

**Probleme hoher Stoffwechselraten bei Cephalopoden
aus verschiedenen geographischen Breiten**

**Consequences of high metabolic rates in cephalopods
from different geographical latitudes**

Susanne Zielinski

**Ber. Polarforsch. 338 (1999)
ISSN 0176 - 5027**

Susanne Zielinski

Alfred-Wegener-Institut für Polar- und Meeresforschung
Columbusstraße
27568 Bremerhaven

Die vorliegende Arbeit ist die im wesentlichen unveränderte Fassung einer kumulativen Dissertation, die in der Sektion Ökologie und Ökophysiologie bei Prof. Dr. H.O. Pörtner angefertigt und im Juli 1999 dem Fachbereich 2 (Biologie/Chemie) der Universität Bremen vorgelegt wurde.

Inhaltsverzeichnis

	Seite
Abkürzungsverzeichnis	III
Zusammenfassung	V
Summary	VIII
1 . Einleitung	1
2 . Material und Methoden	18
2.1 Fang und Hälterung der Versuchstiere	18
2.2 Inkubationsexperimente unter Hypoxie	19
2.3 Temperaturinkubationen.....	19
2.4 Gewinnung und Aufbereitung der Gewebeproben.....	20
2.5 Untersuchungen zum Sauerstofftransport im Blut	21
2.6 Analysen und Berechnungen	22
2.6.1 Bestimmung der intrazellulären Säure-Basen-Parameter.....	21
2.6.2 Pufferwertbestimmung.....	23
2.6.3 Bestimmung von Metaboliten des Energiestoffwechsels.....	24
2.6.4 Bestimmung von Enzymaktivitäten.....	24
2.6.5 Quantifizierung von Oxidationsprodukten	25
2.6.6 Berechnung der Gibbs'schen freien Energie der ATP-Hydrolyse	26
2.6.7 Berechnung der Aktivierungsenergie.....	28
2.6.8 Berechnung der Q ₁₀ -Werte.....	28
2.6.9 Berechnung der Protonenproduktion.....	29
2.6.10 Berechnung des Bohr- und Hill-Koeffizienten.....	30
2.6.11 Abschätzung des sauerstoffabhängigen CO ₂ -Transportes	30
2.7 Statistik.....	31
3 . Publikationen	32
Liste der Publikationen bzw. beabsichtigten Publikationen	
und Erklärung über den von mir geleisteten Anteil	32
I Metabolic performance of the squid <i>Lolliguncula brevis</i> (Cephalopoda)	
during hypoxia: an analysis of the critical Po ₂	34
II Temperature as a critical constraint in warm water and Antarctic	
cephalopods	62

III	Temperature effects on oxygen binding properties of haemocyanin of an Antarctic cephalopod.....	100
IV	Oxidative stress and antioxidative defense in cephalopods: a function of metabolic rate or age?	120
4	Diskussion	146
4.1	Der Einfluß von Hypoxie und Temperatur auf den Stoffwechsel von Cephalopoden.....	146
4.1.1	Anaerober Stoffwechsel als Indikator für kritische Umweltbedingungen.....	146
4.1.2	Säure-Basen-Haushalt in Abhängigkeit von der Temperatur.....	150
4.1.3	Energiestoffwechsel in Abhängigkeit von Hypoxie und Temperatur	153
4.1.4	Temperatursensitivität von Enzymaktivitäten	155
4.1.5	Aerobe und anaerobe Kapazitäten antarktischer Cephalopoden.....	158
4.2	Temperatureinfluß auf den Sauerstofftransport am Hämocyanin.....	160
4.3	Untersuchungen zum Oxidationsschutz	165
4.3.1	Enzymatischer Oxidationsschutz und oxidative Schäden in Relation zur Stoffwechselrate.....	165
4.3.2	Bedeutung der Radikalbildung und des Oxidationsschutzes für die Alterung	169
4.4	Ausblick: Temperatur und Sauerstoff als limitierende Faktoren für Cephalopoden.....	173
5	Literaturverzeichnis	176
	Danksagung	198

