

Auswertung spektrophotometrischer Methoden zur Untersuchung mitochondrialer Parameter in polaren Fischen

Bachelorarbeit

Abschlussmodul 16 B.Sc. Biologie

Nicolas Melchior

Erstgutachter: Dr. Felix Christopher Mark

Zweitgutachter: Prof. Dr. Bernhard Lieb

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Bachelorarbeit selbstständig und ohne Zuhilfenahme anderer als der angegebenen Quellen verfasst habe. Alle Stellen der Arbeit, die wörtlich oder sinngemäß aus Veröffentlichungen oder aus anderen fremden Texten entnommen wurden, sind von mir als solche kenntlich gemacht worden. Diese Arbeit wurde bisher weder veröffentlicht, noch einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Trebur, den 26.10.2020,



Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	5
Abstract.....	7
1. Einleitung	8
1.1. Ursprung und Aufbau der Mitochondrien.....	8
1.2. Das Elektronentransportsystem	9
1.3. Die F_1F_0 -ATPase und die ATP-Synthese	11
1.4. Ektotherme Lebewesen und Anpassungen an das Habitat	12
1.5. Substrate-Uncoupler-Inhibitor-Titration-Protokoll.....	14
1.6. Messung der ATP-Produktion	15
1.7. Forschungsziele.....	16
1.8. Erwartungen	16
2. Material und Methoden.....	17
2.1. Fischschlachtung und Probengewinnung.....	17
2.2. Mitochondrien-Isolation	17
2.3. Permeabilisierung von Herzfasern	18
2.4. Substrate-Uncoupling-Inhibitor-Titration-Protokoll.....	18
2.4.1. Substrate-Uncoupler-Inhibitor-Titration-Protokoll für isolierte Mitochondrien.	18
2.4.2. Substrate-Uncoupler-Inhibitor-Titration-Protokoll für permeabilisierte Herzfasern	19
2.5. K_d -Determinatioon ohne biologische Proben.....	19
2.6. Messung der ATP-Produktion	20
2.6.1. Messung der ATP-Produktion in isolierten Mitochondrien.....	20
2.6.2. Messung der ATP-Produktion in permeabilisierten Herzfasern.....	20
2.7. Bradford-Assay	21
2.8. Auswertung.....	23
2.8.1. Auswertung der Bradford-Assays	23
2.8.2. Auswertung der SUIT-Protokolle	24
2.8.3. Auswertung der K_d -Determinatioon.....	24

2.8.4. Auswertung der ATP-Produktion und der P/O-Verhältnisse.....	25
3. Ergebnisse	26
3.1. Bradford-Assay – Proteinbestimmung.....	26
3.2. Substrate-Uncoupling-Inhibitor-Titration-Protokoll (SUIT-Protokoll).....	28
3.2.1. SUIT-Protokoll bei isolierten Mitochondrien von <i>B. saida</i>	28
3.2.2. SUIT-Protokoll bei isolierten Mitochondrien von <i>S. salar</i>	30
3.2.3. SUIT-Protokoll bei isolierten Mitochondrien von <i>D. labrax</i>	32
3.2.4. SUIT-Protokoll mit permeabilisierten Herzfasern von <i>B. saida</i>	34
3.2.5. SUIT-Protokoll bei permeabilisierten Herzfasern von <i>S. salar</i>	36
3.2.6. SUIT-Protokoll bei permeabilisierten Herzfasern von <i>D. labrax</i>	38
3.3. K_d -Determinatio n ohne biologische Probe.....	40
3.4. ATP-Produktion und P/O-Verhältnisse	41
3.4.1. ATP-Produktion und P/O-Verhältnisse bei <i>B. saida</i>	41
3.4.2. Messung der ATP-Produktion und der P/O-Verhältnisse bei <i>S. salar</i> und <i>D. labrax</i>	43
4. Diskussion.....	44
4.1. Sauerstoffverbrauch bei isolierten Mitochondrien und permeabilisierten Herzfasern.....	44
4.2. ATP-Produktion und P/O-Verhältnisse in polaren Fischen	48
Zusammenfassung und Ausblick.....	50
Literaturverzeichnis	52

Abkürzungsverzeichnis

ANT - Adenin-Nukleotid-Translokase

ATP - Adenosintriphosphat

B. saida - *Boreogadus saida*

Blank - State-I-Respiration vor Versuchsbeginn

BSA - Rinderserumalbumin

CI - NADH:Q-Oxidoreduktase

CII - Succinat:Q-Oxidoreduktase

CIII - Q:Cytochrom-c-Oxidoreduktase

CIV - Cytochrom-c-Oxidase

D. labrax - *Dicentrarchus labrax*

EGTA - Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure

ETS - Elektronentransportsystem

FAD - Flavin-Adenin-Dinukleotid

FCCP - Carbonyl-cyanid-p-(trifluoromethoxy)phenyl-hydrazon

FMN - Flavinmononukleotid

HRR - Oroboros O2k High-resolution respirometry

L_n - LEAK-Respiration ohne Adenylate

L_{omy} - LEAK-Respiration nach Inhibition mit Oligomycin

MgG - Magnesium Green

MiR05 - Mitochondrienrespirationsmedium 05

MS222 - Tricain-Methan-Sulfonat

NaCl - Natriumchlorid

NADH - Nicotinamidadenindinukleotid

OXPHOS - oxidative Phosphorylierung

Q^{•-} - Semichinonradikalanion

Q - Ubichinon

Q_a - erste Q-Bindungsstelle in CIII

Q_i - zweite Q-Bindungsstelle in CIII

ROS - reaktive Sauerstoffspezies

ROX - Restsauerstoffverbrauch

Rpm - Umdrehungen pro Minute

S. salar - *Salmo salar*

SUIT-Protokoll - Substrate-Uncoupler-Inhibitor-Titration-Protokoll

TMPD - Tetramethylphenyldiamin

UCP - uncoupling Protein

Abstract

Die Ziele der vorliegenden Bachelorarbeit waren die Messung und Auswertung des Sauerstoffverbrauchs und der ATP-Produktion in isolierten Mitochondrien und permeabilisierten Herzfasern von polaren Fischen. Mitochondrien entstanden gemäß der Endosymbiontentheorie aus der Aufnahme eines, zur Reduktion von Sauerstoff befähigten, Proteobakteriums durch eine eukaryotische Zelle (Barbour, 2014 und Purves, 2011). An diese Reaktion wurde im Laufe der Evolution die Synthese von ATP gekoppelt (Purves, 2011). Die Körpertemperatur von ektothermen Organismen ist direkt von der Habitattemperatur abhängig und die Temperatur ist einer der wichtigsten abiotischen Umweltfaktoren (Lucassen et al., 2003, Wehner und Gehring, 2013). Da die Geschwindigkeit enzymatischer Prozesse von der Temperatur abhängig ist, RGT-Regel, sollten bei *B. saida* bei 5 °C der Sauerstoffverbrauch und die ATP-Produktion niedriger als bei *S. salar* und *D. labrax* sein.

Dazu wurden bei dem Polardorsch *Boreogadus saida*, sowie bei dem atlantischen Lachs *Salmo salar* und dem europäischen Wolfsbarsch *Dicentrarchus labrax* mit polarographischen Sauerstoffsensoren und optischen fluorometrischen Sensoren der Sauerstoffverbrauch und die ATP-Produktion gemessen. Der Sauerstoffverbrauch wurde mittels eines Substrate-Uncoupler-Inhibitor-Titration-Protokolls und die ATP-Produktion mit dem Fluoreszenzfarbstoff Magnesium Green gemessen (Iftikar und Hickey, 2013).

1. Einleitung

1.1. Ursprung und Aufbau der Mitochondrien

Mitochondrien entstanden vor 1,5 Milliarden Jahren durch die Aufnahme eines Proteobakteriums durch eine eukaryotische Zelle (Barbour, 2014 und Purves, 2011, S. 739). Mitochondrien hatten vermutlich die primäre Funktion, Sauerstoff (O_2) durch die Reduktion zu Wasser zu entgiften, an welche anschließend die Bildung von Adenosintriphosphat (ATP) gekoppelt wurde (Purves, 2011, S. 740). Mitochondrien sind im Durchmesser 1,5 μm groß und 2-8 μm lang (Purves, 2011, S.120). Sie besitzen eine äußere glatte Membran und eine innere Membran mit Einstülpungen, den Cristae (Purves, 2011, S. 120). Die Cristae entstehen, weil sich die ATP-Synthasen zueinander assoziieren, dadurch werden sie widerstandsfähiger gegen Rotationskräfte und der Protonengradient ist in ihrer Nähe am stärksten ausgeprägt (Stryer, 2018, S. 638). Mitochondrien sind ubiquitäre Zellorganelle, in welchen Substrate oxidiert und 90 % des zellulären ATP gebildet werden (Havird et al., 2019, Salin et al., 2016). P. Mitchell postulierte 1961, dass es eine chemi-osmotische Kopplung zwischen einer ATPase und einem Elektronen- und Hydrogentransfersystems aus drei Stellen gibt. Nach diesem chemi-osmotischen Modell wird die Energie, die durch Substratoxidation frei wird, zur Bildung eines Protonengradientens genutzt, welcher zur Bildung von ATP genutzt wird (Groen et al., 1990). In der inneren Mitochondrienmembran befinden sich die Komplexe des Elektronentransportsystems, welche Protonen über die innere Membran pumpen (Burtscher et al., 2015). Außerdem befinden sich noch die Enzyme der β -Oxidation und des Citratzyklus in der Mitochondrienmatrix (Mootha et al., 2003). Der Citratzyklus ist der aerobe Abbau von Glucose, genauer die Oxidation von Glucosederivaten zu CO_2 , wobei sechs Elektronen auf NAD^+ , zwei Elektronen auf Flavin-Adenin-Dinukleotid (FAD) übertragen werden und ein Molekül ATP entsteht (Stryer, 2018, S. 582 und 583).

Neben der Rolle bei dem aeroben Glucoseabbau und der Konservierung der freiwerdenden Energie in Form von ATP, spielen Mitochondrien eine Rolle bei Krankheiten. Mitochondrien generieren eine Mehrheit von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) (Mootha et al., 2003). Durch reversen Elektronentransport von Ubichinon zu Komplex I bei einem hohen Protonengradienten entstehen ROS durch eine Ein-Elektronen-Reduktion von O_2 (Murphy, 2008). Da die Löslichkeit von O_2 in der Membran dreifach höher ist als im Cytosol, ist O_2 in der Nähe der ETS-Komplexe höher konzentriert (Murphy, 2008). ROS können frei durch die Mitochondrienmembran diffundieren und operieren als aktive Signalmoleküle für Transkriptionsfaktoren und transkriptionelle Coaktivatoren (Barbour, 2014). Die Bildung von ROS wird durch ein leichtes Entkoppeln, dem Verringern des Membranpotenzials, verhindert

(Cortassa et al., 2014). Diese mitochondriale Dysfunktion ist zum Teil bei Alterskrankheiten wie Parkinson (Hauser und Hastings, 2013), Alzheimer (Gu et al., 2012), pankreatisches β -Zell-Versagen (Ma et al., 2012) und der Insulinresistenz (Kim et al., 2008) beteiligt (Barbour, 2014).

1.2. Das Elektronentransportsystem

Das Elektronentransportsystem (ETS) besteht aus vier Komplexen, davon sind drei Komplexe Protonenpumpen, und zwei Elektronencarriern. Die Komplexe sind die NADH:Q-Oxidoreduktase, die Succinat:Q-Oxidoreduktase, die Q: Cytochrom-c-Oxidoreduktase und die Cytochrom-c-Oxidase (Stryer, 2018, S. 621). Die Elektronencarrier sind der Zwei-Elektronencarrier Ubichinon (Q) und der Ein-Elektronencarrier Cytochrom c (Stryer, 2018, S. 621). Das Nicotinamidadenindienukleotid (NADH) ist ein starkes Reduktionsmittel und O_2 ein starkes Oxidationsmittel. Dadurch gibt NADH leicht Elektronen ab und O_2 nimmt leicht Elektronen auf (Stryer, 2018, S. 618). In den Proteinen befinden sich Fe-S-Cluster, welche bei dem Elektronentransport innerhalb der Proteinkomplexe eine Rolle spielen (Stryer, 2018, S. 623). Die bioenergetischen Schritte des Elektronentransportsystems resultieren in dem Aufbau eines Protonengradientens über der inneren Mitochondrienmembran, welcher zur Bildung von ATP benötigt wird (Gnaiger et al., 2015).

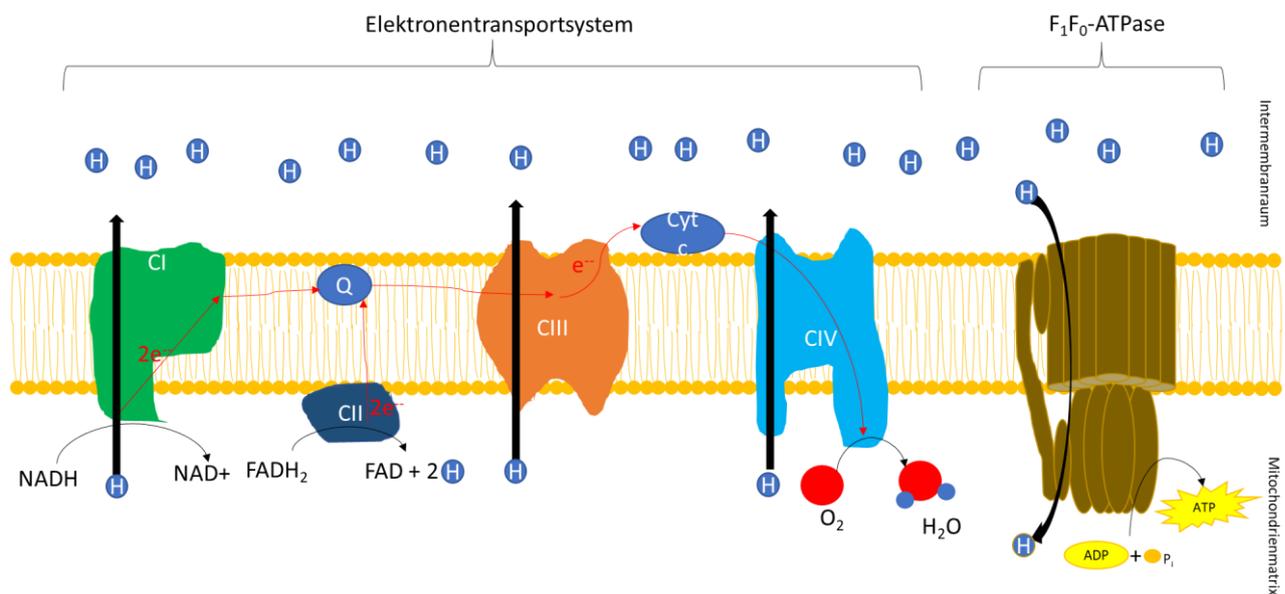


Abb. 1: Schematische Darstellung des Elektronentransportsystems und der F_1F_0 -ATPase an der inneren Mitochondrienmembran nach Vorbild von Stryer, 2018, S. 234. Von links nach rechts: Grün: CI, NADH:Q-Oxidoreduktase; Dunkelblau: CII, Succinat:Q-Oxidoreduktase; Orange: CIII, Q: Cytochrom-c-Oxidoreduktase; Hellblau: CIV, Cytochrom-c-Oxidase; Braun: F_1F_0 -ATPase; Blau: Ubichinonpool Q und Cytochrom c, Cyt c. Rote Pfeile: Weg des Elektronentransports; Dicke schwarze Pfeile: Protonentransport über die innere Mitochondrienmembran.

Die NADH:Q-Oxidoreduktase (CI) ist der erste Komplex der Atmungskette. In vier Schritten werden 2 Elektronen von NADH auf Q übertragen. Im ersten Schritt wird NADH an CI gebunden und zwei Elektronen und zwei Protonen werden auf ein Flavinmononucleotid (FMN) übertragen. Es entsteht FMNH₂. Im zweiten Schritt werden zwei Elektronen von FMNH₂ auf das Fe-S-Cluster übertragen. Anschließend werden die Elektronen auf Q übertragen und Q²⁻ entsteht. Im vierten Schritt nimmt Q²⁻ zwei Protonen aus der Matrix auf und tritt als QH₂ in den Q-Pool innerhalb der inneren Mitochondrienmembran ein. Dies trägt zusätzlich zum Protonengradienten bei. Die Übertragung von zwei Elektronen von NADH auf Q führt dazu, dass vier Protonen über die innere Mitochondrienmembran in den Intermembranraum gepumpt werden. (Stryer, 2018, S. 624 und 625)

Die Succinat:Q-Oxidoreduktase (CII) ist im Gegensatz zu den anderen Komplexen keine Protonenpumpe. Ein Bestandteil von CII ist die Succinat-Dehydrogenase, welche ein Enzym des Citratzyklus ist. Die Succinat-Dehydrogenase oxidiert Succinat zu Fumarat. Dabei werden zwei Protonen auf ein FAD übertragen und FADH₂ entsteht. FADH₂ verbleibt in CII und überträgt über ein Fe-S-Cluster zwei Elektronen auf Q. Q²⁻ nimmt, wie bei CI, zwei Protonen auf und tritt in den Q-Pool ein. (Stryer, 2018, S. 596 und 626)

Über den Q-Pool werden die Elektronen zu der Q: Cytochrom-*c*-Oxidoreduktase (CIII) transportiert. Dabei werden zwei Elektronen des QH₂ auf einen Ein-Elektronen-Carrier, Cytochrom *c*, übertragen. Dieser Mechanismus wird als Q-Zyklus beschrieben. Nacheinander binden zwei QH₂ an CIII und geben je zwei Elektronen und zwei Protonen, auf der Cytoplasmaseite, ab. Das erste QH₂-Molekül bindet an die erste Q-Bindungsstelle (Q_a). Von dort wandert ein Elektron über das Rieske-2Fe-2S-Cluster und Cytochrom *c*₁ zu einem oxidierten Cytochrom *c*. Das Rieske-2Fe-2S-Cluster ist ein besonders stabiles 2Fe-2S-Zentrum, da ein Fe mit zwei Histidin statt zwei Cystein koordiniert ist und dadurch das Reduktionspotenzial erhöht ist und Elektronen leichter aufgenommen werden können. Das zweite Elektron wird über zwei Hämgruppen des Cytochrom *b* zu einem oxidierten Q transportiert. Das Q befindet sich in der zweiten Bindungsstelle (Q_i). Dadurch wird dieses Q in der Q_i-Bindungsstelle zu einem Semichinonradikalanion, Q^{•-}. Das erste Q ist vollständig oxidiert und verlässt Q_a. Das zweite QH₂ bindet an Q_a und reagiert wie das erste QH₂-Molekül. Ein Elektron wird auf Cytochrom *c* übertragen und das andere auf das Q^{•-}. Das Q^{•-} nimmt das zweite Elektron und zwei Protonen aus der Matrix auf und es entsteht QH₂. Bei der Elektronenübertragung von QH₂ auf Cytochrom *c* werden vier Protonen der QH₂-Moleküle auf die Cytoplasmaseite gepumpt und zwei Protonen aus der Matrix entfernt, zwei QH₂-Moleküle zu Q oxidiert und ein zusätzliches Q-Molekül wird zu QH₂ reduziert. (Stryer, 2018, S. 626-628)

Das Cytochrom *c* transportiert ein Elektron zu der Cytochrom-*c*-Oxidase (CIV). Bei der Reduktion von O₂ werden vier Moleküle Cytochrom *c* und vier Protonen aus der Matrix

benötigt. Außerdem werden vier Protonen auf die Cytoplasmaseite gepumpt. In zwei Kupferzentren befinden sich insgesamt zwei Häm-A-Gruppen, Häm a und Häm a_3 und drei Kupferionen, Cu_A/Cu_A und Cu_B . Häm a und Cu_B bilden das aktive Zentrum. Die Elektronen der vier Cytochrom c werden wie folgt auf O_2 übertragen: Von zwei reduzierten Cytochrom- c -Molekülen wandern die Elektronen zu Cu_B und Häm a_3 . Wenn beide Zentren reduziert sind, bindet ein Sauerstoffmolekül an das aktive Zentrum. Der molekulare Sauerstoff zieht je ein Elektron der nahegelegenen Ionen ab und zwischen dem Eisen des Häm a_3 und dem Cu_B bildet sich eine Peroxid- (O_2^{2-}) -Brücke. Anschließend binden zwei weitere Cytochrom- c -Moleküle an CIV und die Elektronen wandern zum aktiven Zentrum. Durch die Addition eines Elektrons und eines Protons an die Sauerstoffatome werden die Ion-Sauerstoff-Gruppen zu $Cu_B^{2+}-OH$ und $Fe^{3+}-OH$ reduziert. Im vierten und letzten Schritt reagieren zwei weitere Protonen mit $Cu_B^{2+}-OH$ und $Fe^{3+}-OH$ und zwei Moleküle H_2O werden freigesetzt. Da die vier Protonen dieser Reaktion aus der Matrix stammen, tragen diese zum Protonengradienten bei. Da die Änderung der freien Enthalpie größer ist als der Beitrag der vier Protonen zu dieser, wird die restliche Energie zum Pumpen von vier Protonen über die Membran genutzt. Somit werden während eines Reaktionszyklus acht Protonen aus der Matrix entfernt. (Stryer, 2018, S. 629-631)

1.3. Die F_1F_0 -ATPase und die ATP-Synthese

Aerobe Organismen synthetisieren ATP über zwei Wege, erstens über die Glykolyse im Cytosol und zweitens über die oxidative Phosphorylierung (OXPHOS) an Membranen (Kadenbach, 2003). Dabei generiert die OXPHOS die 17-fache Menge an ATP im Vergleich zur Glykolyse (Kadenbach, 2003). Ionenaustauschexperimente zeigten, dass zur Bildung von ATP kein Protonengradient benötigt wird, sondern zur Freisetzung des gebildeten ATPs (Stryer, 2018, S. 639).

