

Diplomarbeit im Fach Biologie, Universität Bremen, Fachbereich 2
Alfred – Wegener – Institut für Polar- und Meeresforschung

**Vergleichende Untersuchungen zur Temperaturabhängigkeit
mitochondrialer Funktionszustände bei marinen Fischen**

vorgelegt von

Gisela Lannig

Bremen, im Januar 2000

| | | |
|-----------|---|-----------|
| 1 | EINLEITUNG | 1 |
| 2 | MATERIAL UND METHODEN | 9 |
| 2.1 | Versuchstiere | 9 |
| 2.2 | Analysen | 10 |
| 2.2.1 | Mitochondriale Respiration | 10 |
| 2.2.1.1 | Isolierung der Mitochondrien | 10 |
| 2.2.1.2 | Mitochondriale Respiration | 11 |
| 2.2.1.3 | Bestimmung des Proteingehalts | 16 |
| 2.2.1.4 | Bestimmung des P/O – Verhältnisses | 17 |
| 2.2.1.4.1 | Auswertung nach der klassischen Methode | 17 |
| 2.2.1.4.2 | Methode mittels luminometrischer Messung der ATP-Produktion | 19 |
| 2.2.2 | Messung der spezifischen Citratsynthase-Aktivität | 20 |
| 2.2.3 | Bestimmung des Lipidgehalts | 23 |
| 2.2.4 | Statistik | 24 |
| 3 | ERGEBNISSE | 26 |
| 3.1 | Mitochondriale Respirometrie | 26 |
| 3.1.1 | Mitochondriale Respirationsraten | 26 |
| 3.1.2 | Arrhenius-Aktivierungsenergien und Q_{10} -Werte | 33 |
| 3.1.3 | Kopplungsgrade | 34 |
| 3.1.4 | P/O-Verhältnisse | 36 |
| 3.2 | Citratsynthase-Aktivität | 38 |
| 3.2.1 | Spezifische Citratsynthase-Aktivität | 39 |
| 3.2.2 | Mitochondrialer Proteingehalt der Leber | 43 |
| 3.3 | Lipidgehalt | 44 |
| 4 | DISKUSSION | 47 |
| 4.1 | Respirationseigenschaften von Lebermitochondrien bei <i>Zoarces viviparus</i> | 48 |
| 4.2 | Spezifische Citratsynthase-Aktivität | 55 |
| 4.3 | Lipidgehalt der Leber | 60 |
| 5 | ZUSAMMENFASSUNG | 61 |
| 6 | LITERATUR | 63 |
| 7 | ANHANG | 69 |

Abkürzungen

| | |
|----------------------------|---|
| Abb. | Abbildung |
| ABT | Arrhenius Break Temperatur |
| ADP | Adenosin-5`-diphosphat |
| AM | Assaymedium |
| AMP | Adenosin-5`-monophosphat |
| Ap5A | P ¹ ,P ⁵ -Di-Adenosin-5`-Pentaphosphat |
| ATP | Adenosin-5`-triphosphat |
| BSA | Rinderserumalbumin |
| bzw. | beziehungsweise |
| CoA | Coenzym A |
| DTNB | 5,5`-Dithio-bis-(2-Nitrobenzoe-Säure) |
| E _a | Aktivierungsenergie |
| EDTA | (Ethylendinitrilo)-Tetraessigsäure |
| EGTA | (Ethylenglycol-bis(β-Aminoethylether)-N,N,N',N'-Tetraessigsäure |
| g | Erdbeschleunigung |
| HO | Homogenisationspuffer |
| $\dot{M}O_2$ | Sauerstoffverbrauch |
| MS222 | 3-Aminobenzoessäureethylester |
| M-Suspension | mitochondriale Suspension |
| n | Anzahl der Versuchstiere |
| p | Irrtumswahrscheinlichkeit |
| P _{O₂} | Sauerstoffpartialdruck |
| Q ₁₀ | Beschleunigungsrate eines physiologischen Prozesses bei einer Temperaturerhöhung von 10°C |

| | |
|-------------------|--|
| r | Korrelationskoeffizient |
| RCR | Kopplungsgrad (state III Respirationswert / state IV Respirationswert) |
| RCR _{o1} | Kopplungsgrad (state III Respirationswert / state IV _{o1} Respirationswert) |
| T | Temperatur |
| Tab. | Tabelle |
| Tris-HCl | Tris(Hydroxymethyl)-Aminomethan-Hydrochlorid |
| z. B. | zum Beispiel |

1 Einleitung

Die geographische Verbreitung von Tieren (Zoographie), hängt von einer Vielzahl von Faktoren ab, die bei einer Charakterisierung von Verbreitungsgrenzen berücksichtigt werden müssen. Das Vorhandensein geographischer Grenzen wie große Gebirgszüge oder weitreichende Wasserflächen reicht, neben Nahrungsangebot oft zur Erklärung der Lokalisierung terrestrischer Fauna auf ein bestimmtes Gebiet aus. Solche Grenzen treffen unter anderem auch für Meeresbewohner zu. Nach Eröffnung des Suezkanals drangen über 16 indo-pazifische Fischarten vom Roten Meer, wie beispielsweise *Siganus rivulatus* oder *Hepsetia pinguis* in das Mittelmeer ein und wurden dort seßhaft (Norman, 1966). Die entgegengerichtete Verbreitung von Mittelmeerarten in das Rote Meer hingegen fiel gering aus, was auf weitere verbreitungslimitierende Faktoren im marinen Bereich hindeutet. Einige davon wären Temperatur, Salzgehalt und die chemischen Eigenschaften von Wasser, Meeresströmungen oder das vorhandene Nahrungsspektrum. Neben dem Nahrungsangebot ist die Temperatur ein wesentlicher Faktor für die Verbreitungsgrenzen von Meeresorganismen. Aufgrund von auftretenden Temperaturschwankungen im jeweiligen Habitat wird zwischen eurythermen und stenothermen Meeresorganismen unterschieden. Eurytherme Tiere können große Temperaturschwankungen in ihrem Lebensraum tolerieren, wie sie beispielsweise in der Ostsee vorkommen, bei der im Winter Oberflächentemperaturen von $<1^{\circ}\text{C}$ und im Sommer von etwa 20°C auftreten (Lozán *et al.*, 1996). Stenotherme Arten hingegen haben einen geringen Toleranzbereich in Bezug auf Temperaturänderungen und treten in Gebieten mit relativ konstanten Temperaturen auf. So zeigen beispielsweise die polaren Meeresgebiete Arktis und Antarktis über das Jahr konstant niedrige Temperaturen, die im Bereich $-1,9^{\circ}$ bis 1°C liegen (Olbers *et al.*, 1992), und die dort heimische Fauna gilt als streng stenotherm. Aus einer Arbeit von Peck (1989) geht hervor, daß für den antarktischen Brachiopoden *Liothyrella uva* die obere lethale Temperaturgrenze schon bei $4,5^{\circ}\text{C}$ liegt, und Pörtner *et al.* (1999a) fanden die kritische Temperatur (T_c) der antarktischen Muschel *Laternula elliptica* bei 9°C (T_c : Übergang zu einem anaeroben Stoffwechsel der Mitochondrien, wenn die Temperatur niedrige oder hohe Extremwerte erreicht (Pörtner *et al.*, 1999b).

Stoffwechselprozesse und damit auch der Sauerstoffverbrauch eines Organismus sind in hohem Maße temperaturabhängig. Ein Maß für diese Abhängigkeit ist der Q_{10} , ein empirischer Wert, der aussagt, um welchen Faktor die Geschwindigkeit einer chemischen Reaktion bei einer Temperaturerhöhung um 10°C zunimmt. Fische (Teleostei) gehören zu den Ektothermen, deren Körpertemperatur von der Temperatur des sie umgebenden Wassers bestimmt wird, somit wirken sich Veränderungen der Umgebungstemperatur auf den Metabolismus dieser Tiere aus. Eine fortschreitende Temperaturerhöhung führt zu einer progressiven Steigerung der Stoffwechselrate bis zu einer lethalen Grenze (Johnston *et al.*, 1991). Mit der Besiedlung des gesamten aquatischen Raums, der Lebensräume mit extremen Temperaturen einschließt, mußten folglich Mechanismen entwickelt worden sein, die die dort lebenden Organismen vor schädigenden Temperatureffekten schützen. Als gut untersuchte Mechanismen sind hier die Expression von Hitzeschock-Proteinen (Carratù *et al.*, 1998) oder die Bildung von Gefrierschutz-Proteinen antarktischer Ektothermen (Cheng, 1998) zu nennen.

Der Begriff einer *metabolic cold adaptation* (metabolische Kälteadaptation, MCA) hielt in die wissenschaftliche Literatur Einzug, nachdem Respirationsuntersuchungen an einigen polaren Fischen bei niedrigen Temperaturen höhere Standardstoffwechselraten (Ruhestoffwechsel ohne Auftreten von spontaner Aktivität) aufwiesen, als ein Vergleich mit extrapolierten Daten borealer Arten mit einem Q_{10} -Faktor von 2,5 erwarten ließ (Scholander *et al.*, 1953 und Wohlschlag, 1960). Høleton (1973, 1974) berichtete später von niedrigeren Standardstoffwechselraten bei arktischen Fischen und stellte die *metabolic cold adaptation* in Frage. Die hohen Werte der früheren Arbeiten führte er auf Stress bei den Tieren zurück und kritisierte die Versuchsdurchführung, daß z. B. die Tiere nach Einsetzen in die Respirationskammern nicht genügend Erholungszeit hatten und somit verfälschte Ruhestoffwechselraten ermittelt wurden. Es folgte eine kontroverse Diskussion über die Hypothese der *metabolic cold adaptation* und wie ihr Grad zu quantifizieren sei (Clarke, 1983, 1991; Johnston, 1990; Somero *et al.*, 1998). Der Sauerstoffverbrauch eines Organismus setzt sich aus einer Summe verschiedener Reaktionen zusammen, wobei die einzelnen Reaktionen in unterschiedlicher Weise auf Temperaturveränderungen reagieren können

(Clarke, 1991). Es wurden zum einen Respirationsversuche an isolierten Mitochondrien verschiedener Gewebe (Moyes *et al.*, 1986; Johnston *et al.*, 1994, 1998; Guderley und St. Pierre, 1999; Hardewig *et al.*, 1999a; Pörtner *et al.*, 1999a) als auch Aktivitätsmessungen mitochondrialer Enzyme (Alp *et al.*, 1976; Campbell und Davies, 1978; Crockett und Sidell, 1990) durchgeführt. Die ermittelten Respirationsdaten ließen auf keine oder nur auf geringe Kälteadaptation durch Erhöhung der maximalen oxidativen Kapazität pro Milligramm mitochondrialem Protein schließen und entsprachen nicht der Hypothese der *metabolic cold adaptation*. Die Ergebnisse der mitochondrialen Enzymaktivitäten dagegen zeigten bei den polaren Arten im Vergleich zu Arten gemäßigter Breiten eine höhere Enzymaktivität pro Gramm Frischgewicht_{Gewebe} und deuten somit auf eine deutliche Kälteadaptation im aeroben Energiestoffwechsel polarer Organismen hin. Die erhöhte Aktivität einiger membrangebundener Enzyme bei kaltakklimatisierten und kaltadaptierten Arten ist möglicherweise in einer veränderten Phospholipidzusammensetzung der mitochondrialen Membranen begründet (van den Thillart und Modderkolk, 1978; Wodtke, 1981; Guderley *et al.*, 1997). Es ist bekannt, daß jede Lipidklasse ihre spezifische Phasenübergangstemperatur besitzt (Gelpase zu liquider Kristallphase). Aufgrund dessen kann durch eine Modifizierung der Lipidzusammensetzung die physiologische Effizienz biologischer Membranen bei verschiedenen Habitatterperaturen aufrechterhalten werden und somit die Aktivität der Proteine (Storelli *et al.*, 1998). Dieses Phänomen wurde als *homeoviscous adaptation* (homeoviskose Adaptation) bezeichnet (Cossins und Sinensky, 1986).

Andere Untersuchungen zeigten, daß mit einer Kälteakklimatisierung eurythermer Arten eine Proliferation der Mitochondriendichte einhergeht (Campbell und Davies, 1978; Egginton und Sidell, 1989; St. Pierre *et al.*, 1998) und dieser Befund wurde für einige polare Arten bestätigt (Londrville und Sidell, 1990; Sommer, 1998). Aus Literaturdaten ergibt sich eine Tendenz der Mitochondrien-Proliferation im Muskelgewebe mit abnehmender Habitatterperatur für demersale und gering-aktive Fischarten (Perciformes), wobei die Werte jedoch eine große Streuung zeigen (Johnston *et al.*, 1998). Da mit dieser Proliferation jedoch anscheinend keine Hochregulierung der Stoffwechselrate im Sinne der *metabolic cold adaptation* erfolgt, sahen

Tyler und Sidell (1984) und Londrville und Sidell (1990) in der erhöhten Mitochondriendichte möglicherweise eine Kompensierung der verminderten Diffusionsgeschwindigkeit der Metabolite durch Verkürzung der intrazellulären Entfernungen. Eine andere Anpassung an verminderte Diffusionsgeschwindigkeiten bei kalten Umgebungstemperaturen wird im hohen Lipidgehalt polarer Arten vermutet. Die Diffusionskonstante für Sauerstoff ist in Lipiden etwa 4,4-mal höher als im wässrigen Cytoplasma und es wird angenommen, daß die gesteigerte Anzahl an Lipidtröpfchen im Gewebe polarer Arten die Sauerstoff-Diffusionsrate zwischen Kapillaren und Mitochondrien erhöht (Londrville und Sidell, 1990; Sidell *et al.*, 1995). Ein weiterer Grund für den höheren Lipidgehalt liegt wahrscheinlich in der Präferenz antarktischer Fische zur Oxidierung von Lipiden. Eine Arbeit von Crockett und Sidell (1990) ergab, daß Enzyme für die Fettsäure-Oxidation, wie Carnitin-Palmitoyltransferase, im Muskelgewebe polarer Organismen um den Faktor 1,3 bis 27 aktiver waren als im Muskelgewebe aus Arten gemäßiger Breiten. Ebenso zeigten Sidell *et al.* (1995), daß die antarktische Art *Gobionotothen gibberifrons* im Muskelgewebe eine größere Kapazität für die ATP-Produktion bei der Oxidation von ungesättigten Fettsäuren im Vergleich zu Kohlenhydraten hatte.

Aus den bis jetzt durchgeführten Arbeiten zur Untersuchung einer *metabolic cold adaptation* polarer Meeresorganismen kann noch kein einheitliches Bild entworfen werden. Clarke (1980) erstellte ein Konzept, welches polare Fische in unterschiedliche Metabolismustypen einteilt, indem zwischen *kalt adaptierten* Arten (gemäß Wohlschlag, 1964) und *polaren* Arten (gemäß Clarke, 1980) unterschieden wird (Abb. 1.1) So gehören möglicherweise die *kalt adaptierten* Arten zur *polar aktiven* - Gruppe (Gruppe 1) mit einem hohen Metabolismus, zu der hoch entwickelte Arten der Notothenioiden, wie z.B. *Trematomus* und *Pagothenia* spp., und arktische Gadoiden zählen. Zur Gruppe der *polar trägen, spezialisierten* Arten mit einem relativ hohen Stoffwechsel (Gruppe 2) gehört der Großteil der endemisch antarktischen Artedidraconiden, Bathydraconiden und einige Notothenioiden, ebenso wie die arktischen Cottiden. Wohingegen der *polar* Typ (Gruppe 3), *polar träge, nicht spezialisierte* Arten mit

einem relativ geringen Metabolismus, wie beispielsweise die Zoarciden, darstellt (aus Hubold, 1991).

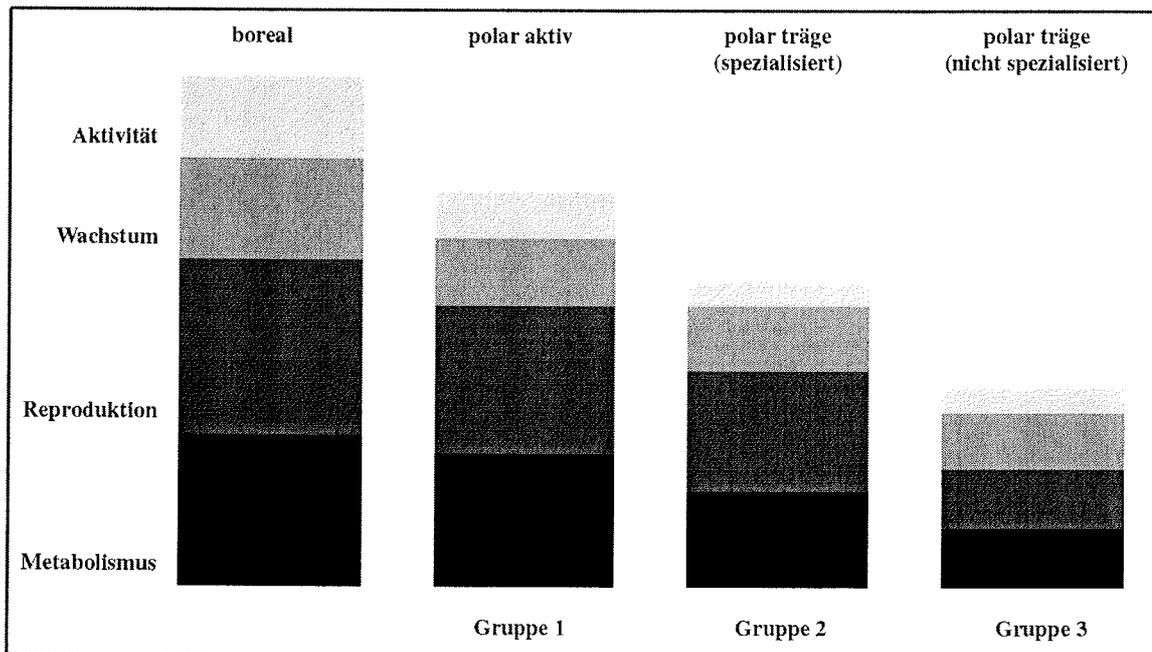


Abb. 1.1 Einteilung polarer Fische in verschiedene Metabolismustypen nach Clarke (1980) im Vergleich zum Stoffwechsel borealer Fische Erklärung siehe Text

Versuchstiere: Aalmuttern (Zoarcidae)

Nach Anderson (1994) fand die Entstehung zoarcider Fische zur Zeit des Eozäns (55 bis 43 Millionen Jahre) im Bereich des Nord-Pazifiks statt, und ihre Verbreitung entlang der Westküste des amerikanischen Kontinents wird im frühen Miozän (35 bis 22 Millionen Jahre) vermutet. In der heutigen Zeit besiedeln sie auch die polaren Gebiete und die Hydrothermalquellen des Pazifiks, in dem Rosenblatt und Cohen (1986) zwei neue Aalmutterarten beschreiben konnten. Es gibt ungefähr 220 Arten dieser Familie, von denen der Großteil hauptsächlich im Nord-Pazifik oder Nord-Atlantik vorkommt. Für den Südlichen Ozean (Antarktis) sind bis jetzt 22 Arten bekannt, von denen der endemische Anteil mit 65% besonders hoch ist (Anderson, 1990).

Die hier untersuchte eurytherme Art *Zoarces viviparus* (Abb. 1.2) der nördlichen Hemisphäre lebt in küstennahen Bereichen in hauptsächlich arktisch-borealen Gewässern. Ihre südliche Verbreitungsgrenze liegt im Wattenmeergebiet der Nordsee. Die Paarung findet zwischen

August und September statt und nach einer Tragzeit von etwa 4 Monaten werden 30 bis 400 Junge geboren (vivipar). Aufgrund ihrer benthischen Lebensweise setzt sich das Nahrungsspektrum von *Z. viviparus* vorwiegend aus Würmern, Weichtieren und kleinen Fischen zusammen (Muus, 1978). Die untersuchten Exemplare dieser Arbeit wurden in der Kieler Bucht der Ostsee gefangen, in der die jahreszeitlichen Wassertemperaturen zwischen 0 und 14°C schwanken (Dippner, 1999).

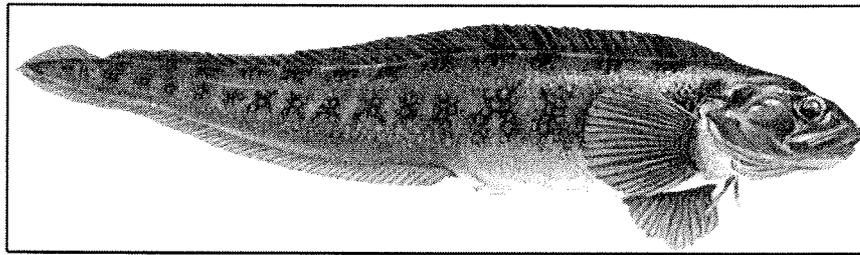


Abb. 1.2 *Zoarces viviparus* und ihre geographische Verbreitung entlang der Küstenlinien Nordeuropas (verändert nach Muus, 1978)

Die in der Arbeit untersuchte antarktische Aalmutterart *Pachycara brachycephalum* (Zoarcidae) (Abb. 1.3) hat aufgrund der konstant niedrigen Temperaturverhältnisse (-1,9 bis 1°C) des Südlichen Ozeans eine streng stenotherme Lebensweise. Ihre Verbreitung ist zirkumantarktisch an küstennahen Hängen in einer Tiefe von 200 bis 1810 Metern und *P. brachycephalum* ernährt sich wie *Z. viviparus* vorwiegend von Würmern, Muscheln und Schnecken (Anderson, 1990). Die Tiere für diese Arbeit stammen aus dem Gebiet bei King George Island.

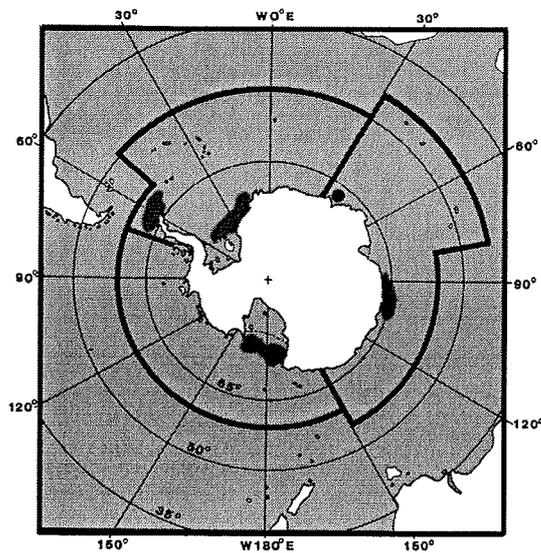
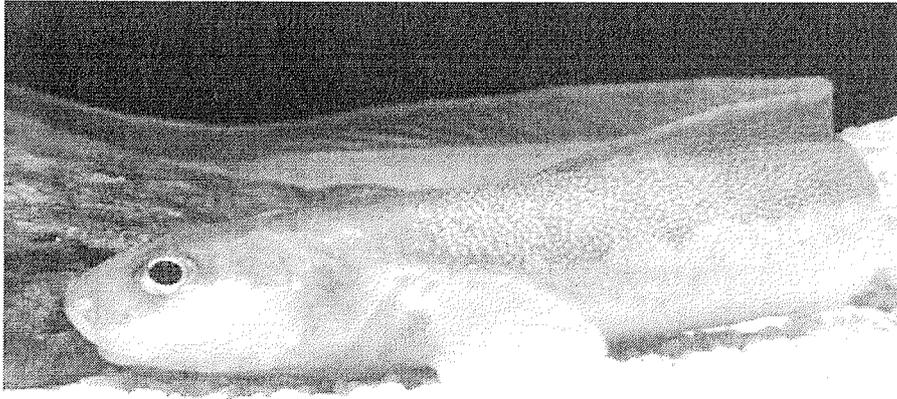


Abb. 3 *Pachycara brachycephalum* und ihre nachgewiesenen Verbreitungsgebiete in den antarktischen Gewässern (verändert nach Anderson, 1990)

Fragestellung

In früheren Arbeiten zur *metabolic cold adaptation* polarer Organismen wurden oft die unterschiedlichen Ökotypen der untersuchten Arten (pelagisch - benthisch und aktiv - träge) zu wenig berücksichtigt. Dies wurde unter anderem von Clarke (1983) kritisiert, da bei Fischen die Lebensweise und Stoffwechselrate in engem Zusammenhang steht. Aus diesem Grund sollten in dieser Arbeit die oben genannten Arten *Zoarces viviparus* (eurytherm) und *Pachycara brachycephalum* (stenotherm) untersucht werden, die sich in ihrer Lebensweise stark ähneln. In Zusammenhang mit einer Kälteadaptation der antarktischen Art sollte überprüft werden, durch welche mitochondriale Ausstattungen die beiden Arten an ihre jeweilige Habitatterperatur angepaßt sind.

Zu diesem Zweck wurde der Einfluß der Temperatur auf die mitochondriale Respiration isolierter Lebermitochondrien der eurythermen Art *Zoarces viviparus* unter Verwendung verschiedener Substrate (Succinat und Pyruvat + Malat) untersucht. Aufgrund von unerwarteten Schwierigkeiten bei den mitochondrialen Respirationsversuchen mit *P. brachycephalum* war es im Zeitraum dieser Arbeit nicht möglich, eine Aussage über einen Unterschied in der temperaturabhängigen Respiration isolierter Mitochondrien der beiden Arten zu treffen.

Neben den mitochondrialen Respirationseigenschaften wurde der Temperatureinfluß auf die Enzymaktivität der mitochondrialen Citratsynthase gemessen, um auf eine Kälteadaptation der oxidativen Kapazität polarer Mitochondrien schließen zu können.

Zudem wurde der mitochondriale Proteingehalt der Leber beider Arten bestimmt, um Aussagen über eine mögliche kälteinduzierte Mitochondrien-Proliferation, wie sie für Muskelgewebe nachgewiesen wurde, auch für die Leber einer antarktischen Art treffen zu können.

Folgende Fragen sollten in dieser Arbeit behandelt werden:

1. Welche Abhängigkeit besteht zwischen der Temperatur und der mitochondrialen Respiration bei der Verwendung unterschiedlicher Substrate ?
2. Lassen sich Unterschiede in der Enzymaktivität der Citratsynthase in Abhängigkeit von der Temperatur bei Zoarciden verschiedener Verbreitungsgrenzen im Sinne einer Kälteadaptation erkennen ?
3. Trifft die kälteinduzierte Mitochondrien-Proliferation auch für die wenig untersuchte Leber zu ?

2 Material und Methoden

2.1 Versuchstiere

Die aus der Ostsee stammenden Exemplare von *Zoarces viviparus* wurden in der Kieler Bucht von der Firma Butt (Strande, Kiel) mittels Reusen gefangen und nach Überführung im Aquarium des Alfred-Wegener-Instituts (AWI) bei einem Tag-Nacht-Zyklus von 12 Stunden gehältert. Die Becken waren mit natürlichem Seewasser aus der Nordsee gefüllt, welches mittels Leitungswasser verdünnt, eine Salinität von 17‰ und eine Wassertemperatur von $10 \pm 1^\circ\text{C}$ hatte. Die Fütterung der Tiere erfolgte jede Woche mit lebenden Nordseekrabben *Crangon crangon*, die aus dem benachbarten „Zoo am Meer“ stammten.

Die antarktischen Exemplare der Art *Pachycara brachycephalum* wurden während der Expedition ANT XV / 3 des deutschen Forschungsschiffes Polarstern im März 1998 mit beköderten Reusen bei King George Island gefangen ($62^\circ 11,2 \text{ S } 58^\circ 15,2 \text{ W}$, Tiefe: 455m und $62^\circ 10,9 \text{ S } 58^\circ 20,8 \text{ W}$, Tiefe: 397m). An Bord fand die Hälterung der Tiere im Aquariumcontainer bei einer Temperatur von $0 \pm 1^\circ\text{C}$ statt, dessen Becken Seewasser der Region enthielten. Im Institut entsprachen die Hälterungsbedingungen der von *Z. viviparus*, wobei die Wassertemperatur bei $0 \pm 1^\circ\text{C}$ und die Salinität bei 32‰ lag. In der nachfolgenden Tabelle 2.1.1 sind die Daten der Versuchstiere zusammengefaßt dargestellt.