Abkürzungen

α_{CO_2}	Löslichkeitskoeffizient von Kohlendioxid
Abb.	Abbildung
ADP	Adenosin-5'-diphosphat
AK	Arginin-Kinase
AMP	Adenosin-5'-monophosphat
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
β_{NB}	Nichtbikarbonat-Pufferwert
C_{CO_2}	Gesamtgehalt des Kohlendioxids
CS	Citrat-Synthase
ΔE	Extinktionsänderung
ΔH^+_{met}	metabolische Protonenproduktion
$\Delta H^+_{\text{nicht-resp}}$	nicht-respiratorische Protonenproduktion
ΔH^+_{resp}	respiratorische Protonenproduktion
$\Delta \text{HCO}_3^- / \Delta \text{HcyO}_2$	Haldane-Koeffizient
$\Delta \log P_{50} / \Delta \text{pH}$	Bohr-Koeffizient
$dG/d\xi$	Gibbs'sche freie Energie der ATP-Hydrolyse
DNA	Desoxyribonucleinsäure
E_a	apparente Arrhenius-Aktivierungsenergie
FG	Frischgewicht
GAPDH	Glycerinaldehydphosphat-Dehydrogenase
GluDH	Glutamat-Dehydrogenase
GP	Glykogen-Phosphorylase
GPDH	Glycerin-3-phosphat-Dehydrogenase
GPX	Glutathion-Peroxidase
GR	Glutathion-Reduktase
GSH/GSSG	Glutathion (reduziert/oxidiert)
HcyO ₂	oxygeniertes Hämocyanin
K	Kontrolle
L-Arg	L-Arginin
LDH	Laktat-Dehydrogenase
MDA	Malondialdehyd
MDH	Malat-Dehydrogenase
Mo_2	Sauerstoffverbrauch
n	Zahl der Versuche
n_{50}	Hill-Koeffizient

Abkürzungen

NAD/NADH	Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid (oxidiert/reduziert)
NADP/NADPH	Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat (oxidiert/reduziert)
ODH	Octopin-Dehydrogenase
p	Irrtumswahrscheinlichkeit
P ₅₀	Sauerstoffpartialdruck im Halbsättigungspunkt
P _c	kritischer Sauerstoffpartialdruck
P _{CO₂}	Kohlendioxidpartialdruck
PFK	Phosphofructokinase
pH _i	intrazellulärer pH
P _i CO ₂	intrazellulärer Kohlendioxidpartialdruck
PK	Pyruvat-Kinase
pK'''	negativer dekadischer Logarithmus der Dissoziationskonstanten K''' von H ₂ CO ₃
P _{O₂}	Sauerstoffpartialdruck
Q ₁₀	Temperaturquotient, Maß für die Beschleunigung von physiologischen Prozessen bei einer Temperaturerhöhung um 10°C
PLA	Phospho-L-Arginin
r ²	Bestimmtheitsmaß
R	allgemeine Gaskonstante
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
RFI	relative Fluoreszenzintensität
S	Sauerstoffsättigung des Hämocyanin
S.	Seiten
SD	Standardabweichung
SOD	Superoxid-Dismutase
T	Temperatur
T _c	kritische Temperatur
v	Volumen
w	Gewicht

Zusammenfassung

An dem Kalmaren *Lolliguncula brevis*, in dessen Lebensraum regelmäßig Fluktuationen in der Sauerstoffverfügbarkeit auftreten, wurde die Hypoxietoleranz untersucht. Es wurde ein kritischer Sauerstoffpartialdruck (P_c) bestimmt, der durch das Einsetzen des anaeroben Stoffwechsels gekennzeichnet ist. Trotzdem reichten während einer zwei-stündigen Inkubation bei Sauerstoffpartialdrücken zwischen 19,3 und 6,6 kPa (moderate Hypoxie) die aeroben und anaeroben Prozesse aus, den Energiestatus in der Mantelmuskulatur aufrechtzuerhalten. Demgegenüber trat bei extremer Hypoxie ($2,8 \pm 0,3$ kPa) schon nach 15 Minuten eine signifikante Abnahme der ATP- und Phospho-L-Arginin-Konzentrationen sowie der Gibbs'schen freien Energie der ATP-Hydrolyse auf. Unter diesen Bedingungen scheint *Lolliguncula brevis* rasch seine Leistungsgrenzen zu erreichen. Der vergleichsweise hohe P_c im Bereich von 7,9 bis 9,4 kPa ist im Zusammenhang mit der hohen Stoffwechselrate dieser Kalmare zu sehen. Dennoch deuten die Ergebnisse darauf hin, daß diese Kalmare in der Lage sind, hypoxe Perioden in ihrem Lebensraum zu tolerieren und möglicherweise sogar ein gewisses Aktivitätsniveau aufrecht erhalten können.