Die F_1F_0 -ATPase hydrolysiert unter pathologischen Bedingungen ATP, um das Membranpotenzial zu stabilisieren (Chinopoulos et al., 2010). Unter solchen Bedingungen wurde die F_1F_0 -ATPase zuerst beschrieben. Weshalb sie in einem Großteil der Literatur nicht ATP-Synthase, ihrer eigentlichen Funktion, genannt wird (Stryer, 2018, S. 636). Die F_1F_0 -ATPase besteht aus einem Rotor, dem c -Ring und dem $\gamma\varepsilon$ -Stiel und einem Stator, dem restlichen Molekül (Stryer, 2018, S. 639).

Die F_1 -Untereinheit ragt in die Matrix, ist kugelförmig mit einem Durchmesser von 8,5 nm und enthält die Komponenten der katalytischen Aktivität. Die F_1 -Untereinheit besteht aus je drei α - und β -Untereinheiten, diese sind katalytisch aktiv, die in einem hexameren Ring angeordnet sind und γ -, δ - und ε -Untereinheiten. Die γ - und ε -Untereinheiten befinden sich unter dem α -

und β -Hexamer und eine α -Helix von γ unterbricht die Symmetrie des Hexamers. Durch die Wechselwirkungen der β -Untereinheiten mit unterschiedlichen Oberflächen von γ unterscheiden sich die drei β -Untereinheiten voneinander. (Stryer, 2018, S. 637 & 638)

Die F_0 -Untereinheit ist ein integraler Bestandteil der inneren Mitochondrienmembran und enthält den Protonenkanal. Die F_0 -Untereinheit enthält den Protonenkanal, welcher aus 8 bis 14 c-Untereinheiten besteht. Die a-Untereinheit an der Außenseite verbindet mit zwei b-Untereinheiten und der δ -Untereinheit, neben den γ - und ϵ -Untereinheiten, die F_0 und die F_1 -Untereinheit. (Stryer, 2018, S. 637 & 638)

In der a-Untereinheit befinden sich zwei Halbkanäle, einer auf der Cytoplasmaseite und einer auf der Matrixseite. Beide Halbkanäle treten mit je einer c-Untereinheit in eine Wechselwirkung. Ein Proton neutralisiert im cytoplasmatischen Halbkanal einen Aspartatrest einer c-Untereinheit. Dadurch dreht sich der Ring im Uhrzeigersinn um eine c-Untereinheit weiter und ein Asparaginsäurerest tritt in Wechselwirkung mit dem Matrixhalbkanal, wodurch ein Proton in die Matrix gelangt. Da der c-Ring fest mit dem $\gamma\epsilon$ -Stiel verbunden ist, sind die β -Untereinheiten mit jedem Rotationsschritt mit einer anderen Oberfläche von γ in Kontakt und ändern ihre Konformation. (Stryer, 2018, S. 641 & 642)

Die ATP-Synthese läuft in drei Schritten in jeder β -Untereinheit ab. In der L-Konformation, loose, werden Adenosindiphosphat (ADP) und P_i gebunden. In der T-Konformation, tight, wird ATP synthetisiert und in der O-Konformation, open, wird ATP freigesetzt. (Stryer, 2018, S. 640)

Die F_1F_0 -ATPase rotiert 100 Mal pro Sekunde (Watt et al., 2010). Die Anzahl der für eine Umdrehung benötigten Protonen entspricht der Anzahl an c-Untereinheiten (Watt et al., 2010). Die γ -Untereinheit rotiert in 120° Schritten, wobei drei Moleküle ATP pro Umdrehung entstehen (Stryer, 2018, S. 641). Bei einer F_1F_0 -ATPase mit 10 c-Untereinheiten werden somit pro Umdrehung 3,3 Moleküle ATP gebildet (Ferguson, 2010).

1.4. Ektotherme Lebewesen und Anpassungen an das Habitat

Bei ektothermen Lebewesen ist die Körpertemperatur abhängig von der äußeren Wärmezufuhr und -abfuhr (Wehner und Gehring, 2013, S. 717). Die Mehrheit der Fische, zum Beispiel *Boreogadus saida* (*B. saida*), *Salmo salar* (*S. salar*) und *Dicentrarchus labrax* (*D. labrax*), sind ektotherme Lebewesen und haben eine Körpertemperatur identisch zur Umgebungstemperatur (Guderley und St-Pierre, 2002). Da die Temperatur eine der wichtigsten abiotischen Faktoren in marinen Ökosystemen darstellt, müssen sich ektotherme Lebewesen an unterschiedliche Temperaturen anpassen (Lucassen et al., 2003). In

ektothermen Organismen ist die metabolische Rate stark abhängig von der Temperatur und der Körpergröße (Clarke und Johnston, 1999).

Im Gegensatz zu ektothermen Lebewesen können sich endotherme Organismen mittels Hitzeproduktion an kältere Temperaturen anpassen. Bei kurzfristiger Kälte können sie über uncoupling Proteine (UCP) den Protonenleak zu Gunsten einer erhöhten Hitzeproduktion erhöhen und bei Kälteadaptation wird durch evolutionäre Selektion die OXPHOS zu Gunsten einer höheren Hitzeproduktion verringert (Gnaiger et al., 2015). Ein Homolog des in Mammalia vorhandenen UCP 1 wurde mittels Gensequenzanalyse in Zebrafischen, Karpfen, der Aalmutter und der antarktischen Aalmutter entdeckt (Stuart et al., 1999, Mark et al., 2006). So zeigt eine mRNA, die für ein Protein codiert, eine 82 %ige Übereinstimmung mit UCP2 (Stuart et al., 2001). Da diese Fische allerdings nicht zur Endothermie befähigt sind, liegt die Vermutung nahe, dass UCP2 eine andere Funktion als die Thermogenese hat (Stuart et al., 1999).

In ektothermen Fischen gibt es viele Hinweise auf adaptive Veränderungen der enzymatischen Aktivität des OXPHOS-Weges (Bermejo-Nogales et al., 2015). Vor 100 Jahren wurde die Theorie der metabolic cold adaptation entwickelt. Gemäß dieser Theorie haben Spezies aus kalten Klimaten eine relativ höhere metabolische Rate als Spezies aus warmen Klimaten (White et al., 2011). Wenn die Temperatur allerdings über oder unter eine Temperaturschwelle steigt oder fällt, wird die aerobe Energieproduktion durch niedrige Sauerstoffkonzentration in Körperflüssigkeiten, dem Wechsel zum anaeroben Metabolismus und progressive Insuffizienz von zellulären Energielevel limitiert (Pörtner et al., 2000).

Bei der Temperaturadaptation sind Mitochondrien, wegen ihres Ursprungs als Symbionten, von besonderem Interesse für die Thermalbiologie (Guderley und St.-Pierre, 2002). Der primäre Mechanismus, um die aerobe Kapazität von Muskeln in Kaltwasserfischen zu erhöhen, ist die Erhöhung der Oberflächen- und Volumendichte von Mitochondrien (Johnston et al., 1998). Außerdem ist, neben der erhöhten Mitochondriendichte in der Leber, auch die Leber in polaren *Zoarces viviparus* nach Adaptation an permanente Kälte vergrößert (Pörtner et al., 2000). Außer der Anpassung an kalte Temperaturen durch eine Erhöhung der Mitochondriendichte oder eine größere Leber, gibt es auch Anpassungen auf enzymatischer Ebene. So ist die Citrat-Synthase und die Cytochrom-c-Oxidase-Aktivität in antarktischen Arten 1,5- bis 5-fach höher als in tropischen Arten (Johnston et al., 1997). Außerdem zeigen Mitochondrien bei kalten Temperaturen eine erhöhte Affinität zu ADP (Guderley und St-Pierre, 2002).

1.5. Substrate-Uncoupler-Inhibitor-Titration-Protokoll

Substrat-Uncoupler-Inhibitor-Titration Protokolle (SUIT-Protokoll) bieten den Vorteil, mit einer kleinen biologischen Probe mehrere respiratorische Zustände, States, sequenziell zu messen (Gnaiger, 2014, S. 50). Zur Messung der Sauerstoffkonzentration und des Sauerstoffverbrauchs wurde ein Oroboros O2k High-resolution respirometry (HRR) verwendet. Das HRR bietet den Vorteil, dass Messungen bei geringen Probenmengen hochsensitiv sind, das HRR einen geringen Instrumentenbackground hat und es eine genaue Temperatur- und Rührerkontrolle bietet (Lanza und Nair, 2010). Die Sauerstoffkonzentration wird mittels einer Clark-Elektrode gemessen. Diese besteht aus einer Gold- oder Platin-Kathode und einer Ag/AgCl-Anode, welche durch eine KCl-Lösung getrennt sind. Es wird eine Spannung angelegt und O₂ diffundiert durch die Membran. An der Kathode wird O₂ durch zwei Elektronen zu H₂O₂ reduziert und H₂O₂ oxidiert an der Anode Ag. Dies erzeugt einen elektrischen Strom proportional zum O₂-Partialdruck, beziehungsweise der O₂-Konzentration in der experimentellen Lösung (Perry et al., 2013).

Es gibt insgesamt 4 States, in denen sich Mitochondrien befinden können. State -I ist der O₂-Verbrauch vor der Zugabe von Substraten, State-II die Respiration nach der Substratzugabe, State-III die Respiration nach der ADP-Zugabe und State-IV die Respiration nach vollständiger Synthese von ADP zu ATP (Perry et al., 2013).

Das SUIT-Protokoll wurde mit der Titration von Glutamat, Malat und Pyruvat gestartet. Diese Substrate stimulierten die Dehydrogenasen mit der Reduktion von NADH, welches Elektronen zu Cl transportierte. Die Elektronen wurden über die thermodynamische Kaskade durch den Q-Zyklus und CIII zu CIV und O₂ transportiert (Gnaiger, 2014, S. 32). Dabei koppelten CI, CIII und CIV den Elektronentransport an das Pumpen von Protonen über die innere Mitochondrienmembran, wodurch ein elektrochemischer Protonengradient aufgebaut wurde (Brown, 1992). Dadurch wurde State 2, beziehungsweise LEAK-Respiration ohne Adenylate (L_n) erreicht (Gnaiger, 2014, S. 29). Anschließend wurde ADP titriert. Dadurch wurde die OXPHOS-Kapazität P unter Beteiligung von Cl gemessen. Um die volle OXPHOS-Kapazität und State 3 zu erreichen, wurde Succinat hinzugefügt. CII oxidierte Succinat, wodurch Elektronen dem Chinonpool und dem ETS hinzugeführt wurden (Gnaiger, 2014, S. 39). Die OXPHOS-Kapazität P ist die respiratorische Kapazität von Mitochondrien in einem ADP-stimulierten Zustand der OXPHOS bei sättigenden Konzentrationen von ADP, inorganischen Phosphaten, Sauerstoff und bestimmten CHO-Substraten (Gnaiger, 2014, S. 24). Anschließend wurde die F₁F₀-ATPase mit Oligomycin inhibiert und die LEAK-Respiration (L_{omy}) gemessen. Oligomycin ist ein Antibiotikum, welches durch Binden an die Carboxylgruppe der c-Untereinheiten den Einstrom von Protonen verhindert (Stryer, 2018, S. 652). Die Elektronentransfersystemkapazität E wurde durch die wiederholte Titration von Entkopplern

der Protonophorengruppe, zum Beispiel Carbonyl-cyanid-p-(trifluoromethoxy)phenylhydrazon (FCCP), erreicht (Gnaiger, 2014, S. 26). FCCP ist eine schwache organische Säure mit delokalisierte negativer Ladung, wodurch FCCP die Membran durchdringen kann (Kadenbach, 2003). Der Protonengradient wurde durch die Translokation von negativgeladenen Komponenten aus den Mitochondrien und Diffusion von protonierten Entkopplern in die Matrix verringert (Kadenbach, 2003). Dadurch nahm der Protonenleak zu. Dieser führte zu einem erhöhten Sauerstoffverbrauch (Groen et al., 1990). Anschließend wurden CI, CII und CIII inhibiert. Rotenon verhinderte in CI die Elektronenübertragung und somit NADH als Substrat (Stryer, 2018, S. 652). Malonat inhibierte kompetitiv CII, da Malonat mit derselben Affinität wie Succinat an CII band, aber nicht von CII zu Fumarat umgewandelt wurde (Potter, 1943). Antimycin A unterband in CIII den Elektronenfluss am Cytochrom b_H (Stryer, 2018, S. 652). Nach der Inhibierung der Komplexe CI bis CIII wurde der Restsauerstoffverbrauch (ROX) durch oxidative Seitenreaktionen gemessen (Gnaiger, 2014, S. 31). Abschließend wurde durch Ascorbat und Tetramethylphenyldiamin (TMPD) die Kapazität des ETS getestet. TMPD ist ein CIV-spezifischer Elektronendonator und Ascorbat sichert die Reduktion von TMPD, in dem Ascorbat Elektronen abgibt (Bioblast, 2020).

1.6. Messung der ATP-Produktion

ATP ist die Energiequelle für die meisten Zellfunktionen wie DNA-, RNA- und Proteinsynthese, Zellteilung, Signaltransduktion, Muskelkontraktion und aktiver Transport über Zellmembranen (Salin, 2015). Die stöchiometrische Effizienz der OXPHOS wird als Verhältnis von produziertem ATP zu verbrauchten Sauerstoff, dem P/O-Verhältnis, dargestellt (Kadenbach, 2003, Salin, 2016). P/O-Verhältnisse wurden zuerst in den 1940er und 1950er Jahren untersucht und als ganzzahlige Verhältnisse angenommen (Hinkle, 2005). Allerdings erwies sich die Messung der P/O-Verhältnisse, aufgrund von ATPasen in den Homogenaten, als herausfordernd (Ferguson, 2010, Salin, 2016). In den 1980ern rückte die Messung der P/O-Verhältnisse erneut in den Fokus, da Mitchell's chemi-osmotische Theorie gebrochene Werte der P/O-Verhältnisse erlaubten (Hinkle, 2004).

Die ATP-Produktion wurde mit dem Mg^{2+} -sensitiven Fluoreszenzindikator Magnesium Green (MgG) gemessen. MgG fluoresziert, wenn es Mg^{2+} gebunden hat (Bioblast, 2020). Da ADP und ATP in der Regel mit Mg^{2+} komplexiert werden, entfärbt sich MgG mit steigender ATP-Konzentration (Stryer, 2018, S. 639). Allerdings zeigen Mg^{2+} -sensitive Fluoreszenzindikatoren eine signifikante Sensitivität zu Ca^{2+} , weshalb im Respirationsmedium Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure (EGTA) vorhanden war (Leysens et al., 1996).

Die ATP-Produktion wird aus der Veränderungsrate von $[Mg^{2+}]$, basierend auf unterschiedlicher Affinität von ATP und ADP zu Mg^{2+} , berechnet (Salin et al., 2016, Metelkin et al., 2009). Allerdings ist die innere Mitochondrienmembran nicht permeabel für MgG und die ATP-Synthese findet auf der Matrixseite statt (Chinopoulos et al., 2010). Die Adenin-Nukleotid-Translokase (ANT) katalysiert den reversiblen Austausch von ADP in die Matrix und ATP auf die Cytoplasmaseite im Mg^{2+} -freien Zustand im stöchiometrischen Verhältnis von 1:1 (Chinopoulos et al., 2009, Chinopoulos et al., 2014, Stryer, 2018, S. 646).

Da in permeabilisierten Herzfasern mehrere Enzyme, die Adeninnukleotide umsetzen können, wie Phosphorylasen, Kinasen und Myosin-ATPasen in kontraktile Zellen vorhanden sind, müssen diese inhibiert werden (Chinopoulos, 2014). In dieser Versuchsreihe wurden die Na^+K^+ -ATPase mit Ouabain und die Myosin-ATPase mit Blebbistatin inhibiert (Iftikar und Hickey, 2013).

1.7. Forschungsziele

Die Forschungsziele dieser Projekt- und Bachelorarbeit waren zum Einen die Messung des Sauerstoffverbrauchs in isolierten Lebermitochondrien und permeabilisierten Herzfasern von *B. saida* bei 5 °C, von *S. salar* bei 10 °C und von *D. labrax* bei 15 °C. Und zum Anderen die Messung der ATP-Produktion mittels des Mg^{2+} -sensitiven Fluoreszenzindikators MgG in isolierten Lebermitochondrien und permeabilisierten Herzfasern von *B. saida* bei 5 °C, *S. salar* bei 10 °C und *D. labrax* bei 15 °C.

1.8. Erwartungen

Die Erwartungen an die Ergebnisse dieser Projekt- und Bachelorarbeit waren, dass bei der höheren Temperatur ein höherer Sauerstoffverbrauch und eine höhere ATP-Produktion als bei den niedrigeren Temperaturen gemessen werden. Gemäß der RGT-Regel und dem Q10-Wert ist die enzymatische Aktivität bei einer 10 °C höheren Temperatur um den Faktor 2 höher (Perry et al., 2013).

Ebenfalls wurde ein Unterschied von isolierten Lebermitochondrien zu permeabilisierten Herzfasern erwartet. Die Permeabilisierung lässt die Herzmitochondrien und die Cytoskelettverbindungen intakt und verändert nicht die kooperative Natur der mitochondrialen Interaktion (Herbst und Holloway, 2015, Iftikar und Hickey, 2013). Dementsprechend wurden für die permeabilisierten Herzfasern Werte nahe der physiologischen Werte erwartet.

2. Material und Methoden

2.1. Fischschlachtung und Probengewinnung

Die Fische wurden mit 0,4 g/l Tricain-Methan-Sulfonat (MS222) betäubt. Die Betäubung mit MS222 dauerte je nach Art, *B. saida*, *S. salar* und *D. labrax*, zwischen 5 und 15 Minuten. Die Fische wurden mit einem spinalen Schnitt hinter der Kopfplatte geschlachtet. Anschließend wurden die Leber und das Herz präpariert. (Strobel et al, 2013)

2.2. Mitochondrien-Isolation

Die Methode der Mitochondrien-Isolation wurde von Strobel et al. 2013 mit einigen Anpassungen übernommen.

