

Blutphysiologie hochantarktischer Fische

Von Andreas Kunzmann*

Zusammenfassung: Während der *Polarstern*-Expedition ANT-VII/4 (EPOS 3, 1989) wurden hochantarktische Fische des östlichen und südöstlichen Weddellmeeres in Tiefen zwischen 200 und 2.000 m gefangen und in Aquarien gehalten. An 16 verschiedenen Arten wurden, für viele Arten erstmalig, umfangreiche Untersuchungen zur Blutphysiologie vorgenommen. Im Vordergrund standen dabei die Bestimmung verschiedener Blutparameter wie pH, pO_2 , pCO_2 (Sauerstoff- bzw. Kohlendioxidpartialdruck), Hb (Hämoglobin), RBC (Erythrocyten), Gesamtkapazität des Blutes für O_2 sowie funktionale und strukturelle Untersuchungen am Hb. Da alle notothenioiden Fische die Tendenz haben, sowohl den Hämoglobingehalt als auch die Menge der Erythrocyten zu reduzieren, können die Daten Rückschlüsse auf einen möglichen Entwicklungsstammesbaum zulassen. Antarktische Teleostier scheinen nur ein Haupthämoglobin zu haben. Das zweite Hb, das in fast allen Notothenioiden gefunden wurde, macht in der Regel nur 5–10 % aus. Ferner zeigen fast alle untersuchten Hämoglobine, wie erwartet, deutliche Root- und Bohr-Effekte. Da der Besitz mehrerer Hb's mit funktionalen Unterschieden eher die Notwendigkeit aufzeigt, sich an wechselnde Umweltbedingungen anzupassen, stimmen die hier gezeigten, einfachen Verhältnisse gut überein mit den konstanten physikochemischen Bedingungen der hochantarktischen Meere. Die Übereinstimmung der Aminosäuresequenzen der Hämoglobine kann bei den antarktischen Fischen bis zu 90 % betragen, auch wenn die verglichenen Arten aus verschiedenen Familien stammen. Dies spiegelt ihren gemeinsamen Ursprung wider. Die deutlich geringere Identität mit den nichtantarktischen Fischen, bei gleicher Funktionsweise des Proteins, ist ein Hinweis auf den hohen Evolutionsdruck südlich der antarktischen Konvergenz.

Summary: High-Antarctic fishes from the eastern and southeastern Weddell Sea were caught in depths between 200 and 2,000 m and maintained in aquaria during *Polarstern* ANT-VII/4 expedition (EPOS 3, 1989). Investigations on the blood physiology were performed for 16 species; for most of them it was the first time. Emphasis was put on the determination of various parameters such as pH, pO_2 , pCO_2 (partial pressure of O_2 and CO_2), Hb (Haemoglobin), RBC (red blood cells) as well as on structural and functional studies of Hb. Since all notothenioid fishes display the tendency to reduce both the red blood cell number as well as the Hb content, the data allow conclusions about a possible tree of evolution. Antarctic teleosts seem to have one major haemoglobin. The second Hb, which has been found in nearly all notothenioids, accounts only for 5–10 % of the total. Furthermore nearly all investigated haemoglobins display pronounced Root- and Bohr effects. As multiple Hb's with functional difference reflect the necessity to cope with varying environmental conditions, the rather simple cases shown here fit well to the constant physico-chemical conditions of high-Antarctic seas.

The sequence identity in amino acids of haemoglobins can reach 90 % within Antarctic species, even if investigated species belong to different families. This reflects their common origin. A clearly lower sequence identity with non-Antarctic fishes, although we find similar function, indicates a high selective pressure south of the Antarctic convergence.

1. EINLEITUNG

Der antarktische Ozean beherbergt kaum mehr als 200 Fischarten (ANDRIASHEV 1965, 1987). Etwa die Hälfte davon sind ausschließlich in der Antarktis zu finden und gehören nur einer einzigen Unterordnung, den Notothenioidei an (DE WITT 1970). Dieser hohe Grad an Endemismus, verbunden mit einer ausgeprägten Stenothermie (DE VRIES & EASTMAN 1981), hat seinen Ursprung in den mehr oder weniger konstant niedrigen Temperaturen (+3 bis -2° C; HELLMER & BERSCH 1985), die den südlichen Ozean seit ungefähr 30 Millionen Jahren charakterisieren (KENNETT 1977). Die antarktischen notothenioiden Fische sind Abkömmlinge der hochentwickelten Barschartigen (Perciformes). Seit etwa dem frühen Tertiär hatten sie Zeit, sich an die fortschreitende Abkühlung ihrer Umgebung anzupassen. Daher hat ein besonderer Seitenzweig der Evolution eine ganze Reihe von Anpassungen hervorgebracht (WELLS et al. 1980). Herausragend unter den physiologischen Besonderheiten der antarktischen Fische sind vor allem die Anpassungen im Bereich des Sauerstofftransportes (WELLS et al. 1980), des Gefrierschutzes (DE VRIES 1988) und der Neurobiologie (MACDONALD et al. 1987).

Die Schelfmeere der Hochantarktis sind gekennzeichnet durch besonders konstant niedrige Temperaturen von -1,6 bis -2,1° C und hohe Sauerstoff-Gehalte von über 95 % Sättigung (HELLMER & BERSCH 1985). Acht bis neun Monate pro Jahr sind diese Gebiete von Meereis bedeckt. Bis auf wenige Beobachtungen im Rossmeer ist über die winterlichen Bedingungen unter der Eisdecke für die dort lebenden Fische nichts bekannt.

Frühere Untersuchungen an der antarktischen Fischfauna (u.a. KOOYMANN 1963, HUREAU et al. 1977, WELLS et al. 1980, WELLS & JOKUMSEN 1982, TETENS et al. 1984) zeigten, daß Angehörige der typisch antarktischen Unterordnung Notothenioidei generell die Tendenz haben, sowohl den Hämoglobingehalt (Hb) als auch die Anzahl der Erythrocyten (RBC) zu reduzieren. WELLS et al. (1980) sehen darin einen evolutionären Anpassungsmechanismus. Die Familie der Eisfische (Channichthyidae), gekennzeichnet durch vollständiges Fehlen von Hb und RBC's, wäre demnach die am speziellsten angepaßte Fischgruppe in der Antarktis. Die Channichthyiden zeigen bei vergleichbar großen Kiemen ein gegenüber anderen Fischen der Antarktis deutlich

*Dipl.-Biol. Andreas Kunzmann, Institut für Polarökologie, Universität Kiel, Olshausenstraße 40-60, D-2300 Kiel. Manuskript erhalten: 13. 12. 1990; angenommen 21. 01. 1991

größeres Herz-, Gefäß- und Blutvolumen (HOLETON 1976). Ferner sind das Herzminutenvolumen (HMV) erhöht, die Blutviskosität erniedrigt, die Sauerstoff-Partialdruckdifferenz (pO_2) zwischen Blut und Zelle beträchtlich erhöht, sowie einige weitere kompensierende Anpassungen zu beobachten. Das fehlende Hb wird durch diese Anpassungen, die temperaturbedingte vermehrte Löslichkeit von Sauerstoff im Plasma und die bis auf wenige Ausnahmen träge Lebensweise dieser überwiegend demersalen Fischgruppe kompensiert. Sie können, wie ihre rotblütigen Verwandten, beachtliche Größen erreichen (z.B. *Champscephalus gunnari* 60-70 cm, KOCK 1981).