Eine Beteiligung anaerober Stoffwechselwege an der Energiebereitstellung wurde in der Mantelmuskulatur von *Lolliguncula brevis* und dem antarktischen Oktopoden *Pareledone charcoti* nach Inkubation bei hohen Temperaturen festgestellt. Durch die Akkumulation anaerober Metabolite konnte für beide Arten die obere kritische Temperatur bestimmt werden, die die Grenze der aeroben Reserve des Gesamtorganismus anzeigt. Jenseits der kritischen Temperaturen konnte der Energiestatus nicht aufrechterhalten werden, sichtbar an der Konzentrationsabnahme der energiereichen Metabolite ATP und Phospho-L-Arginin. Nach Überschreiten der kritischen Temperaturen trat bei beiden Arten eine intrazelluläre Azidose auf, die auf ein wärmeinduziertes Versagen der Säure-Basen-Regulation zurückzuführen sein könnte. Die obere kritische Temperatur von *Lolliguncula brevis* liegt nur gerade oberhalb der natürlichen Temperaturen im Lebensraum. Möglicherweise ist die Toleranz dieses Kalmaren gegenüber hohen Temperaturen wie bereits bei der Hypoxietoleranz gesehen, durch den hohen Sauerstoffbedarf eingeschränkt. Demgegenüber liegt die obere kritische Temperatur für *Pareledone charcoti* deutlich über den Umgebungstemperaturen. Ein Vergleich zwischen Aktivitätsniveau und kritischen Temperaturen verschiedener antarktischer Arten deutet darauf hin, daß die Lage der kritischen Temperatur bei diesen Arten mit ihrer Lebensweise zusammenhängt.

Die Aktivitäten verschiedener an der Glykolyse, dem Aminosäurekatabolismus und dem Zitronensäurezyklus beteiligten Enzyme wurden in den Geweben der antarktischen Oktopoden *Pareledone charcoti* und *Pareledone polymorpha* sowie des antarktischen Kalmaren *Psychroteuthis glacialis* bei Temperaturen zwischen 0 und 30 °C bestimmt. Für die Enzyme der Glykolyse und des Aminosäurekatabolismus wurden bei niedrigen Temperaturen hohe Arrhenius-Aktivierungsenergien gefunden. Dies bestätigt die Hypothese, daß durch hohe Aktivierungsenergien bei niedrigen Temperaturen die Geschwindigkeit enzymatischer Reaktionen gering gehalten werden kann. Dies stände im Einklang mit der niedrigen Stoffwechselrate, die für *Pareledone charcoti* gefunden wurde. Weiterhin wurden die Aktivitäten der gleichen Enzyme bei 0 °C nach einer Temperaturinkubation von *Pareledone charcoti* gemessen. Es zeigte sich zunächst ein Anstieg der Aktivitäten, wenn die Inkubationstemperatur von 0 °C bis auf 6 bzw. 8 °C erhöht wurde. Eine Erhöhung der Inkubationstemperatur auf 10 °C resultierte in einer Abnahme der Aktivitäten bis auf annähernd Kontrollwerte. Diese Abnahme der Enzymaktivitäten korreliert mit der oberen kritischen Temperatur dieser Art und könnte auf ein Ungleichgewicht zwischen Proteinsynthese und Proteinabbau zurückzuführen sein.

Ein Vergleich der Enzymaktivitäten der antarktischen Cephalopoden mit denen aus gemäßigten Breiten zeigte, daß *Psychroteuthis glacialis* aerobe und zum Teil auch anaerobe Kapazitäten aufweist, die mit denen von Kalmaren aus gemäßigten Breiten vergleichbar sind. Demgegenüber scheinen die Enzymaktivitäten der beiden untersuchten Oktopodenarten *Pareledone charcoti* und *Pareledone polymorpha* keine Kältekompensation erfahren zu haben. Diese Unterschiede lassen sich wahrscheinlich auf die unterschiedliche Lebensweise der benthischen Oktopoden und des pelagischen Kalmars zurückführen. Die Kältekompensation der aeroben Kapazität des Kalmars könnte dazu beitragen, ein hohes Aktivitätsniveau bei niedrigen Temperaturen aufrechtzuerhalten.