Tab. 2.1.1 Zusammenfassung der Versuchstier-Daten

| Art: | Fangzeit: | Hälterung im AWI: | Versuch: |
|--------------------------|----------------|-------------------|----------------------------|
| <i>Z. viviparus</i> | September 1998 | seit Oktober 1998 | Mitochondriale Respiration |
| | | | Lipidgehalt |
| | August 1999 | seit August 1999 | Citratsynthase-Aktivität |
| | | | Lipidgehalt |
| <i>P. brachycephalum</i> | März 1998 | seit Juni 1998 | Citratsynthase-Aktivität |
| | | | Lipidgehalt |

2.2 Analysen

2.2.1 Mitochondriale Respiration

2.2.1.1 Isolierung der Mitochondrien

Pro Meßtag wurde ein Fisch mit dem Betäubungsmittel MS222 anästhetisiert (*Z. viviparus* : 0,3 g / l; *P. brachycephalum* : 0,5 g / l) und nach der schnell durchgeführten Präparation der Leber mit einem Genickschnitt getötet. Für mitochondriale Untersuchungen ist die Leber ein geeignetes Gewebe, da sie mit 1000 bis 2000 Mitochondrien pro Leberzelle eine hohe mitochondriale Dichte besitzt. Das Gewebe wurde in eine eisgekühlte Plastikschaale mit Homogenisationspuffer⁺ (HO⁺: 50 mM Hepes, 85 mM KCl, 80 mM Saccharose, 50 mM EDTA, 5 mM EGTA, 1% (w/v) BSA, 1 µl / ml Aprotinin, pH 7,1) überführt (ca. 1 g Leber / 30 ml Puffer), mit Scheren kleingeschnitten und mit einem Teflon-Pistill und 30 ml Glas-Potter vom Typ Potter-Elvehjem Homogenisator ca. 5 min bei niedrigster Umdrehungszahl extrahiert. Die erste Zentrifugation, zur Sedimentierung der Zelltrümmer, erfolgte mit einer auf 0°C vorgekühlten Zentrifuge (Sigma, Osterode am Harz, Deutschland) bei einer Geschwindigkeit von 300 g und einer Dauer von 12 min. Nach Überführung des Überstands in gekühlte Zentrifugenröhrchen und Lagerung auf Eis wurde das Pellet mit 30 ml HO⁺ rehomogenisiert und erneut bei 300 g für 12 min zentrifugiert, um die Ausbeute an Mitochondrien zu erhöhen. Beide Überstände wurden dann für 8 min bei 9500 g zentrifugiert, um die im Überstand befindenden Mitochondrien zu sedimentieren. Die Resuspendierung des mitochondrialen Pellets erfolgte mit 2 ml Assaymedium⁺ (AM⁺: 50 mM Hepes, 80 mM KCl, 80 mM Saccharose, 5 mM KH₂PO₄, 1% (w/v) BSA, 1 µl / ml Aprotinin, pH 7,1). Hierbei wurde darauf geachtet Luftblasen zu vermeiden, da diese die Mitochondrien beschädigen können und somit deren Qualität negativ beeinflussen. Die mitochondriale Suspension (M-Suspension) wurde für die anschließenden Respirationmessungen auf Eis gelagert.

2.2.1.2 Mitochondriale Respiration

Meßprinzip:

Der mitochondriale Sauerstoffverbrauch bei verschiedenen Temperaturen wurde in einer temperierbaren Glaskammer mit einer PO_2 -Elektrode der Firma Eschweiler (Kiel, Deutschland) vom Typ Clarke über ein PO_2 -Pikoampère Meßgerät (Eschweiler) gemessen und mit einem Schreiber der Firma Kipp & Zonen aufgezeichnet. Die Temperierung der Kammer erfolgte über ein verbundenes Thermostat vom Typ FP30 der Firma Julabo Labortechnik (Seelbach/Schwarzwald, Deutschland). Einen Überblick der Versuchsanlage zeigt Abb. 2.2.1.

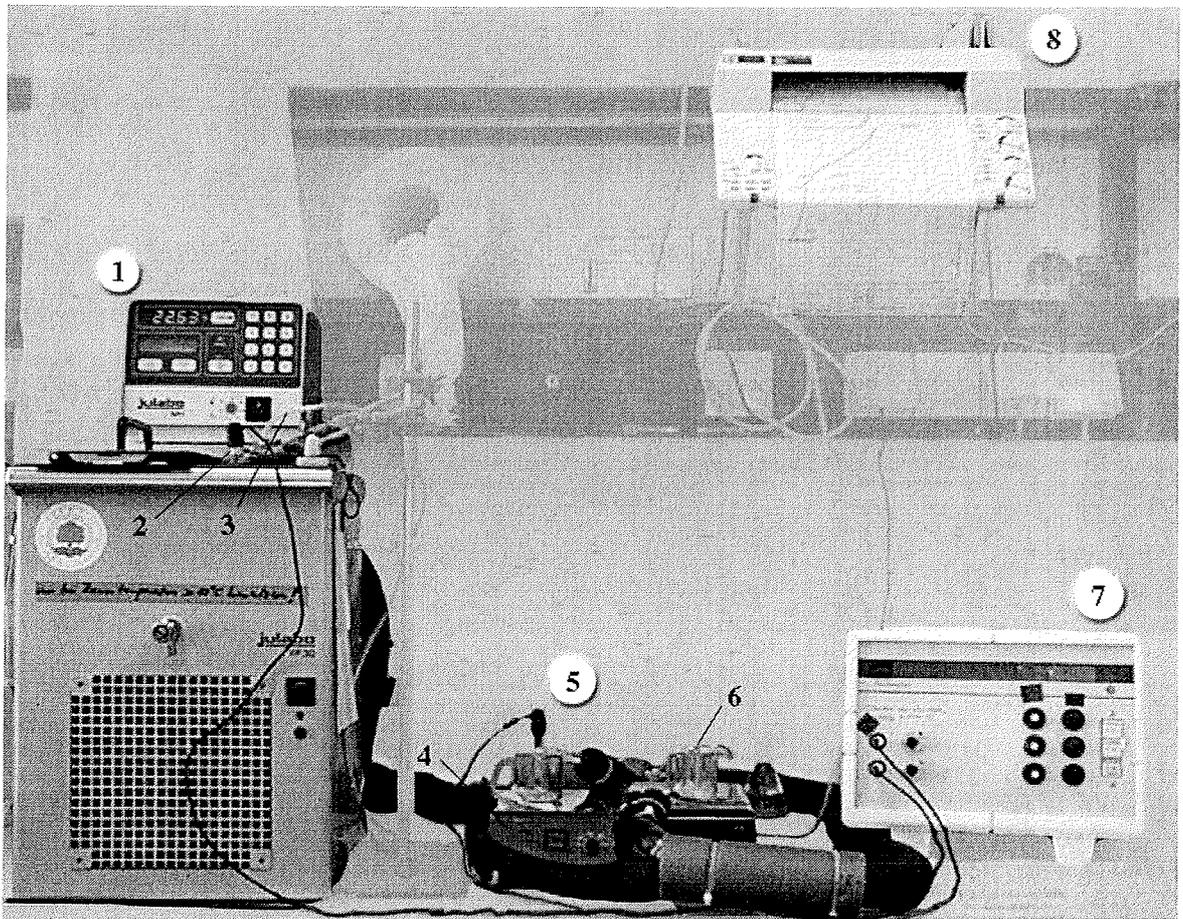


Abb. 2.2.1 Darstellung des Versuchsaufbaus

(1 : Thermostat, 2 : Elektrode in temperierter Na_2SO_3 -Lösung, 3 : Schlauch zur Belüftung des temperierten Assaymediums, 4 : Magnetrührer, 5 : PO_2 -Elektrode in der Meßkammer, 6 : zweite Glaskammer zur Temperierung der Elektrode, 7 : PO_2 -Pikoampère Meßgerät, 8 : Schreiber)

Die Einstellung der jeweiligen Meßtemperatur erfolgte mit einer Abweichung von $\pm 0,3^\circ\text{C}$. Für eine homogene Mischung des Mediums während der Messung sorgte ein Magnetstab mit ca. 350 Umdrehungen pro Minute, angetrieben durch einen Magnetrührer vom Typ Mini MR 1 basic der Firma IKA Labortechnik (Staufen, Deutschland) (s. Abb. 2.2.2).

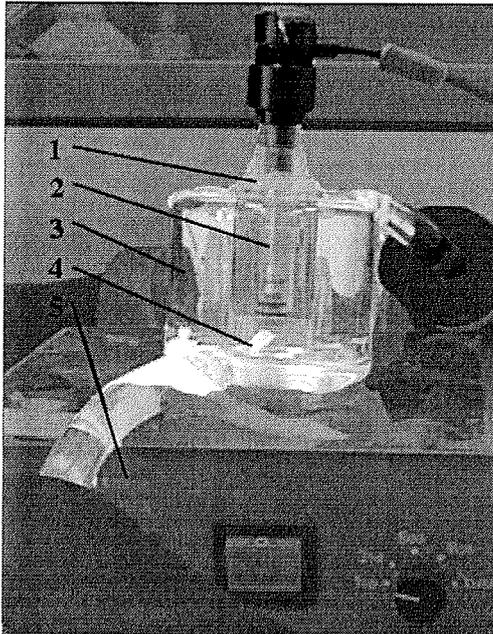


Abb. 2.2.2 Sauerstoff-Elektrode in der Meßkammer

(1 : Kunststoffgehäuse der Elektrode, 2 : PO_2 -Elektrode vom Typ Clarke, 3 : temperierbare Glaskammer, 4 : Magnetstab, 5 : Magnetrührer

Durchführung:

Die Eichung der Elektrode erfolgte bei der jeweiligen Temperatur mit gesättigter Na_2SO_3 -Lösung für 0%- und mit ständig belüftetem Assaymedium (AM^+ ohne BSA und Aprotinin) für 100%-Luftsättigung, wobei für die Bestimmung der Elektrodendrift eine Aufzeichnung von 5 min vorgenommen wurde. Der Sauerstoffpartialdruck in der Kammer wurde pro Meßtag anhand des Barometerdrucks nach folgender Formel ermittelt:

$$\text{PO}_2 = (\text{P}_b - \text{PH}_2\text{O}) \cdot 0,209$$

- PO_2 : Sauerstoffpartialdruck (Torr)
 P_b : Barometerdruck (Torr)
 PH_2O : Wasserdampfdruck bei der jeweiligen Meßtemperatur (Torr)
 0,209 : fraktioneller Anteil von Sauerstoff an trockener Luft.

Die Messungen erfolgten bei den Temperaturen 1° , 3° , 5° , 10° , 15° , 20° , 25° und 30°C . Dazu wurden $100 \mu\text{l}$ M-Suspension in die Kammer gegeben, die neben Assaymedium⁺

5 μM Ap5A, einen Inhibitor der Myokinase, und Substrat (3,3 mM Succinat bzw. 3,2 mM Pyruvat + 0,5 mM Malat) enthielt. Nach Zupipettieren von ADP (Endkonzentration 0,3 mM) erfolgte das Aufzeichnen der oxidativen Phosphorylierung (state III Respiration), die nach der Phosphorylierung des zugegebenen ADPs in die state IV Respiration überging. Die angegebenen Molaritäten beziehen sich auf das Endvolumen von 1 ml. Nach ca. 5 min state IV Respiration wurde Oligomycin, ein Inhibitor der mitochondrialen F_0F_1 -ATPase, in einer Endkonzentration von 2 $\mu\text{g} / \text{ml}$ zugegeben, und der Sauerstoffverbrauch (state IV_{o_1} Respiration) für weitere 5 min aufgezeichnet.

Bei den Respirationmessungen mit Pyruvat + Malat als Substrat erfolgte die Zugabe von ADP und Oligomycin mittels Hamilton-Spritzen (50 μl Volumen). Dadurch vereinfachte sich die Messung bei den hohen Temperaturen, bei denen die Herausnahme der Elektrode aufgrund der wärmebedingten Ausdehnung des Elektrodenträgers erschwert war. Bei den niedrigen Temperaturmessungen (1° bis 5°C) wurden statt 100 μl 200 μl M-Suspension und nur 10 μl ADP (entspricht einer Endkonzentration von 0,12 mM) zugegeben, um die Messung innerhalb von 30 min durchführen zu können. Es wurde jedoch darauf geachtet, daß die Messungen noch im Sättigungsbereich abliefen. Die Messungen wurden innerhalb von 7 bis 8 Stunden beendet, da die Qualität der isolierten Mitochondrien nach diesem Zeitraum merklich abnahm.

Auswertung:

Zum leichteren Verständnis der nachfolgenden Berechnungen ist eine Skizze einer Schreiberaufzeichnung dargestellt (Abb. 2.2.3).

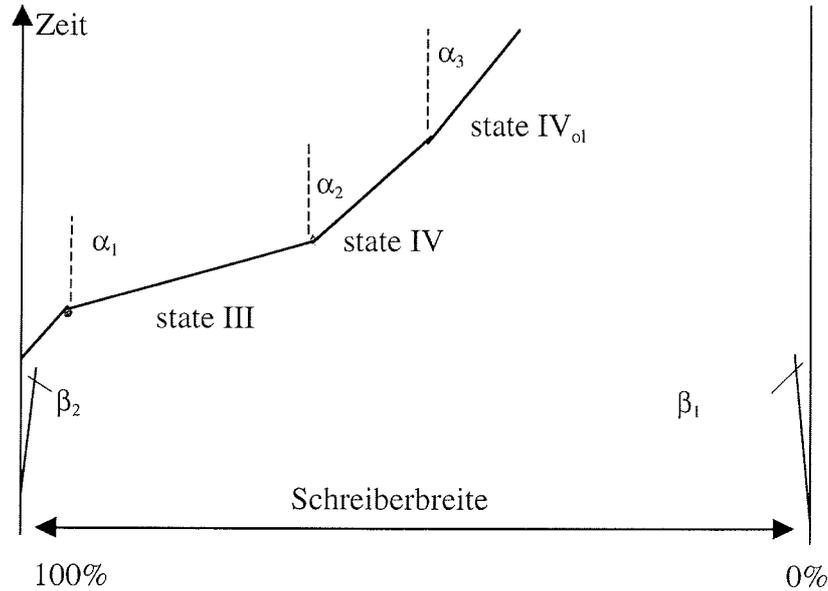


Abb. 2.2.3 schematische Skizze einer Schreiberaufzeichnung

β_1, β_2 : Winkel der Elektrodendrift bei der jeweiligen Eichung ($^\circ$)

$\alpha_1, \alpha_2, \alpha_3$: Winkel des jeweiligen respiratorischen Zustands ($^\circ$)

Mittels eines Geodreiecks wurden die Winkel $\beta_1, \beta_2, \alpha_1, \alpha_2, \alpha_3$ bestimmt und anschließend der Tangens berechnet. Die Tangens-Werte wurden um die Elektrodendrift, die Einstellung des Schreibers (range und Geschwindigkeit) und die Volumenzugabe von M-Suspension und ADP folgendermaßen korrigiert:

$$\tan \alpha_{\text{kor}} = (\tan \alpha - \tan \beta_1 - \tan \beta_2) \cdot K_{Fs}$$

K_{Fs} : Korrekturfaktoren für die oben genannten Punkte.

Für die Berechnung der Sauerstoffverbrauchswerte wurden die korrigierten Tangens-Werte der mitochondrialen Respirationsraten in folgende Formel eingesetzt:

$$\dot{M}O_2 = \frac{\tan \alpha \cdot v_S \cdot V_{Ka} \cdot \text{range}_2 \cdot \beta_{O_2}}{\text{range}_1 \cdot c_M}$$

$\dot{M}O_2$: Sauerstoffverbrauch ($\text{nmol } O_2 \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ mitochondrialem Protein)

v_S : Schreibergeschwindigkeit ($\text{cm} \cdot \text{min}^{-1}$)

V_{Ka} : Volumen der Kammer (l)

β_{O_2} : O_2 -Löslichkeitskoeffizient im AM bei Meßtemperatur ($\mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{Torr}^{-1}$)

range_1 : Schreiberbreite ($\text{cm} \cdot \%^{-1} O_2$)

range_2 : Schreiberbreite ($\text{Torr} \cdot \%^{-1} O_2$)

c_M : mitochondriales Protein (mg)

Bestimmung des mitochondrialen Kopplungsgrads:

Der mitochondriale Kopplungsgrad (RCR = **R**espirations**C**ontrol**R**atio) gibt Aufschluß über die Qualität der isolierten Mitochondrien. Er ist das Verhältnis der Respirationsrate in Anwesenheit von Substrat und ADP (state III) zu der Respirationsrate, nachdem das ADP phosphoryliert (state IV) bzw. nachdem die F_0F_1 -ATPase gehemmt (state IV_{ol}) wurde.

Die Berechnung hierfür lautet:

$$\text{RCR} = \frac{\dot{M}O_2 \text{ (state III)}}{\dot{M}O_2 \text{ (state IV)}}$$

$$\text{bzw. RCR}_{ol} = \frac{\dot{M}O_2 \text{ (state III)}}{\dot{M}O_2 \text{ (state IV}_{ol}\text{)}}$$

Bei Fischmitochondrien deuten Werte über 7 auf intakte und somit gut gekoppelte Mitochondrien hin, wohingegen niedrigere Werte für eine schlechte Qualität zeugen. Jedoch ist eine gewisse Abhängigkeit des Kopplungsgrads vom verwendeten Substrat vorhanden. Substrate, die bei niedrigen Respirationsraten oxidiert werden, haben eine niedrige state III Respirationsrate und somit niedrige RCR- bzw. RCR_{ol}-Werte (Ballantyne, 1994).

Bestimmung der Q_{10} -Werte, der Aktivierungsenergien und möglicher *Arrhenius Break Temperaturen*:

Der Q_{10} gibt den Faktor an, um welchen die Geschwindigkeit einer Reaktion bei einer Temperaturzunahme um 10°C erhöht wird. Seine Berechnung erfolgt mit folgender Formel:

$$Q_{10} = \left(\frac{\dot{M}O_{2T_2}}{\dot{M}O_{2T_1}} \right)^{\frac{10}{T_2 - T_1}}$$

$\dot{M}O_{2T_1}$: Sauerstoffverbrauch bei T_1 (nmol $O_2 \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ mitochondrialem Protein)

$\dot{M}O_{2T_2}$: Sauerstoffverbrauch bei T_2 (nmol $O_2 \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ mitochondrialem Protein)

T_1, T_2 : Meßtemperatur (K)

Die Aktivierungsenergie (E_a), ein Maß für den zum Starten der Reaktion nötigen Energiebetrag, erhält man über die Darstellung der Sauerstoffverbrauchswerte mittels des Arrhenius-Plots. Er ergibt sich durch das Auftragen der ln-transformierten $\dot{M}O_2$ -Werte gegen die inverse absolute Temperatur. Anhand der Steigung der Regressionsgeraden wurde dann die Aktivierungsenergie nach einer modifizierten Formel von Segel (1976) berechnet.

$$E_a = -R \cdot m$$

- E_a : Aktivierungsenergie ($J \cdot mol^{-1}$)
R: Gaskonstante ($J \cdot mol^{-1} \cdot K^{-1}$)
m: Steigung.

Diese Darstellungsweise eignet sich ebenfalls zur Bestimmung möglicher Temperatureffekte auf mitochondriale Funktionen, indem der Arrhenius-Plot auf Diskontinuitäten seiner Steigung analysiert wird. Mittels einer Regressionsanalyse kann somit eine mögliche *Arrhenius Break Temperatur* (ABT) ermittelt werden.

2.2.1.3 Bestimmung des Proteingehalts

Meßprinzip:

Für die Bestimmung des Proteingehalts wurde die gegenüber der Biuret Methode (Gornall *et al.*, 1949) sensitivere Coomassie brilliant blue Methode nach Bradford (1976) angewandt. Die Messung wurde mittels eines Spektrophotometers (Pharmacia, LKB Biochrom 4060, Uppsala, Schweden) durchgeführt und beruht auf der Verschiebung des Absorptionsmaximum einer sauren Coomassie Blue-Lösung nach Bindung an Proteine von 465 auf 595 nm.

Durchführung:

Nach der Präparation wurden jeweils 50-100 μ l M-Suspension und 200 μ l Assaymedium⁺ bei $-20^\circ C$ eingefroren, um nach Beendigung der Respirationsversuche den Proteingehalt der Proben zu ermitteln. Nach Erstellen einer Eichgerade mit reinem BSA, wurden die aufgetauten Proben 1:200 mit 0,9% NaCl verdünnt und davon jeweils 100 μ l in Kunststoffküvetten mit vorher filtrierter 1 ml Coomassie Blue-Lösung (20 mg Coomassie

Blue brilliant G-250 + 10 ml reinem Ethanol + 20 ml H_3PO_4 (85%) auf 200 ml mit destillierten H_2O aufgefüllt) gegeben. Nach kurzem Rühren mit einem Plastikspatel und einer Wartezeit von 10 min konnte dann die Messung vorgenommen werden. Über einen angeschlossenen Computer wurden die gemittelten Werte der jeweils dreifach durchgeführten Messung in einer Konzentration von μg Protein / 100 μl , festgelegt über die Eichreihe, ermittelt.

Auswertung

Der Proteingehalt wurde mit folgender Formel berechnet:

$$c_M = \frac{(c_{MP} - c_{AM+P}) \cdot V_M}{FG_L}$$

- c_M : mitochondrialer Proteingehalt ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ Frischgewicht)
- c_{MP} : Proteingehalt der M-Suspension ($\mu\text{g} \cdot 100 \mu\text{l}^{-1}$)
- c_{AM+P} : Proteingehalt des AMs^+ ($\mu\text{g} \cdot 100 \mu\text{l}^{-1}$)
- V_M : Volumen der M-Suspension (μl)
- FG_L : Frischgewicht der Leber (g)

2.2.1.4 Bestimmung des P/O – Verhältnisses

Mit der Menge an Sauerstoff, die zur Phosphorylierung einer bekannten Menge an ADP verbraucht wird, läßt sich das Verhältnis von Phosphat zu Sauerstoff (kurz P/O) ermitteln. Hierfür kamen in dieser Arbeit zwei Methoden zur Anwendung. Zum einen die klassische Methode, bei der die eingesetzte ADP-Stoffmenge durch den Sauerstoffverbrauch dividiert wird, zum anderen die Methode, bei der mittels einer luminometrischen Messung die produzierte ATP-Konzentration ermittelt wurde, welche statt der ADP-Stoffmenge in die Berechnung einging.

2.2.1.4.1 Auswertung nach der klassischen Methode

Anhand der Schreiberaufzeichnung wurde der Sauerstoffverbrauch während der state III Respiration ermittelt.

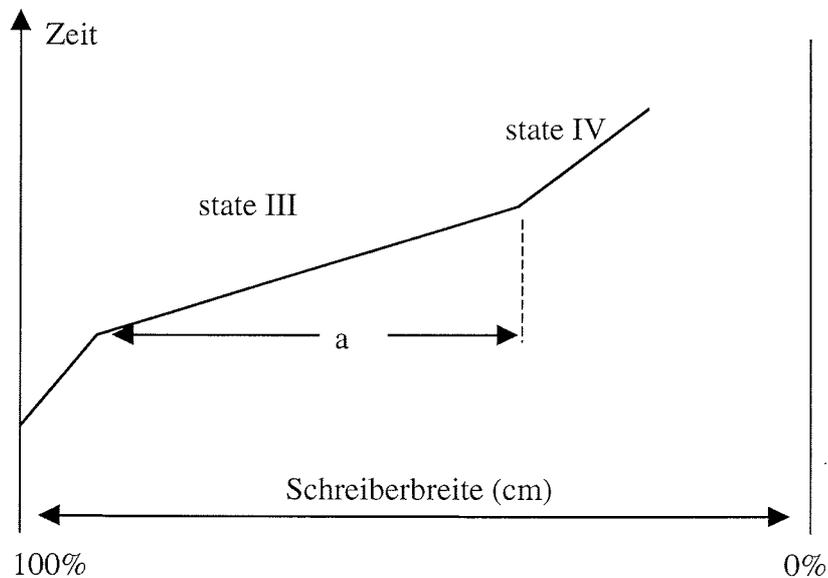


Abb. 2.2.4 Schematische Skizze einer Schreiberaufzeichnung Erklärung siehe Text

Nach Ausmessen der Strecke a (Abb. 2.2.4), wurde der Wert in nachfolgende Formel eingesetzt und somit der Sauerstoffverbrauch der oxidativen Phosphorylierung einer bekannten Menge an ADP berechnet.

$$\Pi O_2 = \frac{a}{\text{range}_1} \cdot \text{range}_2 \cdot \beta_{O_2} \cdot V_{Ka} \cdot 2$$

ΠO_2 : absoluter Sauerstoffverbrauch (nmol O)

a : Sauerstoffverbrauch von state III (cm)

range_1 : Schreiberbreite ($\text{cm} \cdot \%^{-1} O_2$)

range_2 : Schreiberbreite ($\text{Torr} \cdot \%^{-1} O_2$)

β_{O_2} : O_2 -Löslichkeitskoeffizient von AM bei Meßtemperatur ($\mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{Torr}^{-1}$)

V_{Ka} : Volumen der Kammer (l)

2: Umrechnungsfaktor auf atomaren Sauerstoff

Die Stoffmenge des umgesetzten ADP ergab sich aus dessen Konzentrationszugabe. Durch Einsetzen beider Werte in folgende Formel, erhielt man das effektive P/O-Verhältnis.

$$P/O = \frac{c_{ADP}}{\Pi O_2}$$

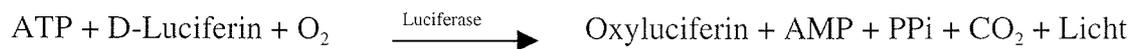
c_{ADP} : Stoffmenge des zugegebenen ADP (nmol P)

ΠO_2 : absoluter Sauerstoffverbrauch (nmol O)

2.2.1.4.2 Methode mittels luminometrischer Messung der ATP-Produktion

Meßprinzip:

Diese Methode basiert auf der Biolumineszenz-Technik, bei der eine stabile Lichtmenge gemessen wird, die durch nachfolgende Reaktion produziert wird.



Die Auswertung der Messung erfolgte anhand von Schreiberaufzeichnungen.

Durchführung:

Die Eichung des Luminometers (1250 Luminimeter von Bio Orbit, Finnland) mit ATP-Standard (Bio Orbit) erfolgte an jedem Meßtag. Für die Messung wurden bei jeder Meßtemperatur während der state III Respiration, in einem geeigneten zeitlichen Abstand, zweimal 10 µl Probe (Probe I und II) mittels einer Hamilton-Spritze (50 µl Volumen) abgenommen und in ein Eppendorf-Gefäß (2 ml Volumen) mit 990 µl Tris-Puffer (0,1 M Tris-Acetat Puffer + 2 mM EDTA, pH 7,75) überführt. Nach kurzem Erhitzen (etwa 2 min) in einem Wasserbad ($95^\circ\text{C} < T < 100^\circ\text{C}$) zur Deaktivierung der ATPase, wurden die Proben kurzfristig auf Eis gelagert. Für die Messung wurde ein Probevolumen von 10 µl in eine spezielle Küvette (Typ 2174-086 von Clinicon) mit 790 µl Tris-Puffer und 200 µl Monitoring Reagenz gegeben und kurz gerührt.

Bei der Abnahme der Proben wurde der jeweilige Sauerstoffgehalt in der Kammer notiert, wodurch sich der Sauerstoffverbrauch mit nachfolgender Formel ermitteln ließ.