Die Leber wurde von Blut, Fettgewebe und Blutgefäßen gereinigt. Anschließend wurde die Leber gewogen. Auf Eis wurde die Leber in 4 ml/g Mitochondrienrespirationsmedium 05 (MiR05) (1 mmol/l MgCl₂, 0,5 mmol/l EGTA, 60 mmol/l K-Lactobionat, 20 mmol/l Taurin, 10 mmol/l KH₂PO₄, 20 mmol/l HEPES, 110 mmol/l Sucrose, 1 g/l BSA) gewaschen und klein geschnitten. Anschließend wurden die Leberstücke mit dem MiR05-Puffer in ein 30 ml Potter-Elvehjem glass homogener überführt. Die Suspension wurde bei 80 Umdrehungen/Minute (rpm) auf Eis homogenisiert, bis keine Gewebestücke mehr sichtbar waren. Die Lebersuspension wurde in 5 ml Reaktionsgefäße überführt und 20 Minuten bei 1200 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde in einem neuen Reaktionsgefäß auf Eis gesammelt. Das Pellet wurde in MiR05 resuspendiert und mit drei vorsichtigen Stößen erneut auf Eis homogenisiert. Das resuspendierte Pellet wurde zum zweiten Mal bei 1200 rpm für 20 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde in einem neuen Reaktionsgefäß gesammelt und das Pellet wurde verworfen. Die gesammelten Überstände wurden für 20 Minuten bei 12.000 rpm zentrifugiert. Die Überstände wurden verworfen und das Pellet in MiR05 resuspendiert und erneut für 10 Minuten bei 12.000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet wurde in 1,5 ml MiR05 resuspendiert. Bis zu dem Beginn des Experimentes wurde die Mitochondrienlösung auf Eis gelagert.

2.3. Permeabilisierung von Herzfasern

Die Methode zur Herstellung permeabilisierter Herzfasern wurde von E. Leo et al, 2017 übernommen.

Das Herz wurde in Biops-Puffer (60 mmol/l K-Lactobionat, 20 mmol/l Taurin, 10 mmol/l KH_2PO_4 , 20 mmol/l HEPES, 110 mmol/l Sucrose, 1g/l BSA) gewaschen. Anschließend wurde das Herz in Fasern separiert und für 20 Minuten in 2 ml Biops mit 50 $\mu\text{g/ml}$ Saponin auf Eis geschüttelt. Die Herzfasern wurden in MiR05-Puffer umgesetzt und drei Mal 10 Minuten in jeweils frischem MiR05-Puffer auf Eis schüttelnd gewaschen. Nach Beendigung des dritten Waschschrittes wurden die permeabilisierten Herzfasern auf Eis gelagert.

2.4. Substrate-Uncoupling-Inhibitor-Titration-Protokoll

2.4.1. Substrate-Uncoupler-Inhibitor-Titration-Protokoll für isolierte Mitochondrien

Das SUI-Protokoll wurde mit einigen Änderungen von Iftikar und Hickey, 2013 übernommen. Die Daten wurden mit der DatLab-Software von Oroboros aufgezeichnet und dargestellt.

300 μl der Mitochondrien-Suspension wurden mit MiR05-Puffer in die Kammern des HRR Oxygraphen gegeben, sodass ein Gesamtvolumen von 2 ml vorlag.

Vor Beginn des SUI-Protokolls wurde die Stabilisierung des O_2 -Flux abgewartet, um die State-I-Respiration (blank) der biologischen Probe zu messen.

Das SUI-Protokoll wurde mit der Titration der Substrate, Glutamat (1mM), Malat (0,4 mM) und Pyruvat (2 mM), für CI gestartet. ADP (0,25 mM) wurde hinzutitriert um CI-State-III zu erreichen. Die OXPHOS wurde durch Succinat (2 mM), dem Substrat für CII, erreicht. Mit Oligomycin (2 $\mu\text{g/ml}$) wurde die F_0F_1 -ATP-Synthase inhibiert und anschließend L_{omy} gemessen. Wiederholte Titrations, $\times 0,5 \mu\text{l}$, von FCCP entkoppelten die Mitochondrien. Rotenon (0,005 mM), Malonat (0,5 mM), und Antimycin A (0,0025 mM), inhibierten nacheinander die Komplexe CI, CII und CIII. Abschließend wurden Ascorbat (2 mM) und TMPD (0,5 mM) in die Kammern titriert, um die alleinige Kapazität von CIV zu messen.

2.4.2. Substrate-Uncoupler-Inhibitor-Titration-Protokoll für permeabilisierte Herzfasern

Das SUIT-Protokoll wurde mit einigen Änderungen von Iftikar und Hickey, 2013 übernommen. Die Daten wurden mit der DatLab-Software von Oroboros aufgezeichnet und dargestellt. In den Kammern des Oroboros 2k Oxygraph für High-Resolution Respirometry (HRR) wurden 2 ml MiR05-Puffer vorgelegt. Es wurden für jede Kammer 3-8 mg permeabilisierte Herzfasern abgewogen und in die Kammern gegeben.

Vor Beginn des Experimentes wurde eine Stabilisierung des O₂-Flux abgewartet, um den blank der biologischen Probe zu messen.

Das SUIT-Protokoll wurde mit der Titration der Substrate, Glutamat (5 mM), Malat (0,8 mM) und Pyruvat (5 mM), für CI gestartet. ADP (1,25 mM) wurde hinzutitriert, um CI-State-III zu erreichen. OXPHOS, 2D, wurde durch Succinat (5 mM), dem Substrat für CII, erreicht. Mit Oligomycin (4 µg/ml), 3Oli, wurde die F₀F₁-ATP-Synthase inhibiert und anschließend L_{omy} gemessen. Wiederholte Titrations, x*0,5 µl, von FCCP entkoppelten die Mitochondrien. Rotenon (0,005 mM), Malonat (5 mM) und Antimycin A (0,0025 mM) inhibierten nacheinander die Komplexe CI, CII und CIII. Abschließend wurden Ascorbat (2 mM) und TMPD (0,5 mM) in die Kammern titriert, um die alleinige Kapazität von CIV zu messen.

2.5. K_d-Determination ohne biologische Proben

Die Methode der K_d-Determination wurde von Chinopoulos et al. (2014) und K. Salin et al. (2016) übernommen.

Für die K_d-Determination wurde der HRR Oxygraph mit Fluoreszenz-Sensoren Smart Fluo-Sensor Blue für Wellenlängen im Bereich von 465 nm verwendet. Die Daten wurden mit der DatLab-Software von Oroboros aufgezeichnet und dargestellt. Der Gain, der Verstärkungsgrad der Fluoreszenz-Sensoren, wurde auf 1000 und die Fluo-Intensität auf 250, beziehungsweise 500, eingestellt. Die Temperatur betrug 5 °C, 10 °C, beziehungsweise 15 °C.

In den Kammern wurden 2 ml MiR05-Puffer vorgelegt. Zunächst wurde in die Kammern der Fluoreszenzfarbstoff MgG (2,2 µM) titriert. Anschließend wurde im Abstand von 90 Sekunden 10 Mal MgCl₂ (0,05 mM) titriert. In Kammer A wurde in 10 Schritten ADP (0,05 mM) und in Kammer B in 10 Schritten ATP (0,05 mM) titriert.

2.6. Messung der ATP-Produktion

2.6.1. Messung der ATP-Produktion in isolierten Mitochondrien

Das Protokoll zur Messung der ATP-Produktion in isolierten Mitochondrien wurde von F. Iftikar und A. Hickey (2013) mit einigen Anpassungen übernommen.

Für die Messung der ATP-Produktion wurde der HRR Oxygraph mit Fluoreszenz-Sensoren Smart Fluo-Sensor Blue für Wellenlängen im Bereich von 465 nm verwendet. Die Daten wurden mit der DatLab-Software von Oroboros aufgezeichnet und dargestellt. Der Gain, der Verstärkungsgrad der Fluoreszenz-Sensoren, wurde auf 1000 und die Fluo-Intensität auf 250, beziehungsweise 500, eingestellt.

300 µl, beziehungsweise je nach Menge an Material 200 µl der Mitochondrien-Suspension wurden mit MiR05-Puffer in die Kammern gegeben, sodass ein Gesamtvolumen von 2 ml vorlag. Ouabain (50 µM) und MgG (5,5 µM) wurden zu der verdünnten Mitochondrien-Suspension in die Kammern titriert. Nach der Stabilisierung des O₂-Flux und des Amp-Signals wurden im Abstand von 5 Minuten die Substrate für CI, Glutamat (1 mM), Malat (0,4 mM) und Pyruvat (2 mM), titriert. Anschließend wurde ADP (0,25 mM, beziehungsweise 0,5 mM) in sättigender Konzentration titriert, um eine maximale ATP-Produktion unter Beteiligung des Komplex CI zu messen. Nach einer Messdauer von 5 Minuten wurde Succinat (2 mM) hinzutitriert, um die ATP-Produktion mit CI und CII zu messen. Nach wiederum 5 Minuten Messdauer, bei isolierten Mitochondrien aus *B. saida* 30 Minuten, wurden CI, CII und CIII durch Rotenon (0,005 mM), Malonat (0,5 mM) und Antimycin A (0,0025 mM) inhibiert. 5 Minuten nach der Hinzugabe von Antimycin A wurde das Experiment beendet.

2.6.2. Messung der ATP-Produktion in permeabilisierten Herzfasern

Das Protokoll zur Messung der ATP-Produktion in permeabilisierten Herzfasern wurde von F. Iftikar und A. Hickey (2013) mit einigen Anpassungen übernommen.

Für die Messung der ATP-Produktion wurde der HRR Oxygraph mit Fluoreszenz-Sensoren Smart Fluo-Sensor Blue für Wellenlängen im Bereich von 465 nm verwendet. Die Daten wurden mit der DatLab-Software von Oroboros aufgezeichnet und dargestellt. Der Gain, der Verstärkungsgrad der Fluoreszenz-Sensoren, wurde auf 1000 und die Fluo-Intensität auf 500 eingestellt.

In den Kammern wurde 2 ml MiR05-Puffer vorgelegt. 3 – 8 mg permeabilisierte Herzfasern wurden in die Kammern gegeben. Anschließend wurden die Inhibitoren Blebbistatin (60 μ M) und Ouabain (50 μ M) sowie MgG (5,5 μ M) in die Kammern titriert. Nach der Stabilisierung des O₂-Flux und des Amp-Signals wurden im Abstand von je 5 Minuten die Substrate des Komplexes CI, Glutamat (5 mM), Malat (0,8 mM) und Pyruvat (5 mM), titriert. Anschließend wurde ADP (1,25 mM) in sättigender Konzentration hinzutitriert, um eine maximale ATP-Produktion unter Beteiligung des Komplexes CI zu messen. Nach einer Messdauer von 5 Minuten wurde Succinat (5 mM) in die Kammern titriert, um die ATP-Produktion unter Beteiligung von CI und CII zu messen. Die ATP-Produktion wurde für 5 Minuten, bei *B. saida* 30 Minuten, gemessen. Anschließend wurden im Abstand von 5 Minuten die Komplexe CI, CII und CIII mit Rotenon (0,005 mM), Malonat (5 mM) und Antimycin A (0,0025 mM) inhibiert. Nach weiteren 5 Minuten wurde das Experiment beendet.

2.7. Bradford-Assay

Zur Proteinbestimmung der Mitochondrien-Suspensionen wurde ein Bradford-Assay nach einer angepassten Anleitung von PanReac AppliChem durchgeführt.

Die Mitochondrien-Suspension und MiR05-Puffer wurden 1:200 in 0,9 %igen Natriumchlorid (NaCl) verdünnt und in einem Ultraschallbad 90 Sekunden bei 0 °C homogenisiert. Anschließend wurden die 1:200 verdünnten Mitochondrien-Suspensionen 1:2, 1:3,33, 1:1,66, 1:1,25 und 1:1 mit 0,9 %iger NaCl verdünnt.

Für die Standardreihe wurde Rinderserumalbumin (BSA) als Standardprotein verwendet. Die 1 mg/ml Stammlösung wurde zunächst 1:10 mit 0,9 %iger NaCl vorverdünnt. Für die Standardreihe wurden fünf Verdünnungen à 1 μ g, 2 μ g, 3 μ g, 4 μ g und 5 μ g angesetzt. Hierzu wurde die vorverdünnte BSA-Lösung mit 0,9 %iger NaCl im Verhältnis 1:5, 1:2,5, 1:1,66, 1:1,25 und 1:1 verdünnt.

Für die Proteinbestimmung wurde eine Well-Platte mit 96 Wells genutzt. Es wurde immer eine dreifache Bestimmung durchgeführt. Abbildung 2 zeigt eine beispielhafte Belegung einer Well-Platte.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	BLK	BLK	BLK	SPL1	SPL1	SPL1	SPL9	SPL9	SPL9			
B	STD1 1	STD1 1	STD1 1	SPL2	SPL2	SPL2	SPL10	SPL10	SPL10			
C	STD2 2	STD2 2	STD2 2	SPL3	SPL3	SPL3	SPL11	SPL11	SPL11			
D	STD3 3	STD3 3	STD3 3	SPL4	SPL4	SPL4	SPL12	SPL12	SPL12			
E	STD4 4	STD4 4	STD4 4	SPL5	SPL5	SPL5	SPL13	SPL13	SPL13			
F	STD5 5	STD5 5	STD5 5	SPL6	SPL6	SPL6						
G	SPL14	SPL14	SPL14	SPL7	SPL7	SPL7						
H	SPL15	SPL15	SPL15	SPL8	SPL8	SPL8						

Abb. 2: Beispiel eines Layouts einer Well-Platte. BLK: Blank; STD1 - STD5: Standardreihe; SPL1 - SPL13: Verdünnungen Mitochondrien-Suspension; SPL14 + SPL15: Verdünnung MiR05-Puffer.

Der Blank war 50 µl 0,9 %iger NaCl. Es wurden immer 50 µl der verdünnten Standardreihe und der verdünnten Proben pro Wellplatte vorgelegt. Anschließend wurden 250 µl frisch filtrierter Bradford-Lösung, Brilliant-Coomassie-Blau, unter Vermeidung von Luftblasenbildung hinzu pipettiert. Nach 8, 12 und 15 Minuten wurde die Extinktion bei 595 nm gemessen.

2.8. Auswertung

2.8.1. Auswertung der Bradford-Assays

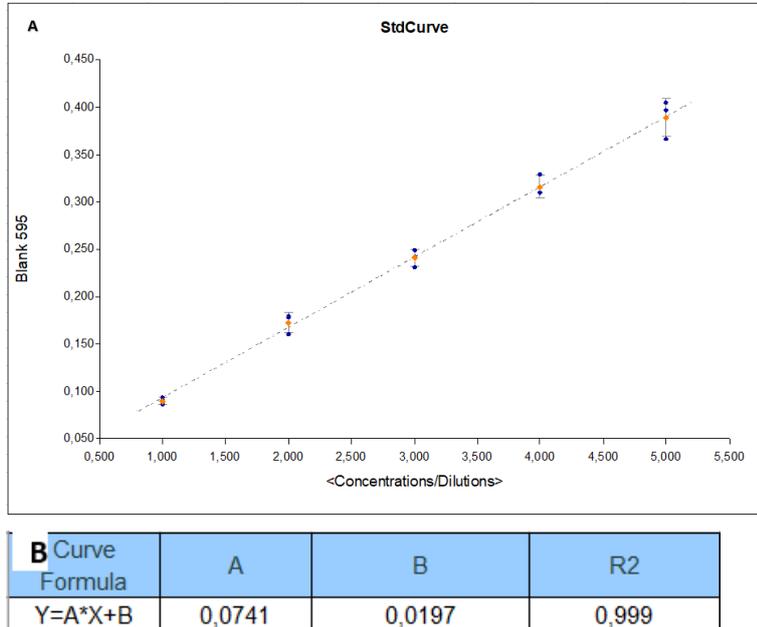


Abb. 3: (A): Standardkurve der Proteinbestimmung nach 12 Minuten Inkubationszeit. Auf der x-Achse sind die Proteinkonzentrationen in $[\mu\text{g}/300 \mu\text{l}]$ aufgetragen und auf der y-Achse die Blank 595-Werte. Blaue Punkte: Extinktionswerte der einzelnen Messungen der dreifach Bestimmung; Orange Punkte: Mittelwerte der einzelnen Extinktionswerte; gestrichelte Linie: Trendlinie der Mittelwerte. (B): Tabelle mit Kurvenformel der Standardkurve, Werte der Variablen A und B, sowie den R-Wert der Standardkurve.

Anhand der von der Software erstellten Standardkurve und der Kurvenformel konnten die Proteinkonzentrationen der Proben errechnet werden (Abb. 3 A und B). Hierzu wurde die Kurvenformel zunächst nach X umgestellt: $X = (Y-B)/A$. Y ist der Mittelwert des Blank-595-Extinktionswertes der Probe. Zunächst wurde die Kurvenformel nach X umgestellt. Anhand der Formel $X = (Y-B)/A$ wurde mit dem Mittelwert der Blank-595-Extinktion die Proteinkonzentration in $[\mu\text{g}/300 \mu\text{l}]$, beziehungsweise $[\mu\text{g}/50 \mu\text{l}]$ berechnet. Als nächstes wurde die Proteinkonzentration in $1 \mu\text{l}$ verdünnter Probe berechnet. Hierzu wurde die Proteinkonzentration $[\mu\text{g}/50 \mu\text{l}]$ durch das jeweilige eingesetzte Volumen dividiert. Im dritten Schritt wurde die Proteinkonzentration pro μl Originalprobe berechnet. Da die Originalprobe 1:200 mit 0,9 %iger NaCl verdünnt wurde, wurde die Proteinkonzentration pro $1 \mu\text{l}$ verdünnter Probe mit dem Faktor 200 multipliziert. Abschließend wurde von der Proteinkonzentration der Originalprobe $1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ subtrahiert, da MiR05 $1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ BSA enthielt.

Für die Eintragung in DatLab wurde die Proteinkonzentration der Originalprobe durch den jeweiligen Verdünnungsfaktor, je nach eingesetztem Volumen der Mitochondrien-Suspension, dividiert.

2.8.2. Auswertung der SUIT-Protokolle

Für die Auswertung der SUIT-Protokolle wurden in den Aufzeichnungen mit DatLab stabile Bereiche des O₂ flux per mass nach den Titrations markiert. Die Markierungen wurden anschließend in eine Excel-Datei von Oroboros Instruments übertragen. Diese Excel—Datei berechnete den O₂ flux per mass (mt) und die flux control ratios (mt). Bei mehreren Experimenten mit der gleichen Probenart, isolierte Mitochondrien oder permeabilisierte Herzfasern, wurden anschließend Mittelwerte und Standardabweichungen berechnet.

Der O₂ flux per mass wurde durch die Division der Sauerstoffverbrauchsrate in pmol/s, Sauerstoffflux, pro Volumeneinheit [ml] mit der Massenkonzentration der biologischen Proben, mg/ml, berechnet. Anschließend wurden die O₂ flux per mass [pmol/(s*mg)] Werte der Markierung mit der blank Respiration korrigiert, O₂ flux per mass (mt). (Gnaiger, 2014, S. 10-12)

Das flux control ratio (FCR) dient der strukturierten Analyse der Mitochondrienfunktion in Abhängigkeit von mitochondriellen Markern. Hier diente der O₂ flux per mass (mt) nach der Titration von Ascorbat und TMPD als Marker und entsprach 1,0, beziehungsweise 100 %. Das FCR der anderen Markierungen wurde als prozentualer Anteil des O₂ flux per mass (mt) nach der Titration von Ascorbat und TMPD berechnet. (Gnaiger, 2014, S. 12)

2.8.3. Auswertung der K_d-Determinations

Für die Auswertung der K_d-Determinations wurden in den Aufzeichnungen mit DatLab vor der ersten MgCl₂ und nach jeder MgCl₂ Titration die stabilen Bereiche des Amp-Signals markiert. Ebenso wurde nach jeder ADP und ATP Titration der stabile Bereich des Amp-Signals markiert. Diese Markierungen wurden in die Excel-Datei „Template_MgG_Calibration_and_Kd_determination_ADP_und_ATP_to_Mg“ von Oroboros Instruments übertragen. Die Excel-Datei berechnete zunächst für jede Versuchsbedingung die freie Mg²⁺-Konzentration und anschließend die K_d für ADP und ATP zu Mg²⁺. Die K_d's wurden für die Berechnung der ATP-Produktion und des P/O-Verhältnisses benötigt.