Der hohe Sauerstoffbedarf vieler Cephalopoden erfordert eine Anpassung des Sauerstofftransports am Hämocyanin an den hohen Sauerstoffbedarf. Die Bedeutung des Hämocyanins für den Sauerstofftransport wurde vergleichend an der eurythermen Art *Sepia officinalis* und dem stenothermen antarktischen Oktopoden *Megaleledone senoi* untersucht. Dabei wurde besonders der Einfluß der Temperatur auf den Sauerstofftransport berücksichtigt. Eine Methode wurde entwickelt, die es erlaubt, Änderungen des Blut-pH und der Sauerstoffsättigung des Hämocyanins kontinuierlich zu verfolgen. Bei beiden Arten stieg die pH-Sensitivität mit zunehmender Temperatur an. Für das Hämocyanin beider Arten wurde eine pH-unabhängige venöse Reserve gefunden, die die Menge des Sauerstoffs angibt, der selbst bei einer extremen pH-Abnahme am

Hämocyanin gebunden bleibt. Für das Hämocyanin von *Megaleledone senoi* lag dieser Wert bei 43 % (0 °C), während diese venöse Reserve bei *Sepia officinalis* 19 % betrug (20 °C). Die Kooperativität des Hämocyanins von *Sepia officinalis* zeigte sowohl eine pH- als auch eine Temperaturabhängigkeit. Zudem nahm die Sauerstoffaffinität dieses Hämocyanins mit einer Rate von $\Delta P_{50}/\Delta T = 0,12$ kPa (pH 7,4) pro °C Temperaturanstieg ab. Im Gegensatz dazu änderte sich die Sauerstoffaffinität des Hämocyanins von *Megaleledone senoi* nur mit einer Rate von $\Delta P_{50}/\Delta T < 0,01$ kPa pro °C. Außerdem änderte sich die Kooperativität weder in Abhängigkeit von der Temperatur noch vom pH-Wert. Aufgrund der niedrigeren Stoffwechselrate von Oktopoden im Vergleich zu Sepien oder Kalmaren wird die pH-Abhängigkeit des Sauerstofftransports am Hämocyanin des Oktopoden nicht in dem Ausmaß maximiert wie es bei anderen Cephalopoden der Fall ist. Insgesamt scheint der Sauerstofftransport bei *Megaleledone senoi* auf die niedrige Stoffwechselrate antarktischer Oktopoden abgestimmt zu sein. Außerdem steht die Temperaturunabhängigkeit der Sauerstoffbindungseigenschaften dieses Hämocyanins im Einklang mit der Stenothermalität dieser Kaltwasser-Oktopoden.

Hohe Stoffwechselraten führen bei vielen Arten zu einer hohen Produktionsrate von Sauerstoffradikalen. In den Geweben von *Sepia officinalis* und *Lolliguncula brevis* wurden die Aktivitäten der am Oxidationsschutz beteiligten Enzyme gemessen, um zu untersuchen, ob die antioxidative Kapazität der Cephalopoden an eine möglicherweise hohe Radikalbildungsrate angepaßt ist. Außerdem wird der oxidative Streß als einer der wichtigsten Faktoren für die Alterung angesehen. Daher wurden zur Untersuchung, ob dieser Faktor zu der relativ kurzen Lebensspanne von Cephalopoden beiträgt, in definierten Altersgruppen von *Sepia officinalis* die Konzentrationen von Malondialdehyd und Lipofuscin als Indikatoren für Lipidperoxidation bestimmt. Im Vergleich der beiden Cephalopodenarten zeigte sich, daß die Aktivitäten der Oxidationsschutzenzyme generell in der Mantelmuskulatur und im Kiemengewebe des Kalmaren niedriger waren. Desweiteren war der antioxidative Status der Cephalopoden niedriger als bei anderen ektothermen Tieren. Mit zunehmendem Alter von *Sepia officinalis* zeigte sich eine signifikante Zunahme der Aktivitäten der Superoxid-Dismutase und der Glutathion-Peroxidase, während die Katalaseaktivität mit zunehmenden Alter signifikant abnahm. Der relativ geringe Oxidationsschutz könnte den signifikanten Anstieg der Malondialdehyd- und der Lipofuscinkonzentration auf ein vergleichsweise hohes Niveau in den ältesten Tieren erklären und auf diese Weise zu der kurzen Lebensspanne dieser Gruppe von Tieren beitragen.

