf zellulärer Ebene sowohl für die kalt stenotherme Kammuschel *A. colbecki*, als Vertreter der Evertibraten, als auch für die antarktische Aalmutter *P. brachycephalum*, als Vertreter der Vertebraten, ausgeschlossen werden. Die Proteinbiosynthese, gemessen in einem *in vitro* System, war bei den antarktischen Arten im Vergleich zu den verwandten eurythermen Arten, der europäischen Kammuschel *A. opercularis* und der Nordsee Aalmutter *Z. viviparus* kältekompensiert. Der kalt adaptierte Proteinsyntheseapparat der antarktischen *P. brachycephalum* konnte jedoch innerhalb der Temperaturtoleranz der Art immer noch an verschiedene Temperaturen angepasst werden. Kompensierte Proteinsynthesekapazitäten werden in den antarktischen Kammuscheln und Aalmuttern durch niedrige Aktivierungsenergien und hohe RNA Translationskapazitäten erzielt, was für die Entwicklung eines kosteneffizienten Wachstumsapparates spricht.

Antarktische Evertibraten haben im Vergleich zu verwandten Arten aus wärmeren Gebieten höhere RNA Gehalte, was zu einer Überkompensation der Proteinsynthesekapazitäten führt. Dieses Phänomen wurde bei Antarktischen Fischen noch nicht beobachtet und könnte eine für die Evertibraten spezifische Anpassung an die antarktischen Bedingungen sein. Hohe RNA Gehalte in den Geweben, zusammen mit hohen RNA Translationskapazitäten, sorgen im Sommer für eine hohe Syntheseleistung, die durch niedrige Protein- und RNA-Umsatzraten in der permanenten Kälte noch begünstigt werden. Mit Hilfe des kompensierten Proteinsyntheseapparates werden nicht nur hohe Wachstumsleistungen im Sommer erzielt, sondern darüber hinaus auch Proteine und RNA als Reservestoffe für den Winter angelegt.

Bei dem Vergleich der *in vitro* und *in vivo* Proteinsyntheseraten kam heraus, dass die Kapazitäten im Gewebe nicht vollständig ausgelastet werden. Solche „Überschusskapazitäten“ sind bereits im Basalstoffwechsel häufig nachgewiesen worden, in Form von hohen Enzymkapazitäten des aeroben Stoffwechsels (Pörtner 2002a). Dies spricht dafür, dass die Regulation der Proteinbiosynthese bzw. des Wachstums auf höherer Ebene erfolgen muss. Ein sensibler Regulator könnte hier der pH_i sein. Die Proteinbiosynthese der kalt stenothermen *A. colbecki* wies eine starke pH-Abhängigkeit auf.

Ein extrem niedriger Sauerstoffbedarf in kalt stenothermen Tieren lässt auf niedrige Kosten des Basalstoffwechsels schließen und könnte u. a. durch reduzierte Proteinumsätze in der Kälte verursacht werden. Durch sinkende Kosten für den Basalstoffwechsel könnte in den kalt stenothermen Tieren mehr Energie für Wachstum zur Verfügung stehen. Eine Grundvoraussetzung für die „Energiebudget Hypothese“ ist, dass die energetischen Kosten für die zellulären Prozesse unabhängig von der Temperatur gleich bleiben. In einer neu entwickelten Methode zur Bestimmung der energetischen Kosten der Proteinbiosynthese konnten keine Unterschiede zwischen der antarktischen Kammmuschel und der europäischen Kammmuschel gezeigt werden und die Grundvoraussetzung am Beispiel der Kammmuscheln also bestätigt werden. Die „Energiebudget Hypothese“ und die damit verbundenen Kompromisse zwischen Lebensweise, Aktivität und Wachstumsleistung werden an verschiedenen Beispielen stenothermer und eurythermer Tiere demonstriert.

Trotz sinkender Kosten für den Basalstoffwechsel in kalt stenothermen Tieren wachsen sie jährlich langsamer, was auf eine Ressourcenlimitierung schließen lässt. *A. colbecki* zeigte nach Langzeithälterung eine starke Reduktion im Proteinsyntheseapparat und in der RNA Translationskapazität. Dies zeigt wie eine Ressourcen-bedingte Verlangsamung oder Stagnation des Wachstums während des antarktischen Winters erfolgen könnte.

1. Einleitung

Ein Charakteristikum der polaren wechselwarmen Tiere ist ihr langsames jährliches Wachstum im Vergleich zu ihren Verwandten aus wärmeren Gebieten (Everson 1977; Clarke 1983; Arntz *et al.* 1994; Peck 2002). Während des antarktischen Sommers können sie jedoch Wachstumsraten erreichen, die denen der Artverwandten aus wärmeren Gebieten ähneln (Brey und Clarke 1993; Arntz *et al.* 1994; Peck 2002). Die Ursachen und Mechanismen für das vergleichsweise langsamere jährliche Wachstum sind noch nicht vollständig geklärt. Die erste zunächst einleuchtende Erklärung, dass niedrige Temperaturen zum langsamen Wachstum führen, ist also zu einfach gedacht.

1.1. Historischer Hintergrund

Mit der Entdeckung der Polarmeere Anfang des 19. Jahrhunderts begann auch die Erforschung der dort lebenden marinen Tiere. Als historisch gilt der Fund von Sir John Ross auf seiner Seereise in die arktische Baffin's Bay (1817-1818). Er brachte (auf 73° 37' N, 75° 25' W) die ersten lebenden Bodenorganismen (Krebse, Seesterne und Würmer) aus der bis zu diesem Zeitpunkt für unbesiedelbar gehaltenen Tiefsee zu Tage. Die britische Antarktis Expedition unter Sir James Clark Ross (1839-1843) bewies, dass auch der Boden des Südpolarmeeres von einer artenreichen Organismenwelt dicht besiedelt wird. Schon Ross notierte damals, dass diese Tiere höchst sensibel auf Temperaturveränderungen reagieren und wohl nur Temperaturen bis 5 °C überleben können (Thomson und Murray 1895). Die Unbewohnbarkeit der aus anthropozentrischer Sicht gesehenen, „unwirtlichen“ Polarmeere galt damit als widerlegt. In den folgenden Jahren verfestigte sich dann die Meinung, dass die ganzjährig stabilen niedrigen Temperaturen in den hohen Breiten eine große Herausforderung für die dort lebenden wechselwarmen Tiere darstellen. Spätestens seit van't Hoff (1884) und Arrhenius (1889) war bekannt, dass die Geschwindigkeit der meisten biochemischen Reaktionen mit sinkender Temperatur abnimmt.

Ege und Krogh (1914) beobachteten beim Goldfisch eine Reduktion der Stoffwechselrate mit abnehmender Temperatur gemäß der van't Hoff'schen Reaktionsgeschwindigkeits-Temperatur-Regel (RGT bzw. Q_{10} Regel). Krogh (1916) stellte daraus eine „Normalkurve“ der Temperaturabhängigkeit des Stoffwechsels bei Fischen auf, die als Grundlage des Konzeptes der „Metabolic cold adaptation“ (Abk.: MCA) diente (Scholander *et al.* 1953; Wohlschlag 1960). Die MCA besagt, dass polare Organismen zur Erhaltung ihrer Vitalfunktionen im Vergleich zu verwandten Arten aus wärmeren Gebieten einen erhöhten Standardstoffwechsel aufweisen, wenn deren bei warmer Temperatur gemessener Standardstoffwechsel zu niedrigen Temperaturen extrapoliert wird. Dunbar (1968) schloss,

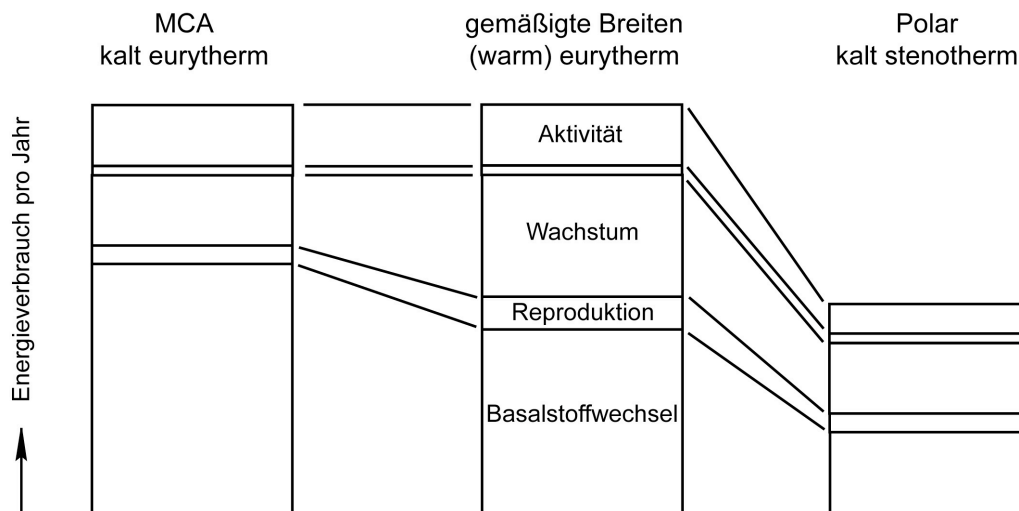


Abbildung 1: Schematische Darstellung des Konzeptes der „Metabolic cold adaptation“ (Dunbar, 1968) bzw. des Energiebudgets eines kalt eurythermen Tieres (linker Balken), des Energiebudgets eines eurythermen Tieres aus gemäßigten Breiten (mittlerer Balken) und des Energiebudgets eines polaren kalt stenothermen Tieres (rechter Balken). Die Größe der Boxen für den Basalstoffwechsel, Wachstum, Reproduktion sind willkürlich gewählt nach Clarke (1980) und die Aktivität wurde verändert nach Pörtner (2002a).

dass durch einen erhöhten Grundstoffwechsel weniger Energie für andere Prozesse wie Reproduktion und Wachstum übrig bliebe (Abbildung 1). Es entbrannte eine wissenschaftliche Diskussion über MCA, deren Existenz Holeyton (1973, 1974) massiv in Frage stellte. Er sah methodische Ursachen als Grund für den hohen Sauerstoffverbrauch der polaren Tiere. Es folgten viele Sauerstoffverbrauchsmessungen an ungestressten antarktischen und arktischen poikilothermen Tieren, welche die MCA teilweise oder ganz widerlegten (White 1975; Ralph und Maxwell 1977a, 1977b, Peck *et al.* 1987; Chapelle und Peck 1995; Whiteley *et al.* 1996; Clarke und Johnston 1999; Peck und Convey 2000; Marsh *et al.* 2001; Steffensen 2002). Andere wiederum bestätigten die Existenz eines erhöhten Stoffwechsels in polaren Wechselwarmen (Forster *et al.* 1987; Macdonald *et al.* 1987; Wells 1987; Torres und Somero 1988; Mikhail und Welch 1989, Somero 1991; van Dijk *et al.* 1999, Pörtner *et al.* 2000; Pörtner *et al.* 2001).

In den letzten Jahren kam zunehmend die Ressourcenlimitierung als Begründung für ein langsames Wachstum in die wissenschaftliche Diskussion (Everson 1977; Clarke 1980, 1983, 1991; Conover 1990; Conover und Present 1990; Schultz *et al.* 1996; Jobling 1996). Bedingt durch eine starke Saisonalität in den polaren Ökosystemen steht den Organismen pro Jahr insgesamt weniger Energie zur Verfügung, sodass auch weniger Energie aufgenommen werden kann, als von Organismen gemäßigter Breiten (Abbildung 1). Das Wachstum kann sich daher nur auf den sehr kurzen Polarsommer beschränken.

Nach fast 200jähriger Polarforschung haben sich drei Hypothesen für das langsame Wachstum polarer wechselwarmer Tiere herauskristallisiert, die nachfolgend genauer überprüft werden sollen:

1. Der direkte Einfluss der Temperatur auf physiologische und biochemische Reaktionen lässt die Tiere langsamer wachsen.
2. Die Anpassung an kalte Temperaturen erfordert höhere Kosten für den Grundstoffwechsel, wodurch im Energiebudget weniger Energie für Wachstum verfügbar ist (MCA).
3. Die limitierte Nahrungsverfügbarkeit durch kurze Polarsommer lässt die Tiere über das Jahr gemittelt langsamer wachsen.

1.2. Temperaturanpassung

Die meisten physiologischen Prozesse und biochemischen Reaktionen werden bei einer Temperaturabnahme um 10 °C, gemäß der Q_{10} Regel um das 2 bis 4fache verlangsamt. Es wird jedoch das Bestreben eines wechselwarmen Organismus sein, unter Einbeziehung der funktionellen Optimierung der verschiedenen, hierarchisch geordneten Funktionsebenen, diesen Temperatureffekt zu kompensieren. Es wäre beispielsweise verhängnisvoll für einen wechselwarmen Fisch, wenn er im Winter nicht vor seinem gleichwarmen und infolgedessen „temperaturunabhängigen“ Räuber, dem Otter oder der Robbe, fliehen könnte. Eine perfekte Temperaturkompensation ist dann erreicht, wenn die Reaktionsgeschwindigkeit bei unterschiedlichen Temperaturen gleich bleibt („Konservierung der Rate“ nach Hochachka und Somero 1984). Der Grad der Kompensation und die damit verbundenen Mechanismen hängen von dem Ausmaß und der Länge der Temperaturänderung ab, und werden wie folgt klassifiziert (Clarke 1991):

Direkte Anpassung ist eine unmittelbare physiologische Antwort eines Organismus auf eine plötzliche Temperaturänderung.

Akklimation bezeichnet die Anpassung eines Organismus an eine neue Temperatur unter Laborbedingungen.

Akklimatisation bezeichnet die langfristige Anpassung gegenüber komplexen (kurzfristigen, langfristigen bzw. wiederholten) umweltbedingten Temperaturänderungen, beispielsweise hervorgerufen durch Gezeitenzyklen, tägliche oder saisonale Temperaturschwankungen.

Adaptation ist das phylogenetisch vorgegebene Anpassungsvermögen eines Organismus an veränderte Umweltfaktoren. Zur Adaptation gehört also die genetisch determinierte

Möglichkeit eines Organismus auf kurzfristige, langfristige bzw. wiederholte Temperaturänderung zu reagieren.

Die Adaptation gibt also den genetischen Rahmen vor, in dem ein Organismus auf bestimmte umweltbedingte Änderungen, wie beispielsweise Temperaturschwankungen kompensatorisch reagieren kann. Sowohl bei der Akklimatisation/Akklimation als auch bei der Adaptation an niedrige Temperaturen ist ein weit verbreiteter Kompensationsmechanismus die Erhöhung der Enzymkapazitäten. Dies erfolgt entweder durch die Synthese von mehr Enzym oder durch Synthese verschiedener temperaturabhängiger Enzym-Isoformen (Hazel und Prosser 1974) bzw. durch Enzymmodifikation (Feller *et al.* 1996; Gerday *et al.* 1997; Ray *et al.* 1998; Gerday *et al.* 2000) und führt meist zu einer Verminderung der Aktivierungsenergie und/oder zu einer veränderten Enzym-Substrat Affinität (Hochachka und Somero 1984; Sokolova und Pörtner 2001; D' Amico *et al.* 2002).

Wachstum ist ein komplexer Prozess, der auf vielen Ebenen kontrolliert und limitiert wird, wobei Wachstumsraten auf zellulärer Ebene eng an Proteinsyntheseraten gekoppelt sind (Fauconneau und Arnal 1985; Houlihan 1991; Houlihan *et al.* 1993; Mathers *et al.* 1993; Reid *et al.* 1995, 1997; McCharty *et al.* 1999). Es gibt eine Fülle von Studien über den direkten Temperatureinfluss auf Wachstum bzw. Proteinbiosynthese unter kontrollierten Laborbedingungen bei kommerziell genutzten marinen Fischen und Evertebraten (Übersichtsartikel von Houlihan 1991; und von McCarthy und Houlihan 1996). Das temperaturabhängige Wachstumsverhalten einzelner Individuen, Arten oder auch Populationen bedeutet jedoch nicht, dass langsames jährliches Wachstum bei antarktischen wechselwarmen Tieren auch auf niedrige Temperaturen zurückzuführen ist. Diese Schlussfolgerung vernachlässigt, dass die antarktischen Organismen mindestens 20 Millionen Jahre Zeit hatten die „Wachstumsmaschine“ bzw. den Proteinsyntheseapparat progressiv an die jetzt vorherrschenden, ganzjährig niedrigen Temperaturen zu adaptieren und kompensatorische Mechanismen für den geschwindigkeitslimitierenden Effekt der Temperatur zu entwickeln.

1.3. Energiebudget Hypothese

Im natürlichen Temperaturbereich der Tiere führen höhere Temperaturen bei den meisten wechselwarmen Tieren zu einer höheren Wachstumsrate bzw. Proteinsyntheserate und zu höheren Sauerstoffverbrauchsraten (immer unter der Voraussetzung, dass keine Nahrungs-limitierung vorliegt (Brett 1979; Houlihan 1991; McCarthy und Houlihan 1996). Es wird geschätzt, dass die Sauerstoffverbrauchsrates eines durchschnittlich wachsenden wechselwarmen Tieres um 40 bis 79% höher liegt als die eines nicht wachsenden wechselwarmen

Tieres (Parry 1983). Da sich mit Verminderung der Temperatur der Sauerstoffverbrauch ungefähr um einen Faktor 2 senkt, liegt die Annahme nahe, dass die Wachstumsrate sich um den gleichen Faktor wie der Sauerstoffverbrauch ändert. Diese Annahme mag auf ein Individuum, eine Art oder auch eine bestimmte Population zutreffen, vernachlässigt jedoch im latitudinalen, zwischenartlichen Vergleich die adaptive Anpassung über einen langen evolutionären Zeitraum. Es haben doch eher jene Tiere einen selektiven Vorteil, die möglichst energieeffizient leben, dabei auch noch schnell wachsen und sich reproduzieren. Es folgt daraus, dass natürliche Selektion durch effiziente Energiebudgetierung (Abbildung 1) stattfindet und nicht auf der Ebene des Sauerstoffverbrauchs. Es ist anzunehmen, dass die verschiedenen Sauerstoff verbrauchenden Prozesse (Abbildung 1) bei unterschiedlicher Temperaturtoleranz der Tiere unterschiedlich stark selektiert werden. Für eine determinierte Menge „assimilierter“ Energie kann Wachstum nur maximiert werden, wenn die benötigte Energiemenge für den Basalstoffwechsel reduziert werden kann. Der Basalstoffwechsel kann jedoch nur soweit reduziert, werden bis ein Überleben gefährdet wird.

Es ist weiter anzunehmen, dass der Anteil der Wachstumskosten (im entferntesten Sinne gehören dazu auch die Reproduktionskosten) am Sauerstoffverbrauch maximiert, der Anteil des Basalstoffwechsels minimiert wird und der Anteil der Aktivitätskosten am Sauerstoffverbrauch abhängig ist von den besonderen ökologischen Lebensumständen. Die Auffassung, dass genau die ektothermen Tiere einen selektiven Vorteil haben, die gemäß der MCA einen temperaturunabhängigen Sauerstoffverbrauch aufweisen, ist daher zu simpel und, wie oben bereits erwähnt, teilweise oder ganz widerlegt (Bullock 1955; Fry 1967; Precht *et al.* 1973; Hazel und Prosser 1974; Newell und Branch 1980). Ganz im Gegenteil, die antarktischen stenothermen Tiere hatten eine lange evolutionäre Entwicklungszeit bei „einfachen“ stabilen Temperaturbedingungen. Sie haben dadurch einen hohen Grad des „energieeffizienten Lebens“ erreicht, der durch einen niedrigen Basalstoffwechsel gekennzeichnet ist. Kalt eurytherme Tiere hingegen müssen eine hohe Temperaturtoleranz aufweisen und haben einen höheren Basalstoffwechsel auf Kosten eines langsameren Wachstums (Pörtner *et al.* 2001; Pörtner *et al.* 2002a; entspreche dem MCA Balken in Abbildung 1).

In kalt stenothermen Tieren könnte die Reduktion des Basalstoffwechsels u.a. erreicht werden durch: 1. einen niedrigeren Proteinumsatz aufgrund höherer Proteinstabilität, 2. reduzierte Aktivität der Ionenpumpen, 3. reduzierte Kosten für die Mitochondrien durch einen niedrigeren, nicht ATP produzierenden, passiven Protonenausstrom („Proton leak“; Pörtner *et al.* 1999; Pörtner *et al.* 2002b). Hawkins (1991) postuliert, dass der Proteinumsatz die Regulation des Stoffwechsels erlaubt. Eine ständige Synthese und Abbau der Proteine sind nicht nur wichtig für die Erhaltung und das Wachstum von Geweben, sondern auch für die Flexibilität von Tieren sich an unterschiedliche Umweltbedingungen anzupassen, kaputte bzw. denaturierte Proteine zu ersetzen oder Aminosäuren zu mobilisieren. Änderungen in

der Proteinsynthesekapazität (Translationskontrolle) oder im RNA Gehalt (Transkriptionskontrolle) können als regulatorische Mechanismen für die Proteinbiosynthese dienen. Im allgemeinen erlaubt die Regulation der Translationskapazität eine schnelle Änderung der Syntheserate durch kurzfristige Inhibierung oder Aktivierung (Hershey 1991) und hält somit die Flexibilität des Systems aufrecht. Wie für verschiedene Systeme gezeigt werden konnte, ist ein entscheidender Kontrollmechanismus der Proteinbiosynthese die Phosphorylierung bzw. die Dephosphorylierung von Komponenten des Translationsapparates, wie Initiations- und Elongationsfaktoren (Benedetti und Baglioni 1986; Hershey 1991; Gingras *et al.* 1999). Eine Signalfunktion könnte dabei dem intrazellulären pH (pHi) zukommen (Hofmann und Hand 1994; Hand und Hardewig 1996), beispielsweise durch einen direkten Effekt auf Phosphorylierungsprozesse der Proteinbiosynthese (Goumard *et al.* 1990; Isford *et al.* 1993).

Eine Grundvoraussetzung für die „Energiebudget Hypothese“ ist, dass die energetischen Kosten aller zellulären Prozesse, also auch für die Proteinbiosynthese, gleich bleiben. Die theoretischen Kosten für die Proteinbiosynthese (=Translation) belaufen sich auf 4 energiereiche Verbindungen pro Peptidbindung (Zwei ATP für die Aminoacylierung und zwei GTP für die Peptidbindung Hasselkorn und Rothman-Denes 1973, Aoyagi *et al.* 1988; Weijland und Parmeggiani 1993). Aufgrund des Bestrebens nach energieeffizienter Optimierung erscheint es sehr unwahrscheinlich, dass die metabolischen Kosten für die Proteinbiosynthese in antarktischen Tieren höher als dieser theoretische Wert sein sollen, wie für die Antarktische Assel *Glyptonotus antarcticus* bestimmt wurde (Whiteley *et al.* 1996). Im Gegensatz dazu wurden in den Larven des Seeigels *Sterechinus neumayeri* sehr niedrige Kosten für die Proteinbiosynthese ermittelt (Marsh *et al.* 2001). Abgesehen davon, dass uns die Autoren eine Begründung dieser Unterschiede in den Kosten schuldig bleiben, besteht ein grundsätzlicher Klärungsbedarf über die energetischen Kosten der Proteinbiosynthese.

Unabhängig von den Kosten pro Peptidbindung zeigen beide Studien und eine neuere Studie an der antarktischen Napfschnecke *Nacella concinna* (Fraser *et al.* 2002a), dass der prozentuale Anteil der Proteinbiosynthese am Gesamtsauerstoffverbrauch höher liegt als bei Tieren aus gemäßigten und tropischen Breiten (Fraser *et al.* 2002a). Dies würde die oben beschriebene „Energiebudget Hypothese“ stützen. Fraser und Koautoren (2002a) begründen die höheren Gesamtkosten für die Proteinbiosynthese allerdings mit Mehrkosten für die Aufrechterhaltung von hohen RNA Konzentrationen in *Nacella concinna*. Höhere RNA Konzentrationen sind ein oft beschriebener Kompensationsmechanismus bei Akklimations- oder Akklimatisationsprozessen wechselwarmer Tiere, um einer bei kalten Temperaturen niedrigeren RNA Aktivität entgegenzuwirken (Goolish *et al.* 1984; Foster *et al.* 1992; Foster *et al.* 1993; Mathers *et al.* 1993; McCarthy und Houlihan 1996; McCarthy *et al.* 1999). Sowohl McCarthy und Houlihan (1996) als auch Fraser und Koautoren (2002a) extrapolieren

dieses Akklimatisationsphänomen der „Hochregulierung der RNA Konzentrationen aufgrund niedriger RNA Aktivitäten“ über den gesamten Temperaturbereich ektothermer und endothermer Tierarten. Sie sehen darin einen kompensatorischen Mechanismus auch auf adaptiver Ebene. Mehrkosten für höhere RNA Konzentrationen widerspräche jedoch einer im Laufe der Evolution vollzogenen Optimierung des Proteinbiosynthese Apparates hin zu energieeffizientem Arbeiten. Energiesparender wäre die Entwicklung eines kalt adaptierten RNA Translationsapparates mit erhöhter katalytischer Effizienz. Höhere RNA Konzentrationen könnten auch das Resultat eines reduzierten RNA Umsatzes bei niedrigen Temperaturen sein.

1.4. Ressourcenlimitierung

Die Hypothese der Ressourcenlimitierung geht wie die „Energiebudget Hypothese“ von einer Temperaturentkopplung und damit von einer vollständigen Kompensation des Wachstumsprozesses aus. Jährliches Wachstum ist durch starke saisonale Schwankungen in der Nahrungsverfügbarkeit limitiert (Clarke und North 1991; Clarke und Peck 1991; Clarke und Leakey 1996). In antarktischen Habitaten gibt es nur kurze Perioden im Jahr, während derer Nahrungsaufnahme möglich oder energetisch günstig ist. Wenn die Wachstumsmaschine erst einmal im Gange ist, dann arbeitet sie mit gleicher Geschwindigkeit wie in ektothermen Tieren aus gemäßigten Breiten. Prinzipiell geht es also auch um effiziente Ressourcen- bzw. Energienutzung und ergänzt im weitesten Sinne die „Energiebudget Hypothese“. In Abbildung 2 wird die Hypothese erläutert. Für eine Vereinfachung wird Wachstum mit der Proteinsyntheserate gleichgesetzt. Die Höhe der Boxen stellt die Syntheserate eines Ribosoms dar und der Abstand zwischen den Boxen die Zeiten, in denen keine Proteinbiosynthese stattfindet. Die obere Reihe repräsentiert ein ektothermes Tier aus gemäßigten Breiten, das bei 10 °C lebt und in einer bestimmten Zeit Δt 8 Proteineinheiten synthetisiert. Ein polarer Artverwandter, der bei 0 °C lebt, synthetisiert in der gleichen Zeit nur 4 Proteineinheiten. Dies entspräche einem Q_{10} von 2 und ließe einen direkten Einfluss der Temperatur vermuten.

Für die niedrige Proteinsyntheserate gibt es jedoch 2 mögliche Erklärungen. In polaren Tieren wird die Proteinbiosynthese durch niedrige Temperaturen reduziert, und auch wenn die Proteinbiosynthese maximal läuft, können nur 4 Proteineinheiten synthetisiert werden.

Das hieße, dass der nicht Temperatur kompensierte Proteinsyntheseapparat fortlaufend mit reduzierter Geschwindigkeit Polypeptidketten synthetisiert (mittlere Reihe). Eine andere Erklärung wäre ein vollständig kompensierter Proteinsyntheseapparat, der mit gleicher Geschwindigkeit arbeitet wie der Syntheseapparat ektothermer Tiere aus gemäßigten

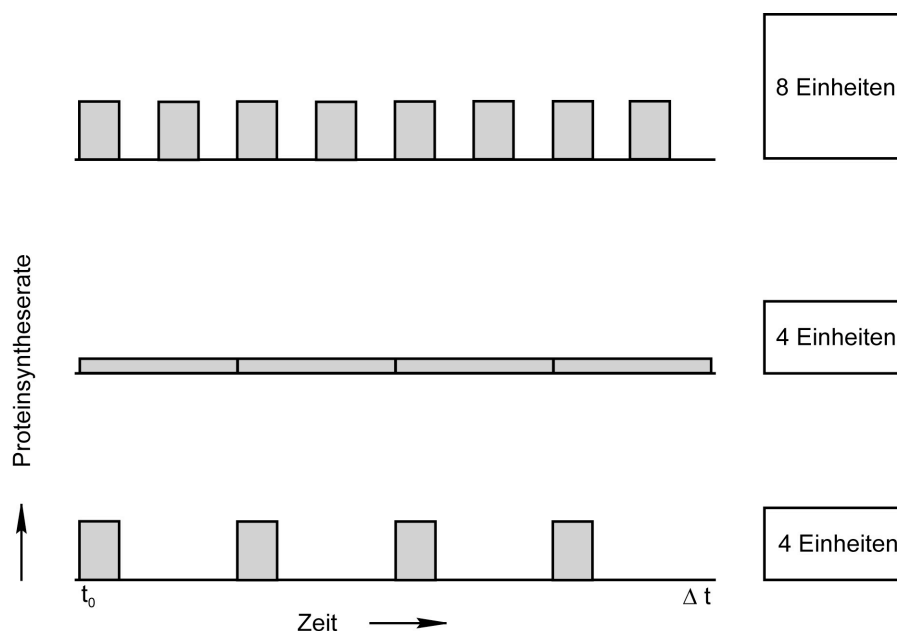


Abbildung 2: Eine schematische Darstellung der Proteinsyntheserate eines ektothermen Tieres aus gemäßigten Breiten bei 10 °C (obere Reihe), eines polaren ektothermen Tieres mit nicht kompensiertem Proteinsyntheseapparat bei 0 °C (mittlere Reihe) und eines polaren ektothermen Tieres mit einem vollständig kompensierten Proteinsyntheseapparat bei 0 °C (untere Reihe). Die Höhe der Balken steht für die Proteinsyntheserate und die Boxen zeigen die synthetisierte Proteinmenge über die Zeit Δt . Zwischen den Boxen befinden sich Perioden, in denen keine Proteinbiosynthese stattfindet. Verändert nach Clarke 1991.

Breiten (untere Reihe). Die Boxenhöhe gleicht deswegen denen aus der oberen Reihe. Es können jedoch nur 4 Proteineinheiten synthetisiert werden, weil den polaren Organismen in der gleichen Zeit Δt weniger Ressourcen (Aminosäuren oder Energie) zur Verfügung stehen als den Tieren aus wärmeren Gebieten (gekennzeichnet durch die Phasen, in denen keine Proteinbiosynthese stattfindet).

Erste Untersuchungen zu dieser Hypothese zeigen deutliche saisonale Wachstumsmuster in antarktischen und arktischen ektothermen Tieren, trotz ganzjährig gleich bleibender Temperaturen (Ashford und White 1995; Lehtonen 1996; North 1998; North *et al.* 1998; Brockington 2001; Brockington und Peck 2001; Fraser *et al.* 2002b). Für die antarktische Napfschnecke *Nacella concinna* konnte auch in der *in vivo* Proteinsyntheserate ein saisonaler Verlauf nachgewiesen werden, der mit RNA Konzentrationsschwankungen bis zu 48% verbunden war (Fraser *et al.* 2002a).

1.5. Ansatz

Aus den vorangegangenen Erörterungen ergab sich die Frage, welchen Grad der Kältekompensation die kalt stenothermen Organismen im Wachstum erlangt haben. Auf zellulärer Ebene ist Wachstum eng an die Proteinbiosynthese gekoppelt, sodass sich zunächst die Frage nach den Kapazitäten und den Anpassungsmechanismen der Proteinsyntheseapparate bei polaren Organismen stellte. Es wurden die Proteinsyntheseapparate einer Evertebratengruppe und einer Vertebratengruppe untersucht, um eventuell allgemeine Prinzipien der Anpassung der „Translationsmaschine“ an kalte Temperaturen herauszuarbeiten.

Bei den Evertebraten fiel die Wahl auf die in der Antarktis endemische *Adamussium colbecki* und die Europäische *Aequipecten opercularis*. Beide Arten stammen aus der Familie der Kammmuscheln (Pectinidae), sind eng miteinander verwandt (Canapa *et al.* 2000) und weisen ähnliche Lebensstile bei unterschiedlicher Temperaturtoleranz auf. Die zirkum-antarktisch verbreitete stenotherme *A. colbecki* lebt in einem engen Temperaturbereich zwischen -1.8 und 2.5 °C, wobei die eurytherme *A. opercularis* bei Temperaturen zwischen 8 und 24 °C vorkommen kann. *A. colbecki* ist besonders interessant, da sie unter den antarktischen Evertebraten zu den relativ schnell wachsenden Muscheln (*Bivalvia*) zählt und mit hohen Abundanzen vorkommt (Berkman 1990; Chiantore *et al.* 2001; Heilmayer *et al.* 2003), sodass eine hoher Adaptationsgrad erreicht sein wird.

Aus der Gruppe der Vertebraten bot sich aufgrund ihrer weltweiten Verbreitung die Familie der Aalmuttern (Zoarciden) an (Anderson 1994). Ein in der Antarktis lebender endemischer Vertreter der Zoarciden ist die Aalmutter *Pachycara brachycephalum*. Diese vermeintlich kalt stenotherme Art zeigt die typischen, für ein permanentes Leben in der Kälte verbundenen, physiologischen Charakteristika (van Dijk *et al.* 1999). Sie lebt natürlicherweise in einem Temperaturbereich zwischen -1.8 und 2.5 °C, weist jedoch auf der anderen Seite eine erstaunlich hohe Temperaturtoleranz auf. Die obere kritische Temperatur, die durch den Übergang zum anaeroben Stoffwechsel charakterisiert wird, liegt bei den antarktischen Aalmuttern zwischen 9 und 13 °C (van Dijk *et al.* 1999; Mark *et al.* 2002) und erlaubt deswegen Langzeitinkubationen bei höheren Temperaturen, um die Akklimatisationsfähigkeit des Proteinsyntheseapparates dieser kalt angepassten Art zu untersuchen. Die in den gemäßigten Schelfmeeren der Nord- und Ostsee verbreitete Spezies *Zoarcetes viviparus* hat den gleichen benthischen Lebensstil wie die antarktische *P. brachycephalum*, lebt jedoch in einem Temperaturbereich von 0 bis 18 °C. Die kritische Temperatur der eurythermen *Z. viviparus* liegt zwischen 21 und 24 °C (van Dijk *et al.* 1999).

Auf zellulärer Ebene kann Wachstum nur dann entstehen, wenn die Nettoproteinsynthese den Proteinabbau übersteigt. Verschiedene Gewebe zeigen unterschiedlich hohe Proteinumsatzraten. In ektothermen Tieren haben Kiemen und Leber die höchsten Protein-

syntheseraten gekoppelt an die höchsten Abbauraten (Houlihan *et al.* 1986; Lyndon und Houlihan 1998). Demgegenüber steht der weiße Muskel, der mit außergewöhnlich niedrigen Proteinsyntheseraten die höchste Wachstumseffizienz aufweist. Für den Dorsch wurde die Effizienz des Proteinwachstums (Wachstum/Synthese) im weißen Muskel auf ungefähr 76%, in den Kiemen auf nur 3 - 5% geschätzt (Houlihan *et al.* 1986). In polaren Ektothermen mit langer evolutionärer Geschichte sollte insbesondere der Proteinsyntheseapparat eines Gewebes mit hohem Proteinumsatz in höchstem Maße an die niedrigen Temperaturen adaptiert sein. Bei den Pectiniden und den Zoarciden wurde deswegen zunächst der Proteinsyntheseapparat der Kiemen untersucht. Bei den Aalmuttern wurden die Untersuchungen auf den weißen Muskel ausgeweitet, dessen Proteinbiosynthese eng an das Wachstum gekoppelt ist. Dies sollte eventuelle Unterschiede zwischen den Geweben identifizieren.

Maximale Geschwindigkeiten der Proteinbiosynthese bzw. die Kapazitäten des Translationsapparates unter nicht limitierenden Bedingungen (ausreichende Versorgung mit energiereichen Verbindungen und Aminosäuren) können optimal in einem *in vitro* System ermittelt werden. Der Translationsassay ist ein zellfreies *in vitro* System, in dem das physiologische Milieu des Cytosols (Hauptort der Proteinbiosynthese) nachgestellt wird. Der Vorteil des *in vitro* Systems ist, dass der isolierte Translationsapparat vergleichbarer Arten mit unterschiedlicher Temperaturtoleranz unter standardisierten physiologischen Bedingungen untersucht werden kann. Dabei läuft die Proteinbiosynthese in einem optimierten zellfreien System in gleicher Weise und Geschwindigkeit ab, wenn nicht schneller, als im Organismus selbst (Jackson 1982; Simon 1987; Lopo *et al.* 1989; Patnaik und Swartz 1998).

1.6. Ziel der Arbeit

Die Erörterungen der drei Hypothesen zum langsamen Wachstum polarer Organismen führen unweigerlich zu der zentralen Frage: Ist das Wachstum kalt stenothermer Organismen kältekompensiert? Die Grundvoraussetzung eines kompensierten Wachstumsapparates ist die Temperaturentkopplung bzw. Kompensation auf zellulärer Ebene. Auf diesem Hintergrund werden in dieser Arbeit folgende Fragen für die Kammuscheln und Aalmuttern untersucht:

1. Trifft die Grundvoraussetzung für die „Energiebudget Hypothese“ zu, dass die energetischen Kosten der Proteinbiosynthese unabhängig von der Temperatur sind?
2. Sind die Kapazitäten der Proteinbiosynthese antarktischer Kammuscheln und Aalmuttern kältekompensiert im Vergleich zu ihren Verwandten aus den wärmeren Gebieten?
3. Trifft die Hypothese, dass bei „Kalt Akklimatisation“ bzw. „Kalt Akklimation“ erhöhte RNA Konzentrationen niedrige RNA Aktivitäten kompensieren auch auf kalt adaptierte ektotherme Kammuscheln und Aalmuttern zu?
4. Wachstum ist ein komplexer Prozess, der auf vielen verschiedenen Ebenen kontrolliert und limitiert wird. Dabei stellt sich die Frage, ob der pHi einen regulatorischen Einfluss auf die Proteinbiosynthese hat. Auf der Grundlage der in dieser Arbeit gewonnenen *in vitro* Daten über die Kapazitäten der Proteinbiosynthese und der in der Literatur vorhandenen *in vivo* Daten, sollen diese drei Hypothesen diskutiert werden.

2. Material und Methoden

2.1. Tiere und Hälterung

2.1.1. Pectinidae

Adamussium colbecki: Die antarktischen Kammmuscheln wurden mit einer Dredschke aus einer Tiefe von 50-80 m gefischt. Sie wurden im Februar 2001 während der XV. Italienischen Antarktis Expedition (ANT 2000/01) in der Nähe der Station „Baia Terra Nova“ („Road Cove“, 74°41.9' S, 164°07.7' O) gefangen. Die Durchführung der Experimente fand direkt auf der Station und am Alfred-Wegener-Institut (AWI) in Bremerhaven statt. Die Versuchstiere (Länge 4.42 ± 0.21 cm, Höhe 4.65 ± 0.17 cm; Abbildung 3) wurden in gut belüfteten Meerwasseraquarien bei konstanten Wassertemperaturen von 0.0 ± 0.5 °C und einem Salzgehalt von 34 ± 1 PSU gehältert.

Aequipecten opercularis: Die kleine Pilgermuschel wurde von der Station „Biologique de Roscoff“, Frankreich, bereitgestellt und mit dem Auto nach Bremerhaven transportiert. Sie wurden im Oktober 1999 mit einer Dredge aus einer Tiefe von 80 m gefischt. Im AWI wurden die Versuchstiere (Länge 4.30 ± 0.15 cm, Höhe 4.28 ± 0.13 cm) bei einer Temperatur von 10 ± 1 °C und einer Salinität von 34 ± 1 PSU gehältert.

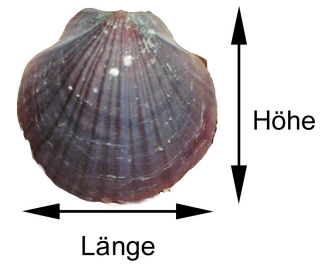


Abbildung 3: Definition der Länge und Höhe einer Muschel

Die *in vitro* Versuche der frisch gefangenen Tiere erfolgten nach einer 6-8tägigen Erholungsphase im Aquarium. Während der Langzeithälterung über 6 Monate wurden beide Arten zweimal wöchentlich mit zermörserten Planktontabletten gefüttert und bei einem Tag-Nacht Rhythmus von je 12 Stunden gehältert. Die Sterblichkeit der Tiere war sehr niedrig.

2.1.2. Zoarcidae

Pachycara brachycephalum: Die antarktischen Aalmuttern wurden mit einer beköderten Fischreuse aus einer Tiefe von 397-455 m während der Antarktis Expedition XV/3 (EASIZ II) des deutschen Forschungsschiffes Polarstern im März 1998 in der Nähe der King George Island (62° 11.2' S, 58° 20.7' W) gefangen. Sie wurden nach Bremerhaven verschifft und im AWI bis zum Beginn der Experimente bei einer Temperatur von 0.0 ± 0.5 °C und einem Salzgehalt von 34 ± 1 PSU gehältert.

Zoarces viviparus: Die aus der Nordsee stammenden Exemplare wurden im August 2001 mit einer Reuse aus einer Tiefe von 5 m rund um Helgoland gefangen und mit dem Forschungskutter Uthörn nach Bremerhaven verschifft und bis zum Beginn der Experimente im AWI bei einer Temperatur von 10 ± 1 °C und einer Salinität von 34 ± 1 PSU gehältert.

Der Akklimationsversuch beider Aalmuttern erfolgte bei einem Tag-Nacht Rhythmus von je 12 Stunden. Sie wurden einmal wöchentlich mit aufgetauten Nordseegarnelen (*Crangon crangon*) gefüttert. Die Sterblichkeit der Tiere war sehr niedrig.

2.2. Isolation des Proteinsyntheseapparates

Bei den Kammmuscheln wurde der Proteinsyntheseapparat aus den Kiemen, bei den Aalmuttern aus den Kiemen und dem weißen Muskel isoliert. Für die Kiemen mussten je 2 Pectiniden bzw. Zoarciden gepoolt werden, um genügend Gewebe für die Herstellung der Lysate und die Messung der Gewebeparameter zu gewinnen. Die Hälfte des Gewebes wurde für spätere Analysen sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren, die andere Hälfte zur Herstellung der Lysate benutzt. Die Homogenisierung der Kiemen erfolgte in einem Verhältnis von 1:2. Der weiße Muskel musste für einen optimalen Aufschluss vor dem homogenisieren unter flüssigem Stickstoff gemörsert werden. Außerdem wurde der Muskel in einem Verhältnis 1:1.6 homogenisiert, um die Aktivität der Muskellysate heraufzusetzen. Nach dem Abzentrifugieren der Mitochondrien, Zellkerne und Membranbruchstücke, wurde der Überstand für den Translationsassay genommen. Diese „Rohlysate“ enthalten alle für die Proteinbiosynthese wichtigen, cytosolischen und vielleicht artspezifischen Bestandteile. Hierzu gehören nicht nur die Ribosomen, messenger-RNAs (mRNA) und transfer-RNAs (tRNA), sondern auch unterschiedlichste Enzyme und kleinere Moleküle, wie die Initiations-, Elongations- und Terminationsfaktoren. Die Extraktionspuffer für die Kammmuscheln und die Aalmuttern wurden mit unterschiedlichen Molaritäten angesetzt, wozu Hepes und Saccharose benutzt wurde. Dies war erforderlich, weil die Kammmuscheln zu den Osmokonformern gehören und isoosmotisch zum Meerwasser sind. Die Aalmuttern hingegen zählen zu den Osmoregulierern und sind gegenüber Meerwasser hypoosmotisch.

2.3. Translationsassay

Die Pufferzusammensetzung und Osmolarität der zellfreien Systeme der Pectiniden bzw. Zoarciden wurde so gewählt, dass die durch den Aufschluss der Gewebe verursachte Verdünnung in den Lysaten kompensiert und im Assay die Intrazellulärflüssigkeit wiedergespiegelt wurde. Osmokonformer nutzen häufig Aminosäuren um ihre intrazelluläre Osmolarität hoch zu halten. Die Aminosäuren Glycin und Taurin kommen in vielen Evertebraten in hohen

intrazellulären Konzentrationen vor (Siegmond 1986) und wurden im Translationsassay der Pectiniden eingesetzt, um eine hohe Osmolarität im Assay zu gewährleisten. Dies war bei den osmoregulierenden Aalmuttern nicht notwendig. Die verschiedenen pH-Werte der Assaypuffer bei den Pectiniden und Zoarciden wurden bei 25 °C eingestellt. Für die Bestimmung der energetischen Kosten bei den Pectiniden und der Proteinsynthesekapazitäten bei den Pectiniden und Zoarciden war eine Optimierung der Systeme notwendig. Insbesondere die Zugabe von Phospho-L-Arginin (PLA) bei den Pectiniden bzw. Phosphokreatin (PCr) bei den Zoarciden, sowie von ATP, GTP, radioaktivem [2,3,4,5,6 ³H] Phenylalanin (Phe) und nicht radioaktiven Aminosäuren war notwendig, um eine Substratlimitierung zu vermeiden (Die Konzentrationen sind in Publikation I (s. Seite 22) für die Pectiniden-Assays und in Publikation III (s. Seite 51) für die Zoarciden-Assays aufgeführt). Für die schnelle ATP- bzw. GTP-Regeneration wurde den Kammuschel-Assays zusätzlich Argininkinase bzw. den Aalmutter-Assays Kreatin-Phosphokinase beigefügt.

Der Translationsassay wurde mit der Zugabe des Lysates gestartet und auf mehrere Eppendorfgefäße verteilt. Der Einbau des radioaktiven Phenylalanins in das Protein wurde über die Zeit detektiert, indem die Proteinbiosynthese in den Gefäßen nach verschiedenen Zeitspannen mit Ribonuklease gestoppt wurde. Um die Aufnahme des radioaktiven Phenylalanins in das *in vitro* synthetisierte Protein zu verfolgen, wurden die Ansätze aus den Gefäßen auf Whatman GF/C Filter überführt und mit drei Trichloressigsäure Waschgängen auf den Filter präzipitiert. Nach einem abschließenden Ethanolwaschgang wurden die Filter getrocknet und die Radioaktivität des präzipitierten Proteins im Szintillationszähler gemessen.

Unter den gleichen Bedingungen wie bei dem radioaktiven Translationsassay wurden die energetischen Kosten der Proteinbiosynthese parallel in zwei nicht radioaktiven Assays bestimmt. Der einzige Unterschied zum radioaktiven Translationsassay war, dass das radioaktive durch nicht radioaktives Phenylalanin ersetzt wurde. In einem der beiden nicht radioaktiven Assays wurde die Proteinbiosynthese von Anbeginn mit Ribonuklease unterbunden und parallel zu den anderen Ansätzen inkubiert. Die Proteinbiosynthese des zweiten nicht radioaktiven Assays wurde, wie in den radioaktiven Translationsassays, nach den vorgegebenen Zeitspannen mit Ribonuklease terminiert. Nach Inkubation und Terminierung wurden die nicht radioaktiven Ansätze umgehend in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die PLA-, ATP- und GTP-Konzentrationen wurden in beiden nicht radioaktiven Ansätzen über die Zeit detektiert. Diese Datensätze wurden benutzt, um den Energiebedarf der Proteinbiosynthese im nicht inhibierten Assay und den Background ATP-Verbrauch im Proteinbiosynthese-inhibierten Assay zu quantifizieren.