Untersuchungen zur Kiemenmorphometrie zweier antarktischer Fischarten (Kiemenoberflächen etc.) im Zusammenhang mit der Lebensweise zeigen im Vergleich zu Literaturdaten generell kleine Kiemenoberflächen (TGA = total gill area), auch bei einer pelagischen Art, und somit ein niedriges Aktivitätsniveau der Fische (KUNZMANN 1987, 1990). Eine kleine Sauerstoffaustauschfläche führt in Kombination mit einer langen Sauerstoffdiffusionsstrecke (WBD = water-blood-distance) zu niedrigen Diffusionsraten und läßt daher niedrige Sauerstoffverbrauchswerte erwarten. Dies müßte sich auch in anderen Parametern wie der allgemeinen Sauerstoffkapazität von Blut und Gewebe sowie der Leistungsfähigkeit der Muskulatur und anderer Organe (Herz, Leber, Niere) widerspiegeln. Der Begriff Sauerstoffkapazität meint hier die Belastbarkeit von Teilsystemen des Sauerstofftransports (Lunge/Kiemen, Blut, Zelle) gegenüber extremen Schwankungen der Sauerstoffkonzentration. Nach DE JAGER & DEKKERS (1975) besteht zwischen der Aktivität und der Sauerstoffkapazität eines Fisches eine starke Koppelung. Hohe Aktivität eines Fisches ist z.B. verbunden mit großer TGA und kurzer WBD sowie einer niedrigen Sauerstoffaffinität des Hämoglobins. Die Sauerstoffaffinität eines Hämoglobins wird üblicherweise angegeben als der P_{50} , das ist der Sauerstoffteildruck, der nötig ist, um 50 % des Hämoglobins mit Sauerstoff zu sättigen.

Bis heute wurden Blutparameter von ungefähr 25 Arten antarktischer Fische umfassend untersucht, im wesentlichen Arten der Gattungen *Trematomus* und *Notothenia* aus der Familie Nototheniidae sowie Arten der Familie Channichthyidae. Eine neuere Arbeit (DI PRISCO et al. 1990) präsentiert einen umfangreichen Satz mehr biochemisch orientierter Daten über Struktur und Funktion von Hämoglobinen antarktischer Fische. Hier fehlt jedoch der Bezug zur Lebensweise der betreffenden Arten. Ein ähnlich lückenhaftes Bild ergibt sich bei verfügbaren Daten über Sauerstoffverbrauch oder Kiemenoberflächen (TGA) von antarktischen Fischen (KUNZMANN 1986). Nur wenige Arbeiten präsentieren vollständige Daten zur Sauerstoffkapazität, meist wird nur ein Teilbereich isoliert dargestellt. Außerdem beschränken sich bisherige Arbeiten hauptsächlich auf den Vergleich zwischen rot- und weißblütigen Arten und dabei im wesentlichen auf Fische aus der Subantarktis und dem Rossmeer mit speziellen Formenkreisen. Nahezu vollständig fehlen dagegen Informationen aus dem Weddellmeer, wo der Formenkreis *Pleuragramma*, *Chionodraco*, *Pagetopsis* dominiert. Ferner fehlen Vergleiche innerhalb einer Familie sowie Darstellungen der Abhängigkeiten bestimmter physiologischer Anpassungen von der Umwelt und Lebensweise.

Aus diesen Gründen liegen Schwerpunkte der hier vorgestellten Untersuchungen zur Sauerstoffkapazität und Blutphysiologie antarktischer Fische auf:

- der physiologisch eher unberührten Weddellmeerfauna,
- der Vervollständigung bereits existierender Daten,
- dem Vergleich von Daten auch innerhalb von Formenkreisen mit engem Bezug zur Lebensweise der Fische,
- der Interpretation im Zusammenhang mit der Evolution der endemischen Familien.

2. MATERIAL UND METHODEN

Während der *Polarstern*-Expedition Ant VII/4 (EPOS 3, 1989) wurden Fische mit verschiedenen Netzen (Agassiz-Trawl, Grundschleppnetz, Benthopelagisches Netz) in drei Gebieten des östlichen und südöstlichen Weddellmeeres in Tiefen zwischen 200 und 2.000 m gefangen. Genauere Angaben bezüglich Fanggerät, Positionen, Artenzusammensetzung sowie der Fangmenge können dem Fahrtbericht von EPOS 3 (HUREAU et al. 1990) entnommen werden. Die Fische wurden nach dem Fang sofort in Aquarien überführt. Zur Erholung vom Fangstreß wurden, bis auf wenige Ausnahmen, innerhalb der ersten 48 Stunden keine Blutproben entnommen. Im Falle von Wiederholungsmessungen wurden Fische auch mehrere Wochen gehältert bzw. werden noch gehältert.

Die Blutproben wurden aus der Schwanzvene von unbetäubten Fischen in heparinisierte Spritzen aufgezogen, was selten länger als 20 Sekunden dauerte. Die Bestimmung verschiedener Blutparameter wie pH, pO_2 , pCO_2 (Sauerstoff- bzw. Kohlendioxidpartialdruck), Hb (Hämoglobingehalt), RBC (Erythrocyten), MCHC (mittlere korpuskuläre Hb-konzentration, MCH (mittlerer Hb-gehalt eines Erythrocyten), O_2 -CC (Gesamtkapazität des Blutes für O_2) stand bei den Untersuchungen an Bord im Mittelpunkt (RANKIN et al. 1990). Die RBC wurden dann isoliert und für spätere Untersuchungen bei $-80^\circ C$ eingefroren.

Die weitere Bearbeitung erfolgte in Zusammenarbeit mit Dr. di Prisco vom Institute for Protein Biochemistry and Enzymology (IBPE) in Neapel. Verschiedenen Verfahren zur Charakterisierung des O_2 -Bindungsverhalten der jeweiligen Hämoglobine (Hb), wie Rooteffekt- und Bohreffekt-Studien, wurden angewandt. Der Rooteffekt beschreibt die Tatsache, daß bestimmte Hb's bei niedrigen pH-Werten nicht vollständig mit Sauerstoff gesättigt werden können (Abb. 1a, 1b). Vermutet wird ein Zusammenhang mit der Füllung der Schwimmblase oder/und der Sauerstoffversorgung des Fisches (BRITTAIN 1987). Der Bohreffekt dagegen beschreibt generell das Sauerstoffbindungsverhalten eines Hb's abhängig vom jeweiligen pH. Er dient der Kontrolle des Gasaustausches (RIGGS 1988). Beide Effekte sind vor allem durch Organophosphate, aber auch durch Cl^- Ionen förderbar (Abb. 2a, 2b). Da Hämoglobine in der oxygenierten bzw. deoxygenierten Form deutlich voneinander verschiedene Absorptionsspektren besitzen, lassen sich die Bestimmungen mit einem Photometer vornehmen. Für eine genaue Beschreibung der Methodik siehe DI PRISCO et al. (1988).