Auswertung:

Berechnungsformel für den Sauerstoffverbrauch:

$$\Pi\text{O}_2 = \left(P_{\text{O}_{21}} - P_{\text{O}_{22}} \right) \cdot \beta_{\text{O}_2} \cdot V_{\text{Ka}} \cdot 2$$

ΠO_2 : absoluter Sauerstoffverbrauch (nmol O_2)

$P_{\text{O}_{21}}$: Sauerstoffpartialdruck bei der ersten Abnahme (Torr)

$P_{\text{O}_{22}}$: Sauerstoffpartialdruck bei der zweiten Abnahme (Torr)

β_{O_2} : Löslichkeitskoeffizient von O_2 im AM ($\mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{Torr}^{-1}$)

V_{Ka} : Volumen der Meßkammer (l)

2: Umrechnungsfaktor auf atomaren Sauerstoff.

Die Auswertung der produzierten ATP-Stoffmenge erfolgte mit der Formel:

$$c_{\text{ATP}} = (X_2 - X_1) \cdot c_E$$

- c_{ATP} : Stoffmenge des produzierten ATP (nmol P)
 X_2 : luminometrischer Meßwert der zweiten Abnahme (cm)
 X_1 : luminometrischer Meßwert der ersten Abnahme (cm)
 c_E : jeweilige Eichung (nmol P · 10⁻⁵ · cm⁻¹).

Zur Berechnung des effektiven P/O-Verhältnisses gingen beide Werte in folgende Formel ein.

$$P/O = \frac{c_{\text{ATP}}}{\Pi O_2}$$

- c_{ATP} : Stoffmenge des produzierten ATP (nmol P)
 ΠO_2 : absoluter Sauerstoffverbrauch (nmol O)

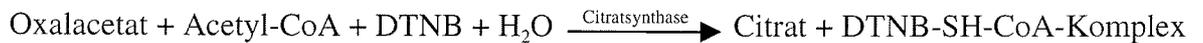
2.2.2 Messung der spezifischen Citratsynthase-Aktivität

Die Citratsynthase ist neben Enzymen wie Cytochrom-Oxidase oder Glutamat-Dehydrogenase ein Markerenzym für Mitochondrien (Ballantyne, 1994). Als Markerenzym wird ein Enzym bezeichnet, das spezifisch in einem Zellorganell lokalisiert ist und zu dessen Charakterisierung dienen kann. Citratsynthase katalysiert die Bildung von Citrat im Citratzyklus und ist in der mitochondrialen Matrix lokalisiert.

Die Messung diente zum einen der Untersuchung unterschiedlicher Enzymausstattungen der Lebermitochondrien der beiden Arten *Z. viviparus* und *P. brachycephalum*, infolge einer Kälteadaptation der antarktischen Aalmutter, zum anderen konnte damit eine genauere Ermittlung des mitochondrialen Proteingehalts der Leber vorgenommen werden.

Meßprinzip:

Die Messung der Citratsynthase-Aktivität wurde an einem mittels angeschlossenen Thermostat (Julabo) temperierbaren Spektrophotometer (DU 7400, Beckmann, München, Deutschland) nach einer modifizierten Anleitung von Sidell *et al.* (1987) durchgeführt. Ihr liegt folgende Reaktion zugrunde:



DTNB bildet mit aliphatischen Schwefelgruppen einen Farbkomplex, der bei einer Wellenlänge von 412 nm stark absorbiert. Die Zunahme der Absorption ist proportional zum umgesetzten Substrat und kann damit zur Quantifizierung der Enzymaktivität herangezogen werden.

Durchführung:

Die Präparation der Leber und Isolierung der Mitochondrien wurde wie in 2.2.1.1 beschrieben durchgeführt, allerdings mit einigen Veränderungen. Aufgrund des geringeren Anspruchs an die mitochondriale Proteingehaltsausbeute und aus methodischen Einschränkungen entfiel die zweite Zentrifugation bei 300 g und 12 min. Außerdem erfolgte die Zentrifugation mit einer Ultrazentrifuge (Model L7 der Firma Beckman Instruments, München, Deutschland), da die Zentrifuge der Firma Sigma für eine Expedition benötigt worden war. Die Resuspendierung des mitochondrialen Pellets erfolgte mit Assaymedium ohne BSA. Durch die weitere Verarbeitung der Suspension mit 5minütiger Behandlung (output control 8, Duty cycle 50%) mit einem auf 0°C temperierten Branson Sonifier 450 der Firma G. Heinemann (Ultraschalltechnik, Schwäbisch Gmünd, Deutschland) veränderte sich die BSA-Konzentration und störte die Proteinbestimmung. Die anschließende Zentrifugation (7400 g für 5 min mit einer Eppendorf Zentrifuge vom Typ 5402, Hamburg, Deutschland) diente zur Sedimentierung der Zellfragmente und der Citratsynthase enthaltende Überstand wurde für die weitere Messung auf Eis gelagert.

Für die Messung der Citratsynthase-Aktivität pro Gramm Leber („maximale“ Citratsynthase-Aktivität), die zur Berechnung des mitochondrialen Proteingehalts diente, wurden während der Präparation Stücke der kleingeschnittenen Leber (Summe zwischen 0,25g bis 0,965g Frischgewicht) abgenommen und zu eisgekühltem Homogenisationspuffer ohne BSA gegeben (Volumen 5 bis 10 ml). Diese Leberstücke wurden zeitlich parallel zur Mitochondrienpräparation bei hoher Umdrehungszahl mit dem Ultra-Turrax T8 (IKA Labortechnik) in einem Glasgefäß homogenisiert. Von dem Extrakt

wurden jeweils 1 bis 2 ml in Eppendorf-Gefäße pipettiert und wie die mitochondriale Suspension mittels Branson Sonifier 450 und anschließender Zentrifugation aufbereitet (siehe oben).

In einer Plastikkuvette wurden 750 μl 100 mM Tris-HCl (pH 8,0), 50 μl 5 mM DTNB, 20 μl 20 mM Acetyl-CoA und 160 μl (H_2O + Probe) zusammenpipettiert und mit einem Plastikspatel gut verrührt. Nach Beginn der Messung wurde das Einstellen einer konstanten Extinktion abgewartet, und dann die Reaktion mit 20 μl 20 mM Oxalacetat gestartet.

Die Messung der Citratsynthase-Aktivität isolierter Lebermitochondrien wurde bei den Temperaturen 0°, 3°, 6°, 9°, 12°, 15°, 18°, 21°, 25° und 30°C durchgeführt. Die „maximale“ Citratsynthase-Aktivität wurde nur bei 25°C gemessen.

Auswertung:

Die Berechnung der Citratsynthase-Aktivität erfolgte mit einer nach dem Lambert-Beerschen Gesetz hergeleiteten Formel:

$$E_A = \frac{\Delta E}{\Delta t} \cdot \frac{V_{\text{Kü}}}{\varepsilon \cdot d \cdot V_p} \cdot \frac{V_{\text{Suspension}}}{c_{\text{M-Protein}}}$$

$$\text{bzw. } E_A = \frac{\Delta E}{\Delta t} \cdot \frac{V_{\text{Kü}}}{\varepsilon \cdot d \cdot V_p} \cdot \frac{V_{\text{Suspension}}}{\text{FG}_L}$$

- E_A : Enzymaktivität ($\text{units} \cdot \text{mg}^{-1}$ mitochondrialem Protein, bzw. $\cdot \text{g}^{-1} \text{FG}_L$)
 $\Delta E / \Delta t$: Absorption pro Zeit (min^{-1})
 $V_{\text{Kü}}$: Volumen der Küvette (μl)
 ε : Extinktionskoeffizient ($13,61 \text{ ml} \cdot \mu\text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$)
 d : Dicke der Küvette (cm)
 V_p : Volumen der Probe (μl)
 $V_{\text{Suspension}}$: gesamtes Volumen der Präparationssuspension (ml)
 $c_{\text{M-Protein}}$: mitochondrialer Proteingehalt (mg)
 FG_L : Frischgewicht der Leber (g).

Die Berechnung des mitochondrialen Proteingehalts der Leber erfolgte mit nachstehender Formel.

$$c_{M\text{-Protein}}^* = \frac{c_{M\text{-Protein}} \cdot A_{CS}^*}{A_{CS}}$$

$c_{M\text{-Protein}}^*$: mitochondriale Proteingehalt ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1} \text{FG}_{\text{Leber}}$)

$c_{M\text{-Protein}}$: Proteingehalt der mitochondrialen Suspension ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1} \text{FG}_{\text{Leber}}$)

A_{CS}^* : „maximale“ Citratsynthase-Aktivität bei 25°C ($\text{units} \cdot \text{g}^{-1} \text{FG}_{\text{Leber}}$)

A_{CS} : Citratsynthase-Aktivität der mitochondrialen Suspension bei 25°C ($\text{units} \cdot \text{g}^{-1} \text{FG}_{\text{Leber}}$).

2.2.3 Bestimmung des Lipidgehalts

Aufgrund der Überlegung, ob und inwieweit die Lipidkonzentration der Leber die mitochondriale Präparation und somit möglicherweise die Qualität der isolierten Mitochondrien beeinflusst, wurde nach einer modifizierten Methode von Bligh und Dyer (1959) der totale Lipidgehalt bestimmt.

Messprinzip:

Durch ein ausgewogenes Mischungsverhältnis von Chloroform : Methanol : Wasser erlangt man durch Zugabe von Lipid enthaltender Probe eine Trennung in zwei Phasen. Aufgrund dieser Phasentrennung, bedingt durch unterschiedliche Lösungseigenschaften, befinden sich in der unteren Chloroform-Schicht die Lipide und in der oberen die wasserlöslichen Bestandteile.

Durchführung:

Die Präparation der Leber erfolgte wie in 2.2.1.1 beschrieben. Etwa 0,25 g Leber wurden mittels eines Ultra-Turrax T8 (IKA Labortechnik) in einem 15 ml Chloroform-Methanol Gemisch (Mischungsverhältnis 1:2) bei hoher Umdrehungszahl 2 min homogenisiert. Nach Zugabe von 5 ml Chloroform und kurzem Mischen der Suspension, wurden 5 ml destilliertes Wasser zupipettiert und erneut gemischt. Nach der Filtration der Suspension durch ein Whatman Nr.1 Filterpapier in einen Glasscheidetrichter und nochmaligem Mischen, erfolgte die Phasentrennung. Nach kompletter Trennung und Aufklärung der

Phasen, erleichtert durch Zugabe weniger Tropfen 0,88%iger KCl-Lösung zur Proteinfällung in der oberen Phase (bildete eine dünne Trennschicht zwischen den Phasen), konnte die Chloroform-Phase in ein vorher gewogenes Glasgefäß abgelassen werden. Zur schnelleren Verdampfung des Chloroforms erfolgte eine Belüftung mit Stickstoff. Danach wurde das Gefäß über Nacht in einen Exikator gestellt, um etwaige Wasserrückstände zu entfernen, und durch erneutes Wiegen am nächsten Tag konnte der Lipidgehalt mit nachfolgender Formel bestimmt werden.

Auswertung:

$$c_{\text{Lipid}} = \frac{(G_{\text{F12}} - G_{\text{F11}})}{\text{FGL}}$$

c_{Lipid} : Lipidgehalt ($\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ Trockengewicht der Leber)

G_{F12} : Gewicht des Gefäßes bei der zweiten Wägung (g)

G_{F11} : Gewicht des Gefäßes bei der ersten Wägung (g)

FGL : Frischgewicht der Leber (g)

2.2.4 Statistik

Zur Überprüfung der Ergebnisse auf 95% Abweichung vom Mittelwert wurde der Ausreißertest nach Nalimov (Noack, 1980) angewandt. Die statistische Auswertung der Meßergebnisse erfolgte mittels einer Varianzanalyse (F-Test, Super ANOVA, Abacus Concepts, Inc., Berkeley, USA) und Kovarianzanalyse (ANCOVA, StatView, Abacus Concepts). Zeigten diese einen signifikanten Unterschied ($p < 0,05$), wurde durch anschließend durchgeführten Student's t-Test ermittelt, welche Paarungen sich signifikant unterschieden. Hierbei wurde zwischen gepaarten und ungepaarten Proben unterschieden. Außerdem wurde die Contrasts Analyse aus Super ANOVA zur Ermittlung signifikanter Unterschiede verwendet.

Die statistische Auswertung der Arrhenius-Plots erfolgte über eine Regressionsanalyse (Super ANOVA) mit anschließendem t-Test zur signifikanten Überprüfung beim Vergleich der Steigungen.

In der nachfolgenden Ausführung der Ergebnisse beziehen sich die Angaben der ermittelten Werte, falls nicht anders erwähnt, jeweils auf den Mittelwert \pm Standardabweichung (MW \pm S.D.). Bei $n = 2$ wurde statt der S.D. die mittlere Abweichung (M.A.) angegeben. Bei Angaben von mathematischen Gleichungen, die zum einen über das Curve Fitting Programm in Sigma Plot (Jandel Scientific, Macintosh, USA) oder über Simple Regression in Super ANOVA ermittelt wurden, werden die zugehörigen statistischen Begriffe r und p mitaufgeführt. Der Wert r gibt den Korrelationskoeffizienten nach Brevais und Pearson (Engel, 1997) an und dient zur Ermittlung einer signifikanten Beziehung zwischen zwei normalverteilten Variablen (die jeweiligen x - und y -Werte der Diagramme). p gibt die Signifikanz der Steigung an.

Werden im folgenden Signifikanzen angegeben, so beziehen sich diese jeweils auf die Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0,05$.

3 Ergebnisse

3.1 Mitochondriale Respirometrie

Mit diesem Versuch sollten sowohl Temperatureffekte auf den mitochondrialen Stoffwechsel von *Z. viviparus* im Temperaturbereich von 1° bzw. 3° bis 30°C, als auch eventuelle Stoffwechselunterschiede in Bezug auf das angebotene Substrat, Succinat im Vergleich zu Pyruvat + Malat, untersucht werden.

3.1.1 Mitochondriale Respirationsraten

Die mitochondrialen Respirationsraten zeigten sowohl bei der Verwendung von Succinat als auch von Pyruvat + Malat einen exponentiellen Anstieg mit signifikanter Steigung über den gesamten Temperaturbereich von 1° bzw. 3° bis 30°C (Abb. 3.1.1 und 3.1.2). Mit beiden Substraten war bei den Respirationsraten (III, IV und IV_{oi}) eine signifikante Zunahme der Sauerstoffverbrauchswerte mit steigender Temperatur zu verzeichnen. Die Differenz zwischen den Respirationsraten III und IV_{oi} stellt eine vorsichtige Schätzung der phosphorylierenden Respiration dar, da Protonen-Leckströme (*protonen leakage*), nicht über die ATPase gekoppelte Protonenflüsse, unter state III Bedingungen nicht oder in geringerem Masse auftreten als unter state IV_{oi} Bedingungen (Pörtner *et al.*, 1999a). Mit Succinat zeigte sich eine niedrigere exponentielle Zunahme der Sauerstoffverbrauchswerte als mit Pyruvat + Malat. Aus Abbildung 3.1.1 B ist zu entnehmen, daß ab 20°C keine signifikante Zunahme des Sauerstoffverbrauchs zum vorherigen Wert mehr zu verzeichnen war. Die Werte von 15° bis 30°C lagen bei einem Mittelwert von $15,18 \pm 5,46 \text{ nmol O} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ mitochondrialem Protein.

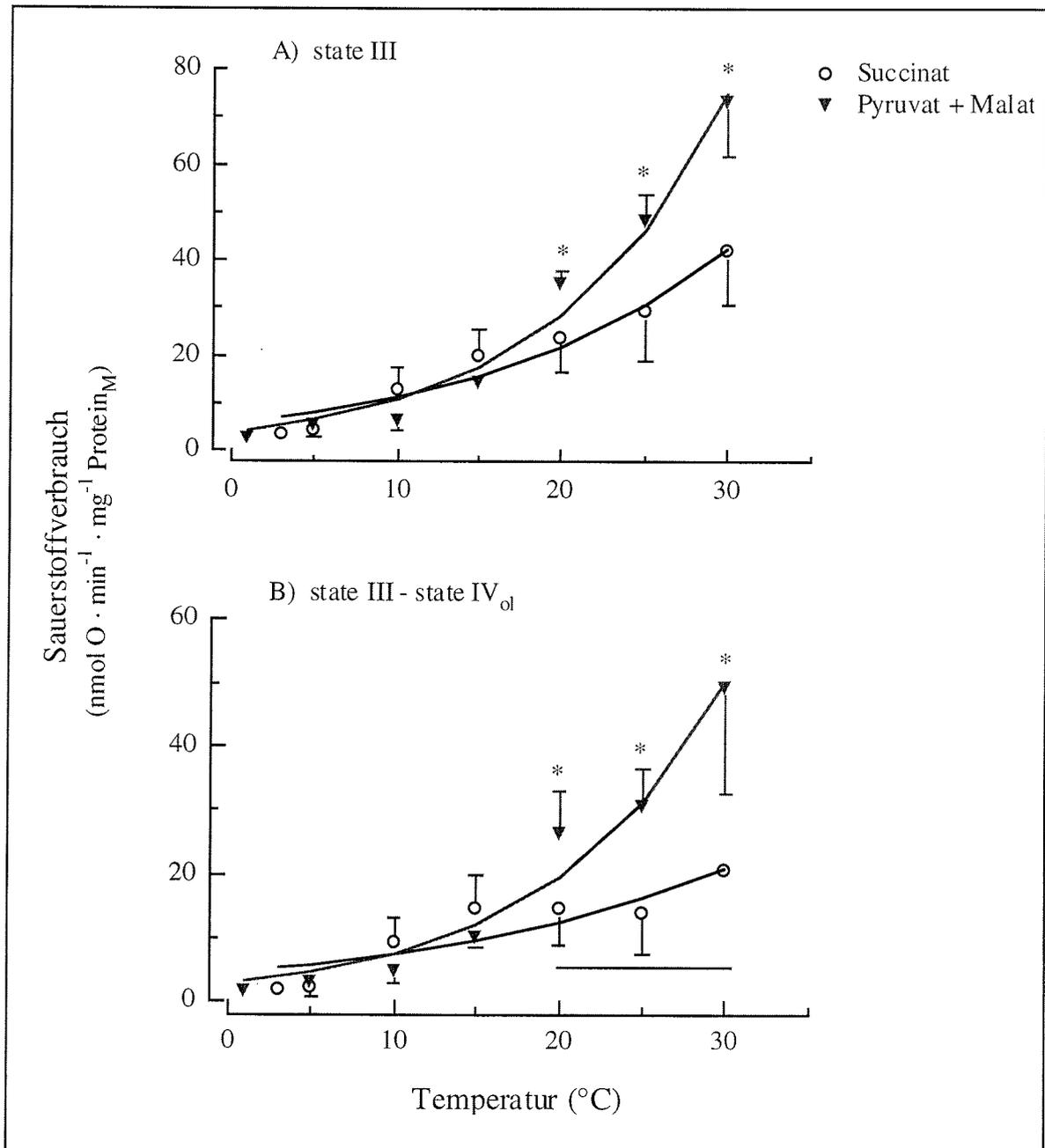


Abb. 3.1.1 Mitochondrialer Sauerstoffverbrauch mit verschiedenen Substraten in Abhängigkeit von der Temperatur (MW±S.D., bei 1°, 3° und 5°C (5° nur ▼) MW±M.A., —: kennzeichnet Bereich (20° bis 30°C) mit Succinat ohne signifikante Steigung, *: signifikanter Unterschied zwischen den Substraten, Test: ANCOVA und Contrasts Analyse, n=2-8)

Exponentialgleichungen der Respirationsraten mit Succinat:

state III: $f(3^{\circ}-30^{\circ}\text{C}) = \exp(0,06 \cdot x + 1,77)$ ($r = 0,934$)

state III - state IV_{ol}: $f(3^{\circ}-30^{\circ}\text{C}) = \exp(0,05 \cdot x + 1,52)$ ($r = 0,904$)

Exponentialgleichungen der Respirationsraten mit Pyruvat + Malat:

state III: $f(1^{\circ}-30^{\circ}\text{C}) = \exp(0,10 \cdot x + 1,40)$ ($r = 0,969$)

state III - state IV_{ol}: $f(1^{\circ}-30^{\circ}\text{C}) = \exp(0,09 \cdot x + 1,08)$ ($r = 0,967$)

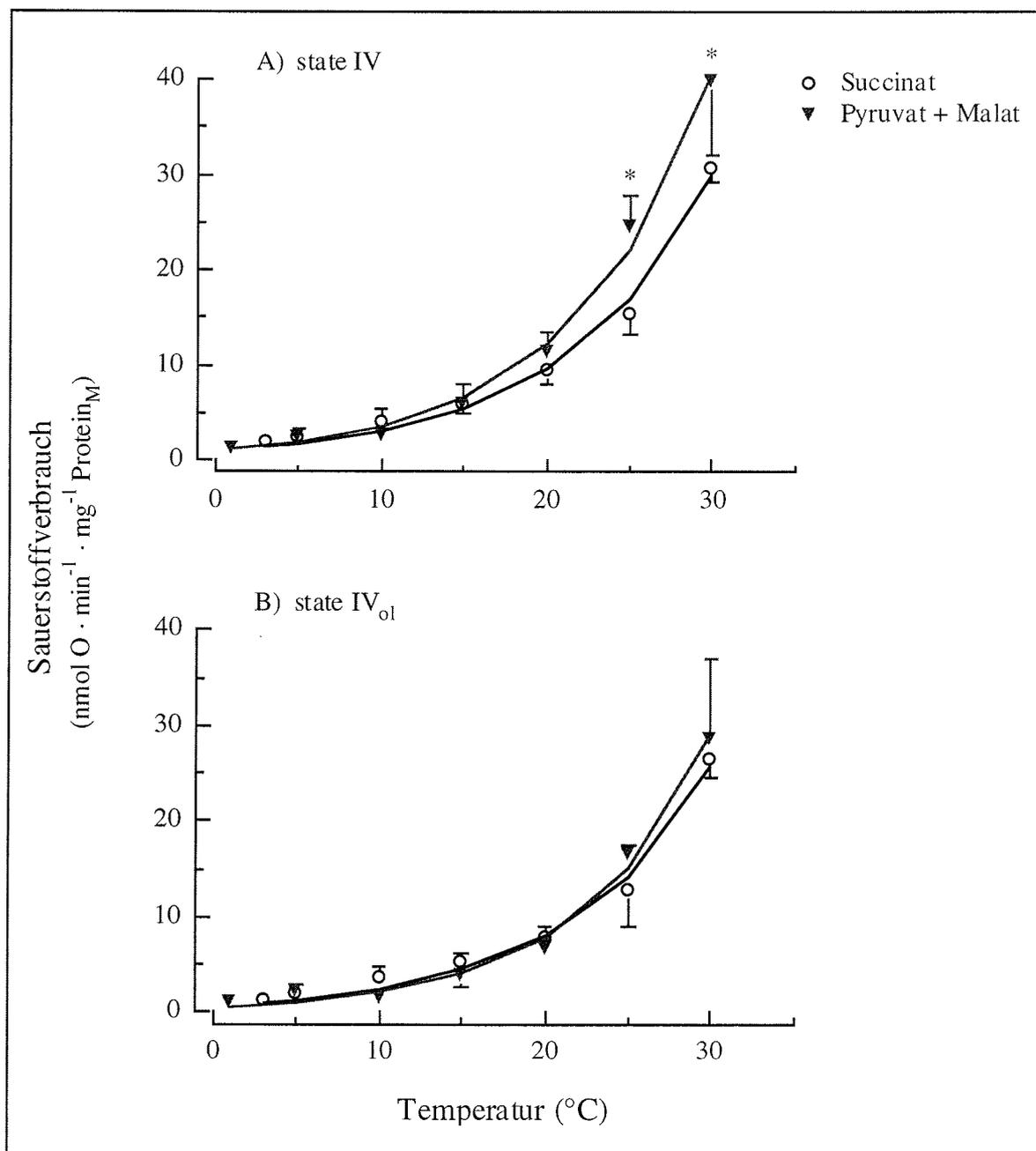


Abb. 3.1.2 mitochondrialer Sauerstoffverbrauch mit verschiedenen Substraten in Abhängigkeit von der Temperatur (MW±S.D., bei 1°, 3° und 5°C (5° nur ▼) MW±M.A. *: signifikanter Unterschied zwischen den Substraten, Test: ANCOVA und Contrasts Analyse, n=2-8)

Exponentialgleichungen der Respirationsraten mit Succinat:

state IV: $f(3^{\circ}\text{-}30^{\circ}\text{C}) = \exp(0,11 \cdot x - 0,01)$ ($r = 0,978$)

state IV_{ol}: $f(3^{\circ}\text{-}30^{\circ}\text{C}) = \exp(0,12 \cdot x + 0,09)$ ($r = 0,979$)

Exponentialgleichungen der Respirationsraten mit Pyruvat + Malat:

state IV: $f(1^{\circ}\text{-}30^{\circ}\text{C}) = \exp(0,12 \cdot x - 0,25)$ ($r = 0,981$)

state IV_{ol}: $f(1^{\circ}\text{-}30^{\circ}\text{C}) = \exp(0,13 \cdot x - 0,54)$ ($r = 0,984$)

Zwischen 15° und 30°C stieg der Anteil des Protonen-Leckstroms an der state III Respiration mit Succinat signifikant von $27,70 \pm 7,98\%$ (15°C) auf $56,00 \pm 0,50\%$ (30°C) an. Im Substratvergleich gab es keine signifikanten Unterschiede im Anteil des Protonen-Leckstroms zwischen 20° und 30°C, jedoch lag er tendenziell mit Succinat höher als mit Pyruvat + Malat (Tab. 3.1.1).

| T (°C) | Protonen-Leckstrom (%) | | | |
|--------|------------------------|-------|---------------------|-------|
| | mit Succinat | | mit Pyruvat + Malat | |
| | MW | SD | MW | SD |
| 10 | 29,40 | 6,95 | 24,85 | 9,70 |
| 15 | 27,70 | 7,98 | 29,71 | 11,99 |
| 20 | 36,70* | 8,96 | 24,52 | 9,03 |
| 25 | 49,30* | 11,59 | 36,27* | 9,47 |
| 30 | 56,00* | 0,50 | 39,31 | 12,58 |

Tab. 3.1.1 Anteil des Protonen-Leckstroms an der state III Respiration (*: signifikante Zunahme, Test: gepaarter und ungepaarter t-Test)

Den Abbildungen 3.1.1 und 3.1.2 kann entnommen werden, daß die Temperaturabhängigkeit des mitochondrialen Sauerstoffverbrauchs mit beiden Substraten signifikant unterschiedlich verlief. Ab 20°C verzeichnete die state III Respiration, als auch die Differenz state III – state IV_{oi} mit Pyruvat + Malat einen signifikant höheren Sauerstoffverbrauch als bei der Verwendung von Succinat. Bei 20°C ergab die state III Respiration mit Pyruvat + Malat beispielsweise einen $\dot{M}O_2$ -Wert von $35,05 \pm 2,45 \text{ nmol O} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ mitochondrialem Protein, der entsprechende $\dot{M}O_2$ -Wert mit Succinat betrug $23,67 \pm 7,10 \text{ nmol O} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ mitochondrialem Protein. Dieser signifikante Unterschied im Sauerstoffverbrauch wurde durch die Q_{10} -Werte unterstützt. So lag der Q_{10} von 15° auf 20°C mit Succinat bei $1,46 \pm 0,36$ und mit Pyruvat + Malat bei $6,03 \pm 1,80$. Die Respirationsrate von state IV zeigte mit Pyruvat + Malat erst ab 25°C signifikant höhere Sauerstoffverbrauchswerte im Vergleich zur Respirationsrate mit Succinat. Die Temperaturabhängigkeit des nicht über die ATPase gekoppelten Protonenflusses (state IV_{oi}) war mit beiden Substraten gleich (Abb. 3.1.2 B).