Summary

Hypoxia tolerance was investigated in brief squid *Lolliguncula brevis*, which are regularly exposed to fluctuating oxygen levels in their shallow coastal environment. A critical oxygen partial pressure (P_c) was determined, which is characterised by the onset of anaerobic metabolism. During two hours of exposure to oxygen partial pressures between 19.3 and 6.6 kPa (moderate hypoxia) aerobic and anaerobic pathways were sufficient to maintain energy status in the mantle musculature. In contrast, both ATP and phospho-L-arginine concentrations as well as the Gibb's free energy change of ATP hydrolysis were significantly decreased already after 15 minutes of extreme hypoxia (2.8 ± 0.3 kPa). Under these conditions *Lolliguncula brevis* seems to rapidly reach its limits of performance. The comparatively high P_c of 7.9 to 9.4 kPa appears to be related to the high metabolic rate of this squid. Nevertheless, these results indicate that the brief squid may be able to tolerate fluctuations of oxygen partial pressure in the ambient water and even maintain muscular activity to a certain extent.

Anaerobic metabolism was also found to contribute to energy production in the mantle musculature of *Lolliguncula brevis* and the Antarctic octopod *Pareledone charcoti* during exposure to high temperatures. A high critical temperature (T_c) could be defined for both cephalopods by the accumulation of anaerobic end products, which indicates the limits of the aerobic reserve for the whole organism. Beyond the critical temperature the energy status could not be maintained as indicated by the depletion of ATP and phospho-L-arginine levels. At the same time an intracellular acidosis was found, which might be caused by a heat induced failure of pH-regulation. The high critical temperature for *Lolliguncula brevis* is found just above the highest ambient temperatures seen in its natural environment. In accordance with the limited hypoxia tolerance, the tolerance of this squid to high temperature might be determined by its high oxygen demand. In contrast, the upper temperature limit for *Pareledone charcoti* is well above ambient temperature. A comparison between the levels of activity and critical temperatures among several Antarctic species indicates, that the critical temperature might be influenced by life style and activity levels.

Activities of enzymes involved in glycolysis, amino acid degradation and citric acid cycle were analysed in tissues of the Antarctic octopods *Pareledone charcoti* and *Pareledone polymorpha* as well as in the squid *Psychroteuthis glacialis* at temperatures between 0 and 30 °C. Enzymes of glycolysis and amino acid degradation displayed high levels of Arrhenius activation energy at low temperatures. This finding supports the hypothesis,

that high levels of activation energy support a low metabolic flux at low temperatures, in accordance with the low metabolic rate found for *Pareledone charcoti*. When enzyme activities were investigated at 0 °C after exposure of *Pareledone charcoti* to temperatures between -1.8 and 10°C, activities increased when temperature was elevated to 6 or 8 °C, but fell to almost control values when temperature was increased further. This drop in enzyme activities correlates with the upper critical temperature of this species and might be caused by an imbalance between protein synthesis and degradation.

A comparison of enzyme activities of Antarctic cephalopods with species from lower latitudes demonstrated, that *Psychroteuthis glacialis* displays similar aerobic and to some extent anaerobic capacities as squids from temperate waters. In contrast, enzyme activities in the Antarctic octopods *Pareledone charcoti* and *Pareledone polymorpha* appear not to be compensated for low temperatures. These differences might be related to the different life styles of benthic octopods and pelagic squid. The cold compensation of aerobic capacity found in the squid might contribute to maintain a high activity at low temperatures.