2.4. Analytische Methoden

Die Bestimmung des freien endogenen Phe in den Lysaten erfolgte mit der RP-HPLC im Labor „Dr. Haase-Aschoff“ (Bad Kreuznach). Die energiereichen Verbindungen PLA, ATP und GTP in den nicht radioaktiven Translationsassays wurden mit Hilfe der Kapillarelektrophorese gemäß der Methode von Casey und Koautoren (1999) bestimmt. Gesamt RNA in den Lysaten und im Gewebe wurde nach alkaliner Hydrolyse gemäß der von Munro und Fleck (1966) abgewandelten Schmidt-Tannhauser Prozedur bestimmt. In Unterproben der alkalisch hydrolysierten Gewebe erfolgte zusätzlich eine Proteinbestimmung nach einer modifizierten Lowry Methode mit Rinderserum Albumin als Standard (Sigma Prozedur Nr. P5656). Die Aminosäureanalysen des Gewebeproteins erfolgte durch saure Hydrolyse in einem Labor in Hamburg (Dr. Wiertz-Dipl. Chem. Eggert-Dr. Joerissen GmbH).

2.5. Berechnungen

2.5.1. Kapazitäten der Proteinbiosynthese

Der lineare Anfangsbereich der zeitabhängigen [2,3,4,5,6-³H] Phe Inkorporationskurven wurde benutzt, um die Proteinsyntheseraten zu bestimmen. Die Proteinsyntheserate wurde dabei von (DPM * x µl Assay⁻¹ * Min⁻¹) über (nmol Phe * x µl Assay⁻¹ * Min⁻¹) in (µg Protein * mg Frischgewicht⁻¹ Tag⁻¹) umgerechnet. Für die Berechnung der spezifischen Radioaktivität wurde sowohl das dem Assay hinzugefügte radioaktive und nicht radioaktive Phe, sowie das im Lysat befindliche endogene Phe berücksichtigt. Mit Hilfe der Aminosäurezusammensetzung des Gewebeproteins konnte mit dem Verhältnis jeder einzelnen Aminosäure zum Phe im Protein und dem spezifischen Molekulargewicht jeder Aminosäure „nmol Phe“ in „synthetisiertes Protein“ umgerechnet werden.

Für einen Vergleich mit *in vivo* Daten aus der Literatur war es erforderlich, die *in vitro* Proteinsyntheseraten in die *in vivo* übliche Angabe der Proteinsyntheserate k_s (% am Gesamtprotein synthetisiertes Protein pro Tag) zu konvertieren:

$$k_s = \frac{\mu\text{g synthetisiertes Protein} / x \mu\text{l Assay} / \text{Tag}}{\mu\text{g Gesamtprotein} / x \mu\text{l Assay}} \times 100$$

In dieser Gleichung bezieht sich das Gesamtprotein auf den Proteingehalt im Gewebe und nicht im Lysat.

Die maximale *in vitro* RNA Aktivität bzw. die *in vitro* RNA Translationskapazität $k_{\text{RNA in vitro}}$ ist vergleichbar mit der *in vivo* RNA Aktivität bzw. der *in vivo* RNA Translationseffizienz $k_{\text{RNA in vivo}}$ ($\text{mg synthetisiertes Protein} \cdot \text{mg RNA}^{-1} \cdot \text{Tag}^{-1}$) und berechnete sich nach folgender Formel:

$$k_{\text{RNA in vitro}} = \frac{\text{mg synthetisiertes Protein} / x \mu\text{l Assay} / \text{Tag}}{\text{mg RNA} / x \mu\text{l Assay}}$$

Bei den Berechnungen von k_s und $k_{\text{RNA in vitro}}$ war $x = 19 \mu\text{l}$ für die Pectiniden-Assays und $x = 11 \mu\text{l}$ für die Zoarciden-Assays.

2.5.2. Die energetischen Kosten der Proteinbiosynthese

Zur Berechnung der energetischen Kosten im *in vitro* Translationsassay wurden die Raten der Aminosäureinkorporation ($\text{mM Aminosäure Min}^{-1}$) in den radioaktiven Assays in direkten Bezug zu den PLA-Verbrauchsraten (mM PLA Min^{-1}) in den nicht radioaktiven Translationsassays gesetzt und ausgedrückt als ($\text{mM konsumiertes PLA} \cdot \text{mM Aminosäure}^{-1}$). Hierfür wurde, genau wie in den radioaktiven Ansätzen, der lineare Anfangsbereich der zeitabhängigen PLA-Kurven benutzt. Der durch die Proteinbiosynthese verursachte PLA-Verbrauch wurde durch die Differenz der PLA-Verbrauchsraten in den beiden nicht radioaktiven Translationsassays berechnet.

2.5.3. Q_{10} Werte und Aktivierungsenergien

Die Berechnung der Q_{10} Werte für die *in vitro* Proteinsyntheseraten erfolgte nach einer modifizierten Van't Hoff'schen Gleichung, die auch kleinere oder größere als die üblichen $10 \text{ }^\circ\text{C}$ Temperaturbereiche berücksichtigt:

$$Q_{10} = (k_2 / k_1)^{10 / (T_2 - T_1)}$$

k_2, k_1 : Proteinsyntheseraten bei der höheren bzw. niedrigeren Temperatur

T_2, T_1 : höhere bzw. niedrigere Messtemperatur in Kelvin

Die Aktivierungsenergie E_a wurde mit Hilfe der Arrhenius-Darstellung bestimmt, bei der der Logarithmus der Reaktionsgeschwindigkeit gegen den reziproken Wert der absoluten Temperatur ($1/T$) aufgetragen wird. Die Aktivierungsenergie ergibt sich aus der von Segel (1976)

modifizierten Formel:

$$E_a \text{ (kJ / mol)} = -R * m * 1000$$

R : allgemeine Gaskonstante (8.3143 J * K⁻¹ * mol⁻¹)

m : Geradensteigung aus der Arrhenius Darstellung

2.6. Statistik

Die Daten wurden als Mittelwerte \pm Standardabweichung oder Standardfehler dargestellt. Vor der Analyse wurden die Daten auf ihre Normalverteilung und Varianzhomogenität überprüft (PC-Programm: STATISTICA Kernel-Version 5.5 A). Traf eines der beiden Kriterien nicht zu, wurden die Daten so transformiert, dass Normalverteilung und Varianzhomogenität gegeben waren. Statistische Unterschiede auf der 5 % Ebene wurden mit der Varianzanalyse (ANOVA) bzw. der Covarianzanalyse (ANCOVA) und nachfolgendem Student-Newman-Keuls Test ermittelt. Unterschiede in den Steigungen der Ribonuklease behandelten und Ribonuklease unbehandelten Translationsassays wurden mit dem *F*-Test verglichen.

3. Publikationen

Liste der bereits veröffentlichten und beabsichtigten Publikationen und Erklärungen über den von mir geleisteten Anteil.

Publikation I

D Storch, HO Pörtner (2003). The protein synthesis machinery operates at the same expense in eurythermal and cold stenothermal pectinids.

Physiological and Biochemical Zoology 76(1): 28-40

Die Idee und der experimentelle Ansatz stammen von mir und wurden mit dem Koautor konzeptionell erarbeitet. Die Experimente wurden von mir durchgeführt. Die erste Version des Manuskriptes zu dieser Veröffentlichung wurde von mir geschrieben und in Zusammenarbeit mit dem Koautor überarbeitet.

Publikation II

D Storch, O Heilmayer, I Hardewig, HO Pörtner (2003). In vitro protein synthesis capacities in a cold stenothermal and a temperate eurythermal pectinid.

Journal of Comparative Physiology B 173: 611-620

Die Idee der Versuche entstand in Zusammenarbeit mit dem Dritt- und Viertautor. Die Einführung in die Methode erfolgte durch den Drittautor. Die Konzeption und Durchführung der Experimente wurde von mir unternommen. Das Manuskript zu dieser Veröffentlichung wurde von mir verfasst und mit dem Zweit-, Dritt- und Viertautor überarbeitet.

Publikation III

D Storch, HO Pörtner. Temperature dependent protein synthesis capacities in cold stenothermal (Antarctic) and eurythermal (North Sea) fish (Zoarcidae).

American Journal of Physiology, eingereicht

Der experimentelle Ansatz wurde auf der Grundlage der zweiten Publikation von mir erarbeitet. Nach Absprache mit dem Koautor wurden die Experimente von mir durchgeführt. Die Erstfassung des Manuskriptes wurde von mir geschrieben und zusammen mit dem Koautor überarbeitet.

Publikation I

The Protein Synthesis Machinery Operates at the Same Expense in
Eurythermal and Cold Stenothermal Pectinids

Daniela Storch und Hans O. Pörtner

(2003)

Physiological and Biochemical Zoology

76(1):28-40

The Protein Synthesis Machinery Operates at the Same Expense in Eurythermal and Cold Stenothermal Pectinids

Daniela Storch

Hans O. Pörtner*

Alfred Wegener Institute for Polar and Marine Research,
Columbusstraße, D-27568 Bremerhaven, Germany

Accepted 10/1/02

ABSTRACT

Translationally active cell-free systems from gills of the Antarctic scallop *Adamussium colbecki* and the European scallop *Aequipecten opercularis* were developed, characterised, and optimised for an analysis of translational capacity. The aim was to determine the energetic cost of protein synthesis in the in vitro cell-free system by directly measuring the required energy equivalents in the lysates. Protein synthesis rate in assays conducted with lysates of *A. colbecki* ($1.029 \pm 0.061 \mu\text{mol Phe min}^{-1}$ at 15°C ; Phe = phenylalanine) were higher compared with lysates of *A. opercularis* ($0.087 \pm 0.013 \mu\text{mol Phe min}^{-1}$ at 15°C and $0.156 \pm 0.023 \mu\text{mol Phe min}^{-1}$ at 25°C). This can in part be attributed to the naturally occurring higher RNA content in lysates of *A. colbecki* ($0.883 \pm 0.037 \text{ mg RNA mL}^{-1}$ lysate) compared with *A. opercularis* ($0.468 \pm 0.013 \text{ mg RNA mL}^{-1}$ lysate). There was no significant difference in the energetic costs of protein synthesis in cell-free systems of gill lysates of the cold stenothermal *A. colbecki* with 4.3 ± 0.7 energy equivalents per peptide bond formed and the eurythermal *A. opercularis* with 5.6 ± 0.6 energy equivalents, indicating that there are no differences in the efficiency of the translation machinery. The energetic costs specified for protein synthesis correspond with the generally accepted theoretical value of four energy equivalents per peptide bond formed, especially in gill lysates of *A. colbecki*, whereas the value for gill lysates of *A. opercularis* was slightly higher.

Introduction

Over the last decades, the concept of metabolic cold adaptation, originally used to explain early findings of relatively high met-

abolic rates in Antarctic fish (Scholander et al. 1953; Wohlschlag 1960), has gradually been disproved by measurements of oxygen uptake in a number of Antarctic and Arctic invertebrates and fish under relatively stress-free conditions (Holeton 1974; White 1975; Ralph and Maxwell 1977a, 1977b; Peck et al. 1987; Chapelle and Peck 1995; Whiteley et al. 1996; Clarke and Johnston 1999; Marsh et al. 2001). It now appears that living in the permanent cold, especially of the Antarctic, is associated with low metabolic rate and, thus, less costly than living in warmer water. The low rates of oxygen demand at low temperature are likely related to reduced protein turnover, ion pump activity, and other aspects of basal metabolism (Clarke 1991). As a precondition, the stoichiometric costs for all of these processes should remain the same; for example, at reduced rates of protein turnover, ATP cost of protein synthesis should also be reduced.

At present, however, studies of the energetic costs of protein synthesis in marine ectotherms and especially in invertebrates living in the southern ocean have led to controversial results. A high protein turnover associated with low metabolic rate was measured in Antarctic sea urchin embryos in vivo, resulting in a synthesis cost of $0.45 \text{ J mg protein}^{-1}$, which is only 4% of the value reported for other marine invertebrates (Marsh et al. 2001). These costs were calculated from a linear regression of total respiration rates versus protein synthesis rates during development. This method produces a global estimate of protein synthesis costs because it includes the energy requirements for overall protein turnover, that is, for transcription, transport of mRNA and amino acids to the location of translation, as well as mRNA and protein degradation. However, this estimate must be considered low because from a strictly biochemical point of view, an average use of four to five ATP molecules per peptide bond is assumed (Buttery and Boorman 1976; Fuery et al. 1998). Neglecting the other costs of protein turnover, the energy cost of 0.45 kJ g^{-1} protein synthesis as determined for Antarctic sea urchin embryos corresponds to a cost of 0.5–0.6 ATPs per peptide bound, depending on the conversion factor used (e.g., five ATPs per peptide bond convert to 3.56 kJ g^{-1} protein synthesised [Aoyagi et al. 1988]; five ATPs convert to 4.5 kJ g^{-1} protein [Fuery et al. 1998]).

Whiteley et al. (1996) found low metabolic rates in the Antarctic isopod *Glyptonotus antarcticus* compared with the temperate *Idotea rescata*. In contrast to Marsh et al. (2001), they observed a low protein synthesis rate associated with relatively high energetic costs of protein synthesis in adult specimens. The ATP requirements were four times higher in *G. antarcticus*

*Corresponding author; e-mail: hpoertner@awi-bremerhaven.de.

at 885 ± 141 mmol ATP g^{-1} protein than in the eurythermal *I. rescata* (237 ± 76 mmol ATP g^{-1} protein). In the study of isopods, inhibition of protein synthesis by cycloheximide and its effect on oxygen consumption were used to evaluate the cost of protein synthesis, which was measured by injection of a single dose of a radiolabeled amino acid according to the flooding dose method (Garlick et al. 1980). The application of cycloheximide in vivo has long been considered to yield specific inhibition and to provide the “true” costs of protein synthesis. However, recent work by Wieser and Krumschnabel (2001) distinctively demonstrates the variability of cost estimates depending on the concentration of cycloheximide used. Cycloheximide seems not to be a specific inhibitor since it is known to affect the membrane transport of potassium (Reilly et al. 1970) and glucose (Evans 1971). Furthermore, Whiteley et al. (1996) could not obtain complete inhibition of protein synthesis in *G. antarcticus*; possibly, the injected cycloheximide was not evenly distributed in the whole body. In conclusion, this method likely leads to an overestimation of the energetic costs (Aoyagi et al. 1988; Wieser and Krumschnabel 2001). Assuming an average molecular weight of 110 g mol^{-1} amino acids, the consequential costs would be 97 ATPs per peptide bond for *G. antarcticus* and 26 ATPs per peptide bond for *I. rescata* (Whiteley et al. 1996).

Oxygen consumption is a complex summation of many processes so that the actual rate of ATP turnover measured in whole animals by far exceeds the theoretical value associated with peptide bond formation. Accordingly, there are major problems with the precision of cost estimates based on whole animal or cellular metabolic rate. Differences (up to fivefold) have been found between the energy cost of protein synthesis estimated directly from the stoichiometry of bond formation and the physiological measurements of the global energy cost of protein synthesis (Waterlow and Millward 1989).

As a solution, the actual cost of protein synthesis can be measured directly in in vitro systems, as was done in this study. In investigations of the more mechanistic aspects, in vitro models have the advantage of ensuring standardised, physiological conditions for between-species comparisons of the isolated translation machinery. It has long been accepted that the protein synthesis in cell-free extracts is regulated in a way very similar, if not identical, to intact cells (Jackson 1982; Simon 1987). In vitro rates of protein synthesis can be set to levels similar to or in excess of those found in vivo through extensive optimisation of reaction parameters (Patnaik and Swartz 1998). Lopo et al. (1989) described cell-free systems for the sea urchin *Strongylocentrotus purpuratus* that displayed many features and characteristic responses typical of intact eggs and embryos.

In this study, we developed, characterised, and optimised translationally active cell-free systems from gills of the Antarctic scallop *Adamussium colbecki* L. and the European scallop *Aequipecten opercularis* (Smith). The aim was to determine the energetic cost of protein synthesis in the optimised in vitro cell-

free system by directly measuring the required energy equivalents in the crude lysates, a newly developed approach that has, in general, not yet been used to study the cost of protein synthesis.

The cold stenothermal *A. colbecki* lives in a narrow temperature range between -1.8° and $+2.5^\circ\text{C}$, whereas the eurythermal *A. opercularis* is found between temperatures of 8° and 24°C . These species have been chosen for their close phylogenetic relationship (Canapa et al. 2000) and equal lifestyle (Stockton 1984) but different ranges of thermal tolerance. The Antarctic *A. colbecki* is particularly interesting because this most conspicuous and circumpolar species is a relatively fast-growing bivalve (Berkman 1990; Chiantore et al. 2001). The translation system has been isolated from the gill because in aquatic invertebrates, gills are among the most active tissues with respect to protein turnover (for review, see Lyndon and Houlihan 1998). Especially the protein synthesis machinery of the gill tissue of this fast-growing, cold stenothermal scallop with its long evolutionary history should be highly adapted to the very low “operating temperatures” in Antarctica and should allow identification of functional differences and differences in the energy requirements of protein synthesis between temperate and polar species. This study demonstrates that the energetic costs to synthesise protein are equal in gill tissues of both pectinids despite different temperatures, which suggests that cold adaptation occurs at the level of increased protein stability, leading to a decrease in overall turnover rates at no increase in the stoichiometric costs of protein synthesis.

Material and Methods

Animals

Aequipecten opercularis were caught at 80 m water depth around Roscoff ($48^\circ51'00\text{N}$, $3^\circ54'00\text{W}$) in the Western English Channel by fishermen of the Station Biologique de Roscoff in October 1999. After a short period of aquarium maintenance, animals were returned to the Alfred Wegener Institute in Germany, where they were kept in well-aerated, recirculating seawater at $10^\circ \pm 1^\circ\text{C}$ and 34 practical salinity units (PSU) for at least 6 d before experimentation. *Adamussium colbecki* were collected from 50–80 m water depth at Road Bay ($74^\circ41'91\text{S}$, $164^\circ07'72\text{E}$) near Terra Nova Bay, Antarctica, in February 2000. They were maintained in running seawater aquaria at $0.0^\circ \pm 0.5^\circ\text{C}$ and 34 PSU at Terra Nova Bay station. They were allowed an acclimation period of 6 d before experiments. Both species were not fed during aquarium maintenance. All experiments were carried out within 3 wk after catching. *Aequipecten opercularis* specimens had a mean size of 4.30 ± 0.15 cm in length and 4.28 ± 0.13 cm in height and *A. colbecki* of 4.42 ± 0.21 cm in length and 4.65 ± 0.17 cm in height.

Preparation of Gill Lysates

The preparation of lysates from gill tissue of *A. opercularis* and *A. colbecki* followed the same procedure. Adductor muscles were dissected, and gills were quickly excised and weighed. Gills of two animals were pooled to provide enough tissue for all measurements. Half of the gill tissue was freeze clamped in liquid N₂ by means of a precooled Wollenberger clamp (Wollenberger et al. 1960) for later examination of the amino acid (AA) composition in tissue protein. The other half was immediately used for the preparation of cell-free protein synthesis systems. Approximately 500–800 mg of gill tissue was transferred to a loosely fitting 2-mL glass homogeniser and homogenised with five strokes in 1 volume of ice-cold extraction buffer containing 100 mM Hepes, 880 mM sucrose, 120 mM potassium acetate, 10 mM magnesium acetate, 7 mM 2-mercaptoethanol, and 30 mM dithiothreitol (DTT). The extraction buffer had been adjusted to pH 7.13 at 25°C. DTT and mercaptoethanol are reductive agents that prevent inhibition of initiation in lysates and counteract the oxidation of certain critical –SH groups to disulphide bonds (Jackson 1982; Kawarasaki et al. 1998). The homogenate was centrifuged at 16,000 g for 30 min at 0°C, and the resulting supernatant was carefully separated from the pellet and used as the lysate. Only freshly prepared lysates were used and were kept on ice before starting the in vitro translation assays. Aliquots of the lysate were frozen in liquid nitrogen for later determination of RNA and endogenous phenylalanine (Phe).

For fully active lysates, work was consistently carried out in a scrupulously clean environment (under a clean bench if available) with the use of baked glassware, sterile, autoclaved plastic ware, and sterile solutions. Water required for the preparation of lysate and assay solutions was treated to inactivate RNase activity by adding 1 mL of diethylpyrocarbonate (DEPC) per litre of distilled water, stirring for half an hour, and then autoclaving.

Cell-Free in Vitro Translation Assays

The buffer composition and osmolarity of the cell-free system was created to compensate for the dilution occurring on lysis of the gill tissue and to mimic the intracellular fluid of marine invertebrates. Translation was measured in assays containing 30 µL of lysate and 120 µL of assay medium. The final volume of 150 µL contained assay buffer (concentration in the assay: 100 mM Hepes, sodium salt, 85 mM taurine, 150 mM glycine, 120 mM potassium acetate, and 5 mM magnesium acetate, adjusted to pH 7.13 at 25°C), 5 mM DTT, 0.2 mM spermidine, all amino acids except Phe at 0.1 mM, 60 µCi of [2,3,4,5,6-³H] Phe (Amersham, 116 Ci mmol⁻¹, 1 mCi = 37 MBq), 4.9 units arginine kinase, and 100 units RNasin ribonuclease inhibitor (Promega) with a fivefold dilution of further tissue ions. The ubiquitously distributed polyamine spermidine has been found

in cells of marine bivalves (Gasparini and Audit 2000) and has a stimulatory effect on polypeptide synthesis in vitro and in vivo (Giannakouros et al. 1990; Monnier et al. 2001). Apart from spermidine, it was important to add labeled and unlabeled amino acids and the energy equivalents phospho-L-arginine (PLA), ATP, and GTP to avoid substrate limitation and to yield high protein synthesis rates.

Unless stated otherwise, substrates of the translation process were used in the following optimised concentrations: 8 µM Phe (including [2,3,4,5,6-³H] Phe), 15 mM PLA, 1 mM ATP, and 0.5 mM GTP. Before starting the translation assay with 30 µL lysate, the reaction mixture was preincubated for 5 min in a water bath set at the experimental temperature of 15°C for *A. colbecki* and 15°C or 25°C for *A. opercularis*. After the addition of lysate, which was considered as time zero, the assay was briefly mixed on a Vortex mixer, quickly subdivided into aliquots of 20 µL, and returned to the water bath, which was set to 15°C or 25°C, respectively. Reactions were run for given time periods and were terminated by adding 2 µL pancreatic RNase (25 units mL⁻¹), followed by an additional 5 min of incubation at the experimental temperature. Then assays were placed on ice. Subsequently, 19-µL samples were pipetted onto Phe-saturated, semiwet Whatman GF/C filters (quenched in 5 mM Phe for 1 h to minimise nonspecific binding of [2,3,4,5,6-³H] Phe). Filters were placed in ice-cold 10% TCA, containing 5 mM Phe, for 5 min to precipitate the synthesised protein onto the filter surface. The filters were then washed in ice-cold 10% TCA for 10 min and were washed twice in ice-cold 5% TCA for 15 min, followed by one wash in 95% ethanol at room temperature. The filters were allowed to dry in air before dissolving them in 5-mL scintillation cocktail (Packard, 57% tritium counting efficiency).

Radioactivity in the precipitated protein was determined by liquid scintillation counting. Also, a zero control, which contained RNase right from the beginning of the assay to prevent protein synthesis, was used to correct for background due to nonspecific binding of [2,3,4,5,6-³H] Phe to components of the lysate. The background averaged to 550 ± 50 disintegrations per minute (DPM) for lysates prepared from *A. colbecki* and to 400 ± 47 DPM for *A. opercularis*. There was no nonspecific incorporation over time, and background values were subtracted from the total counts obtained at each time point. Results were expressed as [2,3,4,5,6-³H] Phe incorporated into trichloroacetic acid-precipitable protein (DPM 19 µL assay⁻¹). With each radioactive translation assay, two nonradioactive assays were run simultaneously under identical conditions with nonradioactive Phe. After the given time periods, samples were immediately frozen in liquid nitrogen. One of the nonradioactive assays was run with and one without RNase from the outset of the translation assay. PLA, ATP, and GTP concentrations were monitored over time. These data sets were used to quantify the energy demand of protein synthesis and to correct for background ATP consumption within the assay.

Analytical Methods

The concentrations of PLA, ATP, and GTP in samples collected from the nonradioactive assays were measured using a capillary electrophoresis method described by Casey et al. (1999). Total RNA in lysates was hydrolysed by alkaline exposure according to the Schmidt-Tannhauser procedure and was quantified by the dual-wavelength procedure of Munro and Fleck (1966). For relating the RNA concentration to the absorbance at these two wavelengths, the modified, more suitable formula, $\text{RNA } (\mu\text{g mL}^{-1}) = 32.9 \times \text{A}_{260} - 6.11 \times \text{A}_{232}$, was used as suggested by Ashford and Pain (1986). The free, endogenous Phe levels in lysates obtained from both species were measured by RP-HPLC in the lab Dr. Haase-Aschoff (Bad Kreuznach, Germany). Total AA composition of tissue protein was determined by acidic hydrolysis followed by HPLC analysis (Dr. Wiertz-Dipl. Chem. Eggert-Dr. Joerissen GmbH, Hamburg, Germany).

Calculations

For accurate determination of the energetic costs, protein synthesis rates were elevated by increasing the temperature to 15°C above the acclimatization temperatures of the two species. Thus, calculations of AA incorporation rates and PLA consumption rates were made using the initial, linear intercept of the curves at 15°C for *A. colbecki* and at 25°C for *A. opercularis*. AA incorporation rates were expressed as $\text{DPM } 19 \mu\text{L assay}^{-1}$ and PLA consumption rates as mM^{-1} . All AA incorporation rates were corrected for differences in $[2,3,4,5,6\text{-}^3\text{H}]$ specific activity and expressed as $\text{pmol Phe } 19 \mu\text{L assay}^{-1} \text{ min}^{-1}$. AA incorporation rates depending on various PLA, ATP, and GTP levels were further converted to percent fractional values of the respective optimised concentration in order to facilitate comparison between different translation efficiencies of assay mixtures due to variable tissue pulping.

The energetic costs of AA incorporation were determined for each individual translation assay and were calculated from the measured absolute concentrations of high-energy phosphates. Therefore, the specific radioactivity, expressed as Bq pmol Phe^{-1} ($1 \text{ DPM} = 1/60 \text{ Bq}$), of each assay was calculated from the amount of added radioactive and nonradioactive Phe in the assay plus the measured endogenous Phe of the lysates. The specific radioactivity was used to convert incorporation rates of Phe (DPM min^{-1}) into mM Phe min^{-1} . PLA consumption rates due to protein synthesis were calculated from the difference between rates found in the two nonradioactive sets. Energy equivalents consumed per peptide bond formed were calculated from the ratio of PLA consumption (mM PLA min^{-1}) to Phe incorporation (mM Phe min^{-1}). Subsequently, the values were normalised for differences in total Phe content in tissue protein of both species and then expressed as PLA consumed per AA.

Statistics

All data are expressed as means \pm SE unless stated otherwise. Numbers (*n*) of determinations are given in parentheses or figure legends. Statistical differences at the 5% level were tested using ANOVA or ANCOVA followed by the Student-Newman-Keuls post hoc test for independent samples. The slopes of regression lines of the ribonuclease treated and untreated assays were compared by use of an *F*-test.

Results

Characterization of Gill Protein and Lysates

The amino acid composition of gill protein from *Aequipecten opercularis* and *Adamussium colbecki* is specified in Table 1. There was no significant difference between species in protein contents of gill tissues ($4.44 \pm 0.27 \text{ g } 100 \text{ g}^{-1}$ in *A. opercularis* and $4.43 \pm 0.22 \text{ g } 100 \text{ g}^{-1}$ in *A. colbecki*) and the percentage of Phe within the protein ($3.83\% \pm 0.18\%$ and $3.84\% \pm 0.04\%$). Despite identical protocols used for both species, endogenous Phe levels and RNA content in lysates of *A. colbecki* ($0.88 \pm 0.04 \text{ mg RNA mL}^{-1}$; $0.29 \pm 0.05 \text{ mM Phe}$) were significantly higher than in lysates of *A. opercularis* ($0.47 \pm 0.01 \text{ mg RNA mL}^{-1}$; $0.11 \pm 0.01 \text{ mM Phe}$; Table 2). This indicates higher levels of RNA and free Phe in the Antarctic species.

Optimum Assay Conditions

It was important to use identical assay conditions for the two species to compare the energetic costs of in vitro protein synthesis of gill. Therefore, the same assay buffer was used. Hepes is a commonly used buffer substance in cell-free protein synthesis and is particularly suitable because it causes pH in the assay buffer to change according to the preferred value of $-0.015 \text{ pH } ^\circ\text{C}^{-1}$. According to the alpha-stat hypothesis, such a pH shift ensures a constant net charge of protein at the different assay temperatures of 15°C for *A. colbecki* and 15°C and 25°C for *A. opercularis* (Cameron 1989).

Cell-free translation systems of both species were optimised for maximum protein synthesis rates and more accurate calculations of energy demand at 15°C for *A. colbecki* and 25°C for *A. opercularis*. Various Phe, PLA, ATP, and GTP levels were applied in assays conducted with lysates of *A. opercularis* at 25°C and subsequently tested for lysates of *A. colbecki* at 15°C (insets in Figs. 1, 2). In vitro protein synthesis rates of both cell-free systems reached saturation at $3 \mu\text{M Phe}$ and remained constant up to $8 \mu\text{M Phe}$ (Fig. 1). Figure 2 depicts the Phe incorporation rate into protein as a function of PLA (Fig. 2A), ATP (Fig. 2B), and GTP (Fig. 2C). Protein synthesis rate was gradually stimulated up to a concentration of 15 mM PLA and was rapidly inhibited at higher PLA levels. A significant loss of protein synthesis rates by 35% occurred at a PLA concentration of 30 mM in both cell-free systems. Due to the presence of

Table 1: Concentrations of amino acids in protein obtained from gill tissue of *Aequipecten opercularis* and of *Adamussium colbecki*

Amino Acids	Gill Protein (g 100 g ⁻¹ gill tissue)	
	<i>Aequipecten opercularis</i>	<i>Adamussium colbecki</i>
Cysteine acid	ND	.03 ± .01
Aspartate	.39 ± .03	.39 ± .01
Hydroxy-proline*	.09 ± .01	.04 ± .01
Threonine	.19 ± .01	.20 ± .02
Serine	.17 ± .02	.18 ± .01
Glutamate	.65 ± .06	.64 ± .03
Proline	.31 ± .04	.29 ± .02
Glycine	.55 ± .02	.60 ± .07
Alanine	.21 ± .01	.21 ± .01
Valine	.22 ± .02	.22 ± .01
Cysteine*	.04 ± .00	.02 ± .01 ^a
Methionine*	.11 ± .01	.09 ± .01
Isoleucine	.19 ± .00	.20 ± .02
Leucine	.27 ± .02	.28 ± .01
Tyrosine*	.15 ± .02	.12 ± .01
Phenylalanine	.17 ± .01	.17 ± .01
Hydroxy-lysine	.02 ± .01	.03 ± .01 ^b
Ornithin	.01 ^c	.01 ^c
Lysine	.29 ± .02	.29 ± .01
Histidine	.11 ± .01	.11 ± .01
Arginine	.30 ± .02	.31 ± .03
Total	4.44 ± .27	4.43 ± .22
% fraction of Phe	3.83 ± .18	3.84 ± .04

Note. The percent fraction of Phe within the protein was calculated from the ratio of phenylalanine content over the sum of amino acids multiplied by 100. Data are given as means ± SD ($n = 5$). ND = not detectable.

^a Only three detectable values out of five determinations.

^b Only four detectable values out of five determinations.

^c Only one detectable value out of five determinations.

* Indicates a significant difference ($P < 0.05$) between species.

endogenous PLA in the lysates, the absolute concentration of PLA in optimised assays was 1749 ± 0.35 mM in *A. colbecki* and 16.43 ± 0.43 mM in *A. opercularis*. When either ATP or GTP was omitted, a reduced incorporation rate of Phe into protein was observed (Fig. 2B, 2C). Protein synthesis rates in both cell-free systems were maximised in the presence of 0.75 mM ATP and 0.5 mM GTP, respectively. On the basis of these results, further cell-free translation assays were conducted using 8 μ M Phe, 15 mM PLA, 1 mM ATP, and 0.5 mM GTP. The average specific radioactivity calculated from the amount of endogenous and added Phe was 0.242 ± 0.032 Bq pmol⁻¹ Phe ($n = 5$) for assays conducted with lysates from *A. colbecki* and 0.512 ± 0.043 Bq pmol⁻¹ Phe ($n = 5$) for assays of *A. opercularis*.

In Vitro Phenylalanine Incorporation

Figure 3 shows the time course of [2,3,4,5,6-³H] Phe incorporation into protein at 15°C by lysates prepared from *A. colbecki* and at 15°C and 25°C by lysates prepared from *A. opercularis* under optimised conditions. Lysates prepared from *A. colbecki* exhibited constant rates of incorporation for the first 5–6 min. The reaction slowed down thereafter and approached completion in an asymptotic manner. In contrast, amino acid incorporation rates by lysates from *A. opercularis* at 15°C remained constant for 26 min and at 25°C for about 17 min, followed by a progressive reduction. Furthermore, the in vitro protein synthesis rate of gill lysates prepared from *A. colbecki* gills (284 ± 27 DPM 19 μ L assay⁻¹ min⁻¹, $n = 5$) measured at 15°C was 5.5-fold higher compared with gill lysates from *A.*

Table 2: Characteristics of cell-free lysates prepared from the gills of *Aequipecten opercularis* and of *Adamussium colbecki*

Species	Tissue	Total RNA* (mg mL ⁻¹)	Free Phe* (mM)
<i>Aequipecten opercularis</i>	Gill	.47 ± .01 (n = 6)	.11 ± .01 (n = 5)
<i>Adamussium colbecki</i>	Gill	.88 ± .04 (n = 6)	.29 ± .05 (n = 5)

Note. All values are means ± SE.

* Indicates a significant difference ($P < 0.05$) between species.

opercularis (51 ± 3 DPM $19 \mu\text{L assay}^{-1} \text{min}^{-1}$, $n = 5$) at the same temperature, which was threefold higher than in *A. colbecki* at 25°C (91 ± 7 DPM $19 \mu\text{L assay}^{-1} \text{min}^{-1}$, $n = 5$). Finally, when we consider the specific radioactivity of 0.242 ± 0.032 Bq pmol Phe⁻¹ and 0.512 ± 0.043 Bq pmol Phe⁻¹ (1 DPM = 1/60 Bq), respectively, the discrepancy between Phe incorporation rates results are even higher, with $1.029 \pm 0.061 \mu\text{mol Phe min}^{-1}$ ($n = 5$) in assays conducted with *A. colbecki* lysates and $0.087 \pm 0.013 \mu\text{mol Phe min}^{-1}$ ($n = 5$) for *A. opercularis* lysates at 15°C ($0.156 \pm 0.023 \mu\text{mol Phe min}^{-1}$, $n = 5$, at 25°C).

Cost of in Vitro Protein Synthesis

Further experiments were conducted to determine the energy requirements of amino acid incorporation into protein. PLA and arginine kinase were used in both cell-free systems to compensate for ATP and GTP hydrolysis over time. While ATP is directly generated from PLA by arginine kinase, GTP is resynthesised at the expense of ATP in the presence of endogenous nucleoside monophosphate kinases or nucleoside diphosphate kinases. Kawarasaki et al. (1995) demonstrated in a cell-free system using wheat germ extract that GTP is regenerated as long as the ATP level is kept at its initial concentration by the ATP regeneration system phospho-L-arginine and arginine kinase. The efficiency of the PLA regeneration system is demonstrated by constant ATP and GTP concentrations in ribonuclease treated and untreated assays (Fig. 4A, 4B). Thus, energy requirements could be calculated from the decrease in PLA levels. However, it is well known that, in addition to the energy-consuming protein synthesis reactions, endogenous protein kinase and phosphatase activities are responsible for further use of ATP in translation assays (Nakano et al. 1996; Kim and Swartz 2000). For adequate consideration of this background ATP turnover, it was required to measure PLA depletion in parallel assays conducted with and without ribonuclease. In both species, addition of ribonuclease resulted in significantly lower rates of PLA degradation than in assays where protein synthesis was not inhibited (Fig. 5A, 5B). Also, ribonuclease caused complete inhibition of $[2,3,4,5,6\text{-}^3\text{H}]$ Phe incorporation in both cell-free systems (data not shown). Therefore, the difference in PLA use between ribonuclease treated and untreated assays could be exclusively attributed to protein-synthesizing reactions.

Protein synthesis accounted for $59\% \pm 5\%$ of total PLA degradation (0.971 ± 0.142 mM PLA) in cell-free translation assays of *A. colbecki*, whereas in assays of *A. opercularis* only $20\% \pm 2\%$ of total PLA use (0.586 ± 0.072 mM PLA) could be ascribed to protein synthesis. Translation-dependent PLA degradation in *A. colbecki* and *A. opercularis* assays amounted to 0.115 ± 0.022 mM min⁻¹ and 0.023 ± 0.003 mM min⁻¹, respectively (see also regression slopes in Fig. 5A, 5B). The energy consumed by protein synthesis was calculated for each lysate from the ratio of PLA degradation per minute and Phe incorporation per minute and then corrected for the fraction of Phe within the protein (*A. colbecki* at 15°C : 0.115 ± 0.022 mM PLA min⁻¹/ $1.029 \pm 0.061 \times 10^{-3}$ mM Phe min⁻¹ $\times 0.0384$; *A. opercularis* at 25°C : 0.023 ± 0.003 mM PLA min⁻¹/ $0.156 \pm 0.023 \times 10^{-3}$ mM Phe min⁻¹ $\times 0.0383$). The same calculation procedure

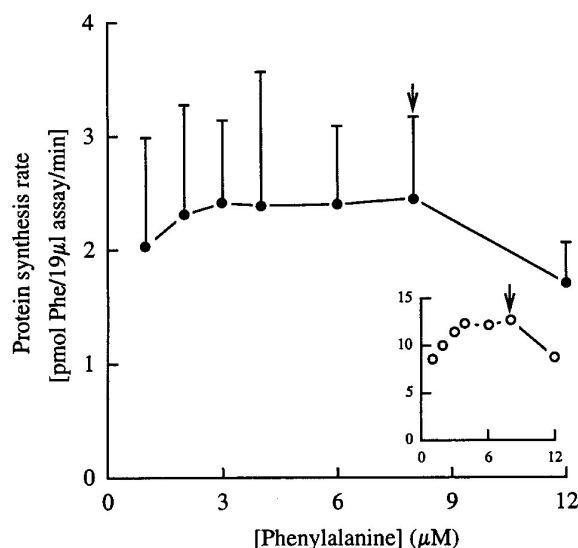


Figure 1. Rates of $[2,3,4,5,6\text{-}^3\text{H}]$ Phe incorporation into protein by cell-free lysates prepared from gills of *Aequipecten opercularis* at 25°C (filled symbols) and *Adamussium colbecki* at 15°C (open symbols, inset) as a function of Phe. Incorporation rates are expressed as pmol Phe $19 \mu\text{L assay}^{-1} \text{min}^{-1}$. The arrow identifies the optimal concentration ($8 \mu\text{M}$). Each data point represents the mean \pm SE ($n = 3$ for *A. opercularis*; $n = 1$ for *A. colbecki*).

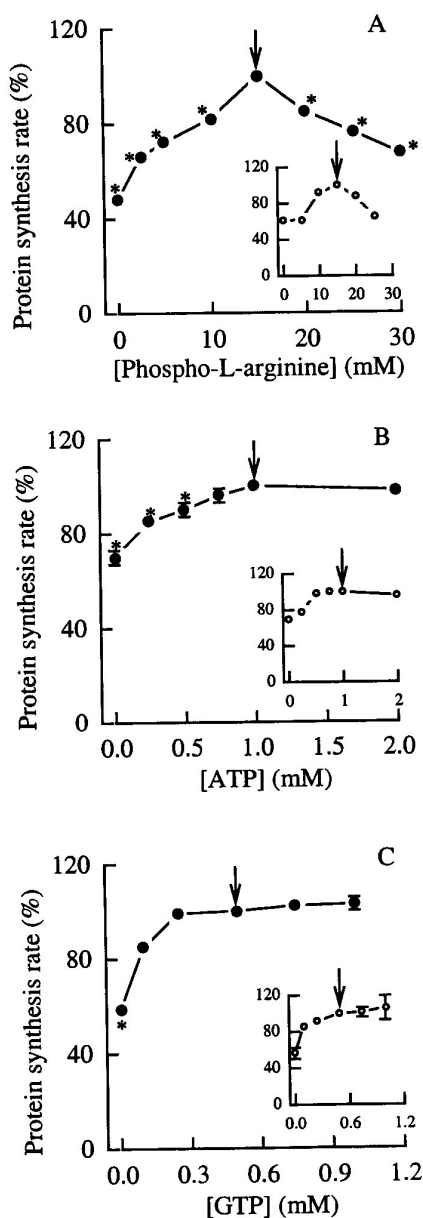


Figure 2. Rates of $[2,3,4,5,6\text{-}^3\text{H}]$ Phe incorporation by cell-free lysates prepared from gills of *Aequipecten opercularis* at 25°C (filled symbols) and *Adamussium colbecki* at 15°C (open symbols, inset) as a function of phospho-L-arginine (A), ATP (B), and GTP (C). Incorporation rates are expressed as a percent fraction of the optimal concentration (A, 15 mM PLA; B, 1 mM ATP; C, 0.5 mM GTP) identified by the arrow. Each data point represents the mean \pm SE (A–C, $n = 3$ for *A. opercularis*; A, B, $n = 1$ for *A. colbecki*; C, $n = 3$ for *A. colbecki*). An asterisk indicates a significant difference ($P < 0.05$) from the optimal concentration.

as for PLA was carried out for ATP and GTP (Fig. 4A, 4B). There was no significant difference between ribonuclease treated and untreated assays and, thus, no ATP and GTP consumption per peptide bond formed if compared with PLA (Table 3). With 5.6 ± 0.6 molecules PLA consumed per peptide bond formed in *A. opercularis* and 4.3 ± 0.7 molecules PLA in *A. colbecki*, there was no significant difference in the costs for protein synthesis between the two species.

Discussion

Methodology

The aim of this study was to investigate the energy requirements for protein synthesis in two pectinid species adapted to different ambient temperatures. In order to overcome the difficulties to estimate protein synthesis costs from whole-organism oxygen consumption rates, the translation machinery was isolated and energy equivalents used per peptide bond formed were directly determined. Crude, postmitochondrial lysate was used because the plethora of low molecular weight compounds utilised for protein synthesis, which are eventually specific to the translation apparatus of the two pectinids and, thus, could change the energetic costs, had to be retained unchanged.

High initial protein synthesis rates have been achieved in cell-free translation systems of both pectinid species by elevating the temperature and optimising the assay composition. There was no thermal deterioration of protein synthesis capacity at the experimental temperatures as shown in a study on the temperature dependence of in vitro protein synthesis (D. Storch

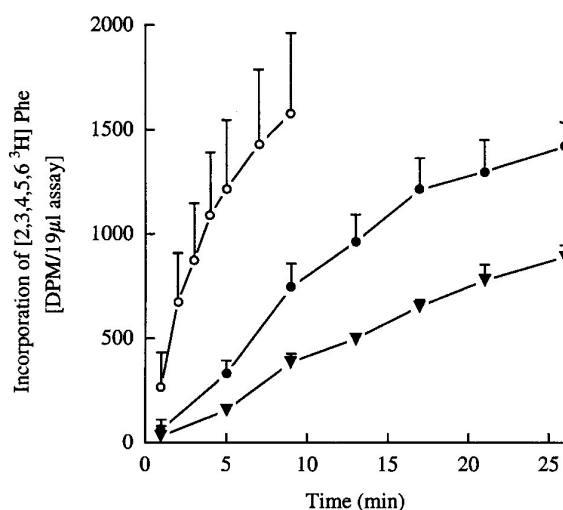


Figure 3. Time course of incorporation of $[2,3,4,5,6\text{-}^3\text{H}]$ Phe into trichloroacetic acid-precipitable protein by cell-free lysates prepared from gills of *Aequipecten opercularis* (filled circles, 25°C; filled triangles, 15°C) and *Adamussium colbecki* (open circles, 15°C). Each data point represents the mean \pm SE ($n = 5$).

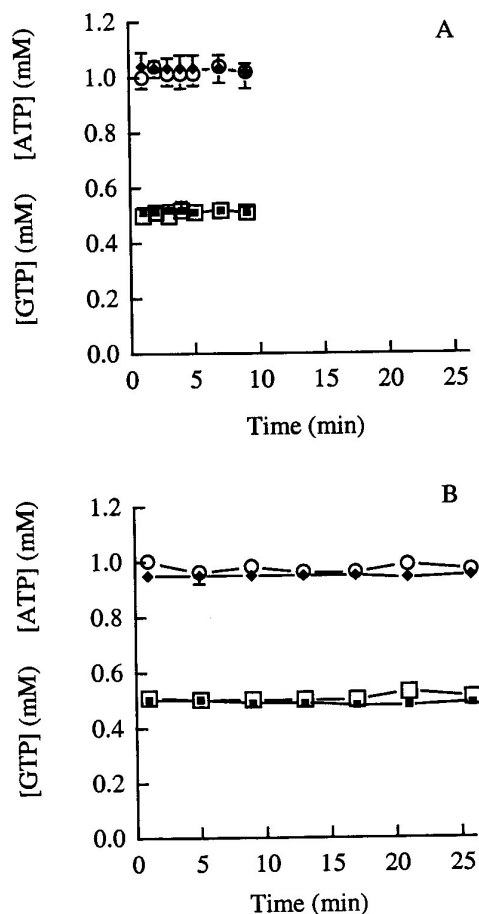


Figure 4. Concentrations of ATP and GTP as a function of time in a cell-free protein synthesis assay prepared from gills of *Adamussium colbecki* at 15°C (A) and of *Aequipecten opercularis* at 25°C (B). Open circles, ATP in assays active in protein synthesis; filled rhombuses, ATP in assays treated with ribonuclease; open squares, GTP in assays active in protein synthesis; filled squares, GTP in assays treated with ribonuclease. Data are presented as means \pm SE ($n = 5$). No significant changes occurred over time.

and H.O. Pörtner, unpublished observation). Isolating the translation machinery with its endogenous mRNA level is a snapshot of the cell. An increase of temperature in the in vitro system merely accelerates the velocity of biochemical reactions until a temperature optimum is reached. Brosnan et al. (1976) also found that amino acid incorporation directed by endogenous mRNA of postmitochondrial supernatant from skate liver was maximal at a temperature 15°C above ambient. Thermal stability has also been demonstrated for other cell-free systems, for example, prepared from liver of Antarctic fish (Haschemeyer and Williams 1982) or from different organs of rainbow trout (Simon 1987). The higher protein synthesis rate

in assays conducted with lysates of *Adamussium colbecki* compared with lysates of *Aequipecten opercularis* can be attributed at least in part to the naturally occurring higher RNA content in lysates of *A. colbecki*.