Arrhenius-Darstellung:

Der exponentielle Zusammenhang zwischen mitochondrialem Sauerstoffverbrauch und Umgebungstemperatur wurde ebenso in der Arrhenius-Darstellung deutlich. Die Steigung der resultierenden Geraden ist ein Maß für die Beschleunigungsrate der Stoffwechselprozesse in Abhängigkeit von der Temperatur.

Innerhalb des gemessenen Temperaturbereichs war bei den Respirationsraten mit Pyruvat + Malat ein linearer Zusammenhang mit signifikanter Steigung gegeben (Abb. 3.1.3 und 3.1.4). Die Regressionen waren mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0.05$ signifikant. Hingegen ergab die Arrhenius-Darstellung der Respirationsraten mit Succinat bei der state III Respiration, als auch bei der Differenz state III – state IV_{oi} eine *Arrhenius Break Temperatur* (ABT) bei 15°C. Ab dieser Temperatur trat bei beiden eine signifikant geringere Steigung in Abhängigkeit von der Temperatur ein (Abb. 3.1.3). Für die state IV und state IV_{oi} Respiration mit Succinat ergab sich über den gesamten Temperaturbereich ein linearer Zusammenhang (Abb. 3.1.4).

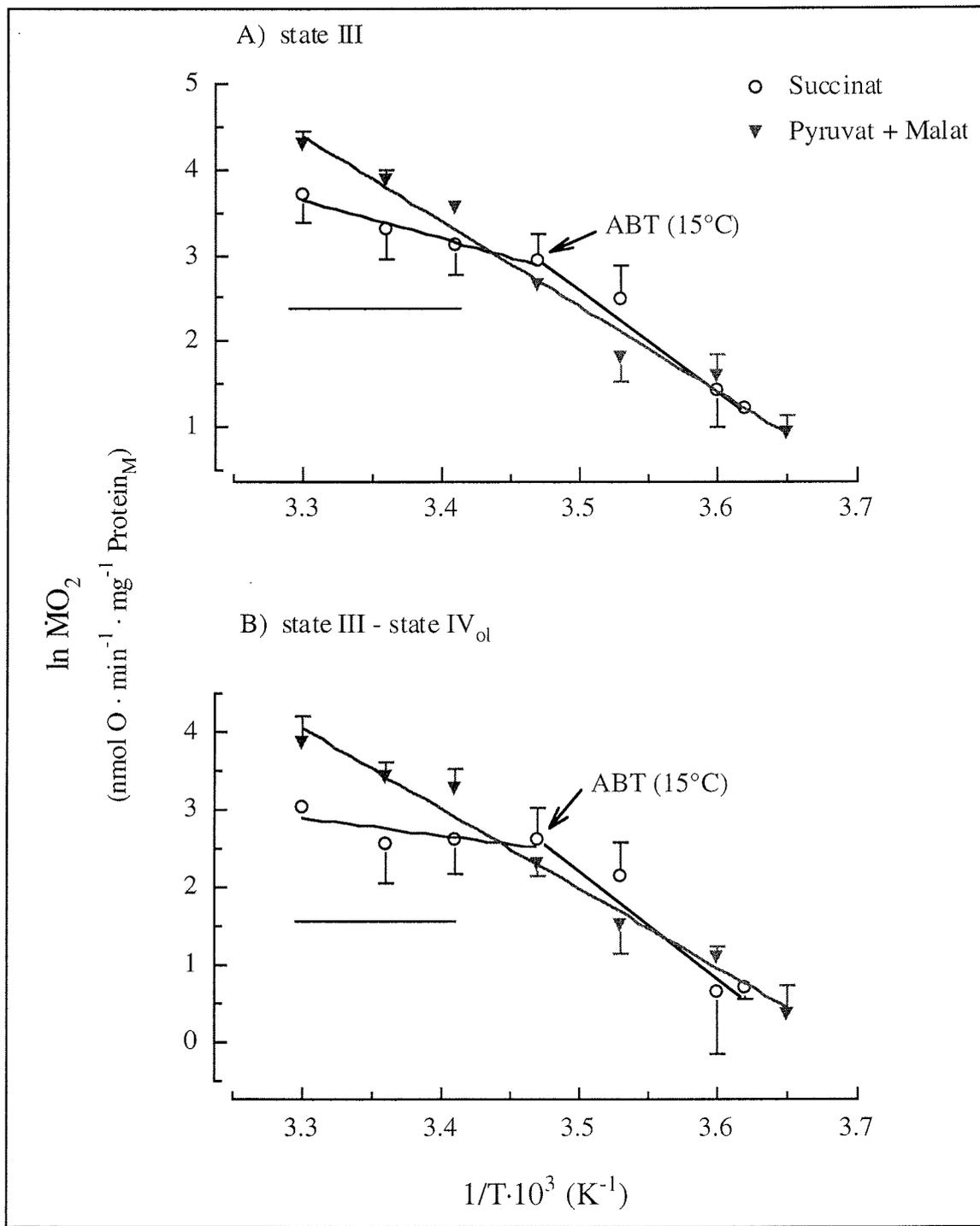


Abb. 3.1.3 Arrhenius-Darstellung der mitochondrialen Respiration mit verschiedenen Substraten in Abhängigkeit von der Temperatur (MW±SD, bei 3,65, 3,62 und 3,6 (10³ K⁻¹) (3,6 nur ▼) MW±M.A., durchgezogene Linie: Regressionsgerade, —: Bereich mit signifikantem Unterschied zwischen den Substraten, Test: Contrasts Analyse, n=2-8)

Regressionsgleichungen der Respirationraten:

- | | | |
|------------------|--------------------------------------|---|
| Succinat: | state III: | $f(3^{\circ}-15^{\circ}\text{C}) = -11,81 \cdot x + 44,02$ ($r = 0,880$, $p = 0,0001$) |
| | | $f(15^{\circ}-30^{\circ}\text{C}) = -4,20 \cdot x + 17,48$ ($r = 0,616$, $p = 0,0006$) |
| | state III - state IV _{ol} : | $f(3^{\circ}-15^{\circ}\text{C}) = -14,70 \cdot x + 53,75$ ($r = 0,834$, $p = 0,0001$) |
| | | $f(15^{\circ}-30^{\circ}\text{C}) = -1,39 \cdot x + 7,38$ ($r = 0,190$, $p = 0,3736$) |
| Pyruvat + Malat: | state III: | $f(1^{\circ}-30^{\circ}\text{C}) = -10,27 \cdot x + 38,30$ ($r = 0,974$, $p = 0,0001$) |
| | state III - state IV _{ol} : | $f(1^{\circ}-30^{\circ}\text{C}) = -10,25 \cdot x + 37,84$ ($r = 0,954$, $p = 0,0001$) |

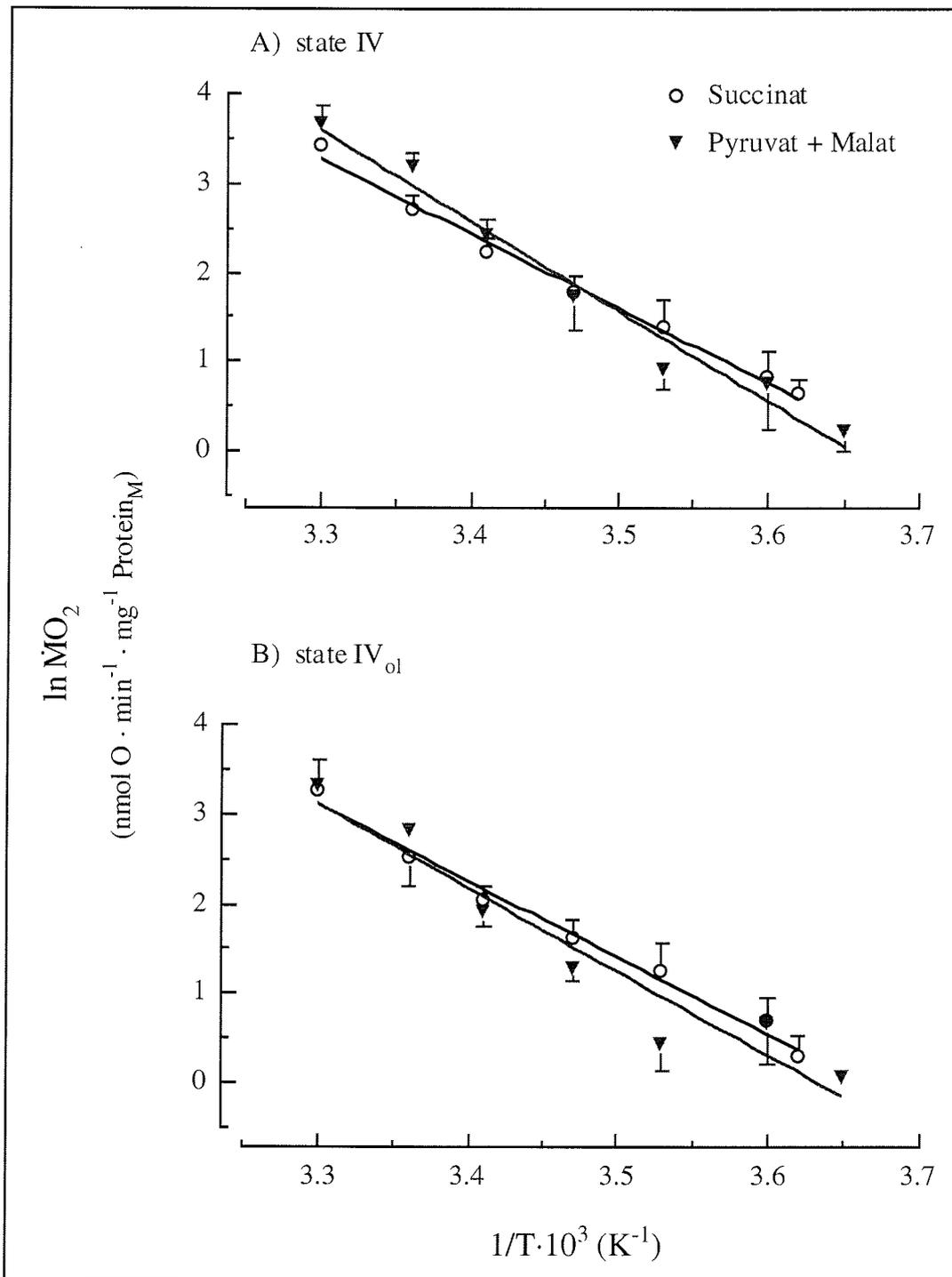


Abb. 3.1.4 Arrhenius-Darstellung der mitochondrialen Respiration mit verschiedenen Substraten in Abhängigkeit von der Temperatur (MW±SD, bei 3,65, 3,62 und 3,6 (10³ K⁻¹) (3,6 nur ▼) MW±M.A., durchgezogene Linie: Regressionsgerade, n=2-8)

Regressionsgleichungen der Respirationsraten mit Succinat:

$$\text{state IV: } f(3^{\circ}\text{-}30^{\circ}\text{C}) = -8,21 \cdot x + 30,32 \quad (r = 0,963, p = 0,0001)$$

$$\text{state IV}_{oi}: f(3^{\circ}\text{-}30^{\circ}\text{C}) = -8,10 \cdot x + 29,77 \quad (r = 0,950, p = 0,0001)$$

Regressionsgleichungen der Respirationsraten mit Pyruvat + Malat:

$$\text{state IV: } f(1^{\circ}\text{-}30^{\circ}\text{C}) = -10,89 \cdot x + 39,59 \quad (r = 0,962, p = 0,0001)$$

$$\text{state IV}_{oi}: f(1^{\circ}\text{-}30^{\circ}\text{C}) = -10,49 \cdot x + 37,82 \quad (r = 0,949, p = 0,0001)$$

3.1.2 Arrhenius-Aktivierungsenergien und Q_{10} -Werte

Im Vergleich der Aktivierungsenergien und Q_{10} -Werte im Temperaturbereich 1° bis 30°C ergaben sich innerhalb der Respirationsraten mit Pyruvat + Malat keine signifikanten Unterschiede (Abb. 3.1.5). Hingegen unterstützten die ermittelten Arrhenius-Aktivierungsenergien und Q_{10} -Werte für die Respiration mit Succinat von state III und der Differenz state III – state IV_{ol} das Auftreten einer ABT bei 15°C. Bei beiden lagen die Werte für den oberen Temperaturbereich (15° bis 30°C) signifikant unter den entsprechenden Werten für den unteren Temperaturbereich (3° bis 15°C) (Abb. 3.1.5).

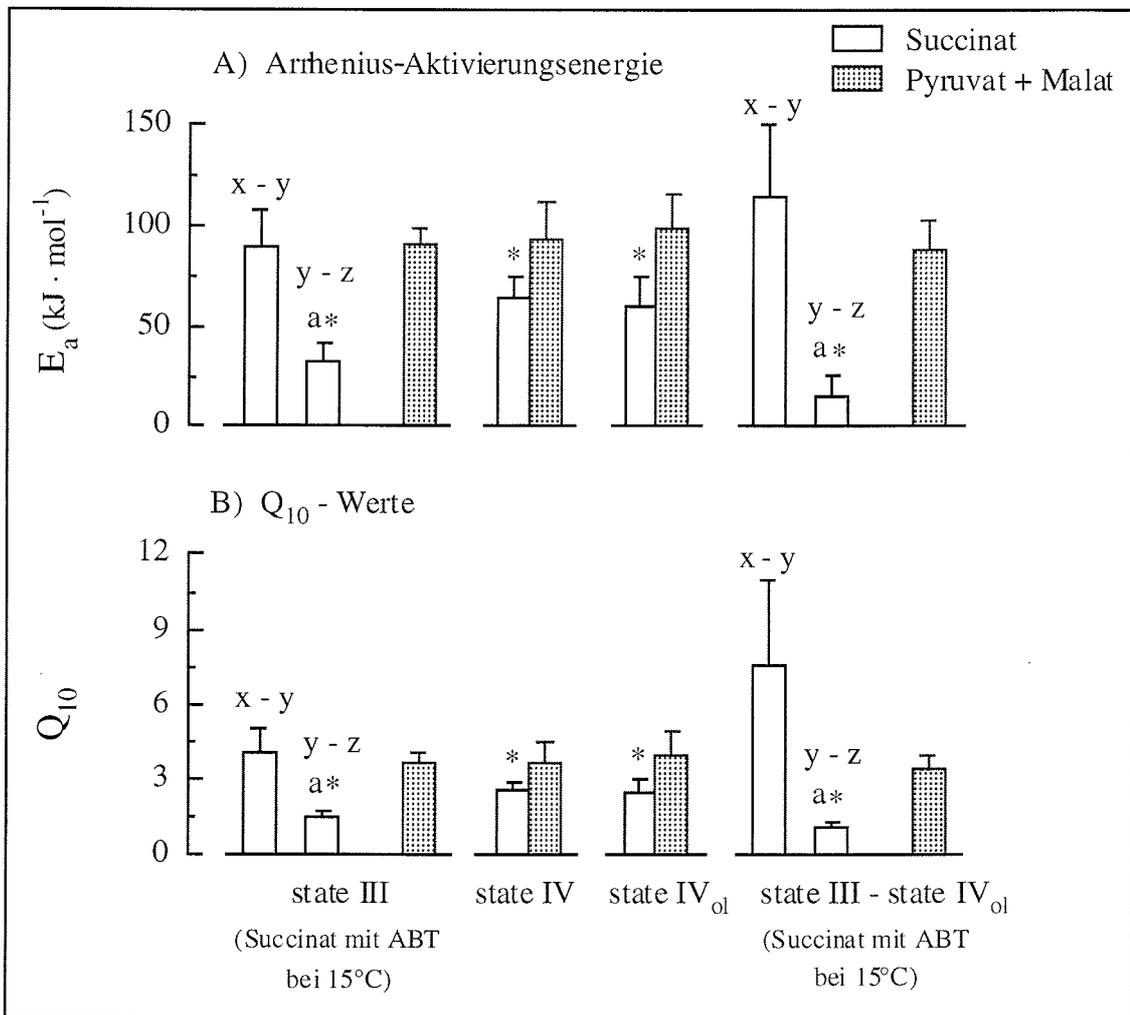


Abb. 3.1.5 Arrhenius-Aktivierungsenergie und Q_{10} -Werte der Respirationsraten mit verschiedenen Substraten im gesamten Temperaturbereich (1° bzw. 3°C bis 30°C) (MW±S.D., *: signifikanter Unterschied zwischen den Substraten bei den einzelnen states, a: signifikanter Unterschied bei state III und state III – state IV_{ol} mit Succinat zwischen den Werten vor (x – y) und nach (y – z) der ABT, n=4-8)

Im Vergleich der Substrate konnten innerhalb des gesamten Temperaturbereichs mit Pyruvat + Malat signifikant höhere Arrhenius-Aktivierungsenergien und Q_{10} -Werte für die Respirationsraten IV und IV_{oi} ermittelt werden (Abb. 3.1.5). Kein signifikanter Unterschied zwischen den Aktivierungsenergien und Q_{10} -Werten der beiden Substrate ergab sich bei der state III Respiration und der Differenz state III – state IV_{oi} mit Succinat für den unteren Temperaturbereich (bis 15°C) (Abb. 3.1.5). So betrug beispielsweise bei der state III Respiration mit Pyruvat + Malat die Arrhenius-Aktivierungsenergie im Temperaturbereich 1° bis 30°C $90,96 \pm 7,89 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ und mit Succinat lag die Aktivierungsenergie vor der ABT (3° bis 15°C) bei $89,80 \pm 18,57 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$. Ab 15°C lagen die Arrhenius-Aktivierungsenergien und Q_{10} -Werte mit Succinat signifikant unter den entsprechenden Werten mit Pyruvat + Malat (Abb. 3.1.5).

3.1.3 Kopplungsgrade

Im Temperaturgradienten von 1° bzw. 3° bis 30°C ließ sich eine Temperaturempfindlichkeit in Bezug auf den Kopplungsgrad der isolierten Lebermitochondrien von *Z. viviparus* feststellen. Die höchsten Kopplungswerte wurden zwischen 10° und 20°C gefunden, wobei es Unterschiede zwischen den verwendeten Substraten.

Der traditionelle RCR (state III Respirationsrate dividiert durch state IV Respirationsrate) ergab für Succinat eine signifikant höhere Kopplung der Mitochondrien bei 10° bis 15°C von $3,16 \pm 0,76$ und $3,16 \pm 1,24$ im Vergleich zu den unterhalb und oberhalb liegenden Temperaturen (Abb. 3.1.6). Hingegen konnte für den RCR von Pyruvat + Malat keine signifikante Temperaturabhängigkeit ermittelt werden. Aber auch hier zeichnete sich bei der Auftragung der RCR-Werte gegen die Temperatur ein (nicht signifikantes) Maximum von $2,8 \pm 1,0$ bei 15° bis 20°C ab. Die RCR-Werte beider Substrate lagen in ähnlicher Größenordnung, so daß im Hinblick auf das Substrat keine signifikanten Kopplungsunterschiede festgestellt wurden (Abb. 3.1.6). Bei 5°C beispielsweise betrug der RCR mit Succinat $1,88 \pm 0,53$ und mit Pyruvat + Malat $2,43 \pm 0,55$.

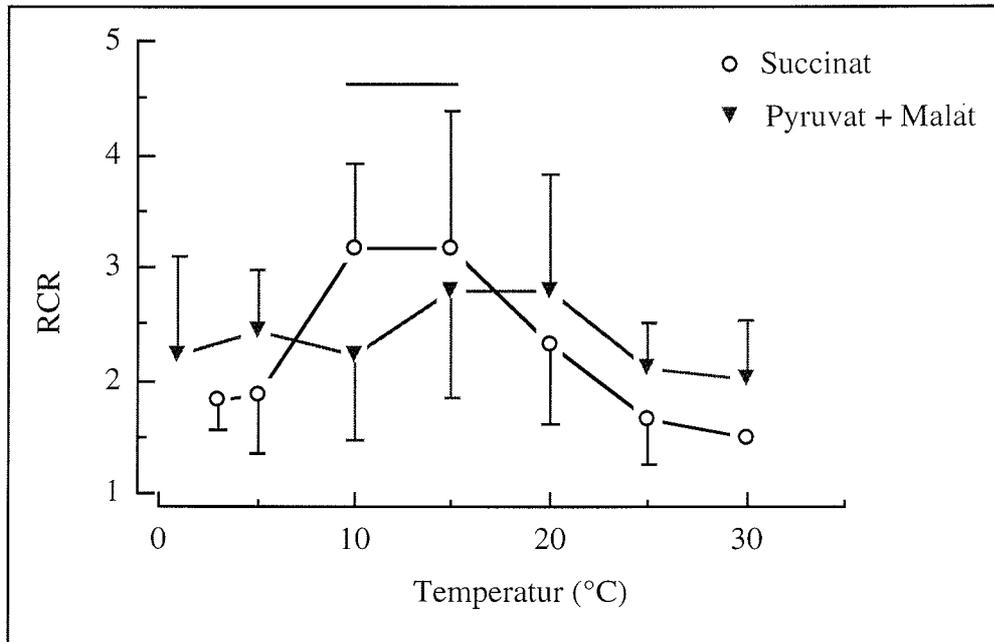


Abb. 3.1.6 Traditioneller Kopplungsgrad mit verschiedenen Substraten in Abhängigkeit von der Temperatur (MW±S.D., bei 1°, 3° und 5°C (5°C nur für ▼) MW±M.A., —: signifikant unterschiedlicher Bereich innerhalb der RCR-Werte mit Succinat zu den RCR-Werten der Temperaturbereiche 3° bis 5°C und 20° bis 30°C, Test: ANCOVA und Contrasts Analyse, n=2-8)

Abbildung 3.1.7 hingegen zeigt im Substratvergleich signifikant höhere RCR_{oi} -Werte (state III dividiert durch state IV_{oi}) bei 20° bis 30°C bei der Verwendung von Pyruvat + Malat. So lag beispielsweise bei 20°C der RCR_{oi} mit Pyruvat + Malat bei $4,19 \pm 1,37$ und der RCR_{oi} mit Succinat bei $2,96 \pm 0,66$.

Signifikante Temperaturabhängigkeit des RCR_{oi} konnte wiederum nur für die Respiration mit Succinat festgestellt werden. So war auch hier der höchste Kopplungsgrad bei den Temperaturen 10° und 15°C mit Werten von $3,96 \pm 0,98$ und $3,49 \pm 0,62$ gegeben. Für die Respiration mit Pyruvat + Malat war nur tendenziell ein Maximum bei 10° bis 20°C festzustellen. Die entsprechenden RCR_{oi} -Werte lauteten für 10°C $4,14 \pm 1,17$, für 15°C $4,45 \pm 2,48$ und für 20°C $4,19 \pm 1,37$.

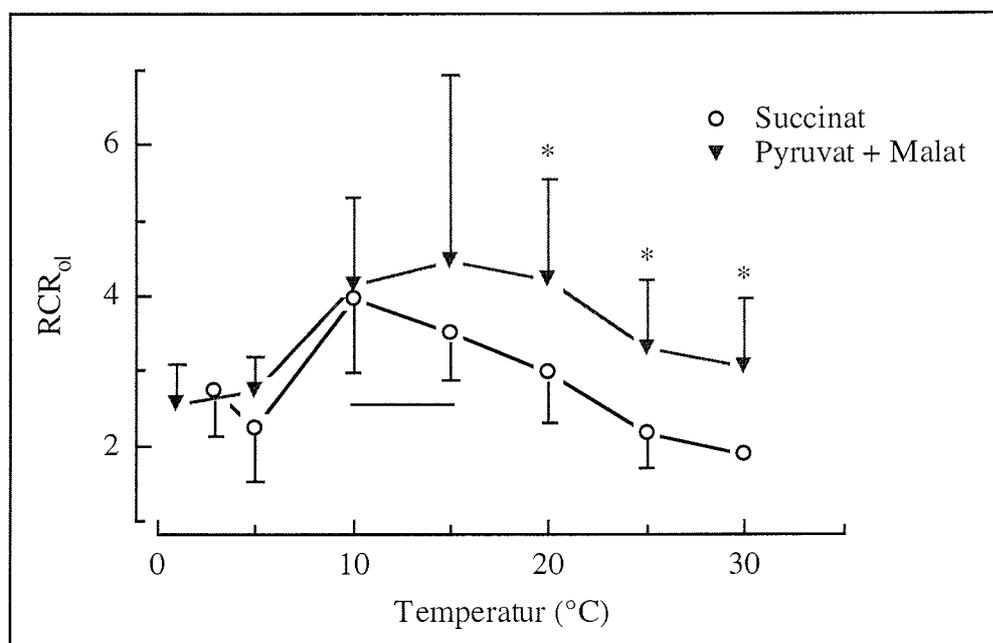


Abb. 3.1.7 Kopplungsgrad mit verschiedenen Substraten in Abhängigkeit von der Temperatur (MW±S.D., bei 1°, 3° und 5°C (5° nur ▼) MW±M.A., —: signifikant unterschiedlicher Bereich innerhalb der RCR-Werte mit Succinat zu den RCR-Werten der Temperaturbereiche 3° bis 5°C und 20° bis 30°C, *: signifikanter Unterschied zwischen den Substraten, Test: ANCOVA und Contrasts Analyse, n=2-8)

3.1.4 P/O-Verhältnisse

Bei der Auftragung der klassisch ermittelten P/O – Verhältnisse gegen die Temperatur ergaben sich mit beiden Substraten signifikant niedrigere P/O-Werte für die unteren Temperaturen. Das P/O – Verhältnis mit Succinat lag mit $1,49 \pm 0,68$ von 3° bis 5°C signifikant unter den P/O – Verhältnissen von $2,25 \pm 0,43$ (10°C), $2,43 \pm 0,44$ (15°C), $2,67 \pm 0,46$ (20°C) und $2,51 \pm 0,70$ (25°C) (Abb. 3.1.8). Für die mitochondriale Respiration mit Pyruvat + Malat ergab sich ein signifikant niedrigeres Verhältnis von $2,50 \pm 0,63$ von 1° bis 5°C zu den P/O-Werten von $3,3 \pm 0,72$ (10°C), $3,05 \pm 0,42$ (15°C), $3,18 \pm 0,81$ (20°C) und $3,36 \pm 0,66$ (25°C) (Abb. 3.1.8).