Hinweise zur Quartärstruktur (Globinuntereinheiten) ergaben sich aus elektrophoretischen Studien. Eine relativ einfache Möglichkeit, Auskunft über die Anzahl der Hämoglobine zu erhalten, ist die Elektrophorese auf Celluloseacetatfolien (CAE). Hierbei werden die Hb's hauptsächlich aufgrund ihrer unterschiedlichen Ladungseigenschaften aufgetrennt. Sehr viel aufwendiger ist die Trennung der Globinuntereinheiten mittels PAGE-SDS-Elektrophorese (PolyAcrylamidGelElektrophorese; SodiumDodecylSulfat). Die Trennung erfolgt hier aufgrund von Ladungs- und Molekulargewichtseigenschaften. Die hier angewandten Methoden sind beschrieben bei D'AVINO & DI PRISCO (1988).

Für die Bestimmung der Primärstruktur der Hämoglobine, also der Menge und Abfolge der einzelnen Aminosäuren im Molekül, wurden die beiden Ketten mittels Phasenumkehr-HPLC zunächst getrennt und gereinigt. Die anschließende Sequenzierung nach dem Prinzip des Edman-Abbaus von Aminosäuren (AS) auf einem Autoanalyzer lieferte die genaue Abfolge der AS bei beiden Globinketten. Genaue Angaben zur Methodik finden sich bei D'AVINO & DI PRISCO (1988, 1989); D'AVINO et al. (1989). Bisher sind die genauen AS-Sequenzen der Hämoglobine erst von einigen wenigen antarktischen Fischarten bekannt (DI PRISCO et al. 1990), meist sind sie noch unveröffentlicht (KUNZMANN et al. im Druck). In der vorliegenden Arbeit soll die neu bestimmte Sequenz der Globinketten von *Bathydraco marri* beispielhaft vorgestellt werden. Zur Zeit werden die einzelnen Globinketten von *Pleuragramma antarcticum* sequenziert, ferner sind die Sequenzierung sowie Analysen zur Sekundär-, Tertiär- und Quartärstruktur weiterer Hämoglobine aus dem Expeditionsmaterial durch die Arbeitsgruppe in Neapel geplant. Die Ergebnisse aus den Strukturanalysen sind unbedingt erforderlich, um die Funktion zu verstehen.

3. ERGEBNISSE und DISKUSSION

3.1 Blutparameter, Aufbau und Funktion von Hämoglobin

Die Erythrocyten von einigen wenigen Arten (z.B. *Pleuragramma antarcticum*, *Racovitzia glacialis* und besonders alle untersuchten *Pogonophryne*-Arten) scheinen wesentlich zerbrechlicher als die Zellen der übrigen Arten zu sein. Die Erythrocyten mußten besonders sorgfältig gewaschen und zentrifugiert werden, um einer Hämolyse vorzubeugen. Außerdem hatte das Blut der *Pogonophryne*-Arten eine auffallend hellrote Farbe und wurde nach einiger Zeit im Eppendorfgesäß, unabhängig von der Menge zugesetzten Heparins, schleimig. Es handelt sich dabei also nicht um eine Blutgerinnung. Das Blut einiger *Pogonophryne*-Vertreter sowie einiger weniger *Gerlachea australis* wies eine deutlich sichtbare Fettbande nach der Zentrifugation in Mikrokapillaren auf (2-3 Vol%). Vertreter nahezu aller Taxa konnten nach einigen Tagen Hälterung im Aquarium fast vollständig den anfänglich sehr hohen CO_2 -Gehalt im Blut abbauen. Einige eliminierten ihr CO_2 nach ein bis drei Stunden erstaunlich schnell (*Racovitzia glacialis*, *Aethotaxis mitopteryx*, *Gymnodraco acuticeps*).

Die Ergebnisse der von mir untersuchten 16 Arten aus dem Weddellmeer sind in Tabelle 1 zusammengefaßt. Eine ausführliche Darstellung und Diskussion aller Ergebnisse, vor allem aus den Root- und Bohreffektstudien, würde an dieser Stelle zu weit führen. Die Abbildungen 1 und 2 sollen daher auch nur beispielhaft für ähnliche Verhältnisse bei den anderen Arten sein. Abb. 1a und 1b zeigen Abwesenheit bzw. ausgeprägtes Vorhandensein eines Roteffektes. Abb. 2a und 2b zeigen „ideale“ Bohreffekte bei zwei verschiedenen Arten. Für andere Arten sei daher auf eine Dissertation verwiesen, die in Kürze abgeschlossen sein wird (KUNZMANN unveröffentlicht). Die wichtigsten Befunde sind nachfolgend kurz im einzelnen aufgeführt.

Fam. Nototheniidae, untersuchte Arten:

Pleuragramma antarcticum, *Aethotaxis mitopteryx*, *Dissostichus mawsoni*, *Trematomus lepidorhinus*, *Trematomus eulepidotus*, *Trematomus scotti*, *Pagothenia hansonii*.

T. scotti hat vermutlich mehr als zwei Hämoglobine. Das zweite Hämoglobin (Hb2) liegt bei *P. antarcticum* in höheren Konzentrationen vor (bis 25 %), beide Hämoglobine zeigen keinen Roteffekt und nur einen leichten Bohreffekt, zumindest im untersuchten pH-Bereich. *A. mitopteryx* hat nur ein Hämoglobin, das keinen Root- und keinen Bohreffekt aufweist (Abb. 1a). Dies stellt eine große Ausnahme dar und wurde deshalb detailliert weiter untersucht (D'AVINO et al. 1990, KUNZMANN et al. im Druck). Es ist unklar, wie die Sauerstoffabgabe in den Geweben ohne Root- und Bohreffekte reguliert wird.