The period of initially high activity remains short followed by a progressive reduction of the translation rate. This is a general phenomenon occurring in cell-free systems and is usually accounted for by the quick depletion of substrates such as ATP, GTP, and amino acids and/or RNA degradation (Spirin

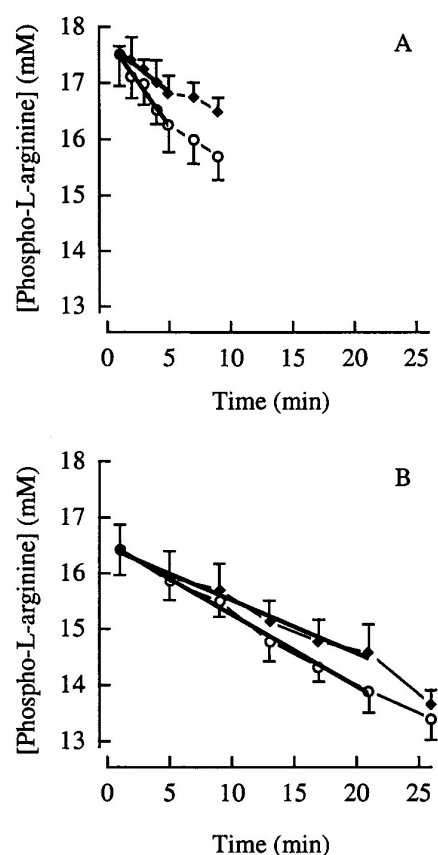


Figure 5. Concentrations of phospho-L-arginine (PLA) in a cell-free protein synthesis assay prepared from gills of *Adamussium colbecki* at 15°C (A) and of *Aequipecten opercularis* at 25°C (B). Open circles, PLA in assays active in protein synthesis; filled rhombuses, PLA in assays treated with ribonuclease. Data are presented as means \pm SE ($n = 5$). Regression slopes are for (A) *A. colbecki*: $m = -0.079 \pm 0.015$ mM PLA min^{-1} (with ribonuclease), $m = -0.194 \pm 0.028$ mM PLA min^{-1} (without ribonuclease). The level of translation-dependent PLA degradation results as $-0.079 \pm 0.015 - (-0.194 \pm 0.028) = 0.115 \pm 0.022$ mM min^{-1} . For (B) *A. opercularis*: $m = -0.094 \pm 0.013$ mM PLA min^{-1} (with ribonuclease), $m = -0.117 \pm 0.014$ mM PLA min^{-1} (without ribonuclease). Translation-dependent PLA degradation results as $-0.094 \pm 0.013 - (-0.117 \pm 0.014) = 0.023 \pm 0.003$ mM min^{-1} .

Table 3: Calculated energy requirements for protein synthesis in cell-free translation assays prepared from gills of *Aequipecten opercularis* and of *Adamussium colbecki*

Energy Equivalents	<i>Aequipecten opercularis</i>	<i>Adamussium colbecki</i>
PLA	5.6 ± .6	4.3 ± .7
ATP	.3 ± .5	−.3 ± .4
GTP	−.3 ± .1	.0 ± .0

Note. Values represent molecules consumed per peptide bond formed. All values are means ± SE ($n = 5$).

et al. 1988; Kawarasaki et al. 1995, 1998; Kang et al. 2000). Furthermore, it has been shown that the accumulation of inorganic phosphate due to net depletion of high energy phosphates has an inhibitory effect on in vitro translation (Nakano et al. 1996; Kim and Swartz 2000).

In this study, substrate depletion is not likely the reason for the progressive decrease of protein synthesis rates because ATP and GTP levels remained high and addition of higher Phe levels could not prolong protein synthesis decisively. Some RNA degradation is inevitable but will also not be the reason for the distinct decrease of protein synthesis rate after a short time. For the protection of endogenous RNA, the common and effective ribonuclease inhibitor RNasin was included in the assay (Lopo et al. 1989; Moreno et al. 1991; Hofmann and Hand 1994).

The early decline of translational activity may be a result of decreasing free magnesium levels in the assays. Magnesium is of primary importance in cellular function because only the Mg^{2+} -adenylate complex forms the true substrate with most enzymes (Aikawa 1981; Pörtner 1990). Furthermore, it plays an important role in the stability and activity of the components of cell-free systems (Araya and Krauskopf 1976; Amthauer and Krauskopf 1979). According to some authors, progressively enhanced Mg^{2+} complexation in cell-free systems during the course of in vitro protein synthesis induces a halt of protein synthesis (Giannakouros and Georgatos 1988; Kim and Swartz 2000). A deprivation below a threshold value results in a decrease of translation efficiency. By addition of exogenous ATP to the assay, some free magnesium ions will be bound to ATP. A bigger loss of free magnesium occurs by generation of the insoluble magnesium ammonium phosphate hexahydrate (Stratful et al. 2001). Ammonium was introduced via the addition of arginine kinase, which was stabilised in suspension with $(NH_4)_2SO_4$ buffer. The liberation of phosphate due to protein synthesis or other reactions in the assay likely stimulated precipitation of $MgNH_4PO_4 \cdot 6H_2O$. As phospho-L-arginine was consumed, inorganic phosphate should have been produced in similar quantities, but a large fraction of the expected free phosphate was missing in assays conducted with either of the pectinid lysates (data not shown), likely due to magnesium precipitation.

Calculation of the Energetic Costs

One technical problem to calculate the energetic costs of protein synthesis was the high proportion of other energy-consuming processes by using crude cell-free systems. Therefore, it was important to accurately differentiate between the energy demand of protein synthesis and energy consumed by other reactions. This was achieved by total inhibition of protein synthesis by pancreatic ribonuclease A (RNase A). The basic assumptions accepted in this study are as follows: first, RNase A should have no effect on energy-dependent reactions other than protein synthesis; second, when the formation of peptide bond synthesis ceases, amino acid acylation must not proceed.

RNase A is a highly specific endonuclease for single-stranded RNA and splits the bond of the phosphate residue at C-3' in a pyrimidine nucleotide to C-5' in the next nucleotide in sequence (for review, see Davidson 1972; Raines 1998). Since the single-stranded 3' end of all tRNAs terminates with the sequence CCA, with the terminal A being the point of covalent attachment of the amino acid, amino acylation is arrested immediately after addition of RNase A. The detachment of radioactive Phe from tRNA after inhibition of protein synthesis was also ensured by RNase A and was essential because Phe-tRNA otherwise precipitates onto the GFC filters and leads to an overestimation of the protein synthesis rate and, thus, an underestimation of the energetic costs for protein synthesis.

Furthermore, the tRNA population in the lysates should be completely acylated when starting the in vitro translation so that tRNAs are only newly acylated when amino acids are incorporated into protein. This precondition is very likely met because amino acylation is a highly exogenous, almost irreversible reaction. Allen et al. (1969) suggested that the tRNA population in rat liver was nearly 100% aminoacylated even in starving animals. Shenoy and Rogers (1977, 1978) reached a similar conclusion.

Comparison of the Two Species

There was no significant difference in the energetic costs of protein synthesis between in vitro cell-free systems of gill lysates of the cold stenothermal *A. colbecki* and the eurythermal *A.*

opercularis, indicating that there are no major differences in the efficiency of the translation machinery. The energetic costs specified for protein synthesis in gill lysates of *A. colbecki* almost correspond with the generally accepted theoretical value of four energy equivalents per peptide bond, whereas the value for gill lysates of *A. opercularis* was slightly higher. The theoretical costs result from two ATPs required for activation of each amino acid and an additional two GTPs needed for each peptide bond formation (Haselkorn and Rothman-Denes 1973; Aoyagi et al. 1988; Weijland and Parmeggiani 1993), including peptide bond synthesis and translocation. Some authors even assume a cost of five ATP equivalents per peptide bond, with the additional ATP used for unknown costs such as production of RNA or amino acid transport (Waterlow et al. 1978a, 1978b; Reeds et al. 1985). These costs are irrelevant in the in vitro translation assay because the RNA pool remains unchanged and amino acid transport is not involved.

It has to be considered, however, that, in addition to amino acylation and elongation, there are other energy-consuming reactions associated with the synthesis of polypeptides in vitro and in vivo, such as translation initiation and termination and, furthermore, the posttranslational modification of newly synthesised polypeptide chains. These events might differ between the examined pectinid species. The migration of 40S ribosomal subunits on mRNA and formation of ternary complexes has been demonstrated to be ATP dependent (Kozak 1980; Tahara et al. 1983), but the exact stoichiometry of ATP hydrolysis per initiation event remains enigmatic. Jackson (1991) demonstrated that the use of ATP for the formation of the initiation complex differed quite substantially between different mRNAs. Higher energy requirements per peptide bond due to initiation and termination will be more significant if only short polypeptides are synthesised de novo and terminated in due course. Costs for initiation will also be more preponderant if polypeptide synthesis has not been finished in vitro. There might be differences between the cell-free translation systems of the two pectinids in the capacity to initiate translation. Moreno et al. (1991) found that 45%–60% of the incorporation of radioactive amino acid into protein in a cell-free system from *Artemia* embryos was due to new initiation and the rest was due to elongation of preformed polypeptide chains. The amount of existing polysomes in the lysates might differ. Therefore, costs for initiation become minimal at higher levels of preformed polysomes in the lysates.

In assays capable of synthesising protein, posttranslational phosphorylation will occur to some extent. In animal cells, serine, threonine, and tyrosine are the amino acids subject to phosphorylation. Serine and threonine contents in gill protein of both species were found to be equal, but tyrosine content was significantly higher in gill protein of *A. opercularis* compared with gill protein of *A. colbecki*. The importance of tyrosine phosphorylation is profound. As an example, the activity of

numerous growth factor receptors is controlled by tyrosine phosphorylation.

As a corollary, further improvement of the presented approach might result from the use of specific inhibitors of initiation. Further inhibitors might minimise the high proportion of energy-consuming processes other than protein synthesis (Moreno et al. 1991).

Overall, our observation of similar stoichiometries in the two species and the fact that these are close to theoretical values for peptide bond formation indicate that the costs of initiation and phosphorylation represent only a small fraction of the total costs of protein synthesis. The slightly higher value for the energetic costs of protein synthesis predicted for *A. opercularis* compared with the theoretical value might involve a higher initiation capacity of the lysates combined with the de novo synthesis and termination of only short polypeptides as well as a higher level of posttranslational phosphorylation.

In this study, there was no evidence that the cost of protein synthesis in the cold stenothermal *A. colbecki* is as high as calculated for an Antarctic isopod (Whiteley et al. 1996) or as elusively low as determined for Antarctic sea urchin embryos (Marsh et al. 2001) when compared with confamilial species living in warmer waters. Analysis of the contribution of protein synthesis to metabolic rate or overall oxygen consumption and the estimation of associated energetic costs appear to produce very imprecise results, regardless of which method will be used. Respiration represents a summation of many processes, including protein turnover, ion pump activity, basal metabolism, and reproduction. Protein turnover in turn includes protein synthesis as well as degradation, RNA turnover, amino acid transport, and metabolic regulation. All of these processes may react differently to temperature; thus, misinterpretations appear possible. For precise estimates of the energy requirements of protein synthesis, separate analysis of this process appears preferable.

In summary, low protein turnover rates seen in many polar stenotherms indicate that cold adaptation presumably occurs at the level of increased protein stability but at no increase in stoichiometric costs. However, the capacity of translation is significantly cold compensated. The validity of these results remains to be tested in other ectotherms adapted to different environmental temperature regimes.

Acknowledgments

We wish to thank the staff of the Station Biologique de Roscoff for fishing and aquarium maintenance of *Aequipecten opercularis*. This work was partly supported by the Italian research programme Progetto Nazionale Ricerche in Antartide. We are grateful for the fantastic Italian hospitality at Terra Nova Bay, and we are especially grateful to Riccardo Cattaneo Vietti for inviting us to collaborate in his project, Chiara Chiantore, and

to the technical staff for their support in Antarctica and for supplying Antarctic scallops. Iris Hardewig and Olaf Heilmayer helped during several aspects of the study.

Literature Cited

- Aikawa J.K. 1981. Magnesium: Its Biological Significance. CRC, Boca Raton, Fla.
- Allen R.E., P.L. Raines, and D.M. Regen. 1969. Regulatory significance of transfer RNA charging levels. I. Measurements of charging levels in livers of chow-fed rats, fasting rats, and rats fed balanced or imbalanced mixtures of amino acids. *Biochim Biophys Acta* 190:323–336.
- Amthauer R. and M. Krauskopf. 1979. Studies on fish liver protein synthesis. III. Activity of carp liver polyribosomes in a homologous cell-free system. *Comp Biochem Physiol B* 62: 231–236.
- Aoyagi Y., I. Tasaki, J. Okumura, and T. Muramatsu. 1988. Energy cost of whole-body protein synthesis measured in vivo in chicks. *Comp Biochem Physiol A* 91:765–768.
- Araya A. and M. Krauskopf. 1976. Studies on fish liver protein synthesis. II. Factors influencing the aminoacylation of shark liver transfer ribonucleic acid. *Acta Physiol Latinoam* 26: 97–105.
- Ashford A.J. and V.M. Pain. 1986. Effect of diabetes on the rates of synthesis and degradation of ribosomes in rat muscle and liver in vivo. *J Biol Chem* 261:4059–4065.
- Berkman P.A. 1990. The population biology of the Antarctic scallop, *Adamussium colbecki* (Smith) at New Harbor, Ross Sea. Pp. 281–288 in K.R. Kerry and G. Hempel, eds. *Antarctic Ecosystems: Ecological Change and Conservation*. Springer, Berlin.
- Brosnan M.E., D.R. Myron, L.A. Feltham, and B.H. Sells. 1976. Comparison of the temperature sensitivity of protein synthesis by cell-free systems from liver of rat and skate (*Raja ocellata*). *Biochim Biophys Acta* 447:360–374.
- Buttery P.J. and K.N. Boorman. 1976. The energetic efficiency of amino acid metabolism. Pp. 197–206 in D.J.A. Cole, K.N. Boorman, P.J. Buttery, D. Lewis, R.J. Neal, and H. Swan, eds. *Protein Metabolism and Nutrition*. Butterworths, London.
- Cameron J.N. 1989. Acid-base homeostasis: past and present perspective. *Physiol Zool* 62:845–865.
- Canapa A., M. Barucca, A. Marinelli, and E. Olmo. 2000. Molecular data from the 16S rRNA gene for the phylogeny of Pectinidae (Mollusca: Bivalvia). *J Mol Evol* 50:93–97.
- Casey T.M., K.G. Duffall, and P.G. Arthur. 1999. An improved capillary electrophoresis method for measuring tissue metabolites associated with cellular energy state. *Eur J Biochem* 261:740–745.
- Chapelle G. and L.S. Peck. 1995. The influence of acclimation and substratum on the metabolism of the Antarctic amphipods *Waldeckia obesa* (Chevreux 1905) and *Bovallia gigantea* (Pfeffer 1808). *Polar Biol* 15:225–232.
- Chiantore M., R. Cattaneo-Vietti, P.A. Berkman, M. Nigro, M.V.S. Schiaparelli, and G. Albertelli. 2001. Antarctic scallop (*Adamussium colbecki*) spatial population variability along the Victoria Land coast, Antarctica. *Polar Biol* 24:139–143.
- Clarke A. 1991. What is cold adaptation and how should we measure it? *Am Zool* 31:81–92.
- Clarke A. and N.M. Johnston 1999. Scaling of metabolic rate with body mass and temperature in teleost fish. *J Anim Ecol* 68:893–905.
- Davidson J.N. 1972. Nucleases and related enzymes. Pp. 183–214 in J.N. Davidson, ed. *The Biochemistry of the Nucleic Acids*. 7th ed. Cox & Wyman, Fakenham, Norfolk, Great Britain.
- Evans W.R. 1971. The effect of cycloheximide on membrane transport in *Euglena*: a comparative study with nigericin. *J Biol Chem* 246:6144–6151.
- Fuery C.J., P.C. Withers, and M. Guppy. 1998. Protein synthesis in the liver of *Bufo marinus*: cost and contribution to oxygen consumption. *Comp Biochem Physiol A* 119:459–467.
- Garlick P.J., M.A. McNurlan, and V.R. Preedy. 1980. A rapid and convenient technique for measuring the rate of protein synthesis in tissues by injection of [3H] phenylalanine. *Biochem J* 192:719–723.
- Gasparini S. and C. Audit. 2000. The free guanidine and polyamine pools of bivalve molluscs in relation to their ecology. *Biochem Syst Ecol* 28:209–218.
- Giannakouros T. and J.G. Georgatsos. 1988. A high-yield cell-free system of protein synthesis of mouse liver. *Int J Biochem* 20:511–519.
- Giannakouros T., H. Nikolakaki, and J.G. Georgatsos 1990. Concentration-dependent effects of natural polyamines on peptide chain initiation and elongation in a cell-free system of protein synthesis. *Mol Cell Biochem* 99:9–19.
- Haschemeyer A.E.V. and R.C. Williams, Jr. 1982. Temperature dependency of cell-free protein synthetic systems from Antarctic fish. *Mar Biol Lett* 3:81–88.
- Haselkorn R. and L.B. Rothman-Denes. 1973. Protein synthesis. *Annu Rev Biochem* 42:397–438.
- Hofmann G.E. and S.C. Hand. 1994. Global arrest of translation during invertebrate quiescence. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 8492–8496.
- Holeton G.F. 1974. Metabolic cold adaptation of polar fish: fact or artefact. *Physiol Zool* 47:137–152.
- Jackson R.J. 1982. The cytoplasmic control of protein synthesis. Pp. 363–418 in R. Pérez-Bercoff, ed. *Protein Biosynthesis in Eukaryotes*. Plenum, New York.
- . 1991. The ATP requirement for initiation of eukaryotic translation varies according to the mRNA species. *Eur J Biochem* 200:285–294.
- Kang S.H., T.J. Oh, R.G. Kim, T.J. Kang, S.H. Hwang, E.Y. Lee, and C.Y. Choi. 2000. An efficient cell-free protein synthesis system using periplasmic phosphatase-removed S30 extract. *J Microbiol Methods* 43:91–96.

- Kawarasaki Y., T. Kawai, H. Nakano, and T. Yamane. 1995. A long-lived batch reaction system of cell-free protein synthesis. *Anal Biochem* 226:320–324.
- Kawarasaki Y., H. Nakano, and T. Yamane. 1998. Phosphatase-immunodepleted cell-free protein synthesis system. *J Biotechnol* 61:199–208.
- Kim D.M. and J.R. Swartz. 2000. Prolonging cell-free protein synthesis by selective reagent additions. *Biotechnol Prog* 16: 385–390.
- Kozak M. 1980. Role of ATP in binding and migration of 40S ribosomal subunits. *Cell* 22:459–467.
- Lopo A.C., C.C. Lashbrook, and J.W. Hershey. 1989. Characterization of translation systems in vitro from three developmental stages of *Strongylocentrotus purpuratus*. *Biochem J* 258:553–561.
- Lyndon A.R. and D.F. Houlihan. 1998. Gill protein turnover: costs of adaptation. *Comp Biochem Physiol A* 119:27–34.
- Marsh A.G., R.E. Maxson, Jr., and D.T. Manahan. 2001. High macromolecular synthesis with low metabolic cost in Antarctic sea urchin embryos. *Science* 291:1950–1952.
- Monnier A., J. Morales, P. Cormier, S. Boulben, R. Belle, and O. Mulner-Lorillon. 2001. Protein translation during early cell divisions of sea urchin embryos regulated at the level of polypeptide chain elongation and highly sensitive to natural polyamines. *Zygote* 9:229–236.
- Moreno A., R. Mendez, and C. de Haro. 1991. Characterization of cell-free protein-synthesis systems from undeveloped and developing *Artemia* embryos. *Biochem J* 276:809–816.
- Munro H.N. and A. Fleck. 1966. Recent developments in the measurement of nucleic acids in biological materials: a supplementary review. *Analyst* 91:78–88.
- Nakano H., T. Tanaka, Y. Kawarasaki, and T. Yamane. 1996. Highly productive cell-free protein synthesis system using condensed wheat-germ extract. *J Biotechnol* 46:275–282.
- Patnaik R. and J.R. Swartz. 1998. *E. coli*-based in vitro transcription/translation: in vivo-specific synthesis rates and high yields in a batch system. *Biotechniques* 24:862–868.
- Peck L.S., A. Clarke, and L.J. Holmes. 1987. Summer metabolism and seasonal changes in biochemical composition of the Antarctic brachiopod *Liothyrella uva* (Broderip 1833). *J Exp Mar Biol Ecol* 114:85–97.
- Pörtner H.O. 1990. Determination of intracellular buffer values after metabolic inhibition by fluoride and nitrilotriacetic acid. *Respir Physiol* 81:275–288.
- Raines R.T. 1998. Ribonuclease A. *Chem Rev* 98:1045–1066.
- Ralph R. and J.G.H. Maxwell. 1977a. Growth of two Antarctic lamellibranches: *Adamussium colbecki* and *Laternula elliptica*. *Mar Biol* 42:171–175.
- . 1977b. The oxygen consumption of the Antarctic limpet *Nacella (Patinigera) concinna*. *Bull Br Antarct Surv* 45: 19–23.
- Reeds P.J., M.F. Fuller, and B.A. Nicholson. 1985. Metabolic basis of energy expenditure with particular reference to protein. Pp. 46–57 in J.S. Garrow and D. Halliday, eds. *Substrate and Energy Metabolism*. John Libbey, London.
- Reilly C., G.F. Fuhrmann, and A. Rethstein. 1970. The inhibition of K⁺ and phosphate uptake in yeast by cycloheximide. *Biochim Biophys Acta* 203:583–585.
- Scholander P.F., W. Flagg, V. Walters, and L. Irving. 1953. Climatic adaptation in arctic and tropical poikilotherms. *Physiol Zool* 26:67–69.
- Shenoy S.T. and Q.R. Rogers. 1977. Effect of starvation on the charging levels of transfer ribonucleic acid and total acceptor capacity in rat liver. *Biochim Biophys Acta* 476:218–227.
- . 1978. Effect of dietary amino acids on transfer ribonucleic acid charging levels in rat liver. *J Nutr* 108:1412–1421.
- Simon E. 1987. Effect of acclimation temperature on the elongation step of protein synthesis in different organs of rainbow trout. *J Comp Physiol B* 157:201–207.
- Spirin A.S., V.I. Baranov, L.A. Ryabova, S.Y. Ovodov, and Y.B. Alakhov. 1988. A continuous cell-free translation system capable of producing polypeptides in high yield. *Science* 242: 1162–1164.
- Stockton W.L. 1984. The biology and ecology of the epifaunal scallop *Adamussium colbecki* on the west side of McMurdo Sound, Antarctica. *Mar Biol* 78:171–178.
- Stratful I., M.D. Scrimshaw, and J.N. Lester. 2001. Conditions influencing the precipitation of magnesium ammonium phosphate. *Water Res* 35:4191–4199.
- Tahara S.M., M.A. Morgan, and A.J. Shatkin. 1983. Binding of inosine-substituted mRNA to reticulocyte ribosomes and eukaryotic initiation factors 4A and 4B requires ATP. *J Biol Chem* 258:11350–11353.
- Waterlow J.C., P.J. Garlick, and D.J. Millward. 1978a. Basic concepts. Pp. 179–225 in J.C. Waterlow, P.J. Garlick, and D.J. Millward, eds. *Protein Turnover in Mammalian Tissues and in the Whole Body*. North-Holland, Amsterdam.
- . 1978b. Protein turnover in the whole body and in the whole tissue. Pp. 444–476 in J.C. Waterlow, P.J. Garlick, and D.J. Millward, eds. *Protein Turnover in Mammalian Tissues and in the Whole Body*. North-Holland, Amsterdam.
- Waterlow J.C. and D.J. Millward. 1989. Energy cost of turnover of protein and other cellular constituents. Pp. 277–282 in W. Wieser and E. Gnaiger, eds. *Energy Transformation in Cells and Organisms*. Thieme, Stuttgart.
- Weijland A. and A. Parmeggiani. 1993. Toward a model for the interaction between elongation factor Tu and the ribosome. *Science* 259:1311–1314.
- White M.G. 1975. Oxygen consumption and nitrogen excretion by the giant Antarctic isopod *Glyptonotus antarcticus* (Eights) in relation to cold-adapted metabolism in marine polar poikilotherms. Pp. 707–724 in H. Barnes, ed. *Ninth European Marine Biology Symposium*. University Press, Aberdeen.
- Whiteley N.M., E.W. Taylor, and A.J. el Haj. 1996. A comparison of the metabolic cost of protein synthesis in stenother-

- mal and eurythermal isopod crustaceans. *Am J Physiol* 271: R1295–R1303.
- Wieser W. and G. Krumschnabel. 2001. Hierarchies of ATP-consuming processes: direct compared with indirect measurements, and comparative aspects. *Biochem J* 355:389–395.
- Wohlschlag D.E. 1960. Metabolism of an Antarctic fish and the phenomenon of cold adaptation. *Ecology* 41:287–292.
- Wollenberger A.O., O. Ristau, and G. Schoffa. 1960. Eine einfache Technik der extrem schnellen Abkühlung grosser Gewebestücke. *Pflueg Arch Eur J Physiol* 270:399–412.

Publikation II

In vitro protein synthesis capacities in a cold stenothermal
and a temperate eurythermal pectinid

D. Storch, O. Heilmayer, I. Hardewig und H.-O. Pörtner

(2003)

Journal of Comparative Physiology B

173: 611-620

D. Storch · O. Heilmayer · I. Hardewig · H.-O. Pörtner

In vitro protein synthesis capacities in a cold stenothermal and a temperate eurythermal pectinid

Accepted: 13 June 2003 / Published online: 6 August 2003
 © Springer-Verlag 2003

Abstract The translational system was isolated from the gills of the Antarctic scallop *Adamussium colbecki* (Smith) and the European scallop *Aequipecten opercularis* (Linnaeus) for in vitro protein synthesis capacities ($\mu\text{g protein mg FW}^{-1} \text{ day}^{-1}$) and the translational capacities of RNA ($k_{\text{RNA in vitro}}$ $\text{mg protein mg RNA}^{-1} \text{ day}^{-1}$). In vitro protein synthesis capacity in the cold-adapted pectinid at 0 °C was similar to the one found in the temperate scallop at 25 °C. These findings might reflect cold compensated rates in *Adamussium colbecki*, partly explainable by high tissue levels of RNA. Cold-compensated in vitro protein synthesis capacities may further result from increments in the translational capacity of RNA. The thermal sensitivity of the translation machinery was slightly different in the two species, with significantly lower levels of Arrhenius activation energies E_a and Q_{10} in *Adamussium colbecki* in the temperature range 0–15 °C. Reduced protein synthesis and translational capacities were found in vitro in gills of long-term aquarium-maintained *Adamussium colbecki* and were accounted for by a loss of protein synthesis machinery, i.e. a reduction in RNA levels, as well as a decrease in the amount of protein synthesized per milligram of RNA (RNA translational capacity, $k_{\text{RNA in vitro}}$). Such changes may involve food uptake or mirror metabolic depression strategies, like those occurring during winter. Consequences of high in vitro RNA translational capacities found in the permanently cold-adapted species are discussed in the context of seasonal food availability and growth rates at high latitudes.

Keywords Protein synthesis · Translational capacity · Translational efficiency · Cold adaptation · Pectinids

Abbreviations *DPM* disintegrations per minute · *DTT* dithiothreitol · E_a Arrhenius activation energy · k_s fractional protein synthesis rate · $k_{\text{RNA in vivo}}$ translational efficiency · $k_{\text{RNA in vitro}}$ translational capacity · *PCA* perchloric acid · *Phe* phenylalanine · *PLA* phospho-L-arginine · *PSU* practical salinity units · *RNAse* ribonuclease · *TCA* trichloroacetic acid

Introduction

Psychrophiles have successfully colonized the year-round cold waters of Antarctica and are able to grow efficiently at sub-zero temperatures. Nonetheless, mean annual growth rates are low compared to temperate ectotherms (Brey and Clarke 1993). A vast array of structural and physiological adjustments is required to counteract the reduction in chemical reaction rates due to low temperature and to ensure matching of the processes of energy production and consumption including those of growth, muscular activity and reproduction. One major component of basal processes is protein turnover (Hawkins 1991). Protein synthesis balances routine protein degradation with a significant net production during growth and, otherwise, comprises a significant fraction of maintenance metabolism in terms of protein turnover. Protein synthesis is energetically expensive, regardless of temperature (Storch and Pörtner 2003). Thus, the regulation of protein turnover and synthesis rates is of utmost importance especially in cold-adapted ectotherms at low rates of oxygen consumption and, consequently, low energy turnover.

Whole body protein synthesis has been shown to reach similar maximum rates in cold-adapted species compared to their temperate congeners (Whiteley et al. 1996; Marsh et al. 2001; Fraser et al. 2002). Whole body

Communicated by G. Heldmaier

D. Storch · O. Heilmayer · H.-O. Pörtner (✉)
 Benthic Systems, Ecophysiology and Ecotoxicology,
 Alfred Wegener Institute for Polar and Marine Research,
 Columbusstraße, D-27568 Bremerhaven, Germany
 E-mail: hpoertner@awi-bremerhaven.de
 Fax: +49-471-48311149

I. Hardewig
 Leibniz-Institute of Freshwater Ecology and Inland Fisheries,
 Müggelseedamm 301, 12561 Berlin, Germany

protein synthesis is a summation of synthesis rates in various tissues, which differ widely in protein turnover and metabolic rate. In fish and a few invertebrates examined to date, gills are among those tissues with very high turnover rates and low protein retention efficiencies, whereas muscle is characterized by low turnover rates and high protein retention efficiencies (Houlihan et al. 1986; Houlihan 1991).

Recent work suggests that ectotherms living at low temperatures maintain considerably elevated tissue RNA:protein ratios due to increased RNA levels. Such high ratios in cold-adapted ectotherms have been interpreted to compensate for a cold-induced reduction in RNA translational efficiency in vivo ($k_{\text{RNA in vivo}}$) (Whiteley et al. 1996; Robertson et al. 2001; Fraser et al. 2002). In Antarctic sea urchin embryos, elevated levels of mRNA and whole-cell RNA were suggested to enable their high protein turnover rates, equivalent to those in temperate zone sea urchin embryos (Marsh et al. 2001). These suggestions also imply that in vivo translational efficiency, defined as in vivo protein synthesis per unit RNA ($k_{\text{RNA in vivo}}$), is reduced because of the temperature-induced reduction in individual biochemical processes involved in protein synthesis. In this context, it is of interest whether synthesis and maintenance of higher RNA levels to counteract the negative effect of cold temperatures on translational activity result in higher costs of protein synthesis. Alternatively, an increased RNA content in cold-adapted ectotherms may just be the result of low RNA turnover rates. In any case, a cold-adapted RNA translation apparatus with enhanced catalytic efficiencies would support increased cost-efficiency, however, it is unclear whether such a cold-compensated translation system on top of increased RNA levels exists.

In the present study we isolated the translational system from the gills of the Antarctic scallop *Adamussium colbecki* (Smith) under different nutritional conditions, and from the European scallop *Aequipecten opercularis* (Linnaeus). Our aim was to determine the translational capacity ($k_{\text{RNA in vitro}}$) of the protein synthesis machineries of marine invertebrates adapted to different ambient temperatures, using an optimized in vitro cell-free system simulating physiological conditions (Storch and Pörtner 2003). The in vitro system enabled us to study the effect of temperature and nutritional status on protein synthesis capacities under conditions of unrestricted energy availability and amino acid supply in the assay. The measurement of in vitro amino acid incorporation is a far more sensitive and immediate indicator for RNA translational capacity than the RNA:protein ratio measured in vivo (Lied et al. 1985; Houlihan 1991). For maximum rates and high signal-to-noise ratios, the translational system was isolated from the gills. To our knowledge, this is the first quantitative study to investigate the RNA translational capacities of the protein synthesis machinery in vitro and to contrast the respective findings in a permanently cold-adapted ectotherm and a temperate ectotherm.

For this study, we chose two species from the pectinid family, the cold stenothermal *Adamussium colbecki* from the Antarctic Ross Sea and the temperate eurythermal *Aequipecten opercularis* from the British channel. Both *Adamussium colbecki* and *Aequipecten opercularis* represent key species in their respective habitats. *Adamussium colbecki* experiences constant annual temperatures ranging between -1.8°C and 2.5°C , whereas *Aequipecten opercularis* covers a broader temperature range of between 8°C and 24°C . Other temperate species (e.g. *Pecten maximus*) are more closely related to *Adamussium colbecki* (Canapa et al. 2000); however, the mode of life of *Adamussium colbecki* resembles more closely that of *Aequipecten opercularis* (epibenthic filter feeding, spontaneous and escape activity cycles), albeit at significantly lower levels of energy expenditure in *Adamussium colbecki* (Heilmayer and Brey 2003; Heilmayer et al. 2004). For cellular design and functional capacity, the similarity in lifestyle in different environments appears as crucial for such comparisons as close phylogenetic relationship, especially in the light of 20 million years of progressive cooling of Antarctic waters and the long standing geographic isolation of Antarctic species (Bailey et al. 2003). Accordingly, different protein synthesis capacities in species from Antarctic and temperate latitudes may reflect general cellular design constraints in the permanent cold (Pörtner 2002).

Our results demonstrate that translation capacity in the cold-adapted pectinid at 0°C exhibits cold compensation. The in vitro RNA translational capacities and overall protein synthesis capacities measured in this study are discussed in the context of energy turnover and the nutritional state of ectotherms inhabiting different latitudes and temperature regimes.

Materials and methods

Animals

Aequipecten opercularis of 4.30 ± 0.15 cm shell length and 4.28 ± 0.13 cm height were provided by the "Station Biologique de Roscoff". They were caught at 80-m water depths by dredging around Roscoff (France) in October 1999. Animals were kept in oxygenated, cooled seawater and returned by car to the Alfred Wegener Institute (AWI). There they were kept in well-aerated, re-circulated seawater at $10 \pm 1^{\circ}\text{C}$ and 34 practical salinity units (PSU) for at least 6 days prior to experimentation. *Adamussium colbecki* of 4.42 ± 0.21 cm shell length and 4.65 ± 0.17 cm height were collected by dredging from 50–80-m water depth near Terra Nova Bay (Antarctica) in February 2000. They were maintained in running seawater aquaria at $0.0 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ and 34 PSU at Terra Nova Bay station for 6 days prior to experimentation. Some of the animals were returned by plane to the AWI in insulated cooling boxes and plastic bags filled with oxygenated cold seawater and a layer of pure oxygen. During the whole transport the boxes were kept in an airfreight container at a constant temperature of $0 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$. At the Institute animals were kept in well-aerated seawater at $0.0 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ and 34 PSU and were fed twice a week with dissolved plankton tablets ($0.01 \text{ g C m}^{-2} \text{ ind}^{-1}$ per meal, HOBBY, Dohse Aquaristik). After 6 months aquarium maintenance, the same experiments were conducted as for freshly captured *Adamussium colbecki* and *Aequipecten opercularis*.

Preparation of gill lysates

The preparation of lysates from the gills of *Aequipecten opercularis* and of *Adamussium colbecki* followed the same procedure as detailed by Storch and Pörtner (2003) and will only briefly be outlined here. Gills of two animals were pooled to provide enough tissue for all measurements. Half of the combined tissue mass was freeze-clamped in liquid N₂ by means of a pre-cooled Wollenberger clamp (Wollenberger et al. 1960) for later examination of RNA and protein contents. The other half was immediately used for the preparation of the cell-free protein-synthesis system. Gill tissue was homogenized with a loosely fitting 2-ml glass homogenizer in 1 volume of ice-cold extraction buffer [containing 100 mM Hepes, 880 mM sucrose, 120 mM K-acetate, 10 mM Mg-acetate, 7 mM 2-mercaptoethanol, 30 mM dithiothreitol (DTT), adjusted to pH 7.13 at 25 °C]. The homogenate was centrifuged at 16,000 g for 30 min at 0 °C and the resulting post-mitochondrial supernatant was used as the lysate, which was kept on ice until the start of the in vitro translation assays to minimize destruction of RNA by endogenous ribonuclease (RNase). Aliquots of the lysates were frozen in liquid nitrogen for later determination of RNA and endogenous phenylalanine (Phe).

Cell-free in vitro translation assays

Protein synthesis rates were determined in vitro at four different temperatures. Lysates prepared from gills of recently captured *Adamussium colbecki* (0 °C, 5 °C, 10 °C, 15 °C) were measured at TNB station in Antarctica. Lysates prepared from gills of freshly captured *Aequipecten opercularis* (0 °C, 5 °C, 15 °C, 25 °C) and long-term maintained *Adamussium colbecki* (0 °C, 5 °C, 15 °C) were analysed at the AWI.

For measurements of the capacity of protein synthesis, translation assays were conducted under optimized, physiological conditions as described previously (Storch and Pörtner 2003). Incorporation of [2,3,4,5,6-³H] Phe into protein was measured as a function of time in 19- μ l samples from an incubation medium containing 30 μ l lysate 150 μ l⁻¹ and, on top of the ionic composition of the lysate, 100 mM Hepes buffer (sodium salt, adjusted to pH 7.13 at 25 °C), 85 mM taurine, 150 mM glycine, 120 mM potassium, 5 mM DTT, 0.2 mM spermidine, all amino acids except Phe at 0.1 mM, 8 μ M Phe (including 60 μ Ci [2,3,4,5,6-³H] Phe, Amersham, 116 Ci mmol⁻¹, 1 mCi = 37 MBq), 100 units RNasin Ribonuclease Inhibitor (Promega), 1 mM ATP, 0.5 mM GTP and for ATP regeneration 15 mM phospho-L-arginine (PLA) and 4.9 units arginine kinase to avoid a limitation of energy supply. Before starting the translation assay with 30 μ l lysate, the reaction mixture was pre-incubated for 5 min in a water bath set to the experimental temperature of 0 °C, 5 °C, 10 °C or 15 °C for freshly collected and long-term maintained *Adamussium colbecki* and of 0 °C, 5 °C, 15 °C or 25 °C for *Aequipecten opercularis*. After the addition of lysate, the assay was quickly subdivided into aliquots of 20 μ l and returned to the water bath set to the experimental temperature. Reactions were terminated by 2 μ l pancreatic RNase (25 units ml⁻¹), followed by an additional 5 min of incubation at 15 °C for *Adamussium colbecki* and 25 °C for *Aequipecten opercularis* to ensure a quick halt of the protein synthesis. Subsequently, 19- μ l samples were pipetted onto Phe-saturated, semi-wet Whatman GF/C filters. Filters were immersed in ice-cold 10% trichloroacetic acid (TCA), containing 5 mM Phe, then washed once in 10% and twice in 5% ice-cold TCA. After a final rinse in 95% ethanol, the filters were allowed to dry in air before dissolving them in 5 ml scintillation cocktail (Packard, 57% tritium counting efficiency). Radioactivity in the precipitated protein was determined by liquid scintillation counting. A sham control, which permanently contained pancreatic RNase to prevent protein synthesis, was used to correct for background due to non-specific binding of [2,3,4,5,6-³H] Phe to components of the lysate. Results were expressed as [2,3,4,5,6-³H] Phe incorporated into TCA-precipitable protein [DPM 19 μ l assay⁻¹].

Analytical methods

Total RNA in lysates was hydrolysed by alkaline exposure according to the Schmidt-Tannhauser procedure and quantified by the dual-wavelength procedure of Munro and Fleck (1966). For relating RNA concentration to absorbance at these two wavelengths, the modified, more suitable formula, RNA (μ g ml⁻¹) = 32.9 × A₂₆₀ - 6.11 × A₂₃₂, was used as suggested by Ashford and Pain (1986). The free, endogenous Phe levels in lysates were measured by RP-HPLC in the lab "Dr. Haase-Aschoff" (Bad Kreuznach, Germany). For the determination of RNA and protein contents of gill, muscle, mantle and gonad, tissues were ground to a fine, homogeneous powder under liquid nitrogen using a pre-cooled mortar and pestle. Two 100-mg sub-samples of the resultant powder were homogenized in ice-cold 0.2 M perchloric acid (PCA). Homogenates were centrifuged at 16,000 g for 1 min at 0 °C and the remaining precipitate was washed twice in 0.2 M PCA.

Subsequently, the pellet was resuspended in 0.3 M NaOH and incubated for 1 h at 37 °C. Sub-samples (15 μ l) were taken for the determination of protein levels using a modified Lowry technique with bovine serum albumin as a standard (Sigma procedure no. P5656). Protein and DNA were then precipitated from the remaining alkali digest by the addition of ice-cold 20% PCA, and after centrifugation the resultant acid-soluble fraction was removed for the estimation of RNA levels by ultraviolet absorption at 232 nm and 260 nm as described above.

Derived parameters and statistics

Protein synthesis rates at the different experimental temperatures were determined using the initial, linear intercept of the time-dependent [2,3,4,5,6-³H] Phe incorporation curves. In order to compare in vitro incorporation rates in this study to in vivo and in vitro protein synthesis rates reported in the literature, protein synthesis rates were converted from disintegrations per minute (DPM; 19 μ l assay⁻¹ min⁻¹) via nanomoles Phe (19 μ l assay⁻¹ min⁻¹) into micrograms protein per fresh weight per day. Therefore, the specific radioactivity, expressed as Bq pmol Phe⁻¹ (1 DPM = 1/60 Bq), of each assay was calculated from the amount of added radioactive and non-radioactive Phe in the assay plus the measured endogenous free Phe of the lysates. Based on the total amino acid composition of gill protein, measured previously (Storch and Pörtner 2003), the ratio of the concentration of each amino acid to the Phe level in tissue protein from gills of both species was used to calculate the relationship between nanomoles of Phe incorporated and micrograms of protein synthesized. It was assumed that the ratios of amino acid over Phe levels in the protein remained unchanged between gills of freshly captured and long-term maintained *Adamussium colbecki*. The molecular weights of the respective amino acids were used in the conversion.

For comparison with in vivo data taken from the literature, protein synthesis rates were converted into fractional protein synthesis rates as usually determined in vivo (see Discussion). Fractional protein synthesis rates of gill tissues which indicate protein turnover (k_s; expressed as a percentage of the total gill protein synthesized per day), were calculated using the following equation:

$$k_s = \frac{\mu\text{g protein synthesized}}{\mu\text{g total protein}} \frac{19\mu\text{l assay}^{-1} \text{ day}^{-1}}{19\mu\text{l assay}^{-1}} \times 100$$

where μ g total protein is the protein content of the tissue used to prepare the lysate.

The maximum translational capacity of RNA determined in vitro (k_{RNA in vitro} expressed as milligrams protein per milligrams RNA per day) is comparable to the translational efficiency of RNA in vivo (k_{RNA in vivo}, also expressed as mg protein per mg RNA and day) and was calculated using the equation:

$$k_{\text{RNA in vitro}} = \frac{\text{mg protein synthesized}}{\text{mg RNA}} \frac{19\mu\text{l assay}^{-1} \text{ day}^{-1}}{19\mu\text{l assay}^{-1}}$$

614

The levels of Arrhenius activation energy (E_a) and Q_{10} were determined from an Arrhenius plot, i.e. $\log V_{\text{protein synthesis}}$ versus $1/T$ (K^{-1}). E_a values were expressed as E_a (kJ mol^{-1}) = $-R \cdot m \cdot 1000$ (modified by Segel 1976) where R is the gas constant ($\text{J mol}^{-1} \text{K}^{-1}$) and m is the slope of the Arrhenius plot.

All data are expressed as means \pm standard deviation ($\bar{X} \pm \text{SD}$) unless stated otherwise. Numbers (n) of determinations are given in figure legends. Prior to analysis, assumptions of normal distribution of the studied variables and homogeneity of variances were tested by use of Sigmaplot. If any of the assumptions was violated, the data were transformed by $(1/x)$ transformation, which resulted in significantly improved normality and homogeneity of variances. Statistical differences at the 5% level were tested using analysis of variance (ANOVA) followed by the Student-Newman-Keuls post hoc test.

Results

Characterization of gill lysates

RNA contents and endogenous Phe levels in lysates of fresh captured *Adamussium colbecki* (0.883 ± 0.037 mg RNA ml^{-1} ; 0.292 ± 0.046 mM Phe) were significantly higher than in lysates of freshly captured *Aequipecten opercularis* (0.468 ± 0.013 mg RNA ml^{-1} ; 0.111 ± 0.009 mM Phe). This indicates higher levels of RNA and endogenous Phe in the Antarctic species. RNA content in lysates of both species was $79 \pm 9\%$ of that observed in the tissue, which was 2.30 ± 0.13 $\mu\text{g mg}^{-1}$ gill tissue in *Adamussium colbecki* and 1.17 ± 0.17 $\mu\text{g mg}^{-1}$ gill tissue in *Aequipecten opercularis*. Thus it appears that there was a 20% loss of ribosomes during the preparation of the gill lysates.

During long-term aquarium maintenance the RNA content as well as the endogenous free Phe levels of *Adamussium colbecki* gills had decreased markedly (0.599 ± 0.062 mg RNA ml^{-1} ; 0.058 ± 0.015 mM Phe) after 6 months compared to freshly captured *Adamussium colbecki*. RNA contents declined to values still significantly higher compared to the RNA content in gills of *Aequipecten opercularis*, whereas Phe fell significantly below values measured in *Aequipecten opercularis*. These findings show the large variability of RNA and Phe contents in the gill tissue of *Adamussium colbecki* under different physiological conditions.

Characteristics of Phe incorporation

Phe incorporation into protein requires functioning of the complete protein synthesis machinery of the cell. The system used here mimics the buffering, osmotic and ionic properties of gill tissue. By using the post-mitochondrial supernatant in an optimized cell-free system (Storch and Pörtner 2003), the maximum protein synthesis rates and, thus, the protein synthesis capacity of gill lysates of both species can be studied under identical physiological conditions.

Figure 1 shows the time course for incorporation of $[2,3,4,5,6-^3\text{H}]$ Phe into TCA-precipitable material at

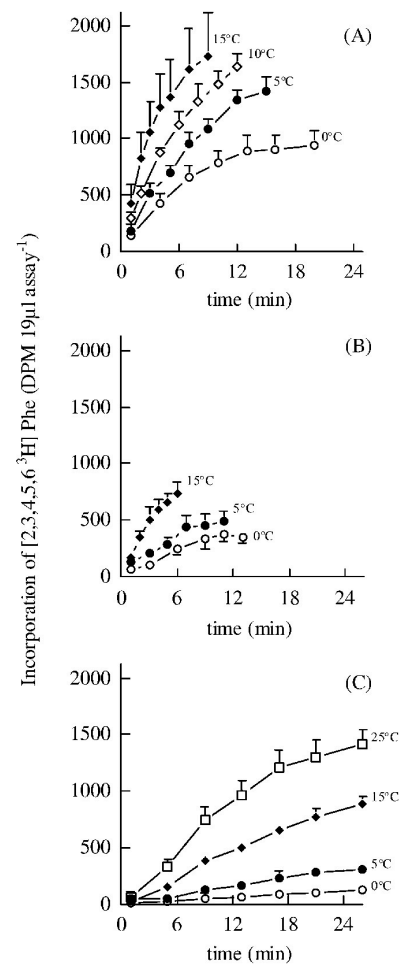


Fig. 1A–C Time course of incorporation of $[2,3,4,5,6-^3\text{H}]$ Phenylalanine (Phe) into trichloroacetic acid-precipitable protein at different temperatures by cell-free lysates prepared from gills of freshly captured *Adamussium colbecki* (A), of long-term maintained *Adamussium colbecki* (B) and of *Aequipecten opercularis* (C). 0 °C: unfilled circles; 5 °C: filled circles; 10 °C: unfilled rhombuses; 15 °C: filled rhombuses; 25 °C: unfilled squares. Data points are means \pm SE ($n = 6$ A, C; $n = 4$ B)

different temperatures by lysates prepared from freshly captured and long-term maintained *Adamussium colbecki* (Fig. 1A, B) and lysates prepared from *Aequipecten opercularis* (Fig. 1C). At all measured temperatures lysates prepared from both species exhibited the same characteristic time course of *in vitro* translation: a linear period of incorporation was followed by a progressive decrease of reaction velocity and approached completion in an asymptotic manner. There was a higher incorporation of Phe into protein at higher temperatures combined with an earlier slowing of the reaction. Short periods of linear incorporation in lysates are typical when compared to other non-reticulocyte cell-free systems (Hofmann and Hand 1994; Kim and Swartz 2000). Lysates prepared from freshly collected and long-term

Table 1 Characteristics of cell-free lysates prepared from gills of freshly captured *Aequipecten opercularis* and *Adamussium colbecki* (f) and from gills of *A. colbecki* long term maintained in the aquarium (m). All values are means \pm SD. (Phe phenylalanine)

Tissue	Species	Total RNA (mg ml ⁻¹)	Free Phe (mM)
Gill	<i>Aequipecten opercularis</i>	0.47 \pm 0.03 (n=6)	0.11 \pm 0.02 (n=5)
	<i>Adamussium colbecki</i> (f)	0.88 \pm 0.09 (n=6)	0.24 \pm 0.06 (n=5)
	<i>A. colbecki</i> (m)	0.60 \pm 0.06 (n=4)	0.06 \pm 0.02 (n=4)

maintained *Adamussium colbecki* exhibited constant rates of incorporation for the first 6–12 min depending on experimental temperature. However, a severe reduction of Phe incorporation velocity was observed in lysates prepared from long-term maintained *Adamussium colbecki* when compared to lysates of fresh animals. In contrast, Phe incorporation by lysates from *Aequipecten opercularis* displayed linear incorporation for longer periods. At 0 °C, 5 °C and 15 °C incorporation remained constant for 20–26 min and at 25 °C for about 17 min, followed by a progressive reduction.