2.8.4. Auswertung der ATP-Produktion und der P/O-Verhältnisse

Für die Auswertung der ATP-Produktion wurden die Daten des Amp-Signals in eine Text.csv-Datei exportiert. In die Excel-Datei „Template-MgG ATP production analysis“ von Oroboros Instruments wurden die markierten MgCl_2 Titrations der K_d -Determinations, sowie die K_d für ADP und ATP und die titrierte ADP-Konzentration übertragen. Die Daten der Text.csv-Datei wurden in die Excel-Datei importiert. Die Daten des Amp-Signals und der dazugehörige Zeitpunkt zwischen der ADP- und Rotenon-Titration wurden in eine vorgelegte Tabelle kopiert. Aus den vorliegenden Daten berechnete Excel für jeden Amp-Wert die ATP-Konzentration. Diese Werte wurden aufgeteilt in Werte nach ADP-Titration und Werte nach Succinat-Titration und mit einem jeweiligen „Null“-Wert nach jeder Titration korrigiert.

Für die ATP-Produktion in $[\text{mmol}/(\text{s}\cdot\text{mg})]$ wurde die ATP-Konzentration in $[\text{mmol}/\text{l}]$ durch die Dauer der Aufzeichnung in $[\text{s}]$ multipliziert mit der Probenkonzentration in $[\text{mg}/\text{l}]$ dividiert. Anschließend wurden Mittelwerte und Standardabweichungen berechnet.

Für die Berechnung des P/O-Verhältnisses wurden zunächst die Daten der Sauerstoffkonzentration des jeweiligen Experiments in eine Text.csv-Datei exportiert und in die dazugehörige Excel-Datei importiert. Für den Messbereich der ATP-Produktion zwischen der ADP und Succinat-Titration und zwischen der Succinat und Rotenon-Titration wurde $d\text{O}_2$ und dt gebildet. $d\text{O}_2$ in $[\mu\text{mol}/\text{l}]$ wurde auf $[\mu\text{mol}/\text{ml}]$ umgerechnet. Anschließend wurde $d\text{O}_2$ in $[\mu\text{mol}/\text{ml}]$ durch Probenkonzentration $[\text{mg}/\text{ml}]$ dividiert. Die ATP-Produktion in $[\text{mmol}/(\text{s}\cdot\text{mg})]$ wurde mit dt multipliziert. Anschließend wurden $d\text{O}_2$ $[\mu\text{mol}/\text{mg}]$ und ATP-Produktion $[\text{mmol}/\text{mg}]$ auf die gleiche Einheit umgerechnet und die ATP-Produktion durch $d\text{O}_2$ dividiert. Anschließend wurden die Mittelwerte und Standardabweichungen berechnet.

3. Ergebnisse

3.1. Bradford-Assay – Proteinbestimmung

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A							0,358	0,354	0,357	0,547	0,551	0,528	595
							0,002	-0,002	0,001	0,191	0,195	0,172	Blank 595
							<0,800	<0,800	<0,800	2,307	2,361	2,05	[Concentration]
B							0,45	0,443	0,447	0,549	0,546	0,535	595
							0,094	0,087	0,091	0,193	0,19	0,179	Blank 595
							0,998	0,904	0,958	2,334	2,293	2,145	[Concentration]
C							0,536	0,535	0,517	0,476	0,477	0,465	595
							0,18	0,179	0,161	0,12	0,121	0,109	Blank 595
							2,158	2,145	1,902	1,349	1,362	1,201	[Concentration]
D							0,599	0,606	0,588	0,466	0,469	0,46	595
							0,243	0,25	0,232	0,11	0,113	0,104	Blank 595
							3,008	3,103	2,86	1,214	1,254	1,133	[Concentration]
E							0,666	0,686	0,666	0,708	0,71	0,685	595
							0,31	0,33	0,31	0,352	0,354	0,329	Blank 595
							3,912	4,182	3,912	4,478	4,505	4,168	[Concentration]
F							0,753	0,761	0,723	0,631	0,63	0,603	595
							0,397	0,405	0,367	0,275	0,274	0,247	Blank 595
							5,085	5,193	4,681	3,44	3,426	3,062	[Concentration]
G							0,371	0,372	0,363	0,686	0,658	0,624	595
							0,015	0,016	0,007	0,33	0,302	0,268	Blank 595
							<0,800	<0,800	<0,800	4,182	3,804	3,345	[Concentration]
H							0,362	0,363	0,356	0,729	0,727	0,689	595
							0,006	0,007	0	0,373	0,371	0,333	Blank 595
							<0,800	<0,800	<0,800	4,762	4,735	4,222	[Concentration]

Abb. 4: Messergebnisse eines Bradford-Assays. Jede Reihe A-F ist in drei Unterreihen unterteilt (siehe Spalte am rechten Rand): 1. Reihe: 595: Extinktionswert bei 595 nm; 2. Reihe: Blank 595: Extinktionswert bei 595 nm korrigiert mit dem Mittelwert der Extinktion des Blanks; 3. Reihe: [Concentration]: errechnete Proteinkonzentration in [$\mu\text{g}/300 \mu\text{l}$].

Abbildung 4 zeigt die Messergebnisse eines Bradford-Assays nach einer Inkubationszeit von 12 Minuten. Pro Zeile A bis H sind drei Zahlenwerte zu sehen. Von oben nach unten sind der Extinktionswert bei 595 nm, der korrigierte Extinktionswert bei 595 nm (Blank 595) und die von der Software errechnete Proteinkonzentration in [$\mu\text{g}/300 \mu\text{l}$] dargestellt. Für den korrigierten Extinktionswert Blank 595 wurde von den Extinktionswerten des Blanks, Zeile A Spalte 7-9, der Mittelwert gebildet und von der jeweiligen Extinktion bei 595 nm subtrahiert. Anschließend erstellte die Software aus den errechneten Mittelwerten von Blank 595 eine Standardkurve.

Die Proteinkonzentrationen der Mitochondrien-Suspensionen wurden wie in 2.8.1. berechnet und in Tabelle 1 dargestellt.

Tabelle 1: Berechnung der Proteinkonzentrationen. Erste Spalte: Daten der Mitochondrien-Suspensionen; Zweite Spalte: Mittelwerte der Extinktionswerte von Blank 595; Dritte Spalte: Errechnete Proteinkonzentration pro Well (300 μ l); Vierte Spalte: Berechnete Proteinkonzentration in [μ g/ μ l] Originalprobe; Fünfte Spalte: korrigierte Proteinkonzentration, ohne MiR05-Puffer, in [μ g/ μ l] Originalprobe.

Datum	Mittelwerte Extinktionswerte Blank 595	μ g Protein/300 μ l	μ g/ μ l ==mg/ml	korrigiert [mg/ml]
05.06.2020	0,458	5,919	39,424	38,424
08.06.2020	0,314	3,965	31,719	30,719
10.06.2020	0,251	3,126	25,008	24,008
12.06.2020	0,186	2,244	17,954	16,954
15.06.2020	0,187	2,262	18,098	17,098
17.06.2020	0,140	1,623	16,235	15,235
19.06.2020	0,117	1,309	8,715	7,715
22.06.2020	0,188	2,271	9,085	8,085
24.06.2020	0,073	0,719	5,754	4,754
26.06.2020	0,109	1,205	9,641	8,641
29.06.2020	0,345	4,390	58,519	57,519
30.06.2020	0,265	3,315	26,519	25,519
01.07.2020	0,300	3,783	30,262	29,262
03.07.2020	0,359	4,579	36,632	35,632

In Tabelle 1 sind die jeweiligen berechneten Proteinkonzentrationen der Mitochondrien-Suspensionen der Versuchstage dargestellt. In der ersten Spalte sind die Mittelwerte der Blank-595-Extinktionswerte aufgelistet. In der zweiten Spalte sind die Proteinkonzentrationen in einem Well der Well-Platte in [μ g/300 μ l] aufgelistet. In der dritten Spalte sind die, mit den jeweiligen Verdünnungsfaktoren, berechneten Proteinkonzentrationen der Originalprobe in [μ g/ μ l] aufgelistet. In der letzten Spalte sind die korrigierten Proteinkonzentrationen in [μ g/ μ l] aufgeführt. Da der MiR05-Puffer 1 g/l BSA enthielt, wurde jeweils 1 μ g/ μ l bei der Proteinkonzentration der Originalprobe abgezogen.

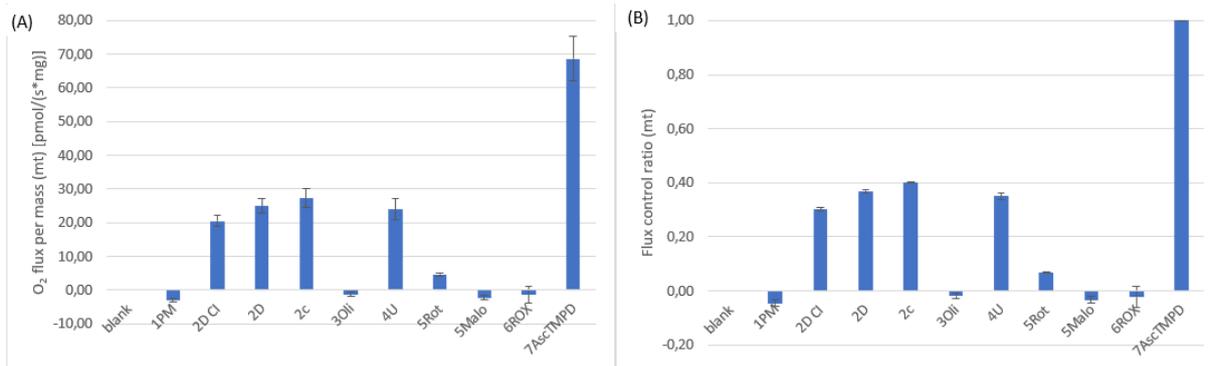


Abb. 6: Balkendiagramme, erstellt aus den Mittelwerten der Daten der Excel-Dateien von isolierten Mitochondrien von *B. saida* bei 5 °C. (A) Balkendiagramm des errechneten Specific flux (mt), O₂ flux per mass (mt), von -10 bis 80 pmol/(s*mg) (y-Achse) der Markierungen (x-Achse) mit der jeweilig Standardabweichung. (B) Flux control ratio FCR (mt) von -0,2 bis 1,0 (-20 % bis 100 %) des errechneten O₂ flux per mass (mt). 7AscTMPD entspricht 1,0 mit der jeweilig Standardabweichung.

Nach der Titration der Substrate für CI fiel zunächst der O₂ flux per mass (mt) auf - 2,96 pmol/(s*mg) (SD = 0,64) (Abb. 6 A, 1PM). Durch die Titration von ADP, 2D CI, wurde CI-State-III erreicht und der O₂ flux per mass (mt) stieg auf 20,49 pmol/(s*mg) (SD = 1,62) (Abb. 6 A, 2D CI). Nach der Titration von Succinat, 2D, wurde die OXPHOS erreicht und der O₂ flux per mass (mt) stieg im Vergleich zu 2D CI um 22 % auf 25,02 pmol/(s*mg) (SD = 2,10) (Abb. 6 A, 2D). Das FCR stieg ebenfalls von 30 % (SD = 0,01), 2D CI, auf 37 % (SD = 0), 2D (Abb. 6 B, 2D CI und 2D). Nach der Inhibition der F₁F₀-ATPase durch Oligomycin, 3Oli, wurde eine LEAK-Respiration von -1,2 pmol/(s*mg) (SD = 0,58) berechnet (Abb. 6 A, 3Oli). Das FCR lag bei -0,02 % (SD = 0,01) (Abb. 6 B, 3Oli). Nach der Entkopplung durch FCCP, 4U, lag der O₂ flux per mass (mt) bei 24,00 pmol/(s*mg) (SD = 3,11) (Abb. 6 A, 4U). Dies entsprach 95 % des O₂ flux per mass (mt) der OXPHOS bei 2D. Anschließend wurden die Komplexe CI, CII und CIII inhibiert (Abb. 6 A, 5Rot, 5Malo und 6ROX). Es wurde ein ROX von -1,25 pmol/(s*mg) (SD = 2,52) berechnet (Abb. 6 A, 6ROX). Die Messung der Kapazität von CIV ergab einen O₂ flux per mass (mt) von 68,68 pmol/(s*mg) (SD = 6,64) (Abb. 6 A, 7AscTMPD).

3.2.2. SUIT-Protokoll bei isolierten Mitochondrien von *S. salar*

Bei isolierten Mitochondrien von *S. salar* wurde ein SUIT-Protokoll in einem HRR Oxygraphen durchgeführt.

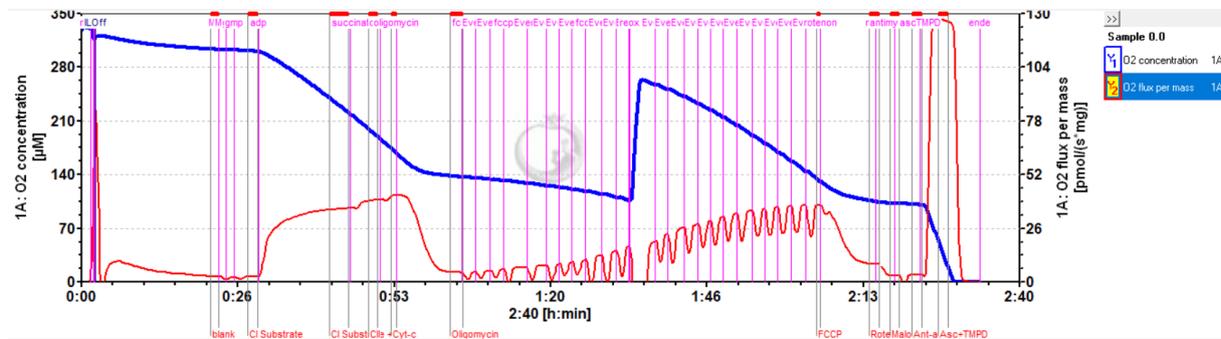


Abb. 7: Aufzeichnung des SUIT-Protokolls vom 05.06.2020 mit O₂-Konzentration in [μM] (blau) und O₂-Flux, Respiration, pro mg Protein in [pmol/(s*mg)] von isolierten Mitochondrien aus der Leber von *S.salar* bei 10 °C. Titrations der Substrate, Inhibitoren und Entkoppler (rosa Markierungen) in der vorgegebenen Reihenfolge. Rote Markierungen: Zur Auswertung wurden vor Beginn des Experiments und nach den einzelnen Titrations die höchsten O₂ flux per mass Werte (Substrate, ADP, Entkoppler und Ascorbat/TMPD), beziehungsweise die tiefsten O₂ flux per mass Werte (Inhibitoren) markiert.

Abbildung 7 zeigt die Aufzeichnung des SUIT-Protokolls bei isolierten Mitochondrien von *S. salar* bei einer Temperatur von 10 °C. Der blaue Graph zeigt den Verlauf der O₂-Konzentration in [μM] und der rote Graph den Verlauf des O₂ flux per mass in [pmol/(s*mg)]. Bei allen drei Experimenten nahm die O₂-Konzentration im Laufe des Experiments ab. Nach Titration der Substrate, ADP, FCCP, Ascorbat und TMPD war die Abnahme stärker. Nach Titration der Inhibitoren war die Abnahme schwächer und nach der Titration von Malonat und Antimycin A war keine Veränderung der O₂-Konzentration erkennbar. Während der wiederholten Titration von FCCP musste, auf Grund der geringen O₂-Konzentration, Sauerstoff hinzugeführt werden (Abbildung 7, reox). Der O₂ flux per mass stieg nach Titration von ADP, Succinat, Cytochrom c, FCCP und Ascorbat und TMPD an und fiel nach Titration der Inhibitoren. Zur Auswertung wurden im Graphen des O₂ flux per mass nach der Titration der Substrate, ADP, FCCP, Ascorbat und TMPD die höchsten Flux-Werte markiert und nach der Titration der Inhibitoren die niedrigsten Flux-Werte markiert (Abbildung 7 rote Markierungen).

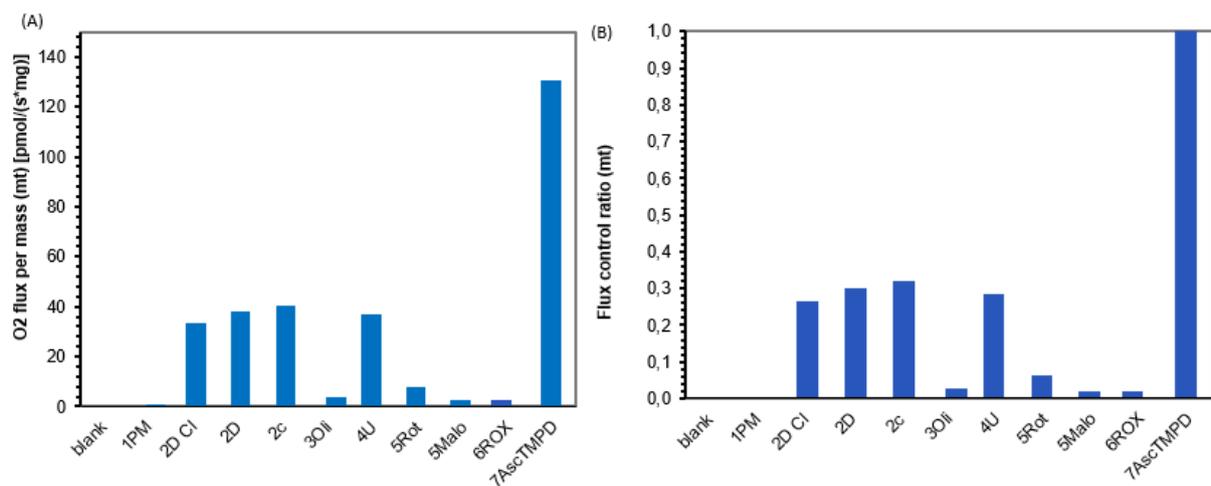


Abb. 8: Balkendiagramme des SUIT-Protokolls bei isolierten Mitochondrien bei *S. salar* bei 10 °C. (A) Balkendiagramm des errechneten Specific flux (mt), O₂ flux per mass (mt), von 0 bis 150 pmol/(s*mg) (y-Achse) der Markierungen (x-Achse). (B) Flux control ratio FCR (mt) von 0 bis 1,0 (0% bis 100%) des errechneten O₂ flux per mass (mt). 7AscTMPD entspricht 1,0.

Nach der Titration der Substrate für CI stieg der O₂ flux per mass (mt) leicht auf 0,15 pmol/(s*mg) (Abb. 8 A, 1PM). Durch die Titration von ADP, 2D CI, wurde CI-State-III erreicht und unter Beteiligung von CI eine OXPHOS von 33,52 pmol/(s*mg) berechnet (Abb. 8 A, 2D CI). Durch die Titration des CII-Substrats Succinat, 2D, wurde die OXPHOS mit Beteiligung von CI und CII gemessen (Abb. 8 A, 2D). Der O₂ flux per mass (mt) stieg um 13,7 % auf 38,12 pmol/(s*mg) und das FCR (mt) stieg von 26 % bei 2D CI auf 30 % bei 2D (Abb. 8 B, 2D CI und 2D). Nach der Inhibition der F₁F₀-ATPase durch Oligomycin, 3Oli, wurde eine LEAK-Respiration L_{omy} von 3,52 pmol/(s*mg) berechnet (Abb. 8 A, 3Oli). Dies entsprach 9,2 % der Respiration bei OXPHOS und einem FCR (mt) von 3 % (Abb. 8 B, 3Oli). Durch das Entkoppeln mit FCCP, 4U, stieg der O₂ flux per mass (mt) auf 37,14 pmol/(s*mg) (Abb. 8 A, 4U). Dies entsprach 91,6 % der Respiration bei OXPHOS und einem FCR (mt) von 29 % (Abb. 8 B, 4U). Nach der Inhibition von CI, CII und CIII durch Rotenon, Malonat und Antimycin A wurde ein ROX von 2,66 pmol/(s*mg) berechnet (Abb. 8 A, 6ROX). Die Messung der Kapazität von CIV ergab einen O₂ flux per mass (mt) von 130,67 pmol/(s*mg) (Abb. 8 A, 7AscTMPD).

3.2.3. SUIT-Protokoll bei isolierten Mitochondrien von *D. labrax*

Bei isolierten Mitochondrien von *D. labrax* wurden SUIT-Protokolle in einem HRR Oxygraphen durchgeführt.