SPECIES	ROOT-Effekt	BOHR-Effekt	Hämoglobine CAE*	Globine PAGE-SDS**
Fam. Nototheniidae				
<i>Aethotaxis mitopteryx</i>	-	-	1	2
<i>Pleuragramma antarcticum</i>	+ leicht	+ leicht	2 (75/25)	3
<i>P. antarcticum</i> Hb1	+ leicht	+ leicht	/	2
<i>P. antarcticum</i> Hb2	+ leicht	+ leicht	/	2
<i>Dissostichus mawsoni</i>	+++	+++	1	2
<i>Trematomus eulepidotus</i>	+	+	2	2-3
<i>Trematomus lepidorhinus</i>	+ leicht	+	2 (90/10)	2
<i>Trematomus scotti</i>	+	/	3 (85/10/5)	3-4
<i>Pagothenia hansonii</i>	+	+	2	2
Fam. Bathydraconidae				
<i>Bathydraco marri</i>	+++	+++	1	2
<i>Bathydraco macrolepis</i>	+++	/	1	2
<i>Gerlachea australis</i>	+ leicht	/	1	2
<i>Racovitzia glacialis</i>	+++	/	1	2
Fam. Artedidraconidae				
<i>Pogonophryne</i> spec. 1	+	/	1	2
<i>Pogonophryne</i> spec. 2	+	+	1	2
<i>Pogonophryne</i> spec. 3	+	/	1	2
Fam. Macrouridae				
<i>Macrourus holotrachys</i>	++	/	1	3
Fam. Anopteroidea				
<i>Anopteroidea pharao</i>	++	/	3-4 (50/40/10)	3-4

Tabelle 1: Hämoglobine von antarktischen Fischen des Weddellmeeres. Sauerstoffbindung und strukturelle Komponenten (teilweise aus KUNZMANN & DI PRISCO 1990). * CAE = Cellulose Acetate Elektrophorese, (Verhältnis Hb1/Hb2 in Klammern); ** PAGE = Polyacrylamidgelelektrophorese, SDS = Sodiumdodecylsulfat, generelle Beobachtung: starker IHP-Effekt, geringer CI-Effekt, Ausnahmen sind angegeben, / = nicht untersucht, + = normaler Effekt, +++ = starker Effekt, - = kein Effekt.

Table 1: Haemoglobins from antarctic fishes of the Weddell Sea. Oxygen binding and structural components (partly from KUNZMANN & DI PRISCO 1990). * CAE = Cellulose Acetate Electrophoresis, (relation Hb1/Hb2 in brackets); ** PAGE = Polyacrylamidgelelelectrophoresis; SDS = Sodiumdodecylsulfate; general observation: strong IHP-effect, weak CI-Effekt, exceptions are indicated, / = not investigated, + = normal effect, +++ = strong effect, - = no effect.

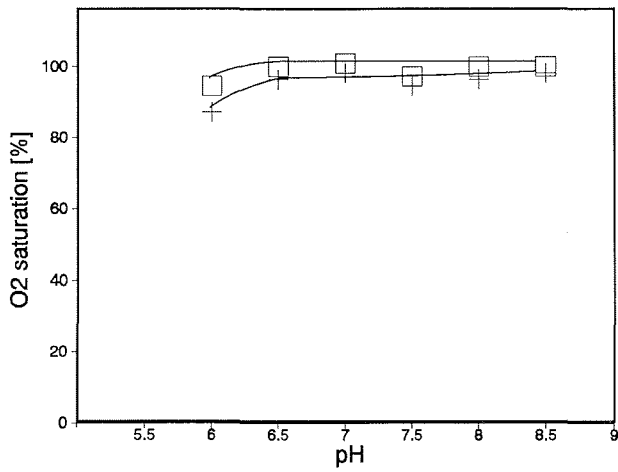


Abb. 1a: Sauerstoffsättigung von *Aethotaxis mitopteryx* Hämoglobin in Abhängigkeit vom pH (Rooteffekt). Hämolysat mit (+) und ohne (□) Einfluß von 3 mM Inositolhexaphosphat (IHP).

Fig. 1a: Oxygen saturation of *Aethotaxis mitopteryx* haemoglobin as a function of pH (Root effect). Haemolysate in the absence (□) or presence (+) of 3 mM inositol hexaphosphate (IHP).

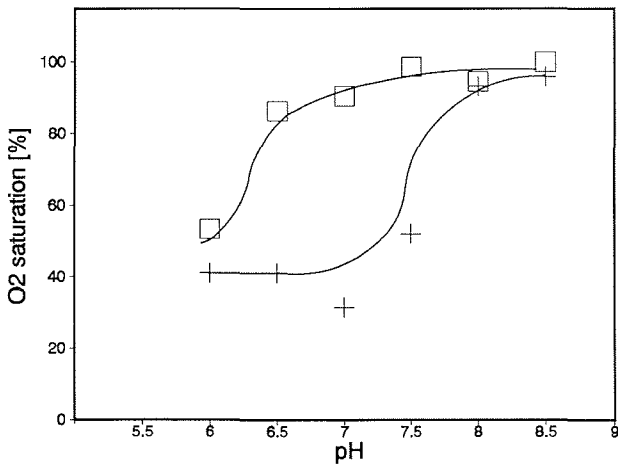


Abb. 1b: Sauerstoffsättigung von *Bathyraco marri* Hämoglobin in Abhängigkeit vom pH (Bohrereffekt). Hämolysat mit (+) und ohne (□) Einfluß von 3 mM Inositolhexaphosphat (IHP).

Fig. 1b: Oxygen saturation of *Bathyraco marri* haemoglobin as a function of pH (Bohr effect). Haemolysate in the absence (□) or presence (+) of 3 mM inositol hexaphosphate (IHP).

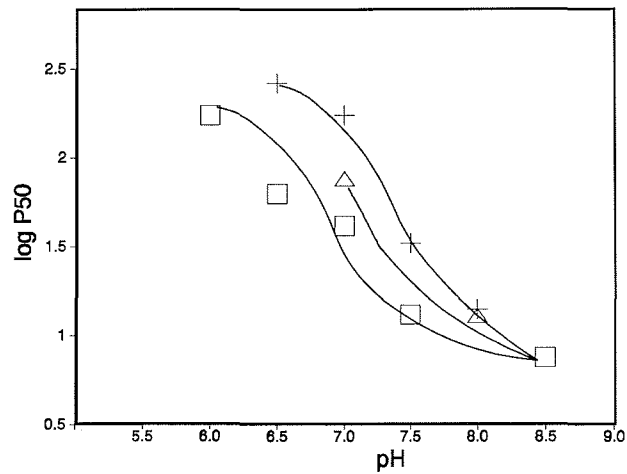


Abb. 2a: Sauerstoffaffinität (P_{50}) von *Bathyraco marri* Hämoglobin in Abhängigkeit vom pH (Bohrereffekt). Hämolysat mit (+) und ohne (□) Einfluß von 0,1 M NaCl/3 mM Inositolhexaphosphat (IHP) sowie nur unter dem Einfluß von 0,1 M NaCl (Δ).

Fig. 2a: Oxygen affinity (P_{50}) of *Bathyraco marri* haemoglobin as a function of pH (Bohr effect). Haemolysate in the absence (□) or presence (Δ) of 0.1 M NaCl and (+) of 0.1 M NaCl, 3 mM inositol hexaphosphate (IHP).

