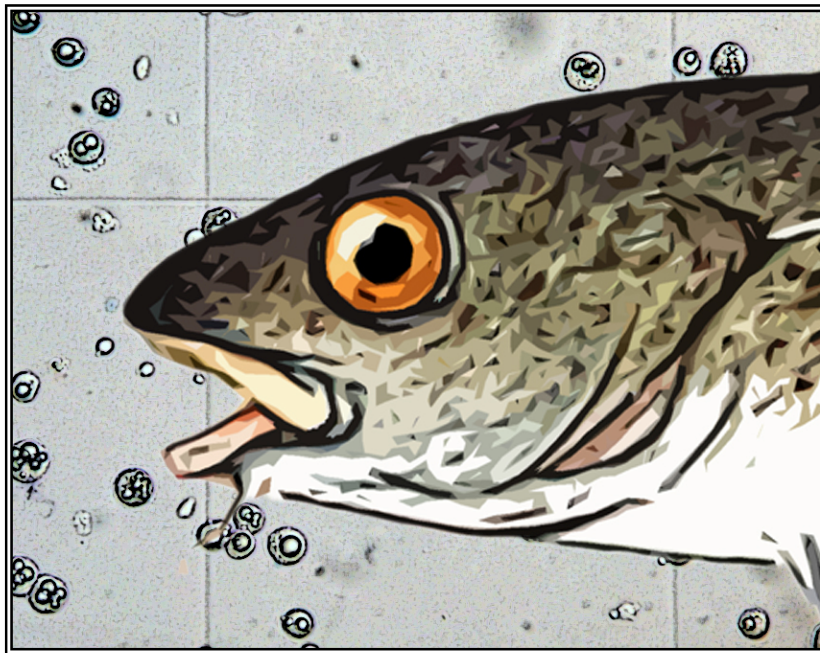


Diplomarbeit im Fach Biologie  
Universität Freiburg, Institut für Biologie  
angefertigt am:

Alfred-Wegener-Institut für Polar- und Meeresforschung, Bremerhaven

Vergleichende Untersuchungen zum temperaturabhängigen  
Sauerstoffverbrauch isolierter Leberzellen von Kabeljau  
(*Gadus morhua*) aus verschiedenen Populationen



vorgelegt von  
Joanna J. Miest  
in Freiburg im Januar 2008



## Zusammenfassung

Aufgrund der globalen Erwärmung des Klimas ist die Klärung der Grundprinzipien der Temperaturtoleranz bei Fischen innerhalb der Tierphysiologie von großer Bedeutung.

Im Rahmen der vorliegenden Diplomarbeit wurde anhand zweier Kabeljaupopulationen (*Gadus morhua* Linnaeus, 1758) unterschiedlicher Habitate (polar und boreal) der Einfluss der Eurythermie auf das zelluläre Stoffwechselverhalten im Temperaturverlauf untersucht. Da sich Temperaturänderungen bereits in einem kurzen Zeitraum auf die Zellmembran auswirken können, wurde der Einfluss einer Kälteinkubation auf die Temperaturempfindlichkeit des Stoffwechsels der Zellen, mit besonderem Fokus auf die mitochondrialen Prozesse (ATP-Synthese und Protonenleck), untersucht.

Zu diesem Zweck wurden Zellen aus der Leber von 10°C akklimierten Kabeljau aus der Barents- und der Nordsee isoliert und die Sauerstoffverbrauchsraten der Hepatozyten bei verschiedenen Temperaturen bestimmt. Zudem erfolgte eine Inhibierung der Mitochondrien bzw. der ATP-Synthese mittels Kaliumcyanid und Oligomycin, um den Anteil dieser Prozesse an der totalen Respiration erfassen zu können. Der Effekt einer Kälteinkubation auf das Respirationsverhalten wurde durch Lagerung der Zellen bei 0°C für 18 - 28 Stunden getestet. Zusätzlich erfolgte eine Erfassung der Sauerstoffverbrauchsraten des Gesamtorganismus, um Aussagen zum Populationsvergleich auf dieser Organisationsebene treffen zu können.

Innerhalb der Stoffwechselraten des Ganztieres konnte ein möglicher Einfluss der Ammonium- und Nitrit-Konzentrationen im Wasser auf die Raten des Sauerstoffverbrauchs dokumentiert werden. Ein Populationsunterschied zwischen Nordsee- und nordost-arktischen Kabeljau konnte jedoch nicht festgestellt werden. Im Gegensatz dazu wurde auf zellulärer Ebene eine höhere Temperaturempfindlichkeit des arktischen Kabeljau gefunden. Die Kälteinkubation führte zu einer veränderten Temperaturempfindlichkeit der Zellen. Im Vergleich mit Literaturdaten aus ähnlichen Versuchen schien sich die Inkubation nicht auf die respiratorischen Anteile der mitochondrialen Prozesse sowie auf die Aktivität der Citratsynthase auszuwirken.

Die veränderte Temperaturempfindlichkeit der Zellen wird mit einer Kälteanpassung der Zellmembran diskutiert (homeoviskose Adaptation). Dies führte zum einen zu einer gesteigerten Respiration in der Kälte, andererseits könnte sie jedoch auch zu einer Beeinträchtigung des Stoffwechsels in den hohen Temperaturen geführt haben. Der gefundene Populationsunterschied innerhalb der Temperaturempfindlichkeit der zellulären Respiration

## Zusammenfassung

---

tionsraten deutet auf erhöhte Energiekosten des arktischen Kabeljau hin, deren Ursprung auf zellulärer bzw. mitochondrialer Ebene zu finden ist. Dieser gesteigerte zelluläre Sauerstoffbedarf kann jedoch anscheinend nicht durch das Herz-Kreislaufsystem des Fisches gedeckt werden, da sich kein Populationseffekt auf Ganztierebene wiederfindet. Somit gerät der arktische Kabeljau bereits in niedrigeren Temperaturen in den Pejus-Bereich der Optimumskurve.

# Inhaltsverzeichnis

<i>Zusammenfassung</i> .....	<i>A</i>
<i>Abkürzungsverzeichnis</i> .....	<i>D</i>
<i>1 Einleitung</i> .....	<i>1</i>
<i>2 Material und Methoden</i> .....	<i>10</i>
2.1 Versuchstiere und ihre Haltung.....	10
2.2 Körperindizes.....	11
2.3 Messung der Ganztierrespiration.....	12
2.4 Präparation der Leberzellen.....	17
2.5 Respiration von Hepatozyten.....	23
2.6 Citratsynthase-Aktivität.....	28
2.7 $Q_{10}$ -Wert und Arrhenius Aktivierungsenergie.....	31
2.8 Statistik.....	32
<i>3 Ergebnisse</i> .....	<i>34</i>
3.1 Körpermaße und -indizes.....	34
3.2 Ganztierrespiration.....	37
3.3 Leberzellen: Zeit- und Inkubationseffekt.....	41
3.4 Leberzellen: Temperatureffekt auf Respiration und beteiligte Prozesse.....	48
3.5 Citratsynthase-Aktivität.....	51
<i>4 Diskussion</i> .....	<i>52</i>
4.1 Körperindizes.....	52
4.2 Ganztierrespiration.....	53
4.3 Leberzellen:.....	56
4.3.1 Isolation.....	56
4.3.2 Abnahme Zellzahl und Viabilität.....	56
4.3.3 Leberzellen: Populationseffekt.....	57
4.3.4. Leberzellen: Zeiteffekt.....	62
4.3.5 Leberzellen: Temperatureffekt an Tag 2.....	67
4.4 Ausblick.....	71
<i>5 Literaturverzeichnis</i> .....	<i>73</i>
<i>6 Anhang</i> .....	<i>a</i>
<i>Danksagung</i> .....	<i>i</i>
<i>Eigenständigkeitserklärung</i> .....	<i>iii</i>

## Abkürzungsverzeichnis

AWI:	Alfred-Wegener-Institut
BSA:	Rinderserum Albumin
COX:	Cytochrom c-Oxidase
CS:	Citratsynthase
Ea:	Arrhenius Aktivierungsenergie
GSI:	gonadosomatischer Index
HSI:	hepatosomatischer Index
HVA:	Homeoviskose Adaptation
In Vorber.:	In Vorbereitung
K:	Konditionsfaktor
KCN:	Kaliumcyanid
MO <sub>2</sub> :	Sauerstoffverbrauch
MS 222:	3-Aminobenzoessäureethylester
NEAC:	nordost-arktischer Kabeljau
NSC:	Nordseekabeljau
Q <sub>10</sub> :	Beschleunigungsrate eines physiologischen Prozesses bei einer Temperaturerhöhung um 10°C
ROS:	Reactive Oxygene Species
SMR:	Ruhestoffwechselrate

# 1 Einleitung

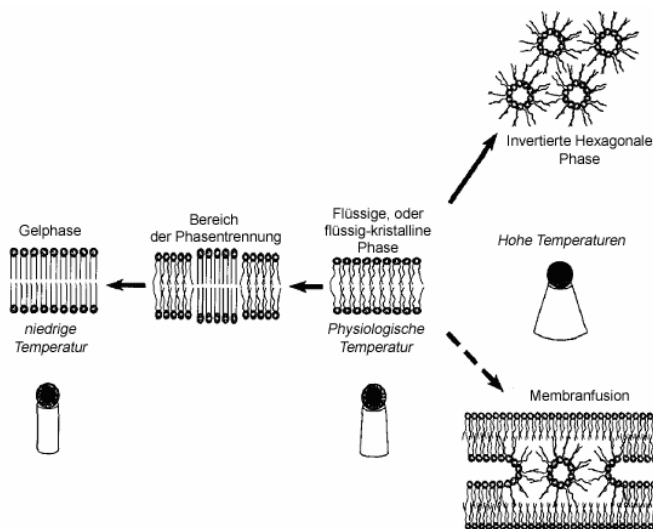
In den letzten Jahren ist der Klimawandel verstärkt in den Fokus der Öffentlichkeit getreten. Der neueste Bericht des UN-Klimarates IPCC – Intergovernmental Panel on Climate Change (IPCC 2007) – lässt keinen Zweifel an der Klimaänderung und deren Konsequenzen. So ist im letzten Jahrhundert die mittlere globale Temperatur um etwa  $0,6^{\circ}\text{C}$  gestiegen, und die Meere sind in dem Zeitraum von 1961 bis 2003 bis zu einer Tiefe von 700 m im Mittel um  $0,1^{\circ}\text{C}$  wärmer geworden. Für die letzte Dekade des 21. Jahrhunderts wird eine weitere Erwärmung des Klimas zwischen  $1,8$  und  $4^{\circ}\text{C}$  vorausgesagt. Die größte Erwärmung wird dabei in den hohen nördlichen Breiten stattfinden (Bindoff et al. 2007). Dies ist für die überwiegend ektothermen Meeresbewohner von zentraler Bedeutung, da sich ihre Körpertemperatur mit der Umgebungstemperatur ändert und dadurch der Stoffwechsel (Metabolismus) der Tiere beeinflusst wird. Der Stoffwechsel reagiert sehr empfindlich auf Temperaturwechsel im internen Milieu eines Tieres. Alle Stufen der biologischen Organisation, von den molekularen Diffusionsraten und biochemischen Reaktionen, über Membranpermeabilität und zelluläre Prozesse, sowie Gewebe- und Organfunktionen bis hin zu deren Integrierung in den Gesamtorganismus, werden von der Temperatur beeinflusst. Das Maß, mit dem der Stoffwechsel auf eine Änderung der Temperatur reagiert, wird in der van't Hoff'schen Regel beschrieben und im  $Q_{10}$ -Wert ausgedrückt. Dieser gibt an, um welchen Faktor die Geschwindigkeit der Reaktion während einer Temperaturerhöhung um  $10^{\circ}\text{C}$  zunimmt.

Aufgrund der beschriebenen Temperaturabhängigkeit haben ektotherme Organismen ihren Stoffwechsel an das jeweilige Temperaturregime ihres Lebensraumes angepasst. Die Toleranz von verschiedenen Temperaturspannen ist dabei unterschiedlich ausgeprägt. So werden die Tiere der Arktis als kalt-eurytherm bezeichnet, da sie an verhältnismäßig konstant niedrige Temperaturen angepasst sind, dabei jedoch im Gegensatz zu den als kalt-stenotherm bezeichneten Tieren der Antarktis noch relativ hohe Temperaturschwankungen um die  $5^{\circ}\text{C}$  in ihrem Lebensraum erfahren. Tiere der gemäßigten Breiten, die hohe Temperaturschwankungen von bis zu  $20^{\circ}\text{C}$  im Jahresverlauf erfahren können, bezeichnet man hingegen als eurytherm. Sie besitzen eine höhere Toleranz gegenüber Temperaturschwankungen und tolerieren höhere Temperaturen als polare Tiere (Pörtner et al. 2000). Die Grenzen der Temperaturtoleranz eines Tieres sind nicht unbedingt starr festgelegt. So können vor allem boreale Tiere ihren Stoffwechsel an die sich im Jahresverlauf ändernden Temperaturen anpassen (Akklimatisation). Wenn dieser Vorgang für Untersuchungen un-

## Einleitung

ter Laborbedingungen initiiert wurde, benennt man ihn als Akklimation (Schmidt-Nielsen 1999). Der Begriff der Adaption hingegen bezeichnet eine genetische Anpassung an Veränderungen über einen langen Zeitraum bzw. über Generationen. Diese Änderungen sind auf allen Organisationsebenen des Tieres (vom Molekül bis zum Ganztier) anzutreffen.

In der Kälte muss einer niedrigen Stoffwechselrate und damit einer geringen ATP-Produktion entgegengewirkt werden, um ein aktives Leben in der Kälte zu ermöglichen. Mit einer Kälteanpassung geht folglich eine Erhöhung der aeroben Kapazität einher. So zeigen polare Fische im Vergleich zu Fischen der gemäßigten Breiten eine Mitochondrienproliferation sowie erhöhte Enzymaktivitäten, wobei letztere sowohl qualitative als auch quantitative Änderungen beinhalten (Nathanailides 1996; Pörtner et al. 2001; Guderley und St-Pierre 2002). Eine weitere temperaturbedingte Anpassung wurde in der Struktur biologischer Membranen gefunden. Nach dem sogenannten Fluiditätsmodell der Zellbiologie liegt eine Membran bei ihrer Normaltemperatur (d.h. Adaption- bzw. Akklimationstemperatur) als zweidimensionaler Flüssigkeitskristall (Abbildung 1.1) vor.



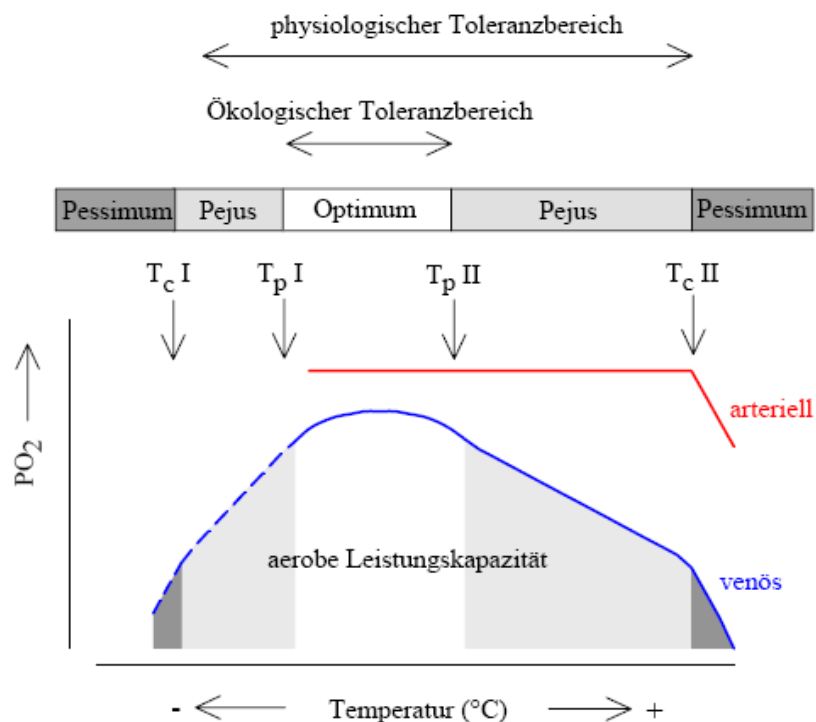
**Abb. 1.1.** Fluiditätsmodell der Lipiddoppelschicht. Die Pfeile geben dabei einen Shift in der Temperatur an. Physiologische Temperatur: Adaption- bzw. Akklimation des Organismus (verändert nach Hazel (1995)).

In Fischen bedeutet eine Änderung der Fluidität eine Beeinträchtigung des Ionentransports und der Funktion membrangebundener Enzyme, wie z.B. der Cytochrom c-Oxidase und der  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase (Hazel 1995; Snyder und Hennessey 2003). Durch Einlagerung von ungesättigten Fettsäuren bzw. dem Einbau von Doppelbindungen in das Lipidmolekül kann bei einer Abkühlung der negative Temperatureffekt auf die Fluidität gesenkt werden (Karp 2005). Dieses wird als homeoviskose Adaptation (homeoviscous adaptation, HVA) bezeichnet (Sinensky 1974; Cossins et al. 1981; Macdonald 1988). In der Natur findet sich der Vorgang der HVA bei der Adaption (Farkas et al. 2001) und der Akklimation bzw. Akklimation von ektothermen Tieren an unterschiedliche Temperaturen.



## Einleitung

Die genannten physiologischen Anpassungen bestimmen die Verbreitungsgrenzen von Tieren und inwieweit der Organismus von einer Klimaänderung beeinflusst wird. Gemäß dem Konzept der sauerstoff- und kapazitätslimitierten Temperaturtoleranz bei ektothermen Meeresorganismen (Pörtner 2001; Pörtner und Knust 2007) wird die Breite des tolerierbaren Temperaturspektrums über die aerobe Leistungskapazität bestimmt. Das hierzu entwickelte Modell zur Temperaturtoleranz von Frederich und Pörtner (2000) wurde für Fische spezifiziert (Abbildung 1.2 (Lannig 2003)). Im Gegensatz zu Crustaceen wird bei Fischen die Grenze der Temperaturtoleranz nicht durch die Ventilation, sondern durch das Herz-Kreislauf-System gesetzt. Während im Bereich des Temperaturoptimums eine Versorgung des Organismus mit ausreichend Sauerstoff gewährleistet werden kann (maximaler venöser Sauerstoffgehalt), ist dies außerhalb des Optimums nicht mehr der Fall und äußerst sich in einem sinkenden venösen  $PO_2$  (Sartoris et al. 2003; Lannig et al. 2004; Pörtner et al. 2004). Diese Temperaturbereiche mit verminderter Sauerstoffversorgung werden als Pejus-Bereiche (pejus = schlechter werdend) bezeichnet. Diese sind durch die untere bzw. obere Pejus-Temperatur ( $T_{PI}$  bzw.  $T_{PII}$ ) und die untere bzw. obere kritische Temperatur ( $T_{CI}$  bzw.  $T_{CII}$ ) eingegrenzt.  $T_c$  kennzeichnet dabei die Temperaturen, unter- bzw. oberhalb derer der Stoffwechsel des Organismus anaeroben wird und ein Überleben nur noch für begrenzte Zeit möglich ist.



**Abb. 1.2** Modell der sauerstofflimitierten Temperaturtoleranz für Fische nach Lannig (2003), aufbauend auf Frederich und Pörtner (2000). Nähere Erklärung siehe Text.

## Einleitung

---

In diesem Zusammenhang fanden Lannig et al. (2004) während einer akuten Temperaturänderung im venösen Blut von 10°C akklimierten Kabeljau (*Gadus morhua*) der Nordsee (Nordseekabeljau, NSC) einen maximalen Sauerstoffgehalt bei 5°C. Bei *G. morhua* der Barentssee (Nordost-arktischer Kabeljau, NEAC) hingegen wurde eine Verschiebung des Maximums im venösen Sauerstoffgehalt zu tieferen Temperaturen (3°C) beobachtet (Pörtner et al. in review). Ein solches Maximum deutet auf einen minimalen Sauerstoffverbrauch durch das Gewebe hin. Die Autoren diskutierten diesen Populationsunterschied mit der Anpassung des Stoffwechsels an das jeweilige Temperaturspektrum des Habitats der untersuchten Populationen (Nordsee vs. Barentssee).

Im Vergleich der verschiedenen Kabeljaupopulationen zeigte der arktische, kalt-eurytherme Kabeljau einen erhöhten Energiebedarf bzw. eine größere Temperaturempfindlichkeit sowohl auf mitochondrialer als auch auf organismischer (Ganztier) Ebene (Fischer 2002; Lannig 2003; Zittier 2006; Polleichtner 2006; Lurman 2007). So wurden in einem Wachstumsexperiment bei unterschiedlichen Temperaturen für alle untersuchten Kabeljaupopulationen (Nordsee, Norwegische Küste und Barentssee) höchste Wachstumsraten um die 10°C beobachtet. Die Tiere aus der Nordsee hatten dabei das größte und die Tiere aus der Barentssee das geringste Wachstumspotential (Pörtner et al. 2001; Fischer 2002). Im Gegensatz zum borealen Kabeljau wurde beim arktischen Kabeljau keine Reduzierung des mitochondrialen Proteins mit Warm-Akklimation gefunden (Lannig et al. 2003). Dies entsprach dem Befund ähnlicher Sauerstoffverbrauchsraten zwischen Tieren der arktischen Population während einer akuten Temperaturerhöhung nach Warm-Akklimation (Zittier 2006). Im Vergleich zum norwegischen Kabeljau wurde beim arktischen Kabeljau die obere kritische Temperatur (anaerober Stoffwechsel) bei niedrigeren Temperaturen erreicht (Zittier 2006).

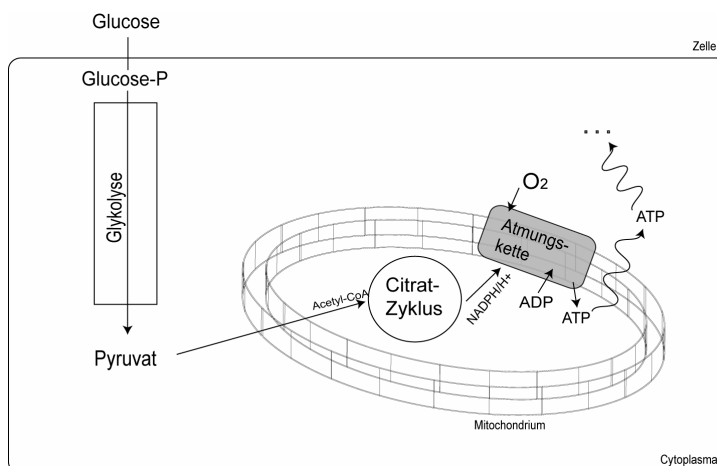
Untersuchungen auf mitochondrialer Ebene deuten ebenfalls auf eine unterschiedliche Temperaturempfindlichkeit zwischen den Kabeljaupopulationen hin. Zwar fanden sich bei Polleichtner (2006) ähnliche Respirationsraten (maximale ATP-Produktion, state III) isolierter Mitochondrien von NEAC und NSC, Fischer (2002) hingegen sah in der state III Respiration sowie in deren Temperaturempfindlichkeit beim arktischen Kabeljau höhere Werte als beim Nordsee-Kabeljau. Auch beim Protonenleck deutet sich eine erhöhte Empfindlichkeit des nordost-arktischen Kabeljau an. So zeigen die maximalen Protonenleckströme (state IV) der isolierten Mitochondrien von 10°C akklimierten arktischen Kabeljau mit einem  $Q_{10}$  von  $3,08 \pm 0,91$  eine höhere Temperaturempfindlichkeit als die Protonenleckströme des Nordseekabeljaus ( $Q_{10} = 2,21 \pm 0,14$ ) (Polleichtner 2006).

## Einleitung

---

In der vorliegenden Arbeit sollte untersucht werden, ob sich diese unterschiedliche Temperaturempfindlichkeit der Populationen auch auf Zellebene widerspiegelt. In der Literatur finden sich unterschiedliche Abhängigkeiten des zellulären Stoffwechsels von der Temperatur, und die sich daraus ergebenden Korrelationen sind vielfältig (exponentiell, hyperbolisch, bis hin zu keiner deutlichen Abgängigkeit des zellulären Sauerstoffverbrauchs von der Messtemperatur) (Pannevis und Houlihan 1992; Krumschnabel et al. 1997; Mark et al. 2005, siehe auch Diskussion Abbildung 4.2). Diese Befunde widersprechen dem allgemeinen Theorem einer exponentiellen Steigerung der Stoffwechselraten mit der Temperatur ( $Q_{10} \approx 2$ ). Demzufolge stellte sich die Frage nach dem zellulären Stoffwechselverhalten des Kabeljau in Abhängigkeit von der Population bzw. vom entsprechenden Grad an Eurythermie (eurytherm vs. Kalt-eurytherm). Weiterhin können sich Temperaturänderungen innerhalb von 6 Stunden auf die Zusammensetzung der Membranlipide isolierter Zellen auswirken (Williams und Hazel 1994; 1995). Dies war der Anlass, den Einfluss der Zeit- bzw. Kälteinkubation auf die Temperaturempfindlichkeit zellulärer Stoffwechselprozesse – v.a. auf mitochondriale Prozesse (ATP-Synthese und Protonleck) *in situ* (in der Zelle) – zu untersuchen. Bei ähnlichen Untersuchungen hatte sich ein mitochondrialer Anteil von 70 – 90% und ein Anteil der ATP-Synthese von 50 – 65% an der Gesamtrespiration ergeben (Rolfe et al. 1999; Cherkasov et al. 2006), die während einer akuten Temperaturänderung kaum Änderungen erfuhren (Mark et al. 2005). Da hier der mitochondriale Stoffwechsel im Vordergrund steht, soll dieser im Folgenden kurz dargestellt werden.

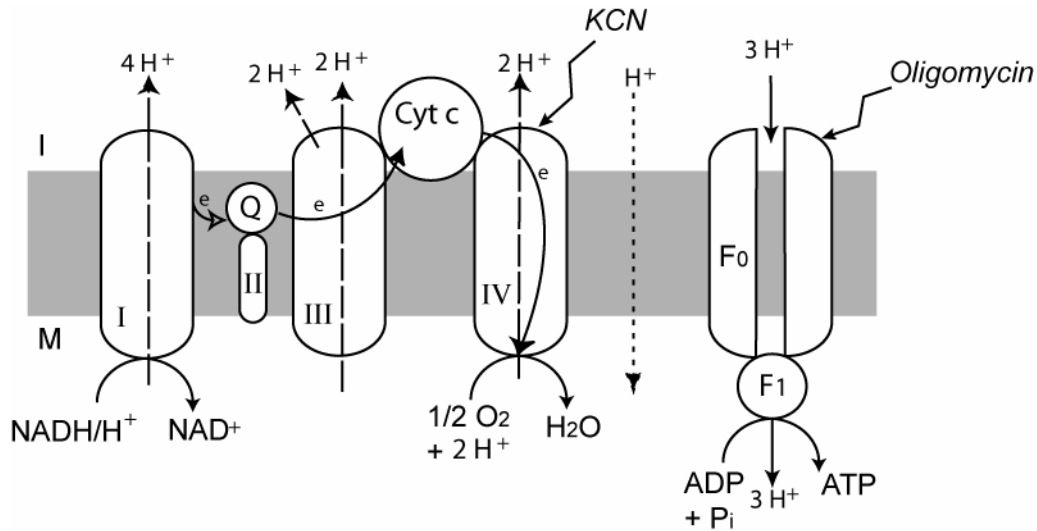
ATP (Adenosintriphosphat) ist in biologischen Systemen der wichtigste Energieträger und wird über die oxidative Phosphorylierung mit Hilfe der Coenzyme (NADH, NADPH,  $FADH_2$ ) gebildet. In Abbildung 1.3 ist die Umsetzung von Glucose zu ATP vereinfacht dargestellt.



**Abb. 1.3** Vereinfachte Darstellung der ATP-Synthese in der Zelle.

## Einleitung

An den vier großen Proteinkomplexen der Atmungskette wird eine Elektronentransportkette aufgebaut, deren Energie zum Transport von Protonen aus der Matrix in den Intermembranraum genutzt wird. Die Elektronen werden an Komplex IV auf Sauerstoff übertragen. Nahezu der gesamte Sauerstoffverbrauch findet hier statt, Ausnahmen sind Oxidasen, die vor allem in der Leber vorkommen. Durch den Protonengradient wird ein Membranpotential aufgebaut, das die Energie für die ATP-Produktion an der  $F_0/F_1$ -ATP-Synthase liefert (Heldmaier und Neuweiler 2004) (siehe Abbildung 1.4).



**Abb. 1.4** Die Atmungskette in der inneren Mitochondrienmembran mit den Angriffspunkten der Inhibitoren. I: Komplex I (NADH-Reduktase), Q: Coenzym Q, II: Komplex II (Ubichinon-Oxidase), III: Komplex III (Cytochrom-Reduktase), Cyt c: Cytochrom c, IV: Komplex IV (Cytochrom c-Oxidase).  $F_0/F_1$ :  $F_0/F_1$ -ATP-Synthase, e: Elektronen,  $H^+$ : Protonen, I: Intermembranraum, M: Matrix, KCN: Kaliumcyanid, gepunkteter Pfeil: Protonenleckstrom. Durch den Transport von Protonen in den Intermembranraum (I) wird ein Membranpotential aufgebaut, dessen Energie die ATP-Synthase und das Protonenleck ermöglicht. Die Durchlässigkeit der Membran für Protonen (Protonenleck) ist dabei mit Potential der Membran positiv korreliert.

Abbildung verändert nach [www.wissenschaft-online.de](http://www.wissenschaft-online.de)

Durch den Protonengradienten ist die ATP-Synthase an die Oxidation gekoppelt. Aber auch im entkoppelten Zustand verbrauchen die Mitochondrien immer noch Sauerstoff, produzieren aber kein ATP. Der restliche Sauerstoffverbrauch wird durch die Permeabilität der inneren Mitochondrienmembran für Protonen erzeugt (Brand et al. 1994).

Tiere mit braunem Fettgewebe können diese Protonenströme gezielt zur Wärmeproduktion nutzen (Nicholls und Locke 1984). Das basale Protonenleck aller nicht Wärme erzeugenden Zellen muss hiervon unterschieden werden und wird als mögliche Abmilderungsreaktion der Zelle auf die Bildung von reaktiven Sauerstoffverbindungen (sogenannten ROS, Reactive Oxygen Species) diskutiert (Brand et al. 2004; Mark et al. 2006). Die Leitfähig-

keit der Membran für Protonen (Protonenleck) ist positiv korreliert mit dem beschriebenen Membranpotential.

In Hepatozyten trägt das Protonenleck im Allgemeinen ~25% zum zellulären Sauerstoffverbrauch bei (Brand et al. 1994; Hulbert et al. 2002). Auch der Betrag des Protonenlecks zum Ruhestoffwechsel des intakten Organismus, stellt, unabhängig von Endo- oder Ektothermie, mit 20 – 30% einen wichtigen Faktor dar (Brand et al. 1991; Hulbert und Else 1999). Somit bildet dieser Rückstrom die größte Ineffizienz in der Kopplung der ATP-Produktion an den Sauerstoffverbrauch (Brand 2005).

### Versuchstiere

Beim Kabeljau (*Gadus morhua*, Linnaeus 1758) handelt es sich um einen im Salzwasser lebenden Knochenfisch (Teleostei). Wie alle Teleostei sind Kabeljau ammoniotelische Tiere, d.h. sie scheiden Ammoniak ( $\text{NH}_3$ ) als Endprodukt des Aminosäureabbaus aus. In Wasser (und in der Zelle) gelöst, protoniert dieses leicht zu Ammonium ( $\text{NH}_4^+$ ). Nitrifizierende Bakterien im Wasser wandeln dieses dann über Nitrit zu Nitrat um.



**Abb. 1.5** Kabeljau *Gadus morhua* (Linnaeus, 1758)

Der Kabeljau ist eine der kommerziell wichtigsten Fischarten im Nordatlantik und spielt zudem eine bedeutende Rolle in vielen Ökosystemen. Allerdings wurde ein dramatischer Rückgang der Populationen beobachtet (Esmark und Jensen 2004), und seit 1996 befindet sich der Kabeljau auf der Roten Liste bedrohter Arten (Sobel 1996). Diese Abnahme der Populationsdichte ist, so scheint es, zum Teil durch Überfischung (Myers et al. 1996) aber auch zum Teil klimatisch bedingt (Lannig et al. 2004; Rose 2004). Ottersen et al. (2006) berichten für den nordost-arktischen Kabeljau von einer fangbedingten Verjüngung der geschlechtsreifen Tiere (Ende 1940er: 10 – 11 Jahre, 1990er: 7 – 8 Jahre) und im gleichen Zeitraum von einer Abnahme in der mittleren Länge der Individuen von 90 cm auf 80 cm. Durch diese Änderung, so argumentieren die Autoren, würden die Tiere weniger robust, und eine Änderung des Klimas hätte stärkere Auswirkungen als zuvor. Dies ist darauf begründet, dass kleinere Tiere einen geringeren Fortpflanzungserfolg haben und somit ein

## Einleitung

---

Ausgleich zwischen Jahren mit guter und schlechter Fortpflanzungsrate nicht mehr stattfinden kann. Dass sich die globale Erwärmung bereits auf die Kabeljaupopulationen auswirkt, zeigt die beobachtete nordwärts gerichtete Wanderung der Nordseepopulation in kältere Gewässer (Pörtner et al. 2001; Clark et al. 2003; Perry et al. 2005; Rindorf und Lewy 2006).

Der Kabeljau, der zu der Familie der *Gadidae* (Dorschartige) gehört, findet sich bis in Wassertiefen von 600 m meist grundnah, aber auch im Pelagial (Muus und Nielsen 1999). Sein Verbreitungsgebiet erstreckt sich über den gesamten Nordatlantik von Grönland bis North Carolina und von Spitzbergen bis zur Biskaya, zudem kommt er in der Nord- und Ostsee sowie im Nordpazifik vor.