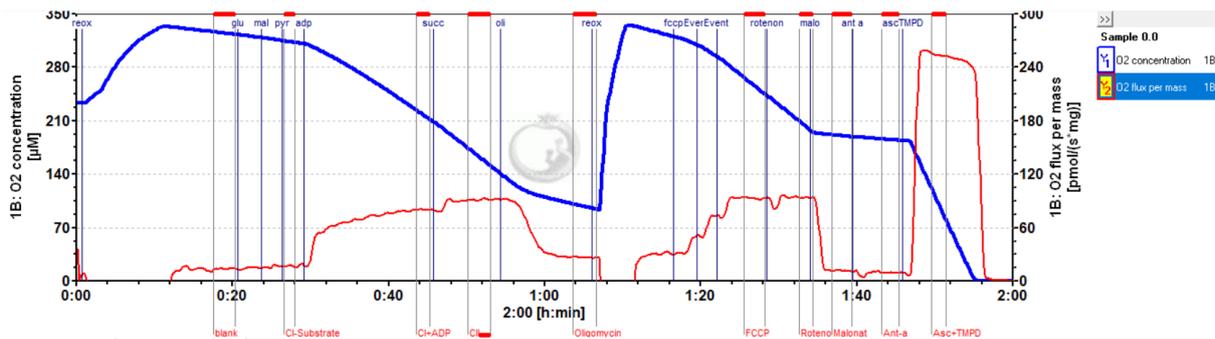


Abb. 9: Beispiel einer Aufzeichnung eines SUIT-Protokolls bei isolierten Mitochondrien von *D. labrax* bei 15 °C. Blauer Graph: Verlauf der O₂-Konzentration von 0 bis 350 µM. Roter Graph: O₂ flux per mass von 0 bis 300 pmol/(s*mg). Blaue Markierungen: Titrations der Substrate, Inhibitoren und Entkoppler, sowie reoxygenieren (reox). Rote Markierung: für Auswertung markierte Bereiche vor Versuchsbeginn (blank) und nach den Titrations der Substrate, Entkoppler und Inhibitoren.

Abbildung 9 zeigt ein Beispiel einer Aufzeichnung eines SUIT-Protokolls bei isolierten Mitochondrien von *D. labrax* bei einer Temperatur von 15 °C. Nach der Titration der Substrate und ADP nahm die O₂-Konzentration (Abb. 9, blauer Graph) ab und der O₂ flux per mass stieg an. Die Abnahme der O₂-Konzentration verringerte sich nach der Titration von Oligomycin und der O₂ flux per mass fiel. Nach der Titration musste, auf Grund der geringen O₂-Konzentration, Sauerstoff hinzugeführt werden (Abb. 9, reox). Anschließend wurde mit der wiederholten Titration von FCCP der O₂ flux per mass auf das Niveau nach der Zugabe von Succinat gebracht. Gleichzeitig nahm die O₂-Konzentration stärker ab. Durch die Titrations von Rotenon, Malonat und Antimycin A fiel der O₂ flux per mass und die Abnahme der O₂-Konzentration wurde geringer. Abschließend wurden Ascorbat und TMPD titriert, wodurch der O₂ flux per mass stark anstieg und die O₂-Konzentration stark abnahm. Nachdem die O₂-Konzentration 0 µM betrug, fiel der O₂ flux per mass auf 0 pmol/(s*mg).

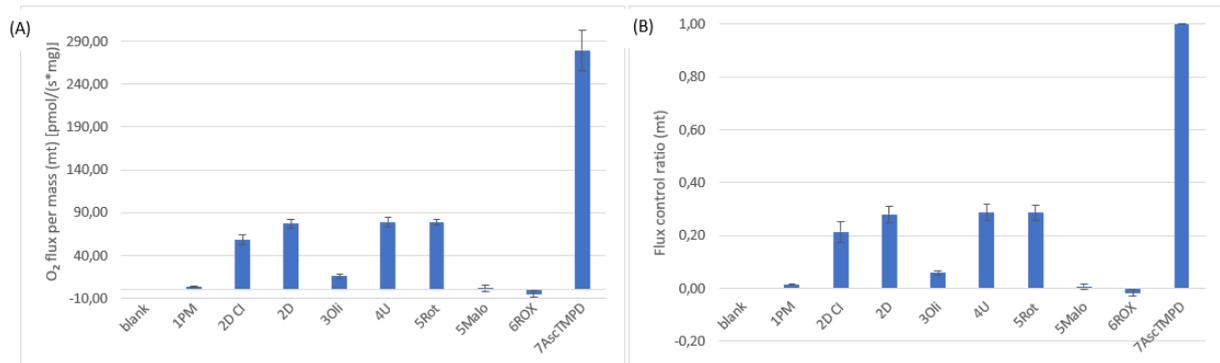


Abb. 10: Balkendiagramme der Mittelwerte der Daten der SUIT-Protokolle bei isolierten Mitochondrien von *D. labrax* bei 15 °C. (A) Balkendiagramm des errechneten Specific flux (mt), O₂ flux per mass (mt), von -10 bis 310 pmol/(s*mg) (y-Achse) der Markierungen (x-Achse) mit der jeweiligen Standardabweichung. (B) Flux control ratio FCR (mt) von -0,2 bis 1,0 (0 % bis 100 %). O₂ flux per mass (mt) von 7AscTMPD entspricht 1,0, andere FCR (mt) als Anteil des O₂ flux per mass (mt) von 7AscTMPD mit der jeweiligen Standardabweichung.

Nach der Titration der Substrate für CI stieg der O₂ flux per mass (mt) leicht auf 4,00 pmol/(s*mg) (SD = 0,77) (Abb. 10 A, 1PM). Durch die Titration von ADP, 2D CI, wurde CI-State-III erreicht und unter Beteiligung von CI eine OXPHOS von 58,31 pmol/(s*mg) (SD = 5,96) berechnet (Abb. 10 A, 2D CI). Durch die Titration des CII-Substrats Succinat, 2D, wurde die OXPHOS mit Beteiligung von CI und CII gemessen (Abb. 10 A, 2D). Der O₂ flux per mass (mt) stieg um 32,64 % auf 77,35 pmol/(s*mg) (SD = 5,12) und das FCR (mt) stieg von 21 % (SD = 0,04) bei 2D CI auf 28 % (SD = 0,03) bei 2D (Abb. 10 A und B, 2D CI und 2D). Nach der Inhibition der F₁F₀-ATPase durch Oligomycin, 3Oli, wurde eine LEAK-Respiration L_{omy} von 16,15 pmol/(s*mg) (SD = 2,25) berechnet (Abb. 10 A, 3Oli). Dies entsprach 20,88 % der Respiration bei OXPHOS und einem FCR (mt) von 6 % (SD = 0,01) (Abb. 10 B, 3Oli). Durch das Entkoppeln mit FCCP stieg der O₂ flux per mass (mt) auf 79,02 pmol/(s*mg) (SD = 6,01) (Abb. 10 A, 4U). Dies entsprach 102,56 % der Respiration bei OXPHOS und einem FCR (mt) von 29 % (SD = 0,03) (Abb. 10 B, 4U). Nach der Inhibition von CI, CII und CIII durch Rotenon, Malonat und Antimycin A wurde ein ROX von -4,88 pmol/(s*mg) (SD = 3,51) berechnet (Abb. 10 A, 6ROX). Die Messung der Kapazität von CIV ergab einen O₂ flux per mass (mt) von 279,48 pmol/(s*mg) (SD = 23,49) (Abb. 10 A, 7AscTMPD).

3.2.4. SUIT-Protokoll mit permeabilisierten Herzfasern von *B. saida*

Bei permeabilisierten Herzfasern von *B. saida* wurden SUIT-Protokolle in einem HRR Oxygraphen durchgeführt.

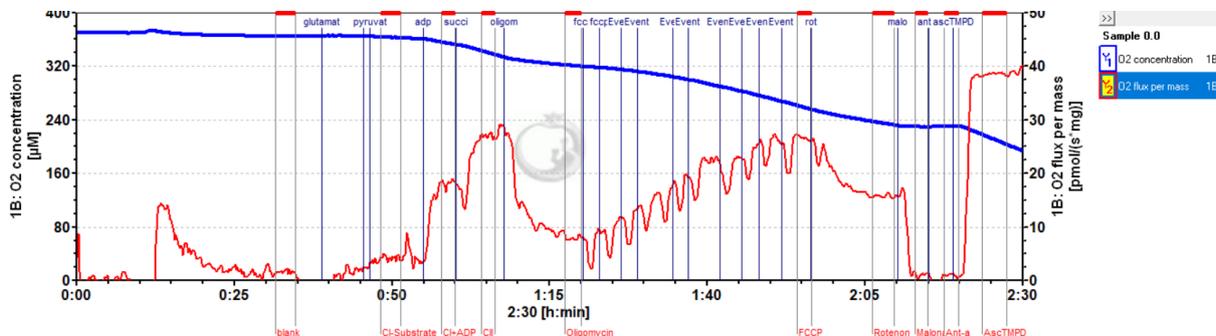


Abb. 11: Beispiel einer Aufzeichnung eines SUIT-Protokolls bei permeabilisierten Herzfasern von *B. saida* bei 5 °C. Blauer Graph: Verlauf der O₂-Konzentration von 0 bis 400 μM. Roter Graph: O₂ flux per mass von 0 bis 50 pmol/(s*mg). Blaue Markierungen: Titrations der Substrate, Inhibitoren und Entkoppler. Rote Markierung: für Auswertung markierte Bereiche vor Versuchsbeginn (blank) und nach den Titrations der Substrate, Entkoppler und Inhibitoren.

Abbildung 11 zeigt die Aufzeichnung eines SUIT-Protokolls bei permeabilisierten Herzfasern von *B. saida* bei 5 °C.

Der blaue Graph zeigt den Verlauf der O₂-Konzentration in [μM]. Nach der Titration von ADP und Succinat nahm die O₂-Konzentration stark ab. Durch die Titration von Oligomycin verringerte sich die Abnahme. Durch die schrittweise Titration von FCCP nahm die O₂-Konzentration mit jeder FCCP-Titration stärker ab. Nach der Titration von Rotenon verringerte sich die Abnahme. Nach den Titrations von Malonat und Antimycin A war eine weitere Verringerung der O₂-Konzentrationsabnahme zu erkennen. Nach der Titration von Ascorbat und TMPD nahm die O₂-Konzentration stark ab.

Der rote Graph zeigt den Verlauf des O₂ flux per mass in [pmol/(s*mg)]. Nach der Titration der Substrate von Komplex CI zeigte sich keine Veränderung des O₂ flux per mass. Nach der Titration von ADP stieg dieser zunächst stark an und flachte dann ab. Nach der Titration von Succinat stieg der O₂ flux per mass erneut an. Durch die Titration von Oligomycin fiel der O₂ flux per mass zunächst stark ab und flachte anschließend ab. Durch die schrittweise Titration von FCCP stieg der O₂ flux per mass schrittweise bis zum Niveau von vor der Titration von Oligomycin. Durch Rotenon fiel dieser wieder stark ab und flachte anschließend ab. Durch die Titration von Malonat und Antimycin A nahm der O₂ flux per mass ab. Nach der Titration von Ascorbat und TMPD stieg der O₂ flux per mass stark an, flachte ab und nahm anschließend leicht ab. Nachdem die O₂-Konzentration 0 μM erreicht fiel der O₂ flux per mass ebenfalls auf 0 pmol/(s*mg).

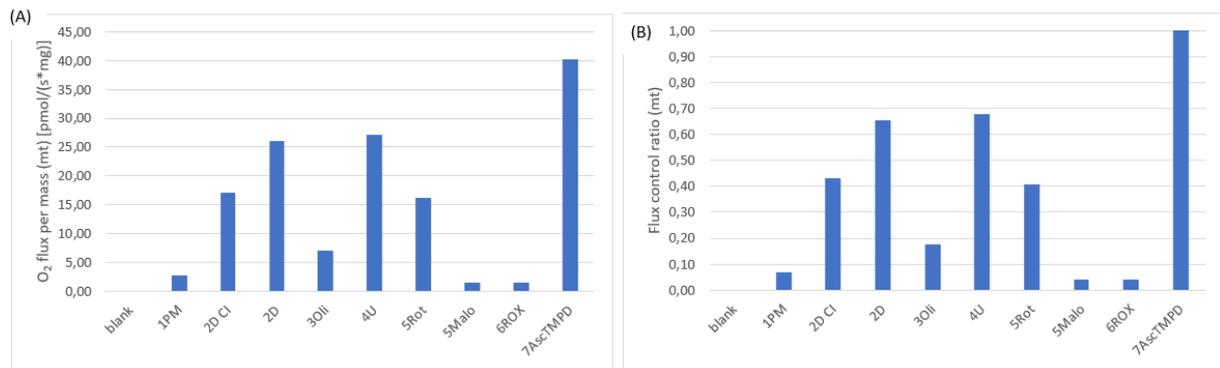


Abb. 12: Balkendiagramme der Daten des SUIE-Protokolls bei permeabilisierten Herzfasern von *B. saida* bei 5 °C. (A) Balkendiagramm des errechneten Specific flux (mt), O₂ flux per mass (mt), von 0 bis 45 pmol/(s*mg) (y-Achse) der Markierungen (x-Achse). (B) Flux control ratio FCR (mt) von 0 bis 1,0 (0 % bis 100 %) des errechneten O₂ flux per mass (mt). 7AscTMPD entspricht 1,0.

Nach der Titration der Substrate für CI stieg der O₂ flux per mass (mt) leicht auf 2,67 pmol/(s*mg) (Abb. 12 A, 1PM). Durch die Titration von ADP, 2D CI, wurde CI-State-III erreicht und unter Beteiligung von CI eine OXPHOS von 17,10 pmol/(s*mg) berechnet (Abb. 12 A, 2D CI). Durch die Titration des CII-Substrats Succinat, 2D, wurde die OXPHOS mit Beteiligung von CI und CII gemessen (Abb. 12 A, 2D). Der O₂ flux per mass (mt) stieg um 52,29 % auf 26,04 pmol/(s*mg) und das FCR (mt) stieg von 43 % bei 2D CI auf 65 % bei 2D (Abb. 12 A und B, 2D CI und 2D). Nach der Inhibition der F₁F₀-ATPase durch Oligomycin, 3Oli, wurde eine LEAK-Respiration L_{omy} von 7,01 pmol/(s*mg) berechnet (Abb. 12 A, 3Oli). Dies entsprach 26,92 % der Respiration bei OXPHOS und einem FCR (mt) von 18 % (Abb. 12 B, 3Oli). Durch das Entkoppeln mit FCCP stieg der O₂ flux per mass (mt) auf 27,06 pmol/(s*mg) (Abb. 12 A, 4U). Dies entsprach 103,93 % der Respiration bei OXPHOS und einem FCR (mt) von 68 % (Abb. 12 B, 4U). Nach der Inhibition von CI, CII und CIII durch Rotenon, Malonat und Antimycin A wurde ein ROX von 1,57 pmol/(s*mg) berechnet (Abb. 12 A, 6ROX). Die Messung der Kapazität von CIV ergab einen O₂ flux per mass (mt) von 40,24 pmol/(s*mg) (Abb. 12 A, 7AscTMPD).

flachte ab und nahm anschließend leicht ab. Nachdem die O₂-Konzentration 0 μM erreichte, fiel der O₂ flux per mass ebenfalls auf 0 pmol/(s*mg).

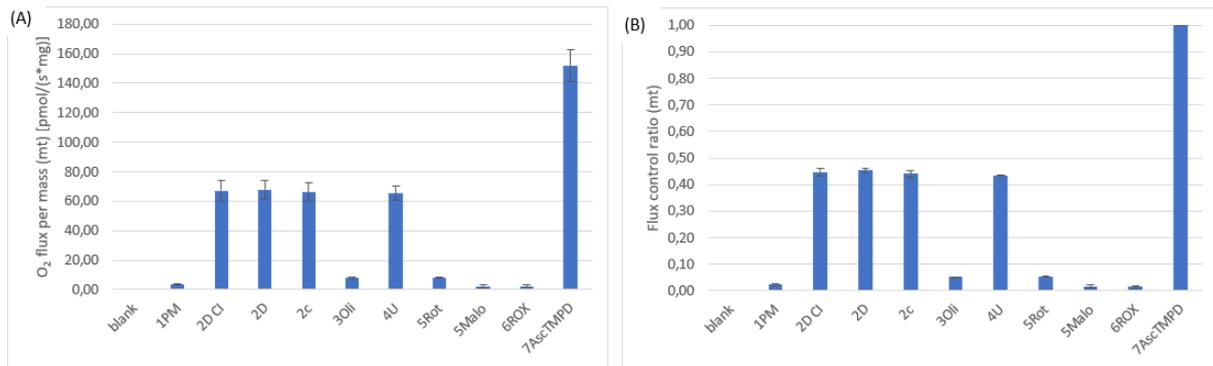


Abb. 14: Balkendiagramme der Mittelwerte der Daten der SUIT-Protokolle bei permeabilisierten Herzfasern von *S. salar* bei 10 °C. (A) Balkendiagramm des errechneten Specific flux (mt), O₂ flux per mass (mt), von 0 bis 160 pmol/(s*mg) (y-Achse) der Markierungen (x-Achse) mit den jeweiligen Standardabweichungen. (B) Flux control ratio FCR (mt) von 0 bis 1,0 (0 % bis 100 %) des errechneten O₂ flux per mass (mt). 7AscTMPD entspricht 1,0 mit den jeweiligen Standardabweichungen.

Nach der Titration der Substrate für CI stieg der O₂ flux per mass (mt) leicht auf 3,5 pmol/(s*mg) (SD = 0,39) (Abb. 14 A, 1PM). Durch die Titration von ADP, 2D CI, wurde CI-State-III erreicht und unter Beteiligung von CI eine OXPHOS von 67,04 pmol/(s*mg) (SD = 6,95) berechnet (Abb. 14 A, 2D CI). Durch die Titration des CII-Substrats Succinat, 2D, wurde die OXPHOS mit Beteiligung von CI und CII gemessen (Abb. 14 A, 2D). Der O₂ flux per mass (mt) stieg um 1,39 % auf 67,97 pmol/(s*mg) (SD = 6,34) und das FCR (mt) blieb bei 45 % (SD = 0,01) bei 2D (Abb. 14 A und B, 2D CI und 2D). Nach der Inhibition der F₁F₀-ATPase durch Oligomycin, 3Oli, wurde eine LEAK-Respiration L_{omy} von 7,79 pmol/(s*mg) (SD = 0,79) berechnet (Abb. 14 A, 3Oli). Dies entsprach 11,47 % der Respiration bei OXPHOS und einem FCR (mt) von 5 % (SD = 0,00) (Abb. 14 B, 3Oli). Durch das Entkoppeln mit FCCP stieg der O₂ flux per mass (mt) auf 65,43 pmol/(s*mg) (SD = 4,82) (Abb. 14 A, 4U). Dies entsprach 96,26 % der Respiration bei OXPHOS und einem FCR (mt) von 43 % (SD = 0,00) (Abb. 14 B, 4U). Nach der Inhibition von CI, CII und CIII durch Rotenon, Malonat und Antimycin A wurde ein ROX von 2,3 pmol/(s*mg) (SD = 0,76) berechnet (Abb. 14 A, 6ROX). Die Messung der Kapazität von CIV ergab einen O₂ flux per mass (mt) von 151,92 pmol/(s*mg) (SD = 11,07) (Abb. 14 A, 7AscTMPD).

3.2.6. SUIT-Protokoll bei permeabilisierten Herzfasern von *D. labrax*

Bei permeabilisierten Herzfasern von *D. labrax* wurden SUIT-Protokolle in einem HRR Oxygraphen durchgeführt.