In vitro protein synthesis and RNA translational capacity

Protein synthesis capacities and RNA translational capacities at different temperatures were calculated from initial Phe incorporation rates according to Fig. 1, adopting Phe and RNA concentrations compiled in Table 1. In vitro protein synthesis capacity in gill lysates increased significantly with temperature (Fig. 2A). Within the temperature range 0–15 °C, protein synthesis capacities increased with identical Q_{10} in freshly captured *Adamussium colbecki* ($Q_{10}=2.6\pm 0.5$) and long-term maintained *Adamussium colbecki* ($Q_{10}=2.2\pm 0.3$), whereas the temperature dependency was significantly higher in *Aequipecten opercularis* ($Q_{10}=3.4\pm 0.6$ between 0 °C and 15 °C). Accordingly, activation energies of protein synthesis were significantly higher in *Aequipecten opercularis* than in freshly captured *Adamussium colbecki* ($E_a=78.5\pm 9.8$ kJ mol⁻¹ versus $E_a=62.9\pm 11.3$ kJ mol⁻¹), whereas 6-month aquarium-maintained *Adamussium colbecki* ($E_a=49.5\pm 9.3$ kJ mol⁻¹) displayed significantly reduced E_a for in vitro protein synthesis.

Between 0 °C and 15 °C, the overall protein synthesis capacity was significantly higher in both freshly captured and long-term maintained *Adamussium colbecki*, compared to *Aequipecten opercularis*. The *Aequipecten* cell-free system displayed a very low rate of protein synthesis at 0 °C (0.6 ± 0.1 μ g protein mg⁻¹ FW day⁻¹) when compared to the 18-fold higher protein synthesis capacity in freshly captured *Adamussium colbecki* at 0 °C (10.4 ± 2.7 μ g protein mg⁻¹ FW day⁻¹), and the rate in *Aequipecten* was still 4.6-fold lower compared to 6-month aquarium-maintained *Adamussium colbecki* at 0 °C (2.7 ± 1.0 μ g protein mg⁻¹ FW day⁻¹).

At the respective habitat temperatures, protein synthesis capacities were still significantly lower in

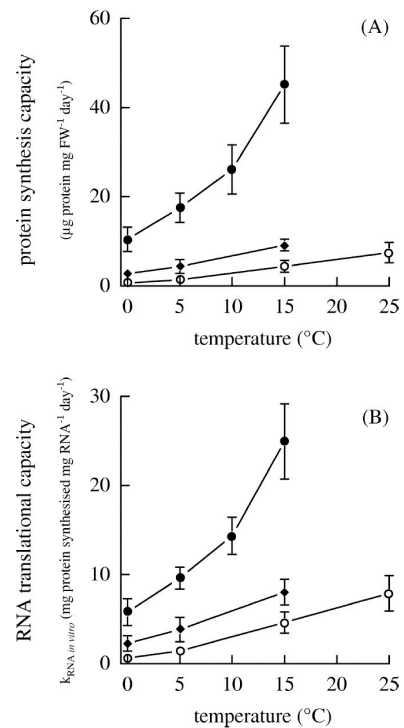


Fig. 2A–B Temperature-dependent in vitro protein synthesis capacities (A) and RNA translational capacities (k_{RNA} in vitro; B). filled circles: freshly captured *Adamussium colbecki*, filled rhombuses: long-term aquarium-maintained *Adamussium colbecki*, unfilled circles: *Aequipecten opercularis*. Data points are means \pm SD (freshly captured *Adamussium colbecki* and *Aequipecten opercularis*: n=6; long-term maintained *Adamussium colbecki*: n=4)

Aequipecten opercularis measured at 5 °C and 15 °C than in freshly captured *Adamussium colbecki* at 0 °C. Only when close to the upper temperature limit of 25 °C, was protein synthesis capacity in the gills of *Aequipecten opercularis* the same as in gills of *Adamussium colbecki* at 0 °C. Long-term aquarium-maintained *Adamussium colbecki* analysed at 0 °C still displayed rates within the same range as in *Aequipecten opercularis* measured at 15 °C.

The 18-fold higher in vitro protein synthesis capacities of *Adamussium colbecki* at 0 °C can mainly be explained by the nine-fold higher RNA translational capacity (Fig. 2B). The remaining discrepancy can be attributed to the two-fold difference in RNA contents in the lysate (Table 1). Thus, both high RNA contents and

high RNA translational capacities supported the high protein synthesis capacities observed in gill lysates of freshly captured *Adamussium colbecki*. The reduced RNA contents in gill lysates of long-term aquarium-maintained *Adamussium colbecki* as well as their reduced RNA translational capacity went hand in hand to support a markedly reduced protein synthesis capacity. Low protein synthesis capacities in gill lysates of *Aequipecten opercularis* were also related to even lower RNA contents and RNA translational capacities than in long-term maintained *Adamussium colbecki*.

RNA, protein and RNA:protein ratio

RNA and protein concentrations as well as RNA:protein ratios, were measured in three other tissues for an evaluation of protein synthesis capacities (Fig. 3). In fact all tissues analysed in freshly captured *Adamussium colbecki* showed significantly higher RNA:protein ratios

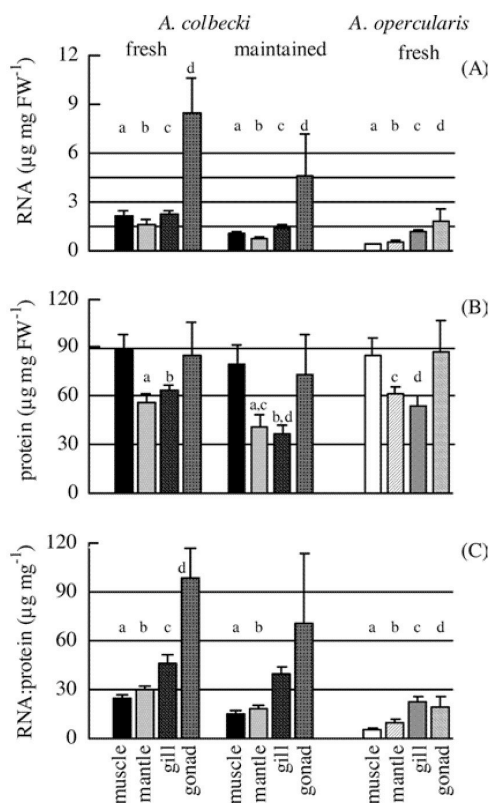


Fig. 3A–C RNA (A), protein (B) concentrations and RNA:protein ratios (C) in various tissues (muscle, mantle, gill, gonads) of freshly captured (four bars on the left), long-term aquarium-maintained *Adamussium colbecki* (center four bars) and of freshly collected *Aequipecten opercularis* (four bars on the right). Data points are means \pm SD (freshly captured and long-term maintained *Adamussium colbecki*: $n=8$; *Aequipecten opercularis*: $n=6$). Only the same tissues were tested for significant differences. Values with the same letter are significantly different

than those in *Aequipecten opercularis* (Fig. 3C) due to higher RNA concentrations (Fig. 3A) at similar protein contents (Fig. 3B). RNA contents were between two-fold higher in gills to five-fold higher in muscle and gonads of freshly captured *Adamussium colbecki* than in *Aequipecten opercularis*. The high protein turnover in gills (Lyndon and Houlihan 1998) is reflected in a high RNA:protein ratio in both species when compared to muscle and mantle. Muscle naturally shows very low protein turnover rates associated with high protein retention. This was indicated by significantly higher protein concentrations in the muscle compared to gills at similar levels of RNA contents ($2.14 \pm 0.29 \mu\text{g mg}^{-1}$ FW in muscle; $2.30 \pm 0.13 \mu\text{g mg}^{-1}$ FW in gill) of freshly captured *Adamussium colbecki*. This was even more evident in *Aequipecten opercularis* with significantly lower RNA contents in muscle ($0.43 \pm 0.03 \mu\text{g mg}^{-1}$ FW) compared to gill tissue ($1.17 \pm 0.17 \mu\text{g mg}^{-1}$ FW) at significantly higher protein contents in muscle tissue. Both RNA and protein concentrations, and thus the RNA:protein ratio, were generally high in the gonads, compared to other tissues but varied substantially between and within species, probably due to variable reproduction stages. These variations were not visible in the other tissues.

Adamussium colbecki maintained for 6 months in the aquarium displayed a marked loss of RNA from the tissues despite continued feeding. Loss of RNA varied between 37% in gills to 56% in mantle compared to freshly captured *Adamussium colbecki* but RNA contents were still significantly higher than in the respective tissues of *Aequipecten opercularis*. Only in mantle and gill were decreasing RNA levels accompanied by a significant decrease in protein concentration. The decrease in RNA levels of the mantle tissue exceeded the loss of protein by 29% whereas the losses of RNA and protein in gill tissue were approximately the same. In accordance with a large reduction in RNA concentration and a lesser fall in protein content, the mean RNA:protein ratio was also reduced in most tissues indicating that *Adamussium colbecki* sustained starvation for some period. The high loss of protein in gill tissue is in line with the high protein turnover rates generally observed in gills.

Discussion

Capacity of protein synthesis in vitro

One of the prime obstacles to the study of in vitro protein synthesis capacity is the poor protein synthesis rate of cell-free systems obtained from assays conducted under non-optimized experimental conditions. The inefficiency of translation is due to gross deviations from physiological conditions, loss of compounds essential for protein synthesis during lysate preparation and/or insufficient high-energy phosphate levels in the translational system. All of these limitations were likely

effective in the only existing study on a cell-free system prepared from an Antarctic ectotherm (Haschemeyer and Williams 1982). These authors prepared a cell-free protein synthesis system from liver of the Antarctic fish *Trematomus bernacchii*. They report an in vitro synthesis rate at 0 °C which was 1/1000th (0.004% liver protein synthesized per day) of that observed in vivo (Smith and Haschemeyer 1980). Gill lysates from *Adamussium colbecki* measured at 0 °C were 4,100-fold more active (16.4% gill protein synthesized per day) and gill lysates from *Aequipecten opercularis* measured at 15 °C 1,625-fold (6.5% gill protein synthesized per day) when compared to the early determinations of protein synthesis rates in the in vitro system of Antarctic fish liver. The 1,000 fold lower in vitro than in vivo protein synthesis rates in liver of *Trematomus bernacchii* (Haschemeyer and Williams 1982) and the order of magnitude by which the pectinid cell-free systems exceed the activity of the “*Trematomus*” cell-free system corroborate the view, that due to improved methodology, values obtained in the present study reflect the full capacity of the protein synthesis machinery. Productivity was probably maximized by using crude, postmitochondrial lysates. The loss of low molecular weight compounds required for protein synthesis was minimized. Full capacity was exploited by the addition of high-energy phosphates (Storch and Pörtner 2003; Spirin et al. 1988; Kim and Swartz 2000). This accomplishment enabled us to determine the true protein synthesis and RNA translational capacities in cell-free translation systems of the two pectinid species.

Temperature dependence of protein synthesis capacities

The isolated translation machinery and its endogenous mRNA level is a snapshot of the cell, which mirrors the previous history of the in vivo protein synthesis system. Reversible changes in translational activity have been observed in vivo in response to growth factors, animal size, change in nutrient supply and various stress conditions (reviewed in Houlihan 1991). Freshly collected animals from both species were assumed to be in similar physiological condition because they were captured during summer, with abundant food in their respective habitats.

Adamussium colbecki very clearly possess protein synthesis machineries with higher RNA levels and RNA translational capacities than *Aequipecten opercularis* from warmer habitats. Furthermore, activation energies and Q_{10} values of protein synthesis were lower in *Adamussium colbecki*. These observations may reflect temperature compensation and indicate maximized protein synthesis capacities, despite low energy turnover rates in the Antarctic species. In spite of the long evolutionary isolation of *Adamussium colbecki* in a low and narrow temperature range, there was no thermal deterioration of protein synthesis capacity up to 15 °C. Moreover, energetic costs of in vitro protein synthesis in

Adamussium colbecki and *Aequipecten opercularis* were found to be similar, at least for peptide elongation (Storch and Pörtner 2003). These patterns indicate that the principal characteristics and stoichiometries of protein synthesis (peptide bond formation, including tRNA acylation, initiation, elongation and termination) remained unchanged at significant lower levels of overall energy turnover which is due to stenothermal life in the permanent cold (Pörtner 2002).

Adaptation to low temperatures comprises increased RNA concentrations relative to protein content. This was found in all investigated tissues of *Adamussium colbecki* and seems to be a general phenomenon in cold-adapted ectotherms (Marsh et al. 2001; Fraser et al. 2002). However, translational activity was still found to be enhanced at low temperatures when corrected for different RNA contents. The high translational capacity of the ribosomes may result from functional optimization of the primary structures of core ribosome proteins and ribosome-associated proteins, such as initiation and elongation factors, as well as of the enzymes involved in protein synthesis. Examples for structural modifications indicative of thermal adaptation of the protein synthesis apparatus have been identified in several microorganisms (Ray et al. 1998; Thomas and Cavicchioli 2002). Increased activities of elongation factor EF-1 have been demonstrated in liver of Antarctic compared to temperate and tropical fish species (Haschemeyer and Williams 1982).

In vitro RNA translational capacity versus in vivo efficiency

Comparison of in vitro translational capacity of RNA with in vivo translational efficiency of RNA, requires careful definition of the two terms. The in vitro translational capacity reflects the topmost capacity of the ribosomes to synthesize protein indicated by the rate of in vitro protein synthesis per unit RNA. The RNA:protein ratio frequently determined in freshly collected tissues indirectly reflects this capacity in vivo but the extent to which this capacity is utilized, is indicated only by the rate of in vivo protein synthesis per unit RNA and is called translational efficiency ($k_{\text{RNA in vivo}}$; Waterlow et al. 1978; Houlihan 1991).

Table 2 summarizes existing in vivo data on gill protein synthesis (k_s), $k_{\text{RNA in vivo}}$ and RNA content of different species in relation to ambient temperature and feeding conditions. The in vitro data obtained in both pectinids at their ambient temperatures were included for a preliminary comparison of the two terms. The in vitro protein synthesis capacities determined in both pectinids exceed by far all values of in vivo efficiency determined in gill tissues of other ectotherms inhabiting various temperature environments. This global comparison suggests that actual in vivo protein synthesis rates remain far below capacity. Certainly, for a confirmation of this conclusion, in vivo protein synthesis should be measured in the two pectinids.

Table 2 Fractional rates of protein synthesis (k_s) in vivo, translational efficiency (k_{RNA} in vivo) and RNA content in gills of invertebrates and fish species (fasted and fed) adapted to different ambient temperatures. For a preliminary comparison, the in vitro data (k_{RNA} in vitro, translational capacity) obtained in the present study are

included and demonstrate excess capacity over in vivo rates. k_s fractional protein synthesis rate (% protein synthesized day⁻¹), k_{RNA} in vivo and in vitro (mg protein synthesized mg RNA⁻¹ day⁻¹), RNA (mg/gFW); FW fresh water. Numbers in parentheses are used as data point labels in Fig. 4

Species	Temperature (°C)	Gill k_s	k_{RNA}	RNA	Reference
Antarctic invertebrates					
<i>Adamussium colbecki</i> aquarium maintained	0	7.3	2.3	1.56	This paper (in vitro)
<i>Adamussium colbecki</i> fed	–	16.4	5.8	2.30	–
Antarctic fish					
<i>Trematomus bernacchii</i> fasted	–1.5	3.9	–	–	Smith and Haschemeyer (1980) (1)
<i>Trematomus bernacchii</i> fed	–	5.3	–	–	–
<i>Trematomus hansonii</i> fasted	–1.5	2.2	0.6	1.4	Smith and Haschemeyer (1980) (2)
<i>Trematomus hansonii</i> fed	–	3.2	1.3	1.6	–
<i>Trematomus newnesi</i>	–1.5	1.5	–	–	Smith and Haschemeyer (1980) (3)
<i>Gymnodraco acuticeps</i>	–1.5	1.3	–	–	Smith and Haschemeyer (1980) (4)
<i>Notothenia corriceps</i> fasted	2	2.9	–	–	Haschemeyer (1983)(5)
<i>Notothenia corriceps</i> fed	–	1.6	–	–	–
<i>Chaenocephalus aceratus</i> (Icefish)	2	0.85	–	–	Haschemeyer (1983) (6)
Temperate invertebrates					
<i>Aequipecten opercularis</i> fed	15	6.5	3.7	1.17	This paper (in vitro)
<i>Carcinus maenas</i> fasted	15	2.4	0.58	–	Houlihan et al. (1990b)(7)
<i>Carcinus maenas</i> fed	–	4.8	1.58	–	–
<i>Octopus vulgaris</i> fasted	22	2.96	0.61	–	Houlihan et al. (1990a)(8)
<i>Octopus vulgaris</i> fed	–	11.26	1.19	–	–
Temperate fish					
<i>Salmo gairdneri</i> (FW)	12	9.1	–	–	Houlihan et al. (1986)(9)
<i>Gadus morhua</i> fed	5	7.8	1.3	5.0	Foster et al. (1992) (10)
<i>Gadus morhua</i> fasted	15	8.8	1.5	3.8	–
<i>Oncorhynchus mykiss</i> fasted	15	6.44	1.63	–	McMillan and Houlihan (1989) (1988) (11)
<i>Oncorhynchus mykiss</i> fed	–	13.96	2.13	–	–
<i>Sufflamen verres</i>	26	15	–	–	Haschemeyer et al. (1979) (12)
(Triggerfish)	30	14	–	–	–

In general, amino acid availability and the competition for cellular energy in the form of ATP may play a major role in understanding why protein synthesis in vivo remains below capacity. Furthermore, several studies suggest that with energy being available, initiation is the rate-limiting step and the most common site for global control of translation (Hofmann and Hand 1994). Control at initiation is most often mediated by the phosphorylation/dephosphorylation of initiation factors, as seen, for example, in mammalian cells (Hershey 1991). Furthermore, the regulation of the GTP:GDP ratio by adenylate levels is a sensitive control parameter for ternary complex (eIF2-GTP-Met-tRNA_i) formation in eukaryotic cells (Walton and Gill 1976).

In vitro protein synthesis in gills of aquarium-maintained *Adamussium colbecki*

The effect of nutrition or season or both is also relevant when studying protein synthesis in ectotherms. This may be especially true for animals from the cold Antarctic where food availability for some species may be highly seasonal and limited to the austral summer. *Adamussium colbecki*, maintained in the aquarium for 6 months, displayed indications of limited food supply despite regular presence of food. These (aquarium) animals were

sampled during their austral wintertime and showed metabolic depression by up to 30%, indicative of food limitation or a winter status of these animals (Heilmayer and Brey 2003). The reduced protein synthesis rates and translational capacity in vitro in the gills of these *Adamussium colbecki* specimens, mirrors such a significant change in the nutritional condition and metabolic rate of these animals. Low protein synthesis rate is reflected in a loss of protein synthesis machinery, indicated by reduced RNA levels and by a decrease in the amount of protein synthesized per milligram of RNA, thus translational capacity. Interestingly, the temperature dependence of protein synthesis was reduced under these conditions, indicated by a lower Q_{10} . This finding suggests a lower activation enthalpy and thus, less cold induced restriction of protein synthesis.

According to Fig. 4, this may be a general pattern among ectotherms. A reduction in food consumption has been shown to decrease in vivo protein synthesis rates and RNA translational efficiency in the gills of various ectotherms (Table 2) and the effect of temperature seems to be reduced in fasting animals (Fig. 4). An animal deprived of food loses weight rapidly but the response is quite variable in individual tissues and can be controlled by the animal (reviewed by Houlihan 1991). The gills in long-term maintained *Adamussium colbecki* sustained the highest protein loss whereas

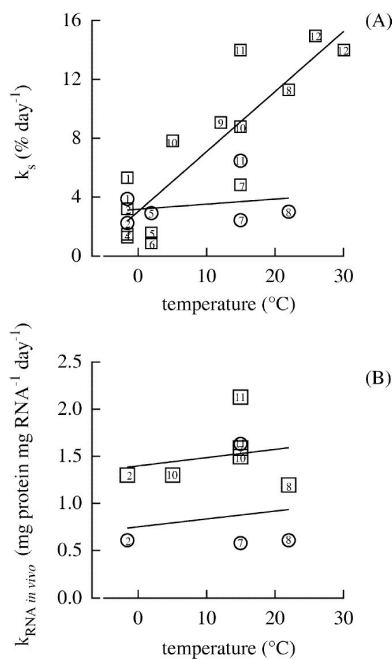


Fig. 4A–B Effect of temperature on fractional protein synthesis rates (k_s) (A) and on translational efficiencies ($k_{RNA \text{ in vivo}}$) (B) measured in vivo in gills of various fed (squares) and fasted (circles) ectotherms. For literature sources of plotted data, see Table 2

muscle protein levels remained the same. It is noteworthy that gills are characterized by very low protein retention efficiency, whereas muscles display very high efficiencies of protein retention (Houlihan et al. 1989; Houlihan 1991; Lyndon and Houlihan 1998). This in turn indicates significant differences in protein stability between various tissues, which seem to be high in muscle but low in gills of cold-adapted *Adamussium colbecki*. The loss of protein synthesis apparatus in the gills of aquarium-maintained *Adamussium colbecki*, which goes hand in hand with a loss of protein content, suggests higher degradation than synthesis rates. Similarly, protein degradation rates in eurythermal salmon were in excess of synthesis rates after 4 months starvation, leading to protein loss in the gills, ventricle, stomach but also red and white muscle (Houlihan 1991). Fraser et al. (2002) observed a parallel reduction of body mass, RNA:protein ratios and protein synthesis rates in the Antarctic limpet *Nacella concinna* during the austral winter.

Summary and conclusions

The patterns observed in the two pectinid species suggest that limitations of protein synthesis capacities in the cold may be compensated for by both enhanced RNA levels and enhanced RNA translational capacities. This may be particularly important in tissues with high protein

turnover rates and low protein retention efficiencies, such as gills. The increased RNA content in the cold may be a result of low RNA turnover rates, with the advantage of enhanced cost-efficiency. Seasonality or variable food supply of the animal seem to outrank temperature effects on protein synthesis capacities and actual in vivo rates, a conclusion supported by findings in *Adamussium colbecki* after long-term aquarium maintenance and by the few in vivo data found in the literature and summarized in Table 2 and Fig. 4.

Even though between-species comparisons like in Fig. 4 have to be treated with caution, a few general patterns arise:

1. In vivo protein synthesis rates in gill tissues of fed fish or invertebrates increase with increasing ambient temperatures, whereas the translational efficiency of RNA remains more or less unchanged. This is in line with the observation of temperature-compensated RNA translational capacities as outlined above.
2. The temperature dependence of in vivo protein synthesis rates in starved fish or invertebrates is less pronounced and translational efficiency is markedly reduced when compared to fed conspecifics (Fig. 4). Accordingly, the value of k_{RNA} is sensitive to the nutritional state of an animal (Millward et al. 1973).

Consequently, increased food demands at higher temperatures must be taken into consideration when studying protein synthesis at different temperatures and latitudes (Houlihan 1991).

As a corollary, current evidence indicates that cold-compensated protein synthesis capacities may not be fully exploited in vivo in the cold, but support similar maximum summer growth rates in Antarctic and temperate regions (Brey and Clarke 1993; Clarke and Leakey 1996; Peck 2002) when enough food and, thus, energy is available. Enhanced capacities of the protein synthesis apparatus in the cold resemble high enzyme capacities of aerobic metabolism, which are cold compensated too, despite reduced standard and maximum metabolic rates. Such excess capacities in metabolic and protein synthesis functions may be relevant for rapid adjustment of metabolic and functional equilibria and for full metabolic flexibility in response to external and internal stimuli in the permanent cold. The extremely high capacity of the protein synthesis system in the Antarctic scallop strongly supports these conclusions; however, any generalized statement on the level of cold compensation in protein synthesis capacity in Antarctic stenotherms requires further comparative study of cold- versus warm-adapted ectotherms with similar lifestyles.

Acknowledgements We are grateful to the staff of the “Station Biologique de Roscoff” for providing *Aequipecten opercularis*. The work on Antarctic scallops was carried out as part of the Italian research programme “Progetto Nazionale Ricerche in Antartide” (PNRA). We would like to thank Riccardo Cattaneo Vietti and Chiara Chiantore for the invitation to their beautiful Italian base “Terra Nova Bay”. The experiments conducted in this study comply with the current laws of Germany.

References

- Ashford AJ, Pain VM (1986) Effect of diabetes on the rates of synthesis and degradation of ribosomes in rat muscle and liver in vivo. *J Biol Chem* 261:4059–4065
- Bailey DM, Peck LS, Bock C, Pörtner HO (2003) High energy phosphate metabolism during exercise and recovery in temperate and Antarctic scallops—an in vivo ³¹P-NMR study. *Physiol Biochem Zool* (In press)
- Brey T, Clarke A (1993) Population dynamics of marine benthic invertebrates in Antarctic and subantarctic environments: are there unique adaptations. *Ant Sci* 5:253–266
- Canapa A, Barucca M, Marinelli A, Olmo E (2000) Molecular data from the 16S rRNA gene for the phylogeny of Pectinidae (Mollusca: Bivalvia). *J Mol Evol* 50:93–97
- Clarke A, Leakey RJG (1996) The seasonal cycle of phytoplankton, macronutrients, and the microbial community in a nearshore Antarctic marine ecosystem. *Limnol Oceanogr* 41:1281–1294
- Foster AR, Houlihan DF, Hall SJ, Burren LJ (1992) The effects of temperature acclimation on protein synthesis rates and nucleic acid content of juvenile cod (*Gadus morhua* L.). *Can J Zool* 70:2095–2102
- Fraser KP, Clarke A, Peck LS (2002) Low-temperature protein metabolism: seasonal changes in protein synthesis and RNA dynamics in the Antarctic limpet *Nacella concinna* Strebel (1908). *J Exp Biol* 205:3077–3086
- Haschemeyer AE (1983) A comparative study of protein synthesis in nototheniids and icefish at Palmer Station, Antarctica. *Comp Biochem Physiol B* 76:541–543
- Haschemeyer AE, Persell R, Smith MA (1979) Effect of temperature on protein synthesis in fish of the Galapagos and Perlas Islands. *Comp Biochem Physiol B* 64:91–95
- Haschemeyer AEV, Williams RC Jr (1982) Temperature dependency of cell-free protein synthetic systems from Antarctic fish. *Mar Biol Lett* 3:81–88
- Hawkins AJS (1991) Protein turnover: a functional appraisal. *Funct Ecol* 5:222–233
- Heilmayer O, Brey T (2003) Saving by freezing? Metabolic rates of *Adamussium colbecki* in a latitudinal context. *Mar Biol* 143:477–484
- Heilmayer O, Brey T, Storch D, Mackensen A, Arntz WE (2004) Population dynamics and metabolism of *Aequipecten opercularis* (L.) from the western English Channel (Roscoff, France). *Neth J Sea Res* (In press)
- Hershey JWB (1991) Translational control in mammalian cells. *Annu Rev Biochem* 60:717–755
- Hofmann GE, Hand SC (1994) Global arrest of translation during invertebrate quiescence. *Proc Natl Acad Sci USA* 91:8492–8496
- Houlihan DF (1991) Protein turnover in ectotherms and its relationships to energetics. In: Gilles R (ed) *Advances in comparative and environmental physiology*, vol 7. Springer, Berlin Heidelberg New York, pp 1–43
- Houlihan DF, McMillan DN, Laurent P (1986) Growth rates, protein synthesis, and protein degradation rates in rainbow trout: effects of body size. *Physiol Zool* 59:482–493
- Houlihan DF, Hall SJ, Gray C (1989) Effects of ration on protein turnover in cod. *Aquaculture* 79:103–110
- Houlihan DF, McMillan DN, Agnisola C, Trara Genoino I, Foti L (1990a) Protein synthesis and growth in *Octopus vulgaris*. *Mar Biol* 106:251–259
- Houlihan DF, Waring CP, Mathers E, Gray C (1990b) Protein synthesis and oxygen consumption of the shore crab *Carcinus maenas* after a meal. *Physiol Zool* 63:735–756
- Kim DM, Swartz JR (2000) Prolonging cell-free protein synthesis by selective reagent additions. *Biotechnol Prog* 16:385–390
- Lied E, Lie O, Lambertsen G (1985) Nutritional evaluation in fish by measurement of in vitro protein synthesis in white trunk muscle tissue. In: Conwey CB, Mackie AM, Bell JG (eds) *Nutrition and feeding in fish*. Academic Press, London, pp 169–176
- Lyndon AR, Houlihan DF (1998) Gill protein turnover: costs of adaptation. *Comp Biochem Physiol A* 119:27–34
- Marsh AG, Maxson RE Jr, Manahan DT (2001) High macromolecular synthesis with low metabolic cost in Antarctic sea urchin embryos. *Science* 291:1950–1952
- McMillan DN, Houlihan DF (1988) The effect of refeeding on tissue protein synthesis in rainbow trout. *Physiol Zool* 61:429–441
- McMillan DN, Houlihan DF (1989) Short-term responses of protein synthesis to re-feeding in rainbow trout. *Aquaculture* 79:37–46
- Millward DJ, Garlick PJ, James WP, Nnanyelugo DO, Ryatt JS (1973) Relationship between protein synthesis and RNA content in skeletal muscle. *Nature* 241:204–205
- Munro HN, Fleck A (1966) Recent developments in the measurement of nucleic acids in biological materials. A supplementary review. *Analyst* 91:78–88
- Peck LS (2002) Ecophysiology of Antarctic marine ectotherms: limits to life. *Polar Biol* 25:31–40
- Pörtner HO (2002) Physiological basis of temperature-dependent biogeography: trade-offs in muscle design and performance in polar ectotherms. *J Exp Biol* 205:2217–2230
- Ray KM, Kumar GS, Janiyani K, Kannan K, Jagtap P, Basu MK, Shivaji S (1998) Adaptation to low temperature and regulation of gene expression in antarctic psychrotrophic bacteria. *J Biosci* 23:423–435
- Robertson RF, El-Haj AJ, Clarke A, Peck LS, Taylor EW (2001) The effects of temperature on metabolic rate and protein synthesis following a meal in the isopod *Glyptonotus antarcticus* Eights (1852). *Polar Biol* 24:677–686
- Segel LA (1976) Incorporation of receptor kinetics into a model for bacterial chemotaxis. *J Theor Biol* 57:23–42
- Smith MAK, Haschemeyer AEV (1980) Protein metabolism and cold adaptation in Antarctic fishes. *Physiol Zool* 53:373–382
- Spirin AS, Baranov VI, Ryabova LA, Ovodov SY, Alakhov YB (1988) A continuous cell-free translation system capable of producing polypeptides in high yield. *Science* 242:1162–1164
- Storch D, Pörtner HO (2003) The protein synthesis machinery operates at the same expense in eurythermal and cold stenothermal pectinids. *Physiol Biochem Zool* 76:76:28–40
- Thomas T, Cavicchioli R (2002) Cold adaptation of archaeal elongation factor 2 (EF-2) proteins. *Curr Protein Pept Sci* 3:223–230
- Walton GM, Gill GN (1976) Preferential regulation of protein synthesis initiation complex formation by purine nucleotides. *Biochim Biophys Acta* 447:11–19
- Waterlow JC, Garlick PJ, Millward DJ (1978) The relationship between protein synthesis and cell growth. In: Waterlow JC, Garlick PJ, Millward DJ (eds) *Protein turnover in mammalian tissues and in the whole body*. Elsevier, Amsterdam, pp 538–557
- Whiteley NM, Taylor EW, Haj AJ el (1996) A comparison of the metabolic cost of protein synthesis in stenothermal and eurythermal isopod crustaceans. *Am J Physiol* 271:R1295–R1303
- Wollenberger AO, Ristau O, Schoffa G (1960) Eine einfache Technik der extrem schnellen Abkühlung grosser Gewebestücke. *Eur J Physiol* 270:399–412

Publikation III

Temperature dependent protein synthesis capacities in cold stenothermal (Antarctic)
and eurythermal (North Sea) fish (Zoarcidae)

Daniela Storch und Hans O. Pörtner

(eingereicht)

American Journal of Physiology

Temperature dependent protein synthesis capacities in cold stenothermal (Antarctic) and eurythermal (North Sea) fish (Zoarcidae)

Daniela Storch, Hans O. Pörtner

Alfred Wegener Institute for Polar and Marine Research, Columbusstraße, D-27568
Bremerhaven, Germany

Running head: protein synthesis capacities in Antarctic fish

Correspondence address:

HO Pörtner

Benthic Systems, Ecophysiology & Ecotoxicology

Alfred-Wegener-Institut für Polar- und Meeresforschung

Columbusstraße

D-27568 Bremerhaven

email: hpoertner@awi-bremerhaven.de

ABSTRACT

Higher RNA:protein ratios commonly found at lower acclimation temperatures have frequently hypothesized to reflect lower RNA translational capacities in the cold. The present study was intended to test this hypothesis in stenothermal Antarctic eelpout (*P. brachycephalum*) and in cold acclimated eurythermal eelpout (*Z. viviparus*) by use of crude cell-free protein-synthesis systems prepared from gills and white muscle tissue. The effect of long term thermal acclimation on RNA translational capacities and on protein synthesis capacities was analysed. RNA:protein ratios were the same in *P. brachycephalum* maintained at 0 °C and in *Z. viviparus* maintained at 10 °C. In contrast to *Z. viviparus* at 0 °C, *P. brachycephalum* displayed some cold compensated protein synthesis capacity, which was elicited by higher RNA translational capacities and lower activation energies. These findings indicate cold compensated enzyme capacities to be involved in the adjustment of protein synthesis to cold. In conclusion, the original hypothesis was confirmed for the eurythermal eelpout, whereas it does not apply to the Antarctic eelpout.

RNA translational capacity, RNA:protein ratio, *Zoarces viviparus*, *Pachycara brachycephalum*, cold acclimation, cold adaptation

INTRODUCTION

Cold-adapted organisms are commonly classified as extremophiles living in a chilly barren environment and the widespread observation that polar marine invertebrates and fish have slow annual growth rates apparently confirms this view. The first intuitively appealing explanation is that temperature slows down physiological rates in the cold, but ignores the possibility that over the course of evolutionary time, polar species may have achieved some degree of compensation for the rate-limiting effects of low temperature. Recent evidence demonstrates in fact that cold adapted invertebrates and fish of the Southern Ocean reach growth rates during the short Antarctic summer similar to those of their counterparts from temperate regions ((2), 1, (22), (40)). More recently, interest has focused on protein synthesis in polar species because growth and cellular functioning in tissues are closely related to protein turnover. Protein turnover can comprise a significant fraction of maintenance metabolism (e.g. 53 % in hatching blastula of *S. neumayeri* (30) where protein synthesis balances routine protein degradation with significant net protein formation during growth. Even though protein synthesis is energetically expensive, with unchanged cost regardless of temperature (49) there is some evidence that whole body protein synthesis rates *in vivo* ((56), (43), (30), (7) as well as tissue protein synthesis capacities studied *in vitro* (48) in polar marine invertebrates are similar to those observed in temperate species.

Enabling of the protein synthesis machinery to function at very low “operating temperatures” *in vivo* has been suggested to include elevated tissue RNA:protein ratios (an indirect measure of the *in vivo* capacity for protein synthesis (54), (50), (14). Increased RNA:protein ratios have been found upon cold acclimation or during winter in various tissues of fish and for the last two decades this finding has been interpreted to reflect cold compensation for low RNA translational activities at low temperatures (9), (6), (5), (32), (34), (35)). Accordingly, it seems very tempting to extrapolate this interpretation to cold adapted stenotherms from polar regions. The increase in RNA:protein ratios in Antarctic species reflected by increased RNA levels in cold stenotherms from the Southern Ocean (55), (44), (30), (7)) has in fact been suggested to counteract a thermally induced reduction in RNA translational activity and efficiency *in vivo*. McCarthy and Houlihan (34) suggested that this decrease in RNA translational efficiency with decreasing temperature is a general biological phenomenon observed across ectothermic and endothermic vertebrate species adapted to various temperature regimes.

Fraser et al. (7) proposed that maintaining considerably elevated tissue RNA concentrations causes high metabolic costs of growth in the cold compared to temperate and tropical species. However, in the light of energy savings, the protein synthesis machinery should rather be energy efficient with a cold adapted RNA translation apparatus that

operates at enhanced catalytic efficiency. Similar *in vitro* protein synthesis capacities in gills of the Antarctic scallop *Adamussium colbecki* measured at 0 °C and in the temperate scallop *Aequipecten opercularis* measured at 25 °C, were in fact explainable by the 9fold higher and, thus, cold compensated RNA translational capacity on top of a 2fold elevated RNA content (48) at similar energetic costs (49). Rather than reflecting enhanced energy costs elevated RNA contents in cold adapted ectotherms may therefore just be the result of low RNA turnover rates. Elevated levels of mRNA and protein synthesis sites, in turn, support short diffusion pathways for newly synthesized proteins to their final usage sites.

Against this background it is interesting to evaluate whether the protein synthesis apparatus of ectothermic Antarctic fish displays similar patterns as found earlier in the Antarctic pectinid. Furthermore, a comparison of confamilial fish species from polar as well as temperate waters should indicate differences between cold acclimation and evolutionary cold adaptation. If a capacity for thermal acclimation still exists in polar fishes, such analysis should consider to what extent thermal acclimation may occur differently in polar compared to temperate fish. The key question is whether higher RNA:protein ratios are, in general, accompanied by lower RNA translational capacities at lower acclimation temperatures as found for many eurythermal fish (see above). Based on the findings in the pectinids we rather hypothesized that the protein synthesis apparatus may be permanently cold adapted in the stenotherms, linked to enhanced RNA translational efficiencies at low temperature, possibly at the expense of reduced thermostability.

For such comparisons the protein synthesis apparatus was isolated from gills and white muscle of the Antarctic cold stenothermal eelpout *P. brachycephalum* and of the temperate eurythermal eelpout *Z. viviparus*, which are both part of the cosmopolitan fish family Zoarcidae. In general, fish gills display very high protein turnover rates and low protein retention efficiencies whereas white muscle is characterized by low turnover rates and high protein retention efficiencies (27). *In vivo* protein synthesis rates of white muscle in fish are known to correlate very well with organismic growth rates and to be sensitive to temperature changes upon acclimation (34), (35). Accordingly, our experiments were conducted with the isolated protein synthesis machinery to investigate the effect of acclimation temperature, i.e. the thermal history on the protein synthesis apparatus, as well as the thermostability of the protein synthesis apparatus in response to changes in experimental temperature *in vitro*. Furthermore, *in vitro* amino acid incorporation is a far more sensitive and immediate indicator for RNA translational capacity ((24), (14)) than the *in vivo* RNA:protein ratio and has the advantage to measure protein synthesis capacities under physiological conditions but at unrestricted energy and amino acid supply in the assay (49).

Both eelpout species were acclimated to habitat (control) temperatures and a common temperature of 5 °C, which is well within the thermal tolerance window of both

species. For *P. brachycephalum* which occurs naturally between $-1.8\text{ }^{\circ}\text{C}$ and $2.5\text{ }^{\circ}\text{C}$ the upper critical temperature limit (characterized by a transition to anaerobic metabolism in vivo) was found between $9\text{ }^{\circ}\text{C}$ and $13\text{ }^{\circ}\text{C}$ (53), (29). For *Z. viviparus* which lives between $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ to $18\text{ }^{\circ}\text{C}$, critical limits were reached between $21\text{ }^{\circ}\text{C}$ and $24\text{ }^{\circ}\text{C}$ (53).

MATERIAL AND METHODS

Animals

Antarctic eelpout, *Pachycara brachycephalum*, (20 ± 4 cm, 34 ± 11 g) were caught near King George Island ($62^\circ 11.2'$ S, $58^\circ 20.7'$ W), Antarctica, by a fish trap at a depth of 397 - 455 m in 1998. Animals were returned to the Alfred Wegener Institute (AWI), Bremerhaven, Germany, by the research vessel "MS Polarstern" and were since then kept in well-aerated, re-circulating seawater at 0.0 ± 0.5 °C and 34 ± 1 practical salinity units (PSU). Common eelpout, *Zoarces viviparus*, (22 ± 2 cm, 43 ± 14 g) were collected from 5 m water depth around the German offshore-island Helgoland, North Sea, using a fish trap in 2001. *Z. viviparus* were transported to the AWI by the research cutter "FS Uthörn". They were maintained in well-aerated, re-circulating seawater at 10 ± 1 °C and 34 ± 1 PSU. Photoperiod was adjusted to a 12:12 h light dark cycle.

P. brachycephalum maintained at 0 °C and *Z. viviparus* kept at 10 °C were referred to as control animals. Between February and December 2002 groups of both species were long-term acclimated at 5.0 ± 0.5 °C and at 34 ± 1 PSU. They were held in the same large basin, separated by a grid. Throughout the maintenance period, control animals (0 °C for *P. brachycephalum* and 10 °C for *Z. viviparus*), warm-acclimated *P. brachycephalum* (5 °C) and cold-acclimated *Z. viviparus* (5 °C), respectively, were fed fresh shrimp ad libitum once per week. Feeding did not occur 2 days prior to tissue preparation. Experiments were conducted in January/February 2003.

Preparation of Cell Free Translation Systems

Prior to tissue dissection, the fish were killed by a sharp blow to the head and ensuing transection of the spine. The fish were immediately placed on ice and tissues were quickly excised. Gills were resected by cutting the branchial arches at their sites of attachment. Only the soft gill filaments without arches were used for lysate preparation. White muscle was taken from the dorsolateral aspect along the backbone after the skin had been removed. *P. brachycephalum*, different from *Z. viviparus*, exhibits a subcutaneous thick grease film, which had to be removed along with the skin. White muscle was freeze-clamped in liquid N₂ while the gill lysate was freshly prepared. The cryopreservation did not affect the protein synthesis system as also shown for lysates prepared from epaxial muscle of the cod *Gadus morhua* (25).

The preparation of lysates from *P. brachycephalum* and *Z. viviparus* followed the same procedure. Gill filaments of 1 - 2 animals were pooled to provide enough tissue for all measurements. Half of the gill tissue was freeze-clamped in liquid N₂ for later examination of

amino acid (AA) composition in tissue protein, and of RNA and protein content. Approximately 150-350 mg of gill tissue was transferred to a chilled, hand operated, loosely fitting 2 ml glass homogenizer and homogenized with 5 strokes in 1 volume of ice-cold extraction buffer containing 30 mM Hepes, 250 mM sucrose, 120 mM potassium-chloride, 10 mM magnesium-chloride, 7 mM 2-mercaptoethanol, 20 mM dithiothreitol (DTT), adjusted to pH 7.1 at 25 °C, and supplemented with 107 units/ml RNasin Ribonuclease Inhibitor (Promega). The homogenate was immediately transferred to 1.5 ml Eppendorf Tubes and centrifuged at 16000 g for 30 min at 0 °C. The freshly prepared post-mitochondrial supernatant was used as the lysate and kept on ice until the start of *in vitro* translation assays. Aliquots of the lysates were frozen in liquid nitrogen for later determination of RNA and of free endogenous phenylalanine (Phe). White muscle lysates were prepared in the same way as gill lysates except that muscle tissue (750-1250 mg) was ground to a fine, homogeneous powder under liquid nitrogen using a pre-cooled mortar and pestle before homogenization in 0.6 volumes of ice-cold extraction buffer. This preliminary step was essential for a better mechanical pulping of the stringy muscle tissue.

Cell-free in vitro translation assays

Protein synthesis rates were determined *in vitro* at 5 different temperatures (0, 5, 10, 15, 25 °C). Buffer composition and osmolarity of the cell free system was set to compensate for dilution occurring upon lysis of the gill or white muscle tissue and to mimic the intracellular fluid of marine fish. A refinement of assay conditions was achieved by preliminary experiments with variable Phe, ATP, GTP and phosphocreatine (PCr) concentrations. For measurements of protein synthesis capacity, translation assays were conducted under optimized physiological conditions. Incorporation of [2,3,4,5,6 ³H] Phe into protein was measured as a function of time in 11 µl samples from an incubation medium containing 22.5 µl lysate/75 µl and final concentrations of 30 mM Hepes buffer (sodium salt, adjusted to pH 7.1 at 25 °C), 120 mM potassium chloride, 7 mM magnesium chloride, 5 mM DTT, 0.2 mM spermidine, all amino acids except Phe at 0.1 mM, 6 µM Phe (including 30 µCi of [2,3,4,5,6 ³H] Phe, Amersham, 116 Ci/mmol, 1 mCi = 37 MBq), 52 units RNasin Ribonuclease Inhibitor (Promega), 1 mM ATP, 1 mM GTP and 30 mM PCr and 2.25 units creatine phosphokinase as an ATP regeneration system to avoid a limitation of energy supply. The contribution of low molecular weight components from the lysate to the final concentration was not included in these numbers. Before starting translation with 22.5 µl lysate the reaction mixture was allowed to equilibrate in a water bath set to the experimental temperature of 0 °C, 5 °C, 10 °C, 15 °C or 25 °C for five minutes. After the addition of lysate, the assay was quickly subdivided into aliquots of 11 µl and returned to the water bath set at the experimental temperature. Reactions were run for given time periods and were

terminated by 2 μl pancreatic RNase (25 units/ml). Subsequently, 11- μl samples were pipetted onto Phe saturated, semi-wet Whatman GF/C filters to minimize unspecific adhesion of radioactive Phe to the filter. Filters were immersed in ice cold 10 % TCA, containing 5 mM Phe as carrier, then washed once in 10 % and twice in 5 % ice cold TCA. After a final rinse in 95 % ethanol the filters were allowed to dry in air before dissolving them in 5 ml scintillation cocktail (Packard, 57 % tritium counting efficiency). Radioactivity in the precipitated protein was determined by liquid scintillation counting. A zero control, which contained RNase right from the beginning of the assay to prevent protein synthesis, was used to correct for background due to non-specific binding of [2,3,4,5,6 ^3H] Phe to components of the lysate. Results were expressed as [2,3,4,5,6 ^3H] Phe incorporated into trichloroacetic acid-precipitable protein (as DPM 11 μl assay $^{-1}$) and was later converted to (μg protein mg FW $^{-1}$ day $^{-1}$) (see below).

Analytical Methods

Total RNA and free endogenous Phe levels in lysates were determined as previously described (48), (49). Tissue composition of gill and white muscle was determined by a modified procedure of the Lowry technique (Sigma procedure no. P5656) for protein and by a modified Schmidt-Thannhauser method for RNA (49). In addition to animals used for lysate preparation, further control specimens and those acclimated to 5 °C were taken for measurements of RNA and protein content. Total AA composition of tissue protein was determined by acidic hydrolysis followed by HPLC analysis ("Dr. Wiertz – Dipl. Chem. Eggert – Dr. Joerissen" GmbH, Hamburg, Germany).

Derived Parameters and Statistics

Protein synthesis rates in gill and white muscle tissues at the different experimental temperatures were determined using the initial, linear intercept of time dependent [2,3,4,5,6 ^3H] Phe incorporation curves. Protein synthesis rates were converted from (DPM 11 μl assay $^{-1}$ min $^{-1}$) via (nmol Phe 11 μl assay $^{-1}$ min $^{-1}$) into (μg protein mg FW $^{-1}$ day $^{-1}$). Therefore, the specific radioactivity, expressed as (Bq pmol Phe $^{-1}$) (1 DPM = 1/60 Bq), of each assay was calculated from the amount of added radioactive and non-radioactive Phe in the assay plus the measured free endogenous Phe of the lysates. Based on the total amino acid composition of protein in gill or white muscle, respectively, the ratio of each amino acid to Phe in protein was used to calculate the relationship between nmol of Phe incorporated and micrograms of protein synthesized. For the conversion the molecular weights of the respective amino acids were used.