**Abb. 1.6** Das Verbreitungsgebiet (blaue Markierung) vom atlantischen Kabeljau *Gadus morhua*. Verändert nach: [www.wikipedia.de](http://www.wikipedia.de) (Autor: Aotearoa)

Innerhalb dieses Gebietes lassen sich verschiedene Populationen abgrenzen, die durch unterschiedliche Laichgebiete genetisch voneinander getrennt sind. Da in dieser Arbeit der Einfluss der Adaptation an unterschiedliche Temperaturregimes untersucht werden sollte, wurden der eurytherme Nordseekabeljau und der kalt-eurytherme Kabeljau der Barentssee einem Vergleich unterzogen. Der Nordseekabeljau ist an ein breites Temperaturfenster angepasst, da er in seinem Lebensraum Temperaturschwankungen von 5°C im Winter und 16°C im Sommer erfährt (Dippner 1999). Der arktische Kabeljau hingegen lebt in einem stabilen Klima und hält sich bei Temperaturen von 0°C bis 5°C auf, wandert jedoch während der Fortpflanzung in Laichgebiete bei den Lofoten mit Wassertemperaturen von bis zu 9°C (Bergstad et al. 1987; Godo und Michalsen 2000; Dippner und Ottersen 2001).

### Fragestellung

Der Einfluss der Temperatur auf zelluläre Stoffwechselraten sollte an verschiedenen Populationen von *Gadus morhua* in Abhängigkeit vom Grad ihrer Eurythermie untersucht werden. Dazu wurde in der vorliegenden Arbeit der Sauerstoffverbrauch isolierter Hepatozyten aus Kabeljau der Nordsee und der Barentssee bestimmt.

Neben dem Einfluss der Temperatur auf die Zellrespiration sollte auch die Temperaturabhängigkeit der mitochondrialen Prozesse *in situ* (in der Zelle) bestimmt werden. Hierzu wurden mit Hilfe von Inhibitoren verschiedene Einzelprozesse, die an der Gesamtrespiration der Zellen beteiligt sind, quantitativ bestimmt. Eingesetzt wurde zum einen Kaliumcyanid (KCN), das als Inhibitor der Cytochrom c-Oxidase den mitochondrialen Sauerstoffverbrauch hemmt und zum anderen Oligomycin, das die  $F_0/F_1$ -ATPase, und damit den Sauerstoffverbrauchs durch die ATP-Synthese hemmt (Slater 1950) (siehe Abbildung 1.4). Für eine genauere Betrachtung der Interaktion von Oligomycin mit der  $F_0/F_1$ -ATP-Synthase siehe Devenish et al. (2000) und im Material & Methoden Teil Kapitel 2.5. Die Untersuchung erfolgte an Leberzellen (Hepatozyten). Die Leber ist ein sehr stoffwechselaktives Organ, das an vielen metabolischen und physiologischen Abläufen beteiligt ist und eine Schlüsselrolle in der Erhaltung des inneren Gleichgewichts (Homöostase) übernimmt. Sie stellt den Glucosespeicher des Körpers dar und hat eine zentrale Rolle im Stickstoff- und Proteinstoffwechsel. Daher eignet sie sich gut als Modell zum Studium von Mechanismen und Prozessen, die von einer Akklimation bzw. Adaption an verschiedene Umweltbedingungen betroffen sind.

In vorangegangenen Arbeiten ging man außerhalb von Kulturbedingungen von einem Tod der Zellsuspension, gemessen am Verhältnis von intakten zu beschädigten Zellen (Viabilität), nach 4 – 6 Stunden aus (Berry et al. 1997).

Unter den hier beschriebenen Aspekten ergaben sich die Fragestellungen dieser Arbeit:

- Lässt sich die Viabilität isolierter Zellen über 24 Stunden in einem für Messungen geeigneten Rahmen halten?
- Bewirkt eine Kälteinkubation Änderungen im zellulären Stoffwechsel und in der Enzymaktivität der Citratsynthase?
- Ergeben sich Unterschiede während einer akuten Temperaturänderung auf den Stoffwechsel der Zelle in Abhängigkeit vom Grad der Eurythermie?
- Wie beeinflusst die Temperatur den zellulären Energiehaushalt in Hinblick auf den Anteil mitochondrialer Prozesse an der Zellatmung?
- Hat der Grad der Eurythermie Einfluss auf den Standardstoffwechsel des Ganztieres? Und korreliert dieses mit dem Sauerstoffverbrauch auf Zellebene?

## 2 Material und Methoden

### 2.1 VERSUCHSTIERE UND IHRE HÄLTERUNG

Für die Versuche wurde Kabeljau (*Gadus morhua*) aus unterschiedlichen Habitaten, Nordsee und Barentssee, verwendet. Exemplare der zunächst untersuchten nordost-arktischen Population (North-Eastern Arctic Cod, NEAC) stammten aus der F1-Generation der Fischzucht-Abteilung *Fiskeriforskning* des *Norwegian Institute of Fisheries and Aquaculture Research* in Tromsø, Norwegen. Die Tiere wurden dort bei 10°C aufgezogen (persönliche Mitteilung B. Klein) und befanden sich seit Dezember 2005 in der Aquariumsanlage des Alfred-Wegener-Instituts (AWI). Der anschließend untersuchte Nordseekabeljau (North Sea Cod, NSC<sub>I</sub> und NSC<sub>II</sub>) wurde vor Helgoland entweder mittels Reusen oder durch das Forschungsschiff Uthörn in der Tiefen Rinne gefangen. Die Unterteilung in NSC<sub>I</sub> und NSC<sub>II</sub> ergab sich durch die unterschiedlichen Fangzeiten: NSC<sub>I</sub> wurde im Juli 2006 und NSC<sub>II</sub> erst im Laufe der vorliegenden Arbeit, im April 2007, gefangen.

Beide Populationen wurden bei einer Wassertemperatur von 10°C ± 1°C gehalten und zweimal wöchentlich im Wechsel mit gefrorener Nordseekrabbe (*Crangon crangon*) und Miesmuschelfleisch (*Mytilus edulis*) (Firma Erdmann, Ritterhude) gefüttert, wobei die Futtermenge 10% des Fischgewichtes entsprach. Der Tag/Nacht-Rhythmus betrug 12/12 Stunden und die Wasserwerte für pH, Salinität, Nitrit und Ammonium wurden zweimal wöchentlich kontrolliert, und bei Bedarf erfolgte ein Wasserwechsel.

15 Tiere der arktischen Population wurden in einem großen Becken (3 m<sup>3</sup>) in Kreislauf 2 (Gebäude A) gehalten. Das Hälterungsbecken war an das mit Nordseewasser gespeiste Kreislaufsystem des Instituts angeschlossen, in dem durch Proteinabschäumer und biologische Rieselfilter eine gute Wasserqualität gewährleistet wird. Zudem war ein zusätzlicher Filter (Teich-Außenfilter, Fa. EHEIM GmbH & Co. KG) an das Becken angeschlossen. Im Laufe des Versuchs wurde die Fütterung auf einmal pro Woche reduziert, um die Fetteinlagerung in der Leber der Versuchstiere für eine verbesserte Zellisolierung zu verringern.

Der Nordseekabeljau NSC<sub>I</sub> wurde zunächst in einem anderen Kreislauf (Gebäude D) des AWIs gehältert. Die Hälterung fand hier in kleineren Tanks (1 m<sup>3</sup>) in Gruppen von 1 – 5 Tieren statt. Der Kreislauf war mit Proteinabschäumern und Wasserfiltern versehen. Zwei Wochen vor Versuchsbeginn wurden die Fische in das oben erwähnte, inzwischen freie Hälterungsbecken transferiert. NSC<sub>II</sub> wurde nach seiner Ankunft im AWI in dem Aquariensystem Gebäude A gehalten.



### 2.2 KÖRPERINDIZES

Die Berechnungen sogenannter Körperindizes geben einen Anhaltspunkt für die Fitness und den physiologischen Zustand der Tiere. Die Formeln zur Berechnung von Konditionsfaktor (K) und hepatosomatischem Index (HSI) wurden der Arbeit von Lambert und Dutil (1997a) entnommen. Die Berechnung des gonadosomatischen Index (GSI) wurde aus der Formel für den HSI abgeleitet.

Der Konditionsfaktor K ist ein Maß für die Fitness und berechnet sich nach der Fulton'schen Formel aus Gewicht und Länge eines Tieres:

$$K = \frac{\text{Tiergewicht}}{\text{Länge}^3} \cdot 100$$

Mit

K = Konditionsfaktor [g/cm<sup>3</sup>]

Tiergewicht = Frischgewicht des Tieres ohne Mageninhalt [g]

Länge = totale Länge des Tieres [cm]

Der hepatosomatische Index (HSI) gibt Aufschluss über den Ernährungszustand sowie über die Energiereserven eines Tieres:

$$\text{HSI} = \frac{\text{Lebergewicht}}{\text{Tiergewicht}} \cdot 100$$

Mit

HSI = Hepatosomatischer Index

Lebergewicht = Frischgewicht der Leber [g]

Tiergewicht = Frischgewicht des Tieres ohne Mageninhalt [g]

Über den gonadosomatischen Index (GSI) kann die Geschlechtsreife eines Tieres eingeschätzt werden:

$$\text{GSI} = \frac{\text{Gonadengewicht}}{\text{Tiergewicht}} \cdot 100$$

Mit

GSI = Gonadosomatischer Index

Gonadengewicht = Frischgewicht der Gonaden [g]

Tiergewicht = Frischgewicht des Tieres ohne Mageninhalt [g]

Bei geschlechtsreifen Tieren verhalten sich GSI und HSI gegenläufig, da die angereicherten Energiereserven in der Leber zu Beginn der Reproduktionsphase für den Aufbau der Gonaden herangezogen werden (Schwalme und Chouinard 1999).

### 2.3 MESSUNG DER GANZTIERRESPIRATION

In diesem Experiment wurde der Standardstoffwechsel (Standard Metabolic Rate, SMR) der Tiere über  $\text{MO}_2$ -Messungen bestimmt. SMR ist ein Maß für die Energiekosten und definiert sich als die Stoffwechselrate im postbrandialen (nüchterner) Zustand unter Ruhebedingung (Helfman et al. 1997).

#### **Versuchsaufbau**

Der Versuchsaufbau bestand aus drei mit Wasser gefüllten Becken (Volumen ~135 L pro Becken), die über U-Rohre zu einem System verbunden waren (Abbildung 2.1 A&C). Der Aufbau erlaubte einen Wasserwechsel (über Becken 3) während des Versuches ohne eine Störung der Tiere, die sich in den Becken 1 und 2 befanden. Über einen angeschlossenen Filter (Teich-Außenfilter, EHEIM GmbH & Co. KG), der zudem der Reinigung des Wassers diente, wurde ein Kreislauf erzeugt. Kühlschläuche, die an ein regulierbares Kühlaggregat (PK 20 KS, Fa. LAUDA DR. R. Wobser GmbH & Co. KG, Germany) angeschlossen und durch die U-Rohre in die Becken verlegt wurden, sorgten für eine konstante Temperierung ( $10^\circ\text{C} \pm 0,5^\circ\text{C}$ ) des Wassers, welches über Sprudelsteine mit Raumluft bzw. Druckluft begast wurde. Zur Abdunkelung und zur Wärmeisolierung wurden die Becken mit Schaumstoffplatten abgedeckt.

Die Wasserqualität im Versuchsaufbau während der Versuchsdauer (ca. 4 – 7 Tage) wurde mittels photometrischer Schnelltests für Ammonium und Nitrit (Nanocolor<sup>®</sup>-Test, Mache-



Eine Peristaltikpumpe (MCP Standard, ISMATEC GmbH) beförderte unter Erzeugung eines gleichmäßigen Wasserstroms das 100% luftgesättigte Wasser aus dem Becken durch die Respirationskammer. Der Fluss durch die Messkammer wurde mittels einer Stoppuhr und Messzylinder regelmäßig kontrolliert und so eingestellt, dass ca. 20% des verfügbaren Sauerstoffs veratmet wurde. Je nach Fischgröße variierte die Flussrate zwischen 150 und 600 ml/min. Der Sauerstoffgehalt des ausfließenden Wassers wurde über eine Sauerstoff-Microoptode (needle type, TX2-Typ, PreSens GmbH, Germany) gemessen (im Folgendem auch als Kammeroptode bezeichnet), die am Ausgang der Kammer über ein Y-Stück in den Kreislauf eingebracht war. Eine zweite Optode maß als Referenzoptode den Sauerstoffgehalt im Becken. Beide Optoden waren über TX-Geräte (Microx TX2, PreSens GmbH, Germany) und einem HUB-Port mit einem Computer verbunden, der die Messwerte kontinuierlich alle 5 Minuten aufzeichnete (Software: TX2 OXYVIEW V4.02, PreSens Germany).

Vorversuche ergaben, dass unter den genannten Bedingungen der Anteil einer bakteriellen Atmung auf die Respirationsmessungen ausgeschlossen werden kann. Vor Beginn der Messung wurden möglichst alle Luftblasen aus der Respirationskammer entfernt, da diese sonst die Messung des Sauerstoffgehalts im ausströmenden Kammerwasser beeinflusst hätten. Die Fütterung der Versuchstiere wurde eine Woche vor Versuchsbeginn eingestellt (Fischer 2002), um sicherzustellen, dass die gemessene Stoffwechselrate nicht durch Verdauungsprozesse beeinflusst wurde. In der Literatur hatte sich gezeigt, dass bei 8 – 12°C nach 6 Tagen ohne Futter der Sauerstoffverbrauch von *Gadus morhua* einen stabilen Wert erreicht und nur noch der basale Stoffwechsel gemessen wird (Lyndon et al. 1992). Geringe Aktivitätseinflüsse konnten allerdings nicht ausgeschlossen werden, da die Fische in den Kammern eine gewisse Bewegungsfreiheit besaßen. Vor dem Einbringen des Tieres in die Versuchskammer wurde dieses mit 0,08 g/L MS 222 (3-Aminobenzoesäureethylester) leicht betäubt, um den Stress zu minimieren. Danach wurden Gewicht und Länge der Versuchstiere bestimmt, der Fisch in die Kammer eingebracht, diese luftfrei verschlossen und die Messung gestartet.

Die meiste Zeit über wurden zwei Fische parallel im selben Versuchsaufbau gemessen, wobei sich jeweils ein Tier in Tank 1 und 2 befand. Tank 3 wurde für etwaige Wasserwechsel genutzt.

### **Funktionsweise der Sauerstoff-Microoptode**

Optische Sauerstoffsensoren werden als Optoden bezeichnet und messen den Gehalt an Sauerstoff im Medium. In Optoden interagiert ein Analyt mit einem Indikator und verändert so dessen optische Eigenschaften. Der Indikator wird über eine optische Faser angeleuchtet, die Fluoreszenz wird durch die „Quenching“-Eigenschaften des Sauerstoffs verändert. Eine Analyse erfolgte mittels verschiedener Parameter (wie z.B. Intensität, Polarität etc.) des zurückgestrahlten Lichts. Die Verwendung von Sauerstoffoptoden bietet den Vorteil, dass sie keinen Sauerstoff verbrauchen und unabhängig sind von der Flussgeschwindigkeit des Mediums (Klimant et al. 1995).

Die in allen Versuchen verwendeten Optoden wurden vor ihrem Gebrauch geeicht. Dies erfolgte mittels einer 2-Punkt-Kalibrierung in 100% Luft gesättigtem Seewasser und sauerstofffreier, gesättigter Natriumdisulfid-Lösung (= 0% Sauerstoff). Beide Lösungen waren auf die Temperatur im Versuchsaufbau temperiert.

### **Berechnung des Sauerstoffverbrauchs**

Für die Bestimmung des Sauerstoffverbrauchs wurden nur die Daten ab Messtag 2 – 3 (etwa 40 Stunden nach Versuchsbeginn) herangezogen, da sich die Tiere zu diesem Zeitpunkt vom Behandlungsstress durch das Einsetzen in die Kammer erholt hatten und die Einstellung der adäquaten Flussrate abgeschlossen war. Zudem wurden nur Daten verwendet, die in Phasen minimalen Sauerstoffverbrauchs gemessen wurden, da diese den Ruhestoffwechsel widerspiegeln.

Die von der Referenzoptode aufgezeichneten Schwankungen in den O<sub>2</sub>-Sättigungsraten (100% ± 10%) des Umgebungswassers, wurden bei der Auswertung berücksichtigt. Zudem erfolgte nach Beendigung des Versuchs (Herausnahme des Tieres) noch eine Aufzeichnungsphase mit leerer Respirationskammer, um eine eventuell aufgetretene Drift der Kammeroptode mit einbeziehen zu können.

## Material & Methoden

---

Für die Berechnung des Sauerstoffverbrauchs war die Berechnung des Sauerstoffpartialdrucks des Wassers nötig und erfolgte wie in Müller (2004) beschrieben.

$$P_{O_2} = (P_b - P_{H_2O}) \cdot 0,209$$

Mit

$P_{O_2}$  = Sauerstoffpartialdruck des Wassers [Torr]

$P_b$  = Luftdruck Bremerhavens im Tagesmittel [Torr]

$P_{H_2O}$  = Wasserdampfdruck [Torr]

0,209 = fraktioneller Anteil von Sauerstoff an trockener Luft

Der aktuelle Luftdruck für Bremerhaven wurde jeden Tag von [www.wetteronline.de](http://www.wetteronline.de) übernommen.

Für die Berechnung des spezifischen Sauerstoffverbrauchs bezogen auf das individuelle Tiergewicht wurde nach Ultsch et al. (1980) verfahren:

$$MO_2 = \Delta O_2 \cdot \left( \frac{PO_2}{100} \right) \cdot \beta O_2 \cdot Fl$$

Mit

$MO_2$  = spezifischer Sauerstoffverbrauch pro Tier [ $\mu\text{mol O}_2/\text{h}$ ]

$\Delta O_2$  = Differenz Sauerstoffgehalt im ein- und ausfließenden Wasser [%]

$PO_2$  = Sauerstoffpartialdruck des Wassers [Torr] für 100% luftgesättigtes Wasser

$\beta O_2$  = Sauerstoffkapazität von Seewasser [ $\mu\text{mol O}_2/\text{L}\cdot\text{Torr}$ ] aus Dejours (1975)

$Fl$  = Flussrate [L/h]

Aufgrund der Allometrie des Energiehaushalts bzw. der Abnahme des spezifischen Sauerstoffverbrauchs mit zunehmender Körpermasse (Heldmaier und Neuweiler 2004) wurde der Sauerstoffverbrauch auf 1 kg Tiergewicht normiert:

$$\text{norm } MO_2 = \left( \frac{MO_2}{TG} \cdot 1000 \right)^b$$

Mit

$\text{norm } MO_2$  =  $MO_2$  normiert auf ein Tier mit Masse 1000 g [ $\mu\text{mol O}_2/(1\text{kg}\cdot\text{h})$ ]

$MO_2$  = spezifischer Sauerstoffverbrauch pro Tier [ $\mu\text{mol O}_2/\text{h}$ ]

$TG$  = Frischgewicht des gemessenen Tieres [g]

$b$  = Steigung der doppelt logarithmischen Regressionsgeraden von  $MO_2$  zu  $TG$

Der für Fische allgemein geltende Wert mit  $b = 0,8$  (Clarke und Johnston 1999) wurde für die Normierung übernommen.

Die Normierung des Tiergewichts auf 1 kg wurde gewählt, da es sich dabei um den in der Literatur gebräuchlichen Wert handelt.

### 2.4 PRÄPARATION DER LEBERZELLEN

Die in den folgenden Versuchen verwendeten Chemikalien wurden, wenn nicht anders angegeben, über Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Germany bezogen.

Die Präparation der primären Leberzellen wurde nach einem veränderten Protokoll von Mommsen et al. (1994) durchgeführt. Die Autoren stellten zwei alternative Isolationsprotokolle vor. Zum einen kann die Leber *in situ*, d.h. noch im Tier, behandelt werden, zum anderen erfolgen Perfusion und Verdauung des Organs *in vitro*, also außerhalb des Tieres. In dieser Arbeit wurde das *in vitro*-Protokoll angewendet (siehe Mark et al. 2005).

### Chemikalien und Lösungen

Lösung 1 (Hanks Medium ohne Mg)

**Tabelle 2.1** Salze in 1 Liter Hanks Medium

Chemikalien	Mr (g/mol)	Einwaage g/L
5,6 mM Glucose	180,2	1,0091
5 mM KCl	74,56	0,3728
4 mM NaHCO <sub>3</sub>	84,01	0,33604
0,3 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (Anhydrid)	142,0	0,0426
240 mM NaCl	58,44	14,0256
0,4 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	136,09	0,054436
10 mM HEPES	260,3	2,603

pH bei 20°C mit HCl auf 7,4 eingestellt

Lösung 1 wurde in Portionen à 100 ml eingefroren und am Tag vor der Präparation über Nacht im Kühlschrank bei 4°C aufgetaut. Am Tag der Präparation wurde die Lösung sterilfiltriert (0,2 µm Minisart<sup>®</sup> plus, Sartorius AG, Germany), in 2 Teile aufgeteilt und mit der einen Hälfte Lösung 2 angesetzt.

### Lösung 2 (Inkubationslösung)

Lösung 1 + 1% BSA (1 g/100 ml) (Albumin, Bovine 98%)

BSA im Medium erhöht die Viabilität der Zellen (Pannevis und Houlihan 1992). Aufgrund des Zerfalls von BSA mit der Zeit muss die Lösung am Tag der Verwendung frisch angesetzt werden.

### Lösung 3 (Präparationslösung)

Lösung 2 + 750 U/ml Collagenase Typ 1A

### Lösung 4 (Zellmedium)

Lösung 2

+ 5 mM Glucose (Stocklösung 500 mM)

+ 2 mM MgSO<sub>4</sub> (Stocklösung 2 M)

Es wurden jeweils Stocklösungen in deionisiertem Wasser angesetzt und nach Sterilfiltration in kleineren Volumen eingefroren (-20°C), die bei Gebrauch aufgetaut und danach im Kühlschrank (4°C) gelagert wurden.

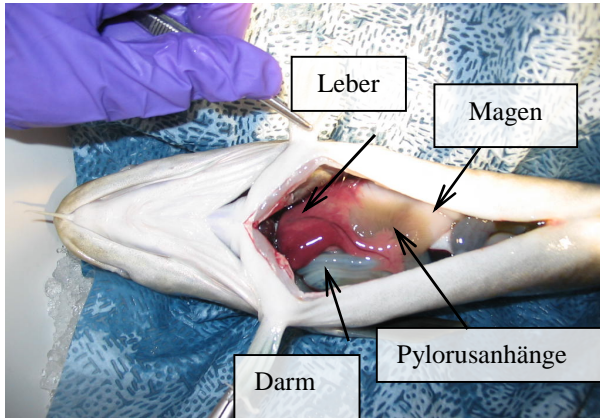
Alle Lösungen wurden während des Versuchs auf Eis gelagert.

### **Präparationsprotokoll**

Vor Beginn der Präparation wurden alle Glasgefäße autoklaviert sowie das Präparierbesteck mit 70%igem Ethanol sterilisiert. Die in 70%igem Ethanol gelagerte Gaze wurde an der Luft getrocknet.

Der Fisch wurde mit MS 222 in einer Dosis von 0,08 g/L Seewasser betäubt. Länge und Gewicht des Tieres wurden bestimmt. Das Tier wurde auf Eis gelegt, und die Tötung erfolgte mittels Durchtrennen des Rückenmarks. Danach wurde der Fisch mit einer Schere von der Afteröffnung her in Richtung Kopf aufgeschnitten, ohne dabei die inneren Organe zu verletzen (Abb. 2.2). Die Leber wurde möglichst schnell entnommen (max. 2 Minuten), wobei als letztes die Pfortader (*Vena cava*) durchtrennt wurde, da diese die Hauptversorgung der Leber mit Blut gewährleistet. Die Leber wurde in eine Glaspetrischale (auf Eis) mit Lösung 1 gelegt und das Lebergewicht notiert. Im Laufe der Zellpräparation (siehe folgenden Abschnitt) wurden die weiteren Organe des Fisches entnommen und gewogen (Magen [voll und leer], Gonaden, Herz [Ventrikel + Sinus]), sowie das Schlachtgewicht (Tierkörper ohne Organe) und das Geschlecht bestimmt.



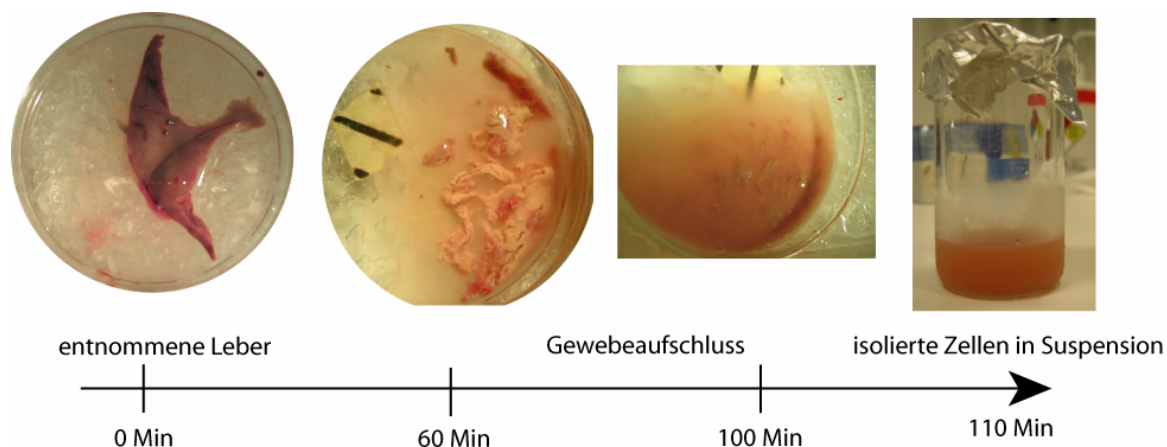


**Abb. 2.2** Präparation eines Kabeljau mit offen gelegten Organen. Nicht zu sehen: Gallenblase, Milz, Niere und Herz.

Alle im nachfolgenden Abschnitt beschriebenen Präparationsschritte wurden auf Eis ausgeführt. Mit einer Spritze mit steriler Einmalkanüle (0,9 x 40 mm) wurde Lösung 1 in die Pfortader und andere Blutgefäße gespritzt, wodurch das Blut herausgewaschen und dadurch Messartefakte durch die Stoffwechselaktivitäten der Erythrozyten minimiert wurden. Dieser Vorgang wurde wiederholt, bis die Leber möglichst blutleer (hell) war.

Für den anschließenden Gewebeaufschluss mittels Collagenase wurde die gewaschene Leber in eine zweite Glaspetrischale mit Lösung 3 (2 ml pro Gramm Leber) überführt. Collagenase wirkt durch enzymatische Zersetzung des Bindegewebsbestandteils Collagen, wodurch sich der Zusammenhalt der Zellen mit der Zeit auflöst. Um eine gute Oxygenierung während des Aufschlussprozesses, der bis zu 100 min dauern kann (Abb. 2.3), zu gewährleisten, wurde auf ein ausreichend hohes Oberflächen-Volumen-Verhältnis geachtet (Lösung nicht höher als 1 cm in der Petrischale während des Gewebeaufschlusses (Krebs et al. 1974)). Mit einer Spritze wurde die collagenasehaltige Lösung 3 mehrmals über die *Vena cava* in die Leber gespritzt, und die Leber wurde mit Hilfe einer abgeschnittenen Pasteurpipette „massiert“. Dieses erfolgte durch mehrmaliges Spritzen der Lösung auf die Leber, wodurch sich eine bessere Verteilung der Collagenase über die Leber ergab. Die zerstörte Bindegewebshülle wurde mit zwei feinen Pinzetten entfernt und eine weitere Massage erfolgte. Obwohl die Collagenase zwar den Zusammenhalt der Zellen löst, hängen diese noch an den gap und tight junctions zusammen. Um zu verhindern, dass die Zellen auseinanderreißen und einen Teil ihrer Membran dabei verlieren, verlief der Trennungsprozess in einzelne Zellen durch sanftes Schütteln auf Eis, wobei immer wieder massiert und weiteres Bindegewebe und Blutgefäße entfernt wurden (Howard et al. 1973) (Schüttler: IKA Labortechnik KS 501; 50 Drehungen pro Minute). Konnte das komplette

Zellhomogenat mit der Pasteurpipette aufgenommen werden, wurde es durch eine 250  $\mu\text{m}$  Gaze im Glasrichter in ein Becherglas filtriert.



**Abb. 2.3** Zeitlicher Ablauf der Zellpräparation durch enzymatischen Gewebeaufschluss mittels Collagenase.

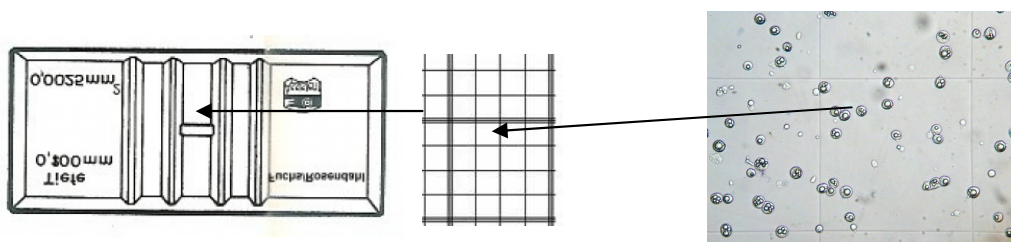
Die Zellsuspension wurde auf sterile Eppis verteilt und bei 100 x g, 0°C, 4 Minuten lang zentrifugiert (Eppendorf Zentrifuge 5810 R). Durch die langsame Zentrifugation erfolgte eine Pelletierung der intakten Zellen, wobei jedoch zum einen eine mechanische Belastung der intakten Zellen und zum anderen eine Pelletierung beschädigter Zellen und Zellbruchstücke vermieden wurde (Howard et al. 1973). Nach der Zentrifugation konnte mit einer Pipette zuerst das Fett, das sich an der Oberfläche abgesetzt hatte, entfernt und dann der restliche Überstand abgenommen werden. Das gewonnene Zellpellet wurde in Lösung 2 resuspendiert, und es erfolgte eine erneute Zentrifugation bei 100 x g, 0°C für 2 Minuten. Der Überstand wurde wieder abgenommen, das Pellet mit Lösung 2 resuspendiert und erneut zentrifugiert. Dieser Waschschrift (Auswaschen der Collagenase) wurde wiederholt, bis der Überstand klar war, wobei die Pellets zunehmend vereinigt wurden. Während des Waschens wurde jeweils ein Teil der abzentrifugierten Erythrozyten, die als rotes Pellet unterhalb des Zellpellets zu erkennen waren, abgenommen, möglichst ohne dabei an Leberzellen zu verlieren. Die Zellen wurden unabhängig von der Lebergröße schließlich in 5 ml Lösung 4 aufgenommen und zur Erholung für etwa eine Stunde auf Eis sanft geschüttelt. Die Präparation stellte für die Zelle einen Stressfaktor dar, und es traten leichte mechanische und chemische Schädigungen der Membranstruktur auf („Blebbing“ der Zellmembran). Nach der einstündigen Ruhe wurden diese Abschnürungen (Blebs) der Membran nicht mehr beobachtet, d.h. eine Regeneration der Zellen war eingetreten.

Fische speichern ihre Fettreserven hauptsächlich in der Leber (*G. morhua*: 25% Leberlipid zu 1% Lipid in der weißen Muskulatur (Lambert und Dutil 1997a), weshalb diese bis zu etwa 35 - 70% aus Fett bestehen kann (Holdway und Beamish 1984), und es wurden vor allem zu Beginn der Versuchsreihe häufig Fettlebern festgestellt. Von einer Fettleber wird in dieser Arbeit ab einem hepatosomatischen Index (HSI) = 1 (siehe Kap. 2.6) gesprochen. Bei einer Fettleber ist die Isolierung von Zellen erschwert bzw. unmöglich. Die Zellen sind in solchen Fällen mit gespeichertem Fett gefüllt und erhalten dadurch Auftrieb (Mommsen et al. 1994), wodurch das Abzentrifugieren erschwert wird. Eine Trennung von Zellen, Collagenase-Lösung und Zellresten ist dann nur durch Anpassung der Zentrifugationsschritte möglich. Die Zentrifugation erfolgte in solchen Fällen bei 200 x g für 5 Minuten im ersten Waschschrift und für die weiteren Schritte bei 200 x g für 3 Minuten. Die Temperatur betrug weiterhin 0°C. Der Überstand aus dem ersten Waschschrift wurde ein weiteres Mal zentrifugiert, da sich hierin immer noch Leberzellen befanden. Mit diesen Änderungen ließen sich Zellen isolieren, die Ausbeute war aber um ein Vielfaches geringer als bei einer Leber mit HSI < 1. Um diesem bekannten Problem entgegenzuwirken, wurde die Fütterung der Versuchsfische reduziert, so dass die Fettspeicher der Leber verringert wurden.

Die Zellqualität und die Konzentration (Zellzahl pro ml) wurden mit der Trypan Blau-Färbung (Howard und Pesch 1968; Pfaff et al. 1980) überprüft, da dieser Farbstoff infolge erhöhter Membranpermeabilität bei beschädigten Zellen das Cytoplasma anfärbt (Sandström 1965). Dazu wurden 10 µl Trypan Blau (Trypan Blue Solution 0,4%), 10 µl Zellsuspension und 40 µl Lösung 2 gemischt (1:6 Verdünnung).

Eine Fuchs-Rosenthal-Kammer (0,2 mm Tiefe) wurde mit Lösung 2 angefeuchtet, das Deckglaschen angedrückt und die Zellverdünnung über Kapillarkräfte unter das Deckglas gegeben (Abb. 2.4).

Fünf zufällig ausgewählte Quadrate wurden unter dem Mikroskop ausgezählt, wobei intakte Zellen und blau gefärbte, beschädigte Zellen getrennt voneinander gezählt wurden.