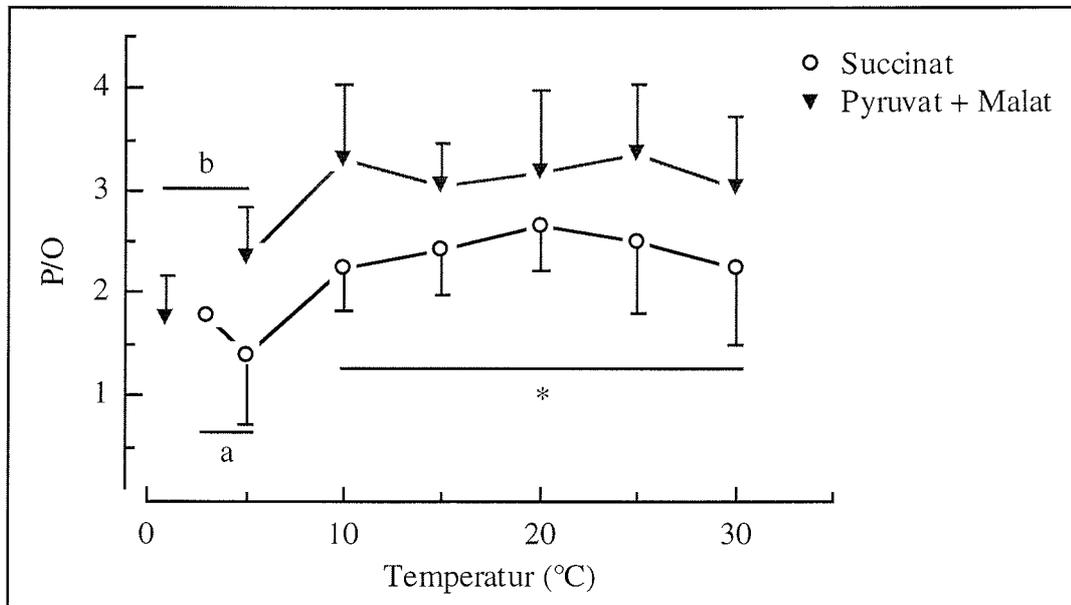


Abb. 3.1.8 P/O-Verhältnisse in Abhängigkeit von der Temperatur (MW±S.D., bei 1°, 3° und 5°C (5° nur ▼) MW±M.A., a und b: signifikant unterschiedlicher Bereich zu den Temperaturen 10°, 15°, 20° und 25°C der P/Os mit Succinat (a) und mit Pyruvat + Malat (b), *: signifikant unterschiedlicher Bereich zwischen den Substraten, Test: ANCOVA und Contrasts Analyse, n=2-8)

Die Abbildung zeigt, daß die P/O-Werte mit Succinat niedriger lagen als die Werte mit Pyruvat + Malat. In der Gegenüberstellung der gemittelten Werte über den unteren Temperaturbereich (bis 5°C) ergab die Contrasts Analyse keinen signifikanten Unterschied ($p = 0,2862$), wohingegen im oberen Temperaturbereich, 10° bis 30°C, ein signifikanter Unterschied zwischen den P/O-Verhältnissen der Substrate festgestellt werden konnte ($p = 0,0001$). Die mitochondriale Respiration mit Succinat ergab in diesem Temperaturbereich (10° bis 30°C) ein signifikant niedrigeres mittleres P/O-Verhältnis von $2,29 \pm 0,53$ gegenüber der Respiration mit Pyruvat + Malat mit einem gemittelten P/O-Wert von $3,17 \pm 0,65$.

Die P/O-Verhältnisse mittels luminometrischer Messung, ermittelt für die Respiration mit Pyruvat + Malat, ergaben ebenfalls eine Temperaturabhängigkeit bei niedrigen Temperaturen und signifikant niedrigere Werte als die klassische Methode im Temperaturbereich 1° bis 10°C (Abb. 3.1.9).

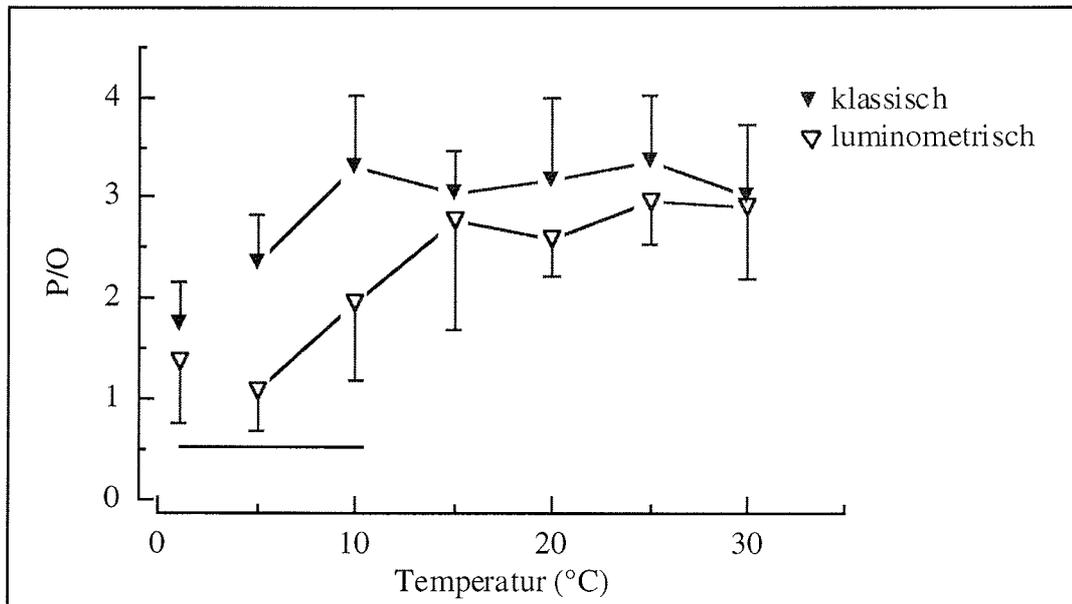


Abb. 3.1.9 P/O-Verhältnisse verschiedener Ermittlungsmethoden in Abhängigkeit von der Temperatur (MW±SD, bei 1° und 5°C (5° nur ▼) MW±M.A., —: kennzeichnet signifikant unterschiedlichen Bereich zwischen den Methoden, als auch innerhalb der luminometrisch ermittelten P/O-Werte von 1° bis 10°C zu den Temperaturen von 15° bis 30°C, Test: ANCOVA und Contrasts Analyse, n=2-7)

Der Vergleich der P/O-Werte zwischen den Methoden, klassische Methode gegen luminometrische Ermittlung des P/O – Verhältnisses, ergab von 1° bis 10°C ein signifikant niedrigeres P/O-Verhältnis von $1,47 \pm 0,68$ mit luminometrischer Messung der ATP-Produktion im Vergleich zu klassisch ausgewerteten P/O-Verhältnissen von $2,80 \pm 0,92$. Im oberen Temperaturbereich (15° bis 30°) ergab sich kein Unterschied zwischen den Methoden.

3.2 Citratsynthase-Aktivität

In diesem Versuch wurden die Arten *Z. viviparus* (Ostsee) und *P. brachycephalum* (Antarktis) auf die Citratsynthase-Aktivitäten in isolierten Lebermitochondrien bei verschiedenen Temperaturen (0° bis 30°C) untersucht, um die Mitochondrien auf unterschiedliche Enzymausstattungen infolge einer Kälteadaptation der antarktischen Aalmutter zu vergleichen.

Bei der Präparation von *P. brachycephalum* wurde des öfteren der Parasit *Pseudoterranova decipiens* (Nematoda) in der Leber gefunden. Fische dienen ihm als Zwischenwirt für sein drittes Larvenstadium und er wurde schon für mehrere antarktische

Fischarten bestimmt (Reimann, 1997; Palm *et al.*, 1994). Infizierte Lebern wurden aussortiert und nicht für die Messung herangezogen.

3.2.1 Spezifische Citratsynthase-Aktivität

Die Kurvenverläufe in Abbildung 3.2.1 zeigen den exponentiellen Anstieg der Citratsynthase-Aktivität mit steigender Temperatur von 0° bis 30°C. Für *Z. viviparus* lautet die zugehörige Gleichung $f(0^{\circ}\text{-}30^{\circ}\text{C}) = \exp^{(0,0443 \cdot x - 4,194)}$, für *P. brachycephalum* war der Zusammenhang $f(0^{\circ}\text{-}30^{\circ}\text{C}) = \exp^{(0,0714 \cdot x - 3,8977)}$. Die spezifische Citratsynthase-Aktivität von *Z. viviparus* (units · mg⁻¹ mitochondrialem Protein) lag im gesamten Temperaturbereich signifikant unter der Citratsynthase-Aktivität von *P. brachycephalum*.

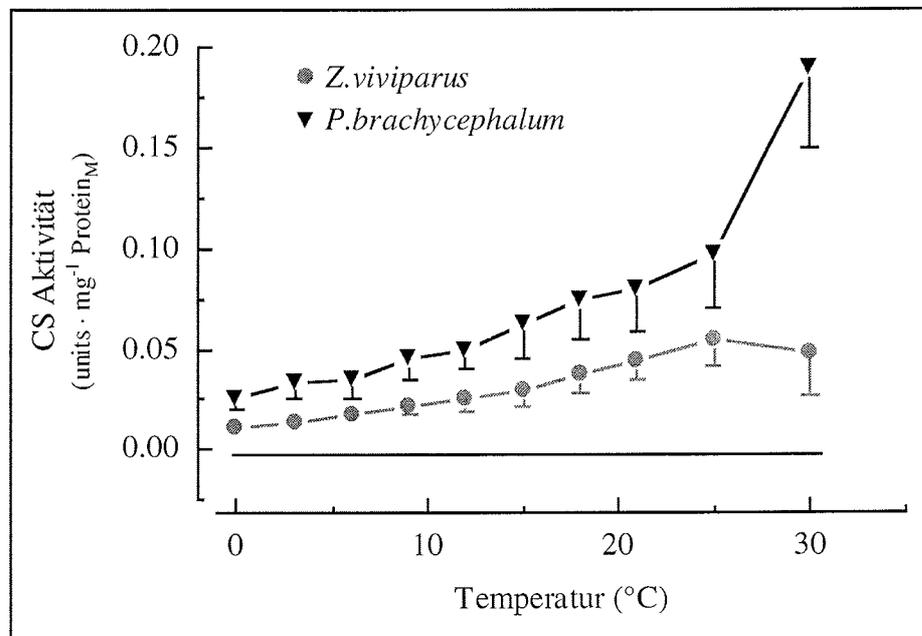


Abb. 3.2.1 Citratsynthase-Aktivität pro mg mitochondrialem Protein aus Aalmuttern der Ostsee und der Antarktis in Abhängigkeit von der Temperatur (MW±S.D., —: Bereich signifikanten Unterschieds zwischen den Arten, Test: ANCOVA und ungepaarter t-Test, (●): n=8-12, (▼): n=3-9)

Die Arrhenius-Darstellung der Citratsynthase-Aktivität pro mg mitochondrialem Protein (Abb. 3.2.2) zeigte bei beiden Arten die Tendenz einer Steigungsänderung bei $3,36 \cdot 10^3$ (K⁻¹) (entspricht 25°C). Aufgrund fehlender Wertepaare für höhere Temperaturen wie 35° und 40°C konnte mittels der Regressionsanalyse (Super Anova) keine signifikante ABT ermittelt

werden, weswegen die eventuelle Arrhenius Break Temperatur in Klammern angegeben wurde.

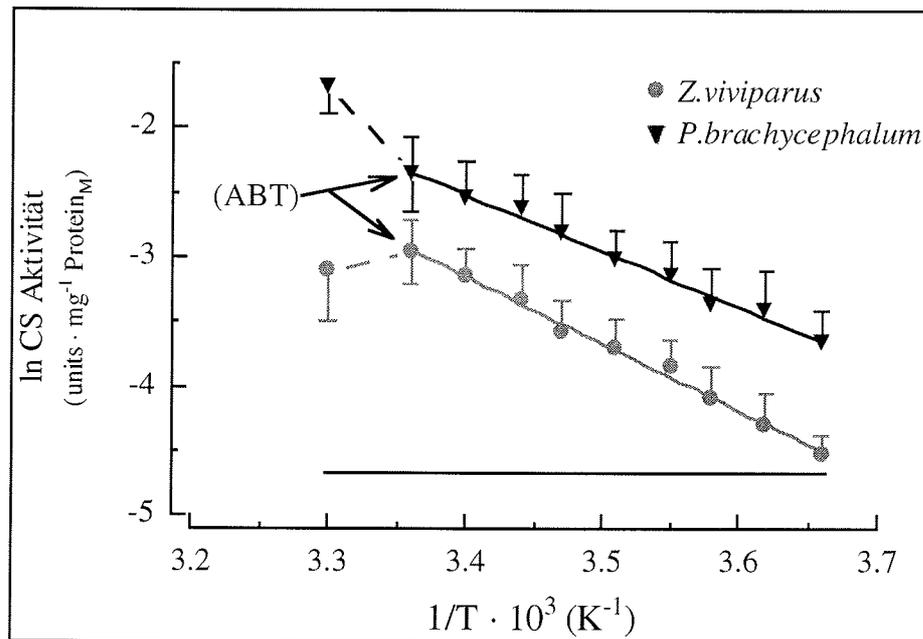


Abb. 3.2.2 Arrhenius-Darstellung der Citratsynthase-Aktivität von Aalmuttern aus der Ostsee und der Antarktis in Abhängigkeit von der Temperatur (MW±S.D., —: Bereich signifikanten Unterschieds zwischen den Arten, Test: ANCOVA und ungepaarter t-Test, (●): n=8-12, (▼): n=3-9)

Unterstützt wurde die Annahme einer ABT bei 25°C durch den Vergleich der Aktivierungsenergien und Q_{10} -Werte der zwei Temperaturbereiche 0° bis 25°C und 25° bis 30°C (Abb. 3.2.3 A und B). Bei *Z. viviparus* ergab die Arrhenius-Aktivierungsenergie von 0° bis 25°C einen signifikant höheren Wert von $42,57 \pm 4,13 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$, im Gegensatz zu dem Wert von $25,17 \pm 6,87 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ im Temperaturgradienten 25° bis 30°C, der eine negative Steigung aufwies. Die entsprechenden signifikant unterschiedlichen Q_{10} -Werte lagen bei $1,85 \pm 0,13$ (0° bis 25°C) und bei $0,84 \pm 0,27$ (25° bis 30°C). Bei *P. brachycephalum* war das Verhältnis genau umgekehrt. Hier lag die Aktivierungsenergie von 0° bis 25°C mit einem Wert von $34,99 \pm 1,70 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ signifikant unterhalb der Aktivierungsenergie von $66,95 \pm 4,23 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ im Temperaturbereich 25° bis 30°C. Die Q_{10} -Werte waren mit $1,62 \pm 0,03$ (0° bis 25°C) und $2,63 \pm 0,16$ (25° bis 30°C) signifikant unterschiedlich.

Der Abbildung kann außerdem entnommen werden, dass sich die Arrhenius-Aktivierungsenergien und Q_{10} -Werte innerhalb des Artenvergleichs ebenso signifikant unterschieden. So lagen die Werte von *P. brachycephalum* von 0° auf 25°C signifikant unterhalb und von 25° bis 30°C signifikant oberhalb der Aktivierungsenergien und Q_{10} -Werte von *Z. viviparus*.

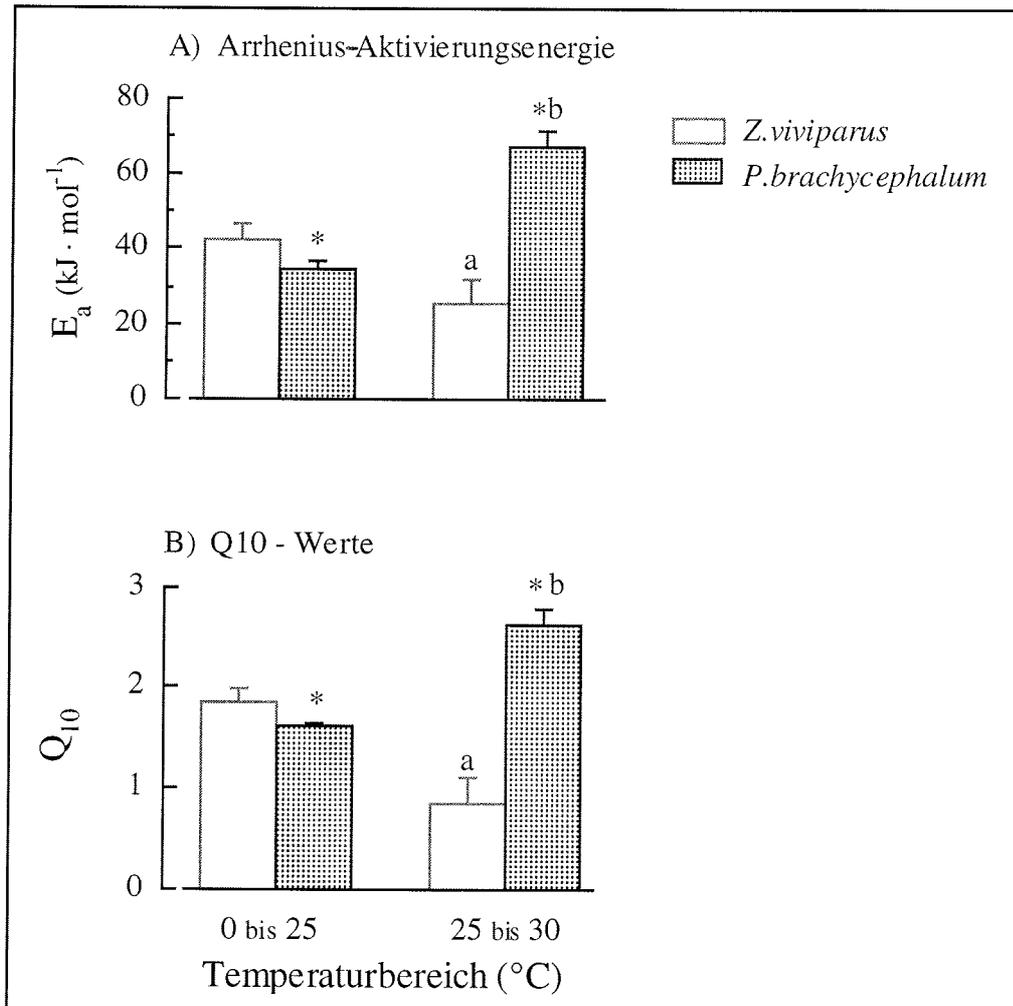


Abb. 3.2.3 Arrhenius-Aktivierungsenergien und Q_{10} -Werte der Citratsynthase-Aktivität verschiedener Arten in unterschiedlichen Temperaturbereichen (MW±S.D., a und b: signifikanter Unterschied zu den Werten im Temperaturbereich (0° - 25°C) (a = *Z. viviparus*, b = *P. brachycephalum*) *: signifikanter Unterschied der Werte eines Temperaturbereichs zwischen den zwei Arten, Test: gepaarter und ungepaarter t-Test, n=6-12 (0°-25°C), n=3-9 (25°-30°C))

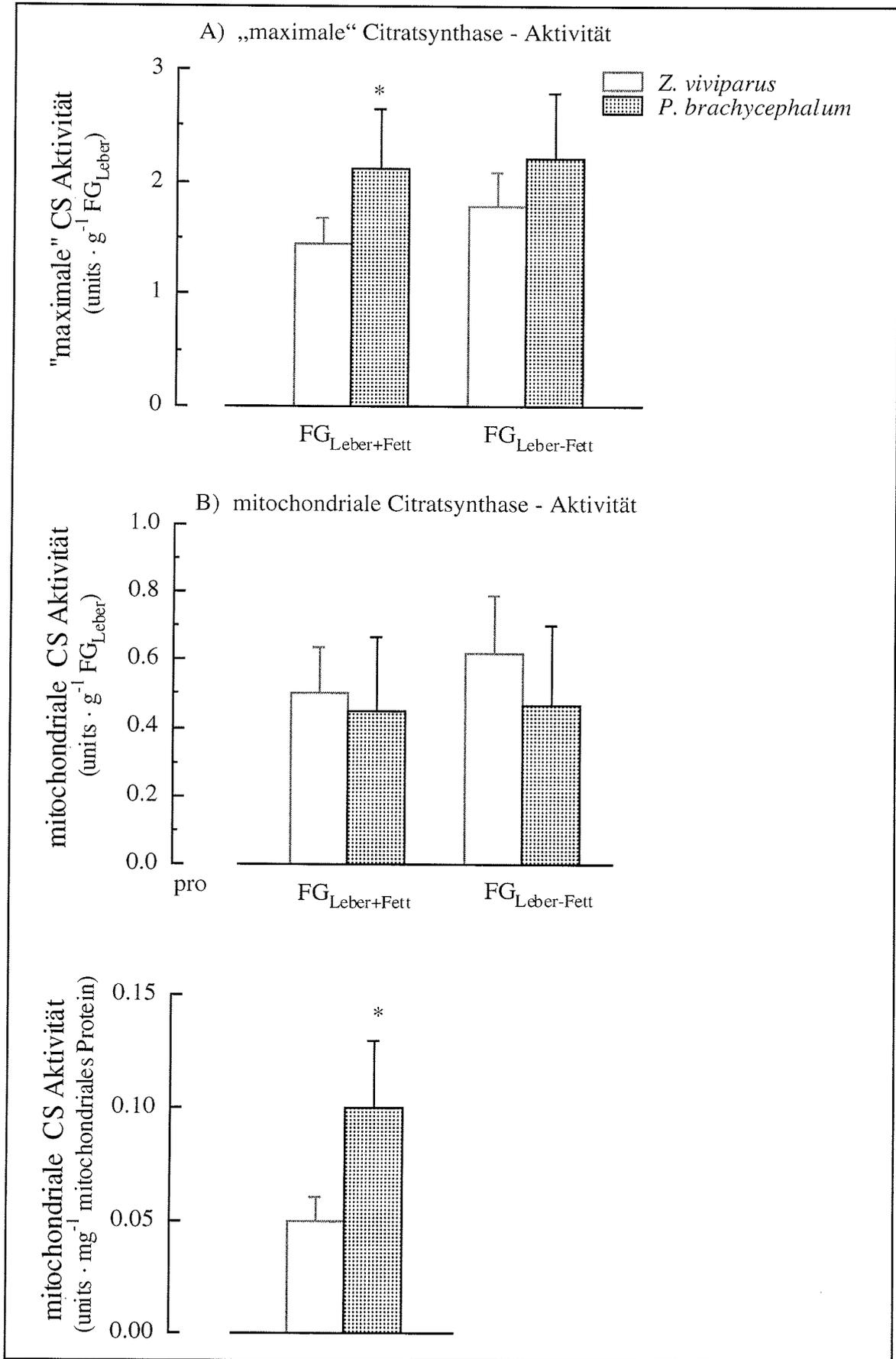


Abb. 3.2.4 Citratsynthase-Aktivität der beiden Arten im Vergleich bei 25°C (MW±S.D., *: signifikanter Unterschied zwischen den Arten, Test: ungepaarter t-Test, n = 4-12)

3.2.2 Mitochondrialer Proteingehalt der Leber

Durch die Bestimmung der Citratsynthase-Aktivität in isolierten Lebermitochondrien ebenso wie in Leberstücken konnte eine genauere Bestimmung des mitochondrialen Proteingehalts der Leber vorgenommen werden. Die „Korrektur“ ergab einen mitochondrialen Proteingehalt von $27,67 \pm 10,97 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1} \text{ FG}_{\text{Leber}}$ bei *Z. viviparus* und von $19,61 \pm 5,02 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1} \text{ FG}_{\text{Leber}}$ bei *P. brachycephalum*. Es war kein signifikanter Unterschied gegeben (Abb. 3.2.5). Ohne Korrektur lagen die Werte bei $9,03 \pm 3,14 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1} \text{ FG}_{\text{Leber}}$ (*Z. viviparus*) und bei $5,52 \pm 3,24 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1} \text{ FG}_{\text{Leber}}$ (*P. brachycephalum*). Diese Werte geben jedoch keinen guten Anhaltspunkt für die „Notwendigkeit“ einer „Korrektur“, da zum einen der zweite Homogenisationsgang bei der Präparation wegfiel, und zum anderen eine Ultrazentrifuge benutzt werden mußte (s. Material- und Methodenteil 2.2.2), die für solche geringen Umdrehungszahlen (300 bis 9500 g) nicht unbedingt geeignet scheint, da sie eine lange Bremsdauer hat und der Pellet nicht so „fest saß“ wie bei der Zentrifugation mit der Sigma Zentrifuge, die für die Präparationen bei den mitochondrialen Respirationsversuchen benutzt wurde (eigene Beobachtung). Bei den Respirationsversuchen, bei denen großer Wert auf eine optimale Ausbeute an mitochondrialem Protein gelegt worden war, betrug der Proteingehalt $22,22 \pm 7,34 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1} \text{ FG}_{\text{Leber}}$ (*Z. viviparus I*, Hälterung im Institut seit September 1998, Zeitpunkt der Messung: November 1998). Aus der Abb. 3.2.5 ist ersichtlich, daß der Wert sich im Vergleich zu den "korrigierten" mitochondrialen Proteingehalten der Exemplare von *Z. viviparus II* (Hälterung im Institut seit August 1999, Zeitpunkt der Messung: August 1999) und *P. brachycephalum* (Hälterung im Institut seit März 1998, Zeitpunkt der Messung: August 1999) nicht signifikant unterschied.

Unter Berücksichtigung des Lipidanteils der Leber, ebenso dargestellt in Abbildung 3.2.5, ergab sich jedoch ein signifikant höherer mitochondrialer Proteingehalt der Leber von *Z. viviparus II* ($34,38 \pm 13,55 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1} \text{ FG}_{\text{Leber-Lipid}}$) im Vergleich zu den Werten von *Z. viviparus I* ($22,91 \pm 7,57 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1} \text{ FG}_{\text{Leber-Lipid}}$) und von *P. brachycephalum* ($20,52 \pm 5,25 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1} \text{ FG}_{\text{Leber-Lipid}}$).

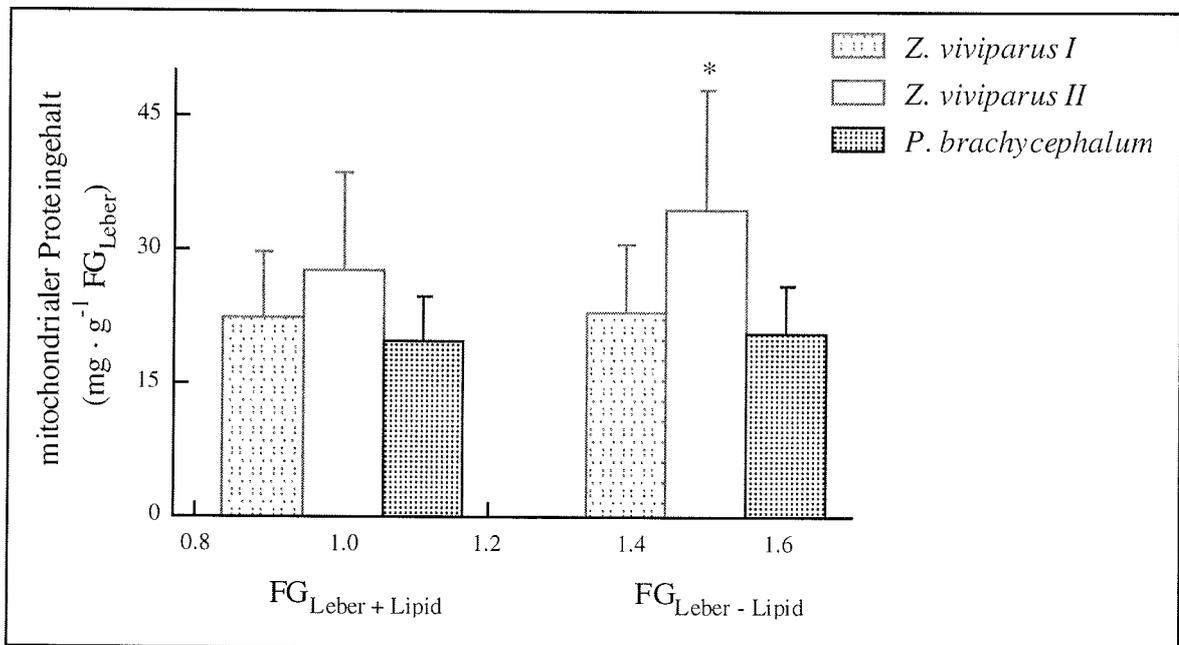


Abb. 3.2.5 Mitochondrialer Proteingehalt der Leber (MW±S.D., *: signifikanter Unterschied zu den Exemplaren *Z. viviparus I* und *P. brachycephalum*, Test: ungepaarter t-Test, n=7-9)

3.3 Lipidgehalt

Bei der Bestimmung des Lipidgehalts der Leber ergab sich sowohl zwischen den unterschiedlichen Arten, *Z. viviparus* und *P. brachycephalum*, als auch im Vergleich zwischen den beiden zeitlich unterschiedlichen Fängen von *Z. viviparus* ein signifikanter Unterschied. (Abb. 3.3.1)

Die Exemplare von *Z. viviparus*, die im August 1999 in der Kieler Bucht gefangen wurden, hatten einen signifikant höheren Lipidanteil der Leber von $18,5 \pm 6,9\%$ als die antarktische Art mit einem Anteil von $4,6 \pm 1,0\%$ Lipid, die seit Juni 1998 im Aquarium gehalten wird. Ebenso signifikant höher war der Lipidgehalt der Leber von *Z. viviparus* im Vergleich zu den artgleichen Exemplaren aus der Ostsee, die sich seit September 1998 im Aquarium des Instituts befanden und einen Lipidanteil von $3,0 \pm 0,4\%$ hatten (Abb. 3.3.1).

