

Bachelor-Thesis im Vollfach Biologie, Fachbereich 2, Universität Bremen

Angefertigt in der Sektion Integrative Ökophysiologie, Alfred-Wegener-Institut für Polar- und Meeresforschung, Bremerhaven

# **Temperaturabhängige pH- und Stoffwechselregulation in antarktischen Fischen**

Temperature dependent pH and metabolic regulation in Antarctic fish



Vorgelegt von:

**Bastian Maus**

Matrikelnummer: 2501581

im August 2013

Erstgutachter: Prof. Dr. Hans-Otto Pörtner

Zweitgutachter: Dr. Christian Bock

# Inhaltsverzeichnis

<i>Zusammenfassung / Summary</i>	<i>II</i>
<i>Abkürzungsverzeichnis</i>	<i>V</i>
<b>1. Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1 pH-Wert und CO <sub>2</sub> in lebendem Gewebe	1
1.2 Die alphastat-Hypothese der temperaturabhängigen pH-Regulation	2
1.3 Hintergründe zur Säure-Base-Regulation in <i>P. brachycephalum</i> und das Konzept der Sauerstoff- und Kapazität-limitierten Temperaturtoleranz	3
1.4 Konzept und Ziele des Versuchs	6
<b>2. Material und Methoden</b>	<b>7</b>
2.1 Versuchstiere	7
2.2 Inkubation und Probennahme	7
2.3 pH <sub>i</sub> -Messung und die Homogenatmethode	8
2.4 Messung von $c(\text{CO}_2)$ , $P(\text{CO}_2)$ und $[\text{HCO}_3^-]$	9
2.5 Metabolitmessung mittels <sup>1</sup> H-NMR-Spektroskopie	10
2.6 Auswertung und Statistik	10
<b>3. Ergebnisse</b>	<b>11</b>
3.1 pH <sub>i</sub>	11
3.2 CO <sub>2</sub> -Parameter	12
3.3 Metabolitmessungen	14
3.4 Korrelation zwischen pH <sub>i</sub> , Bicarbonat sowie Imidazol	15
<b>4. Diskussion</b>	<b>16</b>
4.1 Methodenkritik und mögliche Fehlerquellen	16
4.2 pH-Werte und anaerobe Metabolite	19
4.3 CO <sub>2</sub> -Gehalt	20
4.4 Imidazol und Pufferverhalten des Zytosols	21
4.5 Bezug auf Transkriptom-Analysen und aktive pH-Regulation	22
4.6 Einfluss des pH <sub>i</sub> und der Versorgung mit Sauerstoff auf Stoffwechselprozesse	25
4.7 Fazit	27
<b>5. Literaturverzeichnis</b>	<b>28</b>
<b>6. Anhang</b>	<b>A1</b>
6.1 Tabellen	A1
6.2 Rechnungen	A3
<i>Danksagungen</i>	<i>VII</i>
<i>Eigenständigkeitserklärung</i>	<i>VIII</i>

## Zusammenfassung

Die Antarktis zeichnet sich als Lebensraum vor allem durch konstant niedrige Temperaturen mit geringen, saisonalen Schwankungen aus. Ihre Bewohner sind an ein enges Temperaturfenster angepasst und allgemein als stenotherm zu bezeichnen, weshalb sie als besonders anfällig für Temperaturänderungen gelten.

Dies gilt auch für die antarktische Aalmutter (*Pachycara brachycephalum*), die im Rahmen dieser Bachelorarbeit hinsichtlich der temperaturbedingten Langzeitänderungen im Säure-Base-Haushalt und im Stoffwechsel untersucht wurde. Als Material dienten Proben aus weißem Muskelgewebe von Tieren, die zuvor für zwei Monate bei sechs unterschiedlichen Temperaturen zwischen -1 und 9°C inkubiert worden sind. Dieser Temperaturbereich deckt die bekannten Temperatur-Toleranzgrenzen der untersuchten Art ab. Die Änderung in Säure-Base-Parametern im weißen Muskel, genauer dem intrazellulären pH ( $\text{pH}_i$ ),  $c(\text{CO}_2)$ ,  $[\text{HCO}_3^-]$  und  $P(\text{CO}_2)$  wurden mittels Homogenatmethode untersucht. Relative Konzentrationsänderungen von Laktat, Succinat und Imidazol konnten durch Analyse von  $^1\text{H-NMR}$ -Spektren ermittelt werden und sollten das Bild hinsichtlich des anaeroben Stoffwechsels und der Puffereigenschaften des Zytoplasmas vertiefen.

Zwischen 0 und 3°C zeigte sich eine Erniedrigung des  $\text{pH}_i$  um  $-0,018^\circ\text{C}^{-1}$ , die mit Akut-Inkubationen am gleichen Gewebe übereinstimmt und auf alphastat-pH-Regulation hindeutet. Im Bereich zwischen 3 und 9°C stieg vor allem der  $\text{pH}_i$  an; ein erhöhter  $\text{CO}_2$ -Gehalt wurde zwischen 7 und 9°C gemessen. Diese Beobachtungen weichen von den bereits bekannten, akuten Anpassungsmustern ab und deuten darauf hin, dass alphastat-Regulation über längere Zeiträume nicht aufrechterhalten werden kann.

Eine Konzentrationsänderung der anaeroben Stoffwechselendprodukte Laktat und Succinat konnte nicht gemessen werden, jedoch sank bereits ab 3°C die relative Imidazol-Konzentration im Gewebe und blieb auch bei weiterer Temperaturerhöhung konstant niedrig. Das Fehlen dieses wichtigen intrazellulären Puffers könnte – bei steigender  $[\text{HCO}_3^-]$  im Gewebe – die Unterschiede im Verlauf des  $\text{pH}_i$  zwischen Langzeitinkubation und akuten Anpassungen erklären.

Die aerobe Kapazität des Tiers steht in Verbindung mit seiner Temperaturtoleranz. Bereits durchgeführte Untersuchungen deuten auf ein Defizit bei der Sauerstoffversorgung ab ca. 6°C hin, was sich in negativen Wachstumsraten niederschlägt. Ebenso konnte bereits zuvor gezeigt werden, dass das Wachstumsoptimum bei 3 bis 4°C mit den niedrigsten

Genexpressionsraten in Hepatozyten korreliert. Im Temperaturbereich des Wachstumsoptimums entspricht die  $\text{pH}_i$ -Regulation demnach der postulierten alphastat-Hypothese. Bei steigenden Temperaturen weichen erst der  $\text{pH}_i$ , dann der  $\text{CO}_2$ -Gehalt vom alphastat-Muster ab – passend zum genannten Rückgang der aeroben Kapazität. Die Fähigkeit zur aeroben Energiegewinnung im Gewebe scheint also ausschlaggebend für die Effizienz der Säure-Base-Regulation zu sein.

## Summary

The Antarctic ocean is a stable environment, especially concerning its constantly low temperatures that are not subjected to great seasonal changes. The resident animals are well adapted to a narrow temperature range and usually characterised as stenothermal, thus being vulnerable to temperature changes.

This also accounts for the antarctic eelpout *Pachycara brachycephalum*, that has been studied in the course of this Bachelor-thesis for temperature-dependent long-term changes in acid-base-regulation and metabolism. Experiments were conducted on samples of white muscle tissue of animals that were previously incubated to six different temperatures, ranging from  $-1$  to  $9^\circ\text{C}$ , for two months. This range covers the known boundaries of temperature-tolerance of the species investigated. Changes in intracellular pH ( $\text{pH}_i$ ),  $c(\text{CO}_2)$ ,  $[\text{HCO}_3^-]$  and  $P(\text{CO}_2)$  in white muscle tissue were determined using the homogenate technique. Through the analysis of  $^1\text{H}$ -NMR-spectra, I was able to look for changes in the relative concentrations of lactate, succinate and imidazole, in order to gain information on anaerobic metabolism and buffering characteristics of the cytoplasm.

A decline in  $\text{pH}_i$  of  $-0,018^\circ\text{C}^{-1}$  was detected between  $0$  and  $3^\circ\text{C}$ , that coincides with short-term studies on the same tissue and indicates alphastat regulation.  $\text{pH}_i$  rose predominantly between  $3$  and  $9^\circ\text{C}$ ; and an increased  $\text{CO}_2$ -content was found between  $7$  and  $9^\circ\text{C}$ . These findings differ from previously investigated short-term patterns and indicate that alphastat regulation might not be sustainable on longer timescales.

No change was found in the relative concentrations of anaerobic metabolites lactate and succinate, whilst the imidazole-concentration dropped already at  $3^\circ\text{C}$  and remained constantly low despite rising temperatures. The differences in  $\text{pH}_i$ -regulation between long-term and acute adaptations could be related to the lack of this important intracellular buffer and to a rise in tissue bicarbonate concentration.

The aerobic capacity of the animal is linked to its thermal tolerance. Earlier studies showed that oxygen supply is reduced at about 6°C resulting in negative growth rates at this temperature and above. Optimal growth has already been measured as well, ranging between 3 to 4°C and correlating with the lowest levels of gene-expression in hepatocytes. Up to these limits,  $\text{pH}_i$  changed according to the proposed alphastat-Hypothesis. With increasing temperatures, first  $\text{pH}_i$ , then  $\text{CO}_2$ -content deviate from the alphastat-pattern and this corresponds to the before mentioned reduction in aerobic capacity. Therefore the capability to use aerobic metabolism seems to be defining the efficiency of acid-base regulation.

## Abkürzungsverzeichnis

$\bar{a}$	Beschleunigung	KOH	Kaliumhydroxid
$\alpha$	Dissoziationsgrad	kPa	Kilopascal
$\alpha$	Löslichkeitskoeffizient	L	Liter
ADP	Adenosin-5'-diphosphat	m	Meter
AMP	Adenosin-5'-monophosphat	M	Molar (mol/L)
ANOVA	Varianzanalyse	Mg <sup>2+</sup>	zweiwertiges Magnesiumion
ATP	Adenosin-5'-triphosphat	min	Minute(n)
°C	Grad Celsius	mol	Mol
Ca <sup>2+</sup>	zweiwertiges Calciumion	MS-222	Tricain-Methansulfonat
$c(\text{CO}_2)$	Kohlenstoffdioxid-Gehalt	$n$	Stichprobengröße
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid	Na	Natrium
CO <sub>2</sub> <sup>3-</sup>	Carbonat	Na <sup>+</sup>	Natriumion
d	Tag(e)	NaOH	Natriumhydroxid
D <sub>2</sub> O	Deuteriumoxid / schweres Wasser	NMR	Kernspinnresonanz
DNA	2'-Desoxyribonukleinsäure	NTA	Nitritotriessigsäure
g	Gramm; Erdbeschleunigung	O <sub>2</sub>	molekularer Sauerstoff
GC	Gaschromatograph(ie)	P	Phosphor; Wahrscheinlichkeit
GTP	Guanosin-5'-triphosphat	$P$	Leistung
H <sup>+</sup>	Wasserstoffion / Proton	PCA	Perchlorsäure
HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	Hydrogencarbonat / Bicarbonat	$P(\text{CO}_2)$	Kohlenstoffdioxid-Partialdruck
H <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	Kohlensäure	PFK1	Phosphofruktokinase 1
H <sub>2</sub> O	dest. Wasser	pH	$-\log_{10}[\text{H}^+]$
H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	anorganisches Phosphat(-ion)	pH <sub>i</sub>	intrazellulärer pH
HCl	Salzsäure	pK <sub>s</sub>	$-\log_{10}$ der Gleichgewichtskonstante im Säure-Base-Gleichgewicht
HR-MAS	high-resolution magic angle spinning	pK <sub>s</sub> '''	pK-Wert unter definierten Versuchbedingungen
HSI	hepatosomatischer Index $\frac{\text{Lebergewicht in g} \cdot 100}{\text{Körpergewicht in g}}$	$\rho$	Spearman Rangkorrelationskoeffizient
HSP	Hitzeschock-Protein	$R^2$	Bestimmtheitsmaß
$I$	Ionenstärke	rel. E.	relative Einheiten
Im	(deprotoniertes) Imidazol	RNA	Ribonukleinsäure
ImH <sup>+</sup>	protoniertes Imidazol	SD	Standardabweichung
IMP	Inosin-5'-monophosphat	$t$	Zeit
K <sup>+</sup>	Kaliumion	$T$	Temperatur
KF	Kaliumfluorid	T	Tesla
		$T_{cII}$	obere kritische Temperatur

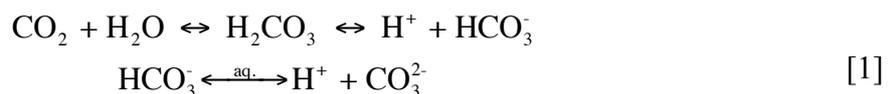
$T_{pH}$	obere Pejus-Temperatur
TMS	3-(Trimethylsilyl)- propion-2,2,3,3-d <sub>4</sub> -säure
$W$	Watt
$\bar{x}$	Mittelwert
$Z$	Ladungszahl / Proteinladung

## 1. Einleitung

Änderungen von Umweltparametern in Folge des Klimawandels gewinnen vor allem für die zuvor stabilen polaren Ökosysteme an Bedeutung (Hoegh-Guldberg & Bruno 2010). Durch entsprechende Langzeitstudien, lassen sich die dort nachhaltig wirksamen Auswirkungen der fortschreitenden Temperaturerhöhung untersuchen und Voraussagen über die integrativen Zusammenhänge zwischen abiotischen Ursachen und biotischen Auswirkungen erstellen (Parmesan & Yohe 2003). In dieser Arbeit sollen die langfristigen Anpassungsfähigkeiten in der Regulation des Säure-Base-Haushalts der poikilothermen, stenothermen antarktischen Aalmutter *Pachycara brachycephalum* analysiert werden.

### 1.1 pH-Wert und CO<sub>2</sub> in lebendem Gewebe

Die Bedeutung des pH-Werts für den Organismus zeigt sich durch seinen Einfluss auf zahlreiche biochemische Prozesse. Als Folge von Änderungen des pH-Werts im Körper ändern sich auch der Dissoziationsgrad der schwachen Säuren und damit die Ladung von Proteinen. Von der Nettoladung der Proteine werden wiederum Enzymaktivitäten, die Assemblierung von Untereinheiten und die Membraneigenschaften beeinflusst. Sie trägt außerdem zum osmotischen Druck von Zellkompartimenten bei. Die Ladung der Proteine definiert schließlich die Gesamtladung innerhalb der Zellen und damit auch das Reaktionsvermögen von Ionen (Eckert et al. 2002). Stoffwechselbedingt werden fortlaufend Protonen in den Zellen freigesetzt. Um Enzymaktivitäten und osmotische Prozesse stabil zu halten, ist die aktive Regulation des pH-Werts für Tiere sehr wichtig. Eine verstärkte, biologisch bedingte Ansäuerung des Zytoplasmas findet durch erhöhte Zellatmung oder durch anaeroben Energiestoffwechsel statt (Eckert et al. 2002). Als Produkt der Zellatmung ist CO<sub>2</sub> an der beschriebenen Ansäuerung beteiligt, da es in wässriger Lösung Kohlensäure bildet. Folgende Reaktionsgleichung beschreibt die möglichen Verbindungen von CO<sub>2</sub> und Wasser:



Der  $P(\text{CO}_2)$  steht demnach in direkter Beziehung zum pH-Wert und ist für den Organismus die Variable, über welche die Konzentration von CO<sub>2</sub> im Blut und damit auch für die Gewebe durch die Atmung geregelt werden kann. Höhere CO<sub>2</sub>-Partialdrücke erhöhen pH-abhängig die Bildung von HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>, da die Stoffmengenverhältnisse der oben genannten Reaktion [1] verschoben werden (Eckert et al. 2002). Die Feinabstimmung des intrazellulären pH (pH<sub>i</sub>)

erfolgt über Protonenexkretion, unter anderem durch den  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -Antiporter. Durch das Membranpotential allein, würde der  $\text{pH}_i$  um knapp eine Einheit unter den tatsächlich gemessenen Werten liegen. Allerdings wird der  $\text{Na}^+$ -Einstrom ebenfalls reguliert, da das hohe Gefälle zwischen extra- und intrazellulärer  $\text{Na}^+$ -Konzentration wiederum zu alkalischeren  $\text{pH}_i$ -Werten führen würde (Madshus 1988).

## 1.2 Die alphastat-Hypothese der temperaturabhängigen pH-Regulation

Die Funktionalität der intrazellulären Proteine wird in poikilothermen Vertebraten gemäß der alphastat-Hypothese (Reeves 1972) auch bei einer Änderung der Umgebungs-/Körpertemperatur aufrechterhalten. Da die meisten Fische – so auch die Aalmutter – ektotherm sind, entspricht die Temperatur in ihrem Gewebe nahezu der Umgebungstemperatur (Taylor et al. 1999). Eine besondere Rolle kommt dabei der temperaturabhängigen Änderung des  $\text{pK}$ -Wertes der Imidazol-Gruppen ( $\text{pK}_{\text{Im}}$ ) in Histidin-Seitenketten zu, die in etwa der zu beobachtenden, temperaturabhängigen  $\text{pH}$ -Wert-Änderung entspricht ( $\Delta\text{pK}_{\text{Im}}/\Delta T \approx \Delta\text{pH}/\Delta T$ ). Die Imidazol-Gruppen stellen einen entscheidenden Teil der hohen Pufferkapazität des Zytoplasmas dar und dominieren generell die Bicarbonat-unabhängigen Puffersysteme im Körper (Reeves 1972; Abe et al. 1985). Per Definition ist der  $\text{pK}$ -Wert als Gleichgewichtskonstante für die Protonierung eines Stoffes im Säure-Base-Verhältnis anzusehen, wenn gilt:  $\text{Im} + \text{H}^+ = \text{ImH}^+$ . Als „alpha“ wird – in diesem Fall – der Dissoziationsgrad einer Imidazol-Gruppe bezeichnet (Burton 2002):

$$\alpha = \frac{[\text{Im}]}{[\text{Im}] + [\text{ImH}^+]} \quad [2]$$

Da sich der Dissoziationsgrad der Proteine passiv dem  $\text{pK}_{\text{Im}}$  anpasst, sind umfangreiche Änderungen im  $\text{CO}_2$ -Gehalt des Gewebes nicht nötig, um den  $\text{pH}_i$  entsprechend zu regeln (Reeves 1972).