**Abb. 2.4** Darstellung einer Fuchs-Rosenthal-Zählkammer mit Hepatozyten.  
Verändert nach <http://retro.mta-labor.info/> und <http://wesomed.de>

Die Zellzahl (intakter bzw. beschädigter Zellen) berechnete sich wie folgt:

$$\begin{aligned} \text{Zellanzahl N} &= \frac{\text{Summe}_{\text{Zellen aus a Quadraten}} \cdot \text{Verdünnungsfaktor}}{0,25^2 \cdot 0,2 \cdot a} \cdot 1000 \cdot \text{ml}^{-1} \\ &= \frac{\text{Summe}_{\text{aus 5 Quadraten}} \cdot 6}{0,0625} \cdot 1000 \cdot \text{ml}^{-1} \end{aligned}$$

Kästchenfläche    Tiefe    ausgezählte Kästchen

Ein guter Wert, d.h. eine Zelldichte, bei der zum einen eine ausreichende Versorgung der Zellen mit Substrat und Sauerstoff gewährleistet ist und zum anderen eine messbare Respiration besteht, liegt bei 3 – 4 Millionen Zellen/ml. Bei höheren Dichten wurde deshalb die Suspension mit Lösung 4 verdünnt. Der Anteil der Erythrozyten lag immer unter 10%. Bei der Lagerung musste beachtet werden, dass die Zellsuspension nicht höher als 2 cm im Gefäß stand (Krebs et al. 1974), um eine gute Oxygenierung aller Zellen zu gewährleisten. Die Lagerung der Zellen erfolgte im 0°C-Raum auf Eis und auf dem Schüttler (KS 501, IKA® Werke GmbH & Co KG) bei 60 Mot/min. Lösung 4 wurde offen mitgeschüttelt, um eine gute Oxygenierung zu gewährleisten. Für eine gute Versorgung mit Glucose während der anschließenden Lagerung über Nacht wurden die Zellen zuvor erneut abzentrifugiert (100 x g, 0°C, 2 min) und in Lösung 4 aufgenommen. Am nächsten Tag wurde frische Lösung 2 und 4 angesetzt, die Zellen erneut abzentrifugiert (100 x g, 0°C, 2 min) und in der frischen Lösung 4 aufgenommen. Die Lagerung der Zellen während der Messungen erfolgte wie oben beschrieben.

### **Zeiteffekt auf die Anzahl intakter Zellen und Viabilität**

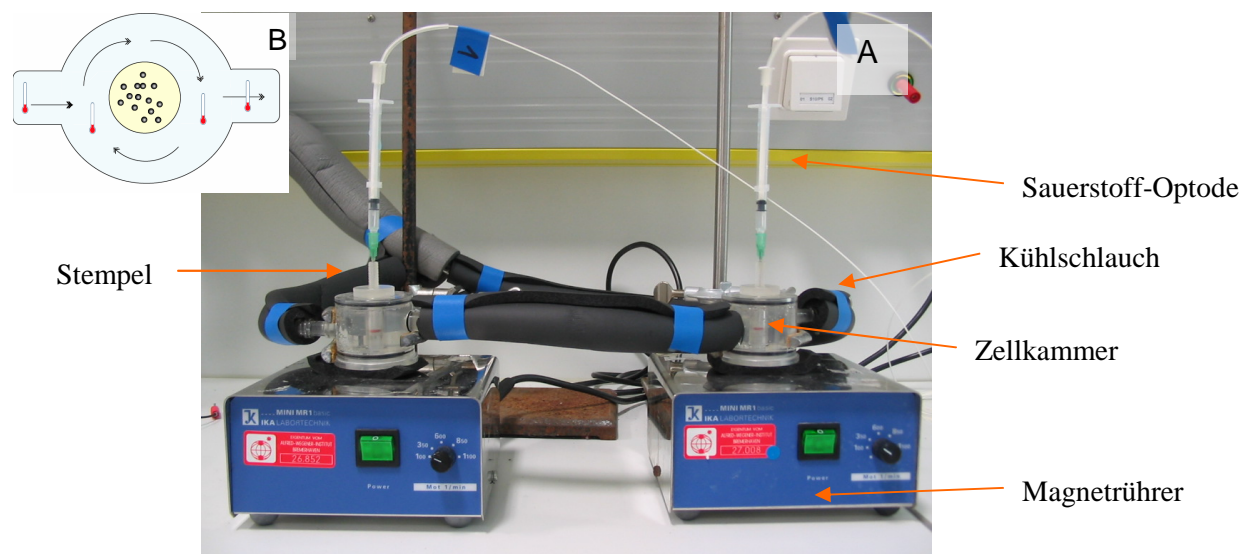
Um einen etwaigen Zeiteffekt auf die Quantität und Qualität der isolierten Leberzellen festhalten zu können, wurde die Anzahl der Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten bestimmt. Die Zählung ging in die spätere MO<sub>2</sub>-Berechnung ein. Die erste Zählung erfolgte am Isolierungstag nach der einstündigen Erholungsphase (Zeitpunkt 0 h). An Tag 2 folgten weitere Zählungen mit leichten Zeitverschiebungen, weswegen die Daten für die spätere Auswertung gemittelt wurden. Zählungen am Vormittag wurden unter den Zeitpunkt 18 h und die Zählungen am Nachmittag unter 28 h zusammengefasst. Für eine Standardisierung wurden die realen Werte in Prozent umgerechnet. Hierfür wurde die Anzahl an intakten Zellen zu Stunde 0 als 100% festgelegt, die Änderung in den folgenden Zählungen wurde

als prozentuale Abnahme von diesen 100% berechnet. Die Viabilität ist definiert als der prozentuale Anteil intakter Zellen an der Gesamtzellanzahl (intakte + beschädigte Zellen).

### 2.5 RESPIRATION VON HEPATOZYTEN

#### **Messung**

Die Messung fand nach einem Protokoll von Mark et al. (2005) im geschlossenen System statt, wonach kein Sauerstoff von außen zugeführt wird, sondern dieser durch den Verbrauch der Zellen im Medium stetig abnimmt. Die Aufzeichnung dieser Abnahme erfolgte kontinuierlich in Schritten von einer Minute mittels einer Sauerstoff-Optode (needle type, TX2-Typ, PreSens GmbH, Germany), die an ein TX-Gerät (Microx TX2, PreSens GmbH, Germany) angeschlossen war. Letzteres war wiederum mit einem PC verbunden, an dem die Aufzeichnung mit TX2 Oxyview V4.02 (PreSens Germany) erfolgte. Die Eichung wurde für jede Messtemperatur mittels Zweipunktkalibrierung in 100% luftgesättigter (= 100% Eichung) bzw. mit natriumdisulfidgesättigter (= 0% Eichung) Lösung 1 durchgeführt. Aus zeitlichen Gründen wurde die Kalibrierung nicht am Messtag vorgenommen, sondern die notierten Kalibrierungswerte wurden bei der entsprechenden Messtemperatur manuell in das Messprogramm eingegeben. In Abbildung 2.5 ist der Versuchsaufbau für die Zellrespirationsmessungen abgebildet. Jede Respirationkammer (Ranks Brothers, Cambridge, UK) steht auf einem Magnetrührer (RET basic IKAMAG safety control, IKA<sup>®</sup> Werke GmbH & Co KG), und über ein angeschlossenes Thermostat (FP 30, JULABO Labortechnik GmbH, Germany) konnten die verschiedenen Messtemperaturen mit einer Genauigkeit von  $\pm 0,1^{\circ}\text{C}$  eingestellt werden. Die Kammern konnten durch einen drehbaren Stempel mit einer schmalen Öffnung für die Messoptode bzw. für die Zugabe der verschiedenen Inhibitoren luftdicht verschlossen und auf ein Messvolumen zwischen 300 und 1500  $\mu\text{l}$  eingestellt werden. Eine Homogenität der Suspension wurde durch einen Rührfisch am Boden der Kammer ermöglicht (350 Mot/min).



**Abb. 2.5** Versuchsaufbau zur Messung des zellulären Sauerstoffverbrauchs. A) Aufbau mit 2 Respirationskammern, stehend auf Magnetrührern, angeschlossen über Kühlschläuche an 1 Thermostat. Kammern sind mit „Stempeln“ verschlossen, durch die Sauerstoffoptoden in die Kammern eingeführt wurden (s. Bild). Die Optoden sind über TX2-Geräte direkt mit einem PC verbunden. Die Zugabe des Inhibitors erfolgte ebenfalls durch die Öffnung im „Stempel“. B) Schematische Darstellung der Respirationskammer. Die Hepatozyten (blaue Kreise) im Kammerinneren werden von außen mit Kühlflüssigkeit umspült und so temperiert.

Vor der jeweiligen Messung pro Temperatur wurde 1 ml Zellsuspension aus der gelagerten Stocksuspension mit der eingestellten Konzentration von 3 – 4 Millionen Zellen pro ml abgenommen und zentrifugiert (100 x g, 0°C, 2 min). Die Hälfte des Überstandes wurde durch frische Lösung 4 ersetzt, um den Sauerstoff- und Glucosegehalt im Medium für die Messung anzureichern. Danach wurden 200 – 500 µl dieser Zellsuspension in die temperierte Respirationskammer gegeben. Das Messvolumen richtete sich nach dem Gesamtvolumen der Zellsuspension (entspricht der Ausbeute der Isolation), welches von Größe und Fettgehalt der Leber abhing. Die Suspension wurde etwa 5 Minuten in der Kammer belassen um zu temperieren, bevor diese mit dem Stempel verschlossen wurde. Hierbei wurde sichergestellt, dass sich keine Luftblasen in der Kammer befanden. Die Optode wurde durch den Stempel in die Kammer eingeführt und die Messung gestartet. Nach Aufzeichnung eines linearen Verlaufs in der Sauerstoffabnahme (ca. 30 Minuten), wurde die Optode entfernt und mit Hilfe von verschiedenen Hamiltonspritzen der jeweilige Inhibitor zugegeben, wobei der Zeitpunkt der Inhibitorzugabe notiert wurde. Die Sauerstoffabnahme wurde für weitere 30 Minuten aufgezeichnet. Nach Beendigung der Messung wurden die Kammern, Stempel und Rührfische mit 70%igem Ethanol und deionisiertem Wasser gereinigt.

Das Thermostat wurde auf die nächstgewünschte Messtemperatur in der Kammer hochgefahren.

Es wurde bei folgenden Temperaturen gemessen: 1, 3, 5, 7, 9, 15°C und 23°C (Raumtemperatur). Für jede Temperatur fanden zwei parallele Messungen statt, jeweils gehemmt durch unterschiedliche Inhibitoren. Als Inhibitoren wurden Kaliumcyanid (KCN, Hemmung der mitochondrialen Atmungskette) und Oligomycin (Hemmung der  $F_0/F_1$ -ATPase) eingesetzt. KCN blockiert die Cytochrom c-Oxidase (Mootha et al. 2001), und somit kann kein Sauerstoff mehr durch die Atmungskette verbraucht werden. In diesem Zustand erfolgt ein  $O_2$ -Verbrauch nur noch über nicht-mitochondriale Prozesse. Um eine differenziertere Betrachtung der Mitochondrienrespiration zu ermöglichen, wurde mit Hilfe von Oligomycin die  $F_0/F_1$ -ATP-Synthase inhibiert und dadurch der Sauerstoffverbrauch von der ATP-Synthase entkoppelt. Es verblieb allein das Protonenleck als verbrauchender Prozess (siehe Tabelle 2.2).

**Tabelle 2.2** Wirkung der eingesetzten Inhibitoren

Inhibitor	Gehemmtes Molekül	Gehemmter Prozess	Verbleibender Prozess
Kaliumcyanid	Cytochrom c-Oxidase	Mitochondriale Respiration	Nicht-mitochondriale Respiration
Oligomycin	$F_0/F_1$ -ATP-Synthase	ATP-Produktion	Nicht-mitochondriale Respiration + Protonenleck

In Vorversuchen wurden verschiedene Inhibitor-Konzentrationen getestet, um die minimale Konzentration zu bestimmen, bei der eine vollständige Hemmung auftrat. Es erwiesen sich 100  $\mu\text{mol/L}$  für KCN und 10  $\mu\text{g/ml}$  für Oligomycin als ausreichend. Um den Einfluss der Zeit, Inkubation (Lagerung) bei 0°C und der Temperatur auf die Zellrespiration zu erfassen, wurden am Tag der Präparation (Tag 1) Vergleichsmessungen bei 5°C und 23°C durchgeführt. In der Annahme, dass der Zeiteffekt verstärkt bei hohen Temperaturen bemerkbar wäre, wurden an Tag 2 am Ende der Versuchsreihe nochmals die Respirationsraten bei 23°C gemessen. Am nächsten Tag (Tag 2) wurde das gesamte Temperaturspektrum gemessen. Dabei wurde die Respiration auf die jeweilige Anzahl an intakten Zellen zu diesem Zeitpunkt bezogen. Einen detaillierten Überblick über den Ablauf der Messungen gibt Tabelle 2.3.

**Tabelle 2.3** Versuchsprotokoll über den zeitlichen Verlauf

Die angegebenen Zeitabläufe gelten für einen idealen Verlauf des Versuchsprotokolls. Aufgrund von technischen Problemen (z.B. Erreichen einer konstanten Messtemperatur) bzw. Störungen bei der Präparation oder Messung (z.B. erhöhter Zeitbedarf für den Gewebeaufschluss, Luftblasen in der Kammer) konnte es zu Variationen im Zeitablauf kommen. (✗): eine Durchführung fand nur statt, wenn es der zeitliche Rahmen erlaubte.

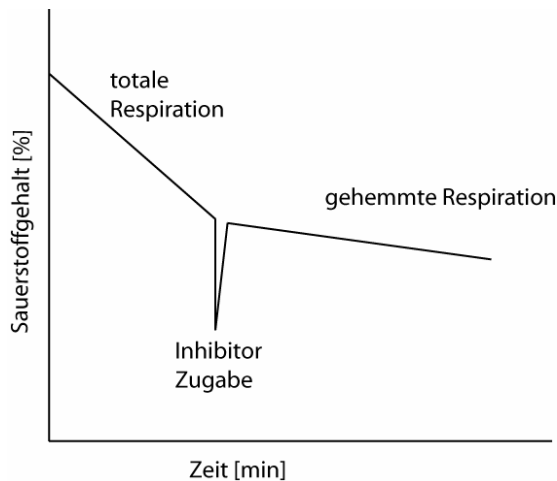
Tag	Zeitpunkt (h zur Kontroll- messung)	Prozess	Vergleichs- Messung bei		Messung bei	Inhibitor	
			5°C	23°C		Kalium- cyanid	Oligo- mycin
1	- 6	Präparation					
	- 2,5	Erholungsphase					
	- 1	Verdünnung					
	0	Messung Einfrieren von Zellsuspension (≥ 500 µl) für weiterführende Messungen	✗	✗		(✗)	(✗)
	1	Erneuerung des Mediums und Inkubation (0°C)					
2	17	Erneuerung des Mediums					
	18	Messung Dabei alle 2-3 h Zellzählung Einfrieren von Zellsuspension (≥ 500 µl) für weiterführende Messungen		✗	1°C	✗	✗
	20				3°C	✗	✗
	22		✗		5°C	✗	✗
	24				7°C	✗	✗
	26				9°C	✗	✗
	28			✗	15°C	✗	✗

Für weiterführende Messungen, Bestimmung der Citratsynthase-Aktivität und des Proteingehalts, wurde an beiden Tagen mindestens 500 µl der Zellsuspension und der Lösung 4 bei -20°C eingefroren.

### Auswertung der zellulären Sauerstoffverbrauchsraten

Für die Berechnung der Respirationsraten wurde die Steigung bzw. das Gefälle der Sauerstoffabnahme in der Respirationskammer bestimmt. Hierzu wurden die Daten zunächst unterteilt in „totale Atmung“ und „gehemmte Respiration“ (Abb. 2.6). Mit Hilfe einer graphischen Darstellung der Daten wurde dann der Abschnitt für die Steigungsberechnung bestimmt. Kriterium hierfür war, dass die Steigung stetig, linear und negativ war. Ausreißer mit Datensprüngen von mehr als 10% des Sauerstoffgehalts wurden von der Steigungsauswertung ausgenommen.





**Abb. 2.6** Schema und Einteilung der zellulären Respirationmessung.

Die Berechnung der Respiration erfolgte mit folgender Formel:

$$MO_2 = -m \cdot \left( \frac{PO_2}{100} \right) \cdot \beta O_2 \cdot \frac{K}{N}$$

Mit

$MO_2$  = Respirationsrate der Hepatozyten [ $\mu\text{mol O}_2/(\text{Mio Zellen} \cdot \text{min})$ ]

$m$  = Steigung: Abnahme des Sauerstoffgehalts in der Kammer [%/min]

$PO_2$  = Sauerstoffpartialdruck [Torr] bei 100%

100 = 100%

$\beta O_2$  = Sauerstoffkapazität der Lösung [ $\mu\text{mol O}_2/(\text{L} \cdot \text{Torr})$ ]

$K$  = zugegebenes Volumen der Zellsuspension [L]

$N$  = Anzahl der Leberzellen im zugegebenem Volumen  $K$  [Mio]

Der  $MO_2$ -Wert wurde dann in  $\text{nmol O}_2/(\text{Mio Zellen} \cdot \text{min})$  umgerechnet.

Die Berechnung der totalen und der inhibierten Respiration erfolgte getrennt, wobei sich aus der Differenz der beiden die gehemmte Respiration ergab (siehe auch Tabelle 2.4). Die prozentuale Hemmung berechnete sich durch:

$$\text{Hemmung} = \left( \frac{MO_{2\text{inh}}}{MO_{2\text{total}}} \right) \cdot 100$$

Mit

Hemmung = Prozentsatz der inhibierten Atmung an der total Respiration [%]

$MO_{2\text{inh}}$  = inhibierte Atmung [ $\text{nmol O}_2/(\text{Mio Zellen} \cdot \text{min})$ ]

$MO_{2\text{total}}$  = totale Atmung [ $\text{nmol O}_2/(\text{Mio Zellen} \cdot \text{min})$ ]

Messungen, die eine negative Hemmung (Anstieg der Respiration nach Zugabe des Inhibitors) ergaben, wurden von der weiteren Auswertung ausgenommen.

Anhand der verwendeten Inhibitoren konnte in Annäherung der Sauerstoffbedarf einzelner Prozesse berechnet werden (Cherkasov et al. 2006) (siehe Tabelle 2.2).

**Tabelle 2.2** Berechnung Respirationsanteile

$MO_{2,total}$ : ungehemmter Sauerstoffverbrauch;

$MO_{2,Oli}$ :  $MO_2$  nach Zugabe von Oligomycin;

$MO_{2,KCN}$ :  $MO_2$  nach Zugabe von Kaliumcyanid

ATP-Synthese	$MO_{2,total} - MO_{2,Oli}$
Protonenleck	$MO_{2,Oli} - MO_{2,KCN}$
Nicht-mitochondriale Atmung	$MO_{2,KCN}$
Mitochondriale Atmung	$MO_{2,total} - MO_{2,KCN}$

Bei der Betrachtung der Hemmung der  $F_0/F_1$ -ATPase durch Oligomycin muss beachtet werden, dass dieses das Membranpotential des Mitochondriums verändert und dadurch das Protonenleck maximal wird. Daher ist der Sauerstoffverbrauch durch das errechnete Protonenleck wahrscheinlich höher als im Ruhestoffwechsel, weshalb die errechnete ATP-Synthese (aus totaler Zellrespiration und Respiration nach Oligomycin-Hemmung) als zu niedrig vermutet werden kann (Rolfe und Brand 1997).

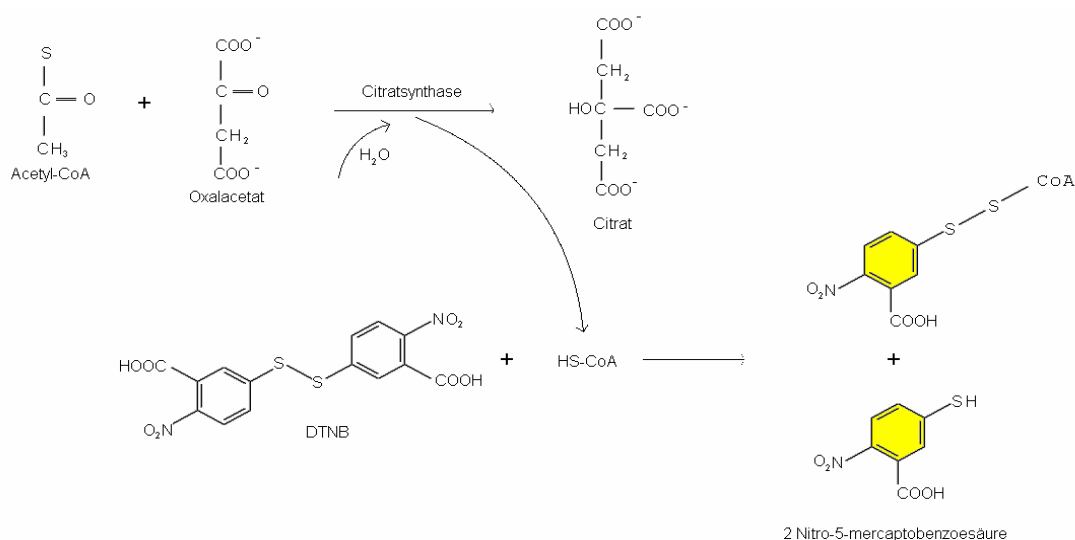
## 2.6 CITRATSYNTHASE-AKTIVITÄT

### Prinzip der Messung

Im Citratzyklus katalysiert die Citratsynthase die Umsetzung von Acetyl-CoA und Oxalacetat zu Citrat. Dabei wird HS-CoA abgespalten. Mit DTNB (5,5'-Dithio-bis-(2-nitrobenzoic acid)) bildet letzteres über aliphatische Schwefelgruppen einen gelben Farbkomplex, der die Lichtabsorption der Lösung verändert (Abb. 2.7).

Bei der Photometrie erfolgt eine Mengenbestimmung aufgrund des physikalischen Zusammenhanges zwischen Lichtabsorption und Konzentration einer Lösung (Lambert-Beer'sches Gesetz s.u.). Daher kann über den gebildeten Farbkomplex die Umsatzrate bzw. die Aktivität der Citratsynthase bestimmt werden (Ellman 1959).

## Material & Methoden



**Abb. 2.7** Reaktionsschema der Citratsynthase-Messung. Citratsynthase katalysiert die Reaktion aus Acetyl-CoA und Oxalacetat zu Citrat, wobei HS-CoA abgespalten wird, das mit DTNB zu einem farbigen Komplex reagiert (hier gelb dargestellt). Photometrisch kann die Konzentration dieses Komplexes bestimmt werden. Schema verändert nach (Ellman 1959).

### Messprotokoll

Ein Teil der eingefrorenen Zellsuspension von Tag 2 wurde aufgetaut und für 5 Minuten bei 0°C und 360 Watt mit Ultraschall behandelt (Branson Sonifier 450: Output 8, Cycle 50%). Nach anschließender Zentrifugation (5 min, 7400 x g und 0°C) wurde der Überstand abgenommen und für die nachfolgenden Messungen auf Eis gelagert.

In 1 ml Halbmikroküvetten wurde wie folgt pipettiert:

Substrate (Molarität der Stammkonzentration)	Volumen	Endkonzentration
Tris-HCl (100 mM)	750 µl	72 mM
DTNB (5 mM)	50 µl	0,24 mM
Acetyl-CoA (20 mM)	20 µl	0,38 mM
Probe + H <sub>2</sub> O	200 µl	0,38 mM
Oxalacetat (20 mM)	20 µl	0,38 mM

Die Messung erfolgte bei 412 nm nach einem modifizierten Pipettierschema von Jäckel (2007). In dieser Arbeit musste mehr Probe eingesetzt werden als üblich (Probe + Wasser 160 µl). Nach einem Vorlauf (ca. 3 min) wurde die Reaktion durch Zugabe von 20 µl

Oxalacetat (20 mM) gestartet. Es erfolgte jeweils eine Doppelbestimmung der Proben mit unterschiedlichen Probenvolumina zur Überprüfung der Substratsättigung.

### Auswertung

Das Absorptionsvermögen einer Lösung ist abhängig von der Zahl der mit dem Licht in Wechselwirkung tretenden Teilchen, also von der Schichtdicke  $d$  und der Konzentration  $c$  der Lösung. Der stoff- und wellenlängenabhängige Proportionalitätsfaktor heißt Extinktionskoeffizient  $\epsilon$ . Im Fall von DTNB beträgt dieser  $\epsilon = 13,61 \text{ ml}/(\mu\text{mol}\cdot\text{cm})$ . Dies ist im Lambert-Beerschen-Gesetz zusammengefasst:

$$E_{\lambda} = -\log\left(\frac{I}{I_0}\right) = c \cdot \epsilon_{\lambda} \cdot d$$

Mit:

$E_{\lambda}$  = Extinktion (Absorption an der Wellenlänge  $\lambda$ )

$I$  = Intensität des transmittierten Lichtes [ $\text{W}/\text{m}^2$ ]

$I_0$  = Intensität des einfallenden (eingestrahnten) Lichtes [ $\text{W}/\text{m}^2$ ]

$c$  = Konzentration der absorbierenden Substanz in der Flüssigkeit [ $\mu\text{mol}/\text{ml}$ ]

$\epsilon_{\lambda}$  = dekadischer molarer Extinktionskoeffizient bei der Wellenlänge  $\lambda$   
[ $\text{ml}/(\mu\text{mol}\cdot\text{cm})$ ]

$d$  = Weglänge des Lichtes in der Flüssigkeit (Schichtdicke der Küvette) [ $\text{cm}$ ]

Unter Einbeziehung der Zeit kann die Enzymaktivität  $A$  bestimmt werden, wobei sich  $E_{\lambda}/\Delta t$  in der vom Photometer gemessenen Steigung wiederfindet. Unter Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors  $f$  (Assayvolumen/Probenvolumen) und der eingesetzten Probe ( $N$ ) berechnet sich die spezifische Aktivität [ $U$ ] der eingesetzten Probe mit nachstehender Formel:

$$A_{\text{spez}} = \frac{\Delta E_{\lambda} \cdot f}{\varepsilon_{\lambda} \cdot d \cdot \Delta t \cdot N}$$

Mit

$A_{\text{spez}}$  = Enzymaktivität [U/1 Mio Zellen]

$N$  = eingesetzte Zellmenge [Mio Zellen/ml]

$\Delta E_{\lambda}$  = Änderung der Extinktion

$\Delta t$  = Änderung der Zeit [min]

$f$  = Verdünnungsfaktor

$\varepsilon_{\lambda}$  = dekadischer molarer Extinktionskoeffizient bei der Wellenlänge  $\lambda$   
[ml/ $\mu$ mol•cm]

$d$  = Schichtdicke [cm]

Die Proteinmenge sollte bestimmt werden, um die Respirationsraten der Zellen hierauf normieren zu können. Hierdurch sollte eine bessere Vergleichbarkeit mit Literaturdaten erreicht werden. Die Proteinbestimmung erfolgte nach der Methode von Biuret (Methode siehe Anhang 6.5). Allerdings lieferte dies aus verschiedenen Gründen keine auswertbaren Daten, und auch eine Proteinbestimmung nach Bradford war erfolglos. Aus zeitlichen Gründen konnten keine weiteren Testmessungen zur Modifizierung des Protokolls durchgeführt werden.

### 2.7 $Q_{10}$ -WERT UND ARRHENIUS AKTIVIERUNGSENERGIE

#### $Q_{10}$

Der  $Q_{10}$ -Wert gibt an, wie stark ein biologischer Prozess durch eine Temperaturerhöhung um 10°C beeinflusst wird (van't Hoff-Regel). Der  $Q_{10}$ -Wert biologischer Prozesse liegt meist zwischen 1,8 und 3,0, d.h. bei einer Erwärmung um 10°C verdoppelt bis verdreifacht sich die Reaktionsgeschwindigkeit.  $Q_{10}$  ist eine dimensionslose Größe, die dem Quotienten der beiden Messwerte bei den Temperaturen  $T_1$  und  $T_2$  entspricht, und die aus folgender Gleichung (Heldmaier und Neuweiler 2004) resultiert:

$$Q_{10} = \left( \frac{k_2}{k_1} \right)^{\left( \frac{10}{T_2 - T_1} \right)}$$

Mit

$k_1$  = Stoffwechselrate bei Temperatur  $T_1$

$k_2$  = Stoffwechselrate bei Temperatur  $T_2$

$T$  = Temperatur in Kelvin (K)

### Arrhenius-Plot

Auf Arrhenius (1859 – 1927) beruht eine graphische Darstellung temperaturabhängiger Reaktionen. Für diesen Arrhenius-Plot wird der natürliche Logarithmus einer Reaktionsgeschwindigkeit (oder z.B. der Stoffwechselrate) gegen den Reziprokwert der absoluten Temperatur [Kelvin, K] aufgetragen. Aus der Steigung der linearen Regression lässt sich die Arrhenius Aktivierungsenergie berechnen (Angelova et al. 2007):

$$E_a = -R \cdot m$$

Mit

$E_a$  = Arrhenius Aktivierungsenergie [J/mol]

$R$  = Gaskonstante: 8,3 J/(mol•K)

$m$  = Steigung der linearen Regression im Arrhenius Plot [1/K]

## 2.8 STATISTIK

Alle Daten wurden zunächst mittels Nalimov-Test auf Ausreißer getestet (Noak 1980). Ab einer Fehlerwahrscheinlichkeit von 95% wurden die Werte aus dem Datensatz entfernt.

Die weitere statistische Auswertung der Daten erfolgte mit INSTAT 3.06 (2003, GraphPad Software, USA). Signifikanzen zeichnen sich in dieser Arbeit durch eine Irrtumswahrscheinlichkeit von  $p \leq 0,05$  aus.

Die Daten wurden zuerst mittels Kolmogorov-Smirnov-Test auf Normalverteilung getestet. Mit dem Bartlett-Test wurde auf gleiche Verteilung der Standardabweichungen getestet. Lag eine Normalverteilung und eine Varianzhomogenität vor, so wurden die Daten, wenn nicht anders erwähnt, mittels ungepaartem two-tailed t-Test bzw. ANOVA nach Tukey auf Signifikanzen getestet. Im Falle einer inhomogenen Verteilung wurde ein Mann-Whitney Test angewendet. Lag keine Varianzhomogenität vor, wurden die Daten mittels Welch-Correction korrigiert bzw. eine ANOVA nach Dunn durchgeführt.

## Material & Methoden

---

Lineare Regressionen wurden mit PRISM 4.02 (2004, GraphPad Software, USA) auf die Signifikanz der Steigung getestet, und zudem fand im Falle von zwei Datensätzen ein Vergleich der Regressionen statt (F-Test). Korrelationen wurden mittels Pearson-Test geprüft. Bei Regressionen gibt der p-Wert die signifikante Abweichung der Steigung von 0 an. Falls nicht anders erwähnt, wurden die Ergebnisse in dieser Arbeit als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler (MW  $\pm$  SE) angegeben. p-Werte wurden nur angegeben, wenn  $p \leq 0,05$ .

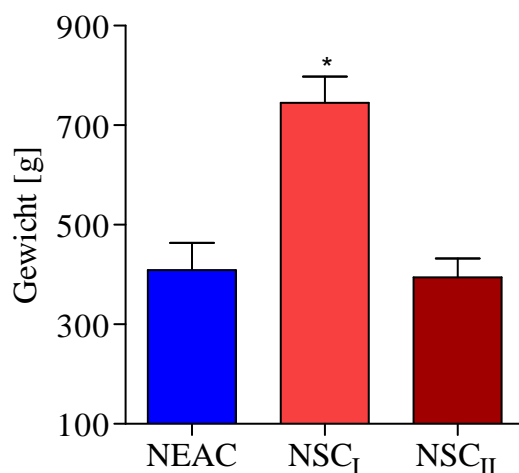
### 3 Ergebnisse

In der Darstellung der Ergebnisse wurde der nordost-arktische Kabeljau (NEAC) jeweils durch blaue und der Nordseekabeljau (NSC) durch rote Symbole gekennzeichnet. Für die Auswertung der Körpermaße und -indizes wurde zwischen langzeitgehälterten (NSC<sub>I</sub>, hellrot) und kurzzeitgehälterten (NSC<sub>II</sub>, dunkelrot) Exemplaren der Nordseepopulation unterschieden.

#### 3.1 KÖRPERMAßE UND -INDIZES

##### Frischgewicht und Länge

Mit einer Gewichtsspanne von 393,12 – 999,25 g lag das Gewicht des langzeitgehälterten Nordseekabeljaus NSC<sub>I</sub> signifikant höher als das Frischgewicht des kurzzeitgehälterten NSC<sub>II</sub> (297,92 – 586,77 g,  $p = 0,0002$ ) sowie des langzeitgehälterten NEAC (217,80 – 630,60 g,  $p = 0,0003$ , Abb. 3.1). Die Gewichtsdaten von NSC<sub>II</sub> und NEAC lagen somit im ähnlichen Bereich und zeigten keinen signifikanten Unterschied.

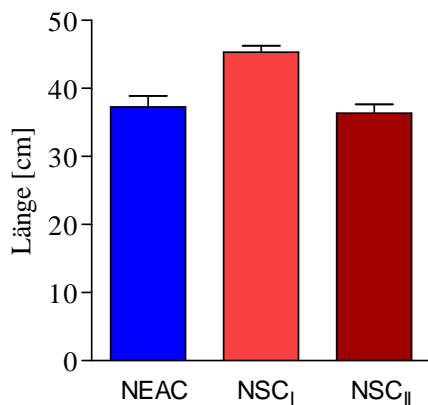


**Abb. 3.1** Frischgewicht der untersuchten Kabeljaupopulationen, Hälterungstemperatur 10°C. NEAC: nordost-arktischer Kabeljau, langzeitgehältert (n = 10), NSC<sub>I</sub>: Nordseekabeljau, langzeitgehältert (n = 12), NSC<sub>II</sub>: Nordseekabeljau, kurzzeitgehältert (n = 7). Dargestellt sind MW ± SE.\* kennzeichnet signifikanten Unterschied von NSC<sub>I</sub> zu NEAC und NSC<sub>II</sub>.

Trotz eindeutiger Gewichtsunterschiede ergaben sich in der Länge der untersuchten Populationen keine signifikanten Unterschiede (Abb. 3.2). Die Tiere des langzeitgehälterten Nordseekabeljaus NSC<sub>I</sub> zeigten die größere Spanne mit Längen von 38 bis 50 cm, während bei NSC<sub>II</sub> die Länge zwischen 33 bis 44 cm und beim arktischen Kabeljau zwischen 30 und 44 cm variierten.