High oxygen requirements in cephalopods require an efficient oxygen carrier in the blood. Oxygen binding and its temperature dependence were compared in haemocyanins of the eurythermal cuttlefish *Sepia officinalis* and the stenothermal Antarctic octopod *Megaleledone senoi*. A technique was developed which allowed continuous recordings of pH changes and associated fluctuations in haemocyanin oxygen saturation. In both species pH sensitivity of oxygen binding increased with increasing temperature. The pH-independent venous reserve was 43 % in *Megaleledone senoi* at 0 °C and 19 % in *Sepia officinalis* at 20 °C. The cooperativity of *Sepia officinalis* haemocyanin was pH- as well as temperature dependent, whereas the cooperativity of *Megaleledone senoi* haemocyanin was not influenced by temperature or pH. Oxygen affinity of *Sepia officinalis* haemocyanin increased with temperature at a rate of $\Delta P_{50}/\Delta T = 0.12 \text{ kPa } ^\circ\text{C}^{-1}$ (pH 7.4), while this rate was much smaller in *Megaleledone senoi* haemocyanin ($\Delta P_{50}/\Delta T < 0.01 \text{ kPa } ^\circ\text{C}^{-1}$; pH 7.4). The low metabolic rate of octopods compared to cuttlefish or squids seems to eliminate the necessity to maximise pH dependent oxygen transport to the extent seen in other cephalopods. In *Megaleledone senoi* oxygen transport seems to be tuned to the unusually low metabolic rates found in Antarctic octopods. Furthermore, the temperature independent oxygen affinity reflects the stenothermality of these cold water octopods.

The high metabolic rates of cephalopods might be related to high levels of oxygen radical production. Therefore, the activities of antioxidative enzymes were investigated in tissues

of the cuttlefish *Sepia officinalis* and the squid *Lolliguncula brevis*. Furthermore, since oxidative stress is regarded to be one of the most important factors contributing to aging, the levels of malondialdehyde and lipofuscin were evaluated as indicators of lipid peroxidation in well defined laboratory reared age groups of *Sepia officinalis*. Maximal enzyme activities were generally lower in tissues of *Lolliguncula brevis* than in *Sepia officinalis*. Comparison with other ectothermic animals showed both cephalopod species to have a lower antioxidative status. Activities of superoxide dismutase and glutathione peroxidase increased significantly with increasing age of *Sepia officinalis*, while catalase activity decreased with increasing age. The comparatively low antioxidative status might have caused the significant increase of malondialdehyde and lipofuscin concentrations in the oldest animals and might thereby contribute to the short life span of these cephalopods.

1. Einleitung

Vor über 500 Millionen Jahren entstanden im späten Kambrium die ersten Cephalopoden, die alle durch eine externe Schale gekennzeichnet waren (Lehmann 1987; Teichert 1988). Vermutlich bewegten sich diese nur wenige Zentimeter großen Lebewesen zunächst noch schneckenartig kriechend auf dem Meeresboden (Lehmann 1987). Von den beschalteten Cephalopoden haben nur die 5 Arten der Gattung *Nautilus* bis heute überlebt. Bei den übrigen heute noch vorkommenden Cephalopoden, die in der Unterklasse Coleoidea zusammengefaßt werden, wurde die Schale im Laufe der Evolution ins Innere verlagert oder sogar bis auf winzige Rudimente zurückgebildet (Siewing 1985; Remane et al. 1986). Die rezenten Coleoideen lassen sich vermutlich auf einen gemeinsamen Vorfahren zurückführen (Clarke 1988a), dessen Ursprung im späten Paläozoikum (Oberes Devon bis Karbon vor 400 bis 330 Millionen Jahren) zu finden ist (Roper et al. 1984; Lehmann 1987; Teichert 1988). Die Vorfahren der heutigen Oktopoden haben sich wahrscheinlich in der Trias vor 200 Millionen Jahren von den übrigen Coleoideen abgespalten. Gegen Ende der Kreidezeit (70 Millionen Jahre) entstanden dann die Ordnungen der Oktopoda, der Teuthoidea (Kalmare) und Sepioidea (Sepien) in der heutigen Form (Ward 1983; Clarke 1988a). Oktopoden sind durch ihre 8 Arme und einen kurzen, sackförmigen Körper gekennzeichnet. Aufgrund ihrer 10 Arme, von denen 2 in Tentakeln umgewandelt sind, werden die Sepien und Kalmare als Dekapoden zusammengefaßt (Hunt 1996). Sepien sind an ihrem breiten, sackförmigen Körper zu erkennen, während Kalmare eine schlanke, torpedoförmige Gestalt haben (Roper et al. 1984). Bei diesen beiden Gruppen findet sich am Mantel beiderseitig ein Flossensaum, der je nach Lebensweise unterschiedlich groß ausgeprägt ist (Pörtner 1994a). Nur die Kalmare sind im Pelagial zu finden, Sepien und Oktopoden leben dagegen in Bodennähe (Piatkowski 1995). Den etwa 11.000 ausgestorbenen Tintenfischarten stehen ca. 650 lebende gegenüber (Voss 1977; Roper et al. 1984), die in allen Weltmeeren von den Tropen bis in die Polarmeere verbreitet sind und dort sowohl in den Gezeitenbereichen, in den offenen Meeren als auch in der Tiefsee vorkommen (Packard 1972; Roper et al. 1984; Hunt 1996).