The translational capacity of RNA (expressed as mg protein per mg RNA per day) in the *in vitro* system was calculated using the equation:

$$k_{\text{RNA}} = \frac{\text{mg protein synthesized} / 11 \text{ } \mu\text{l assay} / \text{day}}{\text{mg RNA} / 11 \text{ } \mu\text{l assay}}$$

Arrhenius activation energy (E_a) and Q_{10} were determined from an Arrhenius plot of $\log V_{\text{protein synthesis}}$ versus $1/T$ (K^{-1}). E_a values were expressed as E_a (kJ/mol) = $-R * m * 1000$, where R is the gas constant ($\text{J mol}^{-1} \text{K}^{-1}$) and m is the slope of the Arrhenius plot.

All data are expressed as means \pm standard error ($\bar{X} \pm \text{SE}$) unless stated otherwise. Numbers (n) of determinations are given in parentheses or figure legends. Prior to analysis, assumptions of normal distribution of the studied variables and homogeneity of variances were tested. If any of the assumptions was violated, the data were transformed by x^x , which resulted in significantly improved normality and homogeneity of variances. Statistical differences at the 5 % level were tested using analysis of variance (ANOVA) followed by the Student-Newman-Keuls post hoc test.

RESULTS

Characterization of Tissue Composition and Lysates

The amino acid composition of white muscle and of gill protein from *P. brachycephalum* and *Z. viviparus* is specified in Table 1. Acclimation to 5 °C exhibited no major effect on amino acid composition in either species. Therefore and for the sake of simplicity amino acid composition values determined in differently acclimated *P. brachycephalum* and *Z. viviparus*, respectively, were summarized to one mean \pm SD for white muscle and one mean \pm SD for gills. In muscle tissue only glycine differed significantly between species at the same protein content, whereas in gill tissue of *P. brachycephalum* alanine, cysteine, methionine and hydroxy-lysine levels were significantly lower than in gill tissue of *Z. viviparus* at the same level of protein content. The ratio of each amino acid to Phe in protein of white muscle and gill from both species was calculated from Table 1 and later used to convert nmol of Phe into grams of protein synthesized. Thereby it was assumed that the ratio of incorporation of the radiolabelled Phe to the incorporation of the 20 other common amino acids is one to one. The Phe percentage of overall protein was equal in muscle and gill of both species (Table 1).

Despite identical protocols used for both species free endogenous Phe levels in white muscle lysates of warm-acclimated *P. brachycephalum* (5 °C) were significantly reduced compared to control animals (0 °C) but were still significantly higher than in lysates prepared from white muscle of cold-acclimated (5 °C) or control (10 °C) *Z. viviparus* (Table 2). There was no detectable difference in free endogenous Phe levels in gill lysates neither between species nor within species maintained at various temperatures. The free endogenous Phe levels in the lysates were taken to correct for the resulting differences in specific radioactivity.

RNA and protein concentrations as well as RNA:protein ratios, as an indicator for the *in vivo* capacity of protein synthesis, were measured in tissues of control animals, and of warm-acclimated *P. brachycephalum* and cold-acclimated *Z. viviparus*, respectively, for an evaluation of long-term acclimation effects (Fig. 1). RNA levels in white muscle of control *P. brachycephalum* (0 °C: 0.68 ± 0.06 μ g RNA/mg FW, $n = 6$) and of control *Z. viviparus* (10 °C: 0.78 ± 0.07 μ g RNA/mg FW, $n = 6$) were similar (Fig. 1A). In warm-acclimated *P. brachycephalum* (5 °C) white muscle RNA was significantly reduced to 0.48 ± 0.02 μ g RNA/mg FW ($n = 6$), whereas cold-acclimated *Z. viviparus* (5 °C) showed a significant elevation of white muscle RNA to 1.37 ± 0.09 μ g RNA/mg FW ($n = 6$). Thus, there was a significant difference in RNA content of white muscle between species at 5 °C. RNA:protein ratios of white muscle tissue (Fig. 1C) followed the pattern of RNA contents (Fig. 1A) due to equal protein contents (Fig. 1B) in both species. Surprisingly, gill tissues of both eelpout species displayed very similar values and exhibited no significant changes in RNA and protein concentrations and in RNA:protein ratios upon long-term acclimation to 5 °C (Fig. 1D-F). Gill

RNA content in the Antarctic eelpout at 0 °C was 2.71 ± 0.10 $\mu\text{g RNA/mg FW}$ ($n = 6$) and at 5 °C was 3.08 ± 0.19 $\mu\text{g RNA/mg FW}$ ($n = 6$). These values were very similar to 3.19 ± 0.54 $\mu\text{g RNA/mg FW}$ ($n = 6$) and 2.71 ± 0.29 $\mu\text{g RNA/mg FW}$ ($n = 6$) determined in gills of cold-acclimated and of control *Z. viviparus*, respectively.

The comparison of RNA contents in gills and white muscle revealed 4fold higher levels in gills than in white muscle of control *P. brachycephalum* and 6.5fold higher values in gills than in white muscle of warm-acclimated *P. brachycephalum*. Values were around 2.3fold higher and 3.5fold higher in gills than in white muscle of cold-acclimated and control *Z. viviparus*, respectively. Overall, gills are among the most active tissues with respect to protein turnover, which is reflected in a high RNA:protein ratio in both eelpout species at all temperatures when compared to white muscle (Fig. 1C&F). Muscle naturally shows very low protein turnover rates associated with high protein retention features. This was indicated by virtually identical protein concentrations in white muscle and gills (Fig. 1B&E) at significantly lower RNA contents in muscle (Fig. 1A&D).

In both species there was a 25 % loss of RNA during the preparation of muscle lysates and a 30% loss in gill lysates when compared to tissue preparations. These losses were taken into account when calculating the *in vitro* protein synthesis capacities of the tissue ($\mu\text{g protein/mg FW/day}$).

In vitro phenylalanine incorporation

Phenylalanine incorporation into protein requires the complete protein synthetic machinery of the cell. The system used here resembles the buffering, osmotic and ionic conditions of the tissues. One goal of this study was to compare protein synthesis capacities in *P. brachycephalum* and *Z. viviparus* acclimated to various temperatures. By using the post-mitochondrial supernatant in an optimized cell-free system the capacities of white muscle and gill lysates of both species could be studied under identical physiological conditions. Figure 2 shows the time course for the incorporation of $[2,3,4,5,6\text{-}^3\text{H}]$ Phe into trichloroacetic acid-precipitable material at different temperatures by lysates prepared from gills of *P. brachycephalum* (Fig. 2). Lysates prepared from both tissues exhibited the same principle pattern of time course of *in vitro* translation regardless of acclimation temperature and species as exemplified for the gill lysate in Figure 2: a linear period of incorporation was followed by a progressive reduction of reaction velocity. The reaction approached completion in an asymptotic manner thereafter. A higher degree of incorporation of Phe into protein was achieved at higher temperatures, combined with an earlier relative slowing of the reaction. Short periods of linear incorporation in lysates are typical when compared to other non-reticulocyte cell-free systems (13), (21).

In vitro protein synthesis and RNA translational capacity

Protein synthesis capacities (μg protein/mg FW/day) and RNA translational capacities (mg protein/mg RNA/day) were calculated from initial Phe incorporation rates (Fig. 2) considering Phe concentrations in the lysates (Table 2), amino acid composition of tissue protein and the RNA concentration in tissues (Fig. 1A&D) and lysates, respectively.

P. brachycephalum (0 °C) vs. *Z. viviparus* (10 °C). *In vitro* protein synthesis capacities in white muscle (Fig. 3A) and in gill lysates (Fig. 3C) displayed significant temperature dependence in control *P. brachycephalum* maintained at 0 °C and in control *Z. viviparus* maintained at 10 °C. Protein synthesis capacities were significantly higher over the total temperature range in white muscle of *P. brachycephalum* compared to white muscle of *Z. viviparus*, although the same RNA contents were found in white muscle tissues of both species (Fig. 1A). An exponential increase of protein synthesis capacities was observed in white muscle within the temperature range 0 °C - 10 °C in control *P. brachycephalum* and within a temperature range 0 °C-15 °C in control *Z. viviparus*. In the lower temperature range protein synthesis capacities of white muscle increased with identical Q_{10} values in control *P. brachycephalum* ($Q_{10} = 6.7 \pm 2.1$, $n = 5$, 0 °C-10 °C) and control *Z. viviparus* ($Q_{10} = 7.0 \pm .2$, $n = 3$, 0 °C- 15 °C), whereas temperature dependency was significantly lower in the upper temperature range in both species. Above 10 °C, protein synthesis capacity of control *P. brachycephalum* white muscle was curbed, evident from the Arrhenius plot (Fig. 3B) as a significantly lower slope and Q_{10} ($Q_{10} = 1.7 \pm 0.3$, $n = 5$) at higher temperatures. Control *Z. viviparus* displayed restrained protein synthesis capacity only beyond 15 °C resulting in a Q_{10} of 1.8 ± 0.0 between 15 °C and 25 °C. The same findings were even more distinct in gill tissues (Fig. 3C&D) with equal RNA contents in the gills of both species (Fig. 1D). In the temperature range 0 °C-10 °C protein synthesis capacities were considerably higher in gills of control *P. brachycephalum* with a significantly lower temperature dependency compared to control *Z. viviparus* ($Q_{10} = 3.9 \pm 1.0$ versus $Q_{10} = 10.6 \pm 0.8$). In the upper temperature range (beyond 15 °C) protein synthesis capacities of *P. brachycephalum* fell below those of gill tissues of control *Z. viviparus*. Interestingly, activation energies of protein synthesis were slightly, though not significantly, lower in the lower temperature range, in white muscle of *P. brachycephalum* ($E_a = 109 \pm 21 \text{ kJ mol}^{-1}$) than in white muscle of *Z. viviparus* ($E_a = 127 \pm 2 \text{ kJ mol}^{-1}$). However, *P. brachycephalum* displayed significantly reduced E_a levels for *in vitro* protein synthesis in gills ($E_a = 81 \pm 14 \text{ kJ mol}^{-1}$ versus $E_a = 155 \pm 5 \text{ kJ mol}^{-1}$ in *Z. viviparus*).

The *Z. viviparus* cell-free system displayed a very low rate of protein synthesis at 0 °C in both tissues (muscle: $2.5 \pm 0.6 \mu\text{g}$ protein/mg FW/day; gill: $3.1 \pm 0.7 \mu\text{g}$ protein/mg FW/day) when compared to the much higher protein synthesis capacities in tissues of *P. brachycephalum* at 0 °C (muscle: $11.8 \pm 2.2 \mu\text{g}$ protein/mg FW/day; gill: $19.7 \pm 2.7 \mu\text{g}$

protein/mg FW/day). The 4-5fold higher *in vitro* protein synthesis capacities in tissues of *P. brachycephalum* measured at 0 °C can be explained by the 4-5fold higher RNA translational capacity in either tissue (control *P. brachycephalum*: white muscle 4.68 ± 0.83 mg protein/mg RNA/day, $n = 5$; gill 3.09 ± 0.34 mg protein/mg RNA/day, $n = 5$, versus control *Z. viviparus*: white muscle 1.16 ± 0.36 mg protein/mg RNA/day, $n = 3$; gill 0.57 ± 0.00 mg protein/mg RNA/day, $n = 3$). At its respective habitat temperature of 10 °C, protein synthesis capacities were 2fold higher in both tissues of control *Z. viviparus* compared to control *P. brachycephalum* (0 °C).

Control P. brachycephalum (0 °C) vs. warm-acclimated P. brachycephalum (5 °C) and control Z. viviparus (10 °C) vs. cold-acclimated Z. viviparus (5 °C). As expected RNA translational capacities (Fig. 4) and protein synthesis capacities (Fig. 5) in lysates prepared from tissues of 5 °C acclimated specimens were temperature dependent as already specified for the protein synthesis capacities of control animals (see above). Fig. 4 depicts the effect of long-term acclimation to 5 °C compared to control temperature on the *in vitro* RNA translational capacities in white muscle (Fig. 4A&C) and in gill (Fig. 4B&D) of both species. In this long-term acclimation experiment we found a crucial difference between the two species, for both white muscle and gills. A significant reduction in RNA translational capacities was observed in lysates prepared from both tissues of warm acclimated *P. brachycephalum* compared to the “cold” control animals at 0 °C (Fig. 4A&B) over the measured temperature range. In contrast, the RNA translational capacities in lysates of tissues of *Z. viviparus* declined significantly upon cooling (Fig. 4C&D). In other words RNA translational capacities appear to increase in *P. brachycephalum* at lower temperatures whereas *Z. viviparus* experienced a decrease in RNA translational capacities upon cold acclimation when measured in the *in vitro* cell free system under the same physiological conditions.

We were further interested in the effect of RNA translational capacities on protein synthesis capacities in consideration of varying RNA contents, observed especially in white muscle upon acclimation, by referring *in vitro* protein synthesis rates to mg fresh weight (Fig. 5A&C). High RNA contents amplify high RNA translational capacities and support high protein synthesis capacities observed in white muscle lysates of control *P. brachycephalum* in comparison to low RNA contents and low RNA translational capacities resulting in a significantly lower protein synthesis capacity in white muscle lysates of warm-acclimated *P. brachycephalum*. In contrast, high RNA contents counteract low RNA translational capacities in white muscle lysate of cold-acclimated *Z. viviparus* when compared to low RNA contents associated with high RNA translational capacities in white muscle lysates of control *Z. viviparus* resulting in similar protein synthesis capacities at both acclimation temperatures.

Warm-acclimated P. brachycephalum (5 °C) vs. cold-acclimated Z. viviparus (5 °C). The comparison of both species acclimated to the same temperature is quite thrilling especially in white muscle because of the large difference in RNA levels in the tissue due to warming of *P. brachycephalum* versus cooling of *Z. viviparus*. Therefore, we contrasted the RNA translational capacities and protein synthesis capacities of white muscle from warm-acclimated *P. brachycephalum* and cold-acclimated *Z. viviparus* in the same Fig. 6 (A&B). At an acclimation temperature of 5 °C RNA translational capacity in white muscle lysates of *P. brachycephalum* was significantly above RNA translational capacities found in *Z. viviparus in vitro* (Fig. 6A) over the whole range of assay temperatures. This was also valid for gill tissues. Despite the much higher RNA contents in white muscle of *Z. viviparus* at 5 °C the observed significantly higher RNA translational capacity in *P. brachycephalum* yielded similar protein synthesis capacities in both species (Fig. 6B). This result and the finding of protein synthesis rates in white muscle significantly different between species maintained at their control temperatures (0 °C and 10 °C, respectively), despite similar RNA contents, indicate a cold compensated protein synthesis machinery in the Antarctic *P. brachycephalum*.

The thermal sensitivity of *in vitro* protein synthesis in white muscle and gill lysates of warm-acclimated *P. brachycephalum* and of cold-acclimated *Z. viviparus* followed the same principle pattern as that observed for white muscle and gill lysates of control *P. brachycephalum*. Protein synthesis capacity increased exponentially with rising temperature between 0 °C and 10 °C. Above 10 °C, temperature dependence was reduced as indicated by a significant drop of the slope in the Arrhenius plot of protein synthesis capacity measured in white muscle lysates (Fig. 7A&C) and in gill lysates (Fig. 7B&D) of both species acclimated to 5 °C. Only in control *Z. viviparus* a significant difference in the thermal sensitivity was conspicuous compared to the other acclimation groups and is illustrated by an extended linear temperature dependence in the low temperature range with a break temperature shifted up to 15 °C in white muscle (Fig. 7C) and in gill lysates (Fig. 7D). In addition, with an activation energy of $155 \pm 5 \text{ kJ mol}^{-1}$ and a Q_{10} value of 10.6 ± 0.8 at temperatures below 15 °C, the temperature dependence of protein synthesis in lysates prepared from gills of control *Z. viviparus* (10 °C) was significantly higher compared to cold-acclimated *Z. viviparus* (5 °C) with an $E_a = 81 \pm 22 \text{ kJ mol}^{-1}$ and a $Q_{10} = 3.7 \pm 0.8$ in the temperature range 0-10 °C. These findings indicate an cold acclimation dependent reduction in the thermal sensitivity of the protein synthesis machinery of *Z. viviparus*, which could not be observed in lysates prepared from tissues of *P. brachycephalum* upon acclimation. Activation energy averaged $85 \pm 14 \text{ kJ mol}^{-1}$ in white muscle and $88 \pm 10 \text{ kJ mol}^{-1}$ in gills of warm acclimated *P. brachycephalum* versus $109 \pm 21 \text{ kJ mol}^{-1}$ in white muscle and $81 \pm 14 \text{ kJ mol}^{-1}$ in gills of

control *P. brachycephalum* in the lower temperature range, with no shift in Arrhenius break temperature.

DISCUSSION

Characteristics of the cell free protein synthesis system. The cell-free system itself was developed in the 1960s; however, low activities have for a long time been the primary shortcoming. The subsequent forty years of intensive studies on optimization made the cell-free translation system a valuable tool to study protein synthesis capacity under physiological conditions at high speed and accuracy, in excess of *in vivo* protein synthesis rates ((16), (23), (45), (37), (39), (38), (28), (48)). High-speed protein synthesis systems are mainly attained by providing sufficient energy and amino acids ((47), (19), (20), (18), (49)) and preventing RNA degradation by addition of RNasin ribonuclease inhibitor ((26), (36), (13), (49)).

These adjustments in assay composition were elaborated in preliminary experiments and the resulting optimized cell free system allows direct comparison of protein synthesis capacities in white muscle and gills of *P. brachycephalum* and of *Z. viviparus* acclimated to various temperatures. An earlier study of an unsupplemented cell free system prepared from liver of Antarctic fish, *Trematomus bernacchii*, showed significant protein synthesis activity at 0 °C (11). However, without adequate optimization the protein synthesis rate at 0 °C was by a factor of more than 1000 (0.004% liver protein synthesized per day) below that observed *in vivo* (5.3 – 6.9% tissue protein synthesized per day in liver, (46)). In contrast, the gill and white muscle lysates prepared from *P. brachycephalum* and from *Z. viviparus* in the present study displayed between 800 and 3000-fold higher protein synthesis rates (control *P. brachycephalum*: muscle 3.5%, gills 11.8% protein synthesized per day, measured at 0 °C; control *Z. viviparus*: muscle 5.3%, gills 18.7%, measured at 10 °C) when compared to early *in vitro* determinations in Antarctic fish liver. The 1000-fold lower *in vitro* than *in vivo* protein synthesis rates in liver of *Trematomus bernacchii* (11) and the order of magnitude, by which the eelpout cell free systems exceed the activity of the “*Trematomus*” cell free system corroborate the view that due to improved methodology values obtained in the present study more closely approach the full *in vitro* capacity of the protein synthesis machinery.

The isolated translational machinery and its endogenous mRNA levels are a snapshot of the cell, which mirrors the previous history of the *in vivo* protein synthesis system. Therefore, *in vitro* protein synthesis capacities were compared in equal sized animals long term acclimated to standard laboratory conditions. This minimizes the effects of fluctuating environmental history such as variable food availability, light:dark regimes and temperature, which is especially important when comparing animals in a latitudinal cline, and allows analyzing the genetically based variation in the protein synthesis apparatus of both species.

Effects of temperature on the protein synthesis machinery. The Arrhenius treatment of the data (log rate vs. inverse absolute temperature) clearly demonstrated that the temperature dependence is biphasic. The Arrhenius break temperature either reflects a change in kinetic properties or onset of denaturation of functional proteins. In white muscle and in gills of both acclimation groups of the stenothermal *P. brachycephalum*, the discontinuity seen at 10 °C is close to the critical temperature (characterized by a transition to anaerobic metabolism) reported between 9 and 13 °C in these animals ((53), (29)). The coincidence of Arrhenius discontinuities and critical temperatures may be accidental, however, the gain of function at lower temperature may have occurred at the expense of low thermal stability as documented for other psychrophilic enzymes ((8), (4)).

Thermal acclimation apparently has an effect on the Arrhenius break temperature in the eurythermal, but not in the stenothermal species. The discontinuity in white muscle and gills of eurythermal *Z. viviparus* acclimated to 5 °C was below the one found in control specimens of *Z. viviparus* (10 °C) which displayed an extended range of linear temperature dependence at least up to 15 °C. This value is still below the critical temperature of *Z. viviparus* which was found between 21 °C and 24 °C. Some correlative relationship between ABT of protein synthesis and critical temperature may reflect the observation that protein synthesis becomes depressed once oxygen limitation becomes effective. A similar biphasic temperature dependence of protein synthesis has been reported for isolated hepatocytes of the European eel *Anguilla anguilla* acclimated to 10 °C and 20 °C by Jankowsky et al. (17). They report a discontinuity at around 15 °C to 16 °C for both acclimation groups. Mammalian cells in culture show a sharp break in the Arrhenius plot for protein synthesis at 24 °C (3) and protein synthesis in liver of the eurythermal toadfish *Opsanus tau* acclimated to 22 °C also exhibited two temperature dependencies when measured *in vivo*: $Q_{10} = 2.5$ in the 17 – 30 °C range; $Q_{10} = 5$ in the 7 - 17 °C range. Below 7 °C protein synthesis was inhibited, a finding attributed to failure of ribosomes to initiate translation (33). All of these findings would suggest that ABT is not always identical to critical temperature but rather related to the setting of kinetic properties. These relationships require further analyses.

Considering the long term pattern of evolutionary cold adaptation, the cold adapted protein synthesis machinery of *P. brachycephalum* might have lost (some of) the ability to adjust to warmer temperatures. No shift in ABT occurs upon warm acclimation. However, RNA translational capacity was reduced upon warming within the thermal tolerance range. This process may reflect beneficial thermal acclimation, as the well being of warm acclimated *P. brachycephalum* was not visibly affected during long term maintenance.

Arrhenius activation energies in the lower temperature range are altered in response to the thermal history in cell free systems prepared from the eurythermal *Z. viviparus*. This

holds likewise for gill and white muscle and literature data also indicate that this may be a common feature. Significantly reduced activation energies of protein synthesis rates were found in eel hepatocytes upon cold acclimation (17). Many enzymes of cold adapted species display reduced activation enthalpies to counterbalance the expected decrease in reaction velocity during cooling (12), (31), (4)). Protein synthesis requires a variety of enzymes and the overall activation energy mirrors that of the whole protein synthesis machinery. The protein synthesis apparatus from white muscle and gill of *P. brachycephalum* also displays the expected cold-induced drop in activation energy, when compared to the synthesis apparatus of the respective tissues of temperate *Z. viviparus*. In contrast to decreasing activation energies observed for the protein synthesis machinery of the eurythermal *Z. viviparus*, however, the protein synthesis complexes of both tissues of *P. brachycephalum* did not exhibit a rise in activation energy, which would be expected upon long term warming. This might further indicate a highly cold adapted protein synthesis apparatus in the Antarctic species, with a limited ability to acclimate.

Ectotherms living at high latitudes display cold compensated enzyme capacities despite reduced metabolic rates. These patterns have been interpreted to reflect a downward shift of oxygen limited thermal tolerance windows (41). *P. brachycephalum*, naturally adapted to environments with very low, constant annual mean temperatures, have higher RNA translational capacities at levels of RNA in gills and white muscle which are similar to those in their confamilial counterparts from temperate habitats. This trend may reflect cold compensation of enzyme capacities involved in protein synthesis in both high and low turnover tissues such as gills and white muscles. The general process of peptide bond formation, including tRNA acylation, initiation, elongation and termination, most likely operates in the same way in both eelpout species adapted to different temperature regimes. The enhanced translational activity at low temperature, indicated by the higher translational capacity of the ribosomes, may rather result from cold optimization of the primary structures of core ribosome proteins and ribosome-associated proteins, such as initiation and elongation factors, as well as from cold compensation of enzyme activities involved in protein synthesis (52). Examples for structural properties indicative of thermal adaptation of the protein synthesis apparatus have been identified in several micro-organisms (42), (51)). Increased activities of elongation factor EF-1 have been demonstrated in liver of Antarctic fish (11).

Acclimation hypothesis. The key question formulated in the introduction was whether, as a general feature in cold acclimation and adaptation, higher RNA:protein ratios are suitable to compensate for lower RNA translational capacities at lower acclimation temperatures. The RNA concentrations of gill and white muscle did not differ between the species maintained at

their habitat temperatures. The levels of white muscle RNA found were comparable to total RNA levels measured in white muscle of *Z. viviparus* and *P. brachycephalum* in a previous study by Hardewig et al. (10). They also found a significant rise in the RNA concentration in white muscle of *Z. viviparus* upon cold acclimation. However, the constancy of this parameter found in gills regardless of acclimation temperature and species already indicates that the RNA:protein ratio does not exclusively reflect cold compensated protein synthesis capacity.

In the present study major changes in RNA:protein ratios upon acclimation were only found in white muscle of both species. As already mentioned protein synthesis rates of white muscle in fish are known to correlate very well with growth rates and react sensibly to temperature changes upon acclimation (15), (34), (35). Therefore, the following discussion will be confined to the white muscle of both species. A role for RNA:protein ratio in cold compensation was only confirmed by the data obtained in the eurythermal eelpout *Z. viviparus*, whereas it does not apply as a feature of latitudinal cold adaptation to the Antarctic cold stenothermal eelpout *P. brachycephalum*. Reduced RNA translational capacities in white muscle of *Z. viviparus* were clearly counteracted by an elevated RNA:protein ratio resulting in similar protein synthesis capacities in both acclimation groups of *Z. viviparus*. In contrast to the tested hypothesis, however, *P. brachycephalum* exhibited increased RNA translational capacities compared to the temperate eelpout with no increase in RNA:protein ratios. Nonetheless, RNA levels are temperature dependent in the Antarctic eelpout, evidenced by a decrease in RNA levels during warm acclimation. At the same time, warming of the Antarctic eelpout caused a drop in translational capacities in white muscle (Figs. 1 and 4). Accordingly, both tissue RNA levels and RNA translational capacities are thermally dependent in similar ways in both eelpout species, however, the range of RNA levels seen in *Z. viviparus* between 5 and 10 °C is found at lower temperatures between 0 and 5 °C in the Antarctic species. This emphasizes the role of adjustments in translational capacity during thermal adaptation. Changing translational capacities may also be involved in other species. In different organs of rainbow trout increased specific elongation rates were measured upon cold acclimation in cell free systems (45). Simon did not determine RNA levels in the assay, however, he concluded that the increased specific elongation rates in 4 °C acclimated trout are due to an effective enhancement of enzymatic elongation factor activities.

We conclude that *P. brachycephalum* evolved a cold adapted RNA translation machinery with enhanced catalytic efficiencies and reduced Arrhenius activation energies to function efficiently at low temperatures, however, at lower RNA:protein ratios than seen in the temperate eelpout when cold acclimated. An increased RNA:protein ratio to counteract temperature induced reduction of the translational capacity, as observed in many eurythermal fish in vivo ((14), (34)) and in vitro in *Z. viviparus* upon cold acclimation (this

study), can partly be extrapolated to cold adapted invertebrates ((30), (7), (48)), but does probably not hold for the highly adapted protein synthesis machineries of Antarctic fish. Further comparative studies are needed to evaluate the level and mechanisms of cold compensation in protein synthesis capacities in Antarctic stenotherms.

Acknowledgments

Special thanks are extended to Gisela Lannig for help with the fish maintenance und the fish dissections, and Iris Hardewig and Magnus Lucassen for their helpful technical advice.

REFERENCES

1. **Arntz WE, Brey T, and Gallardo VA.** Antarctic zoobenthos. *Oceanogr Mar Biol Annu Rev* 32: 241-304, 1994.
2. **Brey T and Clarke A.** Population dynamics of marine benthic invertebrates in Antarctic and Subantarctic environments: are there unique adaptations? *Antarct Sci* 5: 253-266, 1993.
3. **Craig N.** Regulation of translation in rabbit reticulocytes and mouse L-cells; comparison of the effects of temperature. *J Cell Physiol* 87: 157-166, 1975.
4. **D'Amico S, Claverie P, Collins T, Georlette D, Gratia E, Hoyoux A, Meuwis MA, Feller G, and Gerday C.** Molecular basis of cold adaptation. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 357: 917-925, 2002.
5. **Foster AR, Hall SJ, and Houlihan DF.** The effects of seasonal acclimatization on correlates of growth rate in juvenile cod, *Gadus morhua*. *J Fish Biol* 42: 461-464, 1993.
6. **Foster AR, Houlihan DF, Hall SJ, and Burren LJ.** The effects of temperature acclimation on protein synthesis rates and nucleic acid content of juvenile cod (*Gadus morhua* L.). *Can J Zool* 70: 2095-2102, 1992.
7. **Fraser KP, Clarke A, and Peck LS.** Low-temperature protein metabolism: seasonal changes in protein synthesis and RNA dynamics in the Antarctic limpet *Nacella concinna* Strebel (1908). *J Exp Biol* 205: 3077-3086, 2002.
8. **Gerday C, Aittaleb M, Arpigny JL, Baise E, Chessa JP, Garsoux G, Petrescu I, and Feller G.** Psychrophilic enzymes: a thermodynamic challenge. *Biochim Biophys Acta* 1342: 119-131, 1997.
9. **Goolish EM, Barron MG, and Adelman IR.** Thermoacclimatory response of nucleic acid and protein content of carp muscle tissue: Influence of growth rate and relationship to glycine uptake by scales. *Can J Zool* 62: 2164-2170, 1984.

10. **Hardewig I, van Dijk PL, Moyes CD, and Pörtner HO.** Temperature-dependent expression of cytochrome-c oxidase in Antarctic and temperate fish. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 277: R508-R516, 1999.
11. **Haschemeyer AEV and Williams RC Jr.** Temperature dependency of cell-free protein synthetic systems from Antarctic fish. *Mar Biol Lett* 3: 81-88, 1982.
12. **Hochachka PW and Somero GN.** *Biochemical Adaptation*. Princeton, New Jersey: Princeton University Press, 1984.
13. **Hofmann GE and Hand SC.** Global arrest of translation during invertebrate quiescence. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 8492-8496, 1994.
14. **Houlihan DF.** Protein turnover in ectotherms and its relationships to energetics. In: *Advances in Comparative and Environmental Physiology 7*, edited by Gilles R. Berlin, Heidelberg: Springer Verlag, 1991, p 1-43.
15. **Houlihan DF, Hall SJ, Gray C, and Noble BS.** Growth rates and protein turnover in Atlantic cod, *Gadus morhua*. *Can J Fish Aquat Sci* 45: 951-964, 1988.
16. **Jackson RJ.** The cytoplasmic control of protein synthesis. In: *Protein Biosynthesis in Eukaryotes*, edited by Pérez-Bercoff R. New York, London: Plenum Press, 1982, p 363-418.
17. **Jankowsky HD, Hotopp W, and Vsiansky P.** Effects of assay and acclimation temperatures on incorporation of amino acids into protein of isolated hepatocytes from the european eel, *Anguilla anguilla* L. *J Therm Biol* 6: 201-208, 1981.
18. **Kang SH, Oh TJ, Kim RG, Kang TJ, Hwang SH, Lee EY, and Choi CY.** An efficient cell-free protein synthesis system using periplasmic phosphatase-removed S30 extract. *J Microbiol Methods* 43: 91-96, 2000.
19. **Kawarasaki Y, Kawai T, Nakano H, and Yamane T.** A long-lived batch reaction system of cell-free protein synthesis. *Anal Biochem* 226: 320-324, 1995.

20. **Kawarasaki Y, Nakano H, and Yamane T.** Phosphatase-immunodepleted cell-free protein synthesis system. *J Biotechnol* 61: 199-208, 1998.
21. **Kim DM and Swartz JR.** Prolonging cell-free protein synthesis by selective reagent additions. *Biotechnol Prog* 16: 385-390, 2000.
22. **Kock KH and Everson I.** Age, growth and maximum size of Antarctic notothenioid fish - revisited. In: *Fishes of Antarctica. A biological overview*, edited by Di Prisco G, Pisano E, and Clarke A. Milano, Italia: Springer-Verlag, 1998, p 29-40.
23. **Kurland CG.** Translational accuracy in vitro. *Cell* 28: 201-202, 1982.
24. **Lied E, Lie O, and Lambertsen G.** Nutritional evaluation in fish by measurements of in vitro protein synthesis in white trunk muscle tissue. In: *Nutrition and feeding in fish*, edited by Cowey CB, Mackie AM, and Bell JG. London, New York: Academic Press, 1985, p 169-176.
25. **Lied E, Lund B, and von der Decken A.** Protein synthesis in vitro by epaxial muscle polyribosomes from cod, *Gadus morhua*. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 72: 187-193, 1982.
26. **Lopo AC, Lashbrook CC, and Hershey JW.** Characterization of translation systems in vitro from three developmental stages of *Strongylocentrotus purpuratus*. *Biochem J* 258: 553-561, 1989.
27. **Lyndon AR and Houlihan DF.** Gill protein turnover: costs of adaptation. *Comp Biochem Physiol A* 119: 27-34, 1998.
28. **Madin K, Sawasaki T, Ogasawara T, and Endo Y.** A highly efficient and robust cell-free protein synthesis system prepared from wheat embryos: plants apparently contain a suicide system directed at ribosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 97: 559-564, 2000.
29. **Mark FC, Bock C, and Pörtner HO.** Oxygen-limited thermal tolerance in Antarctic fish investigated by MRI and (31)P-MRS. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 283:

R1254-R1262, 2002.

30. **Marsh AG, Maxson RE Jr, and Manahan DT.** High macromolecular synthesis with low metabolic cost in Antarctic sea urchin embryos. *Science* 291: 1950-1952, 2001.
31. **Marshall CJ.** Cold-adapted enzymes. *Trends Biotechnol* 15: 359-364, 1997.
32. **Mathers EM, Houlihan DF, McCarthy ID, and Burren LJ.** Rates of growth and protein synthesis correlated with nucleic acid content in fry of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*: effects of age and temperature. *J Fish Biol* 43: 245-263, 1993.
33. **Mathews RW and Haschemeyer AEV.** Temperature dependency of protein synthesis in toadfish liver. *Comp Biochem Physiol B* 61: 479-484, 1978.
34. **McCarthy ID and Houlihan DF.** The effect of temperature on protein metabolism in fish: The possible consequences for wild Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) stocks in Europe as a result of global warming. In: *Global warming: Implications for freshwater and marine fish*, edited by Wood CM and McDonald DG. Cambridge, UK, Cambridge University Press, Soc Exp Biol Sem Ser 61, 1997, p 51-77.
35. **McCarthy ID, Moksness E, Pavlov DA, and Houlihan DF.** Effects of water temperature on protein synthesis and protein growth in juvenile Atlantic wolffish (*Anarhichas lupus*). *Can J Fish Aquat Sci* 56: 231-241, 1999.
36. **Moreno A, Mendez R, and de Haro C.** Characterization of cell-free protein-synthesis systems from undeveloped and developing *Artemia* embryos. *Biochem J* 276: 809-816, 1991.
37. **Nakano H, Tanaka T, Kawarasaki Y, and Yamane T.** An increased rate of cell-free protein synthesis by condensing wheat-germ extract with ultrafiltration membranes. *Biosci Biotechnol Biochem* 58: 631-634, 1994.
38. **Patnaik R and Swartz JR.** E. coli-based in vitro transcription/translation: in vivo-specific synthesis rates and high yields in a batch system. *Biotechniques* 24: 862-868, 1998.

39. **Pavlov MY and Ehrenberg M.** Rate of Translation of Natural mRNAs in an optimized in vitro system. *Arch Biochem Biophys* 328: 9-16, 1996.
40. **Peck LS.** Ecophysiology of Antarctic marine ectotherms: limits to life. *Polar Biol* 25: 31-40, 2002.
41. **Pörtner HO.** Climate variations and the physiological basis of temperature dependent biogeography: systemic to molecular hierarchy of thermal tolerance in animals. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 132: 739-761, 2002.
42. **Ray KM, Kumar GS, Janiyani K, Kannan K, Jagtap P, Basu MK, and Shivaji S.** Adaptation to low temperature and regulation of gene expression in antarctic psychrotrophic bacteria. *J Biosci* 23: 423-435, 1998.
43. **Robertson RF, El-Haj AJ, Clarke A, Peck LS, and Taylor EW.** The effects of temperature on metabolic rate and protein synthesis following a meal in the isopod *Glyptonotus antarcticus* Eights (1852). *Polar Biol* 24: 677-686, 2001.
44. **Robertson RF, El-Haj AJ, Clarke A, and Taylor EW.** Effects of temperature on specific dynamic action and protein synthesis rates in the Baltic isopod crustacean, *Saduria entomon*. *J Exp Mar Biol Ecol* 262: 113-129, 2001.
45. **Simon E.** Effect of acclimation temperature on the elongation step of protein synthesis in different organs of rainbow trout. *J Comp Physiol B* 157: 201-207, 1987.
46. **Smith MAK and Haschemeyer AEV.** Protein metabolism and cold adaptation in Antarctic fishes. *Physiol Zool* 53: 373-382, 1980.
47. **Spirin AS, Baranov VI, Ryabova LA, Ovodov SY, and Alakhov YB.** A continuous cell-free translation system capable of producing polypeptides in high yield. *Science* 242: 1162-1164, 1988.
48. **Storch D, Heilmayer O, Hardewig I, and Pörtner HO.** In vitro protein synthesis capacities in a cold stenothermal and a temperate eurythermal pectinid. *J Comp Physiol B* August 6, 2003; 10.1007/s00360-003-0371-7.

-
49. **Storch D and Pörtner HO.** The protein synthesis machinery operates at the same expense in eurythermal and cold stenothermal pectinids. *Physiol Biochem Zool* 76: 28-40, 2003.
 50. **Sugden PH and Fuller SJ.** Regulation of protein turnover in skeletal and cardiac muscle. *Biochem J* 273: 21-37, 1991.
 51. **Thomas T and Cavicchioli R.** Archaeal cold-adapted proteins: structural and evolutionary analysis of the elongation factor 2 proteins from psychrophilic, mesophilic and thermophilic methanogens. *FEBS Lett* 439: 281-286, 1998.
 52. **Thomas T and Cavicchioli R.** Cold adaptation of archaeal elongation factor 2 (EF-2) proteins. *Curr Protein Pept Sci* 3: 223-230, 2002.
 53. **Van Dijk PLM, Tesch C, Hardewig I, and Pörtner HO.** Physiological disturbances at critically high temperatures: a comparison between stenothermal antarctic and eurythermal temperate eelpouts (Zoarcidae). *J Exp Biol* 202: 3611-3621, 1999.
 54. **Waterlow JC, Garlick PJ, and Millward DJ.** Protein turnover in the whole body and in whole tissues. In: *Protein turnover in mammalian tissues and in the whole body*, edited by Waterlow JC, Garlick PJ, and Millward DJ. . Amsterdam, New York, Oxford: North-Holland Publishing Company, 1978, p. 444-476.
 55. **Whiteley NM, Robertson RF, Meagor J, el Haj AJ, and Taylor EW.** Protein synthesis and specific dynamic action in crustaceans: effects of temperature. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 128: 595-606, 2001.
 56. **Whiteley NM, Taylor EW, and el Haj AJ.** A comparison of the metabolic cost of protein synthesis in stenothermal and eurythermal isopod crustaceans. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 271: R1295-R1303, 1996.

Table 1. Concentrations of amino acids in protein obtained from white muscle and gill tissue of *P. brachycephalum* and of *Z. viviparus*. The ratio of each amino acid to Phe in protein of gill and muscle from both species was calculated to convert nmol of Phe into grams of protein synthesized.

Amino acids	White muscle protein [g/100g]		Gill protein [g/100g]	
	<i>P. brachycephalum</i>	<i>Z. viviparus</i>	<i>P. brachycephalum</i>	<i>Z. viviparus</i>
Cysteine	0.01 ^a	0.01 ^a	0.07 ± 0.03	0.07 ± 0.05
Aspartate	1.70 ± 0.15	1.71 ± 0.12	0.89 ± 0.07	1.09 ± 0.27
Hydroxy-proline	ND	ND	0.10 ± 0.05	0.15 ± 0.05
Threonine	0.76 ± 0.08	0.76 ± 0.03	0.53 ± 0.06	0.59 ± 0.16
Serine	0.63 ± 0.08	0.64 ± 0.07	0.47 ± 0.05	0.51 ± 0.13
Glutamate	2.40 ± 0.20	2.52 ± 0.17	1.23 ± 0.09	1.43 ± 0.33
Proline	0.53 ± 0.15	0.59 ± 0.03	0.47 ± 0.12	0.58 ± 0.23
Glycine *	0.71 ± 0.07	0.82 ± 0.09	0.66 ± 0.08	0.79 ± 0.30
Alanine #	0.89 ± 0.08	0.96 ± 0.08	0.49 ± 0.04	0.67 ± 0.16
Valine	0.90 ± 0.05	0.89 ± 0.10	0.57 ± 0.05	0.64 ± 0.20
Cysteine #	0.16 ± 0.08	0.15 ± 0.01	0.02 ± 0.01	0.05 ± 0.02
Methionine #	0.59 ± 0.09	0.64 ± 0.05	0.09 ± 0.03	0.23 ± 0.11
Isoleucine	0.86 ± 0.07	0.86 ± 0.06	0.42 ± 0.03	0.43 ± 0.14
Leucine	1.44 ± 0.15	1.38 ± 0.15	0.81 ± 0.07	0.86 ± 0.26
Tyrosine	0.44 ± 0.07	0.49 ± 0.06	0.23 ± 0.04	0.27 ± 0.09
Phenylalanine	0.74 ± 0.09	0.74 ± 0.04	0.42 ± 0.07	0.48 ± 0.11
Hydroxy-lysine #	ND	ND	0.02 ± 0.01 ^b	0.04 ± 0.01
Ornithin	0.04 ± 0.02	0.03 ± 0.01	0.01 ± 0.00	0.01 ± 0.00
Lysine	1.54 ± 0.12	1.56 ± 0.13	0.74 ± 0.08	0.82 ± 0.21
Histidine	0.38 ± 0.05	0.43 ± 0.09	0.31 ± 0.06	0.27 ± 0.05
Arginine	1.07 ± 0.12	1.07 ± 0.08	0.57 ± 0.10	0.70 ± 0.17
Total	16.2 ± 1.1	15.8 ± 1.4	10.7 ± 2.8	9.1 ± 0.8
% Fraction of Phe	4.6 ± 0.3	4.7 ± 0.1	4.5 ± 0.3	4.7 ± 0.5

Note: The % fraction of Phe within the protein was calculated from the ratio of phenylalanine content over the sum of amino acids multiplied by 100.

Data are given as means ± SD (n=6, except for gill of *Z. viviparus* n=5). * indicates a significant difference (p<0,05) between species in white muscle. # indicates a significant difference (p<0,05) between species in gill. ND = not detectable, ^a only 1 detectable value out of 6 determinations., ^b only 5 detectable values out of 6 determinations. Digestion with HCl converts asparagine and glutamine to aspartate and glutamate, respectively.

Table 2. Free endogenous phenylalanine in lysates prepared from white muscle and gills of *P. brachycephalum* maintained at control temperature (0 °C) or acclimated to 5 °C and of *Z. viviparus* acclimated to 5 °C or maintained at control temperature (10 °C). Incorporation of [2,3,4,5,6 ³H] Phe was corrected for free endogenous Phe.

Species	n	White muscle Phe (mmol l ⁻¹ lysate)	Gill Phe (mmol l ⁻¹ lysate)
<i>P. brachycephalum</i> (0 °C)#	5	0.32 ± 0.05*	0.14 ± 0.05
<i>P. brachycephalum</i> (5 °C)#	5	0.21 ± 0.03*	0.08 ± 0.01
<i>Z. viviparus</i> (5 °C)	4	0.10 ± 0.03	0.11 ± 0.02
<i>Z. viviparus</i> (10 °C)	3	0.08 ± 0.01	0.08 ± 0.02

Data are given as means ± SE. * indicates a significant difference (P<0.05) of free endogenous Phe concentration in lysates prepared from white muscle between species and within species at varying acclimation temperatures. # indicates a significant difference (P<0.05) of free endogenous Phe concentration in lysates prepared from different tissues of the same species acclimated to the same temperature.

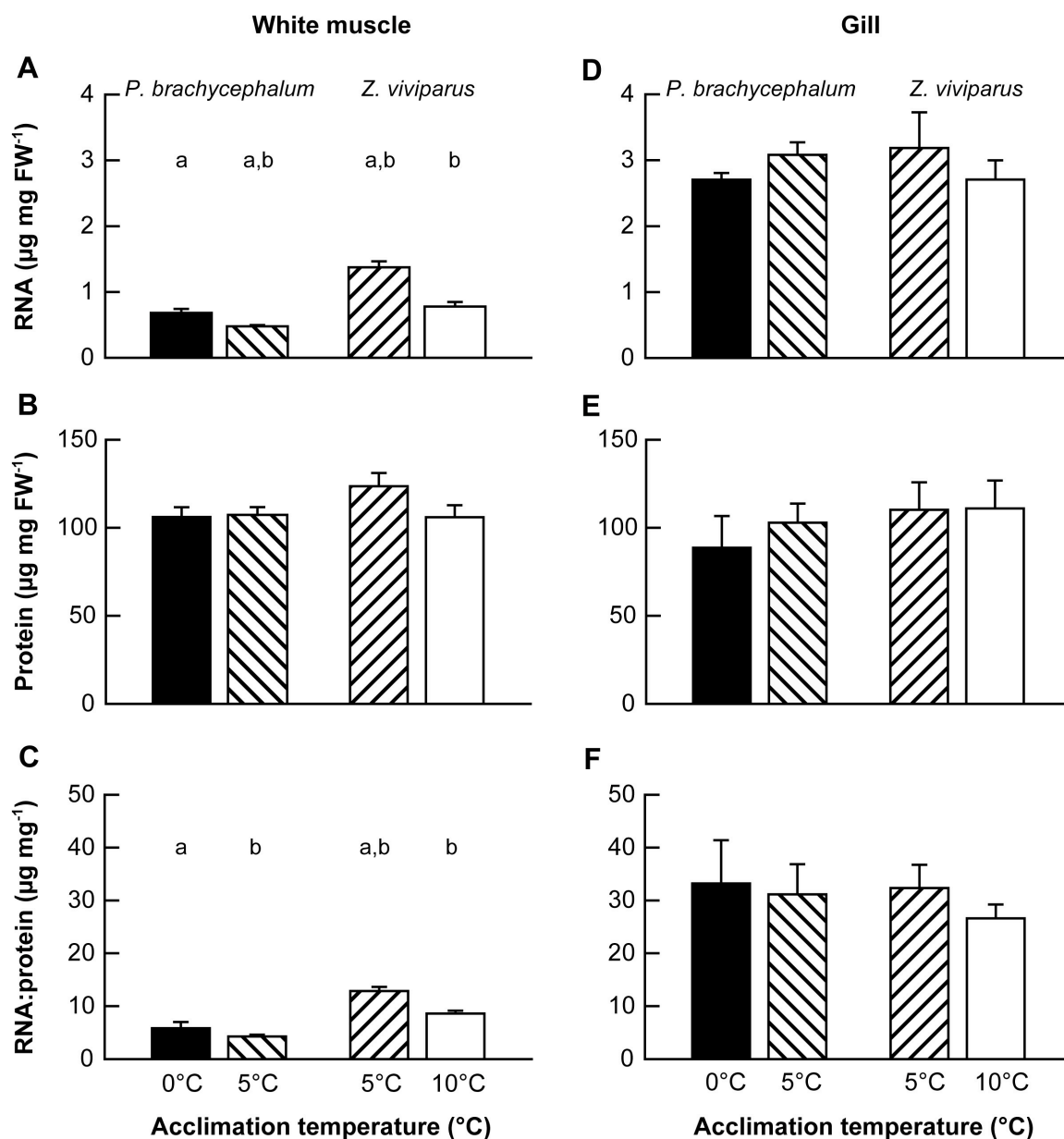


Fig. 1. RNA (A: white muscle; D: gill), protein (B: white muscle; E: gill) concentrations and RNA:protein ratios (C: white muscle; F: gill) in *P. brachycephalum* under control conditions (0 °C) (black bars), in warm-acclimated *P. brachycephalum* (5 °C) (hatched bars next to black bars), in cold-acclimated *Z. viviparus* (5 °C) (hatched bars next to white bars) and in control *Z. viviparus* (10 °C) (white bars). Data points are means \pm SE ($n = 6$). Only the same tissues were tested for the significance of differences. Values with the same letter are significantly different.