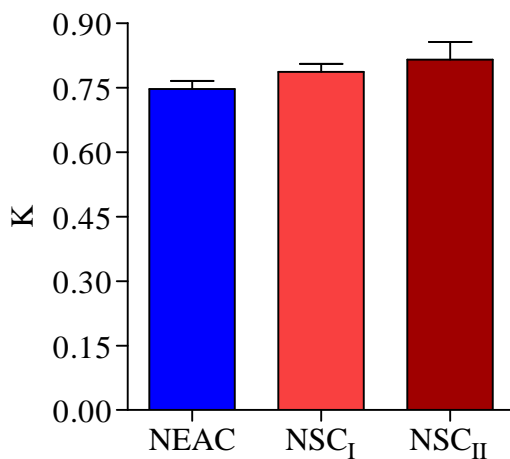
## Ergebnisse



**Abb. 3.2** Tierlänge der untersuchten Kabeljaupopulationen, Hälterungstemperatur 10°C. NEAC: nordost-arktischer Kabeljau, langzeitgehältert (n = 10), NSC<sub>I</sub>: Nordseekabeljau, langzeitgehältert (n = 12), NSC<sub>II</sub>: Nordseekabeljau, kurzzeitgehältert (n = 7). Dargestellt sind MW ± SE.

### Konditionsfaktor

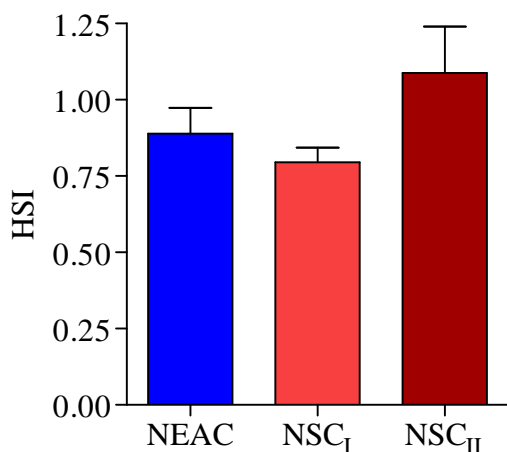
Der Konditionsfaktor (K), ein Maß für die körperliche Verfassung, zeigte für den arktischen Kabeljau (NEAC) Werte von 0,67 – 0,84 und unterschied sich somit nicht signifikant zum Konditionsfaktor von NSC<sub>I</sub> (0,69 – 0,90) und NSC<sub>II</sub> (0,64 – 0,95) (Abb. 3.3). Auch zwischen den beiden Nordseegruppen wurde kein signifikanter Unterschied in der Kondition gefunden.



**Abb. 3.3** Konditionsfaktor (K) der untersuchten Kabeljaupopulationen, Hälterungstemperatur 10°C. NEAC: nordost-arktischer Kabeljau, langzeitgehältert (n = 10), NSC<sub>I</sub>: Nordseekabeljau langzeitgehältert (n = 12), NSC<sub>II</sub>: Nordseekabeljau kurzzeitgehältert (n = 7). Dargestellt sind MW ± SE.

## Hepatosomatischer Index

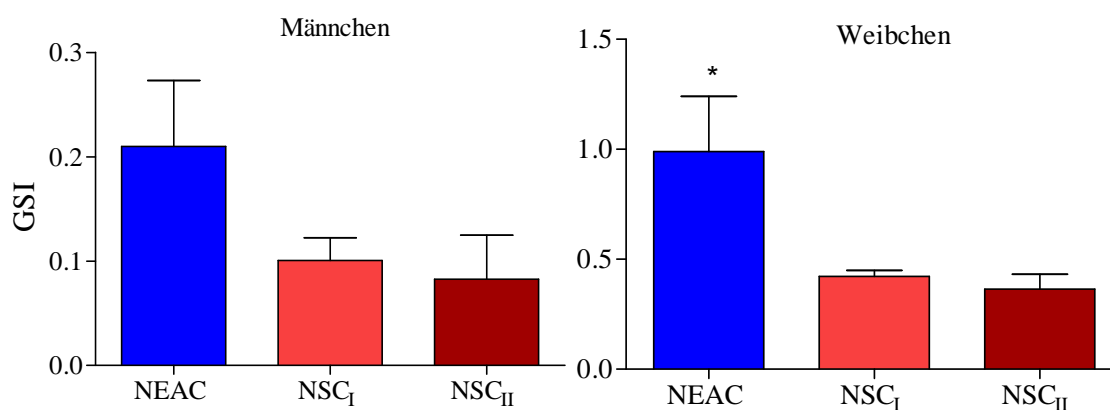
Der hepatosomatische Index (HSI) (Abbildung 3.4), das Verhältnis von Lebergewicht zu Gesamtkörpergewicht, von NSC<sub>I</sub> lag etwas unterhalb des HSI von NSC<sub>II</sub> (NSC<sub>I</sub>: 0,65 – 1,23 vs. NSC<sub>II</sub>: 0,70 – 1,92), wobei sich jedoch kein signifikanter Unterschied ergab. Mit einem HSI von 0,55 – 0,84 für NEAC ergab sich auch im Populationsvergleich kein signifikanter Unterschied.



**Abb. 3.4** Hepatosomatischer Index (HSI) der untersuchten Kabeljaupopulationen, Hälterungstemperatur 10°C. NEAC: nordost-arktischer Kabeljau, langzeitgehältert (n = 10), NSC<sub>I</sub>: Nordseekabeljau, langzeitgehältert (n = 12), NSC<sub>II</sub>: Nordseekabeljau, kurzzeitgehältert (n = 7). Dargestellt sind MW ± SE.

## Gonadosomatischer Index

Aufgrund natürlicher anatomischer Merkmale sind die weiblichen Fortpflanzungsorgane größer und schwerer als die der Männchen, weshalb sich ein signifikanter Unterschied im gonadosomatischen Index (GSI) zwischen den Geschlechtern ergab, und die Daten nach Geschlecht getrennt dargestellt wurden (Abb. 3.5).



**Abb. 3.5** Geschlechterspezifischer gonadosomatischer Index (GSI) der untersuchten Kabeljaupopulationen, Hälterungstemperatur 10°C. NEAC: nordost-arktischer Kabeljau, langzeitgehältert (n = 6:4, m:w), NSC<sub>I</sub>: Nordseekabeljau, langzeitgehältert (n = 7:5, m:w), NSC<sub>II</sub>: Nordseekabeljau, kurzzeitgehältert (n = 2:5, m:w); m: männlich, w: weiblich. \* kennzeichnet signifikanten Unterschied zu NSC<sub>I</sub> und NSC<sub>II</sub>. Dargestellt sind MW ± SE bzw. mittlere Abweichung bei n = 2.

Das Geschlechterverhältnis (Männchen:Weibchen) lag in den Datensätzen beider Populationen in ähnlichen Verhältnissen vor: NEAC 6 : 4 und NSC<sub>I & II</sub> 9 : 10, weswegen in den anderen Messparametern eine Geschlechtsunterscheidung vernachlässigt wurde.

Bei beiden Geschlechtern wurde kein signifikanter Unterschied innerhalb der Nordsee- gruppen (NSC<sub>I</sub> und NSC<sub>II</sub>) gefunden. Aufgrund der geringen Tieranzahl ( $n = 2$  für Männchen bei NSC<sub>II</sub>) wurden die beiden Gruppen für die statistische Auswertung des Populationsvergleichs zusammengefasst. Dieser ergab bei den Männchen, trotz des höheren GSI für NEAC, keinen signifikanten Unterschied. Bei den Weibchen hingegen lag der GSI für NEAC mit  $0,42 - 1,56$  signifikant höher als der GSI für die Kabeljaupopulation aus der Nordsee ( $0,27 - 0,63$ ,  $p = 0,0240$ ).

### 3.2 GANZTIERRESPIRATION

Die Untersuchungen der Ganztierrespiration wurde an dem nordost-arktischen Kabeljau (NEAC) und an dem langzeitgehälterten Nordseekabeljau (NSC<sub>I</sub>) durchgeführt. Die acht Tiere des arktischen Kabeljau wurden zuerst untersucht. Die ersten vier Fische, sowie der letzte, wurden einzeln gemessen; in den Messungen der restlichen Tiere wurden stets zwei Individuen parallel im gleichen Aufbau gemessen. Auch NSC<sub>I</sub> wurde größtenteils in Parallelmessungen untersucht. In Vorversuchen mit einzelnen Fischen hatten Messungen während der Versuchsdauer eine gleichbleibende Wasserqualität ergeben. Im Nachhinein zeigte sich jedoch, dass bei Parallelmessungen (zwei Tieren im Aufbau) die Konzentrationen für Ammonium und Nitrit nicht mehr im unteren Bereich der akzeptablen Grenzwerte lagen und evtl. die Stoffwechselraten beeinflusst hatten, da eine große Streuung im Sauerstoffverbrauch innerhalb einer Population festgestellt wurde. Die Daten wurden daraufhin unter dem Aspekt der Wasserqualität sowie des Populationsunterschiedes untersucht. Die in dieser Arbeit verwendeten Grenzwerte für die Ammonium- bzw. Nitritkonzentration sind in Tabelle 3.1 zu ersehen. Bei den angegebenen Werten handelt es sich um Erfahrungswerte (pers. Mitteilung B. Klein).

**Tabelle 3.1** Verwendete Grenzwerte für die Wasserqualität im Versuchsaufbau

Bereich:	Ammonium (NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> ) [mg/L]	Nitrit (NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> ) [mg/L]
Optimal	0,0 – 0,1	0,0 – 0,1
Akzeptabel	≤ 0,4	≤ 0,2
Schlecht	> 0,4	> 0,2

## Ergebnisse

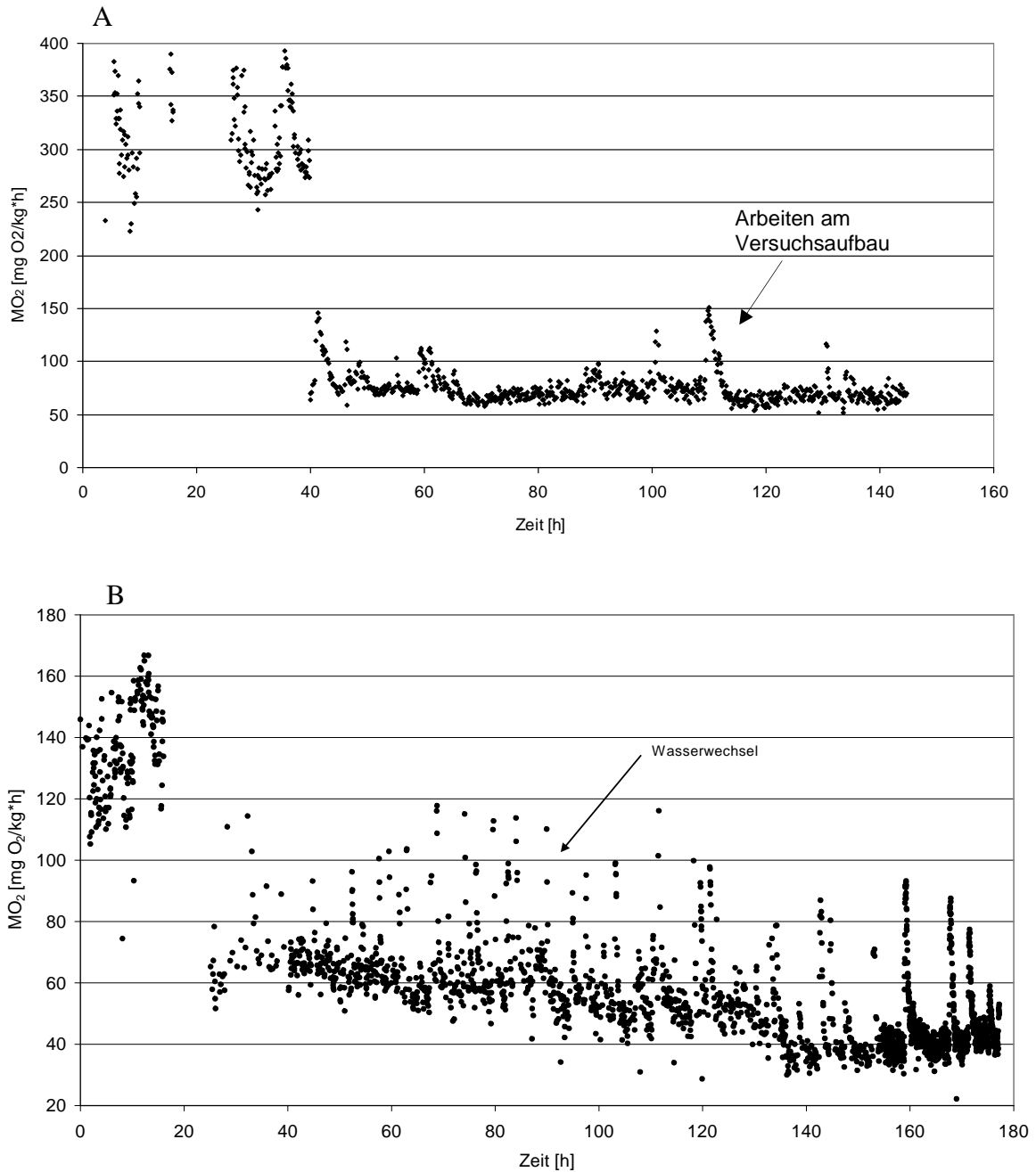
---

In Abbildung 3.6A ist die Respiration eines Versuchstieres bei gleichbleibend hohen Ammonium- und Nitritkonzentrationen dargestellt. Zum Vergleich wird in Abbildung 3.6B die Auswirkung eines Wasserwechsels und die damit verbundene verbesserte Wasserqualität auf die Respiration eines Versuchstieres gezeigt.

Die Ammonium- und Nitritkonzentrationen wurden für den in 3.6A dargestellten Versuch an Tag 1, 2 und 4 bestimmt. Die Konzentration von Ammonium stieg in dieser Zeit von  $<0,1$  über  $0,34$  auf  $0,36$  mg/L an, während die Nitritkonzentration von  $0,03$  über  $0,11$  auf  $0,19$  mg/L anstieg. Diese Werte befanden sich an der Obergrenze des als „akzeptabel“ definierten Bereichs, weswegen kein Wasserwechsel erfolgte. Nach der Stressphase zu Beginn ( $0 - 40$  h) (Sauerstoffverbrauch des Versuchstieres  $> 200$  mg  $O_2$ /(kg•h)) pendelte sich der Sauerstoffverbrauch des Versuchstieres unter den genannten Bedingungen in einem Bereich von  $\approx 60$  mg  $O_2$ /(kg•h) ein. Dieser Verlauf der Stoffwechselrate zeigte sich auch bei einem anderen Tier (Abb. 3.6 B).

So stieg auch hier in den ersten Stunden nach Einsetzen des Tieres in die Kammer der Sauerstoffverbrauch teilweise weit über  $100$  mg  $O_2$ /(kg•h), sank jedoch ab dem 2. Tag ( $25$  h –  $85$  h) auf einen Wert von ca.  $60$  mg  $O_2$ /(kg•h). Zu diesem Zeitpunkt wurde festgestellt, dass die Wasserwerte für Nitrit und Ammonium außerhalb der Grenzwerte lagen ( $NH_4^+$ :  $0,66$  mg/L,  $NO_2^-$ :  $0,46$  mg/L). Daraufhin wurde ein Teil des Wassers im Versuchsaufbau gewechselt, worauf die Respiration abnahm und bei  $140$  h ein Minimum von ca.  $40$  mg  $O_2$ /(kg•h) erreichte. Die Konzentrationen für Ammonium und Nitrit waren bis dahin auf  $0,2$  bzw.  $0,1$  mg/L gesunken.

## Ergebnisse



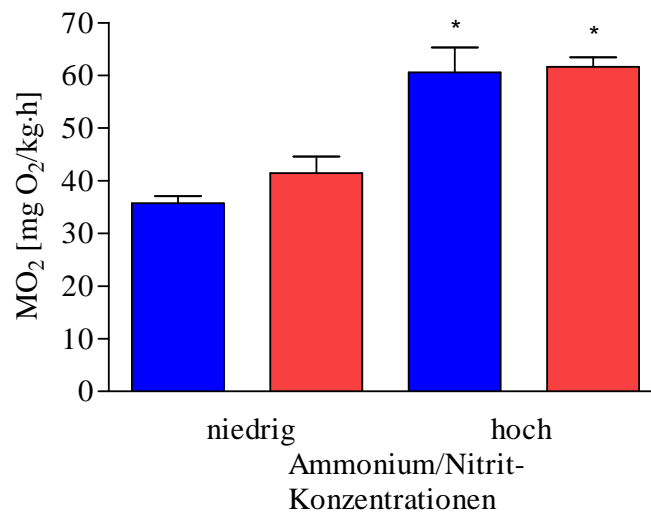
**Abb. 3.6** Exemplarische Darstellung zum Einfluss der Wasserqualität auf den Standardstoffwechsel von Kabeljau, Hälterungs- und Messtemperatur 10°C. A) Messung ohne Wasserwechsel und B) Messung mit Wasserwechsel während des Messzeitraums (siehe Text für weitere Informationen).

Ein ähnliches Bild ergab sich auch bei anderen Messungen, bei denen während der Aufzeichnungsphase ein Wasserwechsel erfolgte.

Die Messungen wurden daraufhin in Respirationsraten bei niedrigen bzw. hohen Ammonium- und Nitritkonzentration unterteilt und für die jeweilige Population gemittelt (Abb. 3.7, eine Darstellung der Sauerstoffverbrauchsraten der Einzeltiere befindet sich im An-

## Ergebnisse

hang Abbildung 6.1). Die Wasserqualität hatte einen signifikanten Einfluss auf den Standardstoffwechsel von Kabeljau beider Populationen. Im Vergleich zu Sauerstoffverbrauchsdaten bei niedrigen Ammonium- und Nitritkonzentrationen ergaben sich bei hohen Konzentrationen um den Faktor 1,7 erhöhte Sauerstoffverbrauchsdaten für NEAC ( $p = 0,007$ ) und für NSC ( $p = 0,009$ ).



**Abb. 3.7** Einfluss der Wasserqualität auf den Standardstoffwechsel (normalisiert auf 1 kg Tier) der untersuchten Kabeljaupopulationen, Mess- und Hälterungstemperatur 10°C, ■ NEAC: nordost-arktischer Kabeljau, langzeitgehältert (n = 3-5), ■ NSC: Nordseekabeljau, langzeitgehältert (n = 3-6). Dargestellt sind MW ± SE. \* kennzeichnet signifikanten Unterschied zu den Werten bei niedrigen Ammonium- und Nitritkonzentrationen.

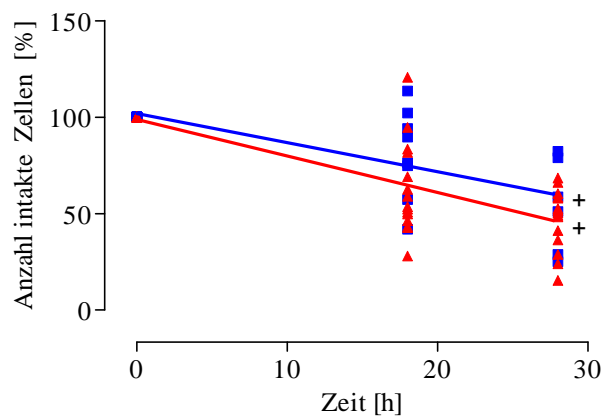
Für den Populationsvergleich wurden die Respirationswerte für die unterschiedlichen Wasserqualitäten getrennt voneinander betrachtet. Bei gleicher Wasserqualität waren die Stoffwechselraten von NEAC und NSC<sub>I</sub> ähnlich, und es wurde kein signifikanter Unterschied im Standardstoffwechsel zwischen den Populationen gefunden (Abb. 3.7). Wurde die Respiration in Wasser mit niedrigen Ammonium- und Nitritkonzentrationen gemessen, lag der Sauerstoffverbrauch für NEAC bei  $35,73 \pm 1,32 \text{ mg O}_2/(\text{kg}\cdot\text{h})$  und für NSC<sub>I</sub> bei  $41,42 \pm 3,18 \text{ mg O}_2/(\text{kg}\cdot\text{h})$ . Bei hohen Konzentrationen waren die Respirationsraten signifikant erhöht, zeigten aber wiederum keinen Unterschied zwischen den Populationen: NEAC =  $60,59 \pm 4,68 \text{ mg O}_2/(\text{kg}\cdot\text{h})$  und NSC =  $61,65 \pm 1,81 \text{ mg O}_2/(\text{kg}\cdot\text{h})$ .

## 3.3 LEBERZELLEN: ZEIT- UND INKUBATIONSEFFEKT

In diesem Abschnitt werden die Ergebnisse gezeigt, die die Qualität und Quantität der isolierten Leberzellen in Bezug auf den Faktor Zeit (siehe Tabelle 2.3) betreffen. Die beiden Gruppen des Nordseekabeljaus (NSC<sub>I</sub> und NSC<sub>II</sub>) wurden im Folgenden als ein Datensatz dargestellt, da sich die Gruppen in den Körperindizes (Kondition, HSI und GSI), die möglicherweise die Ergebnisse zum Zellstoffwechsel hätten beeinflussen können (Lapointe et al. 2006), nicht signifikant unterschieden hatten.

### Zellzahl

Die Anzahl der intakten Zellen nahm bei beiden Populationen mit der Zeit signifikant ab, wobei sich zwischen den Populationen kein signifikanter Unterschied ergab (Abbildung 3.8). Im untersuchten Zeitraum nach der Präparation (0 – 28 h) wurde ein linearer Zusammenhang ( $f(x) = m \cdot x + b$ ) zwischen dem Zeitpunkt der Messung und dem Anteil intakter Zellen gefunden. Folgende Gleichungen wurden ermittelt: NEAC:  $f(x) = (-1,51 \pm 0,32) \cdot x + (101,80 \pm 5,62)$  ( $p \leq 0,001$ ); NSC:  $f(x) = (-1,89 \pm 0,25) \cdot x + (98,81 \pm 5,12)$  ( $p \leq 0,001$ ). Die ermittelten negativen Steigungen bedeuten, dass sich zehn Stunden nach der Präparation die Anzahl an intakten Zellen um 15% (NEAC) bis 19% (NSC) verringerte.



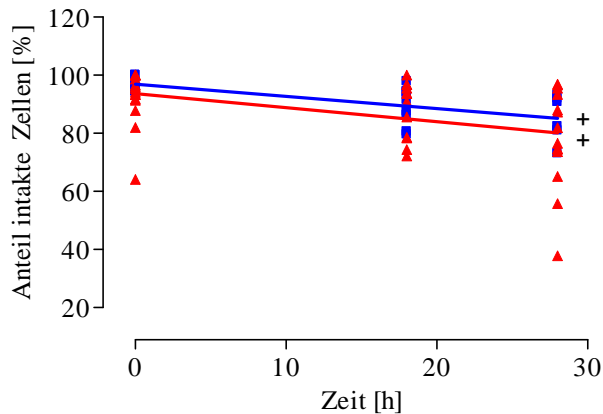
**Abb.3.8** Einfluss der Zeit auf die Anzahl intakter Hepatozyten der untersuchten Kabeljaupopulationen.

■ NEAC: nordost-arktischer Kabeljau (n = 6-8), ▲ NSC: Nordseekabeljau (n = 15). Dargestellt sind die Daten der Einzelpräparationen in Prozent zur Zellzahl zum Zeitpunkt 0h.

+ kennzeichnet eine signifikante negative Steigung.

## Viabilität

In der Graphik 3.9 ist die Zellviabilität, die als der prozentuale Anteil intakter Zellen an der Gesamtzellanzahl definiert ist, in Abhängigkeit von der Zeit aufgetragen.



**Abb. 3.9** Einfluss der Zeit auf die Zellviabilität isolierter Hepatozyten der untersuchten Kabeljaupopulationen. ■ NEAC: nordost-arktischer Kabeljau (n = 6-9), ▲: NSC: Nordseekabeljau (n = 12-16). Dargestellt sind die Daten der Einzelpräparationen. + kennzeichnet eine signifikante negative Steigung.

Ebenso wie für die Anzahl intakter Zellen ergab sich für die Zellviabilität eine signifikante Abnahme mit der Zeit, die sich wiederum zwischen den Populationen nicht unterschied. Die Regressionsanalyse ergab für NEAC  $f(x) = (-0,42 \pm 0,10) \cdot x + (96,86 \pm 1,82)$  ( $p = 0,0005$ ) und für NSC  $f(x) = (-0,48 \pm 0,16) \cdot x + (93,62 \pm 3,01)$  ( $p = 0,0024$ ). Innerhalb von 10 Stunden fiel demnach die Zellviabilität bei beiden Populationen um 4 – 5% und erreichte Werte von 73% – 97% nach 28 h. Dabei ergaben zwei Messungen niedrigere Werte (37% und 55%), diese Zellsuspensionen wurden daraufhin verworfen.

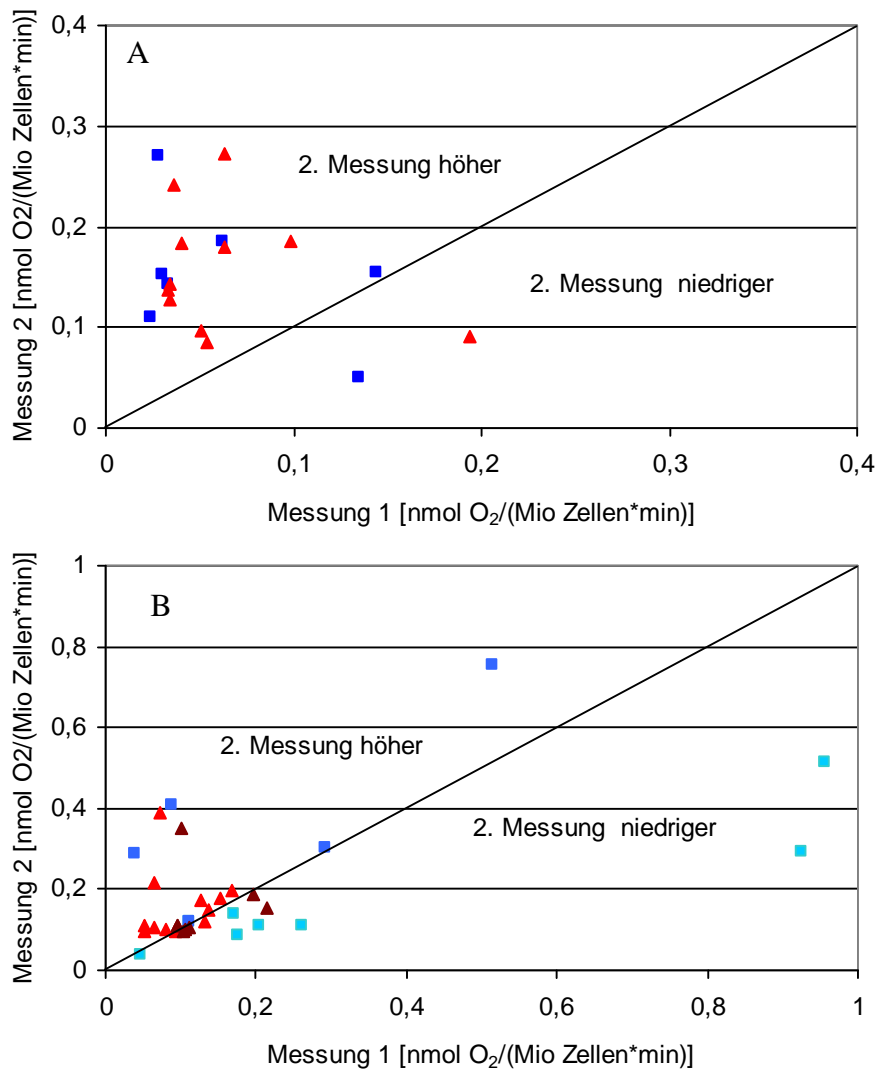
## Zelluläre Respiration

Für die Bestimmung des Zeit- bzw. Kälteinkubationseffektes auf die Respiration primärer (d.h. nicht kultivierter) Leberzellen wurden die in Tabelle 2.3 aufgeführten Vergleichsmessungen durchgeführt und deren Ergebnisse in Abbildung 3.10 für die jeweiligen Messtemperaturen (5°C und 23°C) dargestellt. Für die Darstellung wurde Messung 2 (Respirationsmessungen an Tag 2, bzw. bei 23°C Tag 2: Abendmessung) gegen Messung 1 (Respirationsmessungen an Tag 1 bzw. bei 23°C Tag 2: Morgenmessung) aufgetragen, wobei jeder Datenpunkt einer Vergleichsmessung einer Präparation entspricht. Die Diagonale ( $y = x$ ) stellt ein Maß für die Änderung der Respiration dar. Datenpunkte unterhalb der Diagonalen geben an, dass die Werte der Messung 2 niedriger waren als die der Messung 1. Oberhalb der Diagonalen liegen Datenpunkte, deren Messung 2 höhere Werte als



## Ergebnisse

Messung 1 ergaben. Befinden sich die Werte auf der Geraden, so entspricht Messung 2 der Messung 1, woraus folgt, dass die Inkubation keinen Einfluss auf die Respiration hatte.



**Abb. 3.10** Einfluss der Zeit bzw. Kälteinkubation auf die zelluläre Respiration bei A) 5°C 0h vs. 22h ■ NEAC: nordost-arktischer Kabeljau (n = 7), ▲ NSC: Nordseekabeljau (n = 11). B) 23°C: NEAC: nordost-arktischer Kabeljau, ■ 0h vs. 18 h (n = 7), ■ 18h vs. 28h (n = 5), NSC: Nordseekabeljau, ▲ 0h vs. 18 h (n = 13), ▲ 18h vs. 28h (n = 8). Die Diagonale verläuft mit  $y = x$ , d.h. Messung 1 = Messung 2. Dargestellt sind die Daten der Einzelpräparationen.

## Ergebnisse

---

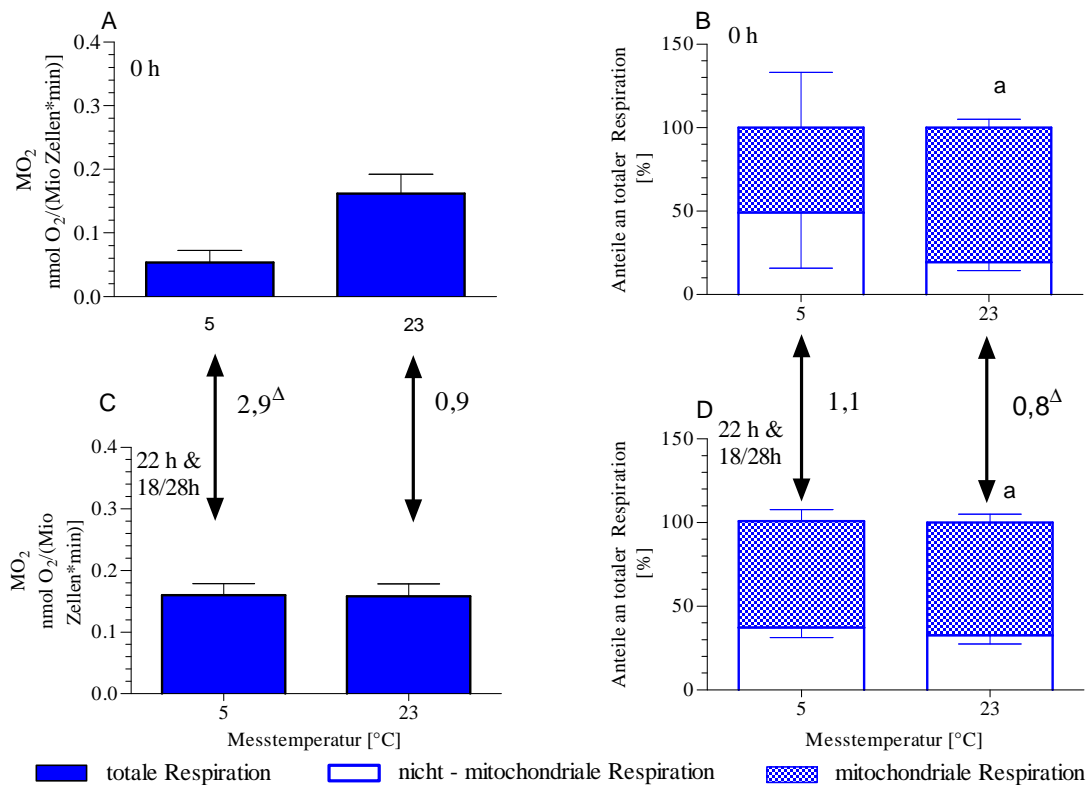
Aus Abbildung 3.10 wird ersichtlich, dass sich die Kälteinkubation je nach Messtemperatur unterschiedlich auf die Respirationsraten der isolierten Leberzellen auswirkte. Bei 5°C befanden sich die Messungen an Tag 2 meist oberhalb der Linie, was auf gesteigerte Respirationsraten hindeutete (Abb. 3.10 A), wohingegen sich bei 23°C meistens kein Unterschied zwischen Messung 1 und Messung 2 ergab (Abb. 3.10 B).

In beiden Populationen hatte der Faktor Zeit während des Messtages 2 (Messung zu Stunde 18 und 28) auf die Sauerstoffverbrauchsrate bei 23°C keinen signifikanten Einfluss (siehe Anhang Abb. 6.2 und Tab. 6.7). Daher wurde in den weiterführenden Auswertungen der gemittelte Wert aus Morgen- (18 h) und Abendmessung (28 h) dargestellt und als 18/28 h bezeichnet.

Für eine genauere Analyse wurde der Zeiteffekt auf die totale Zellrespiration getrennt nach Populationen dargestellt (Abb. 3.11 NEAC und 3.12 NSC). Nach einer 18 – 22 stündigen Lagerung bei 0°C steigerte sich die Respiration isolierter Leberzellen des nordost-arktischen Kabeljaus um den Faktor 2,9 bei 5°C ( $p = 0,0476$ ), während bei 23°C keine Änderung in den Sauerstoffverbrauchsrate gefunden wurde (Änderungsfaktor 0,9, Abbildung 3.11 A & B). Daraus ergab sich eine unterschiedliche Temperaturempfindlichkeit der zellulären Respiration zwischen den Messtagen. Wie in Tabelle 3.3 dargestellt, ergab sich an Tag 1 für NEAC bei einer Änderung von 5°C zu 23°C eine signifikante Erhöhung der Respiration ( $0,07 \pm 0,02$  zu  $0,16 \pm 0,03$  nmol O<sub>2</sub>/(Mio Zellen•min),  $p = 0,0152$ ) mit einem Q<sub>10</sub> von 1,66, während an Tag 2 der Q<sub>10</sub> desselben Temperaturspektrums bei 1,0 lag. Mit ähnlichem Muster änderte sich auch die Aktivierungsenergie ( $E_a$ ) von  $39,8 \pm 14,7$  kJ/mol an Tag 1 zu 0 kJ/mol an Tag 2 (siehe Tabelle für weitere Details).