Aus dem Südpolarmeer sind heute etwa 30 Kalmararten und mindestens 10 Oktopodenarten bekannt (Fischer und Hureau 1985; Piatkowski 1995), während Sepien dort nicht vorkommen (Roper et al. 1984). Kalmare bestimmen in vielen Teilen des Südpolarmeeres das Nekton. Zu den wichtigsten Arten gehören der Eiskalmar *Psychroteuthis glacialis*, der Neukalmar *Alluroteuthis antarcticus*, der Köderkalmar *Gonatus antarcticus* und der Gallertkalmar *Galiteuthis glacialis* (Piatkowski 1995). Unter den antarktischen Oktopoden bildet die Gattung *Pareledone* die am häufigsten vorkommenden Gruppe (Kuehl 1988).

Aufgrund der begrenzten Zugänglichkeit der Antarktis ist über die Biologie antarktischer Cephalopoden nur wenig bekannt. Neben der geographischen Verbreitung befaßten sich bisherige Studien an diesen Organismen vor allem mit der Taxonomie sowie ihrer Rolle in der Nahrungskette (Nemoto et al. 1985; Voss 1988; Rodhouse und Prince 1993; Clarke und Goodall 1994; Kubodera und Okutani 1994). An einigen antarktischen Vertretern der Cephalopoden sollten im Rahmen der vorliegenden Arbeit erste Untersuchungen zur Physiologie durchgeführt werden. Diese Arten werden im folgenden kurz beschrieben.

Der bis zu 44 cm Mantellänge erreichende Eiskalmar *Psychroteuthis glacialis* weist sich durch eine pelagische Lebensweise in Küstennähe aus und ist wahrscheinlich zirkumpolar verbreitet (Roper et al. 1984; Rodhouse 1989; Filippova und Pakhomov 1994). Die gleiche geographische Verbreitung wird für den benthischen Oktopoden *Pareledone charcoti* angenommen, während *Pareledone polymorpha* bislang nur aus dem atlantischen Sektor des Südpolarmeeres und aus der Ross See bekannt ist (Roper et al. 1984). Im Gegensatz zu den beiden mit einer maximalen Mantellänge von rund 7 cm relativ kleinen *Pareledone*-Arten (Roper et al. 1984) kann der Oktopode *Megaleledone senoi* eine Mantellänge bis zu 15 cm und ein Gewicht von mehreren Kilogramm erreichen (Taki 1961; Piatkowski et al. 1998). Die bisher berichteten Fänge dieses Oktopoden lassen auf eine Verbreitung im indoatlantischen Sektor des Südpolarmeeres schließen (Taki 1961; Kubodera und Okutani 1986, 1994; Piatkowski et al. 1998).