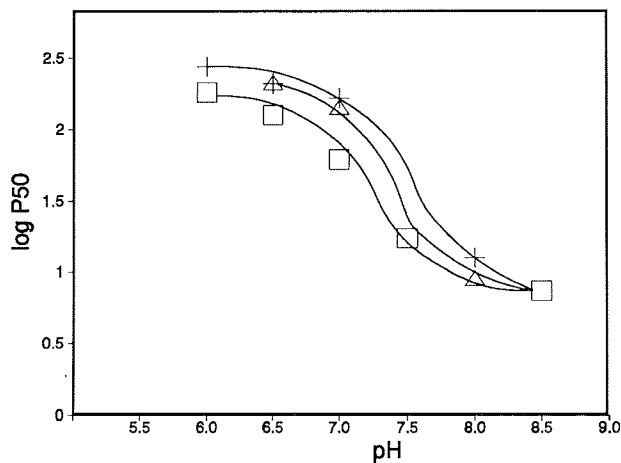


Abb. 2b: Sauerstoffaffinität (P_{50}) von *Trematomus lepidorhinus* Hämoglobin in Abhängigkeit vom pH (Bohrereffekt). Hämolyolat mit (+) und ohne (□) Einfluß von 0.1 M NaCl/3 mM Inositolhexaphosphat (IHP) sowie nur unter dem Einfluß von 0.1 M NaCl (Δ).

Fig. 2b: Oxygen affinity (P_{50}) of *Trematomus lepidorhinus* haemoglobin as a function of pH (Bohr effect). Haemolyolate in the absence (□) or presence (Δ) of 0.1 M NaCl and (+) of 0.1 M NaCl, 3 mM inositol hexaphosphate (IHP).

Fam. Bathydraconidae, untersuchte Arten:

Bathydraco marri, *Bathydraco macrolepis*, *Gerlachea australis*, *Racovitzia glacialis*.

B. marri hat ein Hämoglobin mit extrem deutlichem Phosphat- und Cl-Einfluß auf das Sauerstoffbindungsverhalten (Abb. 1b). Das Hämoglobin von *G. australis* zeigt keinen Rooteffekt.

Die drei Pogonophryne-Arten, vermutlich *P. mentella*, *P. scotti* und *P. marmorata*, haben alle normale Rooteffekte, leider war hier das Material zu knapp für ausführlichere Bohrereffektstudien. Bei der Elektrophorese zeigen sich einige Besonderheiten in der Proteinzusammensetzung.

Die beiden untersuchten Exoten, *Anotopterus pharao* und *Macrourus holotrachys*, die nicht zu den typisch antarktischen Arten gehören, zeigen beide einen ausgeprägten Rooteffekt. *A. pharao* besitzt 3-4 Hämoglobine.

Die hier untersuchten Arten (Tabelle 1) decken zusammen mit den von di Prisco untersuchten Arten (Tabelle 2) einen großen Teil der antarktischen Fischfauna ab. Mit Ausnahme der nichtendemischen Vertreter wie Zoarciden, Macrouriden und *Anotopterus* scheinen antarktische Teleostier nur ein Haupthämoglobin zu haben. Die zweite Komponente, die in fast allen Notothenioiden gefunden wurde, macht in der Regel nur 5-10 Vol% aus. Ferner zeigen fast alle untersuchten Hb's, wie erwartet, deutliche Root- und Bohrereffekte. Die O_2 -Versorgung der Gewebe ist damit fein regulierbar.

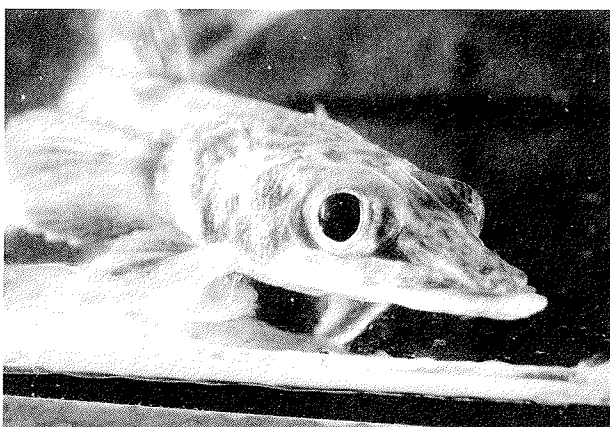


Abb. 3: *Bathydraco marri* Norman. Ein Exemplar wird seit Februar 1988 erfolgreich im Institut für Polarökologie in Kiel gehalten.

Fig. 3: *Bathydraco marri* Norman. Specimen has been successfully maintained in aquaria at the Institut für Polarökologie in Kiel since February 1988.

SPECIES	Herkunft	Hämoglobine CAE**	BOHR- Effekt	ROOT- Effekt
Fam. Nototheniidae				
<i>Notothenia coriiceps neglecta</i>	AP	2	+	+
<i>Notothenia rossii</i>	AP	2	+	+
<i>Notothenia gibberifrons</i>	AP	2	+	+
<i>Notothenia nudifrons</i>	AP	2	/	/
<i>Notothenia larseni</i>	AP	2	/	/
<i>Pagothenia hansonii</i>	AP,RS	2	/	/
<i>Pagothenia bernacchii</i>	RS	1	/	+
<i>Pagothenia borchgrevinkii</i>	RS	2	/	/
<i>Trematomus newnesi</i>	RS	2	+/-	+/-
<i>Trematomus nicolai</i>	RS	2	/	/
<i>Trematomus centronotus</i>	RS	2	+	+
<i>Trematomus loenbergi</i>	RS	2	/	/
<i>Trematomus eulepidotus</i>	RS	2	/	/
<i>Dissostichus mawsoni</i>	RS	1	/	+
Fam. Bathydraconidae				
<i>Parachaenichthys charcoti</i>	AP	1	+	+
<i>Gymnodraco acuticeps</i>	RS	1	-	-
<i>Cygnodraco mawsoni</i>	RS	2	+	+
Fam. Harpagiferidae				
<i>Harpagifer antarcticus</i>	AP	1	/	/
<i>Artedidraco skottsbergi</i>	AP	1	/	/
<i>Harpagifer velifer</i>	RS	1	/	+
Fam. Rajidae				
<i>Raja georgiana</i>	AP	1	/	/
Fam. Zoarcidae				
<i>Lycenchelys nigripalatium</i>	AP	4	/	/
<i>Rogophilina dearborni</i>	RS	4	/	-,+
<i>Australycichthys brachycephalus</i>	RS	5	/	-,+

Tabelle 2: Zusammenstellung der Hämoglobincharakterisierung antarktischer Fische (aus DI PRISCO 1990 und DI PRISCO unveröffentlicht). A.P. = Antarctic Peninsula, RS = Ross Sea, / = nicht untersucht, *CAE = Cellulose Acetate Elektrophorese.