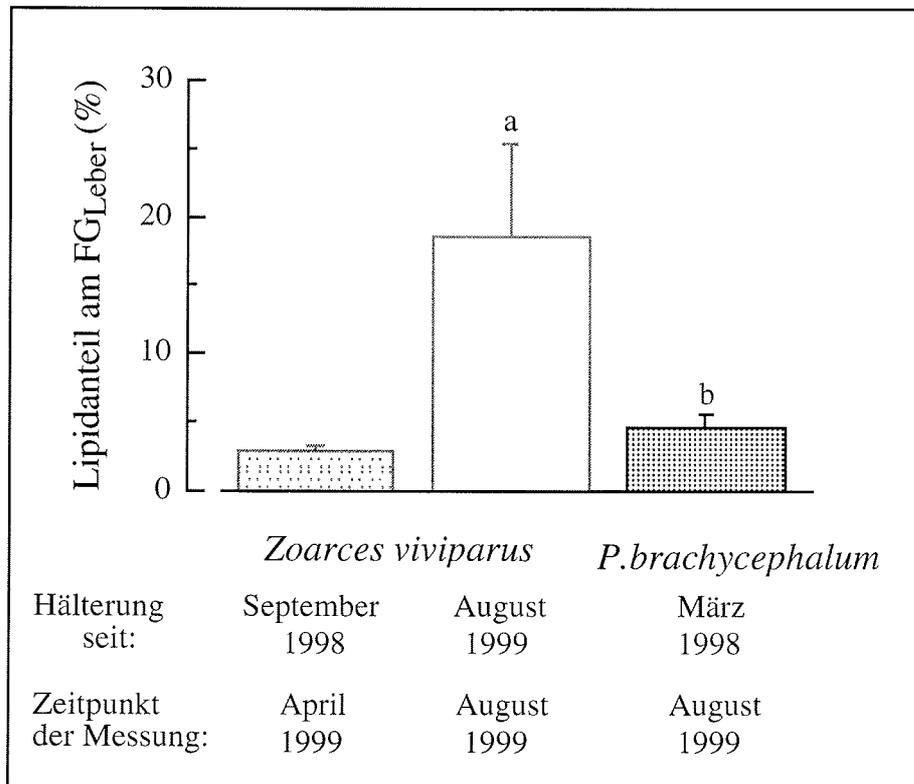


Abb. 3.3.1 Lipidgehalt der Leber von *Z. viviparus* und *P. brachycephalum* mit Angaben der verschiedenen Hälterungs- und Meßzeiten (MW±S.D., a: signifikanter Unterschied zum Lipidgehalt von *Z. viviparus* (1998) und von *P. brachycephalum*; b: signifikanter Unterschied zum Lipidgehalt von *Z. viviparus* (1998 und 1999), n=6-7)

Der hepatosomatische Index (FG der Leber dividiert durch FG des Individuums multipliziert mit 100) von *P. brachycephalum* war sowohl ohne Berücksichtigung als auch mit Berücksichtigung des Lipidanteils signifikant höher als der Index von *Z. viviparus*. Der hepatosomatische Index ($FG_{\text{Leber} + \text{Lipid}} / FG_{\text{Individuum}} \cdot 100$) von *P. brachycephalum* mit einem Wert von $1,90 \pm 0,50$ war um den Faktor $1,45 \pm 0,61$ größer als der somatische Leberindex von *Z. viviparus* mit einem Wert von $1,50 \pm 0,50$. Unter Berücksichtigung des Lipidanteils der Leber verringerte sich der somatische Index der antarktischen Art auf einen Wert von $1,80 \pm 0,40$ und blieb um den Faktor $1,69 \pm 0,72$ signifikant höher als der Index von *Z. viviparus* mit einem verringerten Wert von $1,20 \pm 0,40$. Wie schon bei der Bestimmung des mitochondrialen Proteingehalts der Leber, spiegelt sich auch hier die Bedeutung des Lipidgehalts der Leber beim Artenvergleich wider.

Der Vergleich des hepatosomatischen Indexes von *P. brachycephalum* mit dem Index der Exemplare von *Z. viviparus*, die ebenfalls seit etwa einem Jahr im Aquarium gehalten

wurden, ergab ebenso einen signifikanten Größenunterschied der Lebern, bezogen auf das FG des Individuums. Hier war der Index der antarktischen Art um den Faktor $3,13 \pm 1,00$ ohne Einbeziehung des Lipidanteils, und um den Faktor $3,08 \pm 0,98$ mit Einbeziehung des Lipidgehalts größer als der Index von *Z. viviparus*. Die Faktoren waren in Bezug auf ihre Größenordnung signifikant unterschiedlich.

4 Diskussion

Aufgrund der Fähigkeit von Mitochondrien, aus chemischen Brennstoffen nutzbare Energie in Form von ATP herzustellen, waren sie für die Entwicklung komplexer Lebewesen unerlässlich, da die ATP-Ausbeute um ein Vielfaches höher ist als allein über die Glycolyse. Inwieweit sich mitochondriale Eigenschaften an die Temperaturverhältnisse des jeweiligen Lebensraums verschiedener Fischarten angepaßt haben und somit möglicherweise zu deren Verbreitungsgrenzen beitragen, sollte in dieser Arbeit untersucht werden.

Dazu wurden Respirationsversuche an isolierten Lebermitochondrien aus zwei verschiedenen Arten der Familie Zoarcidae durchgeführt. *Z. viviparus* kommt als eurytherme Art unter anderem in der Ostsee vor, wohingegen *P. brachycephalum* als kaltstenotherme Art bisher nur in der Antarktis gefunden wurde. Die mitochondrialen Respirationsversuche mit der antarktischen Art hatten nicht den erwünschten Erfolg, weder mit dem Substrat Succinat noch mit Pyruvat + Malat konnten auswertbare Respirationsraten (state III, state IV und state IV_{ol}) ermittelt werden. Aufgrund der anscheinend fettreicheren Leber von *P. brachycephalum* wurde die Vermutung aufgestellt, daß der Lipidgehalt möglicherweise bei der Isolierung und der Respiration von Mitochondrien eine Rolle spiele. Aus diesem Anlaß wurde der Lipidgehalt der Leber für beide Arten ermittelt, wobei die Ergebnisse jedoch nicht den erwarteten hohen Unterschied zeigten (s. Ergebnisteil 3.3). Somit konnte der Lipidanteil nicht der störende Faktor sein. Ein weiterer Hinweis dafür waren die Versuche mit Mitochondrien aus im August gefangenen Exemplaren von *Z. viviparus*. Diese hatten einen signifikant höheren Lipidgehalt der Leber (18,5%) sowohl im Vergleich zu den seit etwa einem Jahr gehälterten artgleichen Exemplaren (3,0%), als auch zu *P. brachycephalum* (4,6%), zeigten aber dennoch auswertbare mitochondriale Respirationsraten. Im Vergleich zu Mitochondrien aus *Z. viviparus* mit geringerem Lipidgehalt der Leber ergaben sich pro mg mitochondrialem Protein ähnliche Sauerstoffverbrauchswerte (Sauerstoffverbrauch bei

10°C: $12,83 \pm 4,74$ nmol O · mg⁻¹ mitochondrialem Protein (*Z. viviparus* mit geringem Leber-Lipidanteil) und $16,90 \pm 9,54$ nmol O · mg⁻¹ mitochondrialem Protein (*Z. viviparus* mit hohem Leber-Lipidanteil)). Die Daten der Respirationsversuche mit den frischgefangenen Tieren von *Z. viviparus* sind in dieser Arbeit nicht dargestellt, da mit diesen nur ein möglicher Unterschied zwischen den zwei Fängen ausgeschlossen werden sollte. Nach der Erkenntnis, daß der Lipidgehalt nicht als störender Faktor für die Präparation der antarktischen Mitochondrien in Frage kommt, konnte jedoch aus zeitlichen Gründen nicht länger nach der Ursache für die schlechten Respirationsergebnisse geforscht werden.

Bei der schriftlichen Ausarbeitung der Arbeit wurde deutlich, daß das verwendete Substrat für die mitochondriale Respiration eine entscheidende Rolle spielt (s. folgenden Absatz). Deshalb wird nun vermutet, daß das Problem bei der mitochondrialen Respiration der antarktischen Aalmutterart im verwendeten Substrat (Succinat und Pyruvat + Malat) lag. Aus einer Arbeit von Sidell (1991) geht hervor, daß im Muskelgewebe antarktischer Fische eine deutliche Präferenz für die Verstoffwechslung monoungesättigter Fettsäuren besteht.

4.1 Respirationseigenschaften von Lebermitochondrien bei *Zoarces viviparus*

Die maximale oxidative Kapazität von isolierten Lebermitochondrien von *Z. viviparus* lag mit einem Sauerstoffverbrauch bei 15°C von $19,78 \pm 5,75$ nmol O · min⁻¹ · mg⁻¹ mitochondrialem Protein (mit Succinat) und von $14,27 \pm 1,28$ nmol O · min⁻¹ · mg⁻¹ mitochondrialem Protein (mit Pyruvat + Malat) unterhalb der ermittelten Werte von Suarez und Hochachka (1981) bei der Regenbogenforelle. In deren Arbeit hatte die state III Respiration isolierter Lebermitochondrien einen Wert von $64,3$ nmol O · min⁻¹ · mg⁻¹ mitochondrialem Protein (mit Succinat) und $50,8$ nmol O · min⁻¹ · mg⁻¹ mitochondrialem Protein (mit Pyruvat + Malat). Der Unterschied mag zum einen in der verschiedenen Lebensweise der untersuchten Fischarten liegen, da die Regenbogenforelle ein aktiverer Fisch als *Z. viviparus* ist, zum anderen in den schlechteren RCR-Werten dieser Arbeit. Suarez und Hochachka hatten höhere RCR-Werte von 3,7 (mit Succinat) und 4,8 (mit

Pyruvat + Malat) im Gegensatz zu den Werten dieser Arbeit von $3,16 \pm 1,24$ (mit Succinat) und $2,80 \pm 0,95$ (mit Pyruvat + Malat). Im Vergleich zu einer Arbeit von Moyes *et al.* (1986) an isolierten Lebermitochondrien der Rochenart *Raja erinacea*, die eine ähnlich ruhige Lebensweise führt wie *Z. viviparus*, zeigt sich zwischen den state III Respirationswerten bei 10°C kein Unterschied. So lag der Wert von *R. erinacea* bei $10,49 \pm 0,94$ nmol O · min⁻¹ · mg⁻¹ mitochondrialem Protein (Glutamat + Pyruvat) und der hier ermittelte Wert von *Z. viviparus* bei $12,83 \pm 4,74$ nmol O · min⁻¹ · mg⁻¹ mitochondrialem Protein (Pyruvat + Malat). Die state III Respirationsraten isolierter Muskelmitochondrien verschiedener Fischarten von demersaler bis zu pelagisch-aktiver Lebensweise unterschiedlicher Habitate (Antarktis, Subantarktis und Mittelmeer) aus einer Arbeit von Johnston *et al.* (1998) waren mit Pyruvat + Malat als Substrat höher als die Werte dieser Arbeit. Der mitochondriale Sauerstoffverbrauch der subantarktischen Arten lag im Bereich ihrer Habitattemperatur (ca. 5° bis 12°C) zwischen ungefähr 40 und 60 nmol O · min⁻¹ · mg⁻¹ mitochondrialem Protein. Isolierte Muskelmitochondrien aus *Myoxocephalus scorpius* (Seeskorpion aus der Nordsee) (Johnston *et al.*, 1994) oxidierten Pyruvat mit einer Sauerstoffverbrauchsrate zwischen 25 bis 80 nmol O · min⁻¹ · mg⁻¹ mitochondrialem Protein (3° bis 12,5°C). Die oxidative Kapazität von Mitochondrien des roten Muskels liegt jedoch im allgemeinen höher als von Mitochondrien der Leber (van den Thillart und Modderkolk, 1978).

Der Vergleich der Q₁₀-Werte ergab für die oxidative Kapazität isolierter Lebermitochondrien von *Z. viviparus* zu isolierten Muskelmitochondrien der oben genannten Untersuchungen höhere Werte. Johnston *et al.* (1998) ermittelte in der Arbeit für die mitochondriale state III Respiration der subantarktischen Arten einen Q₁₀-Wert von etwa 2 und für die des Seeskorpions (Johnston *et al.*, 1994; Guderley und Johnston, 1996) wurde ein Wert von 2,47 bis 2,60 angegeben. Der hier ermittelte Q₁₀-Wert dagegen liegt für die Oxidation mit Succinat bei $4,05 \pm 1,00$ (3° bis 15°C) und mit Pyruvat + Malat bei $3,60 \pm 0,48$ (1° bis 30°C). Dies ist möglicherweise ein Hinweis auf gewebespezifische Unterschiede in der Temperaturabhängigkeit mitochondrialer Eigenschaften. Hardewig *et*

al. (1999a) ermittelten zwar für die state III Respiration isolierter Lebermitochondrien aus *L. nudifrons* (antarktischer Notothenioid) einen niedrigeren Q_{10} -Wert von $2,43 \pm 0,26$ (0° bis 15°C , mit Succinat), der im Bereich der oben genannten Q_{10} -Werte isolierter Muskelmitochondrien liegt, und eine Arrhenius-Aktivierungsenergie von $47,5 \pm 6,5 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$, jedoch geht mit einer Kälteakklimatisierung und Kälteadaptation eine Erniedrigung der Stoffwechselrate einher (Dahlhoff *et al.*, 1991). So zeigt ein Vergleich zur oxidativen Kapazität isolierter Lebermitochondrien aus *Z. viviparus* des Weißen Meers (Sommer, unveröffentlichte Daten) eine niedrigere Aktivierungsenergie von etwa $40 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ (7° bis 20°C , mit Succinat) im Gegensatz zu dem hier ermittelten Wert von $89,8 \pm 18,57 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ (3° bis 15°C , mit Succinat). Auch Guderley und Johnston (1996) fanden erniedrigte Aktivierungsenergien mitochondrialer Respirationsraten bei kaltakklimatisiertem (5°C) Seeskorpion *Myoxocephalus scorpius* von $55,44 \pm 4,78 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ im Gegensatz zu $70,19 \pm 4,24 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ bei 15°C akklimatisierten Tieren. Blier und Guderley (1993) fanden erniedrigte ATP-Syntheseraten im roten Muskelgewebe kaltakklimatisierter Regenbogenforellen.

Neben der saisonalen Abhängigkeit der oxidativen Kapazität von Mitochondrien (Guderley und St. Pierre, 1999) hat auch das verwendete Substrat einen wesentlichen Einfluß auf mitochondriale Respirationsraten (Moon und Ouellet, 1979; Suarez und Hochachka, 1981; Moyes *et al.*, 1990; Johnston *et al.*, 1994). Diese Abhängigkeit wurde in der hier vorliegenden Arbeit bei der Verwendung der verschiedenen Substrate Succinat und Pyruvat + Malat untersucht.

Zeigte die oxidative Kapazität mit beiden Substraten bis 15°C keinen Unterschied im Sauerstoffverbrauch, so lag dieser ab 20°C mit Pyruvat + Malat signifikant über dem Sauerstoffverbrauch mit Succinat (s. Abb. 3.1.1 A) Dies scheint auf eine Temperaturempfindlichkeit der Succinat-Dehydrogenase hinzuweisen, was sich in einer ermittelten *Arrhenius Break Temperatur* (ABT) bei 15°C bei der state III Respiration mit Succinat widerspiegelt (s. Abb. 3.1.3). Zeigte sich bis 15°C kein Unterschied in den Arrhenius-Aktivierungsenergien und Q_{10} -Werten beider Substrate, so waren die Werte

oberhalb dieser Temperatur mit Pyruvat + Malat signifikant höher (mit Succinat (15° bis 30°) $E_a = 32,05 \pm 9,5 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ und $Q_{10} = 1,49 \pm 0,25$; mit Pyruvat + Malat (1° bis 30°C) $E_a = 90,96 \pm 7,89 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ und $Q_{10} = 3,60 \pm 0,48$). Somit konnte anscheinend die Aktivität der Succinat-Dehydrogenase durch höhere Temperaturen nicht weiter gesteigert werden. Die Ergebnisse deuten möglicherweise auf eine Denaturierung der Succinat-Dehydrogenase hin, da der Sauerstoffverbrauch in der Differenz state III - state IV_{oi} (ab 15°C) mit zunehmender Temperatur keinen Anstieg nach der Q_{10} -Beziehung verzeichnete, sondern mehr oder weniger um einen Wert von 15,94 nmol O · min⁻¹ · mg⁻¹ mitochondrialem Protein konstant blieb. Pörtner *et al.* (1999a) fanden bei der mitochondrialen Respiration mit Glutamat + Pyruvat als Substrat bei der antarktischen Muschel *L. elliptica* eine ABT bei 9°C. Sie schlußfolgerten, daß die ABT möglicherweise auf fortschreitende Denaturierung mitochondrialer Proteine zurückzuführen sei, da die NADP⁺-abhängige Isocitrat-Dehydrogenase bei der gleichen Temperatur eine ABT in der Aktivität zeigte.

Bei der Verwendung von Pyruvat + Malat spielte eine mögliche ABT der Succinat-Dehydrogenase bei 15°C keine wesentliche Rolle, da die Sauerstoffverbrauchswerte in der state III – state IV_{oi} – Darstellung keine Abnahme zeigten (Abb. 3.1.1 B). Unter den hier gemessenen *in vitro* Bedingungen kann keine Anreicherung von Succinat, das in extrem hohen Konzentrationen vorliegende Prozesse im Citratzyklus hemmen könnte, in der Mitochondrienmatrix auftreten. Zum einen vermitteln Dicarboxylat-Carrier den Transport von Succinat über die innere Mitochondrienmembran und zum anderen ist die zugegebene Konzentration gering (3,3 µmol in 1 ml). Der Nachschub an benötigtem Oxalacetat, der bei einer Denaturierung der Succinat-Dehydrogenase nicht gewährleistet wäre (Succinat -> Fumarat -> Malat -> Oxalacetat), erfolgte über die Zugabe von Malat, so daß die "rechte Seite" des Citratzyklus (Oxalacetat + Acetyl-CoA -> Citrat -> Isocitrat -> α -Ketoglutarat -> Succinyl-CoA -> Succinat) ohne Einschränkung ablaufen kann. Bei der mitochondrialen Respiration mit Succinat könnte fehlendes Pyruvat, und somit Acetyl-CoA, entweder über das

NADP⁺-abhängige Malatenzym (*malic enzyme*) aus Malat oder über die Pyruvat-Carboxylase aus Oxalacetat gebildet werden, so daß ebenfalls der gesamte Citratzyklus durchlaufen werden könnte. Aus den oben schon erwähnten *in vitro* Bedingungen kann jedoch keine Anreicherung in so hohen Konzentrationen erfolgen, die das enzymatische Gleichgewicht auf die Seite der Pyruvatbildung verschieben würden. In der Leber sind in den Mitochondrien beim Transport und Metabolismus von Pyruvat mehrere anabolische und katabolische Stoffwechselwege involviert. Somit können hohe Sauerstoffverbrauchsdaten isolierter Lebermitochondrien bei der Verwendung von Pyruvat keine eindeutige Erklärung für den Pyruvat-Metabolismus liefern (Moyes *et al.*, 1990) und obige Ausführung ist möglicherweise zu theoretisch und zu eng an den Citratzyklus gekoppelt.

Die gemittelten Habitatterperaturen von *Z. viviparus* der Ostsee steigen im Sommer nicht über 15°C (Dippner, 1999). Aus diesem Grund scheint eine ABT für die Succinat-Dehydrogenase bei 15°C wahrscheinlich, obwohl damit noch keine Verbreitungsgrenze für *Z. viviparus* festgelegt werden kann. Verstärkt wurde der Eindruck einer ABT mit Succinat bei 15°C durch den signifikant niedrigeren RCR- und RCR₀₁-Wert im Temperaturbereich 20° bis 30°C im Vergleich zu dem Wert von 10° bis 15°C, wohingegen die RCR- und RCR₀₁-Werte mit Pyruvat + Malat im oberen Temperaturbereich (15° bis 30°) keine signifikante Temperaturabhängigkeit zeigten (s. Abb. 3.1.6 und 3.1.7). Die niedrigen RCR- und RCR₀₁-Werte mit Succinat sind durch die geringer erhöhten Respirationsraten bei den hohen Temperaturen bedingt, da die Kopplungsgrade durch die Division state III / state IV bzw. state III / state IV₀₁ berechnet wurden. In einem vergleichenden Überblick von *Arrhenius Break Temperatures* verschiedener Fisch- und Invertebratenarten zeigten die ABTs von entkoppelten Mitochondrien eine Korrelation mit der Habitatterperatur (Weinstein und Somero, 1998). Sie lagen jeweils oberhalb der Habitatterperatur, wobei der Unterschied zwischen Habitatterperatur und ABT bei niedrigen Umgebungstemperaturen größer war. Bei einer Umgebungstemperatur von 25°C betrug der Unterschied etwa 15°C, wohingegen er bei einer Umgebungstemperatur von

5°C einen Wert von 25°C erreichte. In dieser Arbeit wurde möglicherweise eine ABT gefunden, die im Bereich der oberen Habitattemperatur für *Z. viviparus* im Sommer liegt. Aber es muß beachtet werden, daß diese ABT nur für die Respiration mit Succinat zutrifft, woraus die Bedeutung des Substrats für die mitochondriale Respiration ersichtlich wird. Es erscheint angebracht, Respirationsversuche an isolierten Mitochondrien erst auf Substratunterschiede zu testen, um so die Substratpräferenz vom Gewebe des jeweiligen Versuchstiers ermitteln zu können, mit der dann ein Vergleich zwischen unterschiedlichen Arten vereinfacht werden kann.

Der Sauerstoffverbrauch, der durch Protonen-Leckströme (protonen leakage) verursacht wurde, stieg mit beiden Substraten in ähnlicher Weise an (s. Abb. 3.1.2 B). Jedoch war der *protonen leakage*-Anteil an der state III Respiration mit Succinat ab 20°C signifikant an (s. Tab. 3.1.1), bedingt durch die verminderte oxidative Respiration bei der Verwendung mit Succinat. Die Stärke der Protonen-Leckströme hat Einfluß auf die Kopplungsgrade, da diese mittels der Division state III / state IV, bzw. state III / state IV_{oi} berechnet wurden, und *protonen leakage* während der state IV Respiration, die den Zustand der ruhenden Zelle darstellt, zum Sauerstoffverbrauch beiträgt (Pörtner *et al.*, 1999b). Der *protonen leakage*-Anteil wirkte sich bei der Berechnung der Kopplungsgrad-Werte der unteren Temperaturen (bis 5°C) aufgrund der niedrigen state III Respiration mehr aus, als bei den höheren Temperaturen. Deutlich wurde dies bei der Betrachtung der RCR_{oi}-Werte mit Pyruvat + Malat, die im unteren Temperaturbereich keinen Unterschied zu den Werten mit Succinat zeigten, ab 20°C jedoch signifikant oberhalb der RCR_{oi}-Werte mit Succinat lagen (s. Abb. 3.1.7). Die höheren Arrhenius-Aktivierungsenergien und Q₁₀-Werte, die für *protonen leakage* bei der Verwendung mit Pyruvat + Malat im Vergleich zu Succinat ermittelt wurden, sind in dessen Abhängigkeit von der protonenmotorischen Kraft und somit vom Protonengradienten begründet (Pörtner *et al.*, 1999b). Mit Pyruvat + Malat wird aufgrund höherer Kapazität der Substratoxidation ein stärkerer Protonengradient aufgebaut als mit Succinat.

Bei der Oxidation von Pyruvat wird der gesamte Citratzyklus durchlaufen. An der Oxidation des gebundenen $\text{NADH} + \text{H}^+$ sind alle drei Komplexe der Atmungskette (Komplex I: NADH-Dehydrogenase, Komplex II: Cytochrom-Reduktase, Komplex III: Cytochrom-Oxidase) beteiligt, wohingegen bei der Oxidation von Succinat nur Komplex II und III beteiligt sind. Somit werden mit Pyruvat mehr Protonen aus der Matrix gepumpt, was zu einer höheren ATP-Ausbeute führt (s. Abb. 3.1.8). Die ermittelten P/O-Verhältnisse lagen ab 10°C um einen Mittelwert von $2,29 \pm 0,53$ (mit Succinat) und von $3,17 \pm 0,65$ (mit Pyruvat + Malat). Sie liegen etwas höher, jedoch im Bereich ermittelter Werte von Suarez und Hochachka (1981) bei der Regenbogenforelle mit 1,8 (mit Succinat) und mit 2,5 (mit Pyruvat + Malat). Ebenso stimmen sie mit den klassisch bestimmten P/O-Verhältnissen von *Z. viviparus* vom Weißen Meer (Sommer, unveröffentlichte Daten) überein. Im Vergleich zu dem antarktischen Fisch *L. nudifrons*, bei dem P/O-Verhältnisse um einen Mittelwert von $1,52 \pm 0,02$ im untersuchten Temperaturbereich (0° bis 18°C) lagen (Hardewig *et al.*, 1999a), ergaben sich hier höhere Werte. Dies kann wie schon die unterschiedlichen Werte der state III Respiration auf eine Anpassung der oxidativen Kapazität der antarktischen Mitochondrien deuten oder eine Anpassung an einen erniedrigten Energiebedarf bedeuten. Anfangs erstaunlich war, daß die P/O-Verhältnisse, wie schon die Arbeit von Hardewig bei *L. nudifrons* (1999a) zeigte, trotz Abnahme der Kopplungsgrade einen mehr oder weniger konstanten Wert im oberen Temperaturbereich beibehielten (s. Abb. 3.1.8). Jedoch hängt der Kopplungsgrad vom *protonen leakage* ab, der während der state III Respiration unter Substratsättigung keine Rolle spielen sollte (siehe oben). Unter *in vivo* Bedingungen, bei denen so gut wie keine Substratsättigungen auftreten, sollten die P/O-Werte mit steigender Temperatur geringer ausfallen als die hier gemessenen, da *protonen leakage* mit zunehmender Temperatur ansteigt (s. Abb. 3.1.2 B). Allerdings ist im unteren Temperaturbereich (bis 5°C) eine Korrelation zwischen Kopplungsgrad und P/O-Verhältnissen mit beiden Substraten ersichtlich. Dies ist möglicherweise auf das höhere Membranpotential bei niedrigen Temperaturen zurückzuführen, bedingt durch verminderten Einsatz der ATPase, aber

hoher NADPH-Konzentration. Der Unterschied zwischen den P/O-Verhältnissen im unteren Temperaturbereich der zwei Ermittlungsmethoden (klassisch gegenüber luminometrisch; s. Abb. 3.1.9) erklärt sich möglicherweise durch die schlecht auswertbaren Schreiberaufzeichnungen (klassische Methode) der mitochondrialen Respiration bei den niedrigen Temperaturen.