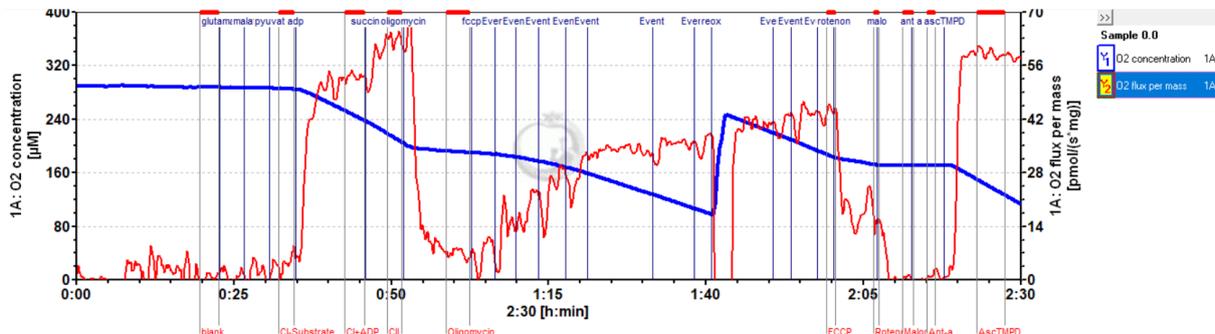


Abb. 15: Aufzeichnung eines SUIT-Protokolls bei permeabilisierten Herzfasern von *D. labrax*. Blauer Graph: Verlauf der O₂-Konzentration von 0 bis 400 μM. Roter Graph: Verlauf des O₂ flux per mass von 0 bis 70 pmol/(s*mg). Blaue Markierungen: Titrations der Substrate, Entkoppler und Inhibitoren. Rote Markierungen: für Auswertung markierte Bereiche vor Versuchsbeginn (blank) und nach den Titrations der Substrate, Entkoppler und Inhibitoren.

Abbildung 15 zeigt die Aufzeichnung eines SUIT-Protokolls bei permeabilisierten Herzfasern von *B. saida* bei 15 °C.

Der blaue Graph zeigt den Verlauf der O₂-Konzentration in [μM]. Nach der Titration von ADP und Succinat nahm die O₂-Konzentration stark ab. Durch die Titration von Oligomycin verringerte sich die Abnahme. Durch die schrittweise Titration von FCCP nahm die O₂-Konzentration mit jeder FCCP-Titration stärker ab und es musste Sauerstoff durch die niedrige O₂-Konzentration hinzugeführt werden (Abb. 15, reox). Nach der Titration von Rotenon verringerte sich die Abnahme. Nach den Titrations von Malonat und Antimycin A nahm die O₂-Konzentration nicht weiter ab. Nach der Titration von Ascorbat und TMPD nahm die O₂-Konzentration stark ab.

Der rote Graph zeigt den Verlauf des O₂ flux per mass in [pmol/(s*mg)]. Nach der Titration der Substrate von Komplex CI zeigte sich keine Veränderung des O₂ flux per mass. Nach der Titration von ADP stieg dieser zunächst stark an und flachte dann ab. Nach der Titration von Succinat stieg der O₂ flux per mass erneut an. Durch die Titration von Oligomycin fiel der O₂ flux per mass zunächst stark ab und flachte anschließend ab. Durch die schrittweise Titration von FCCP stieg der O₂ flux per mass schrittweise an, bis keine weitere Steigerung erfolgte. Durch Rotenon fiel dieser wieder stark ab und flachte anschließend ab. Durch die Titration von Malonat und Antimycin A nahm der O₂ flux per mass erneut stark ab. Nach der Titration von Ascorbat und TMPD stieg der O₂ flux per mass stark an, flachte ab und nahm anschließend leicht ab.

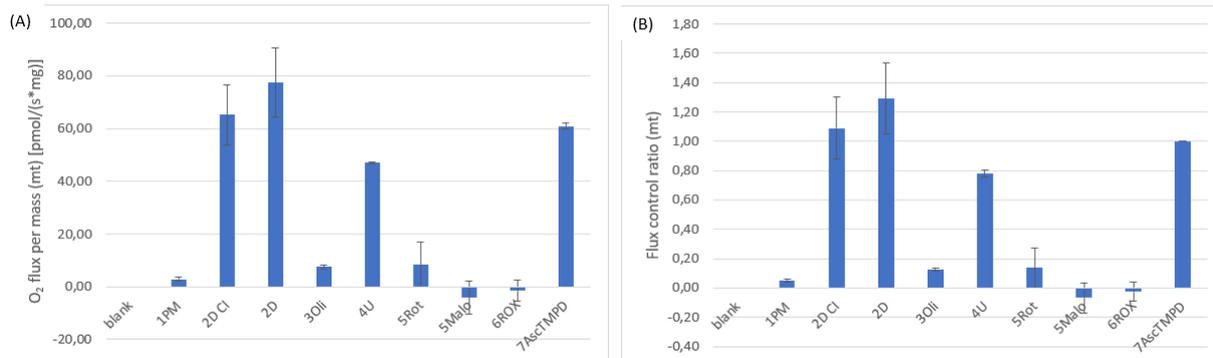


Abb. 16: Balkendiagramme der Mittelwerte der Daten der SUIT-Protokolle bei permeabilisierten Herzfasern von *D. labrax* bei 15 °C. (A) Balkendiagramm des errechneten Specific flux (mt), O₂ flux per mass (mt), von -10 bis 90 pmol/(s*mg) (y-Achse) der Markierungen (x-Achse) mit den jeweiligen Standardabweichungen. (B) Flux control ratio FCR (mt) von -20 bis 1,4 (-20 % bis 140 %) des errechneten O₂ flux per mass (mt). 7AscTMPD entspricht 1,0 mit den jeweiligen Standardabweichungen.

Nach der Titration der Substrate für CI stieg der O₂ flux per mass (mt) leicht auf 2,92 pmol/(s*mg) (SD = 0,72) (Abb. 16 A, 1PM). Durch die Titration von ADP, 2D CI, wurde CI-State-III erreicht und unter Beteiligung von CI eine OXPHOS von 65,17 pmol/(s*mg) (SD = 11,40) berechnet (Abb. 16 A, 2D CI). Durch die Titration des CII-Substrats Succinat, 2D, wurde die OXPHOS mit Beteiligung von CI und CII gemessen (Abb. 16 A, 2D). Der O₂ flux per mass (mt) stieg um 18,85 % auf 77,45 pmol/(s*mg) (SD = 12,92) und das FCR (mt) stieg von 109 % (SD = 0,21) bei 2D CI auf 129 % (SD = 0,24) bei 2D (Abb. 16 A und B, 2D CI und 2D). Nach der Inhibition der F₁F₀-ATPase durch Oligomycin, 3Oli, wurde eine LEAK-Respiration L_{omy} von 7,59 pmol/(s*mg) (SD = 0,73) berechnet (Abb. 16 A, 3Oli). Dies entsprach 9,79 % der Respiration bei OXPHOS und einem FCR (mt) von 13 % (SD = 0,01) (Abb. 16 B, 3Oli). Durch das Entkoppeln mit FCCP stieg der O₂ flux per mass (mt) auf 47,03 pmol/(s*mg) (SD = 0,45) (Abb. 16 A, 4U). Dies entsprach 60,72 % der Respiration bei OXPHOS und einem FCR (mt) von 78 % (SD = 0,02) (Abb. 16 B, 4U). Nach der Inhibition von CI, CII und CIII durch Rotenon, Malonat und Antimycin A wurde ein ROX von -1,56 pmol/(s*mg) (SD = 3,93) berechnet (Abb. 16 A, 6ROX). Die Messung der Kapazität von CIV ergab einen O₂ flux per mass (mt) von 60,95 pmol/(s*mg) (SD = 1,31) (Abb. 16 A, 7AscTMPD).

3.3. K_d -Determination ohne biologische Probe

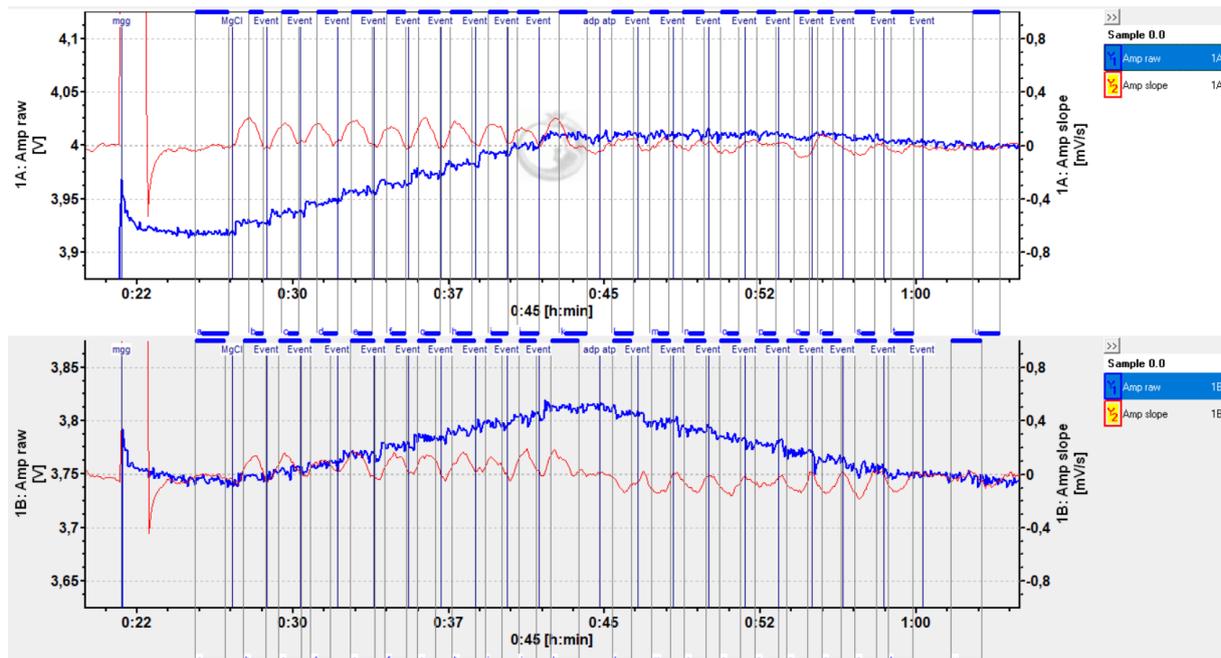


Abb. 17: Aufzeichnung der K_d -Determination bei 5 °C, einem Gain von 1000 und einer Fluo-Intensität von 500. Blauer Graph: Verlauf des Amp-Signals [V]. Roter Graph: Verlauf des Amp slopes [mV/s]. Oben 1A: 10 Titrations von $MgCl_2$ und 10 Titrations ADP. Unten 1B: 10 Titrations von $MgCl_2$ und 10 Titrations ATP. Blaue Markierungen zur Auswertung der K_d -Determination.

Abbildung 17 zeigt die Aufzeichnung der K_d -Determination bei 5 °C. Nach jeder Titration von $MgCl_2$ stieg das Amp-Signal stufenförmig an. Mit jeder ATP-Titration nahm das Amp-Signal stufenförmig ab. Bei den ADP-Titrations war keine stufenförmige Abnahme, sondern eine lineare Abnahme zu erkennen. Der Amp slope stieg mit jeder $MgCl_2$ Titration an und fiel dann wieder auf 0 mV/s. Bei den ADP und ATP Titrations nahm der Amp slope zunächst ab und stieg dann wieder auf 0 mV/s.

Bei 5 °C, einem Gain von 1000 und einer Fluo-Intensität von 500 wurde eine $K_{d-ADP} = 4,879$ mmol/l und eine $K_{d-ATP} = 0,005$ mmol/l berechnet.

Bei 10 °C, einem Gain von 1000 und einer Fluo-Intensität von 500 wurde eine $K_{d-ADP} = 0,609$ mmol/l und eine $K_{d-ATP} = 0,055$ mmol/l berechnet.

Bei 15 °C, einem Gain von 1000 und einer Fluo-Intensität von 250 wurde eine $K_{d-ADP} = 0,393$ mmol/l und eine $K_{d-ATP} = 0,0001$ mmol/l berechnet.

3.4. ATP-Produktion und P/O-Verhältnisse

3.4.1. ATP-Produktion und P/O-Verhältnisse bei *B. saida*

Es wurden bei isolierten Mitochondrien und permeabilisierten Herzfasern von *B. saida* Experimente zur Messung und Bestimmung der ATP-Produktion und des P/O-Verhältnisses durchgeführt.

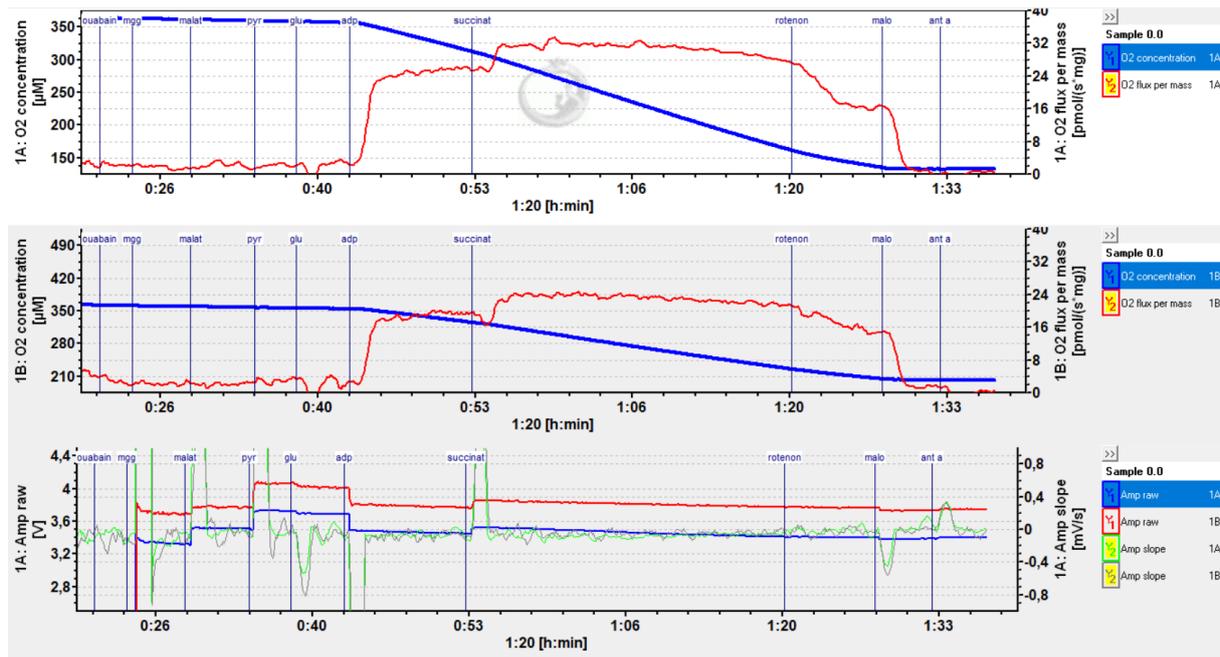


Abb. 18: Aufzeichnung eines Experiments zur Messung der ATP-Produktion bei permeabilisierten Herzfasern von *B. saida* bei 5 °C. Die oberen beiden Graphen zeigen den Verlauf der O₂-Konzentration [µM], blau und des O₂ flux per mass [pmol/(s*mg)], rot, in Kammer A, oben und Kammer B, Mitte. Unterer Graph: Blau und Rot: Amp-Signal [V] in Kammer A, blau und Kammer B, rot. Grün und grau: Amp slope [mV/s] in Kammer A, grün und Kammer B, grau.

Abbildung 18 zeigt die Aufzeichnung eines Experiments zur Messung der ATP-Produktion bei permeabilisierten Herzfasern von *B. saida*. Nach der Titration von MgG stiegen die Amp-Signale an und stabilisierten sich. Durch die Titration der Substrate für CI, Malat, Pyruvat und Glutamat, stiegen die Amp-Signale schrittweise an. Nach der Titration von ADP nahmen die Amp-Signale nach einer stärkeren Abnahme linear ab. Gleichzeitig stieg der O₂ flux per mass an und die O₂-Konzentration nahm ab. Nach der Titration des CII-Substrats Succinat stiegen die Amp-Signale an und nahmen danach linear ab. Der O₂ flux per mass stieg nochmals an und stabilisierte sich und nahm mit fortlaufender Versuchsdauer langsam ab. Der Amp-slope pendelte sich nach den Titrations von MgG, Glutamat, Malat und Pyruvat wieder bei 0 mV/s ein. Nach den Titrations von ADP und Succinat hingegen blieb der Amp-slope im leicht

negativen Bereich. Das Experiment wurde mit der Titration der Inhibitoren für CI, CII und CIII, Rotenon, Malonat und Antimycin A beendet.

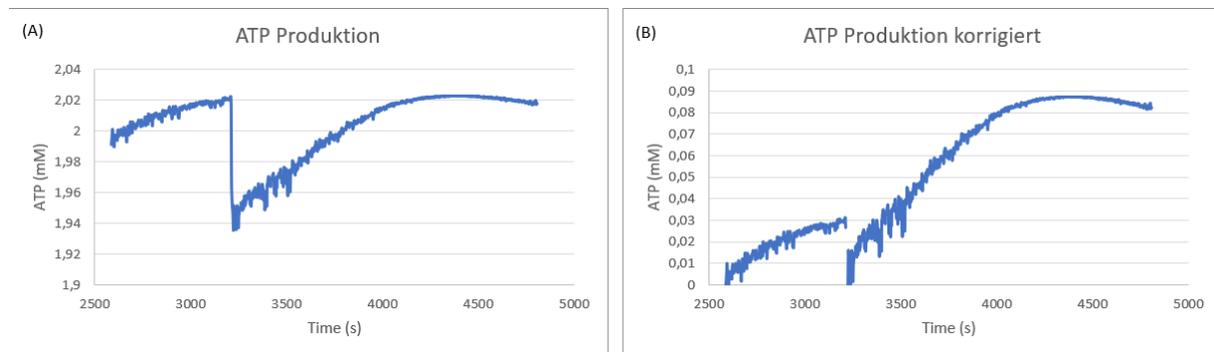


Abb. 19: Diagramme der ATP-Produktion und der korrigierten ATP-Produktion des in Abb. 17 gezeigten Experiments. (A) Darstellung der berechneten ATP-Konzentrationen [mM] für jede Datenaufzeichnung in DatLab. Starke Abnahme zwischen 3000 und 3500 s durch die Titration von Succinat. (B) Korrigierte ATP-Produktion. Nach ADP-Titration und nach Succinat-Titration wurden die Werte mit einem „Null“-Wert korrigiert.

Bei permeabilisierten Herzfasern von *B. saida* wurde die ATP-Produktion nach der ADP-Titration und nach der Succinat-Titration aus den in Abbildung 19 A und B gezeigten Daten berechnet. Nach der ADP-Titration lag die ATP-Produktion bei $0,156 \text{ nmol}/(\text{s}\cdot\text{mg})$ ($\text{SD} = 0,09$). Nach der Succinat-Titration lag die ATP-Produktion bei $0,109 \text{ nmol}/(\text{s}\cdot\text{mg})$ ($\text{SD} = 0,057$). Die P/O-Verhältnisse betragen nach der ADP-Titration bei $4,39$ ($\text{SD} = 3,1$) und nach der Succinat-Titration bei $3,06$ ($\text{SD} = 1,55$).

Bei isolierten Mitochondrien waren die berechneten ATP-Produktionswerte und P/O-Verhältnisse sehr niedrig. Die ATP-Produktion lag nach der ADP-Titration bei $0,034 \text{ nmol}/(\text{s}\cdot\text{mg})$ und nach der Succinat-Titration bei $0,027 \text{ nmol}/(\text{s}\cdot\text{mg})$ ($\text{SD} = 0,014$). Die P/O-Verhältnisse betragen $0,48$ und $0,32$ ($\text{SD} = 0,172$).

3.4.2. Messung der ATP-Produktion und der P/O-Verhältnisse bei *S. salar* und *D. labrax*

Bei *S. salar* wurde bei permeabilisierten Herzfasern und bei *D. labrax* bei isolierten Mitochondrien die ATP-Produktion gemessen und die P/O-Verhältnisse bestimmt. Hier lagen die gemessenen ATP-Produktionszahlen sehr hoch und entsprechend hohe P/O-Verhältnisse wurden berechnet.

Bei permeabilisierten Herzfasern von *S. salar* wurde nach der Succinat-Titration eine ATP-Produktion von 2,145 $\mu\text{mol}/(\text{s}\cdot\text{mg})$ (SD = 0,985) gemessen und ein entsprechendes P/O-Verhältnis von 47647,70 (SD = 33461,34) berechnet.

Bei isolierten Mitochondrien von *D. labrax* wurde nach der Succinat-Titration eine ATP-Produktion von 178,62 $\mu\text{mol}/(\text{s}\cdot\text{mg})$ (SD = 174,77) gemessen und ein entsprechendes P/O-Verhältnis von 1381009,06 (SD = 1549166,25) errechnet.