Die Aufteilung der Respiration in mitochondriale und nicht-mitochondriale Anteile (Abb. 3.11 C & D) zeigte keine Änderung im mitochondrialen Anteil bei 5°C (Abb. 3.11 C), während bei 23°C der Anteil des Sauerstoffverbrauchs durch Mitochondrien signifikant abnahm ( $p = 0,0028$ ). Der Temperatureffekt (5°C zu 23°C) auf die mitochondriale Atmung zu Stunde 0 zeigte einen Trend zur Respirationszunahme mit einem Q<sub>10</sub>-Wert von 2,07 und einer  $E_a$  von  $46,61 \pm 12,26$  kJ/mol ( $p = 0,0946$ ). Nach 18/28 h und einer Lagerung bei 0°C wurde keine temperaturinduzierte Steigerung auf die mitochondriale Atmung verzeichnet (Q<sub>10</sub> = 0,84 und  $E_a = 0$  kJ/mol, bei 5 – 23°C).

## Ergebnisse

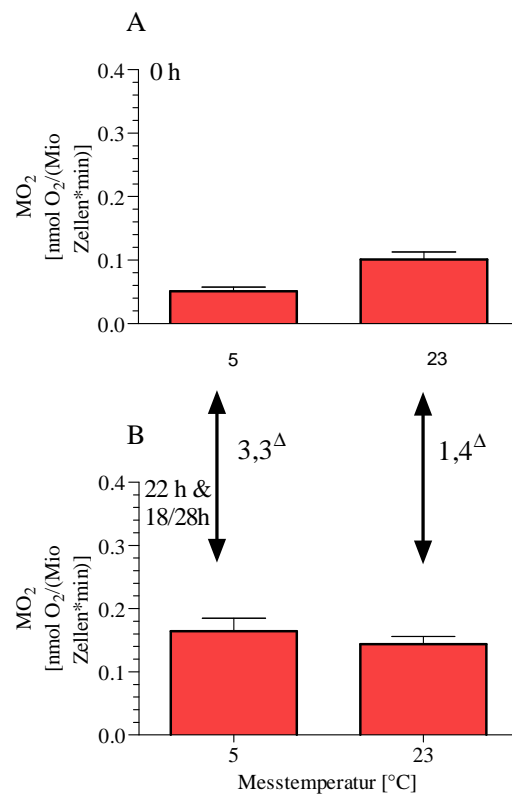


**Abb. 3.11** Einfluss der Zeit bzw. Kälteinkubation auf die zelluläre Respiration bei 5°C und 23°C isolierter Leberzellen des nordost-arktischen Kabeljau (NEAC), Hälterungstemperatur 10°C. Totale Respiration gemessen A) zum Zeitpunkt 0h und B) zum Zeitpunkt 22h bzw. 18/28h (n = 6) Anteil der mitochondrialen Atmung in % zur Totalrespiration C) zum Zeitpunkt 0h und D) zum Zeitpunkt 22h bzw. 18/28h (n = 2-7). Dargestellt sind MW ± SE bzw. mittlere Abweichung bei n = 2 Aus Gründen der Übersichtlichkeit werden in den stacked-Darstellungen (C & D) teilweise die negativen Fehlerbalken angegeben. Gleiche Buchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede zwischen den Datensätzen, Δ bezeichnet signifikante Änderung in der Respirationsrate um den jeweils genannten Faktor.

Ebenso wie für die Respiration isolierter Hepatozyten von NEAC, äußerte sich auch bei den Hepatozyten von NSC der Zeit- bzw. Inkubationseffekt in einer veränderten zellulären Respirationsrate (Abb. 3.12 A & B; nur totale Respiration, für NSC wurde an Tag 1 keine Inhibierung durchgeführt). Im Vergleich zu der Respirationsrate an Tag 1 (0 h) ergab sich an Tag 2 (22 h bzw. 18/28 h) eine um den Faktor 3,3 (p = 0,0003) erhöhte Respiration bei 5°C und, im Gegensatz zu der Beobachtung für NEAC, eine um den Faktor 1,4 (p = 0,0250) erhöhte Respiration bei 23°C. Wie auch beim arktischen Kabeljau konnte vor der Lagerung ein deutlicher Temperatureffekt auf die Zellrespiration beobachtet werden. Der Sauerstoffverbrauch erhöhte sich signifikant zwischen 5°C und 23°C von  $0,05 \pm 0,01$  nmol O<sub>2</sub>/(Mio Zellen•min) (5°C) auf  $0,10 \pm 0,01$  nmol O<sub>2</sub>/(Mio Zellen•min) (23°C) (p = 0,0011). Dies entsprach einem Q<sub>10</sub>-Wert von 1,4 und einer Aktivierungsenergie E<sub>a</sub> von

## Ergebnisse

$23,3 \pm 5,4$  kJ/mol. An Tag 2 hingegen wurde auch für NSC eine temperaturunabhängige Respiration beobachtet, was sich in einem  $Q_{10} = 1$  und einer  $E_a = 0$  kJ/mol widerspiegelt.



**Abb. 3.12** Einfluss der Zeit bzw. Kälteinkubation auf die zelluläre Respiration bei 5°C und 23°C isolierter Leberzellen des Nordseekabeljau (NSC), Hälterungstemperatur 10°C. Totale Respiration gemessen A) zum Zeitpunkt 0h und B) zum Zeitpunkt 22h bzw. 18/28h (n = 7-10) Dargestellt sind  $MW \pm SE$ .  $\Delta$  bezeichnet signifikante Änderung in der Respirationsrate um den jeweils genannten Faktor.

Zur besseren Übersicht wurden in den Tabellen 3.2 und 3.3 die mittleren  $MO_2$ -Werte während der verschiedenen Messzeitpunkte und die zugehörigen  $Q_{10}$ -Werte und Aktivierungsenergien zusammengefasst.

## Ergebnisse

**Tabelle 3.2** Totale Respirationsraten isolierter Hepatozyten von Kabeljau im Zeit- und Populationsvergleich

Dargestellt sind Mittelwert und Standardfehler mit der jeweiligen Versuchstierzahl in Klammern. n.s.: nicht signifikant, 18/28 h: Mittelwert aus 18h und 28 h Messung, \* kennzeichnen signifikante Unterschiede zwischen Tag 1 (0h) und Tag 2 (22h & 22/28h)

Messzeitpunkt	Mess-temperatur	NEAC MO <sub>2</sub> [nmol O <sub>2</sub> /(Mio Zellen•min)]	NSC MO <sub>2</sub> [nmol O <sub>2</sub> /(Mio Zellen•min)]	Signifikanz NEAC : NSC
0 h	5°C	0,07 ± 0,02 (n = 7)	0,05 ± 0,01 (n = 13)	n.s.
	23°C	0,16 ± 0,03 (n = 6)	0,10 ± 0,01 (n = 14)	p = 0,02
22 h	5°C	0,16 ± 0,02 (n = 8)*	0,17 ± 0,02 (n = 10)*	n.s.
18/28 h	23°C	0,16 ± 0,02 (n = 7)	0,15 ± 0,01 (n = 13)*	n.s.

**Tabelle 3.3** Q<sub>10</sub>-Werte und Aktivierungsenergie (E<sub>a</sub>) der totalen Zellrespiration isolierter Hepatozyten von Kabeljau im Zeit- und Populationsvergleich (Temperaturbereich 5 – 23°C).

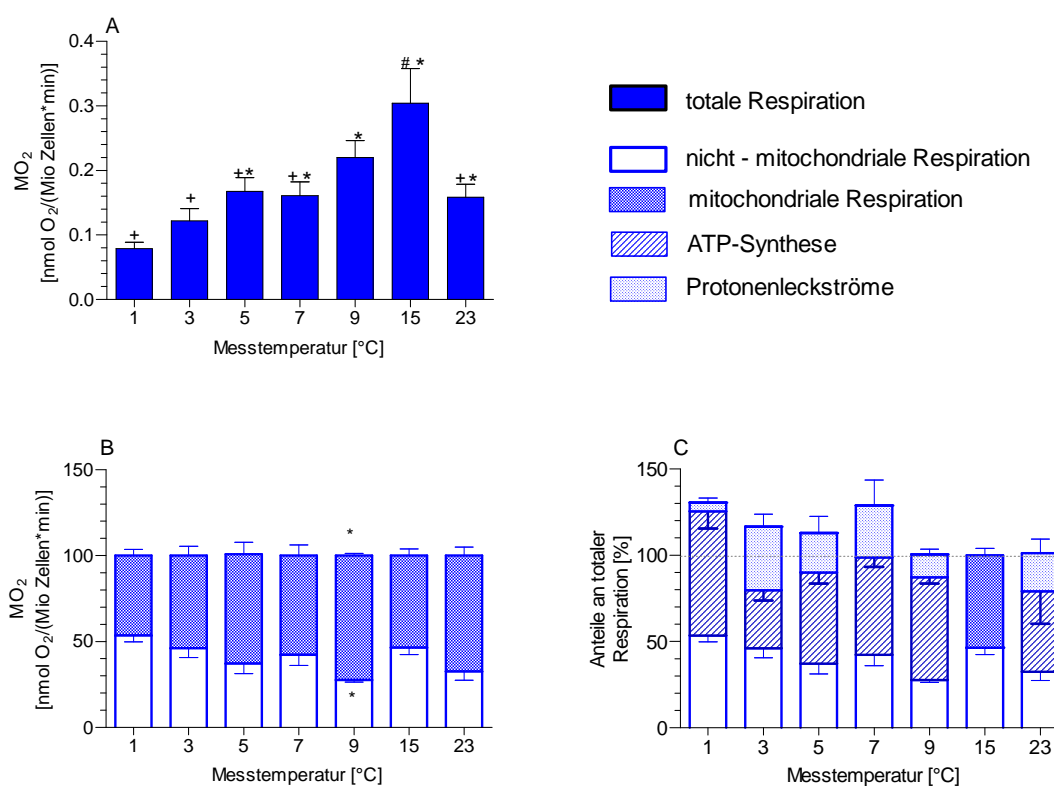
#: Messung ergab negative Aktivierungsenergien, diese wurde aufgrund der biologischen Relevanz auf 0 gesetzt (gemessene Werte siehe Anhang Tab. 6.11)

Messzeitpunkt		NEAC	NSC	Signifikanz NEAC : NSC
0 h	Q <sub>10</sub>	1,66	1,42	
	E <sub>a</sub> [kJ/mol]	39,77 ± 14,67	23,32 ± 5,39	p = 0,028
22 h & 18/28 h	Q <sub>10</sub>	1,00	0,93	
	E <sub>a</sub> [kJ/mol]	0 <sup>#</sup>	0 <sup>#</sup>	n.s.

Aufgrund des Zeit- bzw. Inkubationseffektes (Lagerung bei 0°C) und der daraus resultierenden Änderung im Sauerstoffverbrauch der primären Hepatozyten beider Kabeljaupopulationen sind für den Aspekt des Populationsunterschiedes vor allem die Daten geeignet, die an Tag 1 (Zeitpunkt 0 h) erhoben wurden (Tab. 3.2). Zwischen den Populationen wurde kein signifikanter Unterschied in der zellulären Respiration bei 5°C gefunden, obwohl NEAC einen leicht höheren Wert aufwies. Bei 23°C hingegen ergab sich ein deutlicher Unterschied im Zellstoffwechsel zwischen den Populationen. Im Vergleich zum zellulären Sauerstoffverbrauch von NSC hatte NEAC einen um den Faktor 1,6 signifikant erhöhten zellulären Sauerstoffverbrauch (p = 0,02). Dieser Populationsunterschied äußerte sich ebenfalls in der Temperaturabhängigkeit des zellulären Sauerstoffverbrauchs durch signifikant unterschiedliche Aktivierungsenergien der totalen Respiration von NEAC und NSC.

## 3.4 LEBERZELLEN: TEMPERATUREFFEKT AUF RESPIRATION UND BETEILIGTE PROZESSE

Die Untersuchung zum Temperatureffekt an Tag 2 auf die totale Zellrespiration und daran beteiligte Prozesse ergab für beide Populationen ein ähnliches Bild eines hyperbolischen Zusammenhanges. In der Abbildung 3.13 wurden die Datensätze für NEAC zusammengefasst. Es zeigte sich im unteren Temperaturbereich eine signifikante Steigung im zellulären Sauerstoffverbrauch, während oberhalb von 5°C keine signifikante Änderung der Sauerstoffverbrauchsraten zu erkennen war. Lediglich der Wert für 15°C stach dabei heraus und war signifikant unterschiedlich zu allen Werten außer 9°C.



**Abb. 3.13** Einfluss der Temperatur nach Kälteinkubation (an Tag 2) isolierter Hepatozyten des nordostarktischen Kabeljaus (NEAC, Hälterungstemperatur 10°C) auf A) die zelluläre Respiration (n = 7-9), B) die mitochondriale bzw. nicht-mitochondriale Atmung (in % vom Totalsauerstoffverbrauch, n = 3-9) und C) den Sauerstoffverbrauch durch ATP-Synthese (n = 3-8) und Protonenleck (n = 2-5) sowie auf den nicht-mitochondrialen Sauerstoffverbrauch (in % vom Totalsauerstoffverbrauch). Kennzeichnung der einzelnen Prozesse siehe Legende. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardfehler bzw. mittlere Abweichung bei n = 2. Aus Gründen der Übersichtlichkeit wurden in den stacked-Darstellungen (B & C) teilweise die negativen Fehlerbalken angegeben. Für 15°C liegen keine Daten für eine Inhibierung mit Oligomycin vor, daher wurde hier die undifferenzierte mitochondriale Respiration dargestellt. \* kennzeichnet signifikanten Unterschied zu Daten bei 1°C. # kennzeichnet signifikanten Unterschied zu Daten bei 23°C. + kennzeichnet signifikanten Unterschied zu Daten bei 15°C.

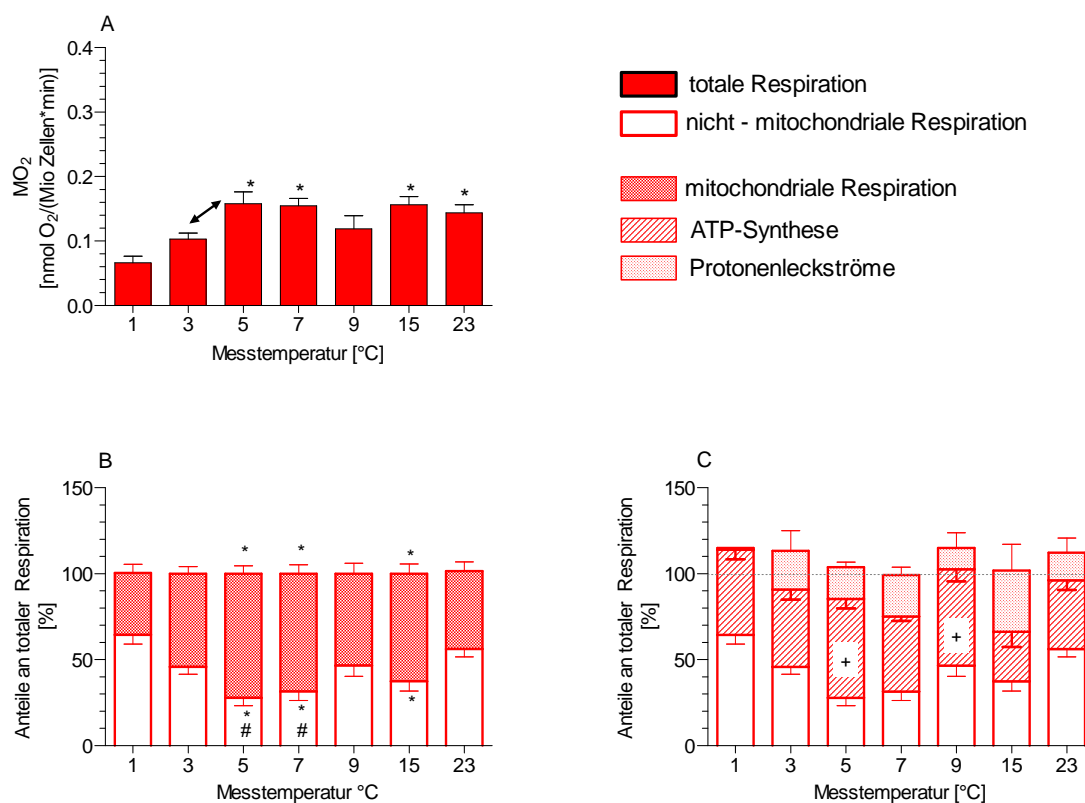
## Ergebnisse

---

Durch Einsatz der Inhibitoren Kaliumcyanid (KCN) und Oligomycin wurden in einer Annäherung die prozentualen Anteile am zellulären Sauerstoffverbrauch durch mitochondriale Atmung, ATP-Synthese, Protonenleck, und nicht-mitochondriale Respiration bestimmt. Im untersuchten Temperaturspektrum trug die mitochondriale Atmung zwischen 46% und 72% zu der totalen Respiration bei (Abb. 3.13 B). Einzig zwischen den Messtemperaturen 1°C und 9°C wurde eine signifikante Änderung gefunden. Im Vergleich zu 1°C erhöhte sich bei 9°C der prozentuale Anteil der mitochondrialen Respiration um den Faktor 1,6. Die weitere Unterteilung der mitochondrialen Atmung in ATP-Synthese und Protonenleck ergab keine signifikante temperaturabhängige Änderung der Anteile (Abb. 3.13 C). Die Werte für ATP-Synthese lagen bei  $53,46 \pm 5,26\%$  und für Protonenleck bei  $20,48 \pm 4,72\%$  der totalen Respiration im Temperaturbereich 1°C bis 23°C.

## Ergebnisse

Wie in der Abbildung 3.14 dargestellt, ergab sich für den Nordseekabeljau, in Bezug auf den Temperatureffekt, ein ähnliches Bild. Die totale Respiration stieg zwischen 1°C bis 5°C signifikant an, während in den höheren Temperaturen keine weitere Änderung des Sauerstoffverbrauchs erfolgte (Abb. 3.14 A).



**Abb. 3.14** Einfluss der Temperatur nach Kälteinkubation (an Tag 2) isolierter Hepatozyten des Nordseekabeljaus (NSC, Hälterungstemperatur 10°C) auf A) die zelluläre Respiration (n = 8 - 13), B) die mitochondriale bzw. nicht-mitochondriale Atmung (in % vom Totalsauerstoffverbrauch, n = 7-10) und C) den Sauerstoffverbrauch durch ATP-Synthese (n = 4-7) und Protonenleck (n = 1-5; nicht zu sehen bei 1°C aufgrund n=1)) sowie auf den nicht-mitochondrialen Sauerstoffverbrauch (in % vom Totalsauerstoffverbrauch). Kennzeichnung der einzelnen Prozesse siehe Legende. Dargestellt sind MW ± SE. Aus Gründen der Übersichtlichkeit wurden in den stacked-Darstellungen (B & C) teilweise die negativen Fehlerbalken angegeben. \* kennzeichnet signifikanten Unterschied zu Daten bei 1°C. # kennzeichnet signifikanten Unterschied zu Daten bei 23°C. + kennzeichnet signifikanten Unterschied zu Daten bei 15°C. ↔ kennzeichnet einen signifikanten Anstieg zwischen zwei aufeinander folgenden Temperaturpunkten.

Der prozentuale Anteil der mitochondrialen Respiration am totalen Sauerstoffverbrauch (Abbildung 3.14 B) war signifikant erhöht bei 5°C, 7°C und 15°C im Vergleich zu 1°C und 23°C (nicht zu 15°C). Bei diesen Temperaturen lag die mitochondriale Atmung zwischen 62% und 72% im Vergleich zu 36% und 45% (1°C & 23°C). Wurde der mito-

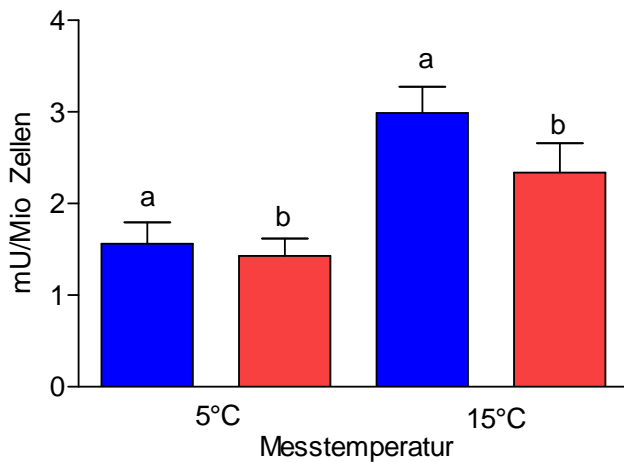


## Ergebnisse

chondriale Anteil aufgeschlüsselt in Sauerstoffverbrauch durch ATP-Synthese und Protonenleck (Abb. 3.14 C), ergaben sich signifikant höhere Anteile für ATP-Synthese bei 5°C und 9°C im Vergleich zu 15°C.

### 3.5 CITRATSYNTHASE-AKTIVITÄT

Die Aktivität der Citratsynthase (CS), gemessen in den eingefrorenen Proben isolierter Hepatozyten von Tag 2, zeigte für beide Populationen (NEAC und NSC) einen deutlichen Temperatureffekt (Abb. 3.15). Die CS-Aktivität war signifikant höher bei 15°C als bei 5°C (NEAC:  $1,56 \pm 0,23$  mU/Mio Zellen (5°C) vs.  $2,99 \pm 0,28$  mU/Mio Zellen (15°C),  $p = 0,0074$ ; NSC:  $1,43 \pm 0,19$  mU/Mio Zellen (5°C) vs.  $2,34 \pm 0,32$  mU/Mio Zellen (15°C),  $p = 0,0234$ ). Zwischen den Populationen wurde kein signifikanter Unterschied in der CS-Aktivität gefunden, obwohl NEAC leicht erhöhte Werte aufzeigte. Die berechneten  $Q_{10}$ -Werte und Aktivierungsenergien waren ähnlich zwischen den Populationen (Tabelle 3.4).



**Abb. 3.15** Einfluss der Temperatur auf die Citratsynthase-Aktivität isolierter Hepatozyten der untersuchten Kabeljaupopulationen, Hälterungstemperatur 10°C.

■ NEAC: nordost-arktischer Kabeljau (n = 4-6), ■ NSC: Nordseekabeljau (n = 9-16). Dargestellt sind MW  $\pm$  SE. Gleiche Buchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede zwischen den Daten.

**Tabelle 3.4.** Aktivierungsenergie ( $E_a$ ) und  $Q_{10}$ -Werte der Citratsynthase-Aktivität isolierter Hepatozyten der untersuchten Kabeljaupopulationen im Bereich 5 – 15°C Messtemperatur.

NEAC: nordost-arktischer Kabeljau, NSC: Nordseekabeljau, n.s.: nicht signifikant. Angegeben sind MW + SE

	NEAC	NSC	Signifikanz: NEAC : NSC
$Q_{10}$	$1,77 \pm 0,20$	$1,72 \pm 0,01$	n.s.
$E_a$ [kJ/mol]	$32,47 \pm 15,40$	$28,90 \pm 14,70$	n.s.

## 4 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss der Temperatur auf die Respiration von Hepatozyten zweier Kabeljaupopulationen von *Gadus morhua* (Barents- und Nordsee) untersucht. Neben den zellulären Daten wurde der Standardstoffwechsel der Tiere erfasst, um diese zwei Aspekte in einen Zusammenhang stellen zu können.

### 4.1 KÖRPERINDIZES

Der in dieser Arbeit ermittelte Konditionsfaktor (K) lag sowohl für kurzzeit- wie auch für langzeitakklimierte Tiere zwischen 0,64 und 0,95, wobei kein Unterschied zwischen den Populationen gefunden wurde (Abb. 3.3, Anhang Tabelle 6.1). In der Literatur werden für *Gadus morhua* mit gutem Ernährungszustand Konditionsfaktoren von 0,9 bis über 1,0 angegeben (0,93 in Lambert und Dutil 1997a, 1,05 in Dutil et al. 1999, 0,99 – 1,27 in Schwalme und Chouinard 1999). In freier Natur fanden sich jedoch K-Werte unterhalb dieses Optimums (0,69 – 0,93 in Lambert und Dutil 1997a), die zudem jahreszeitlichen Schwankungen ausgesetzt sind (Lambert und Dutil 1997b). Als Übergangspunkt von einer guten zu einer schlechten körperlichen Verfassung wird  $K = 0,7$  angegeben (Schwalme und Chouinard 1999). Dies wurde im Hungerexperiment nach 3 Wochen ohne Futter erreicht (0,51 – 0,84 in Dutil et al. 2006). Der hier bestimmte Konditionsfaktor lag demnach im Bereich einer mittleren Kondition, die auch im Feld anzutreffen ist. Der Konditionsfaktor des langzeitgehälterten Nordseekabeljau war im Juli 2006 schon einmal bestimmt worden und zeigte mit Werten zwischen 0,69 und 0,94 (siehe Anhang Tabelle 6.3) keine signifikante Änderung in diesem Zeitraum. Ein Einfluss der Hungerphase (siehe 2.1 und 2.4, bessere Zellisolierung aus fettarmer Leber) auf die Kondition der Tiere konnte daher ausgeschlossen werden. Die Variation des Konditionsfaktors zwischen einzelnen Tieren ist mit dem hierarchischen Fressverhalten von Fischen zu erklären (McCarthy et al. 1993).

Der hier gemessene hepatosomatische Index (HSI) zeigte keinen Populationseffekt, lag jedoch mit Werten zwischen 0,54 und 1,9 (Abbildung 3.4, Anhang Tabelle 6.1) deutlich unter manchen Literaturwerten für Kabeljau von 2,3 bis 7,2 (2,3 – 5,23 (0 – 10°C akklimiert) in Lambert und Dutil 1997a; 1997b, 5,7 – 7,2 (6 – 10°C akklimiert) in Dutil et al. 2006, 2,11 – 5,27 (8°C akklimiert) in Holdway und Beamish 1984). In Wachstumsexperimenten können diese Werte noch um ein Vielfaches überschritten werden ( $10,8 \pm 0,9$  (12°C akklimiert) in Lannig et al. 2003). Die in dieser Arbeit erhobenen Daten lagen in

dem Bereich, der in Hungerexperimenten gefunden wurde ( $0,76 \pm 0,09$  ( $9^{\circ}\text{C}$  akklimiert) nach 107 Tage Hunger in Black und Love 1986,  $0,65 \pm 0,05$  ( $8^{\circ}\text{C}$  akklimiert) nach 10 Wochen Hunger in Guderley et al. 1996). Werte dieser Größenordnung sind Indikatoren für geringe Energieeinlagerungen und wurden auch in anderen Laborexperimenten mit Kabeljau der beiden Populationen gefunden (Lucassen et al. 2006: NSC  $1,04 \pm 0,05$ , NEAC  $1,27 \pm 0,1$ , jeweils  $10^{\circ}\text{C}$  akklimiert und Fischer 2002: NSC: 1,2, NEAC 0,7, jeweils  $12^{\circ}\text{C}$  akklimiert).

Bei der Leber handelt es sich um das Speicherorgan der Fische (Lambert und Dutil 1997a). Die zweiwöchige Hungerphase beeinflusste daher, wie zu erwarten war, den hepatosomatischen Index, indem Energiereserven (Lipide) abgebaut bzw. nicht angelegt wurden.

Der maximale gonadosomatische Index (GSI) der weiblichen Versuchstiere (Abbildung 3.5, Anhang 6.1) lag in dieser Arbeit bei 1,54, der der Männchen maximal bei 0,4. Zusätzlich zu der Sichtkontrolle bei der Präparation veranschaulichte der niedrige GSI die Juvenilität der untersuchten Kabeljauexemplare (Weibchen: Geschlechtsreif  $\geq 2,5$ , Männchen: Geschlechtsreif  $\geq 1$  in Burton et al. 1997; Schwalme und Chouinard 1999). Damit kann ausgeschlossen werden, dass es aufgrund von Gonadenreifung zu einer Verlagerung von Energiereserven aus der Leber in die Reproduktion gekommen war (Schwalme und Chouinard 1999). Das Geschlechterverhältnis der Versuchstiere war etwa 1:1, so dass sich die Unterschiede zwischen Männchen und Weibchen nicht auf die erhobenen Daten auswirkten.

Die bestimmten Parameter K, HSI und GSI zeigten keinen Unterschied zwischen den Populationen. Ein Einfluss dieser Indizes auf den Populationsvergleich der Raten von Standardstoffwechsel und Zellrespiration konnte somit ausgeschlossen werden.

### 4.2 GANZTIERRESPIRATION

Während der Messungen zum Standardstoffwechsel von Kabeljau wurde ein möglicher Einfluss der Wasserqualität (d.h. Ammonium- und Nitrit-Konzentrationen) festgestellt. Dieser Effekt soll hier kurz diskutiert werden. Dabei legen Literaturbefunde nahe, dass Ammonium die beobachteten Phänomene verursacht hatte.

Ammonium wirkt in hoher Konzentration im umgebenden Wasser toxisch, da bei einem pH Wert von 8 ca. 4% als Ammoniak vorliegen. Ammoniak gilt als starkes Zellgift und kann zu Störungen im Energiestoffwechsel führen. Ammoniak erhöht durch die Aufnahme

eines Protons den intrazellulären pH-Wert ( $\text{pH}_i$ ) und führt damit zu Änderungen in den Proteinkonformationen (Penzlin 2005). Des Weiteren muss unter Energieverbrauch der  $\text{pH}_i$  reguliert sowie  $\text{NH}_4^+$  zum Ladungsausgleich unter Energieverbrauch über Kanäle wieder aus der Zelle befördert werden (Müller 2004). Dieser Effekt könnte die beobachtete positive Korrelation zwischen Standardstoffwechsel und erhöhten Ammoniumwerten im Umgebungswasser bei Kabeljau erklären. Auch in juvenilen Seepferdchen (*Hippocampus abdominalis*) und der Regenbogenforelle (*Salmo gairdneri*) wurde unter Ammoniumstress eine Erhöhung der Respirationsraten beobachtet (Smart 1978; Adams et al. 2001). Lang et al. (1987) beschrieben eine erhöhte Ventilationsrate sowie vermehrte Schwimmaktivitäten bei der Regenbogenforelle *Salmo gairdneri* unter Ammoniumkonzentrationen (0,25 mg/L), die noch unter denen lagen, die in dieser Arbeit zu einem sichtbaren Effekt führten (ca. 0,35 mg/L). Die Autoren führten die erhöhte Ventilation auf eine niedrigere Affinität von  $\text{O}_2$  zu Hämoglobin bzw. auf eine verringerte Anzahl an zirkulierenden Erythrozyten zurück. Inwieweit dies auch für Kabeljau zutrifft, ist bisher nicht bekannt. Die Auswirkungen der Wasserqualität auf den Energiestoffwechsel des Kabeljau sollten in einem kontrollierten Experiment weiter überprüft werden. Die in dieser Arbeit als „hoch“ bezeichneten Ammoniumkonzentrationen lagen noch im „akzeptablen“ Bereich (Tabelle 3.1). Es sollte getestet werden, inwiefern diese Konzentrationen auch tatsächlich akzeptabel sind. Dabei sollte der Aspekt einer möglichen Beeinflussung durch Parallelmessungen mit untersucht werden. Zwar bestand zwischen den Fischen während des Experiments kein visueller Kontakt, doch ist nicht auszuschließen, dass sich die Tiere gegenseitig olfaktorisch beeinflusst haben.

Vor dem Hintergrund eines möglichen Zusammenhangs zwischen Ammoniumkonzentration im Wasser und dem Standardstoffwechsel des Kabeljau zeigte sich beim Vergleich mit Werten aus der Literatur (Tabelle 4.1), dass die hier bei niedriger Ammoniumkonzentration gemessenen Werte in dem Bereich derer liegen, die Schumann und Steffensen (1997) gemessen hatten. Die Daten anderer Arbeiten (Claireaux et al. 2000, Fischer 2002, Zittier 2006, Lurman 2007) zeigen dagegen Sauerstoffverbrauchsrate, die hier bei hohen Ammoniumwerten auftraten. Leider kann über die Wasserqualität in den in der Tabelle aufgeführten Arbeiten keine Aussage gemacht werden. Ein genaues Monitoring der Ammoniumgehalte erscheint bei den Messungen der Standardstoffwechselrate beim Kabeljau sinnvoll.

## Diskussion

In Übereinstimmung mit den Studien von Fischer (2002) und Lurman (2007) ergab sich kein Unterschied im Standardstoffwechsel der Kabeljaupopulationen verschiedener Habitate (Barentssee vs. Nordsee, Akklimatationstemperatur = Messtemperatur; siehe Tab. 4.1).