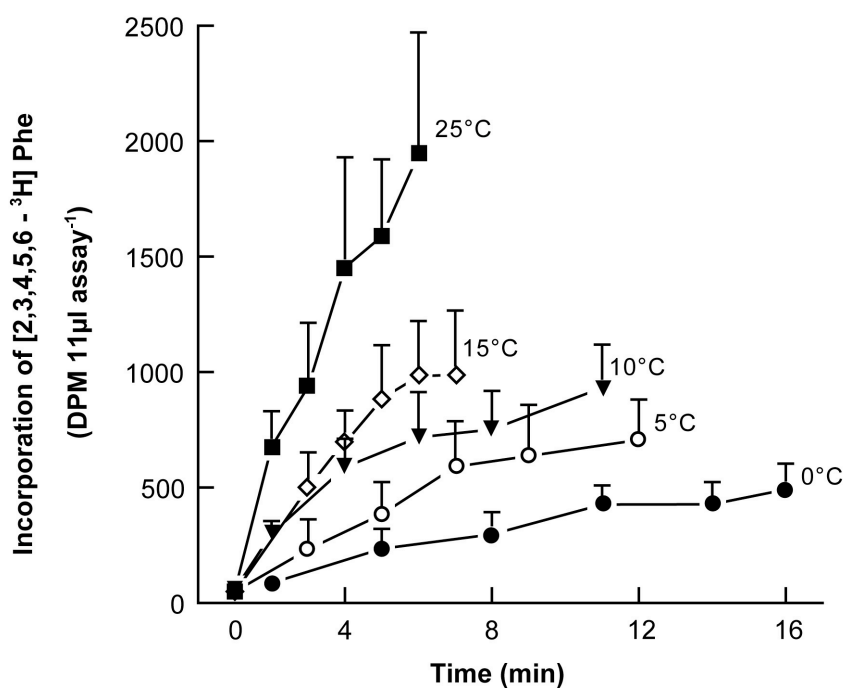


Fig. 2. Time course of incorporation of [2,3,4,5,6- ^3H] Phe into trichloroacetic acid-precipitable protein at different temperatures by cell-free lysates prepared from gills of control *P. brachycephalum* maintained at 0 °C. (0 °C: filled circles; 5 °C: open circles; 10 °C: filled triangles; 15 °C: open rhombuses; 25 °C: closed squares). Data points are means \pm SE ($n = 5$).

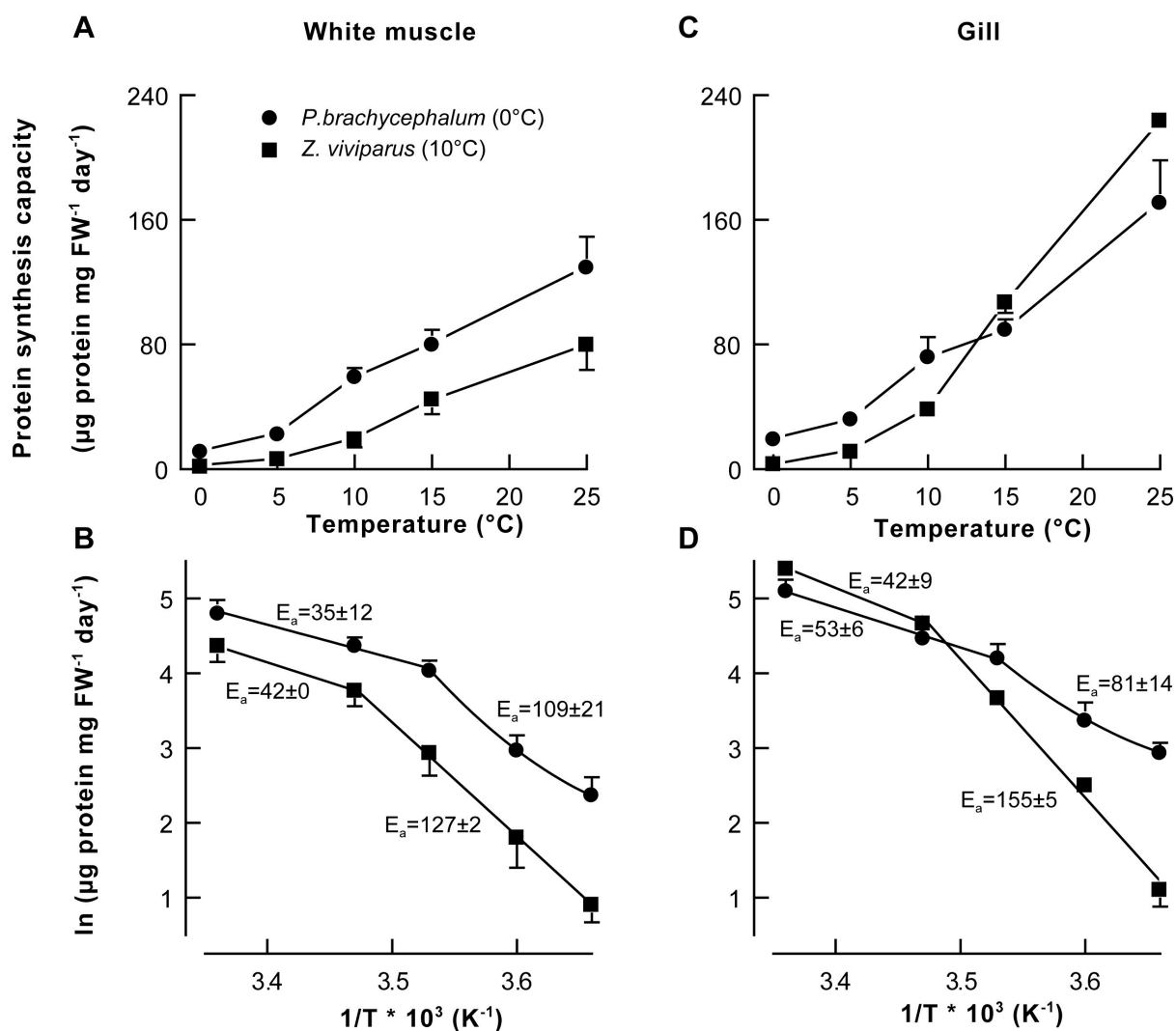


Fig. 3. Temperature dependent *in vitro* protein synthesis capacities in white muscle (A) and gills (C) of control *P. brachycephalum* and control *Z. viviparus*. Arrhenius plots and discontinuities in protein synthesis capacities measured in lysates of white muscle (B) and of gills (D) result as intersections of linear ($r=0.99$ in the temperature range 10°C – 25°C) and second order polynomial regressions ($r=1.0$ in the temperature range 0°C – 10°C) for protein synthesis capacities in both tissues of *P. brachycephalum* and as a linear regression ($r=0.99$ in the temperature range 0°C – 15°C) for protein synthesis capacities in both tissues of *Z. viviparus*. (Closed circles: control *P. brachycephalum* maintained at 0°C , closed squares: control *Z. viviparus* maintained at 10°C). Data points are means \pm SE (control *P. brachycephalum* $n = 5$; control *Z. viviparus* $n = 3$).

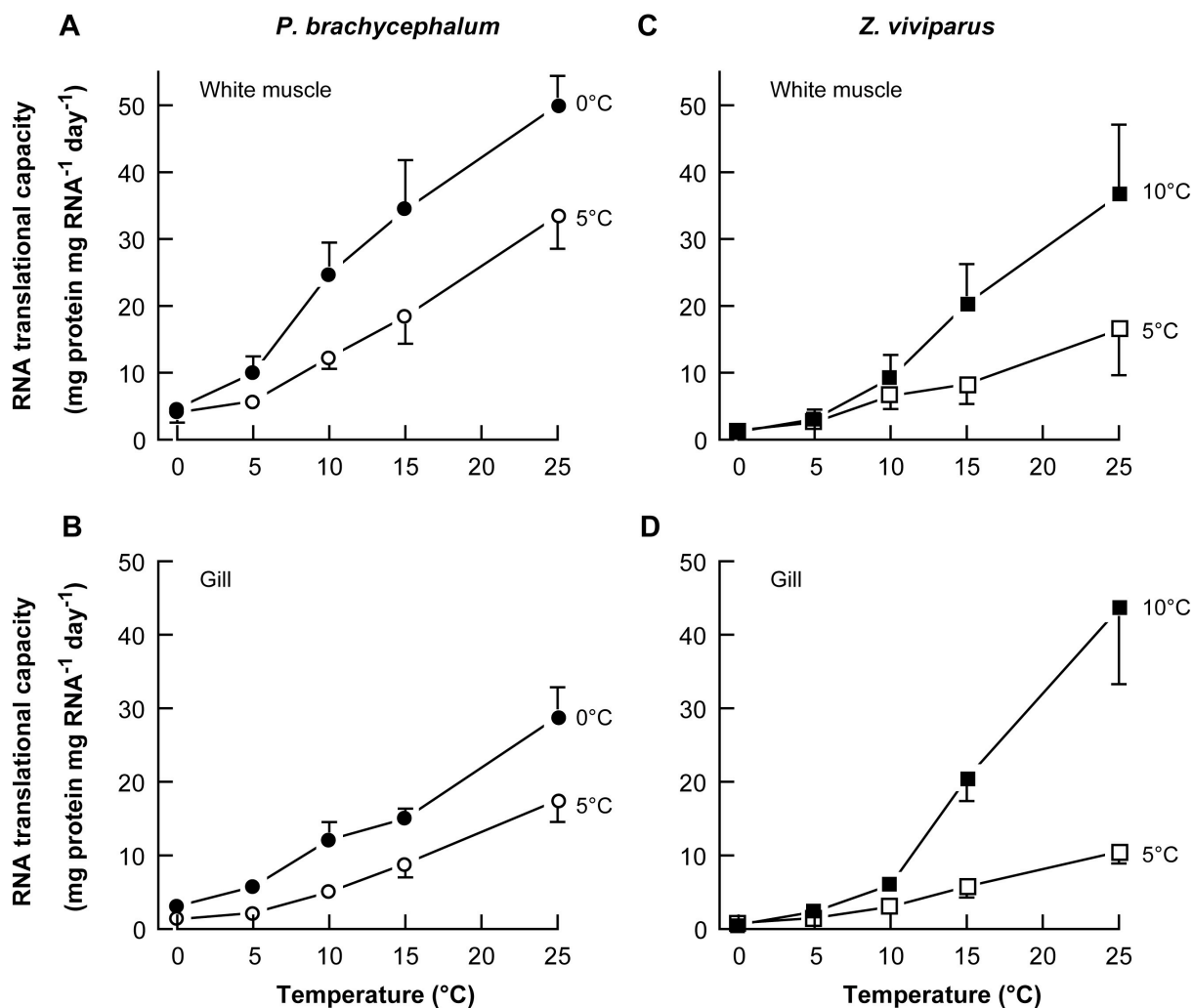


Fig. 4. Temperature dependent RNA translational capacities in lysates prepared from white muscle (A) and gills (B) of *P. brachycephalum* and in lysates prepared from white muscle (C) and gills (D) of *Z. viviparus* acclimated to various temperatures. (Closed circles: control *P. brachycephalum* maintained at 0 °C; open circles: warm-acclimated *P. brachycephalum* (5 °C); closed squares: control *Z. viviparus* maintained at 10 °C; open squares: cold-acclimated *Z. viviparus* (5 °C)). Data points are means \pm SE (control and warm-acclimated *P. brachycephalum* $n = 5$; control *Z. viviparus* $n = 3$; cold-acclimated *Z. viviparus* $n = 4$).

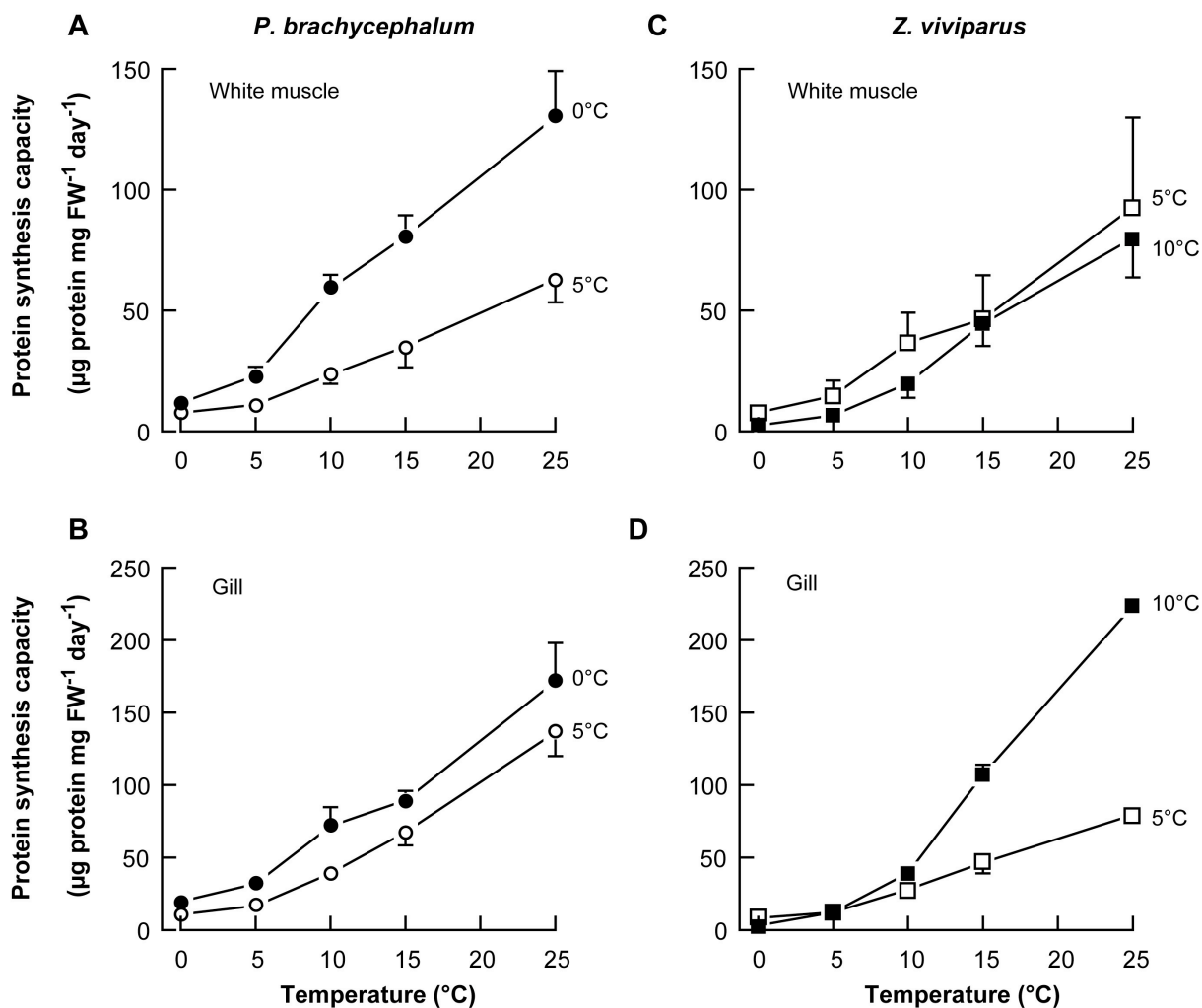


Fig. 5. Temperature dependent protein synthesis capacities in lysates prepared from white muscle (A) and gills (B) of *P. brachycephalum* and in lysates prepared from white muscle (C) and gills (D) of *Z. viviparus* acclimated to various temperatures. Data of *in vitro* protein synthesis capacities in white muscle and gills of control *P. brachycephalum* and control *Z. viviparus* were adopted from Fig. 3(A&C). (Closed circles: control *P. brachycephalum* maintained at 0 °C; open circles: warm-acclimated *P. brachycephalum* (5 °C); closed squares: control *Z. viviparus* maintained at 10 °C; open squares: cold-acclimated *Z. viviparus* (5 °C)). Data points are means \pm SE (control and warm-acclimated *P. brachycephalum* $n = 5$; control *Z. viviparus* $n = 3$; cold-acclimated *Z. viviparus* $n = 4$).

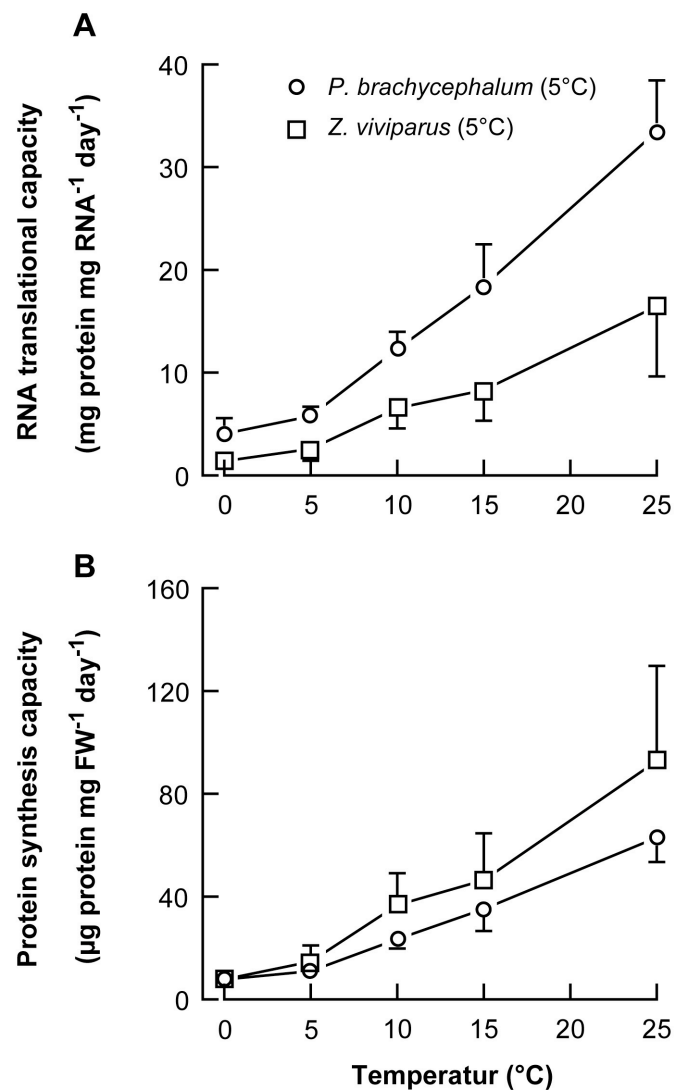


Fig. 6. Temperature dependent RNA translational capacities (A) and protein synthesis capacities (B) in lysates prepared from white muscle of warm-acclimated *P. brachycephalum* and of cold-acclimated *Z. viviparus*. RNA translational capacities were adopted from Fig. 4 and protein synthesis capacities from Fig. 5. (Open circles: warm-acclimated *P. brachycephalum* maintained at 5 °C; open squares: cold-acclimated *Z. viviparus* maintained at 5 °C). Data points are means \pm SE (warm-acclimated *P. brachycephalum* $n = 5$; cold-acclimated *Z. viviparus* $n = 4$).

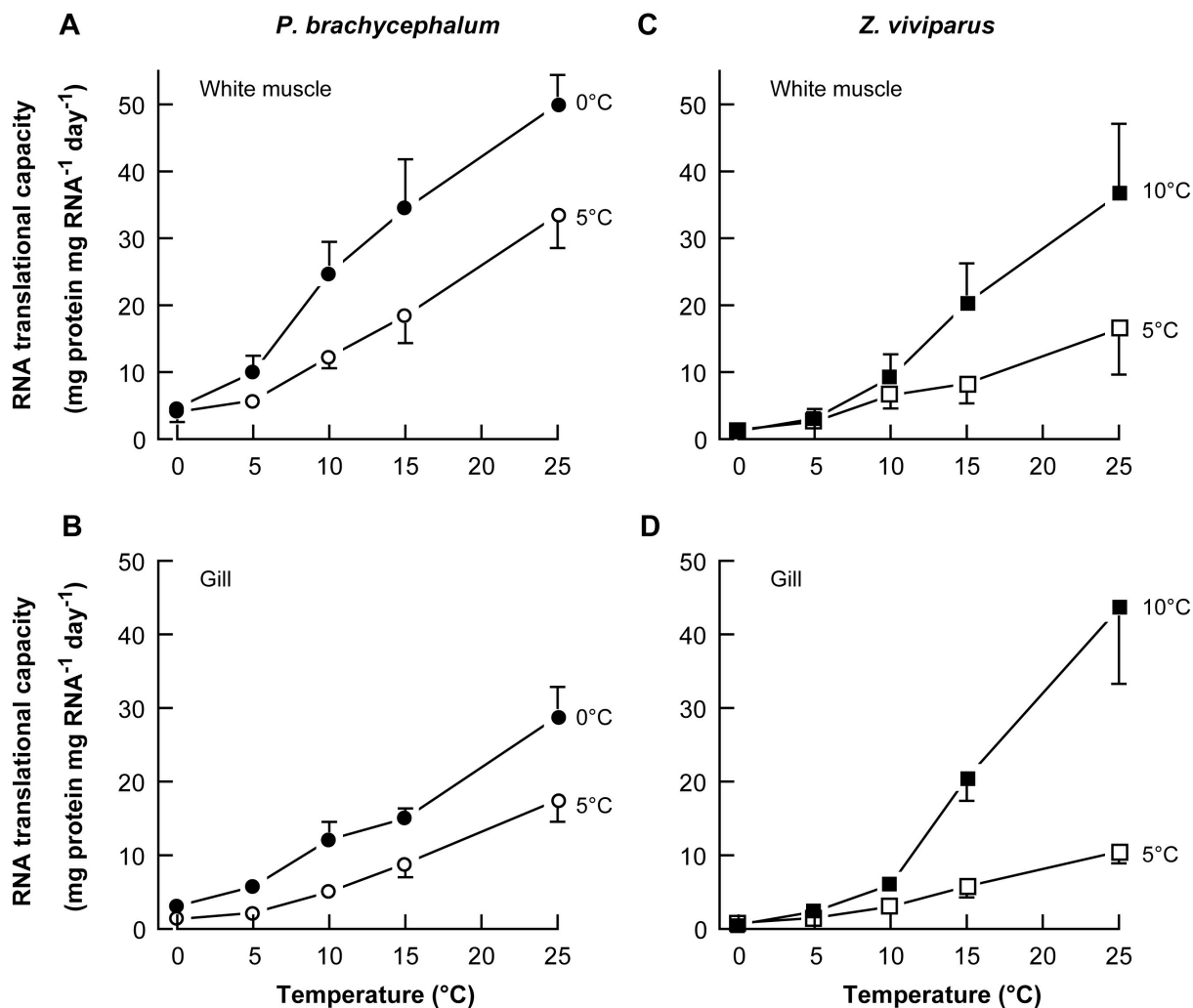


Fig. 7. Comparison of Arrhenius plots of protein synthesis capacities obtained in lysates of white muscle (A&C) and gills (B&D) and resulting as the intersection of linear ($r=0.99$ in the temperature range $10\text{ }^{\circ}\text{C}$ – $25\text{ }^{\circ}\text{C}$) and second order polynomial regressions ($r=1.0$ in the temperature range $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ – $10\text{ }^{\circ}\text{C}$) for control *P. brachycephalum* (A&B) and for cold acclimated *Z. viviparus* (C&D) and warm-acclimated *P. brachycephalum* (A&B). Arrhenius plots of protein synthesis capacities measured in lysates prepared from white muscle of warm-acclimated *P. brachycephalum* result as the intersection of linear (in the temperature range of $10\text{ }^{\circ}\text{C}$ – $25\text{ }^{\circ}\text{C}$, $r = 0.99$) and a steeper linear curve progression in the temperature range of $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ – $10\text{ }^{\circ}\text{C}$ ($r=1$). A linear regression ($r=0.99$ in the temperature range $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ – $15\text{ }^{\circ}\text{C}$) for protein synthesis capacities was found for lysates prepared from white muscle and gills of control *Z. viviparus* (C&D). (Closed circles: control *P. brachycephalum* maintained at $0\text{ }^{\circ}\text{C}$, open circles: warm acclimated *P. brachycephalum* ($5\text{ }^{\circ}\text{C}$), closed squares: control *Z. viviparus* maintained at $10\text{ }^{\circ}\text{C}$, open squares: cold acclimated *Z. viviparus* ($5\text{ }^{\circ}\text{C}$)). Data points are means \pm SE (control and warm-acclimated *P. brachycephalum* $n = 5$; control *Z. viviparus* $n = 3$; cold-acclimated *Z. viviparus* $n = 4$).

4. Diskussion

Die Diskussion befasst sich mit den wichtigsten Ergebnissen aus den Publikationen I, II und III und ergänzt sie durch zusätzliche Ergebnisse. Die Bedeutung der Ergebnisse wird im Lichte der drei in der Einleitung erläuterten Hypothesen diskutiert. Unterschiede und Gemeinsamkeiten zwischen den polaren Evertebraten und Fischen sollen herausgearbeitet werden, um eventuell allgemeine Prinzipien der Anpassung des Proteinsyntheseapparates an kalte Temperaturen zu erkennen.

4.1. Die energetischen Kosten der Proteinbiosynthese

Leben in der permanenten Kälte der Antarktis ist mit einem niedrigen Sauerstoffverbrauch assoziiert und somit nicht so „teuer“ wie das Leben in wärmeren Gebieten. Der niedrigere Sauerstoffbedarf könnte u. a. durch reduzierte Proteinumsätze oder niedrigere Aktivitäten der Ionenpumpen in der Kälte verursacht werden (Clarke 1991). Eine Grundvoraussetzung für die bereits in der Einleitung erläuterte „Energiebudget Hypothese“ ist, dass die energetischen Kosten für die zellulären Prozesse unabhängig von der Temperatur gleich bleiben.

Erste Berechnungen zu den Kosten der Proteinbiosynthese in kalt stenothermen antarktischen Tieren beruhen auf Messungen des Sauerstoffverbrauchs und ergaben zwischen 0.5-0.6 ATP pro Peptidbindung in Seeigelembryonen *Sterechinus neumayeri* (Marsh *et al.* 2001) und 97 ATP pro Peptidbindung in der antarktischen Assel *Glyptonotus antarcticus* (Whiteley *et al.* 1996). Der Anteil der Proteinbiosynthese am Sauerstoffverbrauch ist jedoch sehr problematisch abzuschätzen und kann durch methodische Probleme stark von dem theoretischen Wert von 4 ATP pro Peptidbindung abweichen (Wieser und Krumschnabel 2001; Aoyagi *et al.* 1988; Waterlow und Millward 1989; Houlihan *et al.* 1995). In der vorliegenden Arbeit wurde deswegen eine ganz neue Methode entwickelt, mit der die energetischen Kosten in einem *in vitro* System auf direktem Weg am isolierten Proteinsyntheseapparat bestimmt werden können. Diese Methode wird ausführlich in Publikation I diskutiert und das Prinzip soll nur kurz zusammengefasst werden. Der *in vitro* Translationsassay hat den Vorteil, dass der Proteinsyntheseapparat verschiedener Arten unter gleichen standardisierten, physiologischen Bedingungen verglichen werden kann. Inzwischen ist es allgemein anerkannt, dass die Proteinbiosynthese im zellfreien *in vitro* System genau so reguliert wird, wie in der intakten Zelle. Durch Optimierung des Translationsassays kann die Maximalgeschwindigkeit der Proteinbiosynthese, die Proteinsynthesekapazität, gemessen werden (Jackson 1982; Simon 1987; Lopo *et al.* 1989; Patnaik und Swartz 1998). Zunächst musste der Translationsassay also optimiert werden, um den Vergleich der energetischen Kosten, aber auch der Proteinsynthesekapazitäten zwischen den Arten, nicht durch

Substratlimitierung zu verfälschen. Insbesondere die Zugabe von PLA bei den Pectiniden bzw. PCr bei den Zoarciden, sowie von ATP und GTP war wichtig, um maximale *in vitro* Proteinsyntheseraten zu erlangen (siehe Abbildung 2 in Publikation I, S. 26). Dies wurde auch in vielen anderen zellfreien Translationssystemen beobachtet (Spirin *et al.* 1988; Kawarasaki *et al.* 1995 und 1998; Kang *et al.* 2000). Über die gesamte Zeit der Proteinbiosynthese sorgte das PLA-Regenerationssystem (PLA und Argininkinase) für konstante ATP- und GTP-Konzentrationen im Translationsassay (siehe Abbildung 4 in Publikation I, S. 27), so dass der Energiebedarf für die Proteinbiosynthese ausschließlich aus dem PLA-Verbrauch berechnet werden konnte. Der PLA-Abbau über die Zeit wurde in zwei parallelen Assays des gleichen Lysates gemessen, in denen die Proteinbiosynthese einmal inhibiert und einmal nicht inhibiert wurde.

Damit konnte zwischen dem PLA-Verbrauch der Proteinbiosynthese und anderen energieverbrauchenden Prozessen im Translationsassay unterschieden werden. Die Differenz (PLA-Abnahme: Abbildung 4B) zwischen den beiden Kurven entsprach den Kosten

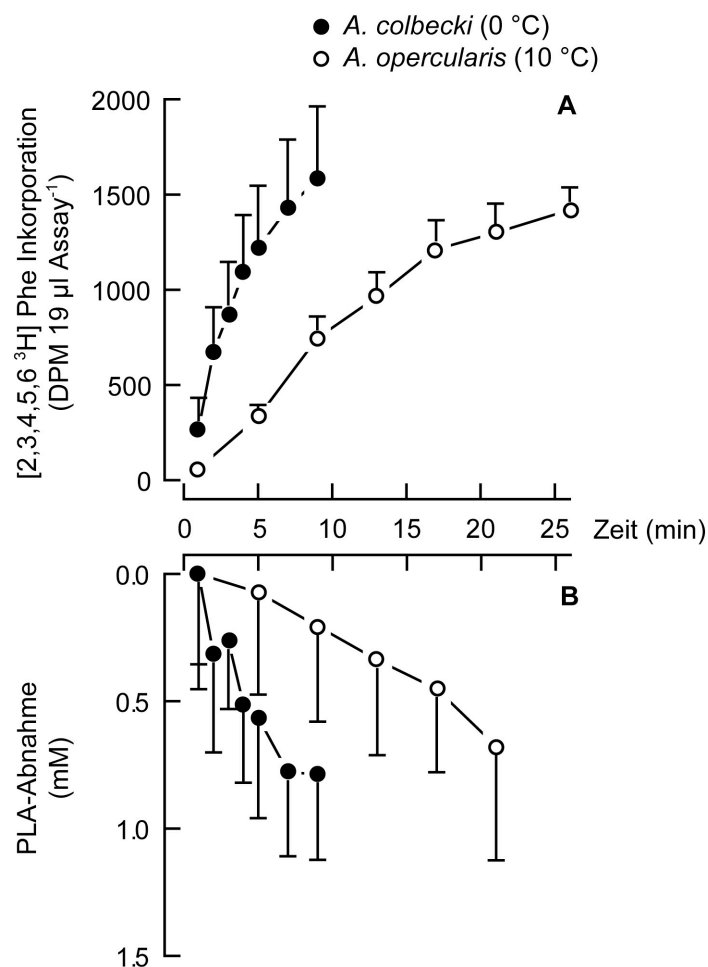


Abbildung 4: *In vitro* Inkorporation von [2,3,4,5,6-³H] Phe in neu synthetisiertes Protein über die Zeit (A), Durch Proteinbiosynthese verursachte PLA-Abnahme im *in vitro* Assay (B).

der Proteinbiosynthese. Die zum PLA-Abbau gehörige Proteinbiosynthese im Translationsassay wurde in einem dritten parallelen Assay des gleichen Lysates durch Einbau von radioaktivem Phenylalanin über die Zeit detektiert (Abbildung 4A). Der PLA-Verbrauch konnte dann direkt auf die Proteinbiosynthese bezogen werden. Auf diese Weise wurden die energetischen Kosten in den Kiemenlysaten der beiden Pectinidenarten bestimmt.

Der berechnete Energiebedarf für *A. opercularis* betrug 5.6 ± 0.6 PLA pro Peptidbindung und für *A. colbecki* 4.3 ± 0.7 PLA pro Peptidbindung. Die energetischen Kosten für die Proteinbiosynthese unterschieden sich nicht signifikant zwischen der antarktischen und der europäischen Kammuschel und kommen den theoretisch berechneten Kosten von 4 ATP pro Peptidbindung sehr nahe. Die hier entwickelte Methode ist wesentlich genauer, als die mit Hilfe des Sauerstoffverbrauches geschätzten Kosten für die Proteinbiosynthese. Es muss an anderen ektothermen Tieren getestet werden, ob dieses Ergebnis allgemeingültig ist. In den Kiemen der Kammuscheln trifft die Grundvoraussetzung für die „Energiebudget Hypothese“ zu. In der antarktischen *A. colbecki* haben sich die energetischen Kosten für die Proteinbiosynthese über eine lange Zeit der Adaptation an kalte Temperaturen nicht geändert. Trotz eines geringeren Gesamtenergieumsatzes aufgrund des kalt stenothermen Lebens in der permanenten Kälte (Pörtner 2002a) funktioniert die Proteinbiosynthese bei der kalt stenothermen und der eurythermen Kammuschelart wahrscheinlich gleich, das heißt 2 ATP werden für die Aminoacylierung und 2 GTP für die Peptidbindung gebraucht.

4.2. Temperaturkompensation

4.2.1. Temperaturabhängigkeit der Proteinsynthesekapazitäten

Im optimierten Translationsassay konnten nicht nur die energetischen Kosten, sondern auch die Kapazitäten des isolierten Proteinsyntheseapparates unter nicht limitierenden, physiologischen Bedingungen bei Pectiniden und Zoarciden untersucht werden. Dies sollte Aufschluss darüber geben, ob die Kapazitäten der Proteinbiosynthese der antarktischen Arten im Vergleich zu ihren Artverwandten aus wärmeren Gebieten kältekompensiert sind. Der isolierte Proteinsyntheseapparat und der RNA Gehalt sind eine Momentaufnahme des Syntheseapparates aus dem lebenden Organismus und spiegeln die Anpassung an die vorangegangenen Umweltbedingungen wider. Die Proteinsynthese ist sehr variabel und ändert sich beispielsweise mit dem Nahrungsangebot, der Größe bzw. dem Entwicklungsstand der Tiere (Übersichtsartikel von Houlihan 1991). Für die Präparation der Lysate wurden deswegen Tiere von gleicher Größe und gleichem Ernährungszustand eingesetzt, um diese Effekte auf den Proteinsyntheseapparat zu minimieren. Unterschiede zwischen der

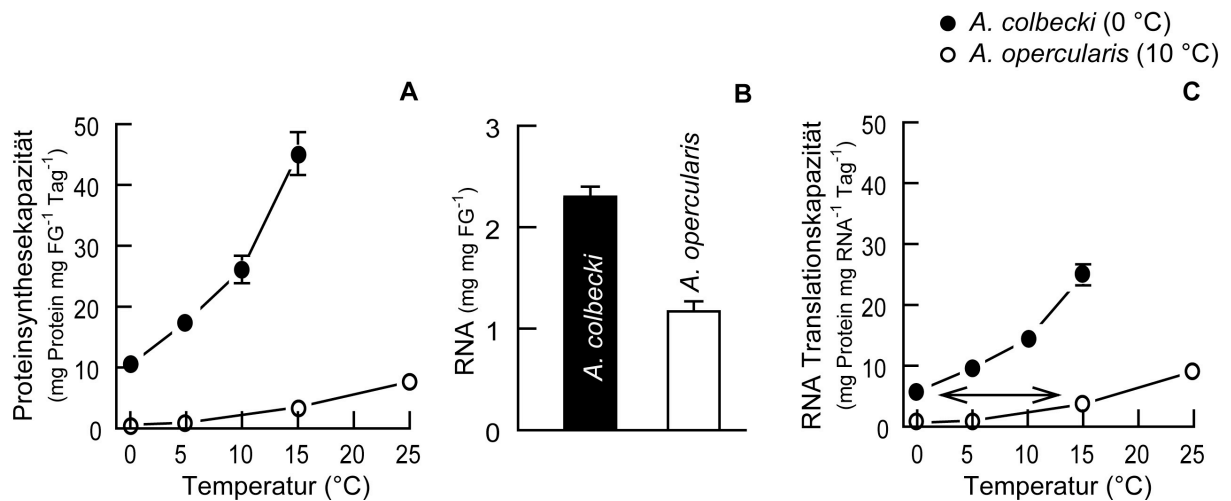


Abbildung 5: *In vitro* Proteinsynthesekapazität in Abhängigkeit von der Temperatur (A), RNA Gehalt (B), *in vitro* RNA Translationskapazität in Abhängigkeit von der Temperatur (C) in Kiemen von *A. colbecki*, gehalten bei 0 °C, und *A. opercularis*, gehalten bei 10 °C.

Proteinsynthesekapazität der kalt stenothermen und der eurythermen Pectiniden bzw. Zoarciden können daher als Adaptation an ihre Umgebungstemperatur gesehen werden.

Die *in vitro* Proteinsynthesekapazität erhöhte sich mit zunehmender Assaytemperatur in beiden Pectinidenarten (Abbildung 5A). Während die Proteinsynthesekapazität in *A. colbecki* (gehalten bei 0 °C) mit einem $Q_{10(0-15\text{ °C})}$ von 2.2 anstieg, war die Temperaturabhängigkeit in *A. opercularis* (gehalten bei 10 °C) deutlich höher ($Q_{10(0-15\text{ °C})} = 3.4$). Dies spiegelt sich auch in der Aktivierungsenergie wider, die bei *A. colbecki* signifikant niedriger lag als bei *A. opercularis* ($E_a = 63$ versus $E_a = 79$). Die geringere Temperaturabhängigkeit im Einklang mit einer niedrigeren Aktivierungsenergie bei den antarktischen Kammuscheln weisen auf eine Temperaturkompensation hin. Viele Enzyme kalt adaptierter Tiere besitzen niedrige Aktivierungsenergien, um niedrigen Reaktionsgeschwindigkeiten durch abnehmende Temperaturen entgegenzuwirken (Hochachka und Somero 1984; Marshal 1997; D'Amico *et al.* 2002). Verschiedenste Enzyme sind in die Proteinbiosynthese involviert, so dass die Aktivierungsenergie des gesamten Proteinsyntheseapparates ein Summenparameter ist. Auch im Einklang mit der geringeren Aktivierungsenthalpie war die Proteinsynthesekapazität in den Kiemenlysaten der stenothermen *A. colbecki* bei allen Messtemperaturen signifikant höher als in den Kiemenlysaten der eurythermen *A. opercularis* (Abbildung 5A).

Die Proteinsynthesekapazitäten in den Kiemen- und Muskellysaten der antarktischen Aalmuttern lagen ebenfalls in dem Temperaturbereich 0-10 °C höher als bei den Nordsee Aalmuttern im Bereich 0-15 °C (Abbildung 6A, 7A). Im unteren Temperaturbereich zeigte der Vergleich der beiden Aalmutterarten das gleiche Bild wie bei den Pectiniden. Die *in vitro* Proteinsynthesekapazität in den Kiemen der antarktischen *P. brachycephalum* (gehalten

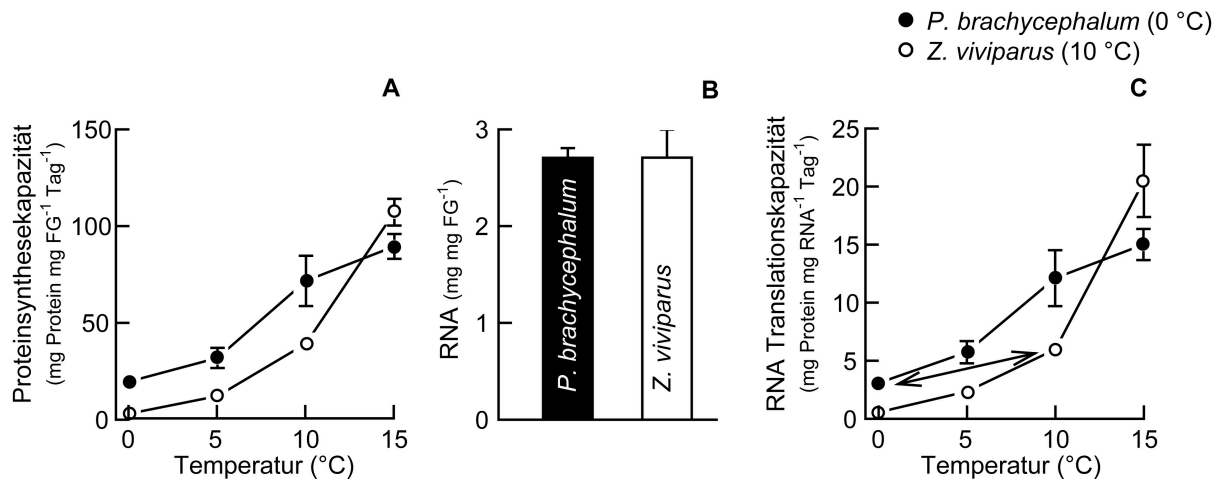


Abbildung 6: *In vitro* Proteinsynthesekapazität in Abhängigkeit von der Temperatur (A), RNA Gehalt (B), *in vitro* RNA Translationskapazität in Abhängigkeit von der Temperatur (C) in der Kieme von *P. brachycephalum*, gehältert bei 0 °C, und *Z. viviparus*, gehältert bei 10 °C.

bei 0 °C) war wesentlich weniger von der Temperatur abhängig ($Q_{10(0-10\text{ °C})} = 3.9$), als die der temperierten *Z. viviparus* ($Q_{10(0-15\text{ °C})} = 10.6$). Die Aktivierungsenergien unterschieden sich signifikant ($E_a = 88$ versus $E_a = 155$). In den Muskellysaten konnte zwischen den beiden Arten kein Unterschied im Q_{10} oder der Aktivierungsenergie E_a gefunden werden. Bei 0 °C war die Proteinsynthesekapazität in den Kiemen der antarktischen Kammmuschel 18fach höher, und die Synthesekapazität in den Kiemen bzw. dem Muskel der antarktischen Aalmutter 6fach bzw. 4.6fach höher als die Proteinsynthesekapazitäten der verwandten Arten aus wärmeren Gebieten. Dies zeigt deutlich, dass die polaren Organismen, unabhängig zu welcher Tiergruppe sie gehören, trotz eines niedrigeren Energieumsatzes einen kältekompenzierten Proteinsyntheseapparat entwickelt haben.

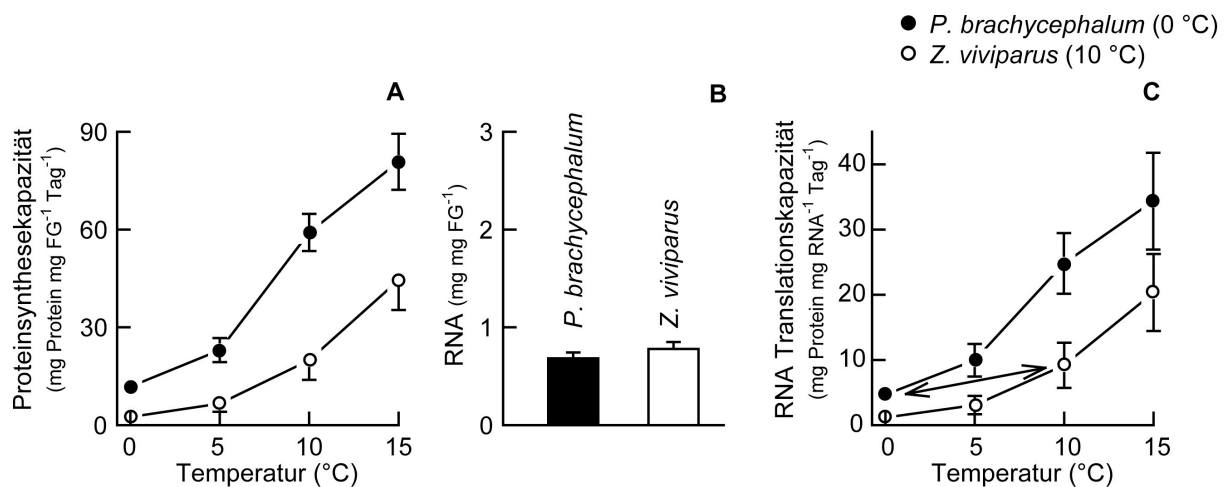


Abbildung 7: *In vitro* Proteinsynthesekapazität in Abhängigkeit von der Temperatur (A), RNA Gehalt (B), *in vitro* RNA Translationskapazität in Abhängigkeit von der Temperatur (C) im Muskel von *P. brachycephalum*, gehältert bei 0 °C, und *Z. viviparus*, gehältert bei 10 °C.

4.2.2. RNA Translationskapazitäten

Es schloss sich im folgenden die Frage an, ob die polaren Tiere die Proteinsynthesekapazität durch eine Erhöhung ihrer RNA Konzentration im Gewebe oder durch eine Erhöhung der RNA Translationskapazität kompensieren. In den Geweben der Kammuscheln und Aalmuttern wurde deswegen der RNA Gehalt bestimmt (Abbildung 5B, 6B, 7B). Die im Translationsassay gemessenen Proteinsynthesekapazitäten (mg neu synthetisiertes Protein $\text{mg Gewebe}^{-1} \text{Tag}^{-1}$, Abbildung 5A, 6A, 7A) konnten dann für die unterschiedlichen RNA Gehalte in den Lysaten korrigiert und die RNA Translationskapazitäten in den Assays berechnet werden ($\text{mg neu synthetisiertes Protein mg RNA}^{-1} \text{Tag}^{-1}$, Abbildung 5C, 6C, 7C). Die antarktische Kammuschel hatte signifikant höhere RNA Gehalte in der Kieme als die europäische Art. Die antarktische Aalmutter hingegen wies gegenüber der Nordsee Aalmutter weder in den Kiemen noch im Muskel höhere RNA Gehalte auf. Der Vergleich bei 0 °C zeigte eine 18fach höhere Proteinsynthesekapazität in der antarktischen Kammuschel. Der geringere Teil konnte durch höhere RNA Gehalte im Gewebe (2fach: Abbildung 5B), der größere Teil durch erhöhte RNA Translationskapazitäten (9fach: Abbildung 5C) erklärt werden. Bei den antarktischen Aalmuttern war die im Vergleich zur Nordsee Aalmutter hohe Proteinsynthesekapazität bei 0 °C in beiden Geweben ausschließlich durch eine höhere RNA-Translationsaktivität (Abbildung 6C, 7C) begründet.

Die hohen Kapazitäten der Ribosomen könnten durch funktionale Optimierung der Primärstrukturen ribosomaler Kernproteine, der Initiations-, Elongations- oder Terminationsfaktoren hervorgerufen werden. Eine weitere Erklärung wären höhere Aktivitäten der in die Proteinbiosynthese involvierten Enzyme. Strukturelle Modifikationen des Proteinsyntheseparates konnten für verschiedene Mikroorganismen demonstriert werden (Ray *et al.* 1998; Thomas und Cavicchioli 2002). Erhöhte Aktivitäten des Elongationsfaktors EF-1 wurden in der Leber des antarktischen Fisches *Trematomus bernacchii* im Vergleich zu temperierten und tropischen Fischen gezeigt (Nielsen 1979; Haschemeyer und Williams 1982).