Table 2: Summary of haemoglobin characterization of antarctic fishes (from DI PRISCO 1990 and DI PRISCO unpubl.). AP = Antarctic Peninsula, RS = Ross Sea, / = not investigated, *CAE = Cellulose Acetate Electrophoresis

Die Arbeiten von MACDONALD et al. (1987) und WELLS & JOKUMSEN (1982) in Neuseeland bestätigen diese Ergebnisse. Die ermittelten Werte, insbesondere das Fehlen multipler Hämoglobine, weichen deutlich ab von der Mehrzahl der Untersuchungen an Fischfamilien gemäßigter und tropischer Breiten, wo nach RIGGS (1970) multiple Komponenten zu finden sind. Manche Fischarten weisen bis zu vier Hb's auf, die in unterschiedlichen Mengen vorliegen können und bei Bedarf synthetisiert werden. Schnelle Schwimmer z.B. haben einzelne Komponenten mit oft deutlich voneinander verschiedenen O₂-Bindungseigenschaften, die den O₂-Transport selbst unter extremen pH-Bedingungen garantieren.

Als gemeinsame Merkmale für alle Notothenioiden lassen sich zusammenfassend herausstellen:

- der Besitz von einem Haupt-Hämoglobin (Hb1, 90-95 Vol%), das oft von einem zweiten, mengenmäßig untergeordnetem, Hämoglobin (Hb2, 5-10 Vol%) begleitet wird und
- ein ausgeprägter Root- und Bohreffekt, stark förderbar durch Organophosphate (ATP, GTP, IHP etc.), weniger förderbar durch Chloridionen (Cl⁻).

Da der Besitz mehrerer Hb's mit funktionalen Unterschieden auf die besondere Anpassungsfähigkeit an wechselnde Umweltbedingungen hinweist, passen die hier gezeigten, einfachen Verhältnisse mit nur einem funktional relevanten Hämoglobin gut zu den weitgehend konstanten physikochemischen Bedingungen der hochantarktischen Meere. Nur unter diesen Rahmenbedingungen konnte es zur Entwicklung einer Fischfamilie wie den Eisfischen kommen, die bei der O₂-Versorgung ausschließlich auf die physikalische Lösung im Blutplasma angewiesen ist.

3.2 Primärstruktur und Hinweise zur Evolution am Beispiel von *Bathyraco marri*.

Da die Darstellung struktureller Untersuchungen und ihre Verbindung zu funktionalen oder evolutiven Aspekten für alle oben aufgeführten Arten sehr umfangreich werden würde, sollen die Ergebnisse für *Bathyraco marri* (Abb. 3), beispielhaft für andere antarktische Fischarten mit ähnlicher Lebensweise, im folgenden kurz dargestellt werden.

Die Untersuchung der Blutparameter Hämatokrit (Hct), Erythrocyten (RBC) und Hämoglobingehalt (Hb) ergab bei *B. marri* mit Hct = 14,6 %, RBC = 0,59*10¹²/l und Hb = 29,6 g/l Werte (Tab. 1), die im Vergleich zu anderen notothenioiden Fischen niedrig sind. Hier gelten ein Hct von 17-30, RBC von 0,6-1,0*10¹²/l und Hb von 30-40 g/l als durchschnittliche Werte (WELLS et al. 1980, DI PRISCO et al. 1990). Im Vergleich zu Fischen anderer Meeresgebiete sind die Blutparameter aller antarktischer Fische sehr niedrig, was unter anderem die ansonsten erhöhte Blutviskosität in kaltem Wasser in Grenzen hält (MACDONALD et al. 1987). Aus den genannten Parametern und der Kenntnis der O₂-Löslichkeit im Plasma (0,8%, GRIGG 1967) kann die Gesamtkapazität des Blutes für O₂ berechnet werden. Für Vollblut von *B. marri* ergibt sich ein Wert von 4,76 Vol%, für die roten Blutzellen allein 27,9 Vol%. Daraus läßt sich berechnen, daß 17 %, also rund 1/6 der Gesamtmenge an O₂ physikalisch gelöst im Plasma transportiert wird. Dies ist ein Wert, der erstaunlich hoch ist und bei Fischen gemäßigter und niedriger Breiten nur 5-8 % beträgt (LOVE 1980). Dies zeigt einerseits die große Bedeutung des O₂-Transports durch reine Diffusion für *B. marri* und läßt einen hohen Anteil der Hautatmung an der Gesamtatmung vermuten, ähnlich der Situation bei den hämoglobinlosen Eisfischen. Andererseits läßt sich daraus schließen, daß das O₂-Transportsystem nicht besonders effizient ist, zumindest was längeranhaltende Höchstleistung angeht. In diesem Zusammenhang sind Videoaufnahmen der Fische vor Ort zu erwähnen, die zeigen, daß ein ausgeprägtes Fluchtverhalten, wie wir es für viele perciforme Fischarten kennen, fehlt. Tab. 3 gibt einen Überblick über alle Blutparameter von *B. marri*. Tab. 4 zeigt einige Parameter im Vergleich mit anderen Angehörigen der Familie Bathyracidae.

Eine SDS-PAGE Electrophorese des *B. marri* Hämolyzates ergab zwei Polypeptidketten (α und β Kette) mit unterschiedlichem Molekulargewicht, beide nahe 16.000 Dalton. Das exakte Molekulargewicht (MG) der α -Kette

Parameter	Wert	Einheit	SD
Hämatokrit	14,6	%	2,9
Erythrocyten	0,59	10 ¹² l ⁻¹	0,12
Hämoglobin	29,6	g l ⁻¹	8,6
MCHC	202,7	g l ⁻¹	15,8
MCH	50,2	pg	11,2
O ₂ -CC Blut	4,76	Vol %	1
O ₂ -CC Zellen	27,9	Vol %	3
Plasma Beitrag zu O ₂ -CC	16,7	Vol %	3
pH	7,73	l	0,26
P _{CO2}	3,8	mm Hg	1,9
P _{O2}	58,5	mm Hg	9,9

Tabelle 3: Blutparameter von *Bathyraco marri* (aus Kunzmann et al. im Druck). MCHC = mittlere korpuskuläre Hämoglobinkonzentration; MCH = mittlerer zellulärer Hämoglobingehalt; O₂-CC = O₂ Gesamtkapazität; P_x = Partialdruck von O₂ und CO₂; SD = Standardabweichung; n = 13.

Table 3: Blood parameters of *Bathyraco marri* (from Kunzmann et al. in press). MCHC = mean corpuscular haemoglobin concentration; MCH = mean cellular haemoglobin content; O₂-CC = carrying capacity for O₂; P_x = partial pressure of O₂ and CO₂; SD = standard deviation; n = 13.