4.2 Spezifische Citratsynthase Aktivität

Die Messung der spezifischen Citratsynthase-Aktivität bei *Z. viviparus* und *P. brachycephalum* in Abhängigkeit von der Temperatur zeigte über den gesamten Messtemperaturbereich bei der antarktischen Art signifikant höhere Werte der Aktivität pro mg mitochondrialem Protein (um den Faktor 2) als bei der Aalmutterart der Ostsee (s. Abb. 3.2.1). Der Q_{10} von 0° bis 25°C betrug bei *Z. viviparus* $1,85 \pm 0,13$ und bei *P. brachycephalum* $1,62 \pm 0,03$. Die entsprechenden Arrhenius-Aktivierungsenergien lagen bei $42,57 \pm 4,13 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ (*Z. viviparus*) und bei $34,99 \pm 1,70 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ (*P. brachycephalum*). Die hier gefundene Temperaturabhängigkeit der Citratsynthase-Aktivität bei beiden Arten entspricht ermittelten Q_{10} -Werten von Enzymaktivitäten anderer Arbeiten. So lag der Q_{10} (1° - 10°C) für die Citratsynthase-Aktivität und für die Cytochrom-c-Oxidase-Aktivität im weißen Muskel von *Myoxocephalus octodecimspinosus* (benthische Fischart gemäßiger Breiten) zwischen 1,65 und 1,76 (Crockett und Sidell, 1989). Hardewig *et al.* (1999b) ermittelten sowohl im weißen Muskel, als auch in der Leber von *Z. viviparus* und *P. brachycephalum* für die Cytochrom-c-Oxidase-Aktivität einen Q_{10} (0° - 18°C) von 1,4 bis 1,5. Im roten Muskelgewebe der Regenbogenforelle (Sommertiere und Wintertiere) betrug der Q_{10} im Temperaturbereich 8° bis 22°C etwa 1,4 für die Cytochrom-c-Oxidase-Aktivität, für die Carnitinpalmitoyl-Transferase 1,61 – 1,69 und für die Citratsynthase-Aktivität lag er zwischen 1,56 (Wintertiere) und 1,75 (Sommertiere).

Die ermittelten Enzymaktivitäten ($\text{units} \cdot \text{g}^{-1} \text{FG}_{\text{Gewebe}}$) waren bei kaltakklimatisierten und kaltadaptierten Arten um den Faktor 1,3 bis 5 im Muskelgewebe (Crockett und Sidell,

1989; St. Pierre *et al.*, 1998) signifikant höher als die Werte bei warmakklimatisierten Tieren. Auch in dieser Arbeit ergab die Messung der "maximalen" Citratsynthase-Aktivität pro Gramm FG_{Leber} höhere Werte für die polare Art im Vergleich zur nahverwandten Art der Ostsee (s. Abb. 3.2.4). Ohne Berücksichtigung des Lipidgehalts der Leber lag die Enzymaktivität mit $2,11 \pm 0,54 \text{ units} \cdot \text{g}^{-1} FG_{\text{Leber+Lipid}}$ von *P. brachycephalum* um das 1,5fache über dem Wert von *Z. viviparus* mit $1,44 \pm 0,23 \text{ units} \cdot \text{g}^{-1} FG_{\text{Leber+Lipid}}$. Nach Abzug des Lipidgehalts des Gewebes unterschieden sich die Werte nur noch um den Faktor 1,2, bedingt durch den hohen Leberlipidgehalt der Exemplare aus der Ostsee. Die Citratsynthase-Aktivitäten, die in isolierten Lebermitochondrien beider Arten gemessen wurden, ergaben pro Gramm Frischgewicht $_{\text{Leber}}$ ein umgekehrtes Verhältnis, denn hier lag die Aktivität der antarktischen Art unter der Aktivität von *Z. viviparus*. Das ist ein Hinweis auf die schlechte Mitochondrienausbeute, die bei der Präparation für die Citratsynthase-Messung erhalten wurde (s. Ergebnisteil 3.2.2) und spiegelt sich in den niedrigen "unkorrigierten" mitochondrialen Proteingehalten der Leber beider Arten wider ($9,03 \pm 3,14 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1} FG_{\text{Leber}}$ für *Z. viviparus* und $5,52 \pm 3,24 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1} FG_{\text{Leber}}$ für *P. brachycephalum*). Der mitochondriale Leberproteingehalt von *P. brachycephalum* lag auch nach der "Korrektur" (über die Enzymaktivität) unter dem Proteingehalt von *Z. viviparus* (s. Abb. 3.2.5). Aufgrund der 2fach höheren Citratsynthase-Aktivität pro mg mitochondrialem Proteingehalt und der höheren "maximalen" Citratsynthase-Aktivität pro Gramm Leber der antarktischen Aalmutter im Gegensatz zur Aalmutter der Ostsee (s. Abb. 3.2.4), zeigt *P. brachycephalum* somit eine eindeutige Anpassung an ihr polares Habitat, um bei den dort herrschenden niedrigen Temperaturen ihren Stoffwechsel aufrechterhalten zu können. Ob diese Kälteanpassung durch eine höhere Quantität und / oder durch eine verbesserte Qualität der Citratsynthase-Enzyme erreicht wurde, wäre noch genauer zu untersuchen.

Campbell und Davies fanden in der Leber von kaltakklimatisierten *Blennius pholis* signifikant höhere Succinat-Dehydrogenase-Aktivitäten pro mg mitochondrialem Protein und schlußfolgerten, daß diese Erhöhung zum Teil auf den Sättigungsgrad mitochondrialer

Membranlipide zurückzuführen sei. Die Erhöhung der Citratsynthase-Aktivität der antarktischen Art muß jedoch andere Gründe haben, da es sich bei der Citratsynthase um ein mitochondriales Matrixenzym handelt. Aus einer Arbeit von Vetter und Buchholz (1998) geht hervor, daß bei metabolischen Enzymen polarer Arten unterschiedliche Mechanismen der Temperaturadaptation zu finden sind: Erniedrigung der Aktivierungsenergie, Erhöhung der Enzym-Substrataffinität, Erhöhung der spezifischen Aktivität und / oder Erniedrigung inhibitorischer Effekte. Die Citratsynthase der antarktischen Aalmutterart *P. brachycephalum* zeigte im Vergleich zur nahverwandten *Z. viviparus* im Temperaturbereich 0° bis 25°C zum einen niedrigere Aktivierungsenergie (s. Abb.3.2.3 A) und zum anderen höhere Enzymaktivität (s. Abb. 3.2.4), somit kann für die polare Zoarcidenart von einer Kälteadaptation gesprochen werden.

Vergleicht man die Daten mit denen der Arbeit von Alp *et al.* (1976), so liegen die Citratsynthase-Aktivitäten pro Gramm FG ("maximale" Enzymaktivität) der hier vorliegenden Arbeit unter den Werten von Alp *et al.* (1976), die im roten Muskel temperierter Fischarten gefunden wurden (Werte in units / g FG bei 25°C: Leber (ohne Berücksichtigung des Lipidanteils): $1,44 \pm 0,23$ (*Z. viviparus*), $2,11 \pm 0,54$ (*P. brachycephalum*); roter Muskel: 35 (Kleingefleckter Katzenhai *S. canicula*), 50 (Forelle *S. gairdneri*). Auch St. Pierre *et al.* (1998) fanden höhere Citratsynthase Aktivitäten im roten Muskel der Regenbogenforelle *O. mykiss*. Die Werte spiegeln denselben Unterschied wider, der für die mitochondriale Respiration zwischen den Geweben gefunden wurde (van den Thillart und Modderkolk, 1978). Jedoch muß auch hier wieder die unterschiedliche Lebensweise der Arten in die Überlegung mit einbezogen werden, da die von Alp *et al.* (1976) und St. Pierre *et al.* (1998) untersuchten Fischarten im Vergleich zur Aalmutter eine viel aktivere Lebensweise haben.

Die Ergebnisse dieser Arbeit deuten auf eine mögliche *Arrhenius Break Temperatur* der Citratsynthase-Aktivität beider Arten bei 25°C hin (s. Abb. 3.2.2). Erstaunlich dabei ist, daß die Aktivität bei *Z. viviparus* abnimmt, der Q_{10} -Wert (25° bis 30°C) fiel auf einen Wert von $0,84 \pm 0,27$ ab, wohingegen der Q_{10} bei der antarktischen Art zunahm ($2,63 \pm 0,16$).

Ein Q_{10} unter Null deutet daraufhin, daß das Enzym, welches die Reaktion katalysiert, denaturiert ist. Dies ist der Fall für die Citratsynthase von *Z. viviparus*, jedoch nicht von *P. brachycephalum*, die sogar noch gesteigert werden konnte (s. Abb. 3.2.3). Dieser Befund entsprach nicht unseren Erwartungen. Es hat den Anschein, daß aufgrund unterschiedlicher Proteinstruktur die Citratsynthase der antarktischen Art temperaturunempfindlicher ist als die der Aalmuttern der Ostsee. Diese Vermutung paßt jedoch nicht zur ausgeprägten Stenothermie polarer Meeresbewohner, die somit eine frühere Denaturierung der Enzyme bei zunehmender Temperatur im Vergleich zu temperierten und tropischen Arten zeigen müßten (Pörtner *et al.*, 1999b). Jedoch muß beachtet werden, daß die Enzymbedingungen unter *in vivo* Verhältnissen komplexer als unter den hier vorliegenden Versuchsbedingungen sind und für eine eindeutige Aussage müssen noch weitere Messungen erfolgen. Zum einen lag die Anzahl der Versuchstiere bei *P. brachycephalum* nur bei 3 ($n = 9$ bei *Z. viviparus*) und zum anderen fehlen noch Werte bei höheren Temperaturen (35° und 40°C), womit dann auch eine statistische Auswertung (Regressionsanalyse) erfolgen kann. Messungen der Isocitrat-Dehydrogenase (Pörtner, unveröffentlichte Daten) deuten bei *Z. viviparus* ebenfalls auf eine ABT bei 25°C hin, jedoch ergibt sich dasselbe Problem wie bei den vorliegenden Daten der Citratsynthase, es fehlen Werte für die höheren Temperaturen.

Proteingehalt der Leber

Es ist bekannt, daß bei vielen Arten eine Kälteakklimatisierung oder Kälteakklimation zu einer Proliferation der mitochondrialen Dichte im Muskel führt (Tyler und Sidell, 1984; Egginton und Sidell, 1989; St. Pierre *et al.*, 1998). Auch in polaren Ectothermen wurden höhere mitochondriale Dichten gefunden (Londrville und Sidell, 1990; Psommer, 1998). Aus einer Arbeit von Campbell und Davies (1978) geht hervor, daß die Mitochondrien-Proliferation ebenso auf die Leber von *Blennius pholis* (Teleost) zutrifft. Jedoch wurde hier zudem noch eine Vergrößerung der Hepatocyten und ihrer Zellkerne gefunden. Im Gegensatz zu den oben genannten Befunden steht die Arbeit von Johnston *et al.* (1998) in der keine erhöhten mitochondrialen Volumendichten im Muskelgewebe

einiger polarer Perciformes gefunden wurden. Sie kamen zur Schlußfolgerung, daß die Erhöhung der oxidativen Kapazität in der Zunahme der Volumen- und Oberflächendichte mitochondrialer Gruppen (clusters) begründet sei.

Über die "Korrektur" des Proteingehalts mittels Citratsynthase-Aktivitätsmessungen bei 25°C, in Leberstücken und isolierten Lebermitochondrien, ergab sich ein niedrigerer Proteingehalt für *P. brachycephalum* ($19,61 \pm 5,02$ mg mitochondriales Protein / g FG_{Leber}) als für *Z. viviparus* ($27,6761 \pm 10,97$ mg mitochondriales Protein / g FG_{Leber}). Nach Abzug des Lipidgehalts der Leber wurde der Unterschied im mitochondrialen Proteingehalt der beiden Arten signifikant (s. Abb. 3.2.4). Dies könnte ein Hinweis sein, daß bei der Aalmutter andere Mechanismen der Kälteadaptation greifen, als die der Mitochondrien-Proliferation, jedoch kann ein gewebespezifischer Unterschied nicht ausgeschlossen werden. Für eine umfassendere Diskussion fehlen leider die Literaturdaten. Jedoch muß beachtet werden, daß keine exakte Zählung der einzelnen Mitochondrien ausgeführt wurde, sondern nur eine Messung des mitochondrialen Proteingehalts der Leber. Der Befund des geringeren mitochondrialen Proteingehalts für *P. brachycephalum* im Gegensatz zu *Z. viviparus* wird möglicherweise durch eine Arbeit von Hardewig *et al.* (1999b) unterstützt. Die Messung der Cytochrom-c Oxidase in der Leber von *Z. viviparus* (Nordsee, 18°C) und *P. brachycephalum* (Antarktis) ergab für die antarktische Art signifikant niedrigere Enzymaktivitäten pro Gramm FG_{Leber} , wobei jedoch keine Proteinbestimmung unternommen wurde.

Aufgrund des hepatosomatischen Index der zwei Arten, der für *P. brachycephalum* um den Faktor 1,45 (Wert für Leber mit Lipidgehalt) und um den Faktor 1,69 (Wert für Leber ohne Lipidgehalt) höher war als der Index von *Z. viviparus*, erscheint es wahrscheinlich, daß der geringere mitochondriale Proteingehalt der Leber von *P. brachycephalum* in Bezug auf das Ganztier keine Auswirkung hat. Durch Multiplizieren des Proteingehalts von *P. brachycephalum* ($20,52$ mg mitochondriales Protein $\cdot g^{-1} FG_{\text{Leber-Lipid}}$) mit dem Faktor 1,69 erhält man einen Proteingehalt von $34,68$ mg $\cdot g^{-1} FG$, der somit dem Proteingehalt von *Z. viviparus* von $34,38$ mg / g $FG_{\text{Leber-Lipid}}$ entspräche. Innerhalb der Leistung des

Organs für die Stoffwechselrate des Ganztiers ergäbe sich somit kein Unterschied. Hieraus ergibt sich nun allerdings die Frage nach dem Grund einer größeren Leber für die antarktische Aalmutter. Möglicherweise erfolgt über die vergrößerte Fläche pro Volumen eine Kompensierung des negativen Temperatureffekts auf die Viskosität des Blutes (Macdonald und Wells, 1991).

4.3 Lipidgehalt der Leber

Die Bestimmung des Lipidgehalts der Leber zeigte, daß dieser einen wesentlichen Einfluß auf den Vergleich von Gewebe zweier Arten hat. Bei den Exemplaren von *Z. viviparus* variierte er zwischen 3,0% (Hälterung seit September 1998) und 18,5% (frisch gefangene Exemplare im August 1999) und lag somit zum einen unter und zum anderen über dem Lipidgehalt der Leber von *P. brachycephalum* von 4,6% (Hälterung seit März 1998). Bei den Angaben des mitochondrialen Proteingehalt pro g FG_{Leber} ergaben sich erst nach Abzug des Lipidanteils der Leber der jeweiligen Art signifikante Unterschiede innerhalb der Werte (s. Abb. 3.2.5). Die Untersuchung von Pekkarinen (1980) zeigte saisonale Schwankungen im Lipidgehalt von *Z. viviparus* in Leber, Muskel und Gonaden. Im August, zur Zeit der Paarung wurde bei *Z. viviparus* (Golf von Finnland) der höchste Lipidgehalt der Leber mit einem Anteil von 37 - 44% am FG gefunden. Der niedrigste Lipidgehalt ergab sich im Frühling mit einem Wert zwischen 16 und 18%. Der Unterschied zu den Werten dieser Arbeit kann unter anderem an der verschiedenen Meßmethodik (Methode nach Folch *et al.*, 1957) und Ernährungszustand der Tiere liegen. Die Arbeiten deuten daraufhin, daß es sinnvoll wäre in zukünftigen Untersuchungen den jeweiligen Lipidgehalt des Gewebes miteinzubeziehen.

5 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde die Temperaturabhängigkeit mitochondrialer Respirationsraten an isolierten Lebermitochondrien der eurythermen Art *Z. viviparus* (Ostsee) bei der Verwendung verschiedener Substrate (Succinat und Pyruvat + Malat) im Temperaturbereich 1° bzw. 3° bis 30°C untersucht. Außerdem wurde die Citratsynthase-Aktivität in der Leber von *Z. viviparus* und der ihr nah verwandten stenothermen Art *P. brachycephalum* (Antarktis) in Hinblick auf eine mögliche Kälteadaptation des Enzyms der antarktischen Art im Temperaturbereich 0° bis 30°C gemessen. Der dritte Teil der Arbeit beinhaltete die Bestimmung des Lipidgehalts der Leber der zwei Arten.

Die mitochondrialen Respirationsraten von *Z. viviparus* zeigten mit beiden Substraten einen exponentiellen Anstieg im Sauerstoffverbrauch mit zunehmender Temperatur. Ab 20°C lag der mitochondriale Sauerstoffverbrauch mit Pyruvat + Malat signifikant über dem Sauerstoffverbrauch mit Succinat. Die Messung des durch Protonen-Leckströme verursachten Sauerstoffverbrauchs ergab mit Pyruvat + Malat höhere Aktivierungsenergien und Q_{10} -Werte als mit der Verwendung von Succinat. Die unterschiedliche Substrat-Oxidierung spiegelt sich ebenso in den höheren P/O-Verhältnissen mit Pyruvat + Malat wider. Außerdem konnte für die oxidative Respiration mit Succinat eine *Arrhenius Break Temperatur* (ABT) bei 15°C ermittelt werden. Somit ergab sich eine eindeutige Abhängigkeit der mitochondrialen Respiration vom verwendeten Substrat. Aus diesem Grund sollten isolierte Mitochondrien auf ihre Substrat-Präferenz getestet werden. So können Aussagen über einen Unterschied in der maximalen oxidativen Kapazität verschiedener Arten leichter getroffen werden. Vor allem wenn man in Betracht zieht, daß keine mitochondrialen Respirationsraten für die antarktische Art *P. brachycephalum* mit Succinat oder Pyruvat + Malat ermittelt werden konnten. Außerdem ergab sich eine deutliche Temperaturabhängigkeit für die Respiration isolierter Mitochondrien der eurythermen Exemplare von *Z. viviparus*. Im unteren Temperaturbereich (1° bis 10°C)

wurden signifikant niedrigere Kopplungsgrade und P/O-Verhältnisse als im Temperaturbereich 10° bis 30°C ermittelt.

Der Vergleich der Citratsynthase-Aktivität zwischen *Z. viviparus* und *P. brachycephalum* ergab im gesamten Temperaturbereich signifikant höhere Enzymaktivitäten für die antarktische Art. Aus dem Befund ergibt sich eine deutliche Kälteadaptation für *P. brachycephalum*. Unterstützt durch die niedrigere Aktivierungsenergie der Citratsynthase von *P. brachycephalum* im Vergleich zu *Z. viviparus* im Temperaturbereich 0° bis 25°C. Eine mögliche ABT für die Citratsynthase ergab sich für beide Arten bei 25°C, jedoch fehlt die statistische Auswertung aufgrund von fehlenden höheren Temperaturmeßwerten (35° und 40°C). Über die Messung der Citratsynthase-Aktivität in isolierten Lebermitochondrien und Leberstücken bei 25°C konnte eine genauere Ermittlung des mitochondrialen Proteingehalts der Leber vorgenommen werden. Es ergab sich nach Abzug des Lipidanteils der Leber ein signifikant höherer mitochondrialer Proteingehalt für *Z. viviparus* im Vergleich zu *P. brachycephalum*, der sich jedoch unter Berücksichtigung des hepatosomatischen Indexes der Arten relativierte. Somit ergab sich für die gesamte Leber für beide Arten ein ähnlicher mitochondrialer Proteingehalt.

Die Bestimmung des Lipidgehalts zeigte einen signifikant höheren Lipidgehalt der Leber für *P. brachycephalum* im Vergleich zum Lipidgehalt der seit ca. einem Jahr gehälterten Exemplare von *Z. viviparus*. In der Gegenüberstellung zu den frisch gefangenen Tieren von *Z. viviparus* lag der Lipidgehalt der antarktischen Art signifikant unter deren Wert. Der hepatosomatische Index von *P. brachycephalum* lag signifikant höher als die ermittelten Indices der zwei unterschiedlichen Fänge von *Z. viviparus*.

Die vorliegenden Ergebnisse lassen den Schluß zu, daß für eine Charakterisierung von mitochondrialen Eigenschaften der Lipidgehalt des Gewebes und der somatische Index berücksichtigt werden sollten.

6 Literatur

- Alp, R.**, Newsholme, E.A., Zammit, V.A. (1976). Activities of Citrat Synthase and NAD⁺ Linked and NADP⁺ Linked Isocitrat Dehydrogenase in Muscle from Vertebrates and Invertebrates. *J. Biochem.* 154, S. 689-700
- Anderson, M.E.** (1990). Zoarcidae. In: *Fishes of the Southern Ocean*, Hrsg. Gon, O. und Heemstra, P.C. J. L. B. Smith Institute of Ichthyology, Grahamtown, S. 256-276
- Anderson, M.E.** (1994). Systematics and osteology of the Zoarcidae (Teleostei: Perciformes). *Ichthyol. Bull.* 60, S. 120
- Ballantyne, J.S.** (1994). Fish mitochondria. In: *Biochemistry and molecular biology of fishes*, Hrsg. Hochachka, P.W. und Mommsen, T.P. Elsevier Science B. V. Vol. 3, S. 487-500
- Bligh, E.G.** und Dyer, W.J. (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.* Vol. 37(8), S. 911-917
- Blier, P.U.** und Guderley, H.E. (1993). Mitochondrial activity in rainbow trout red muscle: the effect of temperature on the ADP-dependence of ATP synthesis. *J. Exp. Biol.* 176, S. 145-157
- Campbell, C.M.** und Davies, S.S. (1978). Temperature acclimation in the Teleost, *Blennius pholis*: changes in enzyme activity and cell structure. *J. Comp. Biochem. Physiol.* 61B, S. 165-167
- Carratù, L.**, Gracey, A.Y., Buono, S., Maresca, B. (1998). Do Antarctic Fish Respond to Heat Shock? In: *Fishes of Antarctica*, Hrsg. di Prisco, G., Pisano, E., Clarke, A. Springer-Verlag, Milano, S. 111-118
- Cheng, H.C.C.** (1998). Origin and Mechanism of Evolution of Antifreeze Glycoproteins in Polar Fish. In: *Fishes of Antarctica*, Hrsg. di Prisco, G., Pisano, E., Clarke, A. Springer-Verlag, Milano, S. 311-328
- Clarke, A.** (1980). A reappraisal of the concept of metabolic cold adaptation in polar marine invertebrates. *J. Biol. Lin. Soc* 14, S. 77-92
- Clarke, A.** (1983). Life in cold water: The physiological ecology of polar marine ectotherms. *Oceanogr. Mar. Biol. Ann. Rev.* 21, S. 341-353

- Clarke, A.** (1991). What Is Cold Adaption and How Should We Measure It ? *J. Am. Zool.* 31, S. 81-92
- Clarke, A.** (1999). Temperature and energetics: an introduction to cold ocean physiology. In: *Cold Ocean Physiology*, Hrsg. Pörtner, H.O. und Playle, R.C. Cambridge University Press, Cambridge, S. 3-30
- Cossins, A.R.** und **Sinensky, M.** (1986). Adaptations of membranes to temperature, pressure and exogenous lipids. in *Physiology of Membrane Fluidity*, Hrsg. Shinitzsky, M. CRC Press, S. 1-20
- Crockett, E.L.** und **Sidell, B.D.** (1990). Some pathways of energy metabolism are cold adapted in Antarctic fishes. *J. Physiol. Zool.* 63, S. 472-488
- Dahlhoff, E., O'Brien, J., Somero, G.N., Vetter, R.D.** (1991). Temperature effects on mitochondria from hydrothermal vent invertebrates: evidence for adaptation to elevated and variable habitat temperature. *J. Physiol. Zool.* 64, S. 1490-1508
- Dippner, J.W.** (1999). Retrospective studies on long term data series of climate conditions and population dynamics of cod and eelpout. Draft Report: Data Report, Climatology and Climate Variability
- Egginton, S.** und **Sidell, B.D.** (1989). Thermal acclimation induces adaptive changes in subcellular structure of fish skeletal muscle. *Am. J. Physiol.* 256, S. 1-9
- Engel, J.** (1997). Signifikante Schule der schlichten Statistik. Filander Verlag, Fürth, S. 67-69
- Gornall, A.G., Bardawill, C.J., David, M.M.** (1949). Determination of serum proteins by means of biuret reaction. *J. Biol. Chem.* 117, S. 751-766
- Graham, M.S.** und **Farell, A.P.** (1989). The effect of temperature acclimation and adrenaline on the performance of a perfused trout heart. *J. Physiol. Zool.* 62, S. 38-61
- Guderley, H.** und **Johnston, I.A.** (1996). Plasticity of fish mitochondria with thermal acclimation. *J. Exp. Biol.* 199, S. 1311-1317
- Guderley, H.E., St. Pierre, J., Couture, P., Hulbert, A.J.** (1997). Seasonal plasticity of the properties of mitochondria from rainbow trout red muscle. *J. Physiol. Biochem.* 16, S. 531-541
- Guderley, H.** und **St. Pierre, J.** (1999). Seasonal cycles of mitochondrial ADP sensitivity

and oxidative capacities in trout oxidative muscle. *J. Comp. Physiol. B.* 169, S. 474-480

Hardewig, I., Peck, L.S., Pörtner, H.O. (1999a). Thermal sensitivity of mitochondrial function in the Antarctic Notothenioid *Lepidonotothen nudifrons*. *J. Comp. Physiol. B.* 169, S. 597-604

Hardewig, I., van Dijk, P.L.M., Moyes, C.D., Pörtner, H.O. (1999b). Temperature dependent expression of cytochrom-c oxidase in Antarctic and temperate fish. *Am. J. Physiol.* 277, S. 508-516

Holeton, G.F. (1973). Respiration of Arctic charr (*Salvelinus alpinus*) from a high Arctic lake. *J. Fish. Res. Bd Can.* 6, S. 717-723

Holeton, G.F. (1974). Metabolic cold adaptation of polar fish: fact or artifact? *Physiol. Zool.* 47, S. 137-152

Hubold, G. (1991). Ecology of Notothenioid Fish in the Weddell Sea. In: *Biology of Antarctic Fish*, Hrsg. di Prisco, G., Maresca, B., Tota, B. Springer Verlag Berlin, Heidelberg, S. 3-22

Johnston, I.A. (1990). Cold adaptation in marine organisms. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B* 326, S.655-667

Johnston, I.A., Clarke, A., Ward, P. (1991). Temperature and metabolic rate in sedentary fish from the Antarctic, temperate and tropical environments. *J. Mar. Biol.* 109, S. 191-195

Johnston, I.A., Guderley, H., Franklin, C.E., Crockford, T., Kamunde, C. (1994). Are mitochondria subject to evolutionary temperature adaptation? *J. Exp. Biol.* 195, S. 293-306

Johnston, I.A., Calvo, J., Guderley, H., Fernandez, D., Palmer, L. (1998). Latitudinal variation in the abundance and oxidative capacities of muscle mitochondria in perciform fishes. *J. Exp. Biol.* 201, S. 1-12

Londrville, R.L. und Sidell, B.D. (1990). Ultrastructure of aerobic muscle in Antarctic fishes may contribute to maintenance of diffusive fluxes. *J. Exp. Biol.* 150, S. 205-220

Lozán, J.L., Lampe, R., Matthäus, W., Rachor, E., Rumohr, H., von Westernhagen, H. (1996). *Warnsignale aus der Ostsee*. Parey Buchverlag, Berlin, S. 21

Macdonald, J.A. und Wells, R.M.G. (1991). Viscosity of Body Fluids From Antarctic Notothenioid Fish. In: *Biology of Antarctic Fish*, Hrsg. di Prisco, G., Maresca, B., Tota, B. Springer Verlag Berlin, Heidelberg, S. 163-178