4.3. Akklimation

Akklimation oder „Akklimation“ ektothermer Organismen an niedrige Temperaturen ist häufig mit einer Erhöhung der RNA Konzentrationen bzw. der RNA:Protein Verhältnisse verbunden, um einer bei kalten Temperaturen niedrigeren RNA Aktivität entgegenzuwirken (Goolish *et al.* 1984; Foster *et al.* 1992; Foster *et al.* 1993; Mathers *et al.* 1993; McCarthy und Houlihan 1996; McCarthy *et al.* 1999). Verschiedene Autoren schlagen eine Extrapolation dieser „Akklimationshypothese“ auf kalt adaptierte Ektotherme im Vergleich zu ihren eurythermen Artverwandten vor (McCarthy und Houlihan 1996; Fraser *et al.* 2002a). Das muss nach den Erkenntnissen aus dieser Arbeit und den in der Literatur vorhandenen Angaben revidiert werden. Erhöhte RNA Konzentrationen bzw. RNA:Protein Verhältnisse wurden bisher nicht in antarktischen Fischen, (*P. brachycephalum*: Abbildung 6B, 7B; Smith und Haschemeyer 1980; Hardewig *et al.* 1999) sondern ausnahmslos nur in antarktischen Evertabraten nachgewiesen (Whiteley *et al.* 1996; Marsh *et al.* 2001; Robertson *et al.* 2001; Fraser *et al.* 2002a). In dieser Arbeit wurden höhere RNA Gehalte nur für die untersuchten Gewebe der antarktischen Kammmuschel gefunden (siehe Abbildung 3 aus Publikation II, S. 39). Der Vergleich der RNA Translationskapazitäten der beiden Kammmuschelarten, gemessen bei ihrer jeweiligen Umgebungstemperatur, zeigte bei Normalisierung auf den gleichen RNA Gehalt eine vollständig kompensierte RNA Translationskapazität für *A. colbecki* (0 °C *A. colbecki* versus 15 °C *A. opercularis*: durch den Pfeil in der Abbildung 5C verdeutlicht). Die hohen RNA Gehalte dienen also nicht als Kompensation für niedrige RNA Translationskapazitäten, sondern stellen vielmehr eine „Überkompensation“ dar. Diese soll später noch eingehender diskutiert werden.

Der Vergleich der RNA Translationskapazitäten in Kiemen und Muskel der Aalmuttern zeigte sowohl in den Kiemen als auch im Muskel der antarktischen Aalmutter etwas niedrigere RNA Translationskapazitäten gegenüber der Nordsee Aalmutter (0 °C *P. brachycephalum* versus 10 °C *Z. viviparus*: durch den Pfeil in der Abbildung 6C bzw. 7C verdeutlicht). Es traten keine Unterschiede im RNA Gehalt bzw. RNA:Protein Verhältnis zwischen den beiden Arten auf. Daher stellte sich die Frage, wie sich die Proteinsyntheseapparate der unterschiedlich adaptierten Aalmuttern bei Akklimation von ihrer Umgebungstemperatur (0 °C *P. brachycephalum* versus 10 °C *Z. viviparus*) an 5 °C verhalten würden. Es sollte geklärt werden, ob die antarktische und die Nordsee Aalmutter bei der niedrigeren Inkubationstemperatur ein höheres RNA:Protein Verhältnis zur Kompensation niedriger RNA-Translationskapazitäten aufweisen. In der Kieme waren weder im RNA Gehalt noch im RNA:Protein Verhältnis Unterschiede bei den verschiedenen Inkubationstemperaturen und Arten zu sehen. Im weißen Muskel hingegen waren bei der jeweils niedrigeren

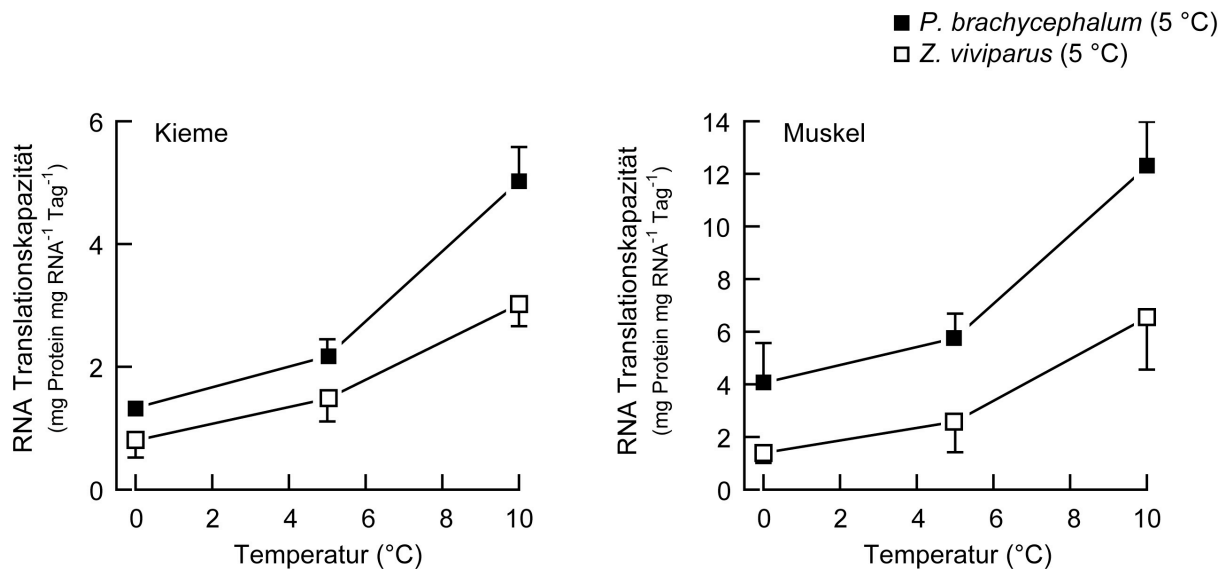


Abbildung 8: *In vitro* RNA Translationskapazitäten in Kiemen und Muskel von *P. brachycephalum* und *Z. viviparus* „akklimiert“ an 5 °C.

Inkubationstemperatur für beide Arten (*P. brachycephalum* 0 °C und *Z. viviparus* 5 °C) die RNA Gehalte signifikant erhöht. Das bedeutet, dass die RNA Gehalte der *P. brachycephalum*, genau wie bei *Z. viviparus*, temperaturabhängig sind und bei wärmeren „Akklimatationstemperaturen“ sinken (siehe Abbildung 1 aus Publikation III, S. 37). Der Hypothese entsprechend war die RNA Translationskapazität im weißen Muskel von *Z. viviparus* bei 5 °C reduziert. Dahingegen wies der weiße Muskel von *P. brachycephalum*, den Erwartungen widersprechend, bei 0 °C deutlich höhere RNA Translationskapazitäten als bei 5 °C auf. Unabhängig von diesem Unterschied zeigen beide Aalmutterarten sowohl im RNA Gehalt als auch in der RNA Translationskapazität die Fähigkeit den Proteinsyntheseapparat an unterschiedliche Temperaturen anzupassen. Jedoch ist der Temperaturbereich, in dem die Anpassung erfolgt, jeweils innerhalb der jeweiligen Temperaturtoleranz der beiden Arten. Im zwischenartlichen Vergleich besaß *P. brachycephalum* deutlich höhere RNA Translationskapazitäten in Kiemen und Muskel als *Z. viviparus* (Abbildung 8).

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass sowohl die antarktischen Evertibraten als auch die Fische im Vergleich zu ihren verwandten Arten aus wärmeren Gebieten kälte-kompensierte Proteinsynthesekapazitäten besitzen. Diese sind durch kompensierte RNA Translationskapazitäten erklärbar, was für die Entwicklung eines kosteneffizienten Wachstumsapparates spricht. Bei den Evertibraten kommt zusätzlich zur Kompensation der RNA Translationskapazitäten als weitere Anpassung an die kalten Temperaturen eine Erhöhung der RNA Gehalte hinzu. Die höheren RNA Gehalte in der Kieme der antarktischen *A. colbecki* führten im Vergleich zur europäischen *A. opercularis* zu einer Steigerung der Proteinsynthesekapazität um einen Faktor 2 (Abbildung 5B). Die 18fach höhere Proteinsynthesekapazität bei 0°C war jedoch hauptsächlich durch erhöhte RNA Translationskapazitäten zu

erklären (9fach: Abbildung 5C). Die „Überkompensation“ der RNA Gehalte könnte daher eher ein positiver Nebeneffekt niedriger RNA Umsatzraten bei niedrigen Temperaturen sein, der außerdem geringere Diffusionswege der neu synthetisierten Proteine zu ihren Zielorten erlaubt.

4.4. Die drei Hypothesen

4.4.1. *In vivo* Temperaturanpassung

Die erste in der Einleitung erwähnte Hypothese, dass der direkte Einfluss der Temperatur auf physiologische und biochemische Reaktionen in der Zelle Ursache für das langsamere jährliche Wachstum der Tiere ist, kann zumindest für die Kammmuscheln und Aalmuttern klar verneint werden. Die untersuchten polaren Organismen zeigen eine deutliche Kompensation ihres Proteinsyntheseapparates, gekennzeichnet durch niedrige Aktivierungsenergien und hohe RNA Translationskapazitäten im Vergleich zu ihren borealen Artverwandten. Die hohen Kapazitäten des Proteinsyntheseapparates in kalt stenothermen

Tabelle 1. Proteinsyntheseraten (k_s), Translationseffizienz (k_{RNA}) und RNA Gehalt in Kiemen verschiedener Evertebraten und Fische (alle gefüttert) adaptiert an verschiedene Umgebungstemperaturen. Ausgeschlossen der Werte aus dieser Arbeit (grau hinterlegt) wurden alle Daten *in vivo* erhoben.
T Temperatur ($^{\circ}C$); k_s Proteinsyntheserate [% Protein synthetisiert Tag^{-1}], k_{RNA} [mg Protein synthetisiert $mg RNA^{-1} Tag^{-1}$], RNA [mg g FG^{-1}]; SW Süßwasser

Spezies	T ($^{\circ}C$)	Kieme k_s	k_{RNA}	RNA	Quelle
Antarktische Evertebraten					
<i>Adamussium colbecki</i>	0	16.4	5.8	2.3	Diese Arbeit (<i>in vitro</i>)
Antarktische Fische					
<i>Pachycara brachycephalum</i>	0	11.8	3.1	2.71	Diese Arbeit (<i>in vitro</i>)
<i>Trematomus bernacchii</i>	-1,5	5.3	-	-	Smith & Haschemeyer 1980
<i>Trematomus hansonii</i>	-1,5	3.2	1.3	1.6	Smith & Haschemeyer 1980
<i>Trematomus newnesi</i>	-1,5	1.5	-	-	Smith & Haschemeyer 1980
<i>Gymnodraco acuticeps</i>	-1,5	1.3	-	-	Smith & Haschemeyer 1980
<i>Notothenia corriceps</i>	2	1.6	-	-	Haschemeyer 1983
<i>Chaenocephalus aceratus</i> (Eisfisch)	2	0.85	-	-	Haschemeyer 1983
Boreale Evertebraten					
<i>Aequipecten opercularis</i>	15	8.8	4.6	1.17	Diese Arbeit (<i>in vitro</i>)
<i>Carcinus maenas</i>	15	4.8	1.58	-	Houlihan <i>et al.</i> 1990b
<i>Octopus vulgaris</i>	22	11.26	1.19	-	Houlihan <i>et al.</i> 1990a
Boreale Fische					
<i>Zoarces viviparus</i>	10	18.7	5.9	2.71	Diese Arbeit (<i>in vitro</i>)
<i>Salmo gairdneri</i> (SW)	12	9.1	-	-	Houlihan <i>et al.</i> 1986
<i>Gadus morhua</i>	5	7.8	1.3	5.0	Foster <i>et al.</i> 1992
<i>Gadus morhua</i>	15	8.8	1.5	3.8	
<i>Oncorhynchus mykiss</i> (SW)	15	13.96	2.13	-	McMillan & Houlihan 1988, 1989
Boreale Fische					
<i>Sufflamen verres</i>	26	15	-	-	Haschemeyer <i>et al.</i> 1979
(Drückerfisch)	30	14	-	-	

Ektothermen sind ebenso kältekompensiert wie beispielsweise die Enzymkapazitäten des aeroben Stoffwechsels, obwohl die polaren Organismen einen reduzierten Basalstoffwechsel haben. Solche „Überschusskapazitäten“ im Basalstoffwechsel und der Proteinbiosynthese können in der permanenten Kälte dazu dienen, flexibel und schnell auf interne und externe Reize zu reagieren.

Die Bestimmung der maximalen Translationsgeschwindigkeit der RNA und die quantitative RNA Bestimmung gibt Auskunft über die relativen Kapazitäten eines Gewebes für die Proteinbiosynthese; ob aber tatsächlich und in welchem Ausmaß diese Kapazitäten genutzt werden, kann aus den *in vitro* Bestimmungen der RNA Translationskapazitäten nicht geschlossen werden. In diesem Abschnitt soll der Bezug zu den in der Literatur befindlichen *in vivo* Daten der Proteinbiosynthese hergestellt werden. Die *in vitro* Translationskapazität reflektiert die höchstmögliche Kapazität der Ribosomen, Proteine zu synthetisieren und wird durch die *in vitro* Proteinsyntheserate pro RNA ausgedrückt. Das RNA:Protein Verhältnis im Gewebe wird häufig als Indikator der Kapazität *in vivo* benutzt. Die *in vivo* RNA Translations-effizienz spiegelt die Auslastung der Kapazität im lebenden Organismus wider und wird als *in vivo* Proteinsyntheserate pro RNA ausgedrückt (Waterlow *et al.* 1978; Houlihan 1991).

Die in der Literatur vorhandenen *in vivo* Daten für die Proteinbiosynthese (k_s), Translationseffizienz ($k_{RNA \text{ in vivo}}$) und RNA Gehalte sind für die Kiemen (Tabelle 1) und den Muskel (Tabelle 2) in Abhängigkeit von der Umgebungstemperatur zusammengetragen

Tabelle 2. Proteinsyntheseraten (k_s), Translationseffizienz (k_{RNA}) und RNA Gehalt im weißen Muskel von gefütterten Fischen unterschiedlicher Lebensweise und adaptiert an verschiedene Umgebungstemperaturen. Ausgeschlossen der Werte aus dieser Arbeit (grau hinterlegt) wurden alle Daten *in vivo* erhoben.

T Temperatur (°C); k_s Proteinsyntheserate [% Protein synthetisiert Tag⁻¹], k_{RNA} [mg Protein synthetisiert mg RNA⁻¹ Tag⁻¹], RNA [mg g FG⁻¹]; SW Süßwasser

Spezies	Lebensweise	T (°C)	Muskel k_s	k_{RNA}	RNA	Quelle
Antarktische Fische						
<i>Pachycara brachycephalum</i>	benthisch	0	3.5	3.1	0.68	Diese Arbeit (<i>in vitro</i>)
<i>Trematomus bernacchii</i>	demersal	-1.5	0.23			Smith & Haschemeyer 1980
<i>Trematomus hansonii</i>	demersal	-1.5	0.22	0.28	1.1	Smith & Haschemeyer 1980
<i>Trematomus newnesi</i>	semipelagisch	-1.5	0.12			Smith & Haschemeyer 1980
<i>Gymnodraco acuticeps</i>	pelagisch	-1.5	0.12	0.24	0.58	Smith & Haschemeyer 1980
<i>Notothenia corriceps</i>	benthisch	2	0.37	-	-	Haschemeyer 1983
<i>Chaenocephalus aceratus</i> (Eisfisch)	pelagisch	2	0.13	-	-	Haschemeyer 1983
Boreale Fische						
<i>Zoarces viviparus</i>	benthisch	10	5.3	5.9	0.78	Diese Arbeit (<i>in vitro</i>)
<i>Anarhichas lupus</i>	demersal	5	0.55	0.74	1.65	McCarthy <i>et al.</i> 1999
<i>Carassius carassius</i> (SW)	pelagisch	10	0.3	1.9	-	Smith <i>et al.</i> 1996
<i>Salmo gairdneri</i> (SW)	pelagisch	12	0.49	-	-	Houlihan <i>et al.</i> 1986
<i>Oncorhynchus mykiss</i> (SW)	pelagisch	15	0.69	0.81	-	McMillan & Houlihan 1988
<i>Opsanus tau</i>	pelagisch	22	0.71	-	-	Pocrnjic <i>et al.</i> 1983
<i>Anguilla anguilla</i>	demersal	25	0.49	-	-	De la Higuera <i>et al.</i> 1999
Tropische Fische						
<i>Sufflamen verres</i> (Drückerfisch)	pelagisch	26	0.69	-	-	Haschemeyer <i>et al.</i> 1979
		30	1.14	-	-	

worden. Bei den *in vivo* Daten wurden nur die Proteinsyntheseraten von gefütterten Tieren ausgewählt, um niedrige Syntheseraten durch Nahrungslimitierung auszuschließen. Der Vergleich von Proteinsyntheseraten zwischen verschiedenen Arten ist nur mit angemessener Vorsicht möglich. Er soll lediglich für den grundsätzlichen Vergleich von *in vivo* und *in vitro* Daten (letztere aus der vorliegenden Arbeit) herangezogen werden.

Die *in vitro* und *in vivo* Proteinsyntheseraten unterscheiden sich auch nach Fütterung noch deutlich. Die *in vitro* Proteinsynthesekapazitäten sind deutlich höher als die *in vivo* Proteinsyntheseeffizienzen. Dieser Unterschied deutet darauf hin, dass die *in vivo* Proteinsyntheseraten weit unter den möglichen Kapazitäten der Gewebe bleiben. Für eine sichere Bestätigung dieser Annahme müssten strenggenommen die *in vivo* Proteinsyntheseraten direkt in den Kammuscheln und Aalmuttern gemessen werden. Da die Kapazitäten *in vivo* nicht vollständig ausgeschöpft werden, muss die Regulation der Proteinbiosynthese bzw. des Wachstums auf einer höheren Organisationsstufe im Tier stattfinden.

4.4.2. Energiebudget Hypothese

Die nicht ausgeschöpften Kapazitäten der Proteinbiosynthese *in vivo* könnten entweder durch Aminosäurelimitierung (Hypothese der Ressourcenlimitierung, siehe 4.4.3) oder durch das Konkurrieren mit anderen Prozessen um Energie in Form von ATP und GTP erklärt werden. Zunächst stellt sich die Frage, wie die Proteinsyntheserate in der Zelle reguliert wird. In der Einleitung wurde bereits erwähnt, dass einige Autoren dem pH eine Signalfunktion zuschreiben (Hofmann und Hand 1994; Hand und Hardewig 1996), beispielsweise durch eine direkte Wirkung auf Phosphorylierungsprozesse der Proteinbiosynthese (Goumard *et al.* 1990; Isford *et al.* 1993).

Aus diesem Grund sollte die pH-Abhängigkeit der *in vitro* Proteinbiosynthese in den Kiemen von *A. colbecki* bei 0 °C und *A. opercularis* bei 15 °C untersucht werden (Abbildung 9). Die pH-Profile der Proteinsyntheseraten der Kiemenlysate beider Pectinidenarten entsprachen einer Optimumskurve mit maximalen Syntheseraten bei pH 7.5 für *A. colbecki* (0 °C) und pH 7.3 für *A. opercularis* (15 °C). Eine pH-Optimumskurve mit einer Maximalsyntheserate zwischen pH 7.5 und 8.0 wurde auch für isolierte Ribosomen aus dem Muskel des Dorsches *Gadus morhua* gefunden (Lied *et al.* 1982). Zellfreie Translationsysteme von Eiern verschiedener Seeigelarten zeigten unterschiedlich steile Optimumskurven. Für *Strongylocentrotus purpuratus* wurde ein außerordentlich scharfes pH-Optimum bei pH 7.2 beobachtet (Lopo *et al.* 1989), während Winkler und Koautoren (1985) für *Lytechinus pictus* nur einen allmählichen Aktivitätsanstieg mit Maximalsyntheseraten bei

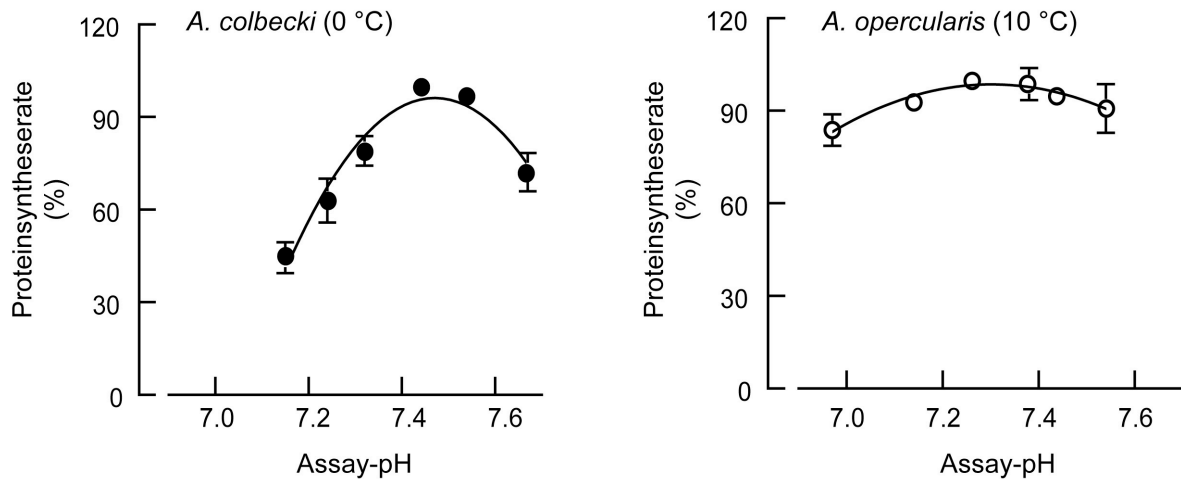


Abbildung 9: *In vitro* Proteinsyntheserate in Abhängigkeit vom Assay-pH in den Kiemen von *A. colbecki*, gehältert bei 0 °C, und *A. opercularis*, gehältert bei 10 °C. Die *in vitro* Proteinbiosynthese wurde in den Kiemenlysaten der *A. colbecki* bei 0 °C und in den Kiemenlysaten der *A. opercularis* bei 15 °C gemessen.

pH 7.4 fanden. Die kardiale Proteinsyntheserate perfundierter Rattenherzen war auch stark pH abhängig und nahm bei einer Senkung um 0.1 pH-Einheiten um 21 % ab (Sugden und Fuller 1991). All diese Studien deuten darauf hin, dass der pHi eine wichtige Rolle in der Regulation der Proteinbiosynthese einnimmt. Die genaue Wirkungsweise ist jedoch unklar. In diesem Zusammenhang sollte erwähnt werden, dass *in vivo* Abschätzungen der Proteinsynthesehemmung in Embryonen des Salinenkrebsses *Artemia franciscana* mit der Hemmung im *in vitro* zellfreien System vergleichbar waren (Hand 1997).

Auffällig zwischen der *in vitro* Proteinbiosynthese beider Pectinidenarten war der große Unterschied in der pH-Sensitivität. Bei einer Abnahme bzw. Zunahme um 0.2 pH-Einheiten kam es in der antarktischen *A. colbecki* zu einer Reduktion der Proteinsyntheserate um 20 % gegenüber nur 6 % in *A. opercularis*. Bei einer weiteren Absenkung bzw. Anhebung um 0.1 pH-Einheiten führte dies zu einer 49-prozentigen gegenüber einer 13-prozentigen Reduktion bei *A. colbecki* bzw. *A. opercularis*. Die Mechanismen, die zu unterschiedlichen pH-Sensitivitäten der Proteinbiosynthese beider Arten führt, sind ungeklärt. Zur Erhöhung der Proteinsyntheseraten bei niedrigen Temperaturen wurden in kalt adaptierten Mikroorganismen strukturelle Modifikationen von Elongationsfaktoren gefunden (Thomas und Cavicchioli 1998). Elongationsfaktoren führen bei Azidose zur Inhibierung der Proteinbiosynthese (Hand 1997; Vayda *et al.* 1995). Strukturelle Modifikationen, wie bei den kalt angepassten Mikroorganismen, könnten möglicherweise bei der kalt stenothermen *A. colbecki* eine stärkere pH-Sensitivität der Proteinbiosynthese verursachen. Diese Hypothese müsste durch Untersuchungen der pH-Sensitivität der Elongationsfaktoren beider Pectinidenarten geprüft werden.

Kürzlich wurden bei *in vivo* Versuchen zur Schwimmaktivität im Muskel von *A. colbecki* (bei 0 °C) und *A. opercularis* (bei 12 °C) vergleichbare pH-Verschiebungen von 0.2 bis 0.3 pH-Einheiten während einer bei beiden Arten gleichlangen Erholungsphase beobachtet (Bailey *et al.* 2003). Bailey und Koautoren schlossen daraus, dass die Muskelleistung und die Erholungskapazität von *A. colbecki* kältekompensiert sind. Unter der Annahme, dass die gefundene pH-Sensitivität der Kiemenlysate auf den Muskel übertragbar ist, wäre folgendes Szenario in der antarktischen *A. colbecki* denkbar. Durch die pH-bedingte Inhibierung der Proteinbiosynthese stände kurzzeitig Energie für eine hohe Muskelleistung und schnelle Erholungsphase zur Verfügung. *A. opercularis* erfährt zwar eine gleichstarke Azidose nach Schwimmaktivitäten wie *A. colbecki*, dies hat jedoch aufgrund der geringeren pH-Sensitivität einen kleinen bis gar keinen Effekt auf die Proteinbiosynthese. Die kurzzeitige Inhibierung der Proteinbiosynthese könnte durch die überkompensierten Proteinsynthesekapazitäten in der Zeit ausgeglichen werden, in der keine Energie zum Schwimmen gebraucht wird. Zukünftige Arbeiten müssen zeigen, wie stark der Einfluß von Aktivität auf die Proteinbiosynthese ist. Hierzu ist es erforderlich, Messungen der Proteinbiosynthese in Abhängigkeit von der Schwimmaktivität durchzuführen.

Nach der „Energiebudget Hypothese“ wird mit ansteigenden Kosten für den Basalstoffwechsel weniger Energie für Wachstum und Reproduktion zur Verfügung gestellt (Abbildung 1, linker Balken). Verschiedene Beispiele bestätigen diese Hypothese. Kälteakklimierte bzw. kälteadaptierte eurytherme Dorsche (*Gadus morhua*) und Aalmuttern (*Z. viviparus*) zeigen über einen latitudinalen Gradienten einen Anstieg im Basalstoffwechsel mit einer reduzierten Wachstums- und Reproduktionsleistung in kälteren Regionen (Pörtner *et al.* 2001). Gleichzeitig zeigen „kalt eurytherme“ Fische einen höheren Energieumsatz im Gewebe, wodurch höhere Aktivitätsleistungen in der Kälte ermöglicht werden (van Dijk *et al.* 1998; Pörtner 2002a). Der Kompromiss zwischen Aktivitäts- und Wachstumsleistung führt in arktischen Populationen zu niedrigeren Wachstumsleistungen im Vergleich zu den Populationen aus borealen Regionen. Durch das bereits über Jahrtausende bestehende stabile Temperaturregime haben die antarktischen Organismen einen hohen Grad an Stenothermie erreicht und sind durch sehr niedrige Standardstoffwechselraten gekennzeichnet. Den hoch stenothermen antarktischen Fischen bleibt daher mehr Energie für Wachstum als den arktischen Fischen. Sie haben auf der evolutiven Zeitskala nicht diesen hohen Grad der Stenothermie erreicht, weil die Arktis mit ihrem heutigen Temperaturregime in Relation zur Antarktis noch jung ist.

Der ökologische Index „P“ der Wachstumsleistung berücksichtigt die Wachstumsgeschwindigkeit über die gesamte Lebensdauer und das theoretische Endgewicht ($P = \log K + \log W_{\infty}$, wo K (Jahr⁻¹): Geschwindigkeit, mit der die Endgröße erreicht wird, W_{∞} : theoretisches Endgewicht; Pauly 1979). Unter Benutzung dieses Indexes „P“ für die

Wachstumsleistung bestätigen höhere Wachstumsleistungen der überwiegend benthischen Notothenioiden ($P = 1-3$) aus der Antarktis im Vergleich zu benthischen Fischen aus der Arktis ($P = 0-1.5$) diese Hypothese (Kock und Everson 1998; Dorrien 1993). Antarktische Notothenioiden und Channichthyiden können sogar ähnliche Wachstumsleistungen „P“ erreichen wie ökologisch vergleichbare Arten aus borealen Gewässern (Kock und Everson 1998). Das Gleiche gilt für die antarktischen *P. brachycephalum* im Vergleich zu *Z. viviparus* (Brodte 2001) oder auch für arktische und antarktische Evertebraten im Vergleich zu ähnlichen Arten aus niedrigeren Breiten (Bluhm 2001; Dahm 1999; Poltermann 2000). Auch die in dieser Arbeit untersuchte antarktische *A. colbecki* erreicht ähnliche Wachstumsleistungen wie *A. opercularis* (Heilmayer *et al.* 2004).

Ein weiteres Beispiel für die „Energiebudget Hypothese“ ist ein Vergleich innerhalb der stenothermen antarktischen Notothenioiden Fische, die an verschiedene ökologische Nischen angepasst sind. Die meisten Notothenioiden leben überwiegend benthisch. Nur einige Notothenioide, wie *Pleurogramma antarcticum* und *Pagothenia borchgrevinki*, haben die Wassersäule erfolgreich erobert. Ein Überblick von La Mesa und Vacci (2001) über Alter und Wachstum der antarktischen Notothenioiden zeigte einen Anstieg der Wachstumsleistung „P“ von pelagischer zu benthischer Lebensweise. Auf der anderen Seite besitzen benthische Notothenioide und andere benthische Fische einen niedrigeren Basalstoffwechsel im Gegensatz zu den aktiveren pelagischen Arten (Hubold 1991). Niedrige Standardstoffwechselraten zusammen mit höheren Wachstumsleistungen in benthischen versus pelagischen Lebensformen zeigen wieder den Kompromiss zwischen Aktivität und Wachstumsleistung. Benthische Fische können demnach mehr Energie ihres Budgets in das Wachstum bzw. die Proteinbiosynthese stecken als pelagische Fische. Dies wird auch durch höhere Proteinsyntheseraten und RNA Gehalte im Muskel benthischer Fische gegenüber dem Muskel pelagischer Fische in der Antarktis bestätigt (Tabelle 2). In ektothermen Tieren besitzt der weiße Muskel die höchste Wachstumseffizienz aller Gewebe, gekennzeichnet durch niedrige Proteinsyntheseraten gekoppelt an niedrige Proteinabbauraten (Houlihan *et al.* 1986; Lyndon und Houlihan 1998). Ein energieeffizientes Wachsen wird auch durch Reduktion des Proteinumsatzes und eine bessere Proteinretention erzielt. Neuere Studien zeigen, dass benthische Fische eine wesentlich höhere Proteinretention besitzen als pelagische Fische (Houlihan *et al.* 1995; Fraser *et al.* 1998; McCarthy *et al.* 1999). Ein kälte-kompensierter RNA Translationsapparat, ein reduzierter Proteinumsatz durch eine höhere Proteinstabilität bei niedrigen Temperaturen und eine höhere Proteinretention stützen einen niedrigen Basalstoffwechsel bei gleichzeitig energieeffizienter, hoher Wachstumsleistung in antarktischen kalt stenothermen Fischen mit benthischer Lebensweise.

Pelagische kalt stenotherme Fische aus der Antarktis haben sich zwar auch gut an das Leben in der Wassersäule angepasst (Kunzmann und Zimmermann 1992), haben

jedoch noch nicht den Kompensationsgrad erreicht wie die benthischen Fische. Die energie-sparende Lebensweise der pelagischen Fische beinhaltet beispielsweise die Reduktion des Skelettes (Eastman 1985), geringe Kalzifizierung der Knochen (De Vries und Eastman 1981) und morphologische Besonderheiten bei Flossen- und Körperformen (Ekau 1988). Durch die Einlagerung von Fetten wird das Schweben in der Wassersäule erreicht (Eastman und De Vries 1982), wodurch eine kostspielige Schwimmblase entfällt. Trotz dieser vielfältigen Anpassungen an das Leben in der Wassersäule haben die antarktischen pelagischen Fische immer noch einen höheren Basalstoffwechsel und es steht ihnen dadurch weniger Energie für das Wachstum zur Verfügung (Priede 1985; Dorrien 1993; Zimmermann und Hubold 1998). Niedrige Proteinsyntheseraten in den antarktischen pelagischen Fischen im Gegensatz zu den benthischen Fischen stützen diese Ausführungen (Tabelle 2). Der Vorteil der pelagischen Lebensweise ist jedoch die Möglichkeit, aktiv nach Nahrung zu suchen, und damit vielleicht nicht ganz so stark an die Saisonalität gebunden zu sein wie benthische bzw. sessile Tiere. In dem pelagischen Silberfisch *Pleurogramma antarcticum* wurden auch im späten Winter volle Mägen gefunden, sodass die Saisonalität der Primärproduktion und die Pulse der Zooplanktonbiomasse am Ende der Nahrungskette einen weniger starken Einfluss zu haben scheinen (Hubold und Hagen 1997).

Die für die benthischen Fische aufgezeigten Vorteile eines energieeffizienten Lebens in der permanenten Kälte sollten auch für die benthischen Evertebraten gelten. Sie sind durch sehr niedrige Stoffwechselraten, inaktive Lebensweise und noch niedrigere Proteinumsatzraten als benthische Fische (Houlihan *et al.* 1995) gekennzeichnet. Neuere Studien zeigen, dass der prozentuale Anteil der Proteinbiosynthese am Gesamtsauerstoffverbrauch verschiedener antarktischer Evertebraten höher liegt als bei ähnlichen Arten aus den gemäßigten und tropischen Breiten (Fraser *et al.* 2002a). Eine parallel ausgeführte ökologische Arbeit an Pectiniden scheint auch zu zeigen, dass der prozentuale Anteil des Wachstums am Gesamtsauerstoffverbrauch in der antarktischen Kammuschel höher liegt als in der europäischen Art. Dies würde die „Energiebudget Hypothese“ auch für die antarktischen Evertebraten bestätigen, die ebenfalls einen hohen Grad an Stenothermie erreicht haben. Hohe RNA Translationskapazitäten und niedrige Aktivierungsenergien würden die Grundlage für ein schnelles energieeffizientes Wachstum sein. Trotzdem weisen gerade die benthischen Evertebraten in der Antarktis, mit ein paar Ausnahmen (Dayton *et al.* 1974; Rauschert 1991; Barnes 1995), extrem langsame, jährliche Wachstumsraten auf (Everson 1977; Clarke 1983; Arntz *et al.* 1994; Peck 2002). Diese Ausnahmen und die Tatsache, dass antarktische pelagische Evertebraten in den Sommermonaten vergleichbare Wachstumsraten wie ähnliche Arten aus wärmeren Gebieten erreichen, führten zu der Annahme, dass hier die Ressourcenlimitierung eine extrem wichtige Rolle spielt (Clarke 1988; Clarke und Peck 1991; Peck 2002).

4.4.3. Ressourcenlimitierung

Die Evertebraten sind also stärker auf das Nahrungsangebot in ihrer Umgebung angewiesen als beispielsweise die pelagischen Fische, die aktiv nach Nahrung suchen können und damit nicht so stark an die Saisonalität gebunden sind wie benthische bzw. sessile Tiere. Die Hypothese der Ressourcenlimitierung geht wie die „Energiebudget Hypothese“ von einer vollständigen Kompensation des Wachstumsprozesses aus. Die Temperaturkompensation des Proteinsyntheseapparates wurde sowohl für die Aalmuttern als auch für die Kamm-muscheln in dieser Arbeit demonstriert. Jährliches Wachstum ist durch starke saisonale Schwankungen in der Nahrungsverfügbarkeit limitiert (Clarke und North 1991; Clarke und Peck 1991; Clarke und Leakey 1996). Die Hypothese besagt weiter, dass es in antarktischen Habitaten nur kurze Perioden im Jahr gibt, während derer Nahrungsaufnahme möglich oder energetisch günstig ist. Saisonale Studien zum Wachstum ektothermer Tiere in der Antarktis sind rar. Abhängig von den Fressgewohnheiten im Winter zeigen erste Studien einen Anstieg im Sauerstoffverbrauch während des Sommers, beispielsweise in der antarktischen Napf-schnecke *Nacella concinna* (Faktor 1.6; Fraser *et al.* 2002b), in der antarktischen Muschel *Laternula elliptica* (Faktor 3; Brockington 2001) und im antarktischen Seeigel *S. neumayeri* (Faktor 2.5-3.1 Brockington und Peck 2001). Im Seeigel *S. neumayeri* waren lediglich 15-20 % des Anstieges im Sauerstoffverbrauch auf die etwas höheren Temperaturen während des antarktischen Sommers zurückzuführen, wohingegen 80-85 % des Anstieges durch erhöhte physiologische Aktivitäten wie Fressen, Wachsen und Abbläuen zu erklären waren (Brockington und Clarke 2001).

Auch in antarktischen Fischen rund um South Georgia (North 1998; North *et al.* 1998) und Signy Island (Ashford und White 1995) wurde ein saisonales Wachstum beobachtet. North und Koautoren identifizierten die saisonalen Schwankungen in der Nahrungsverfügbarkeit als Haupteffekt. Ashford und White hingegen konnten keinen Unterschied zwischen Wachstumslimitierung durch Nahrungsmangel oder durch niedrige Temperaturen belegen. Cogan (1997) stellte fest, dass die antarktischen Fische im Sommer mehr Appetit hatten als im Winter. Er folgerte daraus, dass saisonale Variationen im Wachstum eher auf die Ressourcennutzung und weniger auf die Ressourcenlimitierung zurückzuführen sei. Dies würde wieder einen Kompromiss gemäß der „Energiebudget Hypothese“ bedeuten. Ist der Aufwand für die Nahrungssuche zu kostenintensiv, wird darauf verzichtet und eine Art „Winterschlaf“ mit stark reduziertem Grundstoffwechsel vorgezogen (Ashford und White 1995; Lehtonen 1996; North 1998, North *et al.* 1998; Brockington und Peck 2001). Ganzjährig zu wachsen ist vielleicht energetisch ungünstig und wird daher auf den kurzen, aber sehr intensiven Höhepunkt der Nahrungsverfügbarkeit im antarktischen Sommer beschränkt.

In der Napfschnecke *N. concinna* war die Reduktion im Gesamtsauerstoffverbrauch im Winter mit einer Reduktion im Körpergewicht und im RNA Gehalt bzw. RNA:Protein Verhältnis sowie einer niedrigeren *in vivo* Proteinsyntheserate verbunden (Fraser *et al.* 2002a). Interessanterweise war in der *in vivo* RNA Translationseffizienz der Napfschnecke kein saisonales Muster erkennbar. Sie war im Winter doppelt so hoch wie im Sommer. Fraser und Koautoren (2002a) hatten keine Erklärung dafür, aber nach den Erkenntnissen aus dieser Arbeit können die Befunde wie folgt erklärt werden. Im antarktischen Winter ist für *N. concinna* nicht genügend Nahrung verfügbar, sodass sie auf die im Sommer angelegten Reserven zurückgreifen muss. Dadurch kommt es zu einem massiven, fast 60-prozentigen Abbau der RNA. Während des Winters ist die Proteinbiosynthese und wahrscheinlich auch der Proteinumsatz sehr niedrig. Trotzdem muss der Proteinumsatz auch in Winter gewährleistet werden, um ein Überleben zu sichern. Höhere *in vivo* RNA Translationseffizienzen im Winter bedeuten, dass die Kapazitäten der verbleibenden RNA stärker genutzt werden als im Sommer, wodurch die Proteinbiosynthese im Winter „nur“ um 30 % in *N. concinna* abnimmt.

Bei *A. colbecki*, die im antarktischen Sommer gefangen und über sechs Monate bei kontinuierlicher Fütterung im Aquarium bei 0 °C gehältert wurden, konnte ebenfalls eine Reduktion im RNA Gehalt in allen Geweben (Abbildung 10A) und eine Reduktion im RNA:Protein Verhältnis in Muskel und Mantel festgestellt werden (Abbildung 10B). Die *in vitro* Proteinsynthesekapazität in den Kiemen der gehälterten *A. colbecki* war gegenüber den frisch gefangenen *A. colbecki* ebenfalls stark reduziert und hatte signifikant niedrigere Aktivierungsenergien („gehältert“: $E_a = 50$ versus „frisch gefangen“: $E_a = 63$) (Abbildung 11A). Die niedrigen *in vitro* Proteinsynthesekapazitäten waren sowohl durch die niedrigen RNA Konzentrationen (Abbildung 11B) als auch durch reduzierte RNA Translationskapazitäten (Abbildung 11C) zu erklären. Die *in vitro* RNA Translationskapazität der gehälterten *A. colbecki* mit $k_{\text{RNA } in vitro} = 2.3$ war dennoch höher als die in Tabelle 1 aufgeführten *in vivo* Translationseffizienzen. Dies würde die oben ausgeführte Erklärung der im Winter in *N. concinna* beobachteten, hohen RNA Translationseffizienzen stützen.

Die gehälterten *A. colbecki* zeigten nach 6 Monaten eine 30-prozentige Reduktion im Gesamtsauerstoffverbrauch (Heilmayer und Brey 2003) und lässt vermuten, dass die Tiere sich in einer Art „Winterzustand“ befanden. Durch den Abbau des Proteinsyntheseapparates und niedrige Proteinsyntheseraten können die Tiere im Winter Energie einsparen und ihren Basalstoffwechsel herunterfahren. Im Vergleich dazu zeigte *A. opercularis*, die im Spätsommer gefangen und 6 Monate unter den gleichen Futterbedingungen, jedoch bei 10 °C gehältert wurde, lediglich eine leichte Reduktion im RNA- und Proteingehalt des Mantels (Abbildung 10D, 10E). Die saisonalen Schwankungen im Proteinsyntheseapparat sind in den Geweben von *A. colbecki* wesentlich größere als in den Geweben von *A. opercularis*. Der Proteinsyntheseapparat der polaren Evertrebraten scheint in Phasen der Nahrungslimitierung

bzw. im Winter einen massiven Abbau aller involvierten Moleküle zu erfahren. Aufgrund der niedrigen Temperaturen ist es für *A. colbecki* nicht so kostenintensiv während der nahrungsreichen Sommerzeit in den Geweben RNA im Überschuss zu produzieren und aufrechtzuerhalten. Diese Überkompensation könnte nicht nur schnelles Wachsen während des antarktischen Sommers garantieren, das ohnehin durch hohe RNA Translationskapazitäten gewährleistet wird, sondern auch das Anlegen von Energiereserven in Form von Protein für den Winter ermöglichen. Einige Autoren haben während längerer Hungerperioden in antarktischen Evertebraten erhöhte Ammoniumausscheidungen beobachtet und vermuten, dass der Proteinkatabolismus den Evertebraten im Winter als Hauptenergiequelle für den Stoffwechsel dient (Fraser *et al.* 2002b; Brockington und Peck 2001; Brockington 2001).

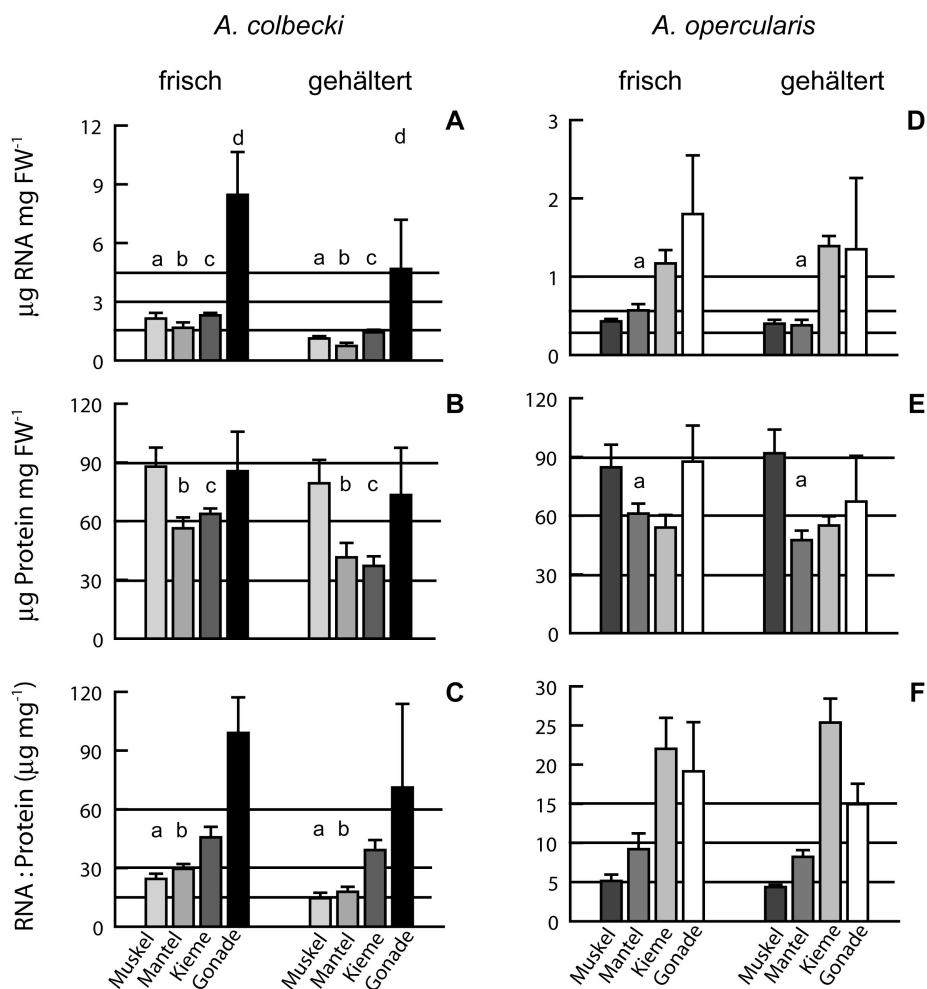


Abbildung 10: RNA- (A, D) und Proteinkonzentration (B, E) und RNA:Protein Verhältnis (C, F) in verschiedenen Geweben frisch gefangener und 6 Monate gehälterter *A. colbecki* und *A. opercularis*. Die Balken innerhalb eines Graphen, mit gleichem Buchstaben unterscheiden sich signifikant voneinander. Die y-Achsen zwischen den beiden Arten sind zum Teil unterschiedlich.

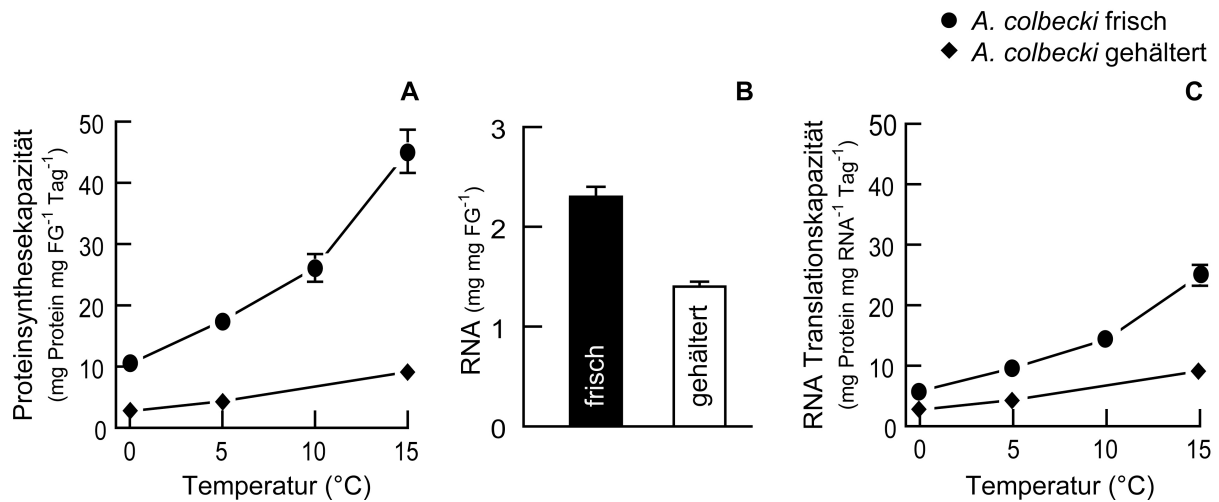


Abbildung 11: *In vitro* Proteinsynthesekapazität in Abhängigkeit von der Temperatur (A), RNA Gehalt (B), *in vitro* RNA Translationskapazität in Abhängigkeit von der Temperatur (C) in Kiemen von frisch gefangenen und 6 Monate gehälterten *A. colbecki*.