**Tabelle 4.1:** Standardstoffwechsel für Kabeljau *G. morhua* in Abhängigkeit von Population bzw. Habitat

Alle  $\text{MO}_2$ -Werte auf 1 kg Tiergewicht normalisiert, + kennzeichnet aus Schwimmtunnelversuchen interpolierte Datensätze, # in einem Respirometer befanden sich 3 Fische, \* aus den Literaturdaten normiert auf 1 kg; angegeben sind MW  $\pm$  SD

Referenz	Population/Herkunft	Akklimations-/ Messtemperatur [°C]	Tiergewicht [g]	$\text{MO}_2$ normiert [mg $\text{O}_2$ /(kg·h)]
Schurmann und Steffensen 1997	Öresund/ Norwegen	10°C	158 $\pm$ 40	39,4 $\pm$ 7,5* +
Fischer 2002	Nordsee	12°C	223 – 433	59,5 $\pm$ 20,6
	Barentssee	12°C	169 – 333	65,5 $\pm$ 3,9
Zittier 2006	Barentssee (Zucht, F1-Generation)	10°C	83 $\pm$ 19	61,7 $\pm$ 14,7
Claireaux et al. 2000	Canada (Scotian Shelf)	10°C	950 – 1850	54,4 $\pm$ 4,1 <sup>#</sup>
Lurman 2007	Barentssee (Zucht, F1-Generation)	10°C	959 $\pm$ 180	ca. 65 <sup>+</sup>
	Nordsee	10°C	712 $\pm$ 230	ca. 60 <sup>+</sup>
Diese Studie Niedrige [ $\text{NH}_4^+$ ]	Barentssee (Zucht, F1-Generation)	10°C	409 $\pm$ 55	35,73 $\pm$ 3,0
	Nordsee	10°C	745 $\pm$ 52	41,42 $\pm$ 5,5
Diese Studie Hohe [ $\text{NH}_4^+$ ]	Barentssee (Zucht, F1-Generation)	10°C	409 $\pm$ 55	60,59 $\pm$ 4,7
	Nordsee	10°C	745 $\pm$ 52	61,65 $\pm$ 1,8

Da der Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit auf dem zellulären Stoffwechsel und seiner Rolle im Energiehaushalt des Tieres lag, werden die Standardstoffwechselraten der Populationen im späteren Kapitel 4.3.3 ausführlich behandelt.

### 4.3 LEBERZELLEN:

#### 4.3.1 Isolation

Die Fütterung der Versuchstiere war für 2 Wochen verringert bzw. teilweise eingestellt worden, um den Lipidgehalt der Leber zu reduzieren. An anderer Stelle wurde bei Kabeljau nach 107 Tagen Hunger eine Reduktion des Fettgehalts der Leber von  $65,9 \pm 4,3\%$  auf  $4,7 \pm 1,2\%$  beschrieben (Black und Love 1986). Bei den hier untersuchten Tieren zeigte sich anschließend auch optisch ein verringerter Fettgehalt (rötliche statt weißliche Färbung der Leber). Dies führte zu einer verbesserten Präparation der Hepatozyten. Ein eventueller Effekt des Hungerstoffwechsels auf die späteren Zellrespirationsmessungen konnte dabei jedoch nicht ausgeschlossen werden. Dies wird in einem späteren Absatz diskutiert (siehe 4.3.3).

#### 4.3.2 Abnahme Zellzahl und Viabilität

Trotz Abnahme der intakten Zellen mit der Zeit lag die Zellzahl während des gesamten Versuchsverlaufes im Bereich von 2 – 4 Millionen Zellen pro Milliliter. Diese Werte fanden sich auch in anderen Arbeiten mit frisch isolierten Leberzellen aus verschiedenen Fischarten ( $2 \cdot 10^6$  aus *Lampetra fluviatilis* in Gamper et al. 2001,  $2,5 \cdot 10^6$  von *Oncorhynchus mykiss* in McKinley und Hazel 2000) und in Zellkulturen von *Zoarcetes viviparus* ( $2 \cdot 10^6$  in Eckerle in Vorber.). In Testversuchen dieser Arbeit hatte sich gezeigt, dass in Messungen mit geringeren Konzentrationen die Sauerstoffverbrauchsdaten nicht mehr detektiert werden konnten.

Die gemessenen Respirationsraten wurden auf die aktuelle Zellzahl bezogen. Da Respirationsrate und Zellzahl in einem linearen Verhältnis stehen (Savina und Gamper 1998), konnte eine Auswirkung der Zellabnahme auf die Respirationsdaten ausgeschlossen werden.

Der Zustand der Zellen (Viabilität) wurde in dieser Arbeit mit Hilfe der Trypan Blau-Färbung bestimmt. Ein Nachteil dieser Methode ist, dass nur schwere Schädigungen beobachtet werden können. Aufgrund seiner leichten Durchführung und Schnelligkeit eignet sie sich dennoch am besten, um den Zustand der Zellsuspension zu erfassen (Pfaff et al. 1980) und wird in der Literatur zahlreich verwendet (u.a. in Schwarzbaum et al. 1992; Smith und Houlihan 1995; Langenbuch und Pörtner 2003; Mark et al. 2005; Busk und Boutilier 2005).

In bisherigen Arbeiten zur Respiration von Hepatozyten aus Fischen wurde immer eine Viabilität von mindestens 90% angegeben (90-95% in Savina und Gamper 1998; Gamper und Savina 2000; Gamper et al. 2001, 90% in Pannevis und Houlihan 1992, >95% in Krumschnabel et al. 2001; Mark et al. 2005). Ähnlich wie bei Vreugdenhil et al. (1997, an Rattenhepatozyten) war die Zellviabilität in der vorliegenden Arbeit geringer, jedoch überwiegend über 80% (siehe Anhang Tab. 6.6). Über den Einfluss der Zellviabilität auf Respirationsraten isolierter Zellen wurden keine Daten in der Literatur gefunden. Eigene Vorversuche zeigten eine deutliche Erhöhung der Zellrespirationsrate erst ab einer Viabilität von  $\leq 40\%$ . Obwohl dieser Aspekt bisher nicht in der Literatur diskutiert wurde, ist ein möglicher Effekt auf die Messung durch beschädigte Zellen nicht auszuschließen. Nekrotische (sterbende) Zellen verlieren ihr Cytoplasma und die darin enthaltenen lysosomalen (abbauenden) Enzyme an die Umgebung. Da hierdurch die umliegenden Zellen gestresst bzw. geschädigt werden können (Karp 2005), kann es vermutlich zu veränderten Stoffwechselprozessen kommen.

In vorangegangenen Arbeiten ging man, basierend auf Untersuchungen an Ratten, außerhalb von Kulturbedingungen generell von einer Überlebenszeit der Hepatozyten von 4 – 6 Stunden aus (Berry et al. 1997). Dies konnte jedoch in dieser Arbeit widerlegt werden, da hier auch noch nach 28 Stunden ohne besondere Kulturmaßnahmen (z.B. Inkubation in Leibowitz L-15 Medium mit Antibiotika (Eckerle in Vorber.)), nur durch den Zusatz von Glucose und Lagerung bei tiefen Temperaturen (0°C), eine hohe Viabilität erhalten werden konnte.

### **4.3.3 Leberzellen: Populationseffekt**

Dies ist, meines Wissens nach, die erste Untersuchung zum zellulären Sauerstoffverbrauch von Kabeljauhepatozyten. Um dennoch einen Eindruck der Größenordnung der hier gefundenen Respirationen zu bekommen, fand eine Gegenüberstellung mit Sauerstoffverbrauchswerten von Leberzellen verschiedener Fischarten statt (siehe Tabelle 4.2). Die Rate des in dieser Arbeit bestimmten zellulären Sauerstoffverbrauchs lag dabei niedriger als in den bisherigen Arbeiten (Krumschnabel et al. 1997, Savina und Gamper 1998, Mark 2005). In der Arbeit von Krumschnabel (1997) hatte sich eine Abhängigkeit des zellulären Sauerstoffverbrauchs (Hepatozyten von *Oncorhynchus mykiss* und *Rutilus rutilus*) von dem Ernährungsstatus der Tiere (*ad libitum* vs. 1 Fütterung pro Tag) gefunden. Bei einer Messtemperatur von 8°C war der Sauerstoffverbrauch der Hepatozyten von *ad libitum* gefütterten Tieren um das 3fache, bei 15°C um das 2,4fache und bei 20°C um das 1,8fache

## Diskussion

erhöht, was zu einer geringeren Temperaturabhängigkeit bei der Zellrespiration führte (siehe Tabelle 4.2). Möglicherweise hatte die eingeschränkte Fütterung in dieser Arbeit einen Einfluss auf die Respirationraten und erklärt eventuell die niedrigeren Respirationraten im Vergleich mit der Literatur. Dieser Effekt musste jedoch für eine gelungene Zellpräparation und aus zeitlichen Gründen in Kauf genommen werden. Interessanterweise entsprachen die  $Q_{10}$ -Werte der Zellrespirationen von Kabeljau, trotz eingeschränkter Fütterung, eher den Daten von *ad libitum* gefütterten Regenbogenforellen. Der Effekt der Fütterung auf den Stoffwechsel isolierter Hepatozyten von Kabeljau bleibt aber zu untersuchen.

Ein Einfluss des Ernährungsstatus auf etwaige Populationsunterschiede zwischen NEAC und NSC wurde ausgeschlossen, da beide Versuchsgruppen die gleiche Behandlung erfuhren (verringerte Fütterung) und die Tiere zudem, wie oben schon erwähnt, keinen Unterschied in den Körperindizes zeigten.

**Tabelle 4.2.** Respirationraten isolierter Fischhepatozyten in Abhängigkeit von Akklimations- und Messtemperatur.

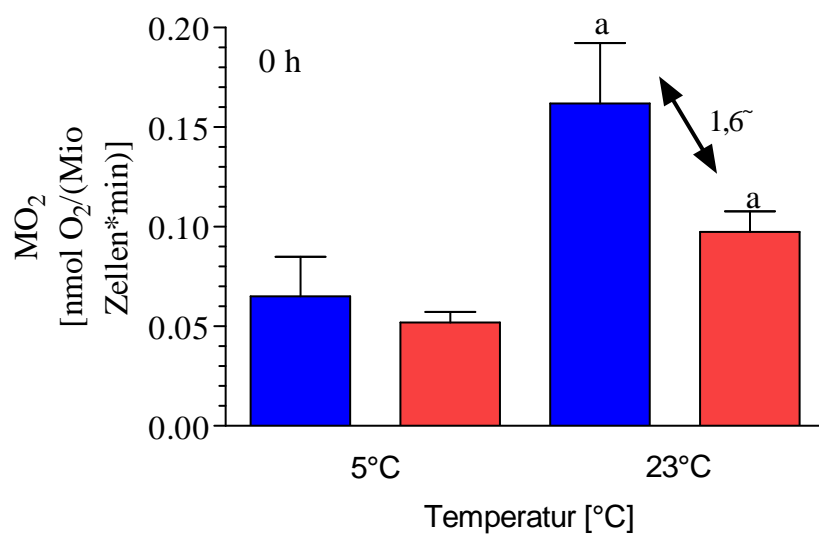
Messungen erfolgten jeweils am Zellpräparationstag

Referenz	Art (Akklimationstemperatur)	Respirationsrate mit Messtemperatur [nmol O <sub>2</sub> /(Mio Zellen•min)]	Q <sub>10</sub> der Respirationsrate
Savina und Gamper 1998	Flussneunauge (2-6°C) ( <i>Lampetra fluviatilis</i> )	20°C: November 1,89 ± 0,16 20°C: Februar 0,66 ± 0,07	
Mark et al. 2005	<i>Trematomus euleptidotus</i> (0-1°C)	3°C: ca. 0,12 15°C: ca. 0,5	3,28
Krummschnabel et al. 1997	Regenbogenforelle (5°C) ( <i>Oncorhynchus mykiss</i> ) <i>ad libitum</i> -Fütterung	8°C: 0,22 ± 0,02 15°C: 0,45 ± 0,05 20°C: 0,75 ± 0,05	2,90 (8-15°C) 2,82 (8-20°C) 2,72 (15-20°C)
	Regenbogenforelle (15°C) ( <i>Oncorhynchus mykiss</i> ) Fütterung 1x/Tag	8°C: 0,22 ± 0,2 15°C: 0,44 ± 0,03 20°C: 0,58 ± 0,06	2,71 (8-15°C) 2,26 (8-20°C) 1,76 (15-20°C)
	Regenbogenforelle (15°C) ( <i>Oncorhynchus mykiss</i> ) <i>ad libitum</i> -Fütterung	8°C: 0,68 ± 0,04 15°C: 1,09 ± 0,10 20°C: 1,22 ± 0,07	1,98 (8-15°C) 1,63 (8-20°C) 1,24 (15-20°C)
Diese Studie	NEAC (10°C) ( <i>Gadus morhua</i> )	5°C: 0,07 ± 0,05 23°C: 0,16 ± 0,07	1,66
	NSC (10°C) ( <i>Gadus morhua</i> )	5°C: 0,05 ± 0,02 23°C: 0,10 ± 0,04	1,42



## Diskussion

Wie zu erwarten war, stiegen die Zellrespirationsraten beider Populationen mit der Temperatur an, wobei sich die Messtemperatur jedoch unterschiedlich auf den Zellstoffwechsel der untersuchten Kabeljaupopulationen auswirkte (Abbildung 4.1). Zeigte sich bei 5°C Messtemperatur kein Unterschied im zellulären Sauerstoffverbrauch zwischen NEAC und NSC, wurde bei 23°C ein gesteigerter Sauerstoffverbrauch der Zellen des arktischen Kabeljaus im Vergleich zum Nordseekabeljau registriert. Im Gegensatz zu NSC reagiert NEAC stärker auf eine Temperaturerhöhung (siehe  $Q_{10}$ -Werte und Aktivierungsenergien in Tab. 4.3).



**Abb. 4.1** Einfluss der Temperatur auf die zelluläre Respiration isolierter Leberzellen der untersuchten Kabeljaupopulationen, Hälterungstemperatur 10°C. ■ NEAC: nordost-arktischer Kabeljau (n = 6 – 7). ■ NSC: Nordseekabeljau (n = 13 - 14). Dargestellt sind Mittelwerte und Standardfehler. Gleiche Buchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede. ~ bezeichnet Signifikanz des Änderungsfaktors.

Im Vergleich zu Daten zur Temperaturabhängigkeit des Stoffwechsels verschiedener Organisationsebenen (Standardstoffwechsel, mitochondriale Respirationsraten) des Kabeljau aus der Literatur lagen die  $Q_{10}$ -Werte für die Zellrespiration etwas niedriger (Tabelle 4.3). Interessanterweise lag die Temperaturabhängigkeit für den mitochondrialen Anteil an der Zellrespiration höher ( $Q_{10}$  und  $E_a$ ) und somit in einem ähnlichen Bereich wie die Daten für isolierte Mitochondrien (siehe Tabelle 4.3). Diese Unterschiede deuten möglicherweise auf eine Limitierung der Stoffwechselrate auf Zellebene bei hohen Temperaturen hin. Wie in der Einleitung schon angesprochen, zeigen Literaturdaten kein einheitliches Bild zur Temperaturabhängigkeit des zellulären Sauerstoffverbrauchs, und nur bei wenigen Ausnahmen ergab sich ein exponentieller Anstieg bei Temperaturerhöhung (Mark et al. 2005). Auf-

## Diskussion

grund der geringen Anzahl an Messtemperaturen zu Stunde 0 kann hier keine Aussage über den Verlauf der temperaturabhängigen Respiration gemacht werden. Die erhobenen Daten zum Temperatureinfluss auf zelluläre Respiration und Energiehaushalt an Tag 2 sind unter dem Vorbehalt des Zeit- und Kälteinkubationseffekts zu interpretieren (siehe dazu nachfolgende Kapitel).

**Tabelle 4.3** Aktivierungsenergien und  $Q_{10}$ -Werte (Temperatureffekt) von Kabeljau, *G. morhua* in Abhängigkeit der systemischen Ebene (Ganztier, Hepatozyten und Mitochondrien)

\* kennzeichnet aus Literaturdaten berechnete Werte

Ebene (Referenz)	Population (Akklimationstemperatur)	Aktivierungsenergie $E_a$ [kJ/mol]	$Q_{10}$ (akute Temperaturänderung)	$Q_{10}$ (Akklimationstemperatur)
MO <sub>2</sub> Ganztier (Fischer 2002)	Nordsee (12°C)		2,8 (12-20°C)	
	Nordsee (4 & 12°C)			1,0 (4-12°C)*
MO <sub>2</sub> Ganztier (Zittier 2006)	Barentssee (4°C)		2,7 (4-16°C)	
	Norwegen (4°C)		2,7 (4-16°C)	
	Barentssee (4 & 15°C)			2,6 (4-15°C)
	Norwegen (4 & 12°C)			1,6 (4-15°C)
MO <sub>2</sub> Ganztier (Lurman 2007)	Barentssee (4°C)		3,7 (4-12°C)	
	Nordsee (4°C)		3,4 (4-12°C)	
	Barentssee (4 & 10°C)			2,5 (4-10°C)
	Nordsee (4 & 10°C)			1,3 (4-10°C)
Hepatozyten-Respiration (diese Arbeit)	Barentssee (10°C)	39,77 ± 14,67	1,66 (5-23°C)	
	Nordsee (10°C)	23,32 ± 5,39	1,42 (5-23°C)	
Mitochondrienrespiration (kalkuliert aus Zellrespiration, diese Arbeit)	Barentssee (10°C)	46,61 ± 29,64	2,07 (5-23°C)	
Mitochondrienrespiration maximale ATP-Produktion (Fischer 2002)	Barentssee (12°C)	71 ± 15,22	3,56* (4-15°C)	
	Nordsee (12°C)	48 ± 12,1	1,82* (4-15°C)	
Mitochondrienrespiration maximale ATP-Produktion (Polleichtner 2006)	Barentssee (10°C)	49,86 ± 11,38	2,21 (4-22°C)	
	Nordsee (10°C)	55,42 ± 5,30	2,32 (4-22°C)	
Mitochondrienrespiration maximaler Protonenleck (Polleichtner 2006)	Barentssee (10°C)	64,41 ± 8,82	3,03 (4-22°C)	
	Nordsee (10°C)	57,79 ± 8,03	2,21 (4-22°C)	

## Diskussion

---

Beim Populationsvergleich wurde, entsprechend der These der Kalt-Eurythermie beim arktischen Kabeljau, auch im Zellstoffwechsel von NEAC eine höhere Temperaturabhängigkeit im Vergleich zu NSC gefunden. Es wurden keine Zellrespirationsdaten bei 10°C (Hälterungstemperatur der Versuchstiere) erhoben. Ähnliche zelluläre Respirationsraten werden jedoch zwischen NEAC und NSC vermutet, da keine Unterschiede zwischen den Populationen im Standardstoffwechsel (Messtemperatur 10°C) und im Zellstoffwechsel (Messtemperatur 5°C) der Tiere gefunden wurden. Der Vergleich erhobener Daten zum Temperatureinfluss auf die Physiologie des atlantischen Kabeljaus verschiedener Populationen von der System- zur Organellebene (Tabelle 4.3) legt die Vermutung nahe, dass sich der Grad der Eurythermie vor allem in einer verminderten Toleranz gegenüber hohen Temperaturen (> 10°C) äußert. Diese erniedrigte Toleranz wird vermutlich maßgeblich von der Temperaturabhängigkeit des mitochondrialen Protonenlecks beeinflusst. Bedauerlicherweise liegen keine Daten zum Einfluss einer akuten Erwärmung auf den Standardstoffwechsel von warm-akklimierten (10 – 12°C) NEAC vor, die einen direkten Vergleich der zellulären Temperaturabhängigkeit mit der des Stoffwechsels des ganzen Tieres erlauben würden.

Das Modell der sauerstoff- und kapazitätslimitierten Temperaturtoleranz bei ektothermen Meerestiere bezeichnet den Übergang vom aeroben zu anaeroben Stoffwechsel als kritische Temperatur  $T_c$  (siehe Einleitung). Bei einem gesteigerten Energiebedarf auf Zellebene sollte daher bei Erwärmung  $T_c$  für NEAC niedriger liegen als bei NSC. In der Tat fand Zittier (2006) im Vergleich der arktischen zur norwegischen Population, während eines akuten Temperaturanstiegs, bei NEAC einen signifikant erhöhten Succinatgehalt (anaerobes Endprodukt) bei niedrigeren Temperaturen. Leider erfolgte bei Zittier (2006) kein Vergleich mit Nordseekabeljau; ein ähnlicher Unterschied zwischen arktischen und Nordseekabeljau kann jedoch vermutet werden. Fischer (2002) beobachtete im Vergleich zum Nordseekabeljau eine erhöhte Mortalität und ein vermindertes Wachstum des arktischen Kabeljau bei 12°C Hälterungstemperatur. All dies deutet auf erhöhte Energiekosten bzw. auf eine veränderte Energieallokation beim kalt-eurythermen Kabeljau der Barentssee hin, aber einige Fragen bleiben noch zu klären:

- 1) Wie erklärt sich die Beobachtung, dass NEAC und NSC bei gleicher Akklimatationstemperatur keinen signifikanten Unterschied im Standardstoffwechsel zeigen, sich jedoch für NEAC ein deutlich erhöhter  $Q_{10}$ -Wert des Standardstoffwechsels zwischen kalt- und warm-akklimierten Tieren ergab (siehe Tabelle 4.3)? Und ist

dies auf eine unkompensierte Mitochondrienkapazität bei warm-akklimierten NEAC im Vergleich zu NSC zurückzuführen?

- 2) Treten bei NEAC Energieallokationen auf, die vor dem Hintergrund der Beibehaltung der mitochondrialen Kapazität mit Warm-Akklimation (Lannig 2003) und dem geringeren Wachstum (Pörtner et al. in review) der arktischen Population, den beobachteten ähnlichen Standardstoffwechsel zwischen den Populationen bewirken? Und um welche handelt es sich hierbei?

### 4.3.4. Leberzellen: Zeiteffekt

In den Vergleichsmessungen (0 h und 22 h), die einer Erfassung des Zeiteffektes auf die Zellrespiration dienten, zeigte sich bei 5°C eine deutliche Erhöhung der Sauerstoffverbrauchsrate. Diese Steigerung der Respiration ist möglicherweise auf Änderungen in der Membranzusammensetzung zurückzuführen, wie sie während der homeoviskosen Adaptation (Anpassung der Membranfluidität an unterschiedliche Temperaturen) auftreten. Die Fluidität und damit die Funktionalität der Zellmembran bei unterschiedlichen Temperaturen soll durch die genannte Adaptation aufrechterhalten werden. In der Kälte erfolgt eine Anpassung durch Einlagerungen ungesättigter Fettsäuren, um den nachteiligen Effekt niedriger Temperaturen auf die Membranfluidität zu kompensieren. Solche Änderungen können in Hepatozyten von *Oncorhynchus mykiss* bereits innerhalb der ersten 6 Stunden nach Inkubation auftreten (Williams und Hazel 1994; 1995) und können bei *Ictalurus punctatus* unabhängig von hormonalen Signalen induziert werden (Koban 1986). Farkas et al. (2001) berichten für Neurone von Karpfen (*Cyprinus carpio*) sogar von Membranänderungen innerhalb von 10 Minuten. Eine Änderung in der Membranzusammensetzung in dem hier verwendeten Zeitrahmen ist somit sehr wahrscheinlich. Allerdings kann von einer abgeschlossenen Membrananpassung nicht ausgegangen werden, da die einzelnen Lipidsubstitutionen in unterschiedlichen Zeitfenstern ablaufen (Minuten bis Wochen) (bei Muskelmitochondrien von *Oncorhynchus mykiss* in Kraffe et al. 2007) und zudem eine hormonelle Stimulation benötigt wird (Hepatozyten von *I. punctatus* und *Z. viviparus* (Koban 1986; Eckerle in Vorber.)).

Es ist annehmbar, dass die Änderungen in der Membranzusammensetzung eine Erhöhung der Respiration bei 5°C bewirken, da die Aktivität membrangebundener Proteine, wie es die Enzyme der Atmungskette sind, von dieser abhängig ist (Hazel 1972; Cossins et al. 1981). Die bei 10°C akklimierten Zellen waren somit zur Stunde 0 bei 5°C aufgrund einer

## Diskussion

---

erhöhten Viskosität der Zellmembran in ihrer respiratorischen Funktion eingeschränkt. Am nächsten Tag war dann durch die kälteinduzierten Umgestaltungen bei 5°C Messtemperatur eine höhere Fluidität und dadurch eine verbesserte Funktionalität bzw. eine höhere Respirationsrate der Enzyme gewährleistet. Eine gesteigerte Respiration kann auch auf erhöhte Protonenleckströme zurückzuführen sein, da mit der Fluidität der Membran auch die Durchlässigkeit der Membran für Protonen steigt.

Da die Änderungen beider Populationen um den gleichen Faktor erfolgen, kann ausgeschlossen werden, dass eine der Populationen eine größere Kapazität für Membranänderungen besitzt.

Neben dem positiven Effekt der homeoviskosen Adaptation kann es durch Kälteinkubation jedoch auch zu Schädigungen der Zellen kommen, die unter anderem durch die Bildung von Sauerstoffradikalen, sogenannten ROS (Reactive Oxygen Species), verursacht werden (Vreugdenhil et al. 1997; Rauen und de Groot 1998; Rauen et al. 1999 in Rattenheptozyten). Diese initiieren Membranschädigungen durch die Interaktion mit Proteinen, Enzymen und Polynukleotiden. Derartige Schädigungen können im Endeffekt zum Zelltod führen und beeinflussen möglicherweise die respiratorische Aktivität der Zellen (Tretter und Adam-Vizi 2000; Tiwari et al. 2002). Neben der Kälteinkubierung könnte die ROS-Bildung auch durch die erhöhten Sauerstoffpartialdrücke im Medium (Lagerung bei 21 kPa) im Vergleich zu *in vivo*-Bedingungen (4 – 5 kPa in venösem Blut bei Fischen in Davie und Farrell 1991) induziert worden sein (Brown et al. 2007 an verschiedenen Säugetierzellen). Des Weiteren kann eine gesteigerte Aktivität von Ionenpumpen (z.B. Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase) zu der beobachteten Erhöhung der Zellrespiration bei 5°C beitragen. In der Kälte verlangsamt sich der aktive Ionentransport, der passive Ionenfluss jedoch nicht. Die Zelle gerät somit in ein Ungleichgewicht, das durch Anpassungen der Ionenpumpen bzw. deren Aktivität ausgeglichen wird. Schwarzbaum et al. (1992) diskutierten daher einen kälteinduzierten Anstieg im zellulären Sauerstoffverbrauch, der durch einen erhöhten Energiebedarf für die Ionenregulation bedingt wird.

In der vorliegenden Arbeit wurde lediglich zwischen mitochondrialen Prozessen (ATP-Synthese und Protonleck) unterschieden. In nachfolgenden Arbeiten sollte eine zusätzliche Untersuchung von ATP-verbrauchenden Prozessen wie z.B. der Ionenregulation oder der Proteinsynthese stattfinden.

Da beide Populationen an Tag 2 ähnliche Viabilitäten sowie Zellrespirationsraten zeigten, kann eine unterschiedliche Kälteresistenz der Zellen zwischen den Populationen ausge-

geschlossen werden. Aufgrund der niedrigeren Habitatterperaturen hätte dieses eventuell für den arktischen Kabeljau erwartet werden können.

Erstaunlicherweise wurde die bei 5°C beschriebene kälteinduzierte Steigerung der Zellrespiration nicht bei 23°C Messtemperatur beobachtet. So steigert sich die Respiration der Zellen, unabhängig von der Population, bei einer 5°C-Messung nach der Kälteinkubation etwa um den Faktor 3. Bei einer Messtemperatur von 23°C hingegen erfuhren nur die Zellen des Nordseekabeljaus eine geringe Steigerung (Faktor 1,4), während die Zellen von NEAC mit der gleichen Rate wie an Tag 1 respirieren. Dieses führt in beiden Populationen zu einer temperaturunabhängigen Respiration (ähnliche Respirationsraten bei 5°C und 23°C). Aufgrund der exponentiellen Respirationssteigerung bei isolierten Mitochondrien aus der Kabeljauleber (Fischer 2002, Polleichtner 2006), sowie der  $Q_{10}$ -Regel, war jedoch eine Respirationssteigerung wie an Tag 1 erwartet worden. Es deutet sich daher eine Limitierung im Zellstoffwechsel bei hoher Temperatur an. Eine solche Limitierung könnte in der Energiebereitstellung oder im Energiebedarf begründet sein.

Eine denkbare Erklärung für eine limitierte Energiebereitstellung könnte in der Verfügbarkeit von Substrat (Glucose) liegen. Kann weniger Substrat geliefert werden als für eine temperaturinduzierte Steigerung des mitochondrialen Stoffwechsels benötigt wird, ist nur eine verringerte oxidative Phosphorylierung möglich. Die in dieser Arbeit verwendete Glucosekonzentration lag im physiologischen Bereich, und in Testversuchen an Fischhepatozyten hatte sich gezeigt, dass eine Erhöhung der Glucosekonzentration keine Steigerung der Respirationsraten bewirkte (pers. Mitteilung F. Mark). Es kann somit vermutet werden, dass eine Limitierung nicht von der Konzentration, sondern eventuell von dem Transport des Substrats abhängt. Möglicherweise ist der Glucosetransport durch die Geschwindigkeit oder die Anzahl der GLUT-Transporter (Glucose-Transporter (Krasnov et al. 2001; Krogdahl et al. 2005)) begrenzt. Auch eine limitierte Phosphorylierung der Glucose sowie ein eingeschränkter intrazellulärer Transport des Substrats zu den Enzymen ist denkbar.

Dieser Effekt ist für Fische nicht unbekannt. So wurde bei Fischen eine langsame Aufnahme von Blutglucose in die Zellen beobachtet, weshalb Knochenfische im Allgemeinen oft als Glucose-intolerant bezeichnet werden (Moon 2001; Legate et al. 2001). Ein weiterer Aspekt, der für die These einer möglichen Glucose-Limitierung beim Stoffwechsel isolierter Zellen spricht, ist das Fehlen hormoneller Stimulation z.B. durch Insulin, durch die ein gesteigerter Substrattransport in die Zellen induziert werden könnte. Allerdings ist die

## Diskussion

---

Rolle von Insulin in Fischen noch fragwürdig. In Säugetieren vermittelt Insulin bei einem hohen Blutglucosespiegel die Öffnung der Glucose-Transporter bzw. deren Bereitstellung an der Zellmembran und den Aufbau des Speicherstoffs Glykogen. In Fischen besitzt Insulin zwar eine ähnliche Struktur wie in Säugetieren (Christiansen und Klungsoyr 1987), seine Funktion ist jedoch bisher noch nicht vollständig verstanden und wird zudem wahrscheinlich von Spezies, Jahreszeit bzw. Umgebungstemperatur und Ernährungsform (herbivor, omnivor, carnivor) beeinflusst. So wird in carnivoren Fischen, deren Nahrung hauptsächlich von Proteinen bestimmt wird, die Insulinausschüttung durch Aminosäuren stärker induziert als durch Kohlenhydrate (Navarro et al. 2002). Für eine weiterführende Diskussion der Glucoseverwertung in Fischen siehe Hemre et al. (2002).

Auch oxidativer Stress durch ROS könnte über die Beeinträchtigung der NADH-Produktion durch das Enzym  $\alpha$ -Ketoglutarate Dehydrogenase im Citratcyclus zu einer Limitierung führen, wie es in Nervenzellen von Meerschweinchen beobachtet wurde (Tretter und Adam-Vizi 2000). Da, wie in der Einleitung erwähnt, NADH als Elektronendonator der Atmungskette für deren Funktion wichtig ist, führt eine verminderte NADH-Konzentration zu einer eingeschränkten ATP-Produktion und damit zu einer Limitierung des Sauerstoffverbrauchs.

Eine Limitierung im Energiebedarf über eingeschränkte ATP-verbrauchende Prozesse (z.B. ATPasen) könnte ebenfalls die unveränderten Respirationsraten an Tag 2 im Vergleich zu Tag 1 bei 23°C erklären. Falls es bei den hohen Temperaturen durch die Kälteinkubation zu Schädigungen der Membran kommt, da diese in den hohen Temperaturen zu flüssig wird, ist die Funktion der membranständigen Proteine, z.B. ATP-verbrauchende Ionentransporter, herabgesetzt. Zudem können Schädigungen der Membranproteine z.B. durch vermehrte ROS-Bildung in der Wärme induziert werden. Ist die Funktion der ATPasen herabgesetzt und wird dadurch kein bzw. wenig ATP verbraucht, kommt es zu einer Herabregulierung der Glykolyse und des Citratzyklus, da hohe ATP-Konzentrationen dort als Inhibitor wirken, und kein weiterer Sauerstoffverbrauch stattfindet (u.a. in Heldmaier und Neuweiler 2004).

Ob die eventuelle Limitierung jedoch auf der Seite der Bereitstellung oder auf der Seite des Bedarfs liegt, kann und soll diese Arbeit nicht klären. Die Identifizierung der limitierenden Mechanismen bedarf weiterer Studien. Es erscheint jedoch ziemlich sicher, dass die Kälteinkubation Auswirkungen auf die Temperaturabhängigkeit zellulärer Stoffwechselpro-

## Diskussion

---

zesse hatte und sich dieses in erniedrigten Aktivierungsenergien und  $Q_{10}$ -Werten ausdrückte.