- Moon**, T.W. und Ouellet, G. (1979). The Oxidation of Tricarboxylic Acid Cycle Intermediates, with Particular Reference to Isocitrate, by Intact Mitochondria Isolated from the Liver of the American Eel, *Anguilla rostrata* LeSueur. Archives of Biochemistry and Biophysics, 195(2) S. 438-452
- Moyes**, C.D., Moon, T.W., Ballantyne, J.S. (1986). Oxidation of Amino Acids, Krebs Cycle Intermediates, Fatty Acids and Ketone Bodies by *Raja erinacea* Liver Mitochondria. J. Exp. Zool. 237, S. 119-128
- Moyes**, C.D., Suarez, R.K., Hochachka, P.W. (1990). A comparison of fuel preferences of mitochondria from vertebrates and invertebrates. Can. J. Zool. 68, S. 1337-1349
- Muus**, B.J. (1978). Meeresfische der Ostsee, der Nordsee, des Atlantiks. BLV, München, Bern, Wien, S. 154-155
- Noack**, S. (1980) Statistische Auswertung von Meß- und Versuchsdaten mit Taschenrechner und Tischcomputer. Walter de Gruyter Verlag Berlin, New York, S. 373
- Norman**, J.R. (1966). Die Fische. Verlag Paul Parey, Hamburg, Berlin, S. 307-318
- Olbers**, D., Gouretski, V., Seifl, G. (1992). Hydrographic Atlas of the Southern Ocean. Alfred-Wegener-Institut Bremerhaven
- Palm**, H., Andersen, K., Klaser, H., Platz, J. (1994). Occurrence of *Pseudoterranova decipiens* (Nematoda) in fish from the southeastern Weddel Sea (Antarctic). J. Polar Biol. 14, S. 539-544
- Peck**, L.S. (1989). Temperature and basal metabolism in the two Antarctic marine herbivores. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 127, S. 1-12
- Pekkarinen**, M. (1980). Seasonal variations in lipid content and fatty acids in the liver, muscle and gonads of the eelpout, *Zoarces viviparus* (Teleostei) in brackish water. Ann. Zool. Fennici 17, S. 249-254
- Pörtner**, H.O., Hardewig, I., Peck, L.S. (1999a). Mitochondrial function and critical temperature in the Antarctic bivalve, *Laternula elliptica*. J. Comp. Biochem. Physiol. 124, S. 179-189
- Pörtner**, H.O., van Dijk, P.L.M., Hardewig, I., Sommer, A. (1999b). Levels of metabolic cold adaptation: trade-offs in eurythermal and stenothermal ectotherms. In: Antarctic Ecosystems: Models for Wider Ecological Understanding, Hrsg. Davison, W., Williams,

C.H., Caxton Press, Christchurch, (in press)

Reimann, N. (1997). Parasitologische Untersuchungen der Helminthenfauna von *Notothenia coriiceps* Richardson 1844 (Pisces, Nototheniidae). Diplomarbeit an der Christian Albrechts Universität Kiel

Rosenblatt, R.H. und Cohen, D.M. (1986). Fishes living in deepsea thermal vents in the tropical eastern Pacific, with descriptions of a new genus and two new species of eelpouts (Zoarcidae). Trans. San Diego Soc. Nat. Hist. Vol. 21(4), S. 71-79

Scholander, P.F., Flagg, W., Walters, V., Irving, L. (1953). Climatic adaption in arctic and tropical poikilotherms. Physiol. Zool. 26, S. 67-92

Segel, J.H. (1976). Biochemical Calculations. J. Wiley & Sons, 2te Auflage, Davis, S. 280

Sidell, B.D, Driedzic, W.R., Stowe, D.B., Johnston, I.A. (1987). Biochemical correlations of power development and metabolic fuel preferenda in fish hearts. J. Physiol. Zool. 60(2), S. 221-232

Sidell, B.D. (1991). Physiological Roles of High Lipid Content in Tissues of Antarctic Fish Species. In: Biology of Antarctic Fish, Hrsg. di Prisco, G., Maresca, B., Tota, B. Springer Verlag Berlin, Heidelberg, S. 220-231

Sidell, B.D., Crockett, E., Driedzic, W.R. (1995). Antarctic Fish Tissues Preferentially Catabolize Monoenoic Fatty Acids. J. Exp. Zool. 271, S. 73-81

Somero, G.N., Fields, P.A., Hofmann, G.E., Weinstein, R.B., Kawall, H. (1998). Cold Adaptation and Stenothermy in Antarctic Notothenioid Fishes: What Has Been Gained and What Has Been Lost? In: Fishes of Antarctica, Hrsg. di Prisco, G., Pisano, E., Clarke, A. Springer Verlag Italia, Milano, S. 97-109

Sommer, A. (1998). Mechanismen und Grenzen der Temperaturanpassung beim Pierwurm *Arenicola marina* (L.). In: Berichte zur Polarforschung, Alfred-Wegener-Institut für Polar- und Meeresforschung, Bremerhaven, Nr. 285.

St. Pierre, J., Charest, P.M., Guderley, H. (1998). Relative contribution of quantitative and qualitative changes in mitochondria to metabolic compensation during seasonal acclimatisation of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. J. Exp. Biol. 201, S. 2961-2970

Storelli, C., Acierno, R., Maffia, M. (1998). Membrane lipid and protein adaptations in Antarctic fish. In: Cold Ocean Physiology, Hrsg. Pörtner, H.O. und Playle, R.C. Cambridge University Press, Cambridge, S. 166-189

- Suarez, P.K.** und Hochachka, P.W. (1981). Preparation and Properties of Rainbow Trout Liver Mitochondria. *J. Comp. Physiol.* 143, S. 269-273
- Tesch, C.** (1998). Auswirkungen erhöhter Wassertemperatur auf den Stoffwechsel eurythermer und stenothermer Zoarciden (Teleostei). Diplomarbeit an der Universität Bremen
- Tyler, S.** und Sidell, B.D. (1984). Changes in mitochondrial distribution and diffusion distance in muscle of goldfish upon acclimation to warm and cold temperatures. *J. Exp. Zool.* 232, S. 1-9
- van den Thillart, G.** und Modderkolk, J. (1978). The effect of acclimation temperature on the activation energies of state III respiration and on the unsaturation of membran lipids of goldfish mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta*, 510, S. 38-51
- Vetter, R.A.H.** und Buchholz, F. (1998). Kinetics of enzymes in cold-stenothermal invertebrates. In: *Cold Ocean Physiology*, Hrsg. Pörtner, H.O. und Playle, R.C. Cambridge University Press, Cambridge, S. 190-211
- Weinstein, R.B.** und Somero, G.N. (1998). Effects of temperature on mitochondrial function in the Antarctic fish *Trematomus bernachii*. *J. Comp. Physiol. B* 168, S. 190-196
- Wodtke, E.** (1981). Temperature adaptation of biological membranes: compensation of the molar activity of cytochrom c oxidase in the mitochondrial energy transducing membrane during thermal acclimation of the carp (*Cyprinus carpio* L.). *Biochim. Biophys. Acta*, 640, S. 710-720
- Wohlschlag, D.E.** (1960). Metabolism of an antarctic fish and the phenomenon of cold adaptation. *Ecol.* 41, S. 287-292

7 Anhang

Mitochondriale Sauerstoffverbrauchsdaten von *Z. viviparus* mit unterschiedlichen Substraten bei verschiedenen Temperaturen

| Respirationszustand | Temperatur (°C) | Substrat: | |
|------------------------------------|--------------------|----------------|-----------------|
| | | Succinat | Pyruvat + Malat |
| state III | 1 | -- | 2,55 ± 0,54 |
| | 3 | 3,36 ± 0,08 | -- |
| | 5 | 4,40 ± 1,73 | 5,07 ± 1,30 |
| | 10 | 12,83 ± 4,74 | 6,20 ± 1,66 |
| | 15 | 19,78 ± 5,75 | 14,27 ± 1,28 |
| | 20 | 23,67 ± 7,10* | 35,05 ± 2,45 |
| | 25 | 29,16 ± 10,09* | 47,87 ± 6,03 |
| | 30 | 41,71 ± 10,92* | 73,13 ± 11,28 |
| state IV | 1 | -- | 1,25 ± 0,25 |
| | 3 | 1,89 ± 0,33 | -- |
| | 5 | 2,32 ± 0,70 | 2,32 ± 1,06 |
| | 10 | 4,13 ± 1,27 | 2,53 ± 0,71 |
| | 15 | 6,03 ± 1,13 | 5,90 ± 2,16 |
| | 20 | 9,42 ± 1,44 | 11,34 ± 2,19 |
| | 25 | 15,35 ± 2,22* | 24,40 ± 3,46 |
| | 30 | 30,69 ± 1,56* | 39,74 ± 7,82 |
| state IV _{ol} | 1 | -- | 1,05 ± 0,003 |
| | 3 | 1,38 ± 0,32 | -- |
| | 5 | 2,05 ± 0,60 | 2,10 ± 0,85 |
| | 10 | 3,61 ± 1,20 | 1,44 ± 0,39 |
| | 15 | 5,17 ± 1,13 | 3,76 ± 1,05 |
| | 20 | 7,75 ± 1,28 | 6,76 ± 0,98 |
| | 25 | 12,74 ± 3,62 | 16,45 ± 0,95 |
| | 30 | 26,33 ± 1,69 | 28,57 ± 8,44 |
| state III – state IV _{ol} | 1 | -- | 1,50 ± 0,54 |
| | 3 | 1,98 ± 0,24 | -- |
| | 5 | 2,35 ± 1,50 | 2,97 ± 0,54 |
| | 10 | 9,22 ± 3,83 | 4,76 ± 1,75 |
| | 15 | 14,61 ± 5,33 | 9,97 ± 1,44 |
| | 20 | 14,53 ± 5,57* | 26,40 ± 6,47 |
| | 25 | 13,90 ± 6,19* | 30,46 ± 5,90 |
| | 30 | 20,72 ± 1,04* | 49,331 ± 6,69 |

Tab. A1 Mitochondrialer Sauerstoffverbrauch ($\text{nmol O} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ mitochondrialem Protein) von *Z. viviparus* mit den Substraten Succinat und Pyruvat + Malat in Abhängigkeit von der Temperatur (MW±S.D., bei 1°, 3° und 5°C (5°C nur bei Pyruvat+Malat) MW±M.A., *: signifikanter Unterschied zwischen den Substraten, n=2-8)

In-transformierte mitochondriale Sauerstoffverbrauchsdaten von *Z. viviparus* mit unterschiedlichen Substraten bei verschiedenen Temperaturen

| Respirationszustand | Temperatur (K ⁻¹) | Substrat: | |
|------------------------------------|----------------------------------|--------------|-----------------|
| | | Succinat | Pyruvat + Malat |
| state III | 3,65 | -- | 0,91 ± 0,22 |
| | 3,62 | 1,21 ± 0,02 | -- |
| | 3,60 | 1,41 ± 0,41 | 1,59 ± 0,26 |
| | 3,53 | 2,49 ± 0,39 | 1,80 ± 0,26 |
| | 3,47 | 2,94 ± 0,32 | 2,65 ± 0,09 |
| | 3,41 | 3,12 ± 0,33* | 3,55 ± 0,07 |
| | 3,36 | 3,32 ± 0,36* | 3,86 ± 0,13 |
| | 3,30 | 3,70 ± 0,31* | 4,28 ± 0,16 |
| state IV | 3,65 | -- | 0,20 ± 0,20 |
| | 3,62 | 0,62 ± 0,18 | -- |
| | 3,60 | 0,81 ± 0,29 | 0,73 ± 0,49 |
| | 3,53 | 1,37 ± 0,33 | 0,89 ± 0,29 |
| | 3,47 | 1,78 ± 0,19 | 1,72 ± 0,37 |
| | 3,41 | 2,23 ± 0,15 | 2,41 ± 0,19 |
| | 3,36 | 2,72 ± 0,15 | 3,19 ± 0,15 |
| | 3,30 | 3,42 ± 0,05 | 3,66 ± 0,21 |
| state IV _{ol} | 3,65 | -- | 0,05 ± 0,003 |
| | 3,62 | 0,29 ± 0,24 | -- |
| | 3,60 | 0,68 ± 0,28 | 0,65 ± 0,43 |
| | 3,53 | 1,24 ± 0,32 | 0,42 ± 0,21 |
| | 3,47 | 1,62 ± 0,22 | 1,28 ± 0,35 |
| | 3,41 | 2,04 ± 0,16 | 1,90 ± 0,14 |
| | 3,36 | 2,51 ± 0,30 | 2,80 ± 0,06 |
| | 3,30 | 3,27 ± 0,06 | 3,31 ± 0,30 |
| state III – state IV _{ol} | 3,65 | -- | 0,34 ± 0,38 |
| | 3,62 | 0,68 ± 0,12 | -- |
| | 3,60 | 0,63 ± 0,80 | 1,08 ± 0,15 |
| | 3,53 | 2,13 ± 0,46 | 1,50 ± 0,37 |
| | 3,47 | 2,61 ± 0,42 | 2,29 ± 0,15 |
| | 3,41 | 2,60 ± 0,45* | 3,25 ± 0,26 |
| | 3,36 | 2,54 ± 0,50* | 3,40 ± 0,20 |
| | 3,30 | 3,03 ± 0,05* | 3,85 ± 0,35 |

Tab. A2 In $\dot{M}O_2$ (nmol O · min⁻¹ · mg⁻¹ mitochondrialem Protein) von *Z. viviparus* mit den Substraten Succinat und Pyruvat + Malat in Abhängigkeit von der Temperatur (MW±S.D., bei 3,65 K⁻¹, 3,62 K⁻¹ und 3,60 K⁻¹ (3,60 K⁻¹ nur bei Pyruvat+Malat) MW±M.A., *: signifikanter Unterschied zwischen den Substraten, n=2-8)

Arrhenius-Aktivierungsenergien und Q_{10} -Werte der mitochondrialen Respirationsraten mit verschiedenen Substraten in verschiedenen Temperaturbereichen

| Aktivierungsenergie (kJ · mol ⁻¹) | Temperaturbereich (°C) | Substrat: | |
|---|---------------------------|----------------|-----------------|
| | | Succinat | Pyruvat + Malat |
| state III vor ABT nach ABT | 1 bis 30 | | 90,96 ± 7,89 |
| | 3 bis 15 | 89,80 ± 18,57 | |
| | 15 bis 30 | 32,05 ± 9,50* | |
| state IV | 1 bzw. 3 bis 30 | 64,55 ± 10,71 | 92,54 ± 18,66 |
| state IV _{oi} | 1 bzw. 3 bis 30 | 59,79 ± 14,39 | 98,04 ± 17,53 |
| state III – state IV _{oi} vor ABT nach ABT | 1 bis 30 | | 88,04 ± 14,32 |
| | 3 bis 15 | 114,47 ± 35,42 | |
| | 15 bis 30 | 14,75 ± 11,05* | |
| Q_{10} | | | |
| state III vor ABT nach ABT | 1 bis 30 | | 3,60 ± 0,48 |
| | 3 bis 15 | 4,05 ± 1,00 | |
| | 15 bis 30 | 1,49 ± 0,25* | |
| state IV | 1 bzw. 3 bis 30 | 2,57 ± 0,35 | 3,62 ± 0,82 |
| state IV _{oi} | 1 bzw. 3 bis 30 | 2,46 ± 0,54 | 3,97 ± 0,90 |
| state III – state IV _{oi} vor ABT nach ABT | 1 bis 30 | | 3,41 ± 0,57 |
| | 3 bis 15 | 7,61 ± 3,37 | |
| | 15 bis 30 | 1,06 ± 0,26* | |

Tab. A3 Arrhenius-Aktivierungsenergien und Q_{10} -Werte der mitochondrialen Respirationsraten von *Z. viviparus* mit den Substraten Succinat und Pyruvat + Malat in verschiedenen Temperaturbereichen, mit einer ABT für Succinat bei 15°C bei den Respirationszuständen state III und state III – state IV_{oi} (MW±S.D., *: signifikanter Unterschied zu den Werten mit Succinat vor ABT und zu den Werten mit Pyruvat + Malat, n=4-8)

Kopplungsgrade der mitochondrialen Respiration von *Z. viviparus* mit unterschiedlichen Substraten bei verschiedenen Temperaturen

| Kopplungsgrad | Temperatur (°C) | Substrat: | |
|-------------------|--------------------|--------------------------|--------------------------|
| | | Succinat | Pyruvat + Malat |
| RCR | 1 | -- | 2,22 ± 0,87 |
| | 3 | 1,83 ± 0,28 | -- |
| | 5 | 1,88 ± 0,53 | 2,43 ± 0,55 |
| | 10 | 3,16 ± 0,76 ^a | 2,23 ± 0,75 |
| | 15 | 3,16 ± 1,24 ^a | 2,80 ± 0,95 |
| | 20 | 2,33 ± 0,71 | 2,80 ± 1,03 |
| | 25 | 1,67 ± 0,40 | 2,12 ± 0,38 |
| | 30 | 1,50 ± 0,08 | 2,01 ± 0,52 |
| RCR _{oi} | 1 | -- | 2,55 ± 0,54 |
| | 3 | 2,72 ± 0,60 | -- |
| | 5 | 2,24 ± 0,71 | 2,72 ± 0,45 |
| | 10 | 3,96 ± 0,98 ^a | 4,14 ± 1,17 |
| | 15 | 3,49 ± 0,62 ^a | 4,45 ± 2,48 |
| | 20 | 2,96 ± 0,66 | 4,19 ± 1,37 [*] |
| | 25 | 2,17 ± 0,47 | 3,29 ± 0,91 [*] |
| | 30 | 1,87 ± 0,02 | 3,04 ± 0,91 [*] |

Tab. A4 Kopplungsgrade der mitochondrialen Respiration von *Z. viviparus* mit den Substraten Succinat und Pyruvat + Malat in Abhängigkeit von der Temperatur (MW±S.D., bei 1°, 3° und 5°C (5°C nur bei Pyruvat+Malat) MW±M.A., a: signifikant höhere Werte innerhalb der Kopplungsgrade mit Succinat, *: signifikanter Unterschied zwischen den Substraten, n=2-8)

Daten der unterschiedlich ermittelten P/O-Verhältnisse der mitochondrialen Respiration von *Z. viviparus* mit unterschiedlichen Substraten bei verschiedenen Temperaturen

| | Temperatur (°C) | Substrat: | | |
|----------|--------------------|--------------------------|--------------------------|----------------|
| | | Succinat | Pyruvat | + Malat |
| Methode: | | klassisch | klassisch | luminometrisch |
| | 1 | -- | 1,75 ± 0,42 ^b | 1,38 ± 0,62* |
| | 3 | 1,79 ± 0,06 ^a | -- | -- |
| | 5 | 1,39 ± 0,68 ^a | 2,35 ± 0,48 ^b | 1,09 ± 0,41* |
| | 10 | 2,25 ± 0,43* | 3,30 ± 0,72 | 1,95 ± 0,76* |
| | 15 | 2,43 ± 0,44* | 3,05 ± 0,42 | 2,77 ± 1,07 |
| | 20 | 2,67 ± 0,46* | 3,18 ± 0,81 | 2,59 ± 0,38 |
| | 25 | 2,51 ± 0,70* | 3,36 ± 0,66 | 2,95 ± 0,42 |
| | 30 | 2,25 ± 0,75* | 3,01 ± 0,72 | 2,91 ± 0,72 |

Tab. A5 P/O-Verhältnisse der mitochondrialen Respiration von *Z. viviparus* mit den Substraten. Succinat und Pyruvat + Malat in Abhängigkeit von der Temperatur und unterschiedlicher Ermittlungsmethoden (klassische Methode gegen luminometrische Messung der ATP-Produktion) (MW±S.D., bei 1°, 3° und 5°C (5°C nur bei Pyruvat+Malat mit klassischer Methode) MW±M.A., a: signifikant unterschiedlich zu den P/O-Werten mit Succinat der Temperaturen 10°-30°C, b: signifikant unterschiedlich zu den P/O-Werten mit Pyruvat + Malat der Temperaturen 10°-30°C, *: signifikanter Unterschied zu den klassisch ermittelten Werten mit Pyruvat + Malat, n=2-8)

Daten der Citratsynthase-Aktivität von *Z. viviparus* und *P. brachycephalum* bei verschiedenen Temperaturen

| Temperatur (°C) | Art: | |
|--------------------|---------------------|--------------------------|
| | <i>Z. viviparus</i> | <i>P. brachycephalum</i> |
| 0 | 0,011 ± 0,002* | 0,026 ± 0,006 |
| 3 | 0,014 ± 0,003* | 0,034 ± 0,009 |
| 6 | 0,017 ± 0,004* | 0,035 ± 0,009 |
| 9 | 0,022 ± 0,005* | 0,045 ± 0,010 |
| 12 | 0,025 ± 0,006* | 0,050 ± 0,010 |
| 15 | 0,029 ± 0,007* | 0,063 ± 0,017 |
| 18 | 0,037 ± 0,009* | 0,074 ± 0,019 |
| 21 | 0,044 ± 0,009* | 0,080 ± 0,021 |
| 25 | 0,054 ± 0,013* | 0,097 ± 0,026 |
| 30 | 0,048 ± 0,021* | 0,189 ± 0,039 |

Tab. A6 Citratsynthase-Aktivität (units · mg⁻¹ mitochondrialem Protein) von *Z. viviparus* und *P. brachycephalum* in Abhängigkeit von der Temperatur (MW ± S.D., *: signifikanter Unterschied zwischen den Arten, n=3-12)

In-transformierte Daten der Citratsynthase-Aktivität von *Z. viviparus* und *P. brachycephalum* bei verschiedenen Temperaturen

| Temperatur (K ⁻¹) | Art: | |
|----------------------------------|---------------------|--------------------------|
| | <i>Z. viviparus</i> | <i>P. brachycephalum</i> |
| 3,66 | -4,52 ± 0,14* | -3,67 ± 0,26 |
| 3,62 | -4,28 ± 0,23* | -3,41 ± 0,30 |
| 3,58 | -4,08 ± 0,24* | -3,38 ± 0,29 |
| 3,55 | -3,85 ± 0,22* | -3,14 ± 0,25 |
| 3,51 | -3,70 ± 0,23* | -3,03 ± 0,23 |
| 3,47 | -3,58 ± 0,24* | -2,81 ± 0,29 |
| 3,44 | -3,33 ± 0,27* | -2,64 ± 0,27 |
| 3,40 | -3,15 ± 0,22* | -2,56 ± 0,29 |
| 3,36 | -2,96 ± 0,26* | -2,36 ± 0,29 |
| 3,30 | -3,10 ± 0,41* | -1,68 ± 0,21 |

Tab. A7 In-transformierte Citratsynthase-Aktivität (units · mg⁻¹ mitochondrialem Protein) von *Z. viviparus* und *P. brachycephalum* in Abhängigkeit von der Temperatur (MW±S.D., *: signifikanter Unterschied zwischen den Arten, n=3-12)

Arrhenius-Aktivierungsenergien und Q_{10} -Werte der Citratsynthase-Aktivität von *Z. viviparus* und *P. brachycephalum* in verschiedenen Temperaturbereichen

| Temperaturbereich (°C) | | Art: | |
|--|-----------|----------------------------|---------------------------|
| | | <i>Z. viviparus</i> | <i>P. brachycephalum</i> |
| Aktivierungsenergie (kJ · mol ⁻¹) | 0 bis 25 | 42,57 ± 4,13* | 34,99 ± 1,70 |
| | 25 bis 30 | 25,17 ± 6,87* ^a | 66,95 ± 4,23 ^a |
| Q_{10} | 0 bis 25 | 1,85 ± 0,13* | 1,62 ± 0,03 |
| | 25 bis 30 | 0,84 ± 0,27* ^a | 2,63 ± 0,16 ^a |

Tab. A8 Arrhenius-Aktivierungsenergien und Q_{10} -Werte der Citratsynthase-Aktivität von *Z. viviparus* und *P. brachycephalum* in unterschiedlichen Temperaturbereichen (MW±S.D., a und b: signifikanter Unterschied zu dem Wert im Temperaturbereich 0°-25°C *: signifikanter Unterschied zwischen den Arten, n=3-12)

Daten der Citratsynthase-Aktivität (bei 25°C) aus Lebergewebe ("maximale" Citratsynthase) und aus isolierten Lebermitochondrien von *Z. viviparus* und *P. brachycephalum*

| | | Art: | |
|--|---------------|---------------------|--------------------------|
| | | <i>Z. viviparus</i> | <i>P. brachycephalum</i> |
| "maximale" Citratsynthase-Aktivität (units · g ⁻¹ FG _{Leber}) | Leber + Lipid | 1,44 ± 0,23* | 2,11 ± 0,54 |
| | Leber - Lipid | 1,79 ± 0,30 | 2,21 ± 0,57 |
| mitochondriale Citratsynthase-Aktivität (units · g ⁻¹ FG _{Leber}) | Leber + Lipid | 0,50 ± 0,14 | 0,45 ± 0,22 |
| | Leber - Lipid | 0,62 ± 0,17 | 0,47 ± 0,23 |
| mitochondriale Citratsynthase-Aktivität (units · mg ⁻¹ Protein _M) | | 0,05 ± 0,01* | 0,10 ± 0,03 |

Tab. A9 Citratsynthase-Aktivität von *Z. viviparus* und *P. brachycephalum* im Vergleich bei 25°C, zum einen bezogen auf FG ohne Berücksichtigung und mit Berücksichtigung des Lipidgehalts der Leber, zum anderen bezogen auf mitochondrialen Proteingehalt (MW±S.D., *: signifikanter Unterschied zwischen den Arten, n=4-12)

Mitochondrialer Proteingehalt und Lipidanteil der Leber von *Z. viviparus* und von *P. brachycephalum*

| Art: | <i>Z. viviparus I</i> | <i>Z. viviparus II</i> | <i>P. brachycephalum</i> |
|--|-----------------------|------------------------|--------------------------|
| Hälterung seit: | September 1998 | August 1999 | März 1998 |
| mitochondrialer Proteingehalt (mg · g ⁻¹ FG _{Leber}) | | | |
| Leber + Lipid | 22,22 ± 7,34 | 27,67 ± 10,97 | 19,61 ± 5,02 |
| Leber - Lipid | 22,91 ± 7,57 | 34,38 ± 13,55* | 20,52 ± 5,25 |
| Lipidanteil am FG _{Leber} (%) | 3,0 ± 0,4 | 18,5 ± 7,0* | 4,6 ± 1,0 ^a |

Tab. A10 Mitochondrialer Proteingehalt und Lipidanteil der Leber der unterschiedlichen Fängen von *Z. viviparus* und *P. brachycephalum* mit Angabe der Hälterungszeiten (MW±S.D., a: signifikanter Unterschied zum Lipidanteil von *Z. viviparus I*, *: signifikanter Unterschied zu den Werten von *Z. viviparus I* und *P. brachycephalum*, n=6-9)

Danksagung

Herrn Professor Dr. Hans-Otto Pörtner danke ich für die gute Betreuung, für die Möglichkeit zu einem selbständigen und freien Arbeiten, für sein Interesse am Fortgang der Untersuchungen und vor allem für seine stete Diskussionsbereitschaft.

Herrn Professor Dr. Gunter-Otto Kirst möchte ich für die Übernahme der Begutachtung dieser Arbeit danken.

Mein Dank gilt vor allem auch allen jetzigen und ehemaligen Mitgliedern der Arbeitsgruppe. Im besonderen:

Dr. Angela Sommer für die wissenschaftliche Betreuung und Erklärung statistischer Methoden (Knick ?!),

Timo Hirse für die Hilfsbereitschaft bei technischen Problemen,

Dr. Magnus Lucassen und Rolf Wittig für die zeitaufwendige Einlernphase in verschiedene Computerprogramme,

Dr. Christian Bock, Daniela Storch und Martina Langenbuch für die Aufmunterung in schlechten Zeiten (tanzende Hamster !),

Boris Klein und Olaf Heilmayer, die mir bei der „Regulierung meines Lipidgehalts“ halfen (Haribo-Frösche !),

und Dr. Iris Hardewig für den schönen Tag in Berlin.

Letztendlich gebührt ein GROSSES Dankeschön meinen Eltern („Care-Paket“ und Haushaltsplan !)

Hiermit versichere ich, daß ich die vorliegende Arbeit selbständig verfaßt habe, und keine anderen Mittel und Quellen als die hier angegebenen verwendet habe.

Bremerhaven, im Januar 2000