4. Diskussion

4.1. Sauerstoffverbrauch bei isolierten Mitochondrien und permeabilisierten Herzfasern

Bei dieser Experimentreihe der Bachelorarbeit wurde der Sauerstoffverbrauch, O_2 flux per mass (mt) [$\text{pmol}/(\text{s}\cdot\text{mg})$], bei isolierten Mitochondrien und permeabilisierten Herzfasern bei drei Fischarten, *B. saida*, *S. salar* und *D. labrax*, und jeweils drei Temperaturen, 5 °C, 10 °C und 15 °C, untersucht. Zur Messung des O_2 flux per mass wurden HRR von Oroboros Instruments genutzt. Da die mitochondriale Respiration häufig mit ROX korrigiert wird (Gnaiger, 2014, S. 31), wurden für die Diskussion die korrigierten O_2 flux per mass (mt) und FCR (mt)-Werte genutzt.

Nach den Titration der Substrate für CI stiegen bei permeabilisierten Herzfasern die O_2 flux per mass an (Abb. 20, 1PM). Bei isolierten Mitochondrien zeigte sich keine einheitliche Entwicklung. Bei *B. saida* nahm die Respiration ab, bei *S. salar* zeigte sich keine Veränderung und bei *D. labrax* stieg diese an. Nach der Titration der Substrate von CI wurde der Zustand der Leak-Respiration ohne Adenylate, L_n , gemessen, dies zeigte den Sauerstoffverbrauch durch Protonenleak, Protonenslip und den Kationentransport (Gnaiger, 2014, S. 28). Durch die Titration mit ADP (Abb. 20, 2D CI) und Succinat (Abb. 20, 2D) stieg der O_2 flux per mass in isolierten Mitochondrien und permeabilisierten Herzfasern aller Arten an. Bei isolierten Mitochondrien zeigte sich, dass mit steigender Temperatur der O_2 flux per mass stärker anstieg (Abb. 20, A 2D CI und 2D). Dies stellten auch Iftikar et al. (2015) fest, die bei unterschiedlich akklimatisierten *Notolabrus celidotus* eine Zunahme der OXPHOS bei steigender Temperatur maßen. Dieser Unterschied der OXPHOS von niedrigeren zu höheren Temperaturen war vermutlich auf die verringerte Geschwindigkeit von chemischen und enzymatischen Prozessen, wie Diffusionsraten, Membranfestigkeit und der Proteinstruktur bei niedrigeren Temperaturen zurückzuführen (M. Lucassen et al., 2003). Die FCR-Werte waren bei isolierten Mitochondrien von *B. saida* nach den Titrationen von ADP und Succinat am höchsten und bei *D. labrax* am niedrigsten (Abb. 20 B, 2D CI). Dies könnte darauf hinweisen, dass Komplex IV bei *B. saida* eine geringere Kapazität aufweist als bei *D. labrax*. Die Kapazität von Komplex III und IV ist in der Regel deutlich höher, um einen Elektronenstau zu verhindern (Gnaiger, 2014, S. 50). Bei *B. saida* um den Faktor 2,7 und bei *D. labrax* um den Faktor 3,57. Durch einen Elektronenstau kann es zu einem reversen Elektronentransport zu CI kommen, wodurch an CI ROS produziert werden (Murphy, 2009). Die LEAK-Respiration L_{omy} lag bei allen Spezies höher als die L_n -Respiration (Abb. 20, A, 3Oli). Da durch die sättigenden Konzentrationen von Substraten ein Protonengradient aufgebaut wurde und der Weg in die Matrix über die F_1F_0 -ATPase inhibiert wurde, mussten die Protonen über andere Wege in die

Matrix gelangen. Dies konnte zum Einen über den ANT-Transporter (Chinopoulos et al., 2009) geschehen. Zum Anderen ist ein beliebtes Modell, dass die Phospholipidmembran nicht starr ist, sondern beweglich und durch Defekte der Doppelschicht Lücken zwischen den Phospholipiden entstehen und Protonen diese Lücken nutzen (Brown, 1992). Ein anderer Weg sind UCP, welche den Protonenleak katalysieren (Stuart, 2001). Diese wurden zuerst in Mammalia beschrieben und ein Homolog, UCP2, wurde durch DNA-Analyse bei Fischen zuerst in Zebrafischen und Karpfen entdeckt (Stuart, 2001). Mark et al., 2006 wiesen UCP2 in der Aalmutter *Zoarces viviparus* und der antarktischen Aalmutter *Pachycara brachycephalum* nach.

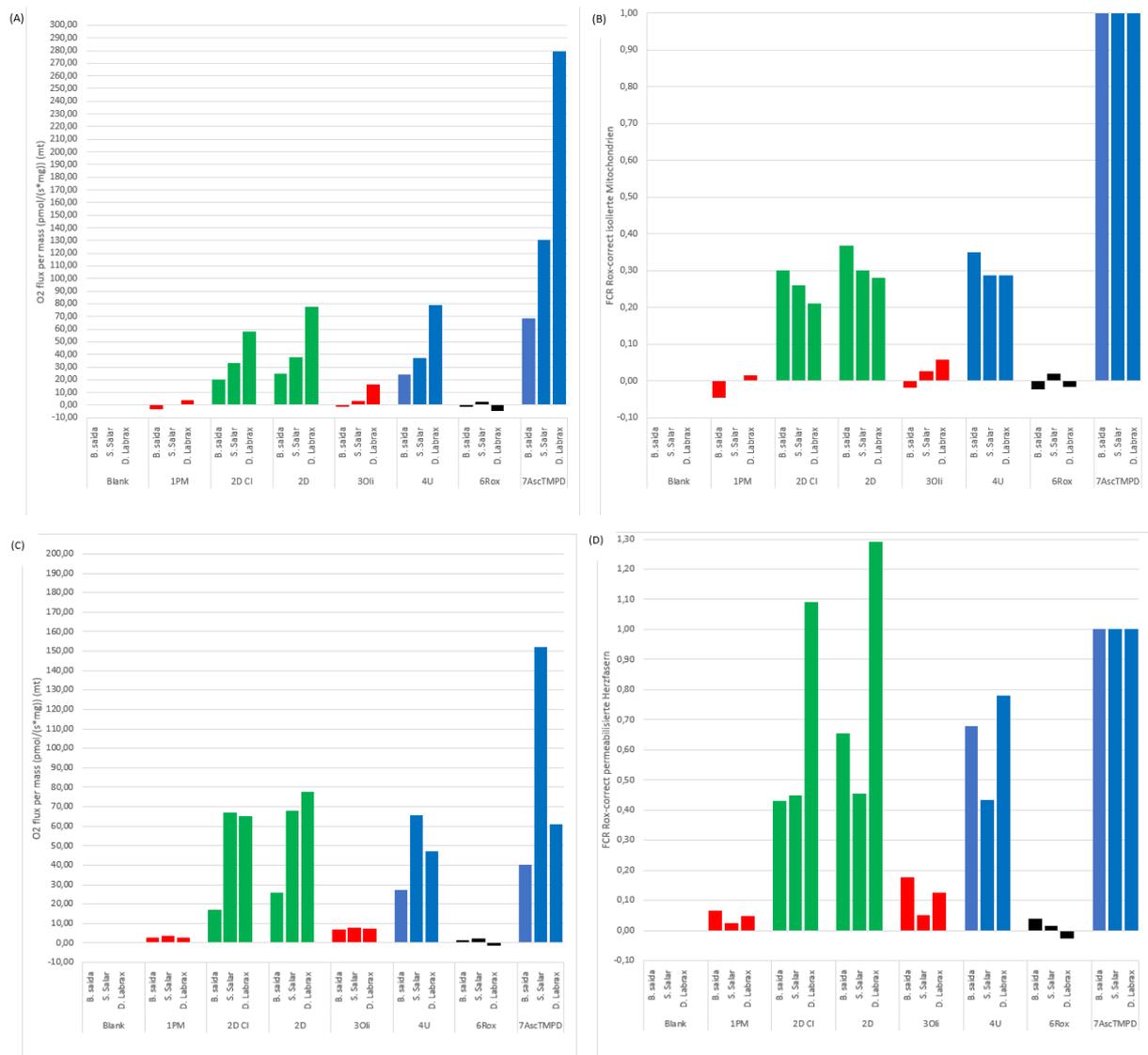


Abb. 20: Balkendiagramme zum Vergleich des O₂ flux per mass (mt) und den FCR (ROX-korrigiert)-Werten bei isolierten Mitochondrien (A und B) und permeabilisierten Herzfasern (C und D) von *B. saida*, *S. salar* und *D. labrax*. (A) und (C) O₂ flux per mass (mt) Werte von (A) -10 bis 300 pmol/(s*mg) und (C) von -10 bis 200 pmol/(s*mg) der dazugehörigen Markierungen: Rot: 1PM und 3Oli, Grün: 2D CI und 2D, Blau: 4U und 7AscTMPD und Schwarz: Blank und 6Rox. (B) und (D) FCR (mt) Werte von (B) -0,1 bis 1,0 und (D) -0,1 bis 1,3 der dazugehörigen Markierungen: Rot: 1PM und 3Oli, Grün: 2D CI und 2D, Blau: 4U und 7AscTMPD und Schwarz: Blank und 6Rox.

Durch FCCP wurden die Mitochondrien entkoppelt (Abb. 20, 4U). FCCP ist eine schwache organische Säure mit delokalisierte Ladung und unterhalb mikromolarer Konzentrationen aktiv (Kadenbach, 2003). Die delokalisierte negative Ladung befähigt FCCP durch die Membran zu dringen und den Protonengradienten durch die Translokation negativ geladener Komponenten aus der Matrix und die Diffusion protonierter Entkoppler in die Matrix den Protonengradienten zu verringern (Kadenbach, 2003). Der erhöhte Protonenleak nach der Entkopplung durch FCCP steigerte den Sauerstoffverbrauch (Groen, 1990). Anschließend wurden durch Rotenon, Malonat und Antimycin A die Komplexe CI, CII und CIII inhibiert und ROX wurde gemessen (Abb. 20, A, 6Rox). Dadurch wurden keine Protonen über die Membran gepumpt und die Elektronen im Chinonpool konnten nicht mehr über CIII und Cytochrom *c* auf CIV und O₂ übertragen werden. ROX beschreibt den Restsauerstoffverbrauch durch oxidative Nebenreaktion nach Inhibierung des ETS (Gnaiger, 2014, S. 31). Dieser lag bei *B. saida* und *D. labrax* im negativen Bereich und bei *S. salar* bei 2,66 pmol/(s*mg). Die abschließende Titration von Ascorbat und TMPD zeigte, dass die Kapazität von CIV bei allen Spezies deutlich höher lag als der Komplexe CI und CII (Abb. 20 A, 7AscTMPD).

Bei permeabilisierten Herzfasern zeigten sich bei *B. saida* und *S. salar* ähnliche Entwicklungen wie bei isolierten Mitochondrien. Bei *B. saida* und bei *S. salar* war der O flux per mass (mt) bei OXPHOS nach Titration von Succinat höher als in isolierten Mitochondrien (Abb. 20, C, 2D). Bei isolierten Mitochondrien sollte der O₂ flux per mass (mt) höher sein, da bei permeabilisierten Herzfasern noch anderes zelluläres Protein vorhanden war. Dadurch sollte MO_2/mg_{Protein} bei isolierten Mitochondrien höher sein. Möglicherweise wurden die Mitochondrien bei der Isolation durch mechanische Erschütterung beschädigt (Herbst und Holloway, 2015). Hier zeigte sich, dass bei steigender Temperatur wieder der O₂ flux per mass (mt) bei *S. salar* höher war als bei *B. saida*. Bei beiden war L_{omy} höher als L_n und höher als in isolierten Mitochondrien (Abb. 20, C, 3Oli). Bei permeabilisierten Herzfasern von *B. saida* lag der FCR (mt)-Wert bei 3Oli 0,18 und bei *S. salar* bei 0,05. Nach der Entkopplung durch FCCP wurden die Komplexe CI, CII und CIII inhibiert und ROX gemessen (Abb. 20, C, 6Rox). Bei *B. saida* lag diese bei 1,57 pmol/(s*mg) und bei *S. salar* bei 2,30 pmol/(s*mg).

Bei *D. labrax* zeigten die Werte über den Verlauf der Experimente bei permeabilisierten Herzfasern, dass es zu Komplikationen während der Messung kam. Zum Einen lag nach der Titration von ADP der O₂ flux per mass (mt) niedriger als bei *S. salar*. Gemäß der Steigerung der Enzymaktivität mit steigender Temperatur hätte der O₂ flux per mass höher sein müssen (Lucassen et al., 2003). Zum Anderen nahm der O₂ flux per mass (mt) während der Versuchsdauer weiter ab. Gleiches zeigt sich bei den FCR (mt)-Werten. Nach der Titration von ADP lag dieser bei 1,09 und nach Succinat bei 1,29 (Abb. 1, D, 2D CI & 2D). Im Isolationsmedium Biops und im Respirationspuffer MiR05 waren jeweils 1 g/l BSA enthalten.

BSA bindet freie Fettsäuren und ihre CoenzymA-ester, welche ANT inhibieren können und entkoppelnde und inhibierende Eigenschaften bei Proteinen der Atmungskette aufweisen (Chinopoulos et al., 2009). Vermutlich war in den Medien eine zu geringe Konzentration BSA enthalten, welche zusammen mit der höheren Temperatur nicht ausreichend war, um die freien Fettsäuren zu binden. So wurden auch einige Experimente bei permeabilisierten Herzfasern von *D. labrax* aufgezeichnet, bei denen die Mitochondrien keine Aktivität zeigten.

Ektotherme Organismen müssen den verlangsamenden Effekt der Temperatur kompensieren (Lucassen et al., 2003). Dies geschieht primär durch eine Erhöhung der Mitochondriendichte (Pörtner et al., 2000, Johnston et al., 1998). Außerdem ist die Citrat-Synthase und Cytochrom-*c*-oxidase-Aktivität in polaren Fischen 1,5- bis 5-fach höher als in tropischen (Johnston et al., 1998).

Die negativen Werte des O₂ flux per mass (mt) und des FCR (mt) nach der Titration der CI-Substrate, der Inhibierung der F₁F₀-ATPase und der Komplexe CI bis CIII könnte durch eine hohe blank-Respiration vor Versuchsbeginn bedingt sein. Da die Werte mit diesem blank-Wert korrigiert wurden, sind bei einer hohen blank-Respiration negative Werte möglich. Möglicherweise wären die negativen Werte durch eine höhere Stichprobenanzahl oder längerem Warten vor Versuchsbeginn zu eliminieren gewesen. Insgesamt wurden zehn *B. saida*, acht *S. salar* und vier *D. labrax* verwendet.

4.2. ATP-Produktion und P/O-Verhältnis in polaren Fischen

Bei dieser Experimentreihe der Bachelorarbeit wurde die ATP-Produktion und die P/O-Verhältnisse bei isolierten Mitochondrien und permeabilisierten Herzfasern von *B. saida*, *S. salar* und *D. labrax* bei 5 °C, 10 °C und 15 °C gemessen und berechnet.

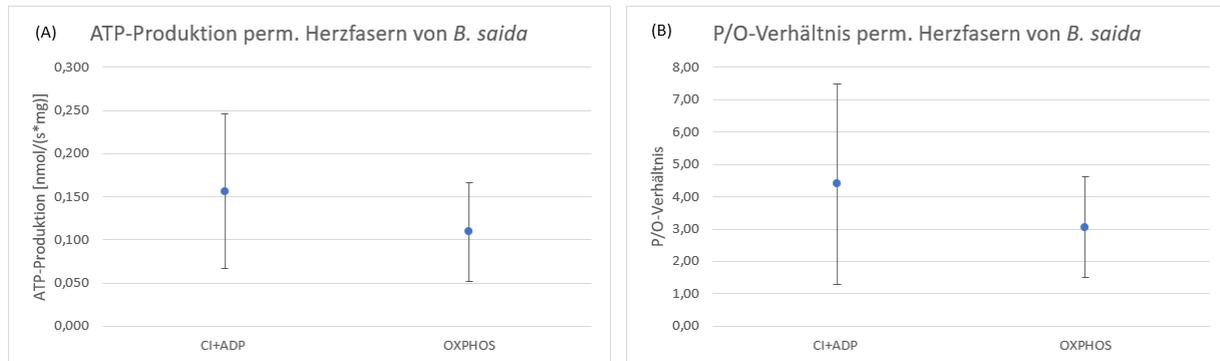


Abb. 21: Punktdiagramme der Mittelwerte der ATP-Produktion und der P/O-Verhältnisse bei permeabilisierten Herzfasern von *B. saida* bei 5 °C. (A) ATP-Produktion von 0 bis 0,3 nmol/(s*mg) bei permeabilisierten Herzfasern nach ADP und CI-Substraten, sowie nach der Titration von Succinat mit der jeweiligen Standardabweichung. (B) P/O-Verhältnis von 0 bis 8 bei permeabilisierten Herzfasern nach ADP und CI-Substraten, sowie nach Succinat-Titration mit der jeweiligen Standardabweichung.

Bei permeabilisierten Herzfasern von *B. saida* wurden ATP-Produktionen für eine CI-State-III, nach Titration der CI-Substrate und ADP, und für OXPHOS, nach der Titration von Succinat, gemessen (Abb. 21 A). Diese betragen für CI+ADP 0,156 nmol/(s*mg) (SD = 0,09) und für OXPHOS 0,109 nmol/(s*mg) (SD = 0,057) (Abb. 2 A). Aus diesen ATP-Produktionsraten wurden mit der dazugehörigen O₂-Konzentrationsabnahme das P/O-Verhältnis berechnet (Abb. 21 B). Diese betragen für CI+ADP 4,39 (SD = 3,10) und für OXPHOS 3,06 (SD = 1,55).

Im Vergleich zu theoretischen P/O-Verhältnissen und P/O-Verhältnissen und ATP-Produktionsraten anderer Studien sind diese Werte sehr hoch. Das theoretische P/O-Verhältnis mit NADH als Elektronendonator liegt bei 2,5 und mit Succinat als Elektronendonator bei 1,5 (Ferguson, 2010). In Herzfasern von *Notolabrus celidotus* wurden bei Temperaturen von 20 °C, 25 °C, 27,5 °C, 30 °C und 32,5 °C ATP-Produktionsraten zwischen 150 pmol/(s*mg) und 50 pmol/(s*mg), sowie P/O-Verhältnisse zwischen 1,8 und 0,6 gemessen (Iftikar und Hickey, 2013). Salin et al., 2016 maßen bei Leberzellen von *S. trutta* nach Fasten ein P/O-Verhältnis von 1,2 und bei Gefütterten ein P/O-Verhältnis von 1,5. In intermyofibrillären und subsarcolemmalen Mitochondrien von kalteakklimierten Enten lagen die P/O-Verhältnisse bei 1,75, beziehungsweise 1,87 (Roussel et al., 1998). Entweder nutzt *B. saida* die OXPHOS sehr effizient zur ATP-Synthese oder bei der Berechnung der ATP-Produktion kam es zu Fehlberechnungen.

Letzteres stützen die Ergebnisse der ATP-Produktion bei isolierten Mitochondrien von *B. saida* und *D. labrax* und bei permeabilisierten Herzfasern von *S. salar*. Bei isolierten Mitochondrien von *B. saida* wurde eine ATP-Produktion bei OXPHOS von 0,027 nmol/(s*mg) (SD = 0,014) und ein P/O-Verhältnis von 0,32 (SD = 0,172) berechnet. Bei isolierten Mitochondrien von *D. labrax* wurde bei OXPHOS eine ATP-Produktion von 178,62 µmol/(s*mg) (SD = 174,77) und ein P/O-Verhältnis von 1.381.009,06 (SD = 1549166,25) berechnet. Bei permeabilisierten Herzfasern von *S. salar* wurde bei OXPHOS eine ATP-Produktion von 2,145 µmol/(s*mg) (SD = 0,985) und ein P/O-Verhältnis von 47.647,70 (SD = 33461,34) berechnet. Bei permeabilisierten Herzfasern von *D. labrax* konnte keine ATP-Produktion gemessen und berechnet werden. Das Amp-Signal stieg nach der ADP-Titration an und es war keine Abnahme zu erkennen. Vermutlich lag dies an zu wenigen und zu niedrigen konzentrierten ATPase-Inhibitoren.