Die Überkompensation im RNA Gehalt, wie sie bei den kalt stenothermen Evertebraten auftritt, ist in den Fischen deswegen vielleicht nicht notwendig, weil sie eher Fette als Energiespeicher nutzen (Donnelly *et al.* 1990; Gon und Heemstra 1990; Woehrmann *et al.* 1997). *P. brachycephalum* hat beispielsweise einen höheren Fettgehalt als *Z. viviparus* (Brodte 2001; Fonds *et al.* 1989). Die Einlagerung der Lipide bei Antarktischen Fischen erfolgt in Form von Triglyceriden, die als Energiespeicher genutzt werden, sowie in Form von Wachsestern, die der Auftriebsregulation dienen (Kock 1992).

4.5. Fazit und Ausblick

Wachstum ist ein komplexer Prozess und wird auf vielen verschiedenen Ebenen kontrolliert und limitiert. In der Literatur werden drei Haupterklärungen für das langsame jährliche Wachstum polarer wechselwarmer Tiere diskutiert:

1. Der geschwindigkeitslimitierende Effekt der Temperatur
2. Die ansteigenden Kosten für den Basalstoffwechsel, wodurch weniger Energie für Wachstum verfügbar ist (MCA)
3. Die saisonale Ressourcenlimitierung

1. Der geschwindigkeitslimitierende Effekt der Temperatur.

Niedrige Temperaturen haben höchstwahrscheinlich einen Einfluss auf die Evolution der heute existierenden polaren Fauna gehabt. Trotzdem haben die kalt adaptierten Stenothermen einen kompensierten Proteinsyntheseapparat entwickelt. Die Kompensation

des Wachstums auf zellulärer Ebene wurde sowohl für die Kammuscheln, als Vertreter der Evertebraten, als auch für die Aalmutter, als Vertreter der Vertebraten nachgewiesen.

Kompensierte Proteinsynthesekapazitäten werden dabei durch niedrige Aktivierungsenergien und hohe RNA Translationskapazitäten erzielt, was für die Entwicklung eines kosteneffizienten Wachstumsapparates spricht. Die hohen Kapazitäten könnten durch funktionale Optimierung der Primärstruktur ribosomaler Kernproteine und Ribosomen assoziierter Proteine erreicht werden (Ray *et al.* 1998; Thomas und Cavicchioli 2002). Zusätzlich erhöhte Aktivitäten der in die Proteinbiosynthese involvierten Enzyme würden durch niedrige Aktivierungsenergien gestützt (Haschemeyer und Williams 1982).

Die von verschiedenen Autoren (McCarthy und Houlihan 1996; McCarthy *et al.* 1999; Fraser *et al.* 2002a) prognostizierte „Hochregulation der RNA:Protein Verhältnisse aufgrund niedriger RNA Aktivitäten“ kann daher für die antarktischen Kammuscheln und Aalmuttern verworfen werden und kann möglicherweise für alle kalt adaptierten Stenothermen negiert werden. Im Unterschied dazu konnte die „Hochregulation der RNA:Protein Verhältnisse aufgrund niedriger RNA Aktivitäten“ für die „kalt akklimierte“ eurytherme *Z. viviparus* bestätigt werden. Beide Aalmutterarten haben aber die Fähigkeit innerhalb ihrer Temperaturtoleranz den Proteinsyntheseapparat an unterschiedliche Temperaturen anzupassen.

Neben den kältekompensierten RNA Translationskapazitäten scheinen hohe RNA Konzentrationen eine zusätzliche Anpassung zu sein, die zu überkompensierten Proteinsynthesekapazitäten bei *A. colbecki* im Vergleich zu *A. opercularis* führten. Hohe RNA Konzentrationen sind jedoch bisher nur in Evertebraten beobachtet worden und könnten den Vorteil haben, die Diffusionswege der neu synthetisierten Proteine zu ihren Zielorten zu verkürzen.

Bei dem Vergleich der *in vitro* und *in vivo* Proteinsyntheseraten kam heraus, dass die Kapazitäten im Gewebe nicht vollständig ausgelastet werden. Solche „Überschusskapazitäten“ sind bereits im Basalstoffwechsel häufig nachgewiesen worden, in Form von hohen Enzymkapazitäten des aeroben Stoffwechsels (Übersichtsartikel von Pörtner 2002a). Die hohen Kapazitäten könnten für die Aufrechterhaltung der Flexibilität bei kalten Temperaturen dienen, um schnell auf interne und externe Reize reagieren zu können. Weitere vergleichende Studien zwischen *in vitro* und *in vivo* Proteinsyntheseraten an dem gleichen Organismus sind erforderlich, um die Ausnutzung der Kapazitäten im lebenden Tier zu bestimmen.

2. Die ansteigenden Kosten für den Basalstoffwechsel, wodurch weniger Energie für Wachstum verfügbar ist (MCA), bzw. das Energiebudget. Die nicht ausgelasteten Kapazitäten lassen vermuten, dass die Regulation der Proteinbiosynthese bzw. des Wachstums auf höherer Ebene erfolgen muss. Ein sensibler Regulator könnte hier der pH

sein. Durch die starke pH-Sensitivität des Syntheseparameters in *A. colbecki* könnte beispielsweise bei einer funktionellen Azidose die Proteinbiosynthese gehemmt werden. Die dabei eingesparte Energie stände dann für eine hohe Leistung und schnelle Erholungsphase zur Verfügung.

Die „Energiebudget Hypothese“ und die damit verbundenen Kompromisse zwischen Lebensweise, Aktivität und Wachstumsleistung wurden an verschiedenen Beispielen stenothermer und eurythermer Tiere demonstriert. Als Folge der MCA besitzen kalt adaptierte eurytherme Fische (Pörtner *et al.* 2001) und pelagische Fische hohe Energieumsatzraten, die hohe Schwimmleistungen ermöglichen, allerdings auf Kosten eines langsameren Wachstums (Pörtner 2002a). Im Vergleich zwischen pelagischen und benthischen antarktischen Fischen wird dies auch durch niedrigere *in vivo* Proteinsyntheseraten im Muskel antarktischer pelagischer Fischen deutlich. Die kalt stenothermen Tiere aus der Antarktis zeigen den höchsten Grad eines energieeffizienten Lebens, gekennzeichnet durch sehr niedrige Basalstoffwechsel, wodurch mehr Energie für Wachstum zur Verfügung steht. Eine Grundvoraussetzung für diese Hypothese ist, dass die molaren energetischen Kosten für alle zellulären Prozesse gleich bleiben. Mit einer in dieser Arbeit entwickelten Methode wurden am Beispiel der Kiemen der beiden Pectinidenarten die energetischen Kosten für die Proteinbiosynthese bestimmt. Die Kosten in den Kiemen beider Arten entsprachen ungefähr den theoretischen Kosten von 4 ATP pro Peptidbindung. Das lässt vermuten, dass sich die Mechanismen der Proteinbiosynthese über den langen evolutionären Zeitraum nicht verändert haben. Eine weitere Voraussetzung ist eine vollständige Kompensation der zellulären Prozesse, wie sie für die Proteinbiosynthese der antarktischen Kammuschel *A. colbecki* und der Aalmutter *P. brachycephalum* nachgewiesen wurde.

In einer parallelen ökologischen Arbeit konnte gezeigt werden, dass der prozentuale Anteil am Sauerstoffverbrauch der für das Wachstum genutzt wird, in der antarktischen *A. colbecki* höher liegt als in der europäischen *A. opercularis*. Neuere Studien an verschiedenen antarktischen Evertibraten bestätigen, dass ein höherer prozentualer Anteil am Gesamtsauerstoffverbrauch für die Proteinbiosynthese genutzt wird als bei Tieren aus gemäßigten Breiten (Fraser *et al.* 2002a). Alle diese Ergebnisse passen in das Konzept der „Energiebudget Hypothese“, die scheinbar ein allgemeines Prinzip darstellt und auch auf die antarktischen Evertibraten anwendbar ist. Die in Abbildung 1 dargestellten drei Möglichkeiten der Energiebudgetierung treffen also alle zu. Die prozentualen Anteile der verschiedenen Prozesse am Sauerstoffverbrauch verschieben sich mit dem Grad der Temperaturtoleranz und der Lebensweise. Für die Prüfung dieser Hypothese sollten in näherer Zukunft Energiebudgets vergleichbarer stenothermer und eurythermer Organismen aus verschiedenen Breiten miteinander verglichen werden.

3. Die saisonale Ressourcenlimitierung. Antarktische Ektotherme haben einen hohen Grad an Stenothermie erreicht und haben sehr niedrige Stoffwechselraten. Niedrige Stoffwechselraten konnten auch für die kalt stenothermen *A. colbecki* (Heilmayer und Brey 2003) und *P. brachycephalum* (Mark *et al.* 2002) im Vergleich zu den eurythermen *A. opercularis* (Heilmayer *et al.* 2004) und *Z. viviparus* (van Dijk *et al.* 1999) nachgewiesen werden. Der kalt adaptierte Proteinsyntheseapparat bringt die Voraussetzung für ein kompensiertes Wachstum. Im antarktischen Sommer können dadurch vergleichbare Wachstumsraten erreicht werden wie in verwandten Arten aus wärmeren Gebieten (Brey und Clarke 1993; Arntz *et al.* 1994; Peck 2002). Trotzdem weisen gerade die antarktischen Evertebraten ein extrem langsames jährliches Wachstum auf. Die Hypothese der Ressourcenlimitierung geht wie die „Energiebudget Hypothese“ von der für *A. colbecki* und *P. brachycephalum* gezeigten vollständigen Kompensation des Wachstumsprozesses aus. Viele Untersuchungen zu dieser Hypothese zeigen deutliche saisonale Wachstumsmuster in antarktischen und arktischen ektothermen Evertebraten und Fischen trotz ganzjährig gleich bleibender Temperaturen (Ashford und White 1995; Lehtonen 1996; North 1998; North *et al.* 1998; Brockington 2001; Brockington und Peck 2001; Fraser *et al.* 2002b). Die für *A. colbecki* gezeigte starke Reduktion im Proteinsyntheseapparat und in der RNA Translationskapazität zeigen, wie eine ressourcenbedingte Verlangsamung oder Stagnation des Wachstums während des antarktischen Winters erfolgen könnte.

Antarktische Evertebraten haben im Vergleich zu verwandten Arten aus wärmeren Gebieten höhere RNA Gehalte, was zu einer Überkompensation der Proteinsynthesekapazitäten führt. Dieses Phänomen wurde bei Antarktischen Fischen noch nicht beobachtet und könnte eine für die Evertebraten spezifische Anpassung an die antarktischen Bedingungen sein. Hohe RNA Gehalte in den Geweben, zusammen mit hohen RNA Translationskapazitäten, sorgen im Sommer für eine hohe Syntheseleistung, die durch niedrige Protein- und RNA-Umsatzraten in der permanenten Kälte noch begünstigt werden. Mit Hilfe des kompensierten Proteinsyntheseapparates werden nicht nur hohe Wachstumsleistungen im Sommer erzielt, sondern darüber hinaus auch Proteine und RNA als Reservestoffe für den Winter angelegt. Die in *N. concinna* gefundene Erhöhung der *in vivo* RNA Translationseffizienz im Winter bestätigen die Existenz nicht ausgenutzter Kapazitäten, die aber dann eingesetzt werden, wenn RNA aufgrund mangelnder Ressourcen im Winter abgebaut werden muss. Einige Autoren haben während längerer Hungerperioden in antarktischen Evertebraten erhöhte Ammoniumausscheidungen beobachtet und vermuten, dass der Proteinkatabolismus den Evertebraten im Winter als Hauptenergiequelle für den Stoffwechsel dient (Fraser *et al.* 2002b; Brockington und Peck 2001; Brockington 2001). Im Folgenden muss geprüft werden, ob hohe RNA Gehalte verbunden mit hohen RNA

Translationskapazitäten für alle antarktischen Evertebraten zutreffen. Weitere Studien an Antarktischen Fischen und Evertebraten müssen darüber hinaus zeigen, ob diese Überkompensation für Evertebraten spezifisch ist.

5. Literatur

Anderson ME (1994) Systematics and osteology of the Zoarcidae (Teleostei: Perciformes).
Ichthyol Bull 60: 1-120

Aoyagi Y, Tasaki I, Okumura J und Muramatsu T (1988) Energy cost of whole-body protein
synthesis measured in vivo in chicks. Comp Biochem Physiol A 91: 765-768

Arntz WE, Brey T und Gallardo VA (1994) Antarctic zoobenthos. Oceanogr Mar Biol Annu
Rev 32: 241-304

Arrhenius SA (1889) Z Phys Chem 4: 226-248

Ashford JR und White MG (1995) An annual profile of growth in the otoliths of immature
Notothenia coriiceps Richardson in relation to the environment at Signy Island,
Antarctica. Antarct Sci 7: 345-349

Bailey DM, Peck LS, Bock C und Pörtner HO (2003) High-energy phosphate metabolism
during exercise and recovery in temperate and Antarctic scallops - an *in vivo* ³¹P-
NMR study. Pysiol Biochem Zool (im Druck)

Barnes DKA (1995) Seasonal and annual growth in erect species of Antarctic bryozoans. J
Exp Mar Biol Ecol 188: 181-198

Benedetti A und Baglioni C (1986) Activation of hemin-regulated initiation factor-2 kinase in
heat-shocked HeLa cells. J Biol Chem 261: 338-342

Berkman PA (1990) The population biology of the Antarctic scollop, *Adamussium colbecki*
(Smith 1902) at New Harbor, Ross Sea. In Kerry KR und Hempel G (Hrsg.) Antarctic
ecosystems. Ecological Change and Conservation. Springer Verlag Berlin Heidelberg
281-288

Bluhm B (2001) Age determination in polar crustacea using the autofluorescent pigment
lipofuscin. Ber Polarforsch/Rep Polar Res 382: 1-127

Brett JR (1979) Environmental factors and growth. In Hoar WS, Randall DJ und Brett JR
(Hrsg.) Fish physiology. Academic Press London VIII: 599-675

- Brey T und Clarke A (1993) Population dynamics of marine benthic invertebrates in Antarctic and Subantarctic environments: are there unique adaptations? *Antarct Sci* 5: 253-266
- Brockington S (2001) The seasonal energetics of the Antarctic bivalve *Laternula elliptica* (King and Broderip) at Rothera Point, Adelaide Island. *Pol Biol* 24: 523-530
- Brockington S und Clarke A (2001) The relative influence of temperature and food on the metabolism of a marine invertebrate. *J Exp Mar Biol Ecol* 258: 87-99
- Brockington S und Peck LS (2001) Seasonality of respiration and ammonium excretion in the Antarctic echinoid *Sterechinus neumayeri*. *Mar Ecol Prog Ser* 219: 151-168
- Brodte E (2001) Wachstum und Fruchtbarkeit der Aalmutterarten *Zoarces viviparus* (Linne) und *Pachycara brachycephalum* (Pappenheim) aus unterschiedlichen klimatischen Regionen. Diplomarbeit: 1-92
- Bullock TH (1955) Compensation for temperature in the metabolism and activity of poikilotherms. *Biol Rev* 30: 311-342
- Canapa A, Barucca M, Marinelli A und Olmo E (2000) Molecular data from the 16S rRNA gene for the phylogeny of Pectinidae (Mollusca: Bivalvia). *J Mol Evol* 50: 93-97
- Casey TM, Dufall KG und Arthur PG (1999) An improved capillary electrophoresis method for measuring tissue metabolites associated with cellular energy state. *Eur J Biochem* 261: 740-745
- Chapelle G und Peck LS (1995) The influence of acclimation and substratum on the metabolism of the Antarctic amphipods *Waldeckia obesa* (Chevreux 1905) and *Bovallia gigantea* (Pfeffer 1808). *Polar Biol* 15: 225-232
- Chiantore M, Cattaneo-Vietti R, Berkman PA, Nigro M, Schiaparelli MVS und Albertelli G (2001) Antarctic scallop (*Adamussium colbecki*) spatial population variability along the Victoria Land coast, Antarctica. *Polar Biol* 24: 139-143
- Clarke A (1983) Life in cold water: the physiological ecology of polar marine ectotherms. *Mar Biol Ann Rev* 21: 341-453
- Clarke A (1980) A reappraisal of the concept of metabolic cold adaptation in polar marine invertebrates. *Biol J Linnean Soc* 14: 77-92

- Clarke A (1988) Seasonality in the Antarctic marine environment. *Comp Biochem Physiol B* 90: 461-473
- Clarke A (1991) What is cold adaptation and how should we measure it? *Am Zool* 31: 81-92
- Clarke A und Johnston NM (1999) Scaling of metabolic rate with body mass and temperature in teleost fish. *J Anim Ecol* 68: 893-905
- Clarke A und Leakey RJG (1996) The seasonal cycle of phytoplankton, macronutrients, and the microbial community in a nearshore Antarctic marine ecosystem. *Limnol Oceanogr* 41: 1281-1294
- Clarke A und North A.W. (1991) Is the growth of polar fish limited by temperature? In di Prisco G, Maresca B und Tota B (Hrsg.) *Biology of Antarctic fish*. Springer-Verlag Berlin, Heidelberg 54-69
- Clarke A und Peck LS (1991) The physiology of polar marine zooplankton. *Polar Res* 10: 355-369
- Coggan R (1997) Growth:Ration relationships in the antarctic fish *Notothenia coriiceps* Richardson maintained under different conditions of temperature and photoperiod. *J Exp Mar Biol Ecol* 210: 23-35
- Conover DO (1990) The relation between capacity for growth and length of growing season: Evidence for and implications of countergradient variation. *Trans Am Fish Soc* 19: 416-430
- Conover DO und Present TMC (1990) Countergradient variation in growth rate: Compensation for length of the growing season among Atlantic silversides from different latitudes. *Oecologia* 83: 316-324
- D'Amico S, Claverie P, Collins T, Georlette D, Gratia E, Hoyoux A, Meuwis MA, Feller G und Gerday C (2002) Molecular basis of cold adaptation. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 357: 917-925
- Dahm C (1999) Ophiuroids (Echinodermata) of southern Chile and the Antarctic: Taxonomy, biomass, diet and growth of dominant species. *Sci Mar (Barc)* 63: 427-432

- Dayton PK, Robilliard GA, Paine RT und Dayton LB (1974) Biological accommodation in the benthic community at McMurdo Sound, Antarctic. *Ecol Monogr* 44: 105-128
- De la Higuera M, Akharbach H, Hidalgo MC, Peragon J, Lupianez JA und Garcia-Gallego M (1999) Liver and white muscle protein turnover rates in the European eel (*Anguilla anguilla*): effects of dietary protein quality. *Aquaculture* 179: 203-216
- De Vries AL und Eastman JT (1981) Physiology and Ecology of Notothenioid Fishes of the Ross Sea. *J. R. Soc. N.Z.* 11: 329-340
- Donnelly J, Torres JJ, Hopkins TL und Lancraft TM (1990) Proximate composition of Antarctic mesopelagic fishes. *Mar Biol* 106: 13-23
- Dorrien CFv (1993) Ecology and respiration of selected Arctic benthic fish species. *Ber Polarforsch/Rep Polar Res* 125: 1-104
- Dunbar MJ (1968) Ecological development in polar regions: a study in evolution. Prentice-Hall Englewood Cliffs, NJ
- Eastman JT (1985) The evolution of neutrally buoyant notothenioid fishes: Their specializations and potential interactions in the Antarctic marine food web. In Siegfried WR, Condy PR und Laws RM (Hrsg.) Antarctic nutrient cycles and food webs. (IV. SCAR Symposium on Antarctic Biology, Wilderness, South Africa, 1983). Springer Verlag New York, NY (USA) 430-436
- Eastman JT und De Vries AL (1982) Buoyancy studies of notothenioid fishes in McMurdo Sound, Antarctica. *Copeia* 2: 385-393
- Ege R und Krogh A (1914) On the relation between the temperature and the respiratory exchange in fishes. *Int Rev Hydrobiol Hydrograph* 7: 48-55
- Ekau W (1988) Ecomorphology of nototheniid fish from the Weddell Sea, Antarctica. *Ber. Polarforsch./Rep. Polar Res. Bremerhaven* 51: 1-140
- Everson I (1977) Antarctic marine secondary production and the phenomenon of cold adaptation. *Philos Trans R Soc Lond Ser B* 279: 55-66

- Fauconneau B und Arnal M (1985) In vivo protein synthesis in different tissues and the whole body of rainbow trout (*Salmo gairdneri* R.). Influence of environmental temperature. *Comp Biochem Physiol A* 82A: 179-187
- Feller G, Narinx E, Arpigny JL, Aittaleb M, Baise E, Genicot S und Gerday C (1996) Enzymes from psychrophilic organisms. *FEMS Microbiol Rev* 18: 189-202
- Fonds M, Jaworski A, Iedema A und Puyf PVD (1989) Metabolism, food consumption, growth and food conversion of shorthorn sculpin (*Myoxocephalus scorpius*) and eelpout (*Zoarces viviparus*). ICES Council Meeting, Copenhagen, Denmark: 1-19
- Forster ME, Franklin CE, Taylor HH und Davison W (1987) The Aerobic Scope of an Antarctic Fish, *Pagothenia borchgrevinki* and Its Significance for Metabolic Cold Adaptation. *Polar Biol* 8: 155-159
- Foster AR, Houlihan DF und Hall SJ (1993) Effects of nutritional regime on correlates of growth rate in juvenile Atlantic cod (*Gadus morhua*): Comparison of morphological and biochemical measurements. *Can J Fish Aquat Sci* 50: 502-512
- Foster AR, Houlihan DF, Hall SJ und Burren LJ (1992) The effects of temperature acclimation on protein synthesis rates and nucleic acid content of juvenile cod (*Gadus morhua* L.). *Can J Zool* 70: 2095-2102
- Fraser KP, Clarke A und Peck LS (2002a) Low-temperature protein metabolism: seasonal changes in protein synthesis and RNA dynamics in the Antarctic limpet *Nacella concinna* Strebel (1908). *J Exp Biol* 205: 3077-3086
- Fraser KPP, Clarke A und Peck LS (2002b) Feast and famine in Antarctica: seasonal physiology in the limpet *Nacella concinna*. *Mar Ecol Prog Ser* 242: 169-177
- Fraser KPP, Lyndon AR und Houlihan DF (1998) Protein synthesis and growth in juvenile Atlantic halibut, *Hippoglossus hippoglossus* (L.): application of super(15)N stable isotope tracer. *Aquacult Res* 29: 289-298
- Fry FEJ (1967) Responses of vertebrate poikilotherms to temperature. In Rose A.H. (Hrsg.) *Thermobiology*. Academic Press New York 375-409
- Gerday C, Aittaleb M, Arpigny JL, Baise E, Chessa JP, Garsoux G, Petrescu I und Feller G (1997) Psychrophilic enzymes: a thermodynamic challenge. *Biochim Biophys Acta* 1342: 119-131

- Gerday C, Aittaleb M, Bentahir M, Chessa JP, Claverie P, Collins T, D'Amico S, Dumont J, Garsoux G, Georgette D, Hoyoux A, Lonhienne T, Meuwis MA und Feller G (2000) Cold-adapted enzymes: from fundamentals to biotechnology. *Trends Biotechnol* 18: 103-107
- Gingras AC, Raught B und Sonenberg N (1999) eIF4 initiation factors: effectors of mRNA recruitment to ribosomes and regulators of translation. *Annu Rev Biochem* 68: 913-963
- Gon O and Heemstra PC (1990) *Fishes of the Southern Ocean*. J.L.B. Smith Inst of Ichthyology Grahamstown
- Goolish EM, Barron MG und Adelman IR (1984) Thermoacclimatory response of nucleic acid and protein content of carp muscle tissue: Influence of growth rate and relationship to glycine uptake by scales. *Can J Zool* 62: 2164-2170
- Goumard G, Cuny M, Sripathi CE und Hayes DH (1990) Monovalent cation-dependent reversible phosphorylation of a 40 S ribosomal subunit protein in growth-arrested *Tetrahymena*: correlation with changes in intracellular pH. *FEBS Lett* 262: 335-338
- Hand SC (1997) Oxygen, pHi and arrest of biosynthesis in brine shrimp embryos. *Acta Physiol Scand* 161: 543-551
- Hand SC und Hardewig I (1996) Downregulation of cellular metabolism during environmental stress: mechanisms and implications. *Annu Rev Physiol* 58: 539-563
- Hardewig I, van Dijk PL, Moyes CD und Pörtner HO (1999) Temperature-dependent expression of cytochrome-c oxidase in Antarctic and temperate fish. *Am J Physiol* 277: R508-516
- Haschemeyer AE (1983) A comparative study of protein synthesis in nototheniids and icefish at Palmer Station, Antarctica. *Comp Biochem Physiol B* 76: 541-543
- Haschemeyer AE, Persell R und Smith MA (1979) Effect of temperature on protein synthesis in fish of the Galapagos and Perlas Islands. *Comp Biochem Physiol B* 64: 91-95

- Haschemeyer AEV und Williams RCJr (1982) Temperature dependency of cell-free protein synthetic systems from Antarctic fish. *Mar Biol Lett* 3: 81-88
- Haselkorn R und Rothman-Denes LB (1973) Protein synthesis. *Annu Rev Biochem* 42: 397-438
- Hawkins AJS (1991) Protein turnover: a functional appraisal. *Funct Ecol* 5: 222-233
- Hazel JR und Prosser CL (1974) Molecular mechanisms of temperature compensation in poikilotherms. *Physiol Rev* 54: 620-677
- Heilmayer O und Brey T (2003) Saving by freezing? Metabolic rates of *Adamussium colbecki* in a latitudinal context. *Mar Biol* 143: 477-484
- Heilmayer O, Brey T, Chiantore M, Cattaneo-Vietti R und Arntz WE (2003) Age and productivity of the Antarctic scallop, *Adamussium colbecki*, in Terra Nova Bay (Ross Sea, Antarctica). *J Exp Mar Biol Ecol* 288: 239-256
- Heilmayer O, Brey T, Storch D, Mackensen A und Arntz WE (2004) Population dynamics and metabolism of *Aequipecten opercularis* (L.) from the western English Channel (Roscoff, France). *Neth J Sea Res* (im Druck)
- Hershey JWB (1991) Translational control in mammalian cells. *Annu Rev Biochem* 60: 717-755
- Hochachka PW and Somero GN (1984) *Biochemical Adaptation*. Princeton University Press Princeton, New Jersey
- Hofmann GE und Hand SC (1994) Global arrest of translation during invertebrate quiescence. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 8492-8496
- Holeton GF (1974) Metabolic cold adaptation of polar fish: fact or artefact. *Physiol Zool* 47: 137-152
- Holeton GF (1973) Respiration of Arctic char (*Salvelinus alpinus*) from a high Arctic lake. *J Fish Res Board Can* 30: 717-723
- Houlihan DF (1991) Protein Turnover in Ectotherms and Its Relationships to Energetics. In Gilles R (Hrsg.) *Advances in Comparative and Environmental Physiology*. 7: 1-43

- Houlihan DF, Carter CG und McCarthy ID (1995) Protein turnover in animals. In Walsh P und Wright P (Hrsg.) Nitrogen metabolism and excretion. CRC Press Boca Raton, Fla. 1-32
- Houlihan DF, Mathers EM und Foster AR (1993) Biochemical correlates of growth rate in fish. In Rankin JC und Jensen FB (Hrsg.) Fish ecophysiology. Chapman & Hall London 45-71
- Houlihan DF, McMillan DN, Agnisola C, Trara Genoino I und Foti L (1990a) Protein synthesis and growth in *Octopus vulgaris*. Mar Biol 106: 251-259
- Houlihan DF, McMillan DN und Laurent P (1986) Growth rates, protein synthesis, and protein degradation rates in rainbow trout: Effects of body size. Physiol Zool 59: 482-493
- Houlihan DF, Waring CP, Mathers E und Gray C (1990b) Protein synthesis and oxygen consumption of the shore crab *Carcinus maenas* after a meal. Physiol Zool 63: 735-756
- Hubold G (1991) Ecology of Notothenioid Fish in the Weddell Sea. In Di Prisco G, Maresca B und Tota B (Hrsg.) Biology of Antarctic Fish. Springer-Verlag Berlin, Heidelberg 3-22
- Hubold G und Hagen W (1997) Seasonality of feeding and lipid content in juvenile *Pleuragramma antarcticum* (Pisces: Nototheniidae) from the southern Weddel Sea. Antarctic Communities: Species, Structure and Survival: 277-283
- Isfort RJ, Cody DB, Asquith TN, Ridder GM, Stuard SB und LeBoeuf RA (1993) Induction of protein phosphorylation, protein synthesis, immediate-early-gene expression and cellular proliferation by intracellular pH modulation. Implications for the role of hydrogen ions in signal transduction. Eur J Biochem 213: 349-357
- Jackson RJ (1982) The cytoplasmic control of protein synthesis. In Pérez-Bercoff R (Hrsg.) *Protein Biosynthesis in Eukaryotes*. Plenum Press New York & London: pp. 363-418
- Jobling M (1996) Temperature and growth: Modulation of growth rate via temperature change. In Wood CM und McDonald DG (Hrsg.) Global warming: Implications for freshwater and marine fish. Cambridge University Press, Cambridge (UK) 61: 225-253

- Kang SH, Oh TJ, Kim RG, Kang TJ, Hwang SH, Lee EY und Choi CY (2000) An efficient cell-free protein synthesis system using periplasmic phosphatase-removed S30 extract. *J Microbiol Methods* 43: 91-96
- Kawarasaki Y, Kawai T, Nakano H und Yamane T (1995) A long-lived batch reaction system of cell-free protein synthesis. *Anal Biochem* 226: 320-324
- Kawarasaki Y, Nakano H und Yamane T (1998) Phosphatase-immunodepleted cell-free protein synthesis system. *J Biotechnol* 61: 199-208
- Kock KH (1992) *Antarctic fish and fisheries*. Cambridge University Press Cambridge
- Kock KH und Everson I (1998) Age, growth and maximum size of Antarctic notothenioid fish -- revisited. In Di Prisco G, Pisano E und Clarke A (Hrsg.) *Fishes of Antarctica. A biological overview*. Springer-Verlag Italia, Milano 29-40
- Krogh A (1916) *The Respiratory Exchange of Animals and Man*. Longmans, Green and Co London
- Kunzmann A und Zimmermann C (1992) *Aethotaxis mitopteryx*, a high-Antarctic fish with benthopelagic mode of life. *Mar Ecol Prog Ser* 88: 33-40
- La Mesa M und Vacchi M (2001) Review. Age and growth of high Antarctic notothenioid fish. *Antarct Sci* 13: 227-235
- Lehtonen KK (1996) Ecophysiology of the benthic amphipod *Monoporeia affinis* in an open-sea area of the northern Baltic Sea: Seasonal variations in body composition, with bioenergetic considerations. *Mar Ecol Prog Ser* 143: 87-98
- Lied E, Lund B und von der Decken A (1982) Protein synthesis *in vitro* by epaxial muscle polyribosomes from cod, *Gadus morhua*. *Comp Biochem Physiol B: Biochem Mol Biol* 72: 187-193
- Lopo AC, Lashbrook CC und Hershey JW (1989) Characterization of translation systems *in vitro* from three developmental stages of *Strongylocentrotus purpuratus*. *Biochem J* 258: 553-561
- Lyndon AR und Houlihan DF (1998) Gill protein turnover: costs of adaptation. *Comp Biochem Physiol A* 119: 27-34

- Macdonald JA, Montgomery JC und Wells RMG (1987) Comparative physiology of Antarctic fishes. *Adv Mar Biol* 24: 321-388, 452
- Mark FC, Bock C und Pörtner HO (2002) Oxygen-limited thermal tolerance in Antarctic fish investigated by MRI and (31)P-MRS. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 283: R1254-R1262
- Marsh AG, Maxson RE Jr und Manahan DT (2001) High macromolecular synthesis with low metabolic cost in Antarctic sea urchin embryos. *Science* 291: 1950-1952
- Marshall CJ (1997) Cold-adapted enzymes. *Trends Biotechnol* 15: 359-364
- Mathers EM, Houlihan DF, McCarthy ID und Burren LJ (1993) Rates of growth and protein synthesis correlated with nucleic acid content in fry of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*: effects of age and temperature. *J Fish Biol* 43: 245-263
- McCarthy ID und Houlihan DF (1996) The effect of water temperature on protein metabolism in fish: the possible consequences for wild Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) stocks in Europe as a result of global warming. In Wood CM und McDonald DG (Hrsg.) *Global warming: implications for freshwater and marine fish*. Cambridge University Press Cambridge, UK 51-77
- McCarthy ID, Moksness E, Pavlov DA und Houlihan DF (1999) Effects of water temperature on protein synthesis and protein growth in juvenile Atlantic wolffish (*Anarhichas lupus*). *Can J Fish Aquat Sci/J Can Sci Halieut Aquat* 56: 231-241
- McMillan DN und Houlihan DF (1988) The effect of refeeding on tissue protein synthesis in rainbow trout. *Physiol Zool* 61: 429-441
- McMillan DN und Houlihan DF (1989) Short-term responses of protein synthesis to refeeding in rainbow trout. *Aquaculture* 79: 37-46
- Mikhail MY und Welch HE (1989) Biology of Greenland cod, *Gadus ogac*, at Saqvaquac, northwest coast of Hudson Bay. *Environ Biol Fish* 26: 49-62
- Munro HN und Fleck A (1966) Recent developments in the measurement of nucleic acids in biological materials. A supplementary review. *Analyst* 91: 78-88

- Newell RC und Branch GM (1980) The influence of temperature on the maintenance of metabolic energy balance in marine invertebrates. *Adv Mar Biol* 17: 329-396
- Nielsen JBK (1979) Levels of polypeptide elongation factor 1 in relation to adaptation of protein synthesis in tropical fishes. *Mar Biol Lett* 1: 15-22
- North AW (1998) Growth of young fish during winter and summer at South Georgia, Antarctica. *Polar Biol* 19: 198-205
- North AW, White MG und Trathan PN (1998) Interannual variability in the early growth rate and size of the Antarctic fish *Gobionotothen gibberifrons* (Lonnberg). *Antarct Sci* 10: 416-422
- Parry GD (1983) The influence of the cost of growth on ectotherm metabolism. *J Theor Biol* 101: 453-477
- Patnaik R und Swartz JR (1998) E. coli-based in vitro transcription/translation: in vivo-specific synthesis rates and high yields in a batch system. *Biotechniques* 24: 862-868
- Pauly D (1979) Gill size and temperature as governing factors in fish growth: a generalization of von Bertalanffy's growth formula. *Ber. Inst. Meereskd. Christian-Albrecht-Univ. Kiel* 63: 1-156
- Peck LS (2002) Ecophysiology of Antarctic marine ectotherms: limits to life. *Polar Biol* 25: 31-40
- Peck LS, Clarke A und Holmes LJ (1987) Summer metabolism and seasonal changes in biochemical composition of the Antarctic brachiopod *Liothyrella uva* (Broderip, 1833). *J Exp Mar Biol Ecol* 114: 85-97
- Peck LS und Conway LZ (2000) The myth of metabolic cold adaptation: oxygen consumption in stenothermal Antarctic bivalves. In Harper EM, Taylor JD und Crame JA (Hrsg.) *The Evolutionary Biology of the Bivalvia*. Geological Society, London, Special Publications, The Geological Society of London 177: 441-450
- Pocrnjic Z, Mathews RW, Rappaport S und Haschemeyer AE (1983) Quantitative protein synthetic rates in various tissues of a temperate fish in vivo by the method of phenylalanine swamping. *Comp Biochem Physiol B* 74: 735-738

- Poltermann M (2000) Growth, production and productivity of the Arctic sympagic amphipod *Gammarus wilkitzkii*. Mar Ecol Prog Ser 193: 109-116
- Pörtner HO (2002b) Climate variations and the physiological basis of temperature dependent biogeography: systemic to molecular hierarchy of thermal tolerance in animals. Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol 132: 739-761
- Pörtner HO (2002a) Physiological basis of temperature-dependent biogeography: trade-offs in muscle design and performance in polar ectotherms. J Exp Biol 205: 2217-2230
- Pörtner HO, Berdal B, Blust R, Brix O, Colosimo A, De Wachter B, Giuliani A, Johansen T, Fischer T, Knust R, Lannig G, Naevdal G, Nedenes A, Nyhammer G, Sartoris FJ, Serendero I, Sirabella P, Thorkildsen S und Zakhartsev M (2001) Climate induced temperature effects on growth performance, fecundity and recruitment in marine fish: developing a hypothesis for cause and effect relationships in Atlantic cod (*Gadus morhua*) and common eelpout (*Zoarces viviparus*). Continental Shelf Research 21: 1975-1997
- Pörtner HO, Hardewig I und Peck LS (1999) Mitochondrial function and critical temperature in the Antarctic bivalve, *Laternula elliptica*. Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol 124: 179-189
- Pörtner HO, van Dijk PLM, Hardewig I und Sommer A (2000) Levels of metabolic cold adaptation: tradeoffs in eurythermal and stenothermal ectotherms. In Davison W. und Howard Williams C. (Hrsg.) Antarctic ecosystems: models for wider ecological understanding. Caxton Press Christchurch New Zealand 109-122
- Precht H, Christophersen J, Hensel H, and Larcher W (1973) Temperature and life. Springer-Verlag Berlin
- Priede IG (1985) Metabolic scope in fishes. In Tyler P und Calow P (Hrsg.) Fish Energetics: New Perspectives. Croom Helm London, Sydney 33-64
- Ralph R und Maxwell JGH (1977a) Growth of two Antarctic lamellibranchs: *Adamussium colbecki* and *Laternula elliptica*. Mar Biol 42: 171-175
- Ralph R und Maxwell JGH (1977b) The oxygen consumption of the Antarctic limpet *Nacella (Patinigera) concinna*. Bull Br Antarct Surv 45: 19-23

- Rauschert M (1991) Ergebnisse der faunistischen Arbeiten im Benthal von King George Island (Südshetlandinseln, Antarktis). Ber Polarforsch 76: 1-75
- Ray KM, Kumar GS, Janiyani K, Kannan K, Jagtap P, Basu MK und Shivaji S (1998) Adaptation to low temperature and regulation of gene expression in antarctic psychrotrophic bacteria. J Biosci 23: 423-435
- Reid SD, Dockray JJ, Linton TK, McDonald DG und Wood CM (1995) Effects of a summer temperature regime representative of a global warming scenario on growth and protein synthesis in hardwater- and softwater-acclimated juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). J Thermal Biol 20: 231-244
- Reid SD, Dockray JJ, Linton TK, McDonald DG und Wood CM (1997) Effects of chronic environmental acidification and a summer global warming scenario: protein synthesis in juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Can J Fish Aquat Sci 54: 2014-2024
- Robertson RF, El-Haj AJ, Clarke A, Peck LS und Taylor EW (2001) The effects of temperature on metabolic rate and protein synthesis following a meal in the isopod *Glyptonotus antarcticus* Eights (1852). Polar Biol 24: 677-686
- Scholander PF, Flagg W, Walters V und Irving L (1953) Climatic adaptation in arctic and tropical poikilotherms. Physiol Zool 26: 67-69
- Schultz ET, Reynolds KE und Conover DO (1996) Countergradient variation in growth among newly hatched *Fundulus heteroclitus*: Geographic differences revealed by common-environment experiments. Funct Ecol 10: 366-374
- Segel LA (1976) Incorporation of receptor kinetics into a model for bacterial chemotaxis. J Theor Biol 57: 23-42
- Siegmund B (1986) Funktionsbedingte und biotopbedingte Hypoxien: Zur Bedeutung der Opine im anaeroben Energiestoffwechsel. Doktorarbeit: 72-93
- Simon E (1987) Effect of acclimation temperature on the elongation step of protein synthesis in different organs of rainbow trout. J Comp Physiol B 157: 201-207

- Smith MAK und Haschemeyer AEV (1980) Protein metabolism and cold adaptation in Antarctic fishes. *Physiol Zool* 53: 373-382
- Smith RW, Houlihan DF, Nilsson GE und Brechin JG (1996) Tissue-specific changes in protein synthesis rates in vivo during anoxia in crucian carp. *Am J Physiol* 271: R897-R904
- Sokolova IM und Pörtner HO (2001) Temperature effects on key metabolic enzymes in *Littorina saxatilis* and *L. obtusata* from different latitudes and shore levels. *Mar Biol* 139: 113-126
- Somero GN (1991) Biochemical mechanisms of cold adaptation and stenothermality in Antarctic fish. In Di Prisco G, Maresca B und Tota B (Hrsg.) *Biology of Antarctic Fish*. Springer-Verlag Berlin, Heidelberg 232-247
- Spirin AS, Baranov VI, Ryabova LA, Ovodov SY und Alakhov YB (1988) A continuous cell-free translation system capable of producing polypeptides in high yield. *Science* 242: 1162-1164
- Steffensen JF (2002) Metabolic cold adaptation of polar fish based on measurements of aerobic oxygen consumption: fact or artefact? *Artefact! Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 132: 789-795
- Sugden PH und Fuller SJ (1991) Correlations between cardiac protein synthesis rates, intracellular pH and the concentrations of creatine metabolites. *Biochem J* 273: 339-346
- Thomas T und Cavicchioli R (1998) Archaeal cold-adapted proteins: structural and evolutionary analysis of the elongation factor 2 proteins from psychrophilic, mesophilic and thermophilic methanogens. *FEBS Lett* 439: 281-286
- Thomas T und Cavicchioli R (2002) Cold adaptation of archaeal elongation factor 2 (EF-2) proteins. *Curr Protein Pept Sci* 3: 223-230
- Thomson CW und Murray J (1895) A summary of the scientific results. In Thomson CW und Murray J (Hrsg.) *Report of the scientific results of the voyage of H.M.S. Challenger during the years 1873 - 1876 under the command of Captain Sir George S. Nares and the late Captain Frank Tourle Thomson*. London First Part: 76-80
- Torres JJ und Somero GN (1988) Metabolism, enzymic activities and cold adaptation in Antarctic mesopelagic fishes. *Mar Biol* 98: 169-180

- van Dijk PL, Tesch C, Hardewig I und Pörtner HO (1999) Physiological disturbances at critically high temperatures: a comparison between stenothermal antarctic and eurythermal temperate eelpouts (Zoarcidae). *J Exp Biol* 202: 3611-3621
- van Dijk PLM, Hardewig I und Pörtner HO (1998) Exercise in the cold: High energy turnover in Antarctic fish. In di Prisco G, Pisano E und Clarke A (Hrsg.) *Fishes of Antarctica. A biological overview*. Springer-Verlag Italia: pp. 225-236
- van't Hoff JH (1884) *Etudes de dynamique chimique (Studien zur chemischen Dynamik)*. 1-236
- Vayda ME, Shewmaker CK und Morelli JK (1995) Translational arrest in hypoxic potato tubers is correlated with the aberrant association of elongation factor EF-1 alpha with polysomes. *Plant Mol Biol* 28: 751-757
- Waterlow JC, Garlick PJ und Millward DJ (1978) In Waterlow JC, Garlick PJ und Millward DJ (Hrsg.) *Protein turnover in mammalian tissues and in the whole body*. North-Holland Publishing Company Amsterdam, New York, Oxford: pp. 179-225 and 444-476
- Waterlow JC und Millward DJ (1989) Energy cost of turnover of protein and other cellular constituents. In Wieser W und Gnaiger E (Hrsg.) *Energy Transformation in Cells and Organisms*. Thieme Verlag Stuttgart 277-282
- Weijland A und Parmeggiani A (1993) Toward a model for the interaction between elongation factor Tu and the ribosome. *Science* 259: 1311-1314
- Wells RMG (1987) Respiration of Antarctic fish from McMurdo Sound. *Comp Biochem Physiol A* 88: 417-424
- White MG (1975) Oxygen consumption and nitrogen excretion by the giant Antarctic isopod *Glyptonotus antarcticus* (Eights) in relation to cold-adapted metabolism in marine polar poikilotherms. In Barnes H (Hrsg.) *Proc 9th Eur Mar Biol Symp*. University Press Aberdeen, UK: pp. 707-724
- Whiteley NM, Taylor EW und el Haj AJ (1996) A comparison of the metabolic cost of protein synthesis in stenothermal and eurythermal isopod crustaceans. *Am J Physiol* 271: R1295-1303

Wieser W und Krumschnabel G (2001) Hierarchies of ATP-consuming processes: direct compared with indirect measurements, and comparative aspects. *Biochem J* 355: 389-395

Winkler MM, Nelson EM, Lashbrook C und Hershey JW (1985) Multiple levels of regulation of protein synthesis at fertilization in sea urchin eggs. *Dev Biol* 107: 290-300

Woehrmann APA, Hagen W und Kunzmann A (1997) Adaptations of the Antarctic silverfish *Pleuragramma antarcticum* (Pisces: Nototheniidae) to pelagic life in High-Antarctic waters. *Mar Ecol Prog Ser* 151: 205-218

Wohlschlag DE (1960) Metabolism of an Antarctic fish and the phenomenon of cold adaptation. *Ecology* 41: 287-292

Zimmermann C und Hubold G (1998) Respiration and activity of Arctic and Antarctic fish with different modes of life: A multivariate analysis of experimental data. In Di Prisco G, Pisano E und Clarke A (Hrsg.) *Fishes of Antarctica. A biological overview*. Springer-Verlag Italia, Milano: pp. 163-174

An dieser Stelle möchte ich Danken:

Herrn **Prof. Hans Otto Pörtner** für die gute Betreuung und die Möglichkeit in seinem Labor die Arbeiten zu meiner Doktorarbeit auszuführen; Herrn **Prof. Wilhelm Hagen** für die Begutachtung meiner Arbeit; **Dr. Iris Hardewig** und **Dr. Magnus Lucassen** für die stete Diskussionsbereitschaft; **Olaf** für die schöne Zeit auf diversen Reisen gen Süden; den Italienern **Riccardo Cattaneo Vietti** und **Chiara Chiantore** für die Einladung und den tollen Aufenthalt auf der Italienischen Station; **Timo** für seine große Hilfsbereitschaft im Labor, trotzdem er soviel um die Ohren hat; **Gisela** und **Christian** dafür, dass sie mich auch während der langen verletzungsbedingten Zwangspause nicht vergessen haben; **Felix** für den Versuch, nach der Rückkehr ins normale Leben, mich mit dem Fahrrad schnell wieder fit zu bekommen; **Lars** für die netten Abende in der Eishalle und das Blumengießen während meiner verletzungsbedingten Abwesenheit; allen „**Vorzimmerjungs**“ aus dem „Molilabor“ und natürlich der gesamten **Arbeitsgruppe** für die stets sehr lustige aber auch inspirative Arbeitsatmosphäre; **Alexandra** und **Thomas** für ihren Beistand in vielen Phasen dieser Arbeit. Insbesondere möchte ich meiner ganzen **Familie** dafür danken, dass sie mir den Rückhalt, die Unterstützung und die Grundlage dafür geschaffen haben, diese Arbeit zu erstellen. „*Colbecki*“ lässt grüßen!

Ein besonderer Dank geht natürlich an **Tobias** für die Entspannung auf dem Wasser und sein großes Verständnis gerade in der Endphase dieser Arbeit.