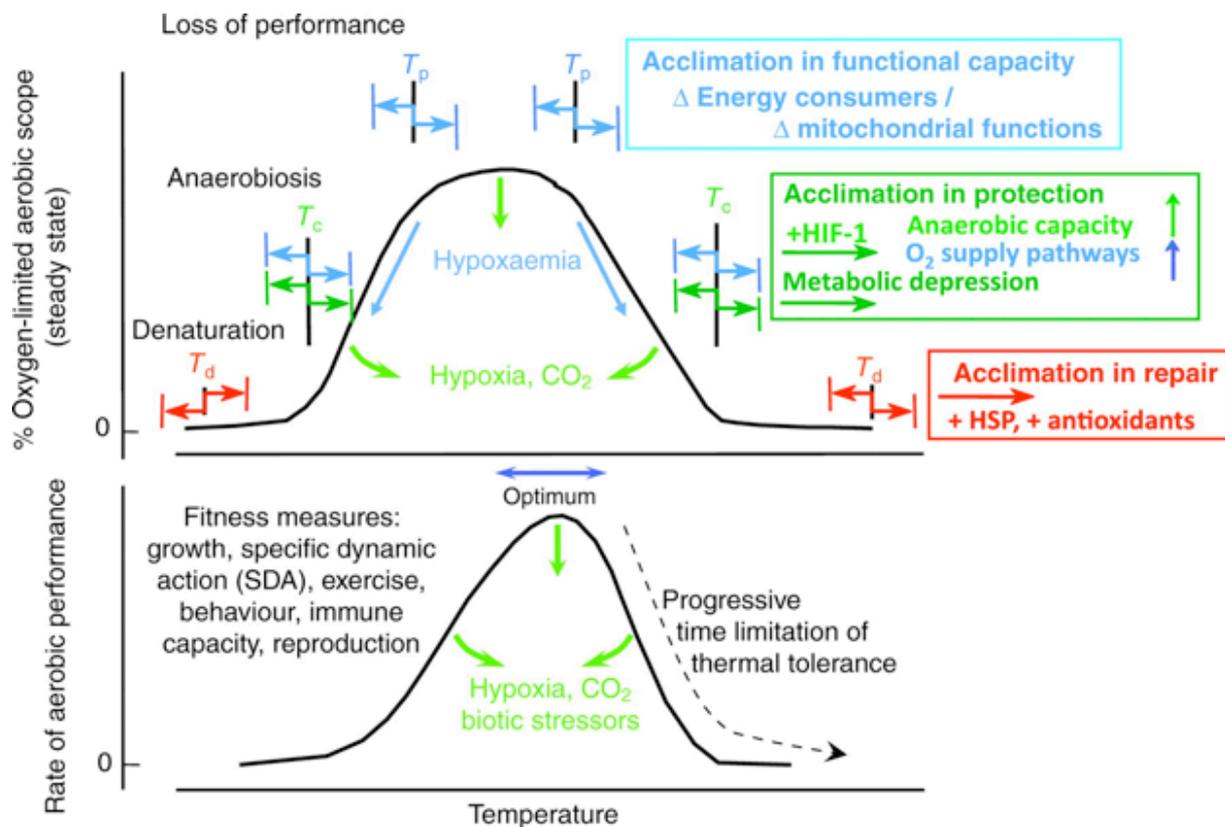
Lediglich der  $P(\text{CO}_2)$  hat – wie zuvor herausgestellt – einen direkten Bezug zum  $\text{pH}_i$  und ist zumindest eine Möglichkeit den  $\text{pH}$ -Wert gezielt durch Ventilation zu beeinflussen. Da  $\text{CO}_2$  in Seewasser bei  $0^\circ\text{C}$  ca. 37-fach besser löslich ist, als  $\text{O}_2$  (Eckert et al. 2002), ist die  $\text{CO}_2$ -Abgabe selbst bei normaler Ventilationrate nicht limitiert. Die Ventilationrate (und damit die  $\text{CO}_2$ -Abgabe) würde nur bei sehr hohen  $\text{O}_2$ -Konzentrationen gesenkt werden (Eckert et al. 2002), welche im hier beschriebenen Experiment jedoch auszuschließen sind.

Ein wichtiger Nebenaspekt der alphastat-Regulation ist die Aufrechterhaltung der Elektroneutralität im Gewebe. Negativ geladene Proteine dienen (neben  $\text{HCO}_3^-$  und  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$ )

als Pufferbasen, die ebenfalls den pH-Wert beeinflussen. Durch eine Ansäuerung verändern sich die Pufferkapazitäten – effektiv sinkt die Konzentration negativ geladener Proteine. Dies muss durch einen Einstrom von Anionen oder einen Ausstrom von Kationen kompensiert werden, um die Elektroneutralität des Mediums zu erhalten (Eckert et al. 2002). Extensive Regulationsprozesse werden überflüssig, da die Nettoladung der Proteine durch die physikalisch bedingte, temperaturabhängige Änderung des  $pK$  weitgehend konstant bleibt. Bezüglich der Ladungskonstanz spricht man auch von der Z-stat-Hypothese (Cameron 1989), die als Ergänzung zur alphastat-Hypothese gesehen werden kann (Pörtner & Bock 2000; Burton 2002). Allerdings beeinflussen auch temperaturbedingte Konformationsänderungen der Proteine und die Ionenstärke des Zytoplasmas die tatsächliche Ladung, was erneut zeigt, dass die Regulation des Säure-Base-Haushalts der Zellen über zahlreiche Parameter erfolgen kann (Burton 2002).

### **1.3 Hintergründe zur Säure-Base-Regulation in *P. brachycephalum* und das Konzept der Sauerstoff- und Kapazität-limitierten Temperaturtoleranz**

Die alphastat-pH-Hypothese wurde bereits in mehreren Studien an der stenothermen antarktischen Aalmutter *Pachycara brachycephalum* und nah verwandten Arten der Zoarcidae getestet (unter anderem: van Dijk et al. 1997; 1999; Bock et al. 2001; Mark et al. 2002). Verschiedene Messverfahren kamen dabei zu vergleichbaren Ergebnissen bezüglich der temperaturabhängigen pH-Änderung. Gemäß der alphastat-Hypothese bedingt eine Erhöhung der Inkubationstemperatur eine Senkung des  $pH_i$ . Van Dijk et al. (1999) zeigten, dass sich der  $pH_i$  im weißen Muskel bei *P. brachycephalum* in Übereinstimmung mit der alphastat-Hypothese einer akuten Temperaturerhöhung von 0 bis 3°C anpasst: In diesem Temperaturbereich wurde eine pH-Wert-Erniedrigung um  $-0,015^{\circ}\text{C}^{-1}$  gemessen. Ausgehend vom  $pH_i$  bei 3°C, fiel dieser erst wieder bei einer Temperatur von  $> 9^{\circ}\text{C}$ , was die Autoren auf die erhöhte Laktat-Konzentration als Folge eines einsetzenden anaeroben Stoffwechsels zurückführten. Aus diesen Effekten einer Kurzzeitinkubation schlossen sie, dass die obere kritische Temperatur ( $T_{cII}$ ) für *P. brachycephalum* bei ca. 10°C liegt. Der  $\text{CO}_2$ -Gehalt und der  $P(\text{CO}_2)$  des Muskels änderten sich hier über eine Temperaturspanne zwischen 0°C und 10°C nicht signifikant. Mark et al. (2002) bestimmten die Pejus-Temperatur ( $T_{pII}$ ) auf etwa 6°C, gekennzeichnet durch einen Rückgang der aeroben Kapazität und der temperaturabhängigen Änderung des  $pH_i$ . Der Versuchsansatz der hier durchgeführten Studie soll Klarheit über langfristige Anpassungen bringen und Aufschlüsse darüber geben, ob diese sich von den bekannten Daten zu Kurzzeitinkubationen unterscheiden.



**Abb. 1: Konzept der Sauerstoff- und Kapazität-limitierten Temperaturtoleranz.** Der obere Graph gibt die Temperaturgrenzen ( $T_p$  Pejus-Temperatur;  $T_c$  kritische Temperatur;  $T_d$  Temperatur, bei der die Proteine beginnen zu denaturieren) in Relation zur Sauerstoffversorgung an, die das Leistungs- und Wachstumsverhalten (unterer Graph) definieren. Das Optimum befindet sich im Temperaturbereich zwischen den Pejus-Temperaturen, wobei eine leichte Verschiebung hin zur  $T_{pII}$  zu erkennen ist. Hier führt die optimale aerobe Kapazität zu optimaler Energienutzung. Zwischen Pejus- und kritischer Temperatur nimmt der Sauerstoffgehalt des Bluts ab (Hypoxemia), während gleichzeitig die anaerobe Kapazität steigt. Jenseits der  $T_c$  ist überleben nur kurzzeitig möglich, da hier die Sauerstoffversorgung gänzlich zum Erliegen kommt. Abiotische (CO<sub>2</sub>, Hypoxie) und biotische Stressoren verengen den Temperaturtoleranzbereich (nach Pörtner 2010 und Windisch 2013).

Die Pejus-Temperaturen definieren den Temperaturbereich, in dem ein Tier seine Gewebe optimal mit Sauerstoff versorgen kann und zur vollständig aeroben Energiegewinnung in der Lage ist. Unter anderem schlägt sich dies in optimalen Wachstumsraten nieder. Bei Temperaturen jenseits davon reicht die Kapazität zur Sauerstoffversorgung nicht mehr, um den Sauerstoffbedarf im Gewebe zu decken, was – aufgrund des steigenden Anteils der anaeroben Energiegewinnung – zu Einbußen in der generellen Leistungsfähigkeit und im Wachstum der Tiere führt (Abb. 1). Eine Limitierung des Faktors „Wachstum“ ist dabei nicht auf molekulare Schädigungen einzelner Zellen zurückzuführen, sondern eher auf Störungen durch Sauerstoffmangel auf organismischer Ebene (Pörtner 2001), speziell im Herz-Kreislaufsystem (Pörtner 2010). Das physiologische Optimum liegt meist knapp unter der oberen Pejus-Temperatur  $T_{pII}$ , bedingt durch die Kombination aus hoher thermischer Aktivierungsenergie und hoher Sauerstoffversorgung (Pörtner 2010). Die kritischen

Temperaturen begrenzen die grundlegende Überlebensfähigkeit, da hier die Fähigkeit zu aerobem Stoffwechsel mangels grundlegender Sauerstoffversorgung zum Erliegen kommt. In der Spanne zwischen  $T_p$  und  $T_c$  ist ein Überleben zwar noch möglich, aber eben nur unter begrenzter Sauerstoffverfügbarkeit im Gewebe (Pörtner 2001).

Für wasserlebende Kiemenatmer wird angenommen, dass neben der physiko-chemisch bedingten Änderung des  $pK_{Im}$  und der Regulation des  $P(\text{CO}_2)$  durch Ventilation, auch der aktive Austausch von Säure-Base-Äquivalenten für die Anpassung des  $\text{pH}_i$  an eine Temperaturänderung verantwortlich ist (van Dijk et al. 1997). Aktive Prozesse bedeuten in biologischen Systemen immer einen Verbrauch von ATP. Um dies über einen längeren Zeitraum effektiv zu regenerieren, sind Vertebraten auf eine ausreichende Sauerstoffversorgung angewiesen. Die reduzierte aerobe Kapazität, gekennzeichnet durch eine reduzierte Sauerstoffversorgung, an der  $T_{pII}$  von  $6^\circ\text{C}$  (Mark et al. 2002) könnte also Einfluss auf die aktive Regulation des  $\text{pH}_i$  haben.

Die pH-Wert-Änderung von  $-0,015^\circ\text{C}^{-1}$  (van Dijk et al. 1999) stimmt mit den Werten aus den Studien von Bock et al. (2001) und Mark et al. (2002) überein, wobei van Dijk et al. die Homogenatmethode nach Pörtner et al. (1990) angewandt haben, die anderen Daten jedoch aus *in vivo*  $^{31}\text{P}$ -NMR-Spektren gewonnen wurden. Die Studien von van Dijk et al. (1999) und Mark et al. (2002) decken den hier relevanten Temperaturbereich von  $-1$  bis  $9^\circ\text{C}$  gut ab und dienen daher als Referenz. Entscheidender Unterschied der hier durchgeführten Studie zu den vorangegangenen ist allerdings die Inkubationsdauer, die nicht über wenige Tage (van Dijk et al. 1999, Mark et al. 2002) bzw. Stunden (Bock et al. 2001) hinausging. Diesbezüglich sollen die hier erhobenen Daten das Verständnis der temperaturabhängigen Anpassung weiter vertiefen: Die hier durchgeführte, langfristige Inkubation der Fische liefert Eindrücke über die nachhaltige Anpassung an unterschiedliche Temperaturen, die sich eventuell vom akuten Adaptionverhalten unterscheiden.

An den Versuchstieren wurden bereits Transkriptomanalysen durchgeführt und mit Leistungsparametern wie HSI, Wachstum und Hämatokrit korreliert (Windisch 2013). Der Datensatz wird ergänzt, durch die transkriptomischen Anpassungen in *P. brachycephalum* an eine Temperaturerhöhung von  $0$  auf  $5^\circ\text{C}$  im Zeitverlauf von 6 Wochen (Windisch et al. 2011). Beide Arbeiten beziehen sich vornehmlich auf Untersuchungen an der Leber und zeigen Hinweise auf eine temperaturbedingte Gewebereorganisation über eine Verschiebung zu einem Kohlenhydratstoffwechsel und einem reduzierten Lipidstoffwechsel bei fortschreitender Inkubation. Dass diese Änderung erst bei einer Inkubation über mehrere

Wochen auftritt (Windisch et al. 2011), deutet an, dass Kurzzeitinkubationen womöglich ein unzureichendes Bild über die tatsächliche Temperaturtoleranz einer Art wiedergeben.

Das Wachstumsoptimum wurde zuvor zwischen 3°C (Windisch 2013) und 4°C (Brodte et al. 2006) bestimmt. Dieser Temperaturbereich korrelierte auf zellulärer Ebene über 9 Wochen mit dem geringsten Transkriptionsaufwand, was Rückschlüsse auf Energieeinsparungen zu Gunsten des Wachstums zulässt. Der Rückgang der Körpermasse bei Temperaturen jenseits der  $T_{pII}$  von 6°C konnte in Zusammenhang mit Autophagie gesetzt werden. Neben Kohlenhydraten, wurden also auch vermehrt Peptide und Aminosäuren im Energiestoffwechsel genutzt, zumal Aminosäuren wohl schon bei geringen Temperaturen als Energiequelle dienen (Windisch 2013).

#### 1.4 Konzept und Ziele des Versuchs

Die hier durchgeführten Messungen sollen Aufschlüsse über den Säure-Base-Haushalt und den Stoffwechsel im weißen Muskelgewebe der antarktischen Aalmutter *Pachycara brachycephalum* (Pappenheim 1912) nach einer Langzeittemperaturinkubation geben. Dabei ist von besonderem Interesse, ob sich Änderungen des  $pH_i$  von bereits bekannten Kurzzeitbeobachtungen unterscheiden.

Um ein breites Spektrum von Akklimationseffekten untersuchen zu können, wurden sechs verschiedene Temperaturen appliziert, die das bereits definierte Temperaturtoleranzfenster dieser Art widerspiegeln. Nach einer 9-wöchigen Inkubationszeit wurden Proben aus sämtlichen Geweben gewonnen, wobei in dieser Arbeit ausschließlich am weißem Muskel gearbeitet wurde.