Interessanterweise scheinen Enzyme des aeroben Stoffwechsels von der Kälteinkubation nicht betroffen zu sein. In einer Zellkulturstudie mit Leberzellen der Nordseeaalmutter (*Zoarces viviparus*, Akklimationstemperatur  $10^{\circ}\text{C}$ ) wurden Zellen bei  $4^{\circ}\text{C}$  inkubiert und der Effekt auf enzymatischer Ebene untersucht (Eckerle in Vorber.). Nach 48 bis 72 Stunden wurde keine Änderung der Enzymaktivität von Citratsynthase (CS) und Cytochrom c-Oxidase (COX) gefunden, was auf das Fehlen einer Kälteanpassung auf Enzymebene hinweist ( $Q_{10} \approx 1$  im Bereich  $4 - 11^{\circ}\text{C}$ ). Dies wurde in der Arbeit von Koban (1986) an Hepatozyten von *Ictalurus punctatus* bestätigt, der zudem ein unterschiedliches Verhalten von mitochondrialen und cytosolischen Enzymen feststellte. So diskutiert Koban, dass die mitochondrialen Enzyme zu einer Kompensation der Stoffwechselraten mit der Temperatur fähig sind, dieses aber nicht bei allen cytosolischen Enzymen gefunden werden konnte. Die hier ermittelte Temperaturabhängigkeit der CS-Aktivität nach einer 28stündigen  $0^{\circ}\text{C}$ -Inkubation zeigte mit einer Aktivierungsenergie von  $32,47 \pm 15,40$  kJ/mol (NEAC) bzw.  $28,90 \pm 14,70$  kJ/mol (NSC) (jeweils:  $5 - 15^{\circ}\text{C}$ ) keinen Unterschied zu Literaturdaten. So fanden Lannig et al. (2003) für die CS-Aktivität in der Leber von Kabeljau (unabhängig von Akklimationstemperatur und Population) eine durchschnittliche Aktivierungsenergie von  $32,1 \pm 2,3$  kJ/mol (Messbereich  $5 - 18^{\circ}\text{C}$ ). Daher zeigte die Citratsynthase vor und nach der Kälteinkubation dieselbe Temperaturabhängigkeit und erfuhr somit wahrscheinlich keine Änderungen in ihrer Aktivität

Da keine Änderung der Citratsynthase-Aktivität durch die  $0^{\circ}\text{C}$ -Inkubation induziert wurde, ist die gefundene Verringerung der Mitochondrienrespiration von Tag 1 zu Tag 2 unter Vorbehalt zu betrachten. Die CS-Aktivität ist ein Indiz für die Aktivität der Mitochondrien. Tritt also keine Änderung der Citratsynthase ein, ist eine beeinträchtigte mitochondriale Kapazität unwahrscheinlich. Zudem kann aufgrund der geringen Stichprobe bei diesem Befund keine fundierte Aussage getroffen werden. Außerdem scheint eine Abnahme der mitochondrialen Respiration nicht plausibel zu sein, da die totale Zellrespiration keine Verringerung erfuhr. Inwieweit die Ursache in der Funktion des Inhibitors (KCN) liegt, bleibt zu untersuchen. Falls die geänderte Membranfluidität zu einem schlechteren Zugang von KCN in die Zelle oder einer geringeren Affinität dieses zur Cytochrom c-Oxidase (COX) führt, würde die geringere Hemmung eine Abnahme der Mitochondrienrespiration vortäuschen. Eine solche Affinitätsänderung wäre auf eine mögliche Beeinträchtigung der COX-Aktivität *in situ* (in der Zelle) aufgrund der veränderten Membrenumgebung bzw. einer



veränderten Interaktion mit den ungesättigten Membranlipiden im Vergleich zu den gesättigteren Lipiden der frisch isolierten Zelle zurückzuführen. Dieses wäre auch mit den unveränderten COX-Aktivitäten anderer Studien vereinbar (Koban 1986; Eckerle in Vorber.).

### **4.3.5 Leberzellen: Temperatureffekt an Tag 2**

#### *Einsatz der Inhibitoren*

In Vorversuchen wurde die Konzentration der eingesetzten Inhibitoren bestimmt, wodurch zum einen eine vollständige Hemmung gewährleistet, zum anderen eine Inhibierung zusätzlicher Prozesse durch eine Überdosis verhindert werden sollte (Wieser und Krumschnabel 2001). Die hier ermittelten und eingesetzten Konzentrationen entsprachen denen anderer Studien (Oligomycin: 10 µg/ml in Cittadini et al. 1975; Nobes et al. 1990; Mark et al. 2005, KCN: 100 µmol/L in Rolfe et al. 1999; Cherkasov et al. 2006).

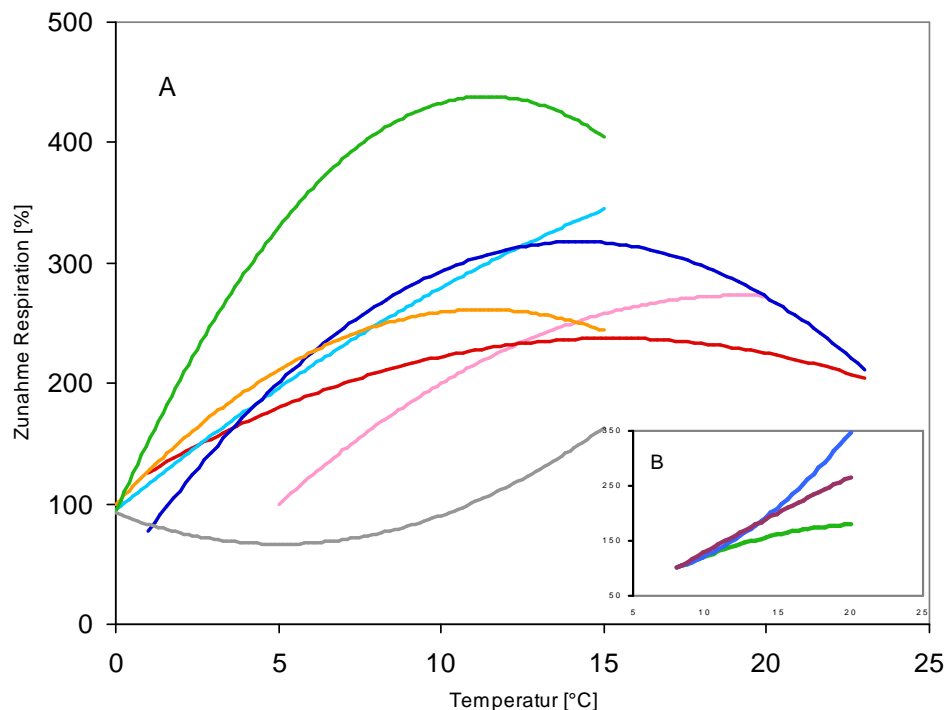
Wie in Abbildung 3.13 C und 3.14 C zu sehen, übertraf die Summe der berechneten Anteile der Prozesse an der Gesamtrespiration dennoch 100%. Dies ist vor allem auf eine unspezifische Wirkung der Inhibitoren zurückzuführen, bei der es zu sekundären Hemmungen anderer, vom inhibierten Prozess abhängiger Stoffwechselwege kommt. So hemmt Oligomycin zwar primär die  $F_0/F_1$ -ATPase, doch werden durch den entstehenden Mangel an ATP auch die ATP-verbrauchenden Prozesse, wie z.B. Proteinsynthese und Ionentransport mittels ATPasen, betroffen. Trotz dieser Problematik kann der Einsatz von Inhibitoren zumindest einen Eindruck über den Anteil sowie Änderung zellulärer Prozesse am Gesamtstoffwechsel der Zelle liefern (Mark 2005).

#### *Temperaturverlauf*

Vor dem Hintergrund eines exponentiellen Anstiegs von Sauerstoffverbrauchsraten des Ganztieres sowie von isolierten Mitochondrien in Abhängigkeit von der Temperatur (Fischer 2002, Zittier 2006, Polleichtner 2006) war der Befund eines eher hyperbolischen Verlaufs der Respirationsraten isolierter Kabeljauhepatozyten mit steigender Messtemperatur an Tag 2 unabhängig von der Population etwas überraschend. Zuerst war die an Tag 2 beobachtete Temperaturunempfindlichkeit oberhalb von 7°C auf den Zeit- und Kälteinkubationseffekt zurückgeführt worden, der im Gegensatz zu 23°C Messtemperatur zu einer gesteigerten zellulären Stoffwechselrate bei 5°C führte (siehe dazu Diskussion 4.3.5). Interessanterweise fand sich jedoch auch in der Literatur kein einheitliches Bild zur Temperaturabhängigkeit zellulärer Sauerstoffverbrauchsraten (Messtag = Präparationstag), und die

## Diskussion

beobachteten Zusammenhänge variierten zwischen keiner, hyperboler und exponentieller Korrelation (Pannevis und Houlihan 1992; Krumschnabel et al. 1997; Mark et al. 2005) (Abbildung 4.2). An Tag 1 fanden nur Messungen bei den genannten zwei Temperaturen statt, weshalb hier keine genauere Aussage über einen eventuellen Zeit- bzw. Inkubationseffekt auf die Temperaturabhängigkeit des Zellstoffwechsels vorgenommen werden kann. Vor diesem Hintergrund und der überraschend äußerst geringen Diskrepanz der Befunde in der Literatur sind zur eindeutigen Klärung und Interpretation weitere Untersuchungen zum



**Abb. 4.2** Graphische Darstellung der prozentualen Respirationssteigerung von Fischhepatozyten im akuten Temperaturverlauf. Dargestellt sind die aus den Literaturdaten berechneten Trendlinien (Polynom 2°). A) Diese Arbeit: — *Gadus morhua* Barentssee (10°C akklimiert), — *Gadus morhua* Nordsee (10°C akklimiert), Pannevis und Houlihan 1997: — *Oncorhynchus mykiss* (10°C akklimiert), Mark et al. 2005: — *Trematomus eulepidotus* (1°C akklimiert), — *Artedidraco orianae* (1°C akklimiert), — *Trematomus lepidorhinus* (1°C akklimiert), — *Lepidonotothen larseni* (1°C akklimiert) B) Krumschnabel et al. 1997: *Oncorhynchus mykiss*, — 5°C-*ad libitum*-Fütterung, — 15°C akklimiert, *ad libitum*-Fütterung, — 15°C akklimiert, maintenance-Fütterung  
Die prozentuale Respiration errechnet sich aus der Steigerung mit der Temperatur, wobei der erste Temperaturpunkt = 100%.

Temperatureinfluss auf den zellulären Stoffwechsel nötig.

Trotz der beobachteten Variation des Zellstoffwechsels in Abhängigkeit von der Temperatur, ergaben sich bei beiden Kabeljaupopulationen keine nennenswerten Unterschiede in der Verteilung der prozentualen Anteile der untersuchten Prozesse an der totalen Zellrespiration (Abb. 3.13 B&C und 3.14 B&C).

## Diskussion

---

In Bezug auf den hyperbolen Anstieg im unteren Temperaturbereich bedeutete dies einen gemeinsamen Anstieg aller gemessenen Prozesse, so dass intrazellulär anscheinend keine Änderung erfolgte. Unabhängig vom Muster der Gesamtrespiration wurde auch in einer Studie von Mark et al. (2005) kein Temperatureinfluss auf die Verteilung der an der Respiration beteiligten Prozesse beschrieben.

Mit Ausnahme der 5°C- und der 7°C-Messung bei NSC (siehe Ausblick) änderte sich der mitochondriale Anteil bei beiden Populationen über das untersuchte Temperaturspektrum hinweg nicht. Dies spricht für einen gleichmäßigen Anstieg der Mitochondrienrespiration mit dem Sauerstoffverbrauch der Zelle in den unteren Temperaturen. Es zeigt aber auch eine Limitierung der Mitochondrien in den höheren Temperaturen, da ein weiterer Anstieg des mitochondrialen Sauerstoffverbrauchs, wie bei Fischer (2002) und Polleichtner (2006), zu einem gesteigerten Anteil der Mitochondrien an der Zellatmung bewirkt hätten. Die möglichen Gründe hierfür wurden bereits in 4.3.4 besprochen. Zudem ergaben Messungen an isolierten Mitochondrien einen deutlichen Temperatureffekt auf den Sauerstoffverbrauch durch ATP-Synthese bzw. durch Protonenleckströme. Dieser führt zudem in den wärmeren Temperaturen meist zu einer geringeren Kopplung der ATP-Synthese (van den Thillart und Modderkolk 1978; Dufour et al. 1996; Fischer 2002; Abele et al. 2002; Lannig et al. 2005; Polleichtner 2006; Kraffe et al. 2007). Diese Beobachtung spricht wiederum für eine Limitierung im Stoffwechselgeschehen isolierter Leberzellen und bedarf, wie oben schon diskutiert, weiterführender Untersuchungen zur Klärung der Frage, welche Prozesse in der Zelle für die „bottle neck“ Situation (Flaschenhals-Situation) verantwortlich sind.

Der Anteil, den die mitochondriale Respiration am totalen Sauerstoffverbrauch einnahm, war mit 40 – 70% in dieser Arbeit sehr niedrig, lag dabei jedoch im Rahmen beschriebener Werte in der Literatur. Die Ursachen dieses niedrigen mitochondrialen Sauerstoffverbrauchs sind vielfältig. Neben den Mitochondrien verbrauchen nur sogenannte Oxidasen im Cytoplasma der Zelle molekularen Sauerstoff bei der Übertragung auf ein Substrat. Die Oxidasen sind in der Leber an der Entgiftung schädlicher Substanzen beteiligt und daher hier in größeren Mengen vorhanden als in anderen Organen.

Der mitochondriale Respirationsanteil anderer Arbeiten betrug: 75% (Vögel, Hepatozyten) in Else et al. (2004), 70 – 90% (Auster, Hepatopancreaszellen) in Cherkasov et al. (2006), 40 – 70% (Krokodile, Hepatozyten) in Hulbert et al. (2002), 67 – 86% (Ratte, Hepatozyten) in Brand et al. (1991). Da außerhalb des Mitochondriums annähernd fast keine Reaktion mit molekularem Sauerstoff stattfindet, scheinen die Werte unnatürlich niedrig. Es wurde zudem nur eine Studie gefunden, in der ein realistischer mitochondrialer Anteil von

91% an der Gesamtrespiration isolierter Leberzellen gefunden wurde (Rolfe et al. 1999). In der Gegenüberstellung erscheinen die niedrigen Anteile der mitochondrialen Respiration als Artefakt und sind vermutlich auf eine methodische Ursache zurückzuführen. In der Arbeit von Rolfe et al. (1999) wurden Myxothiazol (s.u.) statt Kaliumcyanid (KCN) und andere Substrate (Laktat und Pyruvat statt Glucose) verwendet. Möglicherweise führt diese Kombination zu einer besseren Kopplung der Mitochondrien oder zu einem geringeren Anteil der ROS-Bildung an der Gesamtatmung. Es liegt meines Wissens keine Vergleichsstudie zu der Wirkung von KCN und Myxothiazol, sowie der verschiedenen Medien und Substrate vor. Daher kann die Wirkungsweise des Inhibitors als ein Aspekt für die hohen nicht-mitochondrialen Anteile an der Gesamtrespiration nicht ausgeschlossen werden. KCN hemmt erst am vierten Komplex der Atmungskette, wodurch bereits ein Transport von Elektronen stattfindet. Nach Blockierung der Elektronentransportkette durch KCN werden die Elektronen auf Sauerstoff übertragen (was zur Bildung von ROS ( $\text{H}_2\text{O}_2$  und  $\text{O}_2^-$ ) führt) (Sohal 1993). Diese Reaktion wurde auch durch Hemmung mittels Myxothiazol (einem Inhibitor des Komplex III) bestätigt (Turrens et al. 1985; Bolter und Chefurka 1990; Starkov und Fiskum 2001). Die Wirkung von Inhibitoren auf die  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Bildung wurde auch schon in Turrens (1997) beschrieben. Zudem findet sich in Turrens (2003) und in Anhang 6.6 eine Zusammenfassung der Wirkungen sowie der Bildung von ROS.

Der Anteil der ATP-Synthese an der totalen Respiration zeigte keine Änderung im untersuchten Temperaturverlauf, und der hier bestimmte Prozentsatz lag im Bereich derer, die in anderen Studien gefunden wurde. Unabhängig von Tierart und Messtemperatur lag der Anteil der ATP-Synthese zwischen 50 und 65% (53 – 65% (Auster, 12 – 28°C) in Cherkasov et al. 2006, 57 – 65% (Fisch, 0 – 21°C) in Mark et al. 2005, 57 – 64% (Fisch, 20°C) in Gamper und Savina 2000, 60% (Ratte, 37°C) in Lakin-Thomas und Brand 1988, 69% ± 2% (Ratte, 37°C) in Rolfe et al. 1999).

Auch bei dem Anteil des Protonenleck-abhängigen Sauerstoffverbrauchs wurde keine temperaturabhängige Änderung beobachtet, und die Werte schwankten zwischen 12 und 36%. In diesem Bereich lagen auch die ermittelten Werte bei Austern in Cherkasov et al. (2006) (21 – 33%), Krokodilen (10 – 30%) in Hulbert et al. (2002) und Ratten in Nobes et al. (1990) (20 – 40%), Brand et al. (1994) (33 ± 7%) und Rolfe (1999) (22 ± 2%).

Da die hier ermittelten Anteile der untersuchten Prozesse im Bereich derer lagen, die auch in der Literatur gefunden wurden, kann vermutet werden, dass durch die Kälteinkubation keine Änderungen im Energiehaushalt der Zelle stattfinden. Dies bedarf allerdings einer

Überprüfung mit Werten zum zellulären Stoffwechselhaushalt der Kabeljauhepatozyten zu Stunde 0.

Obwohl das Überleben des Ganztieres beim Kabeljau ab einer Temperatur von 16°C nicht mehr gewährleistet ist (Lannig et al. 2004; Zittier 2006), erfuhren die hier untersuchten beteiligten Prozesse trotz Kälteinkubierung keine Änderungen. Dies spricht dafür, dass die Grenzen des Überlebens des Tieres nicht auf zellulärer Ebene gesetzt werden, sondern wahrscheinlich ihren Ursprung im limitierten Herz-Kreislauf-System haben. Dieses Ergebnis ist nicht überraschend, da nach Pörtner (2002) die Überlebensgrenzen auf der Stufe der höchsten Komplexität gesetzt werden, d.h. des Gesamtorganismus. Bei Fischen findet sich das zirkulatorische System als limitierender Faktor (Sartoris et al. 2003; Farrell und Clutterham 2003; Lannig et al. 2004)

#### 4.4 AUSBLICK

Der beobachtete Zeit- bzw. Kälteinkubationseffekt auf die Temperaturempfindlichkeit des Zellstoffwechsels eröffnet Erklärungsmöglichkeiten in unterschiedliche, bisher angesprochene Richtungen. So hat sich, wie an anderer Stelle bereits erwähnt, schon in früheren Arbeiten eine scheinbare Limitierung des Zellstoffwechsels herausgestellt. Da eine genauere Diskussion dieses interessanten Aspektes bisher nicht stattgefunden hat, bietet es sich an, die zu Grunde liegenden Prozesse genauer zu beleuchten.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Untersuchungen an isolierten Zellen möglicherweise einen Hinweis auf die Temperaturtoleranz des Ganztieres geben können. So zeigte sich, wie schon in früheren Arbeiten zur Temperaturtoleranz von Kabeljau, *G. morhua* aus unterschiedlichen Populationen, auch im zellulären Stoffwechsel im Vergleich zu Tieren aus der Nordsee eine stärkere Temperaturempfindlichkeit beim arktischen Kabeljau. Vor dem Hintergrund einer eingeschränkten Leistungskapazität des Herz-Kreislaufsystems und damit der beeinträchtigten Sauerstoffversorgung bei Fischen trägt somit der erhöhte zelluläre Energie- bzw. Sauerstoffbedarf zum engeren Temperaturfenster für die arktische Kabeljaupopulation bei. Inwieweit dabei die Temperaturabhängigkeit des Sauerstoffverbrauchs durch Protonenleckströme eine Rolle spielen (siehe Diskussion), bedarf weiterer Untersuchungen. Für eine bessere Vergleichbarkeit mit Daten von isolierten Mitochondrien sollte versucht werden, die Proteinmenge in den Proben zu bestimmen. Um

## Diskussion

---

die Stoffwechselraten der Zellen in den Gesamtorganismus einordnen zu können, sollte bei weiterführenden Versuchen die Zellzahl, wie auch die Proteinmenge, auf 1 g Leber bezogen werden können (Entnahme einer Leberprobe vor der Isolierung).

Aufgrund des Zeit- bzw. Kälteinkubationseffekts auf die Temperaturempfindlichkeit isolierter Zellen konnte in dieser Arbeit die These einer möglichen Korrelation zwischen thermalem Maximum beim Ganztier (höchste Wachstumsrate) und thermalem Minimum beim Zellstoffwechsel (niedrigste Respirationsrate) nicht untersucht werden. Interessanterweise war beim Nordseekabeljau der mitochondriale Anteil an der Gesamtzellrespiration bei 5°C und 7°C im Vergleich zu den anderen Temperaturen erhöht. Dieser Befund korreliert möglicherweise mit dem Maximum im venösen Sauerstoffgehalt, ermittelt im Ganztier während einer akuten Temperaturänderung (siehe Lannig et al. (2004)). Für eine eindeutige Klärung bedarf es jedoch einer nachfolgenden Studie mit ausreichend Messpunkten zum Zeitpunkt 0, sowie der Einsatz weiterer Inhibitoren zur Erfassung von ATP-verbrauchenden Prozessen (z.B. Ouabain zur Erfassung der Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase, Cycloheximid zur Erfassung der Proteinsynthese). Zudem könnten Messungen unter realen *in vivo* Sauerstoffpartialdrücken vermutlich eine verlässlichere Aussage über die in der Zelle ablaufenden Prozesse im Hinblick auf Energieverteilung erlauben und damit fundierte Aussagen zur Temperaturabhängigkeit des Stoffwechsels des Ganztieres ermöglichen.

Der arktische Kabeljau ist möglicherweise nicht zu einer Akklimation an wärmere Temperaturen fähig (Lurman 2007). Mit Blick hierauf und auf die Akklimationsprozesse im Ganztier wäre es sicher lohnend, auf zellulärer Ebene eine Vergleichsstudie von kalt- und warm-akklimierten Kabeljau verschiedener Temperaturzonen (arktisch vs. Nordsee) durchzuführen.

## 5 Literaturverzeichnis

- Abele,D., K.Heise, H.O.Pörtner, und S.Puntarulo. 2002. "Temperature-dependence of mitochondrial function und production of reactive oxygen species in the intertidal mud clam *Mya arenaria*." *Journal of Experimental Biology*. 205:1831-1841.
- Adams,M.B., M.D.Powell, und G.J.Purser. 2001. "Effect of acute und chronic ammonia and nitrite exposure on oxygen consumption and growth of juvenile big bellied seahorse." *Journal of fish biology*. 58:848-860.
- Angelova,B., T.Avramova, L.Stefanova, und S.Mutofov. 2007. "Temperature effect on bacterial azo bond reduction kinetics: an Arrhenius plot analysis." *Biodegradation*. DOI 10.1007/s10532-007-9144-4.
- Bergstad,O.A., T.Jorgensen, und O.Dragesund. 1987. "Life history and ecology of the ga-doid resources of the Barents Sea." *Fisheries Research*. 5:119-161.
- Berry,M.N., A.R.Grivell, M.B.Grivell, und J.W.Phillips. 1997. "Isolated hepatocytes - past, present and future." *Cell Biology and Toxicology*. 13:223-233.
- Bindoff,N.L., J.Willebrand, V.Artale, A.Cazenave, J.Gregory, S.Gulev, K.Hanawa, C.Le Quéré, S.Levitus, Y.Nojiri, C.K.Schum, L.D.Talley, und A.Unnikrishnan. 2007. "Observations: Oceanic Climate Change and Sea Level." In S.Solomon, D.Qin, M.Manning, Z.Chen, M.Marquis, K.B.Averyt, M.Tignor, und H.L.Miller, editors, *Climate Change 2007: The Physical Science Basis. Contribution of Working Group I to the Fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change*. Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom und New York, NY, USA.
- Black,D. und R.M.Love. 1986. "The sequential mobilisation and restoration of energy reserves in tissues of Atlantic cod during starvation and refeeding." *Journal of Comparative Physiology B*. 156:469-479.
- Bolter,C.J. und W.Chefurka. 1990. "Extramitochondrial release of hydrogen peroxide from insect and mouse liver mitochondria using the respiratory inhibitors phosphine, myxothiazol, and antimycin and spectral analysis of inhibited cytochromes." *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 278:65-72.
- Brand,M.D. 2005. "The efficiency and plasticity of mitochondrial energy transduction." *Biochemical Society Transactions*. 33:897-904.
- Brand,M.D., C.Affourtit, T.C.Esteves, K.Green, A.J.Lambert, S.Miwa, J.L.Pakay, und N.Parker. 2004. "Mitochondrial superoxide: production, biological effects, and activation of uncoupling proteins." *Free Radical Biology and Medicine*. 37:755-767.
- Brand,M.D., L.-F.Chien, E.F.Ainscow, D.F.S.Rolfe, und R.K.Porter. 1994. "The causes and functions of mitochondrial proton leak." *Biochimica et Biophysica Acta*. 1187:132-139.

## Literatur

---

- Brand, M.D., P. Couture, P.L. Else, K.W. Withers, und A.J. Hulbert. 1991. "Evolution of energy metabolism: proton permeability of the inner membrane of liver mitochondria is greater in a mammal than in a reptile." *The Journal of Biochemistry*. 275:81-86.
- Brown, M.F., T.P. Gratton, und J. Stuart. 2007. "Metabolic rate does not scale with body mass in cultured mammalian cells." *AJP - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*. 292:R2115-R2121.
- Burton, M.P.M., R.M. Penney, und S. Biddiscombe. 1997. "Time course of gametogenesis in Northwest Atlantic cod (*Gadus morhua*)." *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*. 54:122-131.
- Busk, M. und R. Boutilier. 2005. "Metabolic Arrest and Its Regulation in Anoxic Eel Hepatocytes." *Physiological and Biochemical Zoology*. 78:926-936.
- Cherkasov, A.S., P.K. Biswas, D.M. Ridings, A.H. Ringwood, und I.M. Sokolova. 2006. "Effects of acclimation temperature and cadmium exposure on cellular energy budgets in the marine mollusk *Crassostrea virginica*: linking cellular and mitochondrial responses." *Journal of Experimental Biology*. 209:1274-1284.
- Christiansen, D.C. und L. Klungsoyr. 1987. "Metabolic utilization of nutrients and the effects of insulin in fish." *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*. 88:701-711.
- Cittadini, A., D. Bossi, G. Longhi, und T. Terranova. 1975. "Energy metabolism of isolated rat thymus cells." *Molecular and Cellular Biochemistry*. 8:49-57.
- Claireaux, G., D.M. Webber, J.-P. Lagardere, und S.R. Kerr. 2000. "Influence of water temperature and oxygenation on the aerobic metabolic scope of Atlantic cod (*Gadus morhua*)." *Journal of Sea Research*. 44:257-265.
- Clark, R.A., C.J. Fox, D. Viner, und M. Livermore. 2003. "North Sea cod and climate change - modelling the effects of temperature on population dynamics." *Global Change Biology*. 9:1669-1680.
- Clarke, A. und N.M. Johnston. 1999. "Scaling of metabolic rate with body mass and temperature in teleost fish." *Journal of animal ecology*. 68:893-905.
- Cossins, A.R., K. Bowler, und C.L. Prosser. 1981. "Homeoviscous adaptation and its effect upon membrane-bound proteins." *Journal of Thermal Biology*. 6:183-187.
- Davie, P.S. und A.P. Farrell. 1991. "The coronary and luminal circulations of the myocardium of fishes." *Canadian journal of zoology*. 69:1993-2001.
- Dejours, P. 1975. *Principles of comparative respiratory physiology*. Elsevier New York.
- Devenish, R.J., M. Prescott, G.M. Boyle, und P. Nagley. 2000. "The Oligomycin Axis of Mitochondrial ATP Synthase: OSCP and the Proton Channel." *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*. 32:507-515.



## Literatur

---

- Dippner, J.W. 1999. "Retrospective studies on long term data series of climate conditions and populations dynamics of cod and eelpout. *Draf Report: Data Report, Climatology and Climate Variability*
- Dippner, J.W. und G.Ottersen. 2001. "Cod and climate variability in the Barents Sea." *Climate Research*. 17:73-82.
- Dufour, S., N.Rousse, P.Canioni, und P.Diolez. 1996. "Top-down control analysis of temperature effect on oxidative phosphorylation." *Biochemical Journal*. 314:743-751.
- Dutil, J.-D., M.Castonguay, D.Gilbert, und D.Gascon. 1999. "Growth, condition, and environmental relationships in Atlantic cod (*Gadus morhua*) in the northern Gulf of St. Lawrence and implications for management strategies in the Northwest Arctic." *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*. 56:1818-1831.
- Dutil, J.-D., G.Godbout, P.U.Blier, und D.Groman. 2006. "The effect of energetic condition on growth dynamics and health of Atlantic cod (*Gadus morhua*)." *Journal of Applied Ichthyology*. 22:138-144.
- Ellman, G.L. 1959. "Tissue sulfhydryl groups." *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 82:70-77.
- Else, P.L., M.D.Brand, N.Turner, und A.J.Hulbert. 2004. "Respiration rate of hepatocytes varies with body mass in birds." *Journal of Experimental Biology*. 207:2305-2311.
- Esmark, M. und N.Jensen. The Barents Sea Cod. In Tveteraas, A. 2004. WWF-Report.
- Farkas, T., E.Fodor, K.Kitajka, und J.E.Halver. 2001. "Response of fish membranes to environmental temperature." *Aquaculture Research*. 32:645-655.
- Farrell, A.P. und S.M.Clutterham. 2003. "On-line venous oxygen tensions in rainbow trout during graded exercise at two acclimation temperatures." *Journal of Experimental Biology*. 206:487-496.
- Fischer, T. The effects of climate induced temperature changes on cod (*Gadus morhua* L.): - Linking ecological and physiological investigations. 2002. Dissertation an der Universität Bremen.
- Frederich, M. und H.O.Pörtner. 2000. "Oxygen limitation of thermal tolerance defined by cardiac and ventilatory performance in spider crab, *Maja squinado*." *AJP - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*. 279:R1531-R1538.
- Gamper, N.L. und M.V.Savina. 2000. "Reversible metabolic depression in hepatocytes of lamprey (*Lampetra fluviatilis*) during pre-spawning: regulation by substrate availability." *Comparative Biochemistry and Physiology*. 127:B 147-154.
- Gamper, N.L., M.V.Savina, I.V.Brailovskaya, und A.A.Vereninov. 2001. "Respiration rates, ATP content and ionic regulation in hepatocytes of starving lamprey during the pre-spawning period of their life cycle." *Journal of fish biology*. 58:230-239.
- Godo, O.R. und K.Michalsen. 2000. "Migratory behaviour of north-east Arctic cod, studied by use of data storage tags." *Fisheries Research*. 48:127-140.

## Literatur

---

- Guderley, H., J.-D. Dutil, und D. Pelletier. 1996. "The physiological status of Atlantic cod, *Gadus morhua*, in the wild and the laboratory: estimates of growth rates under field conditions." *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*. 53:550-557.
- Guderley, H. und J. St-Pierre. 2002. "Review: Going with the flow or life in the fast lane: contrasting mitochondrial responses to thermal change." *The Journal of Experimental Biology*. 205:2237-2249.
- Hazel, J.R. 1995. "Thermal Adaptation in Biological Membranes: Is Homeoviscous Adaptation the Explanation?" *Annual Review of Physiology*. 57:19-42.
- Hazel, J.R. 1972. "The effect of temperature acclimation upon succinic dehydrogenase activity from the epaxial muscle of the common goldfish (*Carassius auratus* L.)--II. Lipid reactivation of the soluble enzyme." *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*. 43:863-882.
- Heldmaier, G. und G. Neuweiler. 2004. *Vergleichende Tierphysiologie Band 2 Vegetative Physiologie*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Helfman, G.S., B.B. Collette, und D.E. Facey. 1997. *The Diversity of Fishes*. Blackwell Science, USA.
- Hemre, G.I., T.P. Mommsen, und A. Krogdahl. 2002. "Carbohydrates in fish nutrition: effects on growth, glucose metabolism and hepatic enzymes." *Aquaculture Nutrition*. 8:175-194.
- Holdway, D.A. und F.W.H. Beamish. 1984. "Specific growth rate and proximate body composition of Atlantic cod (*Gadus morhua* L.)." *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. 81:147-170.
- Howard, R.B., J.C. Lee, und L.A. Pesch. 1973. "The fine structure, potassium content, and respiratory activity of isolated rat liver parenchymal cells prepared by improved enzymatic techniques." *The Journal of Cell Biology*. 57:642-658.
- Howard, R.B. und L.A. Pesch. 1968. "Respiratory Activity of Intact, Isolated Parenchymal Cells from Rat Liver." *Journal of Biological Chemistry*. 243:3105-3109.
- Hulbert, A.J. und P.L. Else. 1999. "Membranes as Possible Pacemakers of Metabolism." *Journal of Theoretical Biology*. 199:257-274.
- Hulbert, A.J., P.L. Else, S.C. Manolis, und M.D. Brand. 2002. "Proton leak in hepatocytes and liver mitochondria from archosaurs (crocodiles) and allometric relationships for ectotherms." *Journal of Comparative Physiology B*. 172:387-397.
- IPCC 2007: The fourth assessment report of the Intergovernmental Panel on Climate Change (IPCC). Cambridge University Press: Cambridge, UK, and New York, USA
- Jäckel, G. Untersuchungen von diurnalen Verhaltens- und Stoffwechseländerungen bei *Sepia officinalis* L. 2007. Diplomarbeit an der Universität Bremen.
- Karp, G. 2005. *Molekulare Zellbiologie*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg.

## Literatur

---

- Klimant,I., V.Meyer, und M.Kühl. 1995. "Fiber-optic oxygen microsensors, a new tool in aquatic biology." *Limnology Oceanography*. 40:1159-1165.
- Koban,M. 1986. "Can cultured teleost hepatocytes show temperature acclimation?" *AJP - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*. 250:R211-R220.
- Kraffe,E., Y.Marty, und H.Guderley. 2007. "Changes in mitochondrial oxidative capacities during thermal acclimation of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*: roles of membrane proteins, phospholipids and their fatty acid compositions." *Journal of Experimental Biology*. 210:149-165.
- Krasnov,A., H.Teerijoki, und H.Molsa. 2001. "Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) hepatic glucose transporter." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Structure and Expression*. 1520:174-178.
- Krebs,H.A., N.W.Cornell, P.Lund, und R.Hems. 1974. "Isolated liver cells as experimental material." In F.Lundquist and N.Tygstrup, editors, Munksgaard, Copenhagen, Denmark.726-750.
- Krogdahl,A., G.I.Hemre, und T.P.Mommsen. 2005. "Carbohydrates in fish nutrition: digestion and absorption in postlarval stages." *Aquaculture Nutrition*. 11:103-122.
- Krumschnabel,G., C.Biasi, P.J.Schwarzbaum, und W.Wieser. 1997. "Acute and chronic effects of temperature, and of nutritional state, on ion homeostasis and energy metabolism in teleost hepatocytes." *Journal of Comparative Physiology B*. 167:280-286.
- Krumschnabel,G., C.Manzl, und P.J.Schwarzbaum. 2001. "Importance of Glycolysis for the Energetics of Anoxia-Tolerant and Anoxia-Intolerant Teleost Hepatocytes." *Physiological and Biochemical Zoology*. 74:413-419.
- Lakin-Thomas,P.L. und M.D.Brand. 1988. "Stimulation of respiration by mitogens in rat thymocytes is independent of mitochondrial calcium." *The Journal of Biochemistry*. 256:167-173.
- Lambert,Y. und J.D.Dutil. 1997a. "Can simple condition indices be used to monitor and quantify seasonal changes in the energy reserves of cod (*Gadus morhua*)?" *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*. 54:104-112.
- Lambert,Y. und J.-D.Dutil. 1997b. "Condition and energy reserves of Atlantic cod (*Gadus morhua*) during the collapse of the northern Gulf of St. Lawrence stock." *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*. 54:2388-2400.
- Lang,T., G.Peters, R.Hoffmann, und E.Meyer. 1987. "Experimental investigations on the toxicity of ammonia: effects on ventilation frequency, growth, epidermal mucous cells, and gill structure of rainbow trout *Salmo gairdneri*." *Diseases of aquatic organisms*. 3:159-165.
- Langenbuch,M. und H.O.Pörtner. 2003. "Energy budget of hepatocytes from Antarctic fish (*Pachycara brachycephalum* and *Lepidonotothen kempfi*) as a function of ambient CO<sub>2</sub>: pH-dependent limitations of cellular protein biosynthesis?" *Journal of Experimental Biology*. 206:3895-3903.