Die größte Artenvielfalt unter den Cephalopoden ist jedoch außerhalb der Polarmeere zu finden (Roper et al. 1984). Das Größenspektrum dieser Cephalopoden reicht von den nur rund 1,5 cm langen Arten der Gattung *Idiosepiidae* (Ordnung Sepiidea) bis hin zu den Riesenkalmaren (*Architeuthis*) mit einer Körperlänge bis zu 18 m (Roper et al. 1984; Nesis 1987). Einige der Kalmare, z. B. *Illex illecebrosus*, führen in ihrem Lebenszyklus lange Wanderungen im offenen Ozean durch (Pörtner 1994a). In warmen Gewässern sind *Sepia officinalis* und der kleine Kalmar *Lolliguncula brevis* beheimatet, die in dieser Arbeit näher untersucht wurden. Der bis zu 16 cm Mantellänge erreichende Kalmar *Lolliguncula brevis* lebt im Herbst und im Winter in küstenfernen Schelfgewässern und wandert im Frühling und im Sommer in die küstennahen Flachgewässer und Ästuar (Hendrix et al. 1981; Hanlon et al. 1983). Im Jahresverlauf schwanken die Temperaturen in seinem Lebensraum zwischen 11 und 31 °C (Gunter 1950; Dragovich und Kelly 1967). Als Ausnahme unter den sonst überwiegend stenohalinen Cephalopoden ist *Lolliguncula brevis* regelmäßig auch in Gewässern niedriger Salinität anzutreffen (Hendrix et al. 1981). Die geographische Verbreitung dieses Kalmaren reicht von Maryland entlang der Ostküste der Vereinigten Staaten bis zum Rio de la Plata, Argentinien und umfaßt auch

den Golf von Mexico und die Karibische See (Voss 1956). Auf der anderen Seite des Atlantiks ist *Sepia officinalis* (Mantellänge bis 50 cm) von der Nordsee über den Ärmelkanal bis vor den Küsten Nordafrikas sowie im Mittelmeer verbreitet. Nach Anpassung können diese Sepien kurze Zeit bei einer Salinität von 18 ‰ überleben, jedoch ist für eine normale embryonale Entwicklung eine Salinität von über 25 ‰ notwendig. Daher kommt diese Art nicht in der Ostsee vor. Nur zum Abbläuen dringen die Tiere in flachere Küstenbereiche ein. In der übrigen Zeit sind sie bis in Wassertiefen von 150 m zu finden (von Boletzky 1983). Die natürlichen Temperaturgrenzen dieser Art sind nicht genau bekannt, aber unterhalb von 10 °C hört das Wachstum auf (Richard 1971, zitiert nach von Boletzky 1983), während Temperaturen oberhalb von 25 °C von dieser Art wahrscheinlich nicht erfahren werden (Mangold-Wirz 1963).

Cephalopoden sind die einzigen Wirbellosen, die aktiv, rasch und ausdauernd zu schwimmen vermögen und dadurch zu Konkurrenten der Fische geworden sind (Lehmann 1987). Jedoch erfolgt die Fortbewegung generell nach einem völlig anderen Prinzip als bei den Fischen. Durch den raschen Ausstoß von Wasser aus der Mantelhöhle der Cephalopoden wird ein Antrieb nach dem Rückstoßprinzip erreicht (Packard 1972). Diese Art der Fortbewegung ist sehr energieaufwendig. Daher sind besonders bei den Kalmaren die höchsten Stoffwechselraten unter den marinen Evertebraten zu finden; sie können sogar die Stoffwechselraten von Fischen ähnlicher Lebensweise und Größe übertreffen. So wurden für die Kalmare *Illex illecebrosus* und *Loligo opalescens* ein höherer Sauerstoffverbrauch als für den Lachs *Oncorhynchus nerka* gemessen, gleichzeitig war aber die bei ausdauerndem Schwimmen erreichbare maximale Geschwindigkeit bei den Kalmaren geringer (O'Dor 1982; Webber und O'Dor 1985, 1986). Nur die Kalmare nutzen das Rückstoßschwimmen kontinuierlich, während diese Art der Fortbewegung von eher bodennah lebenden Cephalopoden meist nur bei der Flucht genutzt wird. Oktopoden bewegen sich auf ihren Armen vorwärts, Sepien schwimmen bevorzugt mit Hilfe ihres Flossensaums (Pörtner 1994a).

Die wichtigsten Energiespeicher bei vielen Tiergruppen sind Kohlenhydrate und Fette. Im Gegensatz dazu erfolgt die Deckung des Energiebedarfes bei den karnivoren Cephalopoden bevorzugt durch den Abbau von Proteinen bzw. Aminosäuren (Boucher-Rodoni und Mangold 1985, 1994; Segawa und Hanlon 1988; Lee 1994). Besonders Prolin wird genutzt (Mommsen und Hochachka 1981), das über Glutamat in den Zitronensäurezyklus gelangt. Der dabei entstehende energiereiche Wasserstoff wird durch Reduktionsäquivalente in die Atmungskette eingeschleust (Abb. 1). Im Cytosol wird