Des Weiteren sollte mit Hilfe der  $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie untersucht werden, inwiefern sich die Konzentrationen bestimmter Metabolite verändern, die im Zusammenhang mit dem Säure-Base-Haushalt stehen und Anzeiger für einen aeroben oder anaeroben Stoffwechsel sind. Anhand dieser Ergebnisse sollten schließlich transkriptionelle Veränderungen verschiedener Kandidatengene validiert werden, die in Microarray-Experimenten mit Leberproben aus der selben Inkubation als „temperatursensitiv-reguliert“ detektiert werden konnten (Windisch 2013). Eventuell lassen sich so Temperaturgrenzen genauer charakterisieren, an denen grundlegende Änderungen im Stoffwechsel als Antwort auf eine Langzeit-Temperaturinkubation einsetzen. Untersucht wurden deshalb der intrazelluläre pH-Wert ( $pH_i$ ), die Konzentration von  $\text{CO}_2$  ( $c(\text{CO}_2)$ ), bzw. der entsprechende Partialdruck ( $P(\text{CO}_2)$ ) und die Bicarbonatkonzentration  $[\text{HCO}_3^-]$  im Gewebe. Anhand von Metabolit-Profilen aus  $^1\text{H-NMR}$ -

Spektren konnten relative Änderungen in den Konzentrationen von Laktat und Succinat bestimmt werden, um abschätzen zu können, ob das Gewebe zum anaeroben Energiestoffwechsel übergegangen ist, in Folge dessen sich diese Substanzen anreichern würden. Auf die gleiche Weise wurden relative Konzentrationsänderungen des Puffers Imidazol bestimmt, der per Definition (Reeves 1972) für die alphastat-Regulation des pH<sub>i</sub> verantwortlich ist.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Versuchstiere

Als Grundmaterial dienten die Gewebeproben, welche aus einer Studie zur Temperatur-Anpassung von *P. brachycephalum* gewonnen wurden (Windisch 2013). Die Fische wurden 2009 mit Hilfe von Köderfallen während der Expedition ANTXXV/4 des FS Polarstern gefangen (62°19,01' S 58°35,49' W; 62°16,86' S 58°36,75' W; 62°19,33' S 58°33,80' W; 62°19,69' S 58°33,68' W, Tiefe: 420-470 m). Nach dem Fang wurden die Fische ins Alfred-Wegener-Institut in Bremerhaven gebracht und bis zum Beginn der Experimente im November 2009 bei 0°C in Meerwasser gehalten (Salinität 34; Windisch 2013).

### 2.2 Inkubation und Probennahme

Neben einer Kontrollgruppe von 12 Tieren bei 0°C wurden je 12 Individuen bei Inkubationstemperaturen von -1, 3, 5, 7 und 9°C für 9 Wochen in einzelnen Schwimmkörben gehalten. Die Temperaturänderung, ausgehend von 0°C, betrug 1°C/d, wobei die Gruppen mit einer Inkubationstemperatur von 7 und 9°C vor dem eigentlichen Inkubationszeitraum für eine Woche bei 5°C gehalten wurden. Die Gruppe, die schließlich bei 9°C inkubiert werden sollte, wurde für eine weitere Woche bei 7°C gehalten, bevor die entgültige Temperatur für 9 Wochen beibehalten wurde. Die Fische wurden wöchentlich *ad libitum* mit *Crangon crangon* gefüttert. In den letzten sieben Tagen vor Probennahme wurden die Fütterungen eingestellt. Nach Betäubung mittels MS-222 (0,2 g/L) wurde den Tieren die Wirbelsäule möglichst nah hinter dem Schädel durchtrennt. Die Gewebeproben aus weißem Muskel wurden entnommen, mittels freeze-clamp in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend bei -196°C gelagert. Die Probennahme fand nach der Inkubation, Anfang 2010 statt (Windisch 2013).

Die Messungen im Rahmen dieses Versuchs wurden im Frühjahr 2013 an weißem Muskelgewebe von je 5 (Inkubationen), bzw. 7 Tieren (Kontrolle) durchgeführt, wobei es

sich um die selben Individuen handelte, die bereits in einer Microarray-Studie untersucht wurden (Windisch 2013). Um geschlechtsspezifische Effekte auszuschließen, wurden in besagter Microarray-Studie vorzugsweise Männchen untersucht. Da allerdings nur zwei Männchen die 9°C-Inkubation überlebten, wurde weiteres Probenmaterial aus drei Weibchen verwendet.

### 2.3 $\text{pH}_i$ -Messung und die Homogenatmethode

Die Messungen von  $\text{pH}_i$  und  $\text{CO}_2$ -Gehalt des Muskels wurden anhand der Homogenatmethode gemäß Pörtner et al. (1990) durchgeführt. Die Methode basiert auf der kurzfristigen, chemischen Unterdrückung möglichst aller pH-Wert beeinflussenden Stoffwechselfvorgänge im Gewebe, nachdem dieses mechanisch aufgeschlossen wurde. Als Medium zur Inhibition von  $\text{pH}_i$ -Änderungen (als Folge des Auftauens) wurde, wie durch Pörtner et al. (1990) und van Dijk et al. (1999) beschrieben, eine Lösung aus 150 mM Kaliumfluorid (KF) und 1 mM  $\text{Na}_2$  Nitrilotriessigsäure (NTA) verwendet. Die KF-Konzentration wurde auf die Kaliumkonzentration des Zytoplasmas und die NTA-Konzentration auf die Aktivität des Gewebes abgestimmt. Je niedriger die Aktivität, desto niedriger sollte die NTA-Konzentration sein. KF und NTA hemmen Reaktionsketten, wie den Abbau von energiereichen Phosphaten oder die anaerobe Bildung von Laktat als Folge der Glykolyse (Pörtner et al. 1990). NTA sollte dabei die zweiwertigen Ionen  $\text{Ca}^{2+}$  und  $\text{Mg}^{2+}$  binden und sie als Cofaktoren aus dem ATP-Stoffwechsel entfernen. Neben den genannten Reaktionen, beeinflussen ATPasen und (ATP-abhängige) Kinasen den pH-Wert *in vitro* sekundär und besonders Muskelgewebe ist durch den erhöhten Calciumgehalt im sarkoplasmatischen Retikulum zu einem hohen ATP-Umsatz in der Lage.

Der pH-Wert des Mediums wurde mit 0,1 M HCl und 0,05 NaOH auf 0,5 pH-Einheiten unter den maximal erwarteten pH-Wert der Probe eingestellt und lag demnach bei ca. 7,0 (nach Pörtner et al. 1990). Aufgrund der niedrigen Pufferkapazität des Mediums reichten zumeist geringe Mengen der Lauge aus. Das Medium wurde maximal drei Tage lang verwendet und bei Bedarf neu angesetzt.

Ein Versuchsröhrchen wurde mit 200 mL KF/NTA-Medium vorbereitet und kurz in flüssigen Stickstoff getaucht. Die gefrorenen Gewebeproben wurden unter Zugabe von flüssigem Stickstoff gemörsert und 200-250 mg des Pulvers in das Röhrchen gegeben. Luftkontakt des Pulvers wurde möglichst gering gehalten, um einen Eintrag oder das Austreten von  $\text{CO}_2$  zu reduzieren (Pörtner et al. 1990). Das Röhrchen wurde weitestgehend

ohne Luft einschüsse vollständig mit Medium gefüllt, verschlossen und das Gewebe mittels Ultraschall aufgeschlossen (Branson Sonifier 450;  $t = 1$  min,  $P = 360$  W). Gewebereste wurden anschließend abzentrifugiert ( $t = 1$  min,  $\bar{a} = 7000$  g). Die Zentrifuge und das Ultraschallgerät wurden zuvor auf  $0,0 \pm 0,5^\circ\text{C}$  temperiert. Die Gewichte des leeren Röhrchens, sowie nach der Vorlage des Mediums, nach Zugabe des Gewebes und des vollständig gefüllten Röhrchens wurden für die Berechnung des  $\text{CO}_2$ -Gehalts notiert.

Die  $\text{pH}_i$ -Messung im Überstand wurde mit einer Fluoreszenz-Elektrode (Optode) durchgeführt. Die Optode wurde in Puffern mit einer Ionenstärke von 0,15 M (entsprechend der  $\text{K}^+$ -Konzentration im Medium) bei der Inkubationstemperatur der jeweiligen Probe kalibriert, wobei auch die Messungen bei der jeweiligen Temperatur durchgeführt wurden. Der pH-Wert des Überstands wurde im Zeitverlauf aufgezeichnet und die Mittelwerte im Zeitfenster zwischen 10-16 min Messdauer notiert. Sofern möglich, wurden je nach Masse der gefrorenen Ausgangsprobe Doppelbestimmungen durchgeführt.

### 2.4 Messung von $c(\text{CO}_2)$ , $P(\text{CO}_2)$ und $[\text{HCO}_3^-]$

Der  $\text{CO}_2$ -Gehalt des Gewebes wurde mittels Gaschromatographie (Agilent Technologies G6890N) im Überstand (Lysat) nach der  $\text{pH}_i$ -Messung bestimmt (verändert nach Pörtner et al. 1990). In GC-Fläschchen wurden je 300 mL luftequilibriumierte 0,1 M HCl gegeben und die Fläschchen mit einem Septumdeckel verschlossen. Mit einer Hamiltonspritze wurden 0,2 mL Überstand aus der  $\text{pH}_i$ -Messung als Probenmaterial pro Fläschchen zugegeben. Die Leerwertkorrektur erfolgte mit 0,2 mL Medium. Zur Kalibration wurden  $\text{CO}_2$ -Standards mit 1,42, 0,71 und 0,355 mmol  $\text{CO}_2/\text{L}$  verwendet (aus Standardlösung: Reagecon 1 g  $\text{CO}_2/\text{L}$ ). Alle  $c(\text{CO}_2)$ -Messungen (Leerwert, Kalibration, Proben) wurden als Doppelbestimmung durchgeführt. Pro Gewebeprobe konnten also 2  $\text{pH}_i$ -Werte sowie 4  $\text{CO}_2$ -Konzentrationen und Partialdrücke ermittelt werden. Als Maß für den  $\text{CO}_2$ -Gehalt der Probe wurde das Integral unter dem entsprechenden Maximalwert bestimmt. Die Berechnung des  $P(\text{CO}_2)$ , der  $[\text{HCO}_3^-]$  und der dafür notwendigen Parameter  $\text{pK}_s'''$  und  $\alpha$  wurden nach Pörtner (1990), bzw. Heisler (1986) durchgeführt (siehe Rechnungen im Anhang). Die Proteinkonzentration im weißen Muskel von *P. brachycephalum* wurde nach Storch et al. (2005) mit 162 g/L angenommen. Die Osmolarität der einzelnen Tiere wurde aus Daten eines Vorversuchs gemittelt und betrug 0,34 mM. Die  $\text{Na}^+$ -Konzentration von 2 mM orientiert sich an der beschriebenen Konzentration in der nah verwandte Nordseeaalmutter *Zoarcis viviparus* (van Dijk et al. 1997).

## 2.5 Metabolitmessung mittels $^1\text{H}$ -NMR-Spektroskopie

$^1\text{H}$ -NMR-Spektren zur Analyse der Metaboliten-Profile wurden anhand von Perchlorsäure-Extrakten (PCA-Extrakte) der Kontrollgruppe und der Inkubationen von 3, 5 und 7°C erstellt (verändert nach Lehnhardt et al. 2005). Erneut wurde gefrorenes Muskelgewebe unter Flüssigstickstoff gemörsert und das Pulver in ein Versuchsgefäß mit 200  $\mu\text{L}$  gefrorener PCA (0,6 M) gegeben. Die Masse des Pulvers pro Tier betrug ca. 220 mg. Für eine Endkonzentration von 1:5 (Gewebe zu PCA) mussten demnach weitere 900  $\mu\text{L}$  PCA in das Reaktionsgefäß gegeben werden, wobei das genaue Volumen natürlich von der tatsächlichen Masse des Pulvers abhing. Anschließend wurde das Gefäß für mindestens 2 min mit Ultraschall behandelt (Branson Sonifier 450;  $P = 360$  W,  $T = 0^\circ\text{C}$ ), um durch die Kombination aus Säure und Schallenergie einen optimalen Aufschluss der Zellen zu erreichen. Unlösliche Gewebereste und Proteine wurden abzentrifugiert ( $t = 2$  min,  $\bar{a} = 16100$  g,  $T = 0^\circ\text{C}$ ) und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Durch Zugabe von 5 M KOH und 0,6 M PCA wurde der pH-Wert des Lysats auf 7,0 – 7,5 eingestellt und mit Indikatorpapier kontrolliert. Das dabei ausgefallene Kaliumperchlorat wurde abzentrifugiert und der Überstand in ein drittes Reaktionsgefäß pipettiert. Die Flüssigkeit wurde in einem Rotations-Vakuum-Konzentrator verdampft (RVC 2-18 HCl, Christ Gefriertrocknungsanlagen) und das getrocknete Extrakt bis zur  $^1\text{H}$ -NMR-Messung im Kühlschrank aufbewahrt.

Zur Messung wurde die Probe in 150  $\mu\text{L}$  99,9%  $\text{D}_2\text{O}$  (Sigma-Aldrich, enthält 0,05% TMS als Standard) resuspendiert und ca. 90  $\mu\text{L}$  dieser Suspension dienten als Probenlösung. Spektren wurden in einem 9,4 T NMR-Spektrometer mit Hilfe eines  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ - $^{31}\text{P}$ -HR-MAS Probenkopfes bei 3,0°C aufgezeichnet (AVANCE III HD 400 WB, Bruker-BioSpin GmbH). Die Aufnahme der  $^1\text{H}$ -NMR-Spektren erfolgte mit Hilfe von Standardpulsprogrammen über die Software des Herstellers (TopSpin 3.2, Bruker-BioSpin GmbH) mit Wasserunterdrückung. Die Spektren wurden mit Chenomx NMR Suite 7.6 (Chenomx Inc., 2013) prozessiert und ausgewertet, wobei die Chenomx-Datenbank als Referenz für die Verschiebung der untersuchten Signale genutzt wurde. Für jedes Tier wurde aus einer Gewebeprobe ein Spektrum erstellt.

## 2.6 Auswertung und Statistik

Die Auswertung der Säure-Base-Parameter erfolgte bei Mehrfachbestimmungen über die gemittelten Werte für jede Gewebeprobe. Als interner Standard zur Auswertung der  $^1\text{H}$ -

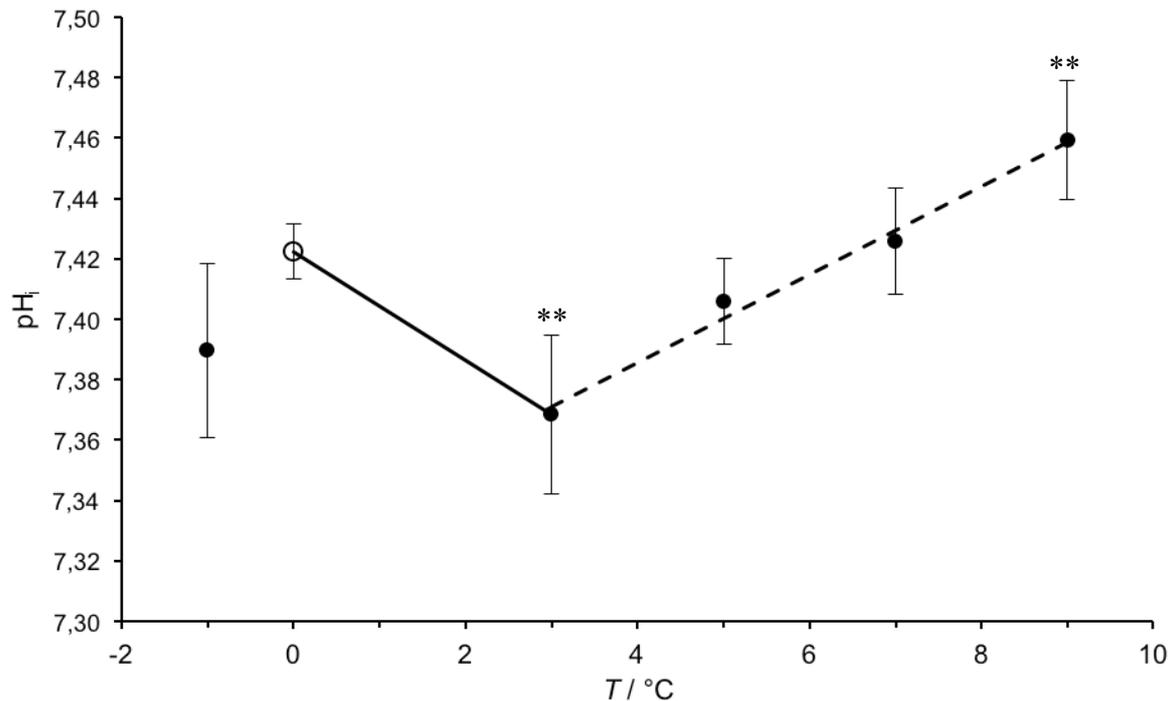
NMR-Spektren wurde ein Signal von Adenosin, das unabhängig vom Bindungsgrad ist, gewählt. Die relativen Einheiten beziehen sich daher auf das Verhältnis Metabolit zu Adenosin. Die Werte der einzelnen Parameter für eine Gruppe (Kontrolle, einzelne Inkubationen) wurden auf Normalverteilung getestet (Shapiro-Wilk-Test,  $P > 0,2$ ). Bei durchweg normalverteilten Werten für einen Parameter, wurden die Gruppen mittels Varianzanalyse (one-way ANOVA mit Student-Newman-Keuls post-hoc Test) auf signifikante Unterschiede getestet ( $P < 0,05$ ). Für nicht normalverteilte Gruppen wurde ein nicht-parametrisches Testverfahren angewandt, um signifikante Unterschiede festzustellen (ANOVA on ranks, Kruskal-Wallis-Test mit Dunn's post-hoc Test). Alle Werte sind als Mittelwerte mit Standardabweichung angegeben. Um den Grad des linearen Zusammenhangs zwischen  $\text{pH}_i$  und Bicarbonat-, bzw. relativer Imidazol-Konzentration zu bestimmen, wurde der Spearman Rangkorrelationskoeffizient  $\rho$  berechnet. Zur statistischen Analyse wurde SigmaPlot 12.0 (Systat Software, 2010) verwendet. Die Grafiken wurden mit Microsoft Excel 2011 erstellt.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1 $\text{pH}_i$

Die temperaturabhängige Änderung des  $\text{pH}_i$  ist in Abb. 2 dargestellt. Ausgehend von einem Kontrollwert von  $7,422 \pm 0,009$  sank der  $\text{pH}_i$  auf  $7,37 \pm 0,03$  bei  $3^\circ\text{C}$ . Dies entspricht einer Änderung  $\Delta\text{pH}/\Delta T = -0,018^\circ\text{C}^{-1}$  in diesem Temperaturbereich. Im Zuge einer weiteren Erhöhung der Temperatur konnte ein linearer Anstieg des  $\text{pH}_i$  um  $0,0145^\circ\text{C}^{-1}$  ( $R^2 = 0,79$ ) bis auf  $7,46 \pm 0,02$  bei der höchsten Inkubationstemperatur von  $9^\circ\text{C}$  gemessen werden. Der Unterschied zwischen den Werten von  $3$  und  $9^\circ\text{C}$  ist nach nicht-parametrischen Tests signifikant.