## Literatur

---

- Lannig, G., L.Eckerle, I.Serendero, J.Sartoris, T.Fischer, R.Knust, T.Johansen und H.O. Pörtner. 2003. "Temperature adaptation in eurythermal cod (*Gadus morhua*): a comparison of mitochondrial enzyme capacities in boreal and Arctic populations." *Marine Biology*. 142:589-599.
- Lannig,G., D.Storch, und H.O.Pörtner. 2005. "Aerobic mitochondrial capacities in Antarctic and temperate eelpout (*Zoarcidae*) subjected to warm versus cold acclimation." *Polar Biology*. 28:575-584.
- Lannig,G. Physiologische Grundlagen temperaturabhängiger Biogeographie bei marinen Fischen. 2003. Dissertation an der Universität Bremen
- Lannig,G., C.Bock, F.J.Sartoris, und H.O.Pörtner. 2004. "Oxygen limitation of thermal tolerance in cod, *Gadus morhua* L., studied by magnetic resonance imaging and on-line venous oxygen monitoring." *AJP - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*. 287:R902-R910.
- Lapointe,D., H.Guderley, und J.-D.Dutil. 2006. "Changes in the condition factor have an impact on metabolic rate and swimming performance relationships in atlantic cod (*Gadus morhua* L.)." *Physiological and Biochemical Zoology*. 79:109-119.
- Legate,N.J., A.Bonen, und T.W.Moon. 2001. "Glucose Tolerance and Peripheral Glucose Utilization in Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*), American Eel (*Anguilla rostrata*), and Black Bullhead Catfish (*Ameiurus melas*)." *General and Comparative Endocrinology*. 122:48-59.
- Lucassen,M., N.Koschnik, L.G.Eckerle, und H.O.Pörtner. 2006. "Mitochondrial mechanisms of cold adaptation in cod (*Gadus morhua* L.) populations from different climatic zones." *Journal of Experimental Biology*. 209:2462-2471.
- Lurman,G. Temperatur-Plastizität und Leistungsanpassung im Fisch-Muskel (Gadidae): Konsequenzen für Aktivitätsniveau und Lebensweise. 2007. Dissertation an der Universität Bremen
- Lyndon,A., D.Houlihan, und S.Hall. 1992. "The effect of short-term fasting and a single meal on protein synthesis and oxygen consumption in cod, *Gadus morhua*." *Journal of Comparative Physiology B: Biochemical, Systemic, and Environmental Physiology*. 162:209-215.
- Macdonald,A.G. 1988. "Application of the theory of homeoviscous adaptation to excitable membranes: pre-synaptic processes." *Biochemical Journal*. 256:313-327.
- Mark,F., T.Hirse, und H.O.Pörtner. 2005. "Thermal sensitivity of cellular energy budgets in some Antarctic fish hepatocytes." *Polar Biology*. 28:805-814.
- Mark,F.C., M.Lucassen, und H.O.Pörtner. 2006. "Thermal sensitivity of uncoupling protein expression in polar and temperate fish." *Comparative Biochemistry and Physiology Part D: Genomics and Proteomics*. 1:365-374.
- McCarthy,I.D., D.Houlihan, C.G.Carter, und K.Moutou. 1993. "Variation in individual food consumption rates of fish and its implications for the study of fish nutrition and physiology." *Proceedings of the Nutrition Society*. 52:427-436.

- McKinley,S.J. und J.R.Hazel. 2000. "Does membrane fluidity contribute to thermal compensation of beta-adrenergic signal transduction in isolated trout hepatocytes?" *Journal of Experimental Biology*. 203:631-640.
- Mommsen,T.P., T.W.Moon, und P.J.Walsh. 1994. "Hepatocytes: isolation, maintenance and utilization." In P.Hochachka und T.P.Mommsen, editors, *Biochemistry and molecular biology of fishes*. Elsevier Science B.V. 355-373.
- Moon,T.W. 2001. "Glucose intolerance in teleost fish: fact or fiction?" *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*. 129:243-249.
- Mootha,V.K., M.C.Weil, K.F.Buttler, L.Scorrano, V.Panoutsakopoulou, C.A.Mannella, and S.J.Korsmeyer. 2001. "A reversible component of mitochondrial respiratory dysfunction in apoptosis can be rescued by exogenous cytochrome c." *The EMBO Journal*. 20:661-671.
- Müller,W. 2004. *Tier- und Humanphysiologie*. Springer Verlag Berlin Heidelberg.
- Muus,B.J. und J.G.Nielsen. 1999. *Die Meeresfische Europas in Nordsee, Ostsee und Atlantik*. Franckh-Kosmos Verlag Stuttgart.
- Myers,R.A., J.A.Hutchings, und N.J.Barrowman. 1996. "Hypotheses for the decline of cod in the North Atlantic." *Marine ecology progress series*. 138:293-308.
- Nathanailides,C. 1996. "Are changes in enzyme activities of fish muscle during cold acclimation significant?" *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*. 53:2333-2336.
- Navarro,I., P.Rojas, E.Capilla, A.Albalat, J.Castillo, N.Montserrat, M.Codina, und J.Gutiérrez. 2002. "Insights into Insulin and Glucagon Responses in Fish." *Fish Physiology and Biochemistry*. 27:205-216.
- Nicholls,D.G. und R.M.Locke. 1984. "Thermogenic mechanisms in brown fat." *Physiological Reviews*. 64:1-64.
- Noak,S. 1980. *Statistische Auswertung von Meß- und Versuchsdaten mit Taschenrechner und Tischcomputer*. Walter de Gruyter Verlag, Berlin, New York.
- Nobes,C.D., G.C.Brown, P.N.Olive, und M.D.Brand. 1990. "Non-ohmic proton conductance of the mitochondrial inner membrane in hepatocytes." *Journal of Biological Chemistry*. 265:12903-12909.
- Ottersen,G., D.O.Huermann, und N.C.Stenseth. 2006. "Changes in spawning stock structure strengthen the link between climate and recruitment in a heavily fished cod (*Gadus morhua*) stock." *Fisheries Oceanography*. 15:230-243.
- Pannevis,M.C. und D.F.Houlihan. 1992. "The energetic cost of protein synthesis in isolated hepatocytes of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)." *Journal of Comparative Physiology B: Biochemical, Systemic, and Environmental Physiology*. 162:393-400.

## Literatur

---

- Penzlin, H. 2005. *Lehrbuch der Tierphysiologie*. Spektrum Akademischer Verlag München.
- Perry, A.L., P.J.Low, J.R.Ellis, und J.D.Reynolds. 2005. "Climate change and distribution shift in marine fishes." *Science*. 308:1912-1915.
- Pfaff, E., B.Schuler, H.Krell, und H.Höke. 1980. "Viability Control and Special Properties of Isolated Rat Hepatocytes." *Archives of Toxicology*. 44:3-21.
- Polleichtner, C.U. Untersuchungen zum mitochondrialen Energiestoffwechsel des atlantischen Kabeljaus (*Gadus morhua* Linnaeus, 1758 ) im latitudinalen Gradienten. 2006. Diplomarbeit an der Universität Berlin
- Pörtner, H.O., B.Berdal, R.Blust, O.Brix, A.Colosimo, B.de Wachter, A.Giuliani, T.Johansen, T.Fischer, und R.Knust. 2001. "Climate induced temperature effects on growth performance, fecundity and recruitment in marine fish: developing a hypothesis for cause and effect relationships in Atlantic cod (*Gadus morhua*) and common eelpout (*Zoarces viviparus*)." *Continental Shelf Research*. 21:1975-1997.
- Pörtner, H.O. und R.Knust. 2007. "Climate change affects marine fishes through the oxygen limitation of thermal tolerance." *Science*. 315:95-97.
- Pörtner, H.O., F.C.Mark, und C.Bock. 2004. "Oxygen limited thermal tolerance in fish? Answers obtained by nuclear magnetic resonance techniques." *Respiratory Physiology & Neurobiology*. 141:243-260.
- Pörtner, H.O. 2001. "Climate change and temperature-dependent biogeography: oxygen limitation of thermal tolerance in animals." *Naturwissenschaften*. 88:137-146.
- Pörtner, H.O. 2002. "Review: Climate variations and the physiological basis of temperature dependent biogeography: systemic to molecular hierarchy of thermal tolerance in animals." *Comparative Biochemistry and Physiology Part A*. 132:739-761.
- Pörtner, H.O., P.L.M.Van Dijk, I.Hardewig, und A.Sommer. 2000. "Levels of metabolic cold adaptation: Tradeoffs in eurythermal and stenothermal ectotherms." In W.Davison, C.Howard-Williams, und P.Broadly., *Antarctic Ecosystems: models for wider ecological understanding*. Caxton Press. Christchurch New Zealand. 109-122.
- Rauen, U. und H.de Groot. 1998. "Cold-Induced Release of Reactive Oxygen Species as a Decisive Mediator of Hypothermia Injury to Cultured Liver Cells." *Free Radical Biology and Medicine*. 24:1316-1323.
- Rauen, U., B.Polzar, H.Stephan, H.G.Mannherz, und H.D.Groot. 1999. "Cold-induced apoptosis in cultured hepatocytes and liver endothelial cells: mediation by reactive oxygen species." *The FASEB Journal*. 13:155-168.
- Rindorf, A. und P.Lewy. 2006. "Warm, windy winters drive cod north and homing of spawners keeps them there." *Journal of Applied Ecology*. 43:445-453.
- Rolfe, D.F. und M.D. Brand. 1997, „The physiological Significance of Mitochondrial Proton Leak in Animal Cells and Tissues.“ *Bioscience Reports*. 17:9-16

## Literatur

---

- Rolfe,D.F., J.M.Newman, J.A.Buckingham, M.G.Clark, und M.D.Brand. 1999. "Contribution of mitochondrial proton leak to respiration rate in working skeletal muscle and liver and to SMR." *AJP - Cell Physiology*. 276:C692-C699.
- Rose,G.A. 2004. "Reconciling overfishing und climate change with stock dynamics of Atlantic cod(*Gadus morhua*) over 500 years." *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*. 61:1553-1557.
- Sandström,B. 1965. "Studies on cells from liver tissue cultivated *in vitro*." *Experimental Cell Research*. 37:552-568.
- Sartoris,F.J., C.Bock, I.Serendero, G.Lannig, und H.O.Pörtner. 2003. "Temperature-dependent changes in energy metabolism, intracellular pH and blood oxygen tension in the Atlantic cod." *Journal of fish biology*. 62:1239-1253.
- Savina,M.V. und N.L.Gamper. 1998. "Respiration and adenine nucleotides of Baltic lamprey (*Lampetra fluviatilis* L.) hepatocytes during spawning migration." *Comparative Biochemistry and Physiology*. 120:B 375-383.
- Schmidt-Nielsen,K. 1999. *Physiologie der Tiere*. Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg, Berlin.
- Schurmann,H. und J.F.Steffensen. 1997. "Effects of temperature, hypoxia and activity on the metabolism of juvenile Atlantic cod." *Journal of fish biology*. 50:1166-1180.
- Schwalme,K. und G.A.Chouinard. 1999. "Seasonal dynamics in feeding, organ weights, and reproductive maturation of Atlantic cod (*Gadus morhua*) in the southern Gulf of St Lawrence." *ICES Journal of Marine Science: Journal du Conseil*. 56:303-319.
- Schwarzbaum,P.J., H.Niederstätter, und W.Wieser. 1992. "Effects of Temperature on the (Na<sup>+</sup>+K<sup>+</sup>)-ATPase and Oxygen Consumption in Hepatocytes of Two Species of Freshwater Fish, Roach (*Rutilus rutilus*) and Brook Trout (*Salvelinus fontinalis*)." *Physiological Zoology*. 65:699-711.
- Sinensky,M. 1974. "Homeoviscous Adaptation – A Homeostatic Process that Regulates the Viscosity of Membrane Lipids in Escherichia coli." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 71:522-525
- Slater,C. 1950. "Application of Inhibitors and Uncouplers for a study of oxidative phosphorylation." *Biochemical Journal*. 46:48-57.
- Smart,G.R. 1978. "Investigations of the toxic mechanisms of ammonia to fish-gas exchange in rainbow trout (*Salmo gairdneri*) exposed to acutely lethal concentrations." *Journal of fish biology*. 12:93-104.
- Smith,R.W. und D.Houlihan. 1995. "Protein synthesis and oxygen consumption in fish cells." *Journal of Comparative Physiology B*. 165:93-101.
- Snyder,R. und T.Hennessey. 2003. "Cold tolerance and homeoviscous adaptation in freshwater alewives (*Alosa pseudoharengus*)." *Fish Physiology and Biochemistry*. 29:117-126.

## Literatur

---

- Sobel, J. 1996. "*Gadus morhua*." *IUCN Red list of threatend species*.
- Sohal, R.S. 1993. "Aging, cytochrome oxidase activity, and hydrogen peroxide release by mitochondria." *Free Radical Biology and Medicine*. 14:583-588.
- Starkov, A.A. und G.Fiskum. 2001. "Myxothiazol induces H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production from mitochondrial respiratory chain." *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 281:645-650.
- Tiwari, B.S., B.Belenghi, und A.Levine. 2002. "Oxidative Stress Increased Respiration and Generation of Reactive Oxygen Species, Resulting in ATP Depletion, Opening of Mitochondrial Permeability Transition, and Programmed Cell Death." *Plant Physiology*. 128:1271-1281.
- Tretter, L. und V.Adam-Vizi. 2000. "Inhibition of Krebs Cycle Enzymes by Hydrogen Peroxide: A Key Role of (alpha)-Ketoglutarate Dehydrogenase in Limiting NADH Production under Oxidative Stress." *Journal of Neuroscience*. 20:8972-8979.
- Turrens, J.F. 1997. "Superoxide Production by the Mitochondrial Respiratory Chain." *Bio-science Reports*. 17:3-8.
- Turrens, J.F. 2003. "Mitochondrial formation of reactive oxygen species." *The Journal of Physiology*. 552:335-344.
- Turrens, J.F., A.Alexandre, und A.L.Lehninger. 1985. "Ubisemiquinone is the electron donor for superoxide formation by complex III of heart mitochondria." *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 237:408-414.
- Ultsch, G.R., M.E.Ott, und N.Heisler. 1980. "Standard metabolic rate, critical oxygen tension, and aerobic scope for spontaneous activity of trout (*Salmo gairdneri*) and carp (*Cyprinus carpio*) in acidified water." *Comparative Biochemistry and Physiology*. 67A:329-335.
- van den Thillart, G. und J.Modderkolk. 1978. "The effect of acclimation temperature on the activation energies of state III respiration and on the unsaturation of membrane lipids of goldfish mitochondria." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*. 510:38-51.
- Vreugdenhil, P.K., M.A.Rankin, und J.H.Southard. 1997. "Cold storage sensitizes hepatocytes to oxidative stress injury." *Transplant International*. 10:379-385.
- Wieser, W. und G.Krumschnabel. 2001. "Hierarchies of ATP-consuming processes : direct compared with indirect measurements, and comparative aspects." *Journal of Biochemistry*. 355:389-395.
- Williams, E.E. und J.R.Hazel. 1994. "Membrane fluidity and hemilayer temperature sensitivity in trout hepatocytes during brief in vitro cold exposure." *AJP: Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*. 266:773-780.
- Williams, E.E. und J.R.Hazel. 1995. "Restructuring of plasma membrane phospholipids in isolated hepatocytes of rainbow trout during brief in vitro cold exposure." *Journal*



## Literatur

---

*of Comparative Physiology B: Biochemical, Systemic, and Environmental Physiology*. 164:600-608.

Zakharov, M.V., B.de Wachter, F.J.Sartoris, H.O.Pörtner, und R.Blust. 2003. "Thermal physiology of the common eelpout (*Zoarces viviparus*)."  
*Journal of Comparative Physiology B*. 173:365-378.

Zittier, Z.M.C. Einfluss der Temperatur auf das Wachstum von Fischen unterschiedlicher Entwicklungsstadien. 2006. Diplomarbeit an der Universität Bremen



## 6 Anhang

### 6.1 Versuchstiere

**Tabelle 6.1** Übersicht Versuchstiere

Population	NEAC	NSC 1	NSC 2
Hälterungstemperatur	10°C		
Hälterungszeitraum	> 1 Jahr		2 Wochen
n	9	12	7
m/w	4:6	7:5	2:5
Länge	40,4 - 44,2	38,2 - 50,1	33,5 - 43,7
Gewicht	218 - 630	393 - 999	298 - 586
Lebergewicht	1,71 - 8,94	3,6 - 11,0	2,1 - 8,69
K	0,67 - 0,84	0,69 - 0,9	0,64 - 0,95
HSI	0,54 - 1,4	0,65 - 1,2	0,7 - 1,9
GSI m	0,04 - 0,43	0,05 - 0,2	0,04 - 0,12
GSI w	0,41 - 1,56	0,34 - 0,48	0,07 - 0,1

**Tabelle 6.2.** angenäherte Wachstumsraten des in dieser Arbeit des verwendeten langzeitakklimierten *G. morhua*

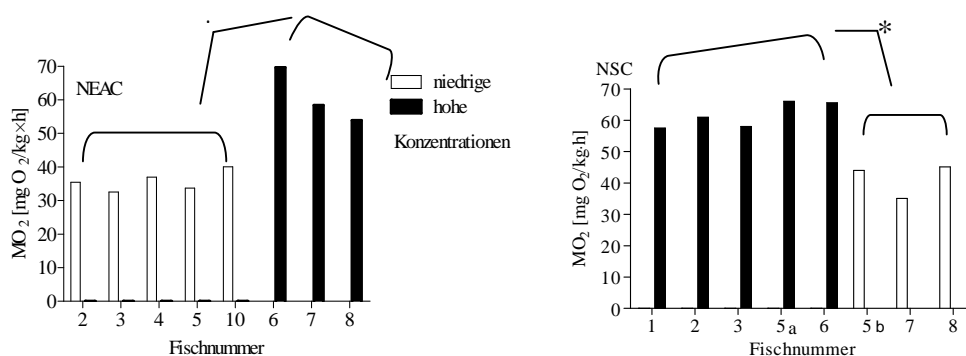
NEAC: nordost-arktischer Kabeljau (F1-Generation aus Zucht), NSC: Nordseekabeljau

	Population und Akklimierungstemperatur	
	NEAC 10°C	NSC 10°C
Anfangsgewicht [g] (Datum)	61,63 ± 3,04 (10.04.06)	280 ± 25,38 (18.06.06)
Endgewicht [g] (Datum)	459,86 (15.02.07)	726,86 (30.5.07)
Gewichtszunahme [% Gewichtszunahme/Tag]	2,08	0,5
Anfangslänge [cm]	23,00	31,77
Endlänge [cm]	37,26	45,30
Längenzunahme [% Längenzunahme/Tag]	0,18	0,12

**Tabelle 6.3** Kondition des langzeitgehälterten Nordseekabeljau NSCI

Tag des Fisches	18.07.2007	~ März 2007
11	0,85	0,75
14	0,94	0,77
16	0,94	0,76
20	0,89	0,90
21	0,85	0,82
24	0,76	0,79
25	0,69	0,71

## 6.2 Ganztierrespiration



**Abb. 6.1** Ganztierrespiration im Qualitätsvergleich des Wassers, Hälterungstemperatur 10°C, Daten auf 1kg TG normiert. Weiß: niedrige, schwarz: hohe Ammonium und Nitritkonzentrationen, Sterne kennzeichnen Signifikanzen; links: NEAC (nordost-arktischer Kabeljau, n = 8), rechts: NSC (Nordseekabeljau, n = 7): 5a: vor Wasserwechsel, 5b: nach Wasserwechsel

**Tabelle 6.4** Respirationsraten des Ganztieres: Einzelwerte

NEAC	2	3	4	5	6	7	8	10
MW [mg O <sub>2</sub> /(kg*h)]	35,42	32,49	36,96	33,71	69,59	58,34	53,85	40,07
SD	3,85	4,91	2,45	2,02	9,18	3,55	6,03	5,46

NSC	1	2	3	5a vor WW	5b nach WW	6	7	8
MW [mg O <sub>2</sub> /(kg*h)]	57,55	60,96	58,02	66,08	44,03	65,62	35,10	45,13
SD	6,24	15,41	6,66	11,81	11,25	3,82	5,94	7,45

## 6.3 Hepatozyten: Qualität und Quantität

**Tabelle 6.5** Anzahl der intakten Zellen

	Tag 1 versus Tag 2 morgens [%]	Tag 1 versus Tag 2 abends [%]
NEAC	81,20 +/- 8,3	54,16 +/- 9,89
NSC	62,51 +/- 6,0	47,25 +/- 4,28

**Tabelle 6.6** Viabilität

	NEAC	NSC
0 h	97,27 +/- 0,85	92,78 +/- 2,28
18 h	90,21 +/- 2,34	88,04 +/- 5,22
28 h	87,85 +/- 2,56	78,40 +/- 5,49

6.4 Zellrespiration

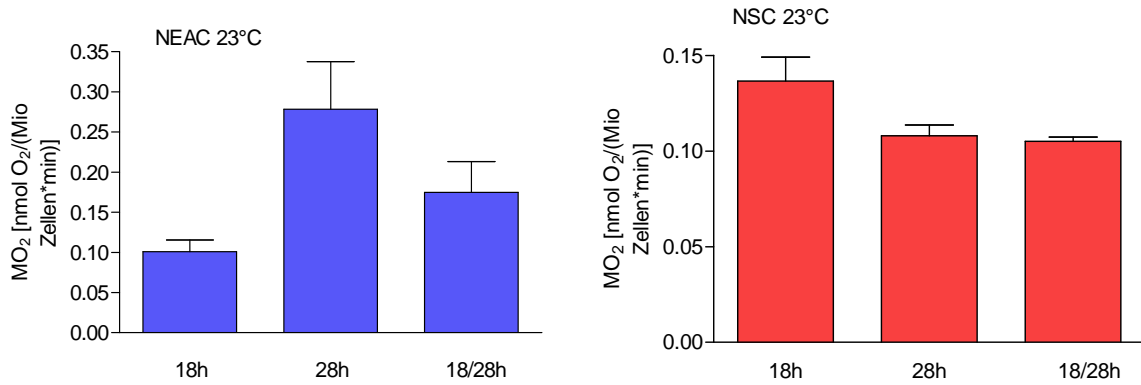


Abbildung 6.2 Zellrespiration: Vergleich bei 23°C Tag 2 morgen- (18h) und abend-Messung (28h)

Tabelle 6.7 Respirationsraten an Tag 2 im Vergleich der 18 h und 23 h Messung bei 23°C.

Fisch	NEAC 23°C		NSC 23°C	
	MO <sub>2</sub> 18 h [nmolO <sub>2</sub> /Mio Zellen•min]	MO <sub>2</sub> 28 h [nmolO <sub>2</sub> /Mio Zellen•min]	MO <sub>2</sub> 18 h [nmolO <sub>2</sub> /Mio Zellen~min]	MO <sub>2</sub> 28 h [nmolO <sub>2</sub> /Mio Zellen~min]
1			0,21	0,15
2			0,11	0,10
3			0,09	0,11
4			0,11	0,10
5	0,11	0,12	0,10	0,35
6	0,29	0,30	0,10	0,09
7	0,04	0,29	0,10	0,11
8	0,09	0,41	0,20	0,19
Mittelwert	0,10	0,28	0,13	0,15
SD	0,04	0,12	0,05	0,09

Tabelle 6.8 Respirationsraten Tag 1

	NEAC		NSC	
	5°C	23°C	5°C	23°C
MW [nmol O <sub>2</sub> /Mio Zellen•min]	0,05	0,10	0,05	0,10
SD	0,02	0,04	0,02	0,04
Anzahl	13	14	13	14

## Anhang

**Tabelle 6.9** Zellrespirationsraten Tag 2

	Temperatur [°C]	1	3	5	7	9	15	23
NEAC	MW [nmol O <sub>2</sub> /Mio Zellen]	0,08	0,12	0,16	0,16	0,22	0,30	0,16
	SD	0,03	0,05	0,05	0,05	0,07	0,14	0,05
	n	9	9	8	9	7	7	7
NSC	MW [nmol O <sub>2</sub> /Mio Zellen]	0,07	0,10	0,16	0,15	0,12	0,15	0,14
	SD	0,04	0,03	0,06	0,03	0,06	0,04	0,04
	n	13	9	11	8	10	8	13

**Tabelle 6.10** Prozentuale Anteile der Respirationsprozesse (MW +/- SE)

NEAC				
Temperatur [°C]	Mitochondriale Respiration [%]	ATP-Synthese [%]	Protonenleck [%]	Nicht-Mitochondriale Respiration [%]
1	45,22 +/- 4,09	31,07 +/- 9,87	2,64	49,12 +/- 6,63
3	53,96 +/- 6,40	61,45 +/- 7,42	35,42 +/- 6,81	44,17 +/- 5,86
5	58,09 +/- 7,87	47,51 +/- 8,28	23,04 +/- 9,64	41,91 +/- 7,87
7	57,75 +/- 6,22	47,36 +/- 9,56	41,26 +/- 15,88	42,25 +/- 6,22
9	66,76 +/- 4,88	51,66 +/- 5,93	23,16 +/- 5,54	33,24 +/- 4,88
15	53,61 +/- 3,99			46,39 +/- 3,99
23	64,63 +/- 7,31	53,43 +/- 18,89	29,51 +/- 5,95	29,41 +/- 4,89
NSC				
Temperatur [°C]	Mitochondriale Respiration [%]	ATP-Synthese [%]	Protonenleck [%]	Nicht-Mitochondriale Respiration [%]
1	44,14 +/- 9,02	45,60 +/- 6,05	13,478 +/- 1,52	58,25 +/- 10,15
3	51,81 +/- 6,40	44,98 +/- 7,01	13,11 +/- 2,80	48,19 +/- 6,40
5	66,95 +/- 6,55	52,51 +/- 6,82	17,54 +/- 7,12	33,05 +/- 6,55
7	61,35 +/- 7,37	48,643 +/- 5,37	20,19 +/- 7,03	38,65 +/- 7,37
9	54,39 +/- 7,00	53,28 +/- 7,58	10,26 +/- 2,64	45,61 +/- 7,00
15	59,80 +/- 7,57	31,47 +/- 12,07	33,56 +/- 4,00	40,20 +/- 7,57
23	49,66 +/- 8,64	39,76 +/- 6,92	59,09 +/- 27,14	46,97 +/- 9,19

**Tabelle 6.11** Aktivierungsenergien Tag 2 (5-23°C) der Zellrespiration

	NEAC	NSC
MW [kJ/mol]	-2,44	-4,09
SD	-6,41	-5,26

### 6.5 Proteinbestimmung

#### BIURET

Für die Vergleichbarkeit mit vorangegangenen Untersuchungen (Fischer 2002; Lannig 2003) sollte in der Zellsuspension die vorhandene Menge an Zellprotein mittels Biuret-Reaktion und eingebautem Waschschrift (siehe nachfolgendes Protokoll) erfolgen.

Die Form der Proteinbestimmung beruht auf einer Färbereaktion von gelöstem Biuret (Carbamoylharnstoff) und Kupfersulfat in alkalischem, wässrigem Milieu. Die Reaktion ist typisch für Verbindungen mit mindestens zwei Peptidbindungen und eignet sich daher für den Proteinnachweis (Lottspeich and Zorbas 1998). Dabei korreliert die Intensität des Farbstoffs direkt mit der Konzentration der reagierenden Gruppe. Die Färbung kann mittels Photometrie bestimmt werden.

#### Protokoll

##### Chemikalien

Waschlösung: 3:1 Diethylether in Ethanol

Deoxycholat: 20%ig in Wasser

Trichloressigsäure (TCA): 3 M

Biuret-Reagenz: vor Benutzung wurde die benötigte Menge filtriert.

##### Ablaufschema

Probe + Aqua dest.: 1000 µl + 25 µl 20% Deoxycholat

Vortexen bis Pellet vollständig resuspendiert, 15 Minuten bei RT inkubieren

+ 20 µl TCA

Vortexen, 15 Minuten, 15°C, 16.000 x g zentrifugieren, Überstand absaugen

+ 1000 µl Waschlösung

Vortexen bis Pellet vollständig resuspendiert ist, zentrifugieren (15 min, 15°C, 16.000 x g), Überstand absaugen

+ 200 µl Aqua dest. + 1000 µl Biuret-Reagenz

Vortexen bis Pellet vollständig resuspendiert ist, 30 Minuten bei

Raumtemperatur inkubieren, danach in Halbmikroküvette überführen und bei

546 nm gegen Leerwert (Wasser + Biuret) messen.

Die Erstellung einer Standardkurve erfolgte mit BSA, zum einem mit Wasser und zum anderen mit Hanks-Medium angesetzt. Nach Zugabe der TCA ließ das Pellet im Hanks-

Mediums nicht mehr resuspendieren, wodurch eine reproduzierbare Proteinbestimmung nicht möglich war.

Aus diesem Grunde sollte eine Proteinbestimmung mittels Bradford-Methode durchgeführt werden. Allerdings konnte auch hier keine erfolgreiche Bestimmung durchgeführt werden, da wahrscheinlich die geringe Menge an Zellprotein durch die hohe in der BSA-Proteinkonzentration im Medium verdeckt wurde. Aus zeitlichen Gründen konnten keine weiteren Testmessungen zur Modifizierung des Protokolls für Proteine in Hanks-Medium erfolgen.

### 6.6 ROS

Oxidativer Stress beschreibt eine Vielzahl von Prozessen, die durch eine vermehrte Produktion von ROS (Reactive Oxygen Species) und einer nicht ausreichenden Bildung von Antioxidantien zu einer Störung des Zellgleichgewichts führen. Die Bildung dieser Sauerstoffradikale erfolgt *in vivo* unter Einbindung der Atmungskette sowohl enzymatisch als auch nicht-enzymatisch (für einen Überblick siehe: Turrens 2003). ROS sind zellschädigend, da sie zu Schädigungen aller Zellbestandteile (Proteine, Lipide, Polysaccharide und DNA) führen. ROS sind ebenfalls an der Vermittlung der Kälte-induzierten Apoptose beteiligt (Rauen et al. 1999) und führen dort zu einer erhöhten Permeabilität der Mitochondrienmembran. Ein erhöhter Sauerstoffverbrauch erfolgt dadurch, dass ein Elektron auf molekularen Sauerstoff übertragen wird und so  $O_2^-$  entsteht. Der Anteil der ROS-Produktion an der Gesamtrespiration *in vitro* wird mit Werten von 0,15% bis 2% angegeben (St Pierre et al. 2002; Turrens 2003).



## Danksagung

Prof. **H.O. Pörtner** danke ich, dass ich diese Arbeit in seiner Arbeitsgruppe am AWI in Bremerhaven erstellen durfte. Ich bedanke mich für die lehrreichen und weiterführenden Anmerkungen und Diskussionen, die mein Interesse an der Physiologie vergrößerten und die für die Erstellung meiner Diplomarbeit sehr wertvoll waren.

Ganz besonders möchte ich Prof. **K.G. Collatz** danken, der es mir trotz meines Examens an der Universität Freiburg und trotz seiner zwischenzeitlichen Pensionierung ermöglicht hat, die Diplomarbeit fernab am AWI in Bremerhaven zu schreiben. Ohne ihn hätte ich diesen Schritt nicht gehen können.

Ein besonderer, sehr persönlicher Dank geht an meine Betreuerin **Dr. Gisela Lannig**. Sie hat mich über das interessante Thema meiner Arbeit in die Praxis und Theorie der Physiologie eingeführt und engagiert begleitet. Sie hatte immer eine Antwort auf meine Fragen und verstand es, mich zu fordern und zu fördern. Dass sie sich auch an Weihnachten noch mit meinen Entwürfen auseinandergesetzt hat, werde ich nicht vergessen.

Der Arbeitsgruppe „Physiologie mariner Tiere“ des AWIs danke ich auf diesem Weg für die freundliche Aufnahme in die Gruppe, für die vielen neuen Anregungen und für die Aufmunterung und Unterstützung, wenn es mal nicht so recht weiter gehen wollte.

Danke auch an Dr. Felix Mark für die Diskussion meiner Daten, fürs Mutmachen, Aufrichten und nicht zuletzt fürs Zuhören, Timo H. und Nils K. für den ständigen Kampf gegen meine „Anti-Geräte-Funktions-Aura“, Dr. Frank Melzner für die Helgoland-Expedition und die ständige Besorgnis um uns Diplomanden, Lars E. für die Diskussionen und Antworten zum Thema Proteine und Zellen, Sandra G. für die immer helfende (lila) Hand im Labor und die lustigen Stunden im Büro, Frauke S. für geteiltes Leid, Freude, Schocki und Weihnachtsfeiern vorm Computer, Kathleen W. für Korrekturen und die nie zu Ende gehörten Hörspiele. Ein Dank geht auch an meine Freunde, mit dabei Selina K. für die ablenkenden Gespräche, Anni S. für die fernschweifende Perspektive danach und danke an Rivqah N., dass sie aus fernen Ländern immer für mich da ist.

Der größte Dank gilt jedoch meinen Eltern. Ohne ihre (nicht nur finanzielle) Unterstützung und ihr Vertrauen in meine Ideen und Träume, hätte ich es nicht bis hierher geschafft.

Danke!

---

## **Eigenständigkeitserklärung**

Ich versichere, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Hilfsmittel und Quellen verwendet habe.

Freiburg, den 08. Januar 2008

.....

Unterschrift