Diese ATP-Produktionsraten und P/O-Verhältnisse bei *S. salar* und *D. labrax* waren keine physiologischen Verhältnisse. So benötigt ein sitzender erwachsener Mann bei 70 kg Körpergewicht ungefähr 83 kg ATP pro Tag, um den Energiebedarf zu decken (Stryer, 2018, S. 614). Dies entspricht 163,65 mol ATP und einer ATP-Produktionsrate von ungefähr 22,82 pmol/(s*mg_{Körpergewicht}).

Vermutlich lagen diese hohen Werte an der K_d -Determination und K_d -Berechnung. Die K_d -Determination wurde lediglich in MiR05 ohne biologische Probe durchgeführt. Zur korrekten Bestimmung hätte die K_d -Determination mit der jeweiligen biologischen Probe, isolierte Mitochondrien und permeabilisierte Herzfasern, von den drei Fischarten bei den jeweiligen Temperaturen durchgeführt werden müssen. Durch die Sars-CoV2-Pandemie und den damit verbundenen Beschränkungen, drei statt fünf Labortage pro Woche, fehlte die Zeit, um die K_d korrekt zu bestimmen und entstandene Fehler zu identifizieren und eliminieren.

Zusammenfassung und Ausblick

Die Ziele dieser Bachelorarbeit waren die Messung des Sauerstoffverbrauchs und der ATP-Produktion mit HRR Oxygraphen bei *B. saida* bei 5 °C, sowie vergleichend bei *S. salar* bei 10 °C und *D. labrax* bei 15 °C. Die Sauerstoffverbrauchsrates wurde mittels eines SUIT-Protokolls und die ATP-Produktion mittels des Fluoreszenzfarbstoffs MgG gemessen.

Bei isolierten Mitochondrien von *B. saida* wurde bei OXPHOS ein Sauerstoffverbrauch von 25,02 pmol/(s*mg) (SD = 2,10) gemessen. Bei *S. salar* und *D. labrax* wurden jeweils höhere Sauerstoffverbrauchsrates von 38,12 pmol/(s*mg), beziehungsweise 77,35 pmol/(s*mg) (SD = 5,12) gemessen. Diese Ergebnisse zeigten, dass bei steigender Temperatur bei isolierten Mitochondrien der Sauerstoffverbrauch und somit die Enzymaktivität zunahm. Bei permeabilisierten Herzfasern war diese Steigerung des Sauerstoffverbrauchs von *B. saida* zu *S. salar* erkennbar. Bei *B. saida* wurde ein Sauerstoffverbrauch von 26,04 pmol/(s*mg) und bei *S. salar* von 67,97 pmol/(s*mg) (SD = 6,34) gemessen. Zu permeabilisierten Herzfasern von *D. labrax* war eine Steigerung des Sauerstoffverbrauchs, wie bei isolierten Mitochondrien, nicht messbar. Hier nahm der O₂ flux per mass (mt) mit fortdauernder Versuchsdauer weiter ab und die Kapazität von CIV lag niedriger, 60,95 pmol/(s*mg) (SD = 1,31), als bei OXPHOS, 77,45 pmol/(s*mg) (SD = 12,92). Dies deutete auf eine Beschädigung der Mitochondrien, durch beispielsweise einer zu niedrigen BSA-Konzentration, hin. Beim Vergleich von isolierten Mitochondrien zu permeabilisierten Herzfasern zeigte sich, dass bei permeabilisierten Herzfasern der O₂ flux per mass (mt) höher war, als bei isolierten Mitochondrien. Dabei sollte dieser in isolierten Mitochondrien höher sein, da permeabilisierte Herzfasern noch anderes zelluläres Protein, wie das Cytoskelett, enthalten. Dies deutete auf eine Beschädigung der Mitochondrien beim Isolationsprozess hin.

Bei der Messung ATP-Produktion konnte nur bei permeabilisierten Herzfasern von *B. saida* ATP-Produktionsraten und P/O-Verhältnisse gemessen werden. Diese lagen nach Titration der CI-Substrate und ADP bei 0,156 nmol/(s*mg) (SD = 0,09) und P/O = 4,39 (SD = 3,1) und bei OXPHOS bei 0,109 nmol/(s*mg) (SD = 0,057) und 3,06 (SD = 1,55). Im Vergleich zu Literaturwerten und anderen Studien sind diese ATP-Produktionsraten und P/O-Verhältnisse sehr hoch (Ferguson, 2010, Iftikar und Hickey, 2013, Roussel et al., 1998, Salin et al., 2016). Bei isolierten Mitochondrien von *B. saida* und *D. labrax*, sowie bei permeabilisierten Herzfasern von *S. salar* konnten keine physiologisch validen ATP-Produktionsraten und P/O-Verhältnisse gemessen werden. Dies deutete auf eine fehlerhafte K_d-Determinations und K_d-Berechnung hin.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die fehlerhafte Messung und Berechnung der ATP-Produktion, sowie die mögliche Beschädigung der Mitochondrien, den Einschränkungen,

nur drei statt fünf Labortage pro Woche infolge der Sars-CoV2-Pandemie, geschuldet waren. Mit mehr verfügbaren Labortagen hätten mögliche Fehler identifiziert und eliminiert werden können. Somit bleibt für zukünftige Messungen des Sauerstoffverbrauchs und der ATP-Produktion bei polaren Fischen, dass die Methodik weiter verfeinert, korrigiert und angepasst wird. Damit physiologisch valide Sauerstoffverbrauchsraten, ATP-Produktionsraten und P/O-Verhältnisse gemessen und berechnet werden können.

Literaturverzeichnis

- Barbour, J.A., Turner, N., 2014. Mitochondrial Stress Signaling Promotes Cellular Adaptations, *Int J Cell Biol.* PMID: 24587804
- Berg, J.M., Tymoczko, J.L., Gatto jr., G.J., Stryer, L., 2018. *Stryer Biochemie*, 8. Auflage Springer Spektrum Verlag, Berlin, S. 234, 582f., 596, 614,618, 621, 623, 624-631, 636-642, 646, 652
- Bermejo-Nogales, A., Caldusch-Giner, J.A., Pérez-Sánchez, J., 2015. Unraveling the molecular signatures of oxidative phosphorylation to cope with the nutritionally changing metabolic capabilities of liver and muscle tissues in farmed fish. *PLoS One*, 10(4):e0122889. doi: 10.1371/journal.pone.0122889
- Brown, G.C., 1992. The leaks and slips of bioenergetic membranes. *FASEB J.*, 6(11):2961-5. doi: 10.1096/fasebj.6.11.1644259
- Burtscher, J., Zangrandi, L., Schwarzer, C., Gnaiger, E., 2015. Differences in mitochondrial function in homogenated samples from healthy and epileptic specific brain tissues revealed by high-resolution respirometry, *Mitochondrion*, 25:104-12. doi: 10.1016/j.mito.2015.10.007
- Chinopoulos, C., Vajda, S., Csanády, L., Mándi, M., Mathe, K., Adam-Vizi, V., 2009. A novel kinetic assay of mitochondrial ATP-ADP exchange rate mediated by the ANT. *Biophys J.*, 96(6):2490-504. doi: 10.1016/j.bpj.2008.12.3915
- Chinopoulos, C., Gerencser, A.A., Mandi, M., Mathe, K., Töröcsik, B., Doczi, J., Turiak, L., Kiss, G., Konrád, C., Vajda, S., Vereczki, V., Oh, R.J., Adam-Vizi, V., 2010. Forward operation of adenine nucleotide translocase during F₀F₁-ATPase reversal: critical role of matrix substrate-level phosphorylation. *FASEB J.*, 24(7):2405-16. doi: 10.1096/fj.09-149898
- Chinopoulos, C., Kiss, G., Kawamata, H., Starkov, A.A., 2014. Measurement of ADP-ATP exchange in relation to mitochondrial transmembrane potential and oxygen consumption. *Methods Enzymol.*, 542:333-48. doi: 10.1016/B978-0-12-416618-9.00017-0.
- Clarke, A., Johnston, N.M., 1999. Scaling of metabolic rate with body mass and temperature in teleost fish. *Journal of Animal Ecology*, 68: 893-905. doi:10.1046/j.1365-2656.1999.00337.x
- Cortassa, S., O'Rourke, B., Aon, M.A., 2014. Redox-optimized ROS balance and the relationship between mitochondrial respiration and ROS. *Biochim Biophys Acta.*, 1837(2):287-95. doi: 10.1016/j.bbabi.2013.11.007
- Ferguson, S.J., 2010. ATP synthase: from sequence to ring size to the P/O ratio. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107(39):16755-6. doi: 10.1073/pnas.1012260107
- Gnaiger, E., 2014. Mitochondrial pathways and respiratory control. An introduction to OXPHOS analysis. 4th ed. *Mitochondrion Physiol Network* 19.12. Oroboros MiPNet Publications, Innsbruck:80 pp., S. 24, 26, 28-32, 39, 50
- Gnaiger, E., Boushel, R., Søndergaard, H., Munch-Andersen, T., Damsgaard, R., Hagen, C., Díez-Sánchez, C., Ara, I., Wright-Paradis, C., Schrauwen, P., Hesselink, M., Calbet, J.A., Christiansen, M., Helge, J.W., Saltin, B., 2015. Mitochondrial coupling and capacity of oxidative phosphorylation in skeletal muscle of Inuit and Caucasians in the arctic winter. *Scand J Med Sci Sports*, 25 Suppl 4:126-34. doi: 10.1111/sms.12612
- Groen, B.H., Berden, J.A., van Dam, K., 1990. Differentiation between leaks and slips in oxidative phosphorylation, *Biochim Biophys Acta.* 1019(2):121-7. doi: 10.1016/0005-2728(90)90132-n
- Gu, X., Huang, H., und Jiang, Z., 2012. Mitochondrial dysfunction and cellular metabolic deficiency in Alzheimer's disease. *Neuroscience Bulletin*, 28, 631-640.
- Guderley, H., St-Pierre, J., 2002. Going with the flow or life in the fast lane: contrasting mitochondrial responses to thermal change. *J Exp Biol.*,205(Pt 15):2237-49

- Hauser, D.N., Hastings, T.G., 2013. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in Parkinson's disease and monogenic parkinsonism. *Neurobiol Dis.*, 51:35-42. doi: 10.1016/j.nbd.2012.10.011
- Havird, J.C., Noe, G.R., Link, L., Torres, A., Logan, D.C., Sloan, D.B., Chicco, A.J., 2019. Do angiosperms with highly divergent mitochondrial genomes have altered mitochondrial function?, *Mitochondrion* 49:1-11. doi: 10.1016/j.mito.2019.06.005.
- Herbst, E.A., Holloway, G.P., 2015. Permeabilization of brain tissue in situ enables multiregion analysis of mitochondrial function in a single mouse brain. *J Physiol.*, 593(4):787-801. doi: 10.1113/jphysiol.2014.285379
- Hinkle, P.C., 2005. P/O ratios of mitochondrial oxidative phosphorylation. *Biochim Biophys Acta*, 7:1706(1-2):1-11. doi: 10.1016/j.bbabi.2004.09.004
- https://wiki.oroboros.at/index.php/Magnesium_Green, Stand: 09.10.2020 14:35Uhr
- https://www.bioblast.at/index.php/Complex_IV, Stand: 08.10.2020 17:33Uhr
- Iftikar, F.I., Hickey, A.J., 2013. Do mitochondria limit hot fish hearts? Understanding the role of mitochondrial function with heat stress in *Notolabrus celidotus*. *PLoS One*, 8(5):e64120. doi: 10.1371/journal.pone.0064120
- Iftikar, F.I., Morash, A.J., Cook, D.G., Herbert, N.A., Hickey, A.J., 2015. Temperature acclimation of mitochondria function from the hearts of a temperate wrasse (*Notolabrus celidotus*). *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol.*, 184:46-55. doi: 10.1016/j.cbpa.2015.01.017
- Johnston I, I., 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 (Pt 1):1-12. PMID: 9390931.
- Kadenbach, B., 2003. Intrinsic and extrinsic uncoupling of oxidative phosphorylation. *Biochim Biophys Acta*, 1604(2):77-94. doi: 10.1016/s0005-2728(03)00027-6
- Kim, J.A., Wie, Y., Sowers, J.R., 2008. Role of mitochondrial dysfunction in insulin resistance. *Circ Res.*, 102(4):401-14. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.107.165472
- Lanza, I.R., Nair, K.S., 2010. Mitochondrial metabolic function assessed in vivo and in vitro. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, 13(5):511-7. doi: 10.1097/MCO.0b013e32833cc93d
- Leo, E., Kunz, K.L., Schmidt, M., Storch, D., Pörtner, H.O., Mark, F.C., 2017. Mitochondrial acclimation potential to ocean acidification and warming of Polar cod (*Boreogadus saida*) and Atlantic cod (*Gadus morhua*). *Front Zool.*, 14:21. doi: 10.1186/s12983-017-0205-1
- Leysens, A., Nowicky, A.V., Patterson, L., Crompton, M., Duchon, M.R., 1996. The relationship between mitochondrial state, ATP hydrolysis, [Mg²⁺]_i and [Ca²⁺]_i studied in isolated rat cardiomyocytes. *J Physiol.*, 496 (Pt 1)(Pt 1):111-28. doi: 10.1113/jphysiol.1996.sp021669
- Lucassen, M., Schmidt, A., Eckerle, L.G., Pörtner, H.O., 2003. Mitochondrial proliferation in the permanent vs. temporary cold: enzyme activities and mRNA levels in Antarctic and temperate zoarcid fish. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.*, 285(6):R1410-20. doi: 10.1152/ajpregu.00111.2003
- Ma, Z.A., Zhao, Z., Turk, J., 2012. Mitochondrial dysfunction and β -cell failure in type 2 diabetes mellitus. *Exp Diabetes Res.* 2012, 703538. doi: 10.1155/2012/703538
- Mark, F.C., Lucassen, M., Pörtner, H.O., 2006. Thermal sensitivity of uncoupling protein expression in polar and temperate fish. *Comp Biochem Physiol Part D Genomics Proteomics*, 1(3):365-74. doi: 10.1016/j.cbd.2006.08.004
- Metelkin, E., Demin, O., Kovács, Z., Chinopoulos, C., 2009. Modeling of ATP-ADP steady-state exchange rate mediated by the adenine nucleotide translocase in isolated mitochondria. *FEBS J.*, 276(23):6942-55. doi: 10.1111/j.1742-4658.2009.07394.x
- Mitchell P., 1961. Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemi-osmotic type of mechanism, *Nature*, 191:144-8. doi: 10.1038/191144a0

- Mootha, V.K., Bunkenborg, J., Olsen, J.V., Hjerrild, M., Wisniewski, J.R., Stahl, E., Bolouri, M.S., Ray, H.N., Sihag, S., Kamal, M., Patterson, N., Lander, E.S., Mann, M., 2003. Integrated analysis of protein composition, tissue diversity, and gene regulation in mouse mitochondria, *Cell*, 115(5):629-40, doi: 10.1016/s0092-8674(03)00926-7
- Murphy, M.P., 2009. How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochem J.*, 417(1):1-13. doi: 10.1042/BJ20081386
- PanReac AppliChem ITW Reagents. Bradford-Solution for Protein Determination
- Perry, C.G., Kane, D.A., Lanza, I.R., Neuffer, P.D., 2013. Methods for assessing mitochondrial function in diabetes. *Diabetes*, 62(4):1041-53. doi: 10.2337/db12-1219
- Pörtner, H.O., van Dijk, P.L.M., Hardewig, I., Sommer, A., 2000. Levels of metabolic cold adaptation: tradeoffs in eurythermal and stenothermal ectotherms. In: *Antarctic Ecosystems: models for wider ecological understanding*. eds W. Davison, C. Howard Williams, Caxton Press, Christchurch New Zealand, ISBN: 0-473-06877-X
- Potter, V.R., Dubois, K.P., 1943. STUDIES ON THE MECHANISM OF HYDROGEN TRANSPORT IN ANIMAL TISSUES : VI. INHIBITOR STUDIES WITH SUCCINIC DEHYDROGENASE. *J Gen Physiol.*, 26(4):391-404. doi:10.1085/jgp.26.4.391
- Roussel, D., Rouanet, J.L., Duchamp, C., Barré, H., 1998. Effects of cold acclimation and palmitate on energy coupling in duckling skeletal muscle mitochondria. *FEBS Lett.*, 439(3):258-62. doi: 10.1016/s0014-5793(98)01382-9
- Sadava, D., Hillis, D.M., Heller, H.C., Berenbaum, M.R., Markl, J. (Hrsg.), 2011. *Purves Biologie*, 9. Auflage Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, S. 120, 739 & 740
- Salin, K., Auer, S.K., Rey, B., Selman, C., Metcalfe, N.B., 2015. Variation in the link between oxygen consumption and ATP production, and its relevance for animal performance. *Proc Biol Sci.*, 282(1812):20151028. doi: 10.1098/rspb.2015.1028
- Salin, K., Villasevil, E.M., Auer, S.K., Anderson, G.J., Selman, C., Metcalfe, N.B., Chinopoulos, C., 2016. Simultaneous measurement of mitochondrial respiration and ATP production in tissue homogenates and calculation of effective P/O ratios, *Physiol Rep.*, 4(20), e13007 doi: 10.14814/phy2.13007
- Strobel, A., Graeve, M., Poertner, H.O., Mark, F.C., 2013. Mitochondrial acclimation capacities to ocean warming and acidification are limited in the antarctic Nototheniid Fish, *Notothenia rossii* and *Lepidonotothen squamifrons*. *PLoS One*, 8(7):e68865. doi: 10.1371/journal.pone.0068865
- Stuart, J.A., Harper, J.A., Brindle, K.M., Brand, M.D., 1999. Uncoupling protein 2 from carp and zebrafish, ectothermic vertebrates. *Biochim Biophys Acta*, 1413(1):50-4. doi: 10.1016/s0005-2728(99)00081-x
- Stuart, J.A., Cadenas, S., Jekabsons, M.B., Roussel, D., Brand, M.D., 2001. Mitochondrial proton leak and the uncoupling protein 1 homologues. *Biochim Biophys Acta*, 1504(1):144-58. doi: 10.1016/s0005-2728(00)00243-7
- Watt, I.N., Montgomery, M.G., Runswick, M.J., Leslie, A.G., Walker, J.E., 2010. Bioenergetic cost of making an adenosine triphosphate molecule in animal mitochondria. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107(39):16823-7. doi: 10.1073/pnas.1011099107
- Wehner, G., Gehring, W., 2013. *Zoologie*, 25. Auflage Georg Thieme Verlag, Stuttgart, S. 717
- White, C.R., Alton, L.A., Frappell, P.B., 2012. Metabolic cold adaptation in fishes occurs at the level of whole animal, mitochondria and enzyme. *Proc Biol Sci.*, 279(1734):1740-7. doi: 10.1098/rspb.2011.2060

Danksagung

Mit dieser Seite möchte ich mich bei allen recht herzlich bedanken, die mich bei dieser Bachelorarbeit unterstützt und ein Gelingen der Bachelorarbeit möglich gemacht haben.

Mein hauptsächlichster Dank gilt meinem Betreuer Herrn Dr. Felix Christopher Mark. Dank ihm war diese Bachelorarbeit am Alfred-Wegener-Institut in Bremerhaven überhaupt möglich. Nachdem mein Aufenthalt in Bremerhaven Mitte März durch die Covid19-Pandemie von einem auf den anderen Tag endete, machte er es mir dennoch möglich, wiederzukommen. Mitte Mai erfuhr ich völlig überraschend, dass ich in zehn Tagen wieder nach Bremerhaven kommen kann. Während der Laborarbeit hatte er immer ein offenes Ohr für mich und führte mich immer auf den richtigen Weg.

Ein nachdrückliches Dankeschön gilt Frau Isabel Ketelsen, die mich während der Laborarbeit unterstützte. Ohne ihre Unterstützung wäre diese Bachelorarbeit in dem gegebenen, verkürzten Zeitrahmen, durch die Beschränkungen, nicht möglich gewesen.

Abschließend möchte ich mich bei meinen Eltern, meiner Schwester und meiner Freundin für das fleißige Korrekturlesen bedanken.

Trebur, den 26.10.2020, Nicolas Melchior