Nach 9 Wochen wiesen die Fische, die bei  $-1^\circ\text{C}$  inkubiert wurden, mit  $7,39 \pm 0,03$  einen niedrigeren mittleren  $\text{pH}_i$  auf, als die Kontrollgruppe. Allerdings stützt sich dieser Wert nur auf zwei verlässliche Messungen. In der ursprünglichen Stichprobengröße mit  $n = 5$  fanden sich drei Gewebestücke, die nicht aus reinem Muskelgewebe bestanden und deshalb aus der Auswertung ausgeschlossen wurden. Dies reduzierte auch die Probengröße aller anderen Temperaturinkubationen. Die entgültigste Stichprobengröße ist aus Tab. A1 (im Anhang) zu entnehmen.



**Abb. 2: Langzeiteffekte auf den pH<sub>i</sub> im weißen Muskel von *P. brachycephalum* nach 9-wöchiger Inkubation bei entsprechenden Temperaturen.** Die Symbole entsprechen dem Mittelwert, die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung. Der Datenpunkt bei 0°C stellt die Kontrollgruppe dar. Mit \*\* gekennzeichnete Werte sind nach nicht-parametrischer Varianzanalyse voneinander signifikant unterschiedlich ( $P < 0,05$ ).

Steigung der linearen Regression zw. 0 und 3°C (durchgezogene Linie) =  $-0,018^{\circ}\text{C}^{-1}$

Steigung der linearen Regression zw. 3 und 9°C (gestrichelte Linie) =  $0,0145^{\circ}\text{C}^{-1}$  ( $R^2 = 0,79$ )

### 3.2 CO<sub>2</sub>-Parameter

Im Temperaturverlauf zeigt sich die direkte Beziehung zwischen gesamtem CO<sub>2</sub>-Gehalt, CO<sub>2</sub>-Partialdruck und Bicarbonat-Konzentration im Gewebe (Abb. 3). Zwischen 0 und 5°C bleiben alle Parameter relativ konstant: Der  $c(\text{CO}_2)$  sinkt minimal von  $3,95 \pm 0,59$  mM (Kontrolle) auf  $3,54 \pm 0,69$  mM (5°C; Abb. 3A) und die Bicarbonatkonzentration von  $3,65 \pm 0,55$  mM auf  $3,28 \pm 0,64$  mM (Abb. 3B). Über denselben Temperaturbereich ist keine Änderung des  $P(\text{CO}_2)$  zu erkennen und die Werte liegen bei ca. 0,45 kPa (Abb. 3C). Erst ab 7°C lagen die Messwerte mit  $0,56 \pm 0,03$  kPa über dem zuvor erwähnten Level, wobei die Unterschiede nach nicht-parametrischen Tests nicht signifikant sind, sich die Muster der Parameter jedoch ähneln. Die Höchstwerte zur gesamten CO<sub>2</sub>-Konzentration und dem CO<sub>2</sub>-Partialdruck liegen bei -1°C mit  $4,72 \pm 0,38$  mM bzw.  $0,57 \pm 0,01$  kPa. Sie beruhen ebenfalls nur auf den Messwerten zu zwei Proben. Es sei hier erneut auf Tab. A1 verwiesen: CO<sub>2</sub>-Messungen wurden nur bei den Proben ausgewertet, von denen möglichst reines weißes Muskelgewebe zur Verfügung stand. Für die warm-inkubierten Fische liegen die Werte zu  $c(\text{CO}_2)$  und  $P(\text{CO}_2)$  nur knapp unter den Höchstwerten; für die  $[\text{HCO}_3^-]$  liegt das Maximum mit  $4,35 \pm 0,31$  mM bei 7°C.

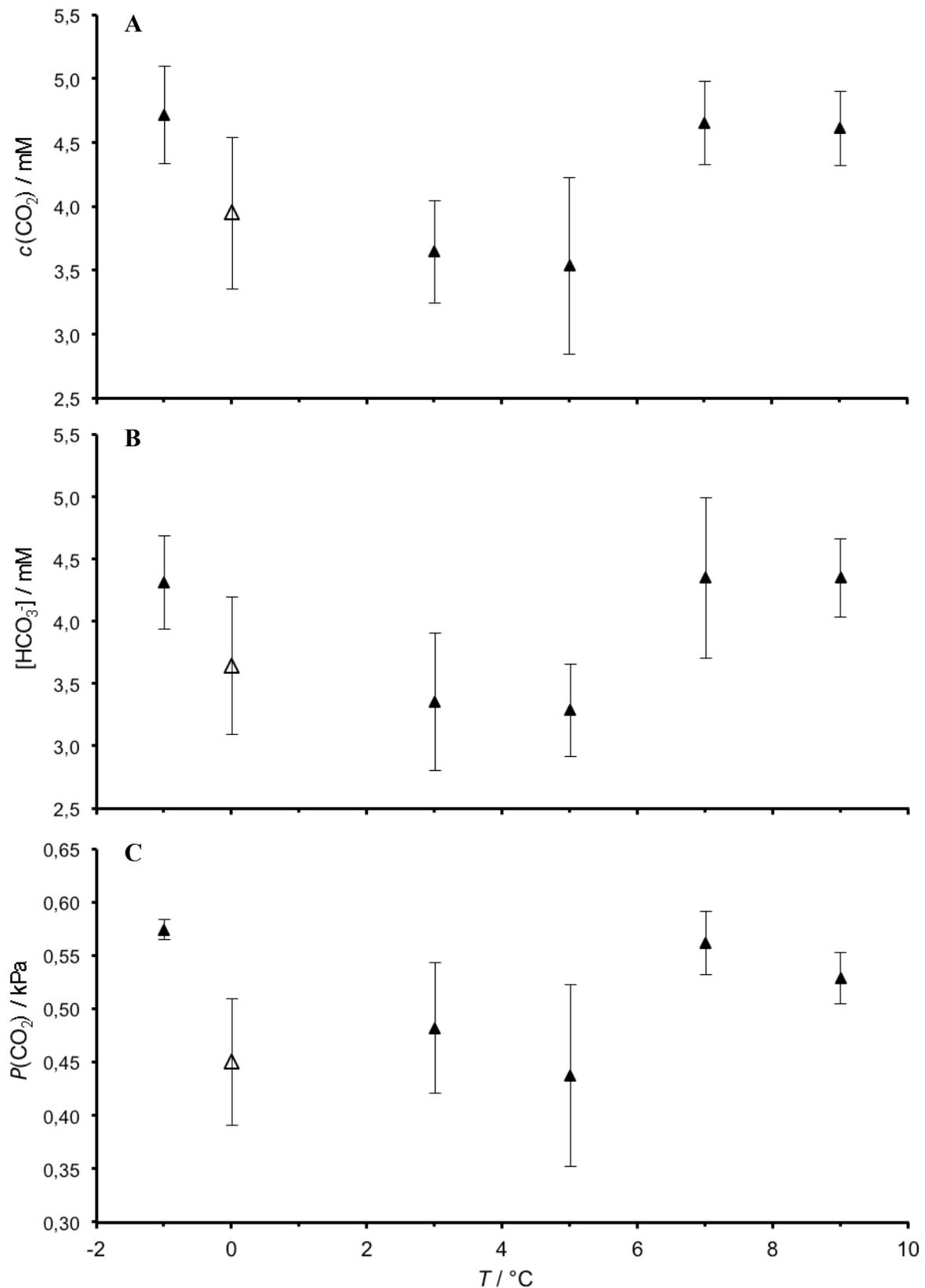


Abb. 3: Langzeiteffekte auf den  $c(\text{CO}_2)$  in mM (A),  $[\text{HCO}_3^-]$  in mM (B) und  $P(\text{CO}_2)$  in kPa (C) im weißen Muskel von *P. brachycephalum* nach 9-wöchiger Inkubation bei entsprechenden Temperaturen. Die Symbole stellen den Mittelwert dar, die Fehlerbalken die entsprechende Standardabweichung. Die Datenpunkte bei  $0^\circ\text{C}$  repräsentieren die Kontrollgruppe.

### 3.3 Metabolitmessungen

<sup>1</sup>H-NMR-Messungen der anaeroben Metabolite Laktat und Succinat ergaben keine eindeutigen Änderungen der relativen Konzentrationen im Zeitverlauf (Tab. 1, Abb. 4). Die relative Konzentration von Imidazol liegt bei 3°C signifikant unter dem Wert der Kontrollgruppe (Tab. 1, Abb. 5; P = 0,014). Eine weitere Temperaturerhöhung änderte die relative Imidazol-Konzentration nicht mehr, sodass zwischen 3 und 7°C Werte von ca. 0,068 relativen Einheiten gemessen wurden. Die NMR-Spektren wurden zum Teil aus anderen Gewebeproben gewonnen, als die Daten zum Säure-Base-Haushalt; die pH<sub>i</sub>-Messung verbrauchte oft das gesamte, ursprüngliche Probenmaterial. Da die neuen Gewebeproben keine definierte Form hatten, konnten Verunreinigungen des Gewebes nicht genau bestimmt werden. Die ursprüngliche Stichprobengröße von 7 Kontrolltieren und 5 Tieren pro Temperaturinkubation wurde so wiederhergestellt. Auch die neuen Proben stammten aus den gleichen Fischen, die für diese Studie gewählt wurden, wobei dieses Probenmaterial bei -80°C gelagert wurde.

**Tab. 1: Relative Konzentrationen von Laktat, Succinat und Imidazol aus PCA-Extrakten des weißen Muskels von *P. brachycephalum* nach 9-wöchiger Temperaturinkubation.** Angegeben sind Mittelwerte mit Standardabweichung. Die relativen Einheiten beziehen sich auf die Adenosinkonzentration im analysierten Spektrum der einzelnen Proben. Mit \* gekennzeichnete Werte sind nach ANOVA signifikant (P < 0,05) unterschiedlich zu den übrigen.

<i>T</i> / °C	[Laktat] / rel. E.	[Succinat] / rel. E.	[Imidazol] / rel. E.
Kontrolle: 0	3,63±1,43	0,096±0,041	0,176±0,078 *
3	2,385±0,668	0,090±0,084	0,078±0,022
5	3,78±1,23	0,084±0,042	0,059±0,041
7	2,449±0,768	0,085±0,031	0,066±0,039

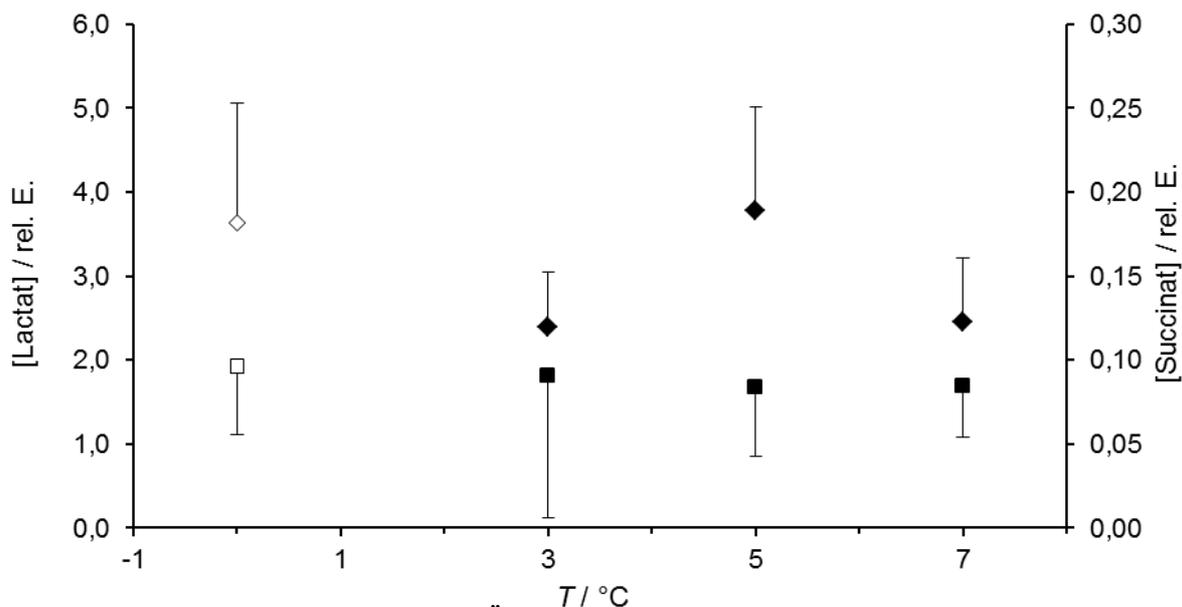


Abb. 4: Langzeiteffekte auf die relativen Änderungen der anaeroben Stoffwechselprodukte Lactat und Succinat im weißen Muskel von *P. brachycephalum* nach 9-wöchiger Inkubation bei entsprechenden Temperaturen. Die relativen Einheiten beziehen sich auf Adenosin als interner Standard und wurden aus  $^1\text{H}$ -NMR-Spektren gewonnen.

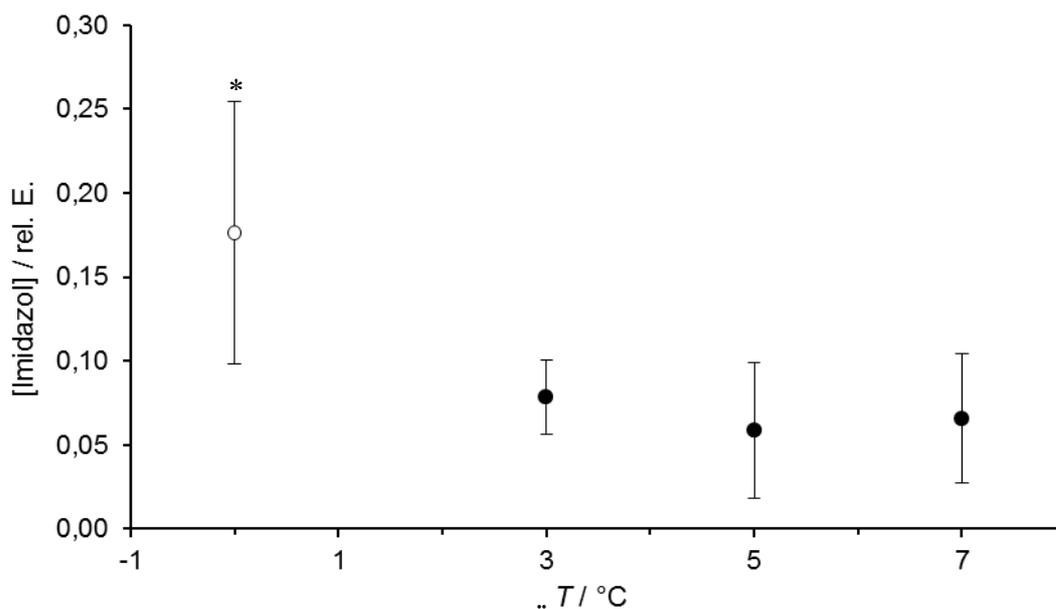
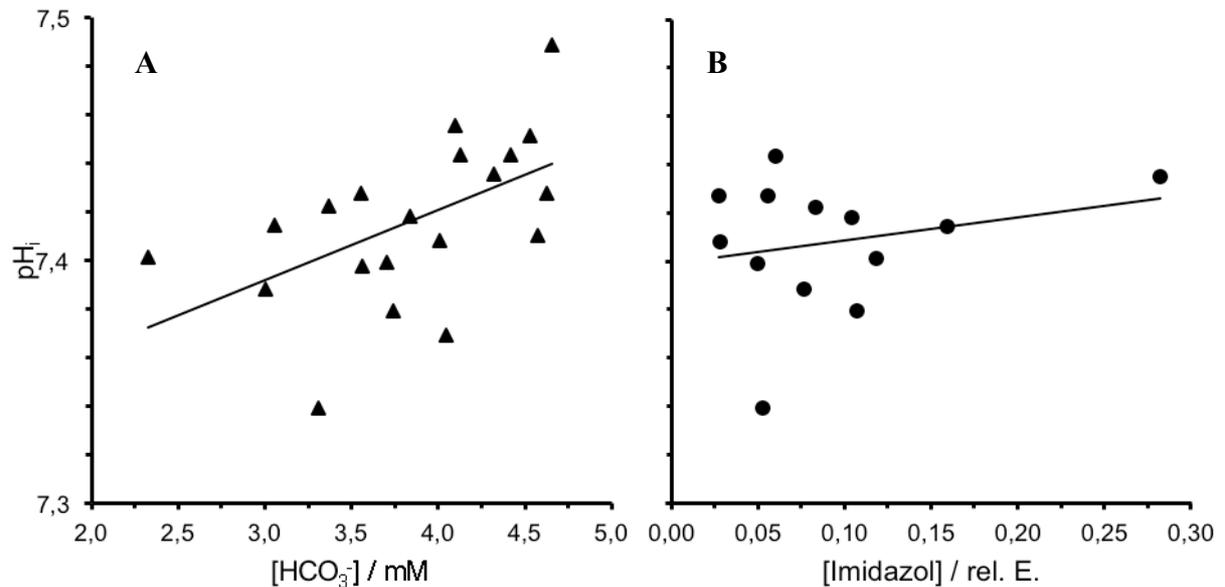


Abb. 5: Langzeiteffekte auf die relativen Änderungen von Imidazol im weißen Muskel von *P. brachycephalum* nach 9-wöchiger Inkubation bei entsprechenden Temperaturen. Die relativen Einheiten beziehen sich auf Adenosin als interner Standard und wurden aus  $^1\text{H}$ -NMR-Spektren gewonnen. Mit \* gekennzeichnete Werte sind nach ANOVA signifikant ( $P < 0,05$ ) unterschiedlich zu den übrigen.