SPECIES (Referenz)	Hct (%)	RBC (10 ¹² /l)	Hb (g/l)	Hb Komp.	ROOT	BOHR
<i>V. infuscipinnis</i> (Hureau 1977)	/	0,36	/	/	/	/
<i>P. charcoti</i> (Hureau 1977; di Prisco et al. 1990)	/	0,44	/	1	+	+
<i>P. georgianus</i> (Everson & Ralph 1968)	/	0,21	8	/	/	/
<i>G. acuticeps</i> (Wells et al. 1980; di Prisco et al. 1990)	24	0,78	22,4	1	-	-
<i>C. mawsoni</i> (di Prisco et al. 1990; Kunzmann unver- öffentlicht)	24,9	0,69	26,4	2	+	+
<i>G. australis</i> (Kunzmann unver- öffentlicht)	17,1	0,38	28,0	1	+	/
<i>R. glacialis</i> (Kunzmann unver- öffentlicht)	14,0	0,51	30,0	1	+	/
<i>B. macrolepis</i> (vorliegende Arbeit)	20,0	0,55	30,0	1	+	+
<i>B. marri</i> (vorliegende Arbeit)	14,6	0,59	29,6	1	+	+

Tabelle 4: Vergleich der Blutparameter und Sauerstoffbindungseigenschaften für Arten der Familie Bathydraconidae (aus Kunzmann et al. im Druck). / = nicht untersucht; Hct = Hämatokrit; RBC = Anzahl der Erythrocyten; Hb = Hämoglobingehalt; Hb Komp. = Hämoglobin-Komponenten.

Table 4: Blood parameters and oxygen binding properties of members of the family Bathydraconidae (from Kunzmann et al. in press). / = not investigated; Hct = hematocrit; RBC = number of red blood cells; Hb = haemoglobin concentration; Hb Komp. = haemoglobin components.

mit 142 AS beträgt 15.552 Dalton und das der β -Kette mit 146 AS 16.048 Dalton, womit sich das Gesamt MG des Hämoglobins mit ~63.200 Dalton errechnet. Die Hämoglobine aller Vertebraten sind erstaunlich einheitlich in Bezug auf ihren Aufbau (4 Globinuntereinheiten) und ihr MG, das häufig um 65.000 Dalton liegt.

Ein Vergleich der Sequenz mit der anderer antarktischer Fischarten zeigt eine hohe Übereinstimmung von bis zu 90 % (Tab. 5), auch wenn die verglichenen Arten unterschiedlichen Familien angehören. Zieht man Fischarten aus gemäßigten oder niederen Breiten heran, ergibt sich immerhin noch eine Übereinstimmung bei ca. 50-70 % der Aminosäuren, obwohl die verglichenen Arten unter völlig verschiedenen Umweltbedingungen leben und systematisch weit voneinander entfernt sind (Tab. 5). Die hohe Sequenzidentität innerhalb der antarktischen Fische spiegelt den gemeinsamen Ursprung wider. Die deutlich geringere Identität mit den nichtantarktischen Fischen, bei gleicher Funktionsweise des Proteins, ist ein Hinweis auf den hohen Evolutionsdruck südlich der antarktischen Konvergenz.

Bei den Bathydraconiden läßt sich der Besitz von nur einem Hämoglobin mit besonders konstanten Umweltbedingungen hinsichtlich des O₂-Gehaltes erklären. Sie gelten als charakteristisch für das Gebiet des Filchnergrabens (EKAU 1988, SCHWARZBACH 1988), dessen Wassermasse (kaltes Eisschelfwasser) konstant über reichlich O₂ verfügt (HELLMER & BERSCH 1985). Diese Anpassung an den abiotischen Faktor O₂ wird überlagert von dem oben erwähnten evolutiven Prozeß der Reduktion von Hämoglobin bei allen antarktischen Fischen. Die Notothenioiden stammen primär von demersalen, barschartigen Vorläufern (mit multiplen Hb's) ab. Eine Verminderung von Hämatokrit, Erythrocyten und Hämoglobingehalt ist, wie schon erwähnt, bei allen Notothenioiden zu beobachten. Die Channichthyiden (Eisfische) stellen möglicherweise den Höhepunkt dieser Entwicklung dar. Eine systematische Einordnung auf Grund von anatomischen Merkmalen gruppiert die Bathydraconiden an die Spitze der rotblütigen Arten (IWAMI 1985), also als letzte Stufe vor den Eisfischen.

SPECIES	<i>T. thynnus</i>	<i>C. carpio</i>	<i>S. irideus</i>	<i>B. marri</i> *	<i>N. coriiceps neglecta</i> Hb2*
α-chains					
<i>N. coriiceps neglecta</i> Hb1*	73	59	57	84	63
<i>N. coriiceps neglecta</i> Hb2*	58	63	53	71	/
<i>B. marri</i> *	79	65	53	/	/
<i>S. irideus</i> HbIV	50	63	/	/	/
<i>C. carpio</i>	56	/	/	/	/
β-chains					
<i>N. coriiceps neglecta</i> Hb1, 2*	56	57	63	90	/
<i>B. marri</i> *	56	57	61	/	/
<i>S. irideus</i>	51	73	/	/	/
<i>C. carpio</i>	50	/	/	/	/

Tabelle 5: Sequenzidentität (%) der α- und β- Kette von Fischhämoglobinen antarktischer und nicht-antarktischer Fische im Vergleich (aus Kunzmann et al. im Druck).

Table 5: Sequence identity (%) of the α- and β- chain of fish haemoglobins from Antarctic and non-Antarctic fishes (from Kunzmann et al. in press).

Dies erklärt die niedrigen Werte für die Blutparameter und den Besitz von nur einem Hämoglobin. Die Richtigkeit dieser Hypothese wird zur Zeit an weiteren Vertretern der Bathydraconiden mit ähnlicher Lebensweise getestet.

4. DANKSAGUNG

Mein Dank geht an die Arbeitsgruppe di Prisco in Neapel für die wertvolle Unterstützung bei den Funktionsstudien von Hämoglobin. Herrn Prof. Hempel danke ich für die Ermöglichung sowohl dieser Arbeit als auch der Kooperation mit Italien. Dem Alfred-Wegener-Institut in Bremerhaven und der Besatzung von FS *Polarstern* danke ich für die logistische Unterstützung während der Expedition Ant-VII/4 (EPOS 3), die finanziell unterstützt wurde von der European Science Foundation (ESF). Selbstverständlich geht mein Dank auch an die Mitarbeiter im Institut für Polarökologie.