### 3.4 Korrelation zwischen $\text{pH}_i$ , Bicarbonat sowie Imidazol

Eine Gegenüberstellung der Abhängigkeit des  $\text{pH}_i$  zu den Konzentrationen der Puffersubstanzen Bicarbonat (Abb. 6A) und Imidazol (Abb. 6B) zeigt, dass lediglich die Bicarbonat-Konzentration einen signifikant positiven, linearen Einfluss auf den  $\text{pH}_i$  im Temperaturbereich zwischen  $-1$  und  $9^\circ\text{C}$  besitzt. Der Spearman Rangkorrelationskoeffizient

beträgt  $\rho(\text{HCO}_3^-) = 0,615$  ( $P = 0,004$ ). Für Imidazol ist keine lineare Abhängigkeit des  $\text{pH}_i$  zwischen 0 und 7°C gefunden worden, bei  $\rho(\text{Im}) = 0,066$  ( $P = 0,821$ ).



**Abb. 6: Korrelation zwischen  $\text{pH}_i$  und Bicarbonat- (A), bzw. relativer Imidazol-Konzentration (B) im weißen Muskel von *P. brachycephalum* nach Langzeit-Temperaturinkubation.** Eingetragen sind die Werte pro Gewebeprobe mit linearer Regression.

A) Temperaturbereich:  $-1 - 9^\circ\text{C}$ ;  $\rho(\text{pH}_i / \text{Bicarbonat}) = 0,615$  ( $P = 0,004$ )  
Steigung der linearen Regression:  $0,029 \text{ mM}^{-1}$  ( $R^2 = 0,287$ )

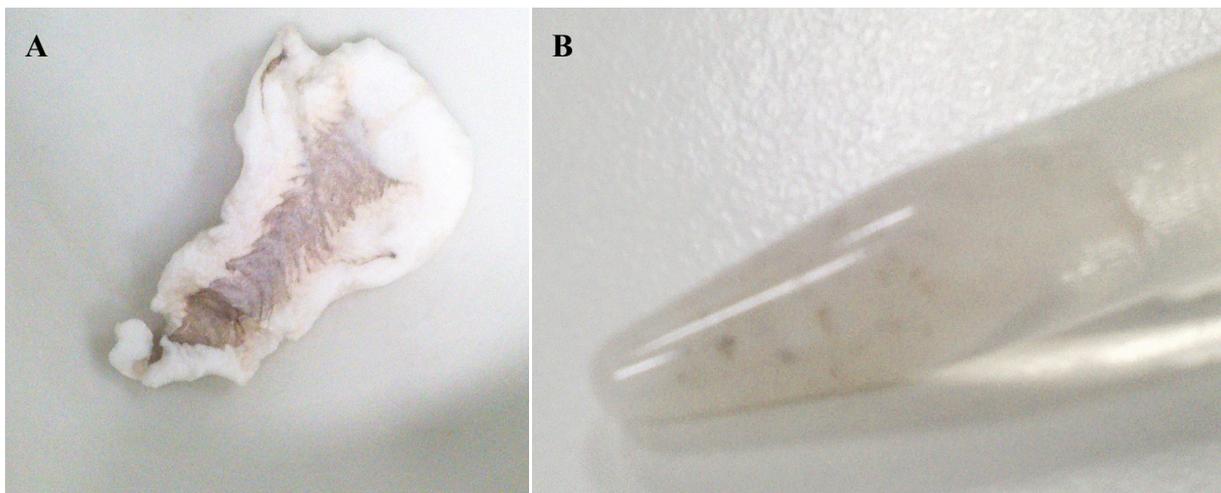
B) Temperaturbereich:  $0 - 7^\circ\text{C}$ ;  $\rho(\text{pH}_i / \text{Imidazol}) = 0,066$  ( $P = 0,821$ )  
Steigung der linearen Regression:  $0,095 \text{ rel. E.}^{-1}$  ( $R^2 = 0,056$ )

## 4. Diskussion

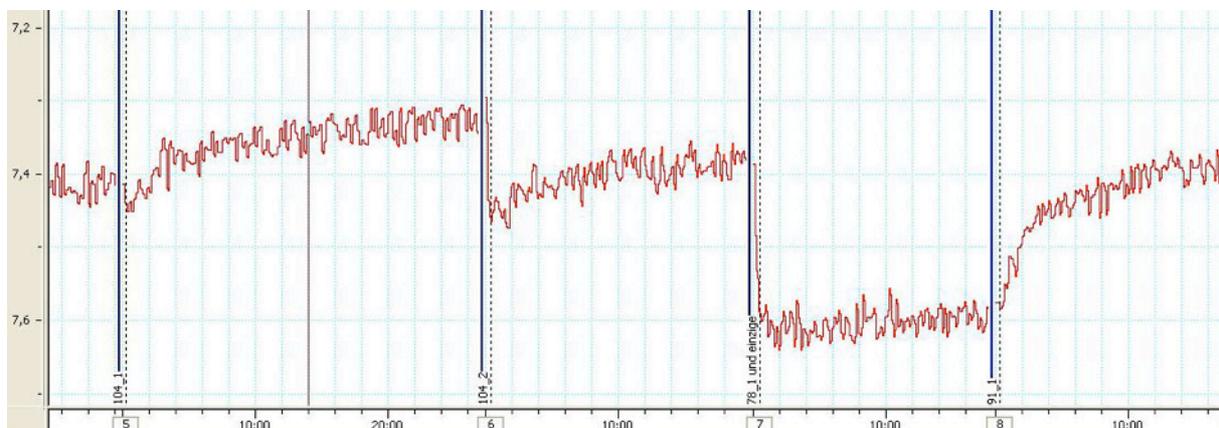
### 4.1 Methodenkritik und mögliche Fehlerquellen

Beim Bearbeiten des Gewebes und Vergleichen der Messwerte des  $\text{pH}_i$  ist aufgefallen, dass wohl nicht ausschließlich Werte aus dem Muskelgewebe gemessen wurden. Oft fand sich schwarzes Gewebe an den besonders kleinen Gewebeproben (Abb. 7A), dessen Überreste auch im Pulver und im Röhrchen zu erkennen waren (Abb. 7B). Dieses Gewebe kann der Grund sein, warum in diesen Proben fast ausschließlich  $\text{pH}$ -Werte von ca. 7,5 – 7,6 gemessen wurden. Der Verlauf der Messung dieser Proben zeigte keinen stetigen, temperaturbedingten Abfall im  $\text{pH}$ -Wert, sondern einen nach kurzer Zeit konstanten Wert (Abb. 8). Vermutlich besitzt die Probe aufgrund der Kontamination durch Hautgewebe deutlich höhere Pufferkapazitäten als das Muskelgewebe allein, sodass der gemessene  $\text{pH}_i$  zumindest einer Mischung aus Muskel- und sonstigem Gewebe entspricht. Zur Auswertung wurden nur  $\text{pH}$ -Werte und  $\text{CO}_2$ -Konzentrationen herangezogen, bei denen sich keine sichtbaren

Verunreinigungen durch unbekanntes Gewebe fanden. In Folge dessen sind auch  $P(\text{CO}_2)$  und  $[\text{HCO}_3^-]$  nur für die nicht-verunreinigten Proben berechnet worden, da diese Werte auf den Messwerten zu  $\text{pH}_i$  und  $c(\text{CO}_2)$  beruhen. Bei zukünftigen Probennahmen sollte dennoch darauf geachtet werden, dass Gewebestücke aus möglichst reinem Muskelgewebe entnommen werden. Es ist vor dem Mörsern der gefrorenen Proben nicht mehr möglich, anderes Gewebe vom eigentlichen Muskel zu entfernen.



**Abb. 7: Gewebeverunreinigungen auf gefrorenem Muskel (A) und im gemörsterten Homogenat (B).** Beide Aufnahmen zeigen die selbe Probe.



**Abb. 8: pH-Messung über den Zeitverlauf.** Beispielhafte Messung des pH-Werts im Homogenat aus Proben eines Vorversuchs. Proben 104 (Doppelbestimmung), 78 (Einfachbestimmung) und 91 (erster Teil einer Doppelbestimmung). Probe 78 ist eine Mischung aus weißem Muskel und umliegendem Gewebe, gekennzeichnet durch den unterschiedlichen Verlauf. Man beachte, dass die pH-Skala invertiert ist.

Während der Messungen zeigte sich die Sensitivität der gewählten Methode: Es ist denkbar, dass durch geringe Mengen eingetragenen Kohlendioxids aus der Luft in das Homogenat der pH artifiziell angesäuert wurde. Wie zuvor erwähnt, hatte die Temperatur während der pH-Messung einen konstanten Einfluss auf den Verlauf der Messkurve. Es konnte beobachtet werden, dass die Erwärmung des Röhrchens im Wasserbad zum stetigen Abfall des gemessenen pH-Werts führte. Um diesen Abfall zu kompensieren, wurden die Messwerte aus

dem Zeitfenster zwischen 10-16 min gemittelt. Aus der Erfahrung heraus hatte sich die Änderung des Messsignals in der Regel in diesem Zeitraum auf ein Minimum reduziert und die in Doppelbestimmung gemessenen Gewebeproben wiesen nur geringste Unterschiede auf. Die zwischenzeitliche Lagerung des Gewebes bei  $-80^{\circ}\text{C}$  könnte zudem den pH-Wert beeinflusst haben, da selbst hier noch Diffusionsprozesse stattfinden können, die den  $\text{pH}_i$  beeinflussen (Karlsson & Toner 1996). Vermutlich spielt hier das bereits erwähnte Ungleichgewicht zwischen Membranpotential und *in vivo*  $\text{pH}_i$  (Madhus 1988) eine Rolle, sodass der  $\text{pH}_i$  bedingt durch die Verteilung der  $\text{H}^+$ -Ionen zwischen Intra- und Extrazellularraum saurer wird.

Die Aussagekraft relativer Metabolitkonzentrationen ist generell begrenzt. Sie sind nur gültig, solange der einbezogene Referenzwert stabil ist. In dieser Studie wurde ein Verhältnis zur Adenosinkonzentration in der Probe bestimmt, unter der Annahme, dass sich Adenosin als Bestandteil von ATP, ADP und AMP, sowie in RNA und DNA nicht ändert. Da unter körperlicher Belastung jedoch eine kurzfristige Desaminierung von AMP zu IMP entdeckt wurde (Schulte et al. 1992), wurde bei der Bestimmung der Adenosinkonzentration bewusst ein Peak gewählt, der sowohl auf Adenosin, als auch auf Inosin zutrifft. Allerdings ist eine solche Desaminierung weitestgehend auszuschließen, da der Handhabungsstress während der Härtung und Probennahme weitgehend reduziert wurde (Windisch 2013). Die nicht signifikant unterschiedlichen Laktatkonzentrationen (Tab. 1, Abb. 4) deuten dennoch auf eine marginale Stressreaktion während der Probennahme hin, scheinen aber zum Teil auch durch individuelle Unterschiede zwischen einzelnen Fische und durch Messungenauigkeiten bedingt zu sein. Der Einfluss von Hungerstress als Folge des Fütterungsplans dürfte wahrscheinlich nur geringfügig ausschlaggebend für Änderungen der Imidazolkonzentration sein. In anderen Experimenten wurde ebenfalls knapp eine Woche vor Probennahme die Fütterung gestoppt (van Dijk et al. 1997; 1999; Bock et al. 2001; Mark et al. 2002).

Des Weiteren stellten Abe & Ohmama (1987) nur einen Rückgang der freien Histidinkonzentration als Folge von Hungerstress fest. Dies ist hier allerdings durch die direkte Analyse der Puffersubstanz Imidazol relativiert. Sowohl freies Histidin, als auch in Proteinen und Oligopeptiden gebundenes Histidin dürfte damit erfasst worden sein und so die Puffereigenschaften des Zytosols gut wiedergeben. Aufgrund der gewählten Extraktionsmethode ist jedoch davon auszugehen, dass Proteine nach der Zentrifugation nur in geringen Mengen in den Extrakten vorhanden sind. Sie sollten also nur zu unwesentlichen Änderungen im Spektrum führen (siehe 2.5: Metabolitmessungen mittels  $^1\text{H}$ -NMR-Spektroskopie).

Generell erschwert der geringe Stichprobenumfang eindeutige Aussagen und trotz der umfangreichen Literatur zur Säure-Base-Regulation sind wenige Daten zu Langzeitstudien verfügbar. Die Vergleiche zwischen Leber (Windisch et al. 2011 & 2012; Windisch 2013) und Muskel sind aufgrund der unterschiedlichen Bedeutung für den Organismus (Walsh & Moon 1982) nur bedingt sinnvoll. Generelle Temperatureinflüsse, z.B. auf die Stabilität verschiedener Proteine, und die gekoppelte Funktion der beiden Gewebe im Energiestoffwechsel lassen trotzdem Vermutungen über Anpassungen auf organischer Ebene zu.

Eine Verallgemeinerung der hier dargestellten Zusammenhänge und deren Übertragung auf andere Tiere oder Gewebe ist also nicht ohne Weiteres zulässig. Unter exzessiver Belastung (Fluchtschwimmen) zeigte *P. brachycephalum* eine hohe Laktatbildung im weißen Muskel, wohingegen in verschiedenen Vertretern der Notothenoidea nahezu konstante Laktatkonzentrationen gemessen wurden (Hardewig et al. 1998). Das weiße Muskelgewebe dient vor allem der schnellen Flucht aus Gefahrensituationen unter anaeroben Bedingungen (Hardewig et al. 1998). Da *P. brachycephalum* generell geringe Schwimmaktivität zeigt, kann besonders das weiße Muskelgewebe womöglich lange mit geringer Sauerstoffverfügbarkeit auskommen, zumal Hardewig et al. (1998) keinen Rückgang der ATP-Konzentration durch Fluchtschwimmen messen konnten. Dies eröffnet für das Tier die Möglichkeit, Sauerstoff in anderen Geweben mit geringer Toleranz zur Anaerobiose als Elektronenakzeptor zur ATP-Bildung zu nutzen (Walsh & Moon 1982). Abweichungen zur alaphastat-Hypothese wurden im anaeroben Stoffwechsel, nahe der kritischen Temperaturen bereits gezeigt (Zielinski & Pörtner 1996; Pörtner & Bock 2000). Der Grund dafür liegt in der Kombination aus der steigenden Konzentration saurer Endprodukte des anaeroben Stoffwechsels (van Dijk et al. 1999) und dem Rückgang des Energiegehalts des Gewebes (Sartoris et al. 2003b). Es handelt sich bei den aufgeführten Studien erneut um akute Temperaturinkubationen.

#### 4.2 pH-Werte und anaerobe Metabolite

Der Kontroll-pH<sub>i</sub> von 7,42±0,01 bei 0°C ist vergleichbar mit vorherigen Untersuchungen, während die errechnete temperaturabhängige pH-Änderung von  $\Delta\text{pH}/\Delta T = -0,018^\circ\text{C}^{-1}$  zwischen 0 und 3°C geringfügig stärker ausgeprägt ist, als in den Studien zur akuten Temperaturänderung (van Dijk et al. 1999; Bock et al. 2001; Mark et al. 2002). Dort wurden Werte um  $-0,015^\circ\text{C}^{-1}$  gemessen. Dennoch deutet diese pH-Wert-Änderung auf eine Regulation gemäß alaphastat-Hypothese im genannten Temperaturbereich hin: Reeves (1972) gibt eine Spanne von  $-0,015^\circ\text{C}^{-1} \leq \Delta\text{pH}/\Delta T \leq -0,020^\circ\text{C}^{-1}$  als Hinweis auf alaphastat-Regulation

an. Zwar liegt der Stichprobenumfang nur bei 4 (Kontrolle), bzw. 3 Fischen (3°C), doch zeigen die geringen Fehler ( $SD < 0,03$ ), dass es sich um durchaus replizierbare Werte handelt. Ein Bereich von  $0,01 \leq SD \leq 0,04$  wurde von Pörtner et al. (1990) für die gewählte Methode angegeben.

Der reduzierte Probenumfang mag ein Grund sein, dass nicht-parametrische Varianzanalysen lediglich einen signifikanten Unterschied im  $pH_i$  zwischen 3 und 9°C belegen konnten. Der hierbei beobachtete lineare Anstieg des  $pH_i$  von 0,0145 pH-Einheiten pro °C in diesem Temperaturbereich (Abb. 2) weicht eindeutig vom alphastat-Muster und den Beobachtungen für akute Anpassungen ab. Van Dijk et al. (1999) berichteten schon zuvor von konstanten  $pH_i$ -Werten ab 3°C trotz weiterer Temperaturerhöhung, was ebenfalls nicht der ursprünglichen alphastat-Hypothese entspricht. Andererseits zeigte die Akut-Studie von Mark et al. (2002) ebenfalls eine  $pH_i$ -Regulation nach alphastat bis 6°C und es wurde bei weiterer Temperatursteigerung lediglich ein Rückgang der temperaturbedingten pH-Änderung von  $\Delta pH/\Delta T = -0,012^\circ C^{-1}$  auf  $-0,004^\circ C^{-1}$  gemessen. Als grundlegende Erklärung führen beide Studien den Rückgang der aeroben Kapazität an, die sowohl die aktive pH-Regulation bedingt (van Dijk et al. 1997), als auch zu einer Erhöhung der zytoplasmatischen Laktatkonzentration aufgrund anaerober Glykolyse führen kann. Ein Einfluss der Laktatkonzentration auf den  $pH_i$  konnte für die Langzeitinkubation nicht belegt werden, da der  $pH_i$  bei 9°C mit  $7,46 \pm 0,02$  am höchsten war und im Bereich von 0 bis 7°C keine eindeutige Änderung der relativen Konzentrationen der anaeroben Endprodukte Laktat und Succinat gemessen werden konnte (Abb. 4). Ein Anstieg der Succinatkonzentration nach Kurzzeitinkubation konnte zuvor für Lebergewebe gezeigt werden (van Dijk et al. 1999). Hohe Laktat- oder Succinatkonzentrationen hätten zu deutlich saureren Werten geführt, jedoch steigen ihre Konzentrationen gemäß van Dijk et al. (1999) erst nahe der  $T_{cII}$  von 10°C signifikant und damit außerhalb des hier untersuchten Temperaturbereichs.

### 4.3 CO<sub>2</sub>-Gehalt

Wie in der alphastat-Hypothese postuliert, änderten sich die CO<sub>2</sub>-Parameter zwischen 0 und 5°C nicht (Abb. 3): Statt einer Alkalisierung durch höhere  $[HCO_3^-]$  oder einer Ansäuerung durch höheren  $P(CO_2)$  und damit Kohlensäure, bedingt die temperaturabhängige Änderung des  $pK_{im}$  den  $pH_i$  (Reeves 1972). Dennoch sind eindeutige, wenn auch nicht signifikante Anstiege der CO<sub>2</sub>-Parameter über dieses Level an beiden Enden des angewandten Temperaturspektrums gemessen worden. Da eine Abweichung vom alphastat-Muster bezüglich des CO<sub>2</sub>-Gehalts erst bei 7°C gemessen wurde und nicht schon bei 5°C (wie beim

pH<sub>i</sub>), lässt sich hier noch keine einheitliche Grenze definieren, an der grundlegende Regulationen als Antwort auf steigende Temperaturen stattfinden. Es besteht wahrscheinlich ein Zusammenhang zwischen den alkalischen pH-Werten der warm-inkubierten Fische und veränderten Puffereigenschaften des Zytoplasmas. Bei erhöhtem [HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>] ab 7°C, scheint eine Verschiebung des pH<sub>i</sub> hin zu alkalischen Werten plausibel gemäß Taylor et al. (1999). Darauf deutet auch die in Abb. 6A gezeigte lineare Korrelation mit  $\rho(\text{HCO}_3^-) = 0,615$  ( $P = 0,004$ ) hin. Steigende pH-Werte werden im linearen Zusammenhang von höheren Bicarbonat-Konzentrationen bedingt, was sich auch in der dominanten Pufferkapazität von HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> im Blut widerspiegelt. Hier lassen sich ebenfalls alkalischere pH-Werte messen, verglichen mit dem Zytoplasma, wo eigentlich Imidazol das Pufferverhalten definiert (Reeves 1972; Taylor et al. 1999; Pörtner & Bock 2000; Eckert et al. 2002). Ein eindeutiger Zusammenhang, der den linearen Anstieg des pH<sub>i</sub> zwischen 3 und 9°C (Abb. 2) erklären könnte, ist wiederum nicht hinreichend zu belegen. Schließlich entsprechen die Werte für die relative Imidazolkonzentration und die [HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>] bei 7°C denen bei 9°C, wobei der pH<sub>i</sub> in diesem Bereich weiter steigt. Bedeutend dürfte in diesem Zusammenhang auch der erhöhte  $P(\text{CO}_2)$  sein, der wiederum durch die Reaktion mit Wasser zu Kohlensäure zu einer Ansäuerung führen würde.

#### 4.4 Imidazol und Pufferverhalten des Zytosols

Eine signifikante Reduktion der relativen [Im] konnte bereits zwischen 0 und 3°C beobachtet werden (Abb. 5), wobei diese noch nicht von Änderungen der CO<sub>2</sub>-Parameter begleitet wurden und auch der pH<sub>i</sub> der Regulation nach der alaphastat-Hypothese folgt. Unter Energiemangel (als Folge verschiedener Stresssituationen) können Fische Proteine und Aminosäuren als Energiequelle nutzen (Abe & Ohmama 1987; Shiau et al. 2001). Besonders Glycin (in der Leber; Windisch 2013), aber auch freies Histidin (Abe & Ohmama 1987; van Waarde 1988) werden dabei umgesetzt. Sie werden dabei als mögliche Grundlage zur Gluconeogenese gesehen und ermöglichen so eine verstärkte Nutzung der Glykolyse zum entgeltigen Energiegewinn (Abe & Ohmama 1987). Hinweise auf verstärkten Proteinabbau in Proteasomen fanden sich auch im Transkriptom der untersuchten Fische, allerdings nur in der Kälte (Windisch 2013). Bei steigender Temperatur zeigte sich ein erhöhter Energiebedarf bei reduzierter aerober Kapazität, was bereits bei 5°C im Zeitverlauf durch eine vermehrte Nutzung von Kohlenhydraten gegenüber Lipiden als Energiequelle deutlich wurde (Windisch et al. 2011). Eine signifikante Gewichtsabnahme der Tiere bei 7 und 9°C ist die langfristige Folge des Energiemangels. Allerdings deutete sich dies schon bei 3°C durch einen leichten

Rückgang des HSI an, obwohl das Körperwachstum bei dieser Temperatur am größten war (Windisch 2013). Eine eventuell unzureichende Energiegewinnung aus der Nahrung könnte bei höheren Temperaturen zum Abbau von Zellstrukturen führen, um dieses Energiedefizit auszugleichen (Lum et al. 2005). In Folge dessen wird auch freies Histidin, bzw. Imidazol abgebaut. Unter der Prämisse, dass sich die Adenosinkonzentration im Gewebe nicht ändert, würde dies die niedrigen relativen Imidazolkonzentrationen und eine verminderte Pufferkapazität erklären. In Kombination mit den erhöhten Bicarbonat-Konzentrationen bei 7 und 9°C wäre so eine mögliche Erklärung für den erhöhten  $\text{pH}_i$  gefunden, nämlich dass der  $\text{pH}_i$  eher durch die Puffereigenschaften des Bicarbonats definiert wird, als durch Imidazol. Es muss angenommen werden, dass  $[\text{HCO}_3^-]$  besonders bei 3°C nach 9 Wochen zu niedrig ist, um hier bereits zu einem erhöhten  $\text{pH}_i$  zu führen. Stattdessen reicht vermutlich die noch vorhandene Imidazolkonzentration aus, um den  $\text{pH}_i$  um -0,018 pH-Einheiten pro °C zu senken. Andererseits hat zumindest eine reine Änderung des Imidazolgehalts keinen erkennbaren Einfluss auf Änderungen des  $\text{pH}_i$  (Abb. 6B:  $\rho(\text{Im}) = 0,066$ ;  $P = 0,821$ ), was die Vermutung nahe legt, dass die Puffereigenschaften von Imidazol im Zytosol konzentrationsunabhängig oder mangels  $\text{HCO}_3^-$  ausschlaggebend für den  $\text{pH}_i$  sein könnten. Bis 5°C überwiegt bei niedriger  $[\text{HCO}_3^-]$  wohl die Pufferkapazität von Imidazol, steigt die Bicarbonat-Konzentration jedoch, ändert sich der  $\text{pH}_i$  anscheinend zu dementsprechend alkalischeren Werten.

Die Temperaturabhängigkeit des  $\text{pH}_i$  über den  $\text{p}K_{\text{Im}}$ , wie sie Reeves (1972) beschrieb, ist bei Temperaturen nahe der angenommenen  $T_{\text{pII}}$  von 6°C (Mark et al. 2002) durch veränderte Puffereigenschaften außer Kraft gesetzt, wobei Untersuchungen über quantitative Änderungen der relevanten Stoffkonzentrationen und ihre Effektive Pufferkapazität noch ausstehen. Des Weiteren wird hier der eventuelle Einfluss weiterer Puffer, wie z.B.  $\text{H}_2\text{PO}_4^{2-}$  (Taylor et al. 1999) oder die absolute Osmolarität des Zytoplasmas nicht berücksichtigt und bedarf weiterer Analyse.

#### 4.5 Bezug auf Transkriptom-Analysen und aktive pH-Regulation

Vor dem Hintergrund, dass die optimale Wachstumstemperatur von *P. brachycephalum* im Bereich von 3°C liegt (Brodte et al. 2006; Windisch 2013), sorgt vermutlich ein erhöhter Anteil aktiver Prozesse in der pH-Regulation (van Dijk et al. 1997) für die gemessenen, im Vergleich zur Kontrolle, sauren Werte bei 3 und 5°C, wobei vor allem der Wert bei 3°C, wie erwähnt, dem Muster nach Reeves (1972) entspricht. In diesem Temperaturbereich wurden die geringsten Expressionslevel gemessen, in Relation die meisten Gene herunterreguliert und

der Metabolismus liefert den größten Energieüberschuss, was sich in maximalem Wachstum niederschlägt (Windisch 2013). Auch hier würde erst eine genauere Untersuchung der freien Energie oder des ATP-Umsatzes Klarheit schaffen (z.B. nach Pörtner et al. 1996), wie viel Energie den Zellen tatsächlich zur Verfügung steht und wie viel sie davon nutzen. Inwiefern der Ionenregulatorische Aufwand im Muskelgewebe tatsächlich steigt, ist ebenfalls unklar.

Die aktive Regulation des  $\text{pH}_i$  ist in eurythermen Arten bei akuten Temperatur-Inkubationen stärker ausgeprägt, als bei stenothermen (polaren) Arten, wobei die vollständige Beziehung zwischen Ionenregulation, Osmolarität und  $\text{pH}_i$  aufgrund der vielfältigen Verflechtungen und Abhängigkeiten noch nicht vollständig verstanden ist (Pörtner & Sartoris 1999). Aktive Ionentransportprozesse tragen zu 65% zur temperaturabhängigen Änderung des  $\text{pH}_i$  in *Z. viviparus* bei. Der Anteil der aktiven Regulation in *P. brachycephalum* beträgt nur ca. 25% (van Dijk et al. 1997; Pörtner & Sartoris 1999; Sartoris et al. 2003a). Dies mag auch damit zusammenhängen, dass *P. brachycephalum* bei 0°C einen höheren Anteil der zur Verfügung stehenden Energie auf den Proteinstoffwechsel verwendet. Damit sind sowohl Protein-Biosynthese, als auch der Abbau von potenziell kältegeschädigten Proteinen über den Ubiquitin-Weg gemeint (Windisch 2013). Bei der optimalen Wachstumstemperatur zwischen 3 und 5°C werden diese Prozesse herunterreguliert, sodass per se mehr Energie für andere Prozesse genutzt werden kann und sich zum Teil auch in höheren Wachstumsraten niederschlägt. Mit steigender Temperatur wächst jedoch der Einfluss anderer temperaturbedingter Effekte (z.B. Änderungen von Membraneigenschaften, Löslichkeitsverhalten von Gasen wie  $\text{CO}_2$  und steigender thermischer Energie in der Zelle), die in Zusammenhang mit dem zu beobachtenden metabolischen Stress (Windisch 2013) zu erkennbaren Änderungen im Säure-Base- und Ionenhaushalt führen können. Sollten neben dem wahrscheinlichen Einsetzen der Autophagie (Windisch 2013) auch apoptotische Prozesse stattfinden, würde die damit verbundene Auflösung von Zellmembranen zu einer Vermischung zuvor getrennter Kompartimente führen, was jedoch weitere Vorhersagen über die Änderung des pH-Werts erschwert.

Der konstante Dissoziationsgrad, den eine pH-Regulation gemäß alaphastat-Hypothese mit sich bringt, sorgt für eine optimale Funktion der Proteine. Der geringste regulatorische Aufwand ist also zwischen 0 und 3°C zu erwarten. Intakte Zellen regulieren ihren pH-Wert über  $\text{H}^+$ - und  $\text{HCO}_3^-$ -Transport, sowie über die  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase. Bei den pH-sensitiven Gruppen handelt es sich vermutlich um Imidazol-Gruppen (Nattie 1990; Burton 2002). Trotz der erniedrigten relativen Imidazol-Konzentration bei Temperaturen oberhalb der Kontrolltemperatur von 0°C, scheinen diese Prozesse nicht geschädigt zu sein. Entsprechend

dem aktiv aufrechterhaltenen  $\text{Na}^+$ -Gradienten folgen sekundär aktive Prozesse über  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -Austauscher und  $\text{H}^+$ -ATPasen, die direkt den pH-Wert beeinflussen (Pörtner & Bock 2000). Thermische Schädigungen dieser Transporter ab  $5^\circ\text{C}$  und ein niedriges Energielevel der Zellen führen dazu, dass sich wohlmöglich die Ionenverteilung über die Zellmembran ändert, was unter anderem zu veränderten Pufferkapazitäten im Zytoplasma und er gemessenen Änderung des  $\text{pH}_i$  führen kann.

Dennoch weisen Madshus (1988) sowie Pörtner & Bock (2000) darauf hin, dass der  $\text{pH}_i$  durch regulatorische Prozesse saurer gehalten wird, als er es aus Gleichgewichts-Berechnungen sein müsste. Würden die aktiven Transportprozesse ausfallen (durch fehlende ATP-Bereitstellung), käme zur passiven Erniedrigung des  $\text{p}K_{\text{Im}}$  mit steigender Temperatur auch der passive Einfluss der Säure-Base-Äquivalente hinzu und würde den  $\text{pH}_i$  noch weiter absenken. Stattdessen wurde jedoch zwischen  $3$  und  $9^\circ\text{C}$  eine Alkalisierung über den Kontrollwert bei  $0^\circ\text{C}$  hinaus gemessen (Abb. 2). Eventuell ändern sich also die Fixpunkte für die aktive Säure-Base-Regulation und einzelne der oben genannten, relevanten Transporter-Typen könnten mit der Zeit unterschiedlich stark betroffen sein. Besonders durch den potentiellen Einfluss der Temperatur auf  $\text{H}^+$ -ATPasen, die  $\text{Na}^+$ -Verteilung und generelle Änderungen der Membranpermeabilität scheint sich ein neues Gleichgewicht einzustellen, welches das Bild einer Überkompensation zur Regelung der Protonenkonzentration vermittelt, wie es auch die verminderte pH-Wert-Erniedrigung in der Akut-Inkubation von Mark et al. (2002) ab  $6^\circ\text{C}$  zeigt. Da Ionenregulation einen großen Teil der verfügbaren Energie in Fischen benötigt (bis zu  $45\%$  aus Sauerstoffverbrauch-Messungen bei Inhibition der  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase in Hepatozyten von *P. brachycephalum*; Mark et al. 2005), sollten Beeinträchtigungen im Energiestoffwechsel sich – je nach Gewebe – mehr oder weniger stark auf die Ionenverteilung auswirken (Pörtner et al. 1998).

Der Einfluss der Temperatur auf die Proteinstabilität wurde bereits von Windisch (2013) diskutiert. Die Stabilität des Protein-Syntheseapparats wurde ab  $5^\circ\text{C}$  durch die vermehrte Bildung ribosomaler RNAs und entsprechender Proteine gefördert, und die erhöhte Expression von HSP – selbst nach neun Wochen – kann als Zeichen für generelle thermische Instabilität gewertet werden. Im Übrigen besteht die Möglichkeit, dass Proteine unter verschiedenen Temperaturen aus unterschiedlichen Isoformen gebildet werden, welche durch eine variierende Histidin-Frequenz im Protein als Anpassung an den  $\text{pH}_i$  transkribiert werden (H. Windisch, pers. Mitteilung). Es wurde außerdem gezeigt, dass als Kälteanpassung bei der Proteinbiosynthese in *P. brachycephalum* bevorzugt Aminosäuren eingebaut werden, die zu einer höheren Instabilität, bzw. Flexibilität der Polypeptide führen (Windisch et al. 2012).

#### 4.6 Einfluss des $\text{pH}_i$ und der Versorgung mit Sauerstoff auf Stoffwechselprozesse

Die vermutete Störung der Ionenregulationprozesse ist offensichtlich über die aerobe Kapazität an die Inkubationstemperatur gekoppelt. Zwischen  $T_{p_{II}}$  und  $T_{c_{II}}$  ist die aerobe Kapazität limitiert und im Katabolismus müssen andere Ausgangsstoffe zur anaeroben Energiegewinnung genutzt werden (Mark et al. 2002; Windisch et al. 2011). Dass die Abweichung des  $\text{pH}_i$  vom Optimum nicht nur Nachteile für den Organismus haben kann, deutet sich durch die Einflüsse des pH-Werts auf Enzymaktivitäten an (Walsh & Moon 1982): Eine Überaktivität oxidativer Stoffwechselprozesse, die zur Bildung reaktiver Sauerstoffspezies führen, kann vermieden und antioxidative Enzyme, wie Peroxidasen, in ihrer Aktivität gefördert werden, indem der  $\text{pH}_i$  den jeweiligen pH- und Temperatur-Optima angepasst wird (vgl. Abele & Puntarulo 2004). Neben dem  $\text{pH}_i$  spielt in diesem Zusammenhang auch die Temperatur eine Rolle: Eine Temperaturerhöhung innerhalb der kritischen Temperaturgrenzen führt generell zu einer Erhöhung der Umsatzrate eines Enzyms (Eckert et al. 2002). Davon sind auch Enzyme betroffen, deren Aktivität in allgemeinen Stresssituation für das Gewebe nachteilig sein können. Genauere Untersuchungen diesbezüglich stehen für *P. brachycephalum* jedoch noch aus.

Die Messwerte aus Abb. 2 und 3 deuten darauf hin, dass erst ab Temperaturen jenseits der optimalen Wachstumstemperatur von  $3^\circ\text{C}$  Änderungen in der direkten pH-Regulation und oberhalb von  $5^\circ\text{C}$  Änderungen im gesamten Säure-Base-Haushalt, einschließlich  $c(\text{CO}_2)$  einsetzen. Anhand der hier erhobenen Daten, scheint es als Langzeitanpassung ab  $5^\circ\text{C}$  (und damit nahe der zuvor bei etwa  $6^\circ\text{C}$  definierten  $T_{p_{II}}$ ) vorteilhaft für den Organismus zu sein, bei steigender Temperatur pH-sensitive Proteine zu regulieren und Änderungen im Zellstoffwechsel einzuleiten. Zusätzlich zu den gezeigten Anpassungen im weißen Muskel, ist auch der Stoffwechsel in den Leberzellen der antarktischen Aalmutter betroffen (Windisch et al. 2011; Windisch 2013). Ein gegenüber der alaphastat-Hypothese geringerer  $\Delta\text{pH}/\Delta T$  von  $-0,009^\circ\text{C}^{-1}$  im weißen Muskel des amerikanischen Aals, wurde von Walsh & Moon (1982) ebenfalls als Anpassung der Enzymaktivitäten bei Temperaturänderungen gedeutet. Aus der unterschiedlichen, temperaturabhängigen Änderung des  $\text{pH}_i$  in verschiedenen Geweben schlussfolgerten sie, dass zu Gunsten überlebenswichtiger Organe, wie Leber und Herz, die Stoffwechselrate speziell des Muskelgewebes reduziert wird, um insgesamt Energie zu sparen.

Vor dem Hintergrund, dass die Phosphofruktokinase 1 (PFK1) bei höheren pH-Werten im Zytosol erst durch deutlich höhere ATP-Konzentrationen gehemmt wird (Ui 1966), scheint eine Verschiebung im Energiestoffwechsel hin zur anaeroben Glykolyse sehr wahrscheinlich. Der Verlauf des  $pH_i$  (Abb. 2) deutet darauf hin, dass die  $T_{pH}$  im Muskel wohl nicht exakt bei 6°C liegt (Mark et al. 2002, aus Akut-Inkubation), sondern eher bei 5°C. Da zusätzlich bei 5°C nach sechs Wochen mehr Glucose durch Gluconeogenese bereitgestellt (Windisch et al. 2011) und die Nettoumsatzrate der PFK1 durch einen alkalischen  $pH_i$  erhöht wird, steigt der Anteil der Energie, die anaerob mittels Glykolyse in der Zelle bereitgestellt werden kann. Ui (1966) konnte zeigen, dass eine pH-Wert-Erhöhung in Zellextrakten aus dem Zwerchfell von Ratten zur gleichzeitigen Erhöhung der Gesamt-Glykolyserate führt. Über sechs Wochen zeigt mit fortschreitender Inkubation bei 5°C die Citratsynthase in *P. brachycephalum* eine geringere Aktivität, was auf eine Reduktion des Citratzyklus und damit der aeroben Energiegewinnung hindeutet (Windisch et al. 2011). Dass dennoch nach neun Wochen bei 5°C positives Wachstum zu messen war, mag daran liegen, dass es sich hier um eine Temperaturgrenze handelt, an der die Sauerstoffversorgung gerade noch zur aeroben Energiegewinnung ausreicht. Umweltbedingter Stress könnte eventuell dazu führen, dass die Fische auf lange Sicht vermehrt zur anaeroben Energiegewinnung übergehen, was 5°C als  $T_{pH}$  kennzeichnen würde. Dies spiegelt sich in der engen Beziehung zwischen steigender Gluconeogenese-Rate (Windisch et al. 2011) und Netto-Energiegewinn wider. Zur Regenerierung eines Mols Glucose aus einem Mol Laktat, bzw. Pyruvat werden 6 Mol ATP verbraucht (4 mol ATP + 2 mol GTP, Stryer 1990). Ist die Versorgung der Zelle mit Sauerstoff so weit limitiert, dass dieser zusätzliche Energieverbrauch nicht mehr über oxidative Phosphorylierung gedeckt wird, kommen langfristige Prozesse, die überschüssige Energie benötigen – wie z.B. Wachstum – zum Erliegen. Die Sauerstoffverfügbarkeit bei 5°C ist für *P. brachycephalum* wohlmöglich ein kritischer Parameter, der die absolute Leistungsfähigkeit des Organismus definieren kann und damit wohl als  $T_{pH}$  zu definieren wäre. Unveränderte Laktat-Konzentrationen (Tab. 1) könnten auch eine Folge des Abtransports zur Leber sein, wo Laktat über die Gluconeogenese zu Glucose und schließlich zu Glykogen metabolisiert wird (Cori-Zyklus). Ein anaerober Stoffwechsel würde so verschleiert werden. Dennoch weisen Schulte et al. (1992) darauf hin, dass zumindest in der Regenbogenforelle (*Oncorhynchus mykiss*) Laktat schon im weißen Muskel in Glykogen umgewandelt wird.

Eine allgemeine Erhöhung der Glykolyserate kann selbstverständlich auch zu einer Erhöhung des Gesamt-Energiegewinns führen, wenn mehr glykolytisch erzeugtes Acetyl-Coenzym A in

den Citratzyklus eingebracht wird. Die erwähnte, abnehmende Aktivität der Citratsynthase bei 5°C über sechs Wochen (Windisch et al. 2011) zeigt jedoch, dass hier auf Dauer Inkubationsbedingungen herrschen, die jenseits der maximalen aeroben Kapazität der Tiere liegen.

Wird das Muskelgewebe bei steigenden Temperaturen tendentiell mit weniger Sauerstoff versorgt (Mark et al. 2002), und die allgemeine Stoffwechselaktivität pH-abhängig reduziert, kann dies auf einen trade-off zu Gunsten wichtigerer Organe hindeuten (Walsh & Moon 1982). Eventuell werden vor allem Nervengewebe und der Herzmuskel weiterhin gut mit Sauerstoff versorgt, wohingegen die Versorgung des weißen Muskels reduziert wird und eine aerobe Energiegewinnung auch bei höheren Temperaturen gewährleistet werden kann. Die Vermutung, dass dies in diesen Geweben zu einer alaphastat-Regulation des  $pH_i$  über 3°C hinaus führt, müsste noch durch gezielte Messungen bestätigt werden. Eine mangelhafte Durchblutung des Muskels ab 7°C (Mark et al. 2002) könnte jedenfalls auch den steigenden  $CO_2$ -Gehalt erklären, da nicht genügend  $CO_2$  abtransportiert wird. Demnach würde es sich bei der gemessenen Alkalisierung des Gewebes um einen passiven Effekt handeln.

#### 4.7 Fazit

Eine langfristige Inkubation von *P. brachycephalum* bei Temperaturen oberhalb der natürlichen Umgebungstemperatur von 0 – 1°C (Windisch 2013) führt zwangsläufig zu Anpassungen auf zellulärer Ebene. Zwar findet sich bei 3 – 5°C ein optimales Wachstum und bis 3°C folgt die Änderung des  $pH_i$  im weißen Muskel der alaphastat-Hypothese, doch deutet die Reduktion des relativen Imidazolgehalts bereits auf Stoffwechseländerungen hin, die bei Temperaturen ab 5°C eine Schwelle erreichen, bei der verschiedene Effekte akkumulieren. Die Sauerstoffverfügbarkeit (Mark et al. 2002) und vergleichsweise geringe thermische Stabilität von Proteinen und des Translationsapparats (Windisch 2013) sind hier bezeichnend für das Annähern an die Pejus-Temperatur und reduzieren die Leistungsfähigkeit der Zelle. Die nachhaltige Regeneration von ATP ist unter anaeroben Bedingungen auf Dauer nicht möglich. Passend zum Konzept der Sauerstoff-limitierten Temperaturtoleranz (Pörtner 2001; 2010), liegt das Wachstums-Optimum von *P. brachycephalum* mit 3 – 5°C (Brodte et al. 2006; Windisch 2013) knapp unter der in dieser Studie postulierten  $T_{pII}$  von 5°C. Oberhalb der Pejus-Temperatur deuten sich Störungen des Ionenhaushalts an, die durch den sinkenden Anteil der aeroben gegenüber der anaeroben Energiegewinnung bedingt sein können. Durch die reduzierte Imidazol- und die erhöhte Bicarbonatkonzentration verschiebt sich möglicherweise das Pufferverhalten des Zytosols in den alkalischen Bereich. Ausgehend vom

pH<sub>i</sub> bei 3°C fand ein linearer Anstieg bis auf 7,46±0,02 bei 9°C statt und damit zu Werten über dem Kontrollwert von 7,422±0,009 bei 0°C. Die Fähigkeit zur aeroben Energiegewinnung ist wahrscheinlich eng an die tatsächliche Änderung des pH<sub>i</sub> gekoppelt und lässt sich schwer einer definierten Temperatur zuordnen. Die fließenden Übergänge von anaerobem Energiestoffwechsel, temperaturbedingter Fehlfunktion von Proteinen und natürlich Durchblutung als Einflussfaktoren auf den Säure-Base-Haushalt sollten in weiteren Untersuchungen genauer betrachtet und in ihrer Interaktion intensiver analysiert werden.

## 5. Literatur

- Abe H., Ohmama S. (1987): Effect of starvation and sea-water acclimation on the concentration of free L-Histidine and related dipeptides in the muscle of eel, rainbow trout and Japanese dace. *Comp. Biochem. Physiol.* 88B: 507-511.
- Abe H., Dobson G. P., Hoeger U., Parkhouse W. S. (1985): Role of histidine-related compounds to intracellular buffering in fish skeletal muscle. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 249: 449-454.
- Abele D., Puntarulo S. (2004): Formation of reactive species and induction of antioxidant defence systems in polar and temperate marine invertebrates and fish. *Comp. Biochem. and Physiol. Part A: Molecular & Integrative Physiology.* 138: 405-415.
- Brodte E., Knust R., Pörtner H. O. (2006): Temperature-dependent energy allocation to growth in Antarctic and boreal eelpout (Zoarcidae). *Polar Biol.* 30: 95-107.
- Bock C., Sartoris F. J., Wittig R. M., Pörtner H. O. (2001): Temperature-dependent pH regulation in stenothermal Antarctic and eurythermal temperate eelpout (Zoarcidae): an in-vivo NMR study. *Polar Biol.* 24: 869-874.
- Cameron J. N. (1989): Acid-Base Homeostasis: Past and Present Perspectives. *Physiol. Zool.* 62: 845-865.
- Eckert R., Randall D., Burggren W., Kathleen F. (2002): Tierphysiologie. Thieme Verlag, Stuttgart. S. 585-655.
- Hardewig I., van Dijk P. L. M., Pörtner H. O. (1998): High-energy turnover at low temperatures: recovery from exhaustive exercise in Antarctic and temperate eelpouts. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 274: 1789-1796.
- Heisler N. (ed.) (1986): Acid-Base Regulation in Animals. Elsevier, Amsterdam.
- Hoegh-Guldberg O., Bruno J. F. (2010): The Impact of Climate Change on the World's Marine Ecosystems. *Science.* 18: 1523-1528.
- Karlsson J. O. M., Toner M. (1996): Long-term storage of tissues by cryopreservation: critical issues. *Biomaterials.* 17: 243-256.
- Lehnhardt F. G., Bock C., Röhn G., Ernestus R. I., Hoehn M. (2005): Metabolic differences between primary and recurrent human brain tumors: a <sup>1</sup>H NMR spectroscopic investigation. *NMR in Biomedicine.* 18: 371-382.
- Lum J. J., DeBerardinis R. J., Thompson C. B. (2005): Autophagy in metazoans: cell survival in the land of plenty. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 6: 439-448.

- Madshus I. H. (1988): Regulation of intracellular pH in eucaryotic cells. *Biochem. J.* 250: 1-8.
- Mark F. C., Bock C., Pörtner H. O. (2002): Oxygen-limited thermal tolerance in Antarctic fish investigated by MRI and  $^{31}\text{P}$ -MRS. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 283: 1254-1262.
- Mark F. C., Hirse T., Pörtner H. O. (2005): Thermal sensitivity of cellular energy budgets in some Antarctic fish. *Polar Biol.* 28: 805-814.
- Nattie E. E. (1990): The alphastat hypothesis in respiratory control and acid-base balance. *J. Appl. Physiol.* 69: 1201-1207.
- Pappenheim P. (1912): Die Fische der deutschen Südpolar-Expedition 1901 – 1903: Die Fische der Antarktis und Subantarktis. Deutsche Südpolar-Expedition XIII, Zoologie V, 160-182.
- Parmesan C, Yohe G. (2003): A globally coherent fingerprint of climate change impacts across natural systems. *Nature.* 421: 37-42.
- Pörtner H. O. (2001): Climate change and temperature-dependent biogeography: oxygen limitation of thermal tolerance in animals. *Naturwissenschaften.* 88: 137-146.
- Pörtner H. O. (2010): Oxygen- and capacity-limitation of thermal tolerance: a matrix of integrating climate-related stressor effects in marine ecosystems. *J. Exp. Biol.* 213: 881-893.
- Pörtner H. O., Bock C. (2000): A Contribution of Acid-base Regulation to Metabolic Depression in Marine Ectotherms. In *Life in the Cold: Eleventh International Hibernation Symposium* (ed. Heldmaier G., Klingenspor M.). Springer, Berlin/Heidelberg/New York. S. 443-456.
- Pörtner H. O., Boutilier R. G., Tang Y., Toews D. P. (1990): Determination of intracellular pH and  $\text{P}_{\text{CO}_2}$  after metabolic inhibition by fluoride and nitrilotriacetic acid. *Respir. Physiol.* 81: 255-274.
- Pörtner H. O., Finke E., Lee P. G. (1996): Effective Gibb's free energy change of ATP hydrolysis and metabolic correlates of intracellular pH in progressive fatigue of squid (*Lolliguncula brevis*). *Am. J. Physiol.* 271: 1403-1414.
- Pörtner H. O., Hardewig I., Sartoris F. J., van Dijk P. L. (1998): Energetic aspects of cold adaptation: critical temperatures in metabolic, ionic and acid-base regulation? In *Cold Ocean Physiology. Society for Experimental Biology Seminar Series 66* (ed. Pörtner H. O. & Playle R. C.). Cambridge University Press, Cambridge. S. 88-120.
- Pörtner H. O., Sartoris F. J. (1999): Invasive Studies of intracellular acid-base parameters: quantitative analyses during environmental and functional stress. In *Regulation of Tissue pH in Plants and Animals: A Reappraisal of Current Techniques. Society for Experimental Biology Seminar Series 68* (ed. Egginton S., Taylor E. W., Raven J. A.). Cambridge University Press, Cambridge. S. 69-98.
- Reeves R. B. (1972): An Imidazole Alphastat Hypothesis for Vertebrate Acid-Base Regulation: Tissue Carbon Dioxide Content and Body Temperature in Bullfrogs. *Respir. Physiol.* 14: 219-236.
- Sartoris F. J., Bock C., Pörtner H. O. (2003a): Temperature-dependent pH regulation in eurythermal and stenothermal marine fish: an interspecies comparison using  $^{31}\text{P}$ -NMR. *Journal of Thermal Biology.* 28: 363-371.

- Sartoris F. J., Bock C., Serendero I., Lannig G., Pörtner H. O. (2003b): Temperature-dependent changes in energy metabolism, intracellular pH and blood oxygen tension in the Antarctic cod. *Journal of Fish Biology*. 62: 1239-1253.
- Schulte P. M., Moyes D. M., Hochachka P. W. (1992): Integrating Metabolic Pathways In Post-Exercise Recovery Of White Muscle. *J. Exp. Biol.* 166: 181-195.
- Shiau C. Y., Pong Y. J., Chiou T. K., Tin Y. Y. (2001): Effect of starvation on free histidine and amino acids in white muscle of milkfish *Chanos chanos*. *Comp. Biochem. Physiol.* 128B: 501-506.
- Storch D., Lannig G., Pörtner H. O. (2005): Temperature-dependent protein synthesis capacities in Antarctic and temperate (North Sea) fish (Zoarcidae). *J. Exp. Biol.* 208: 2409-2420.
- Stryer L. (1990): Biochemie. Spektrum, Heidelberg. S. 460.
- Taylor S. E., Egginton S., Taylor E. W., Franklin C. E., Johnston I. A. (1999): Estimation of intracellular pH in muscle of fishes from different thermal environments. *Journal of Thermal Biology*. 24: 199-208.
- Ui M. (1966): A Role of Phosphofructokinase in pH-dependent Regulation in Glycolysis. *Biochim. Biophys. Acta*. 124: 310-322.
- van Dijk P. L. M., Hardewig I., Pörtner H. O. (1997): Temperature-dependent shift of  $pH_i$  in fish white muscle: contributions of passive and active processes. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 272: 84-89.
- van Dijk P. L. M., Tesch C., Hardewig I., Pörtner H. O. (1999): Physiological disturbances at critically high temperatures: A comparison between stenothermal Antarctic and eurythermal temperate eelpouts (Zoarcidae). *J. Exp. Biol.* 202: 3611-3621.
- van Waarde A. (1988): Biochemistry of non-protein nitrogenous compounds in fish including the use of amino acids for anaerobic energy production. *Comp. Biochem. Physiol.* 91B: 207-228.
- Walsh P. J., Moon T. W. (1982): The influence of temperature on extracellular and intracellular pH in the American eel, *Anguilla rostrata* (Le Sueur). *Respir. Physiol.* 50:129-140.
- Windisch H. S. (2013): Molecular adaptation and thermal plasticity in a cold-adapted Antarctic fish. Universität Bremen, Bremen.
- Windisch H. S., Kathöver R., Pörtner H. O., Frickenhaus S., Lucassen M. (2011): Thermal acclimation in Antarctic fish: Transcriptomic profiling of metabolic pathways. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 301: 1453-1466.
- Windisch H. S., Lucassen M., Frickenhaus S. (2012): Evolutionary force in confamilial marine vertebrates of different temperature realms: adaptive trends in zoarcid fish transcriptomes. *BMC Genomics*. 13: 549.
- Zielinski S., Pörtner H. O. (1996): Energy metabolism and ATP free-energy change of the intertidal worm *Sipunculus nudus* below a critical temperature. *J. Comp. Physiol. B.* 166: 492-500.

## 6. Anhang

### 6.1 Tabellen

**Tab. A1: Messwerte zu  $\text{pH}_i$  und  $c(\text{CO}_2)$ , sowie die daraus berechneten  $P(\text{CO}_2)$  und  $[\text{HCO}_3^-]$ .** Messwerte sind aus Mehrfachbestimmungen auf die jeweilige Probe gemittelt. Verunreinigte Proben sind mit (\*) gekennzeichnet. Die Mittelwerte mit Standardabweichung sind für die nicht-verunreinigten Proben berechnet und ausgewertet worden. Kursiv gedruckte Guppen sind nicht normalverteilt nach Shapiro-Wilk-Test mit  $P > 0,2$ .

$T / ^\circ\text{C}$	Probe	$\text{pH}_i$	$c(\text{CO}_2) / \text{mM}$	$P(\text{CO}_2) / \text{kPa}$	$[\text{HCO}_3^-] / \text{mM}$
-1	-1-13 (*)	7,635	4,980	0,346	4,736
	-1-26 (*)	7,716	5,853	0,334	5,617
	-1-39 (*)	7,601	3,559	0,268	3,370
	-1-104	7,369	4,447	0,567	4,047
	-1-143	7,410	4,988	0,581	4,578
	$\bar{x} \pm \text{SD}$	7,390±0,029	4,718±0,382	0,574±0,010	4,313±0,375
0 (Kontrolle)	0-26	7,418	4,164	0,480	3,838
	0-52	7,414	3,321	0,386	3,058
	0-130 (*)	7,593	5,178	0,399	4,906
	0-156	7,422	3,654	0,417	3,370
	0-169 (*)	7,475	5,211	0,528	4,852
	0-182 (*)	7,380	5,162	0,648	4,323
	0-195	7,435	4,676	0,519	4,323
	$\bar{x} \pm \text{SD}$	7,422±0,009	3,954±0,593	0,450±0,060	3,647±0,553
3	3-13	7,379	4,065	0,524	3,745
	3-26 (*)	7,504	4,174	0,405	3,926
	3-91 (*)	7,304	3,255	0,495	2,952
	3-117	7,388	3,261	0,412	3,009
	3-169	7,339	3,625	0,511	3,313
	$\bar{x} \pm \text{SD}$	7,369±0,026	3,650±0,403	0,482±0,061	3,356±0,370
5	5-39 (*)	7,504	3,337	0,330	3,149
	5-52	7,397	3,840	0,485	3,563
	5-65	7,427	3,811	0,449	3,554
	5-104	7,399	3,994	0,502	3,708
	5-117	7,401	2,508	0,314	2,329
	$\bar{x} \pm \text{SD}$	7,406±0,014	3,538±0,691	0,437±0,085	3,288±0,644
7	7-13	7,408	4,301	0,542	4,012
	7-39	7,427	4,948	0,596	4,630
	7-78 (*)	7,501	4,211	0,428	3,983
	7-91 (*)	7,507	4,586	0,460	4,341
	7-182	7,443	4,713	0,548	4,422
	$\bar{x} \pm \text{SD}$	7,426±0,018	4,654±0,327	0,562±0,030	4,355±0,314
9	9-13	7,443	4,388	0,523	4,128
	9-39	7,451	4,809	0,562	4,530
	9-52	7,488	4,923	0,528	4,660
	9-78 (*)	7,361	4,709	0,675	4,373
	9-91	7,455	4,348	0,503	4,097
	$\bar{x} \pm \text{SD}$	7,459±0,020	4,617±0,291	0,529±0,024	4,454±0,284

**Tab. A2: Konzentrationen von Laktat, Succinat und Imidazol, aus den Daten der NMR-Spektren berechnet.** Die eigentlichen Messwerte aus den Spektren sind kursiv eingetragen. Die relativen Einheiten der Metabolite beziehen sich auf die ermittelte Adenosinkonzentration.

<i>T / °C</i>	<i>Probe</i>	<i>Adenosin</i>	<i>Laktat</i>	<i>Succinat</i>	<i>Imidazol</i>	<i>Laktat / rel. E.</i>	<i>Succinat / rel. E.</i>	<i>Imidazol / rel. E.</i>
0	0-26	<i>0,4382</i>	<i>1,4951</i>	<i>0,0392</i>	<i>0,0457</i>	3,4119	0,0895	0,1043
	0-52	<i>0,3850</i>	<i>2,1522</i>	<i>0,0494</i>	<i>0,0614</i>	5,5901	0,1283	0,1595
	0-130	<i>0,4196</i>	<i>1,2022</i>	<i>0,0258</i>	<i>0,0533</i>	2,8651	0,0615	0,1270
	0-156	<i>0,4570</i>	<i>1,1976</i>	<i>0,0425</i>	<i>0,0379</i>	2,6206	0,0930	0,0829
	0-169	<i>0,5194</i>	<i>1,4673</i>	<i>0,0377</i>	<i>0,1155</i>	2,8250	0,0726	0,2224
	0-195	<i>0,4376</i>	<i>1,0337</i>	<i>0,0253</i>	<i>0,1234</i>	2,3622	0,0578	0,2820
	0-186	<i>0,3273</i>	<i>1,887</i>	<i>0,0563</i>	<i>0,0839</i>	5,7653	0,1720	0,2563
	$\bar{x} \pm SD$					3,6343±1,4323	0,0964±0,0410	0,1763±0,0778
3	3-13	<i>0,7010</i>	<i>2,3718</i>	<i>0,0418</i>	<i>0,075</i>	3,3835	0,0596	0,1070
	3-26	<i>0,0736</i>	<i>0,184</i>	<i>0,0177</i>	<i>-/-</i>	2,5000	0,2404	<i>-/-</i>
	3-91	<i>0,7354</i>	<i>1,4916</i>	<i>0,0434</i>	<i>0,0573</i>	2,0283	0,0590	0,0779
	3-117	<i>0,1839</i>	<i>0,2909</i>	<i>0,0094</i>	<i>0,0140</i>	1,5818	0,0511	0,0761
	3-169	<i>0,6312</i>	<i>1,5358</i>	<i>0,0259</i>	<i>0,0331</i>	2,4331	0,0410	0,0524
	$\bar{x} \pm SD$					2,3853±0,6680	0,0903±0,0843	0,0784±0,0223
5	5-39	<i>0,6618</i>	<i>1,8015</i>	<i>0,0248</i>	<i>0,0263</i>	2,7221	0,0375	0,0397
	5-52	<i>0,1985</i>	<i>1,0488</i>	<i>0,0301</i>	<i>-/-</i>	5,2836	0,1516	<i>-/-</i>
	5-65	<i>0,4190</i>	<i>1,9251</i>	<i>0,0329</i>	<i>0,0114</i>	4,5945	0,0785	0,0272
	5-104	<i>0,4130</i>	<i>0,9739</i>	<i>0,0284</i>	<i>0,0204</i>	2,3581	0,0688	0,0494
	5-117	<i>0,3818</i>	<i>1,5042</i>	<i>0,0321</i>	<i>0,0451</i>	3,9398	0,0841	0,1181
	$\bar{x} \pm SD$					3,7796±1,2340	0,0841±0,0418	0,0586±0,0407
7	7-13	<i>0,6619</i>	<i>1,3459</i>	<i>0,0326</i>	<i>0,0184</i>	2,0334	0,0493	0,0278
	7-39	<i>0,4469</i>	<i>1,0124</i>	<i>0,0240</i>	<i>0,0249</i>	2,2654	0,0537	0,0557
	7-78	<i>0,2011</i>	<i>0,6620</i>	<i>0,0202</i>	<i>-/-</i>	3,2919	0,1004	<i>-/-</i>
	7-91	<i>0,1012</i>	<i>0,3204</i>	<i>0,0106</i>	<i>0,0121</i>	3,1660	0,1047	0,1196
	7-182	<i>0,3388</i>	<i>0,5038</i>	<i>0,0390</i>	<i>0,0203</i>	1,4870	0,1151	0,0599
	$\bar{x} \pm SD$					2,4487±0,7675	0,0847±0,0308	0,0657±0,0386

## 6.2 Rechnungen

Berechnung des Löslichkeitskoeffizienten  $\alpha$  und des  $pK_S'''$  nach Heisler (1986) sowie von  $P(\text{CO}_2)$  und  $[\text{HCO}_3^-]$  nach Pörtner et al. (1990) am Beispiel von Probe 3-117:

### Gegebene Werte:

$T =$	$3^\circ\text{C}$
$\text{pH}_i =$	$7,388$
$c(\text{CO}_2) =$	$3,261 \text{ mM}$
$[\text{Na}^+] =$	$0,002 \text{ M}$
Ionenstärke $I =$	$0,15 \text{ M}$
Molarität der gelösten Spezies $[M] =$	$0,34 \text{ M}$
Proteinkonzentration $[\text{Pr}] =$	$162 \text{ g/L}$

Berechnung von  $\alpha$  und  $pK_S'''$  für das inkubierte Gewebe:

**R1:** Löslichkeitskoeffizient  $\alpha$  nach (Heisler 1986):

$$\begin{aligned} \alpha &= 0,1008 - 29,8 \cdot 10^{-3} \cdot [M] + (1,218 \cdot 10^{-3} \cdot [M] - 3,639 \cdot 10^{-3}) \cdot T \\ &\quad - (19,57 \cdot 10^{-6} \cdot [M] - 69,59 \cdot 10^{-6}) \cdot T^2 \\ &\quad + (71,71 \cdot 10^{-9} \cdot [M] - 559,6 \cdot 10^{-9}) \cdot T^3 \\ \alpha_{3-117} &= 0,1008 - 29,8 \cdot 10^{-3} \cdot 0,34 \text{ M} + (1,218 \cdot 10^{-3} \cdot 0,34 \text{ M} - 3,639 \cdot 10^{-3}) \cdot 3^\circ\text{C} \\ &\quad - (19,57 \cdot 10^{-6} \cdot 0,34 \text{ M} - 69,59 \cdot 10^{-6}) \cdot 3^2\text{C}^2 \\ &\quad + (71,71 \cdot 10^{-9} \cdot 0,34 \text{ M} - 559,6 \cdot 10^{-9}) \cdot 3^3\text{C}^3 \\ &= 0,0815 \frac{\text{mmol}}{\text{L} \cdot \text{mmHg}} \end{aligned}$$

**R2:**  $pK_S'''$  nach (Heisler 1986):

$$\begin{aligned} pK_S''' &= 6,583 - 13,41 \cdot 10^{-3} \cdot T + 228,2 \cdot 10^{-6} \cdot T^2 - 1,516 \cdot 10^{-6} \cdot T^3 - 0,341 \cdot I^{0,323} \\ &\quad - \log_{10} \left( \frac{1 + 0,00039 \cdot [\text{Pr}] + 10^{(\text{pH} - 10,64 + 0,011 \cdot T + 0,737 \cdot I^{0,323})}}{(1 + 10^{1,92 - 0,01 \cdot T - 0,737 \cdot T^{0,323} + \log_{10}([\text{Na}^+] + (-0,494 \cdot I + 0,651)(1 + 0,0065[\text{Pr}])})}) \right) \\ pK_{S''' 3-117} &= 6,583 - 13,41 \cdot 10^{-3} \cdot 3^\circ\text{C} + 228,2 \cdot 10^{-6} \cdot 3^2\text{C}^2 - 1,516 \cdot 10^{-6} \cdot 3^3\text{C}^3 - 0,341 \cdot 0,15^{0,323} \text{ M}^{0,323} \\ &\quad - \log_{10} \left( \frac{1 + 0,00039 \cdot 162 \text{ g/L} + 10^{(7,388 - 10,64 + 0,011 \cdot 3^\circ\text{C} + 0,737 \cdot 0,15^{0,323} \text{ M}^{0,323})}}{(1 + 10^{1,92 - 0,01 \cdot 3^\circ\text{C} - 0,737 \cdot 3^{0,323} \text{C}^{0,323} + \log_{10}(0,002 \text{ M} + (-0,494 \cdot 0,15 \text{ M} + 0,651)(1 + 0,0065 \cdot 162 \text{ g/L}))})} \right) \\ &= 6,3107 \end{aligned}$$

Berechnung von  $P(\text{CO}_2)$  und  $[\text{HCO}_3^-]$  aus  $\alpha$ ,  $\text{p}K_s'''$  und  $c(\text{CO}_2)$  nach Pörtner et al. (1990):

**R3:**  $P(\text{CO}_2)$  nach (Pörtner et al. 1990)

$$P(\text{CO}_2) = \frac{c(\text{CO}_2)}{10^{\text{pH}-\text{p}K_s'''} \cdot \alpha + \alpha}$$

$$P(\text{CO}_2)_{3-117} = \frac{3,261 \text{ mM}}{10^{7,388-6,3107} \cdot 0,0815 \frac{\text{mmol}}{\text{L} \cdot \text{mmHg}} + 0,0815 \frac{\text{mmol}}{\text{L} \cdot \text{mmHg}}} = 3,0879 \text{ mmHg} = 0,412 \text{ kPa}$$

**R4:**  $[\text{HCO}_3^-]$  nach (Pörtner et al. 1990)

$$[\text{HCO}_3^-] = P(\text{CO}_2) \cdot \alpha \cdot 10^{(\text{pH}-\text{p}K_s''')}$$

$$[\text{HCO}_3^-]_{3-117} = 3,0876 \text{ mmHg} \cdot 0,0815 \frac{\text{mmol}}{\text{L} \cdot \text{mmHg}} \cdot 10^{(7,388-6,3107)} = 3,009 \text{ mM}$$

## Danksagungen

Ich möchte mich hiermit bei folgenden Personen bedanken, die mir während der Anfertigung dieser Bachelorarbeit und darüber hinaus auf verschiedene Weise und in verschiedenen Situationen geholfen haben:

**Prof. Dr. Hans-Otto Pörtner**, als Erstgutachter der Arbeit und für die Möglichkeit sie in seiner Arbeitsgruppe durchzuführen, sowie für kompetente Anregungen zur Auswertung.

**Dr. Christian Bock**, als Zweitgutachter der Arbeit und die bereitwillige und umfassende Unterstützung auch über seinen eigenen Forschungsschwerpunkt hinaus.

**Dr. Heidrun Windisch**, für die Bereitstellung der Gewebeproben und der von ihr erhobenen Daten.

**Timo Hirse**, für allzeit verfügbare technische und methodische Unterstützung, die meine labortechnischen Fähigkeiten nachhaltig verbessert hat.

**Anette Tillmann**, für persönliche Hilfe und als Ansprechpartnerin, um mich im weitläufigen Alfred-Wegener-Institut zurechtzufinden.

Den Master- und PhD-Studenten der Gruppe „NMR“, insbesondere **Franziska Kupprat**, **Felizitas Wermter** und **Matthias Schmidt**, für Hilfe bei der Bedienung des NMR, der Auswertung der Spektren und für verschiedene Denkanstöße.

Der Sektion Integrative Ökophysiologie, dafür, dass sie mich so freundlich aufgenommen hat und für eine angenehme Arbeitsatmosphäre gesorgt hat.

Meinen Freunden und meiner Familie, die mich während des gesamten Studiums unterstützt haben.

## **Eigenständigkeitserklärung**

Hiermit erkläre ich, Bastian Maus, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig angefertigt habe. Es wurden nur die in der Arbeit ausdrücklich benannten Quellen und Hilfsmittel benutzt. Wörtlich oder sinngemäß übernommenes Gedankengut habe ich als solches kenntlich gemacht.

---

Bastian Maus

Bremen, den