Literatur

- Andriashchev, A. P. (1965): A general review of the Antarctic fish fauna.- Monogr. Biol. 25: 491-550.
- Andriashchev, A. P. (1987): A general review of the antarctic fish fauna.- Proc. V Congr. europ. Ichtyol. Stockholm, pp 357-372.
- Brittain, T. (1987): The Root effect (Minireview).- Comp. Biochem. Physiol. 86B (3):473-481.
- D'Avino, R. & di Prisco, G. (1988): Antarctic fish hemoglobin: an outline of the molecular structure and oxygen binding properties. I Molecular structure.- Comp. Biochem. Physiol. 90B (3): 579-584.
- D'Avino, R., Caruso, C., Romano, M. & Camardella, L. (1989): Hemoglobin from the Antarctic fish *Notothenia coriiceps neglecta*. 2. Amino acid sequence of the α-chain of Hb I.- Eur. J. Biochem. 179:707-713.
- D'Avino, R. & di Prisco, G. (1989): Hemoglobin from the Antarctic fish *Notothenia coriiceps neglecta* I. Purification and characterization.- Eur. J. Biochem. 179:699-705.
- D'Avino, R., Fago, A., Kunzmann, A. & di Prisco, G. (1990): Structure and function of the hemoglobin of the Antarctic teleost *Aethotaxis mitopteryx*.- Ital. Biochem. Soc. Trans. 2(3):315.
- De Jager, S. & Dekkers, W. J. (1975): Relations between gill structure and activity in fish.- Netherl. J. Zool. 25(3): 276-308.
- De Vries, A. L. (1988): The role of antifreeze glycopeptides and peptides in the freezing avoidance of Antarctic fishes.- Comp. Biochem. Physiol. 90B (3):611-621.
- De Vries, A. L. & Eastman, J. T. (1981): Physiology and ecology of notothenoid fishes of the Ross Sea.- J. Royal. Soc. New Zealand 11(4): 329-340.
- De Witt, H. H. (1970): The character of the midwater fish fauna of the Ross sea, Antarctica.- In: Holdgate (ed.), Antarctic Ecology, Vol 1: pp 305-314, Academic Press, London.
- di Prisco, G., Giardina, B., D'Avino, R., Condo, S. G., Bellelli, A. & Brunori, M. (1988): Antarctic fish hemoglobin: an outline of the molecular structure and oxygen binding properties. II Oxygen binding properties.- Comp. Biochem. Physiol. 90B (3):585-591.

- di Prisco, B., D'Avino, R., Camardella, L., Caruso, C., Romano, M. & Rutigliano, B. (1990): Structure and function of hemoglobin in Antarctic fishes and evolutionary implications.- *Polar Biol.* 10:269-274.
- Ekau, W. (1988): Ökomorphologie nototheniider Fische aus dem Weddellmeer, Antarktis.- *Ber. Polarforsch.* 51:1-140.
- Everson, I. & Ralph, R. (1968): Blood analyses of some Antarctic fish.- *Br. Antarct. Surv. Bull.* 15:59-62.
- Grigg, G. C. (1967): Some respiratory properties of the blood of four species of Antarctic fishes.- *Comp. Biochem. Physiol.* 23:139-148.
- Hellmer, H. H. & Bersch, M. (1985): The Southern Ocean.- *Rep. Polar Res.* 26:1-115.
- Holeton, G. F. (1976): Respiratory morphometrics of white and red blooded Antarctic fish.- *Comp. Biochem. Physiol.* 54A: 215-220.
- Hureau, J. C., Petit, D., Fine, J. M. & Marneux, M. (1977): New cytological, biochemical, and physiological data on the colorless blood of the Channichthyidae (Pisces, Teleosteans, Perciformes).- In: Llano, G.A. (ed.): Adaptations within Antarctic ecosystems, Gulf Publ. Co, Houston, pp. 459-477.
- Hureau, J. C., Balguerías, E., Duhamel, G., Kock, K.-H. & Ozouf-Costaz, C. (1990): Fish fauna of the eastern Weddell Sea.- *Rep. Polar Res.* 68:130-138.
- Iwami, T. (1985): Osteology and relationships of the family Channichthyidae.- *Mem. Natl. Inst. Polar Res. Ser. E No.36:1-69.*
- Kennet, J. P. (1977): Cenozoic evolution of Antarctic glaciation, the circumantarctic ocean and their impact on global paleoceanography.- *J. Geophys. Res.* 82: 3843-3876.
- Kock, K.-H. (1981): Fischereibiologische Untersuchungen an 3 antarktischen Fischarten.- *Mitt. Inst. Seef.* 32, 226 pp.
- Kooyman, G. L. (1963): Erythrocyte analysis of some Antarctic fishes.- *Copeia* 1963(2): 457-458.
- Kunzmann, A. (1986): Kiemenmorphometrie von zwei antarktischen Fischarten, *Pleuagramma antarcticum* und *Notothenia gibberifrons*.- Unveröffentl. Dipl. Arb., Univ. Kiel., pp.83.
- Kunzmann, A. (1987): Gill morphometrics of an antarctic fish, *Pleuagramma antarcticum*.- *Proc. V Congr. europ. Ichthyol.* Stockholm:467-468.
- Kunzmann, A. (1990): Gill morphometrics of two Antarctic fish species, *Pleuagramma antarcticum* and *Notothenia gibberifrons*.- *Polar Biol.* 11: 9-18.
- Kunzmann, A., Caruso, C. & di Prisco (im Druck): Haematological studies on a high-Antarctic fish: *Bathodraco marri* Norman.-
- Kunzmann, A. & di Prisco, G. (1990): On the blood physiology of Weddell Sea fishes.- *II Int. Conf. Biol. Ant. Fishes.* Ravello 30.5-1.6.90.
- Kunzmann, A., di Prisco, G., Fago, A. & D'Avino, R. (im Druck): Blood and hemoglobin analysis of a high-Antarctic fish: *Aethotaxix mitopteryx* De Witt.-
- Love, R. M. (1980): The chemical biology of fishes.- Vol 2. Advances 1968-1977. AP, London, etc., 943 pp.
- Macdonald, J. A., Montgomery, J. C. & Wells, R. M. G. (1987): Comparative Physiology of Antarctic Fishes.- *Advances in Mar. Biol.* 24: 321-388.
- Rankin, J. C., Johnson, T. P., Kunzmann, A. & Wöhrmann, A. P. A. W. (1990): Physiological studies on teleost fish.- *Rep. Polar Res.* 68: 144-151.
- Riggs, A. (1970): Properties of fish hemoglobins.- In: Hoar W.S. & Randall D.J. (eds.) *Fish Physiology* Vol IV: 209-246. Academic Press, London.
- Riggs, A. F. (1988): The Bohr effect.- *Ann. Rev. Physiol.* 50:181-204.
- Tetens, V., Wells, R. M. G. & De Vries, A. L. (1984): Antarctic fish blood: respiratory properties and the effects of thermal acclimation.- *J. exp. Biol.* 104: 269-288.
- Schwarzbach, W. (1988): The demersal fish fauna of the eastern and southern Weddell Sea: geographical distribution, feeding of fishes and their trophic position in the food web.- *Rep. Polar Res.* 54:3-94.
- Wells, R. M., Ashby, M. D., Duncan, S. J. & Macdonald, J. A. (1980): Comparative study of the erythrocytes and hemoglobins in notothenoid fishes from Antarctica.- *J. Fish Biol.* 17(5): 517-527.
- Wells, R. M. & Jokumsen, A. (1982): Oxygen binding properties of hemoglobins from antarctic fishes.- *Comp. Biochem. Physiol.* 71B (3): 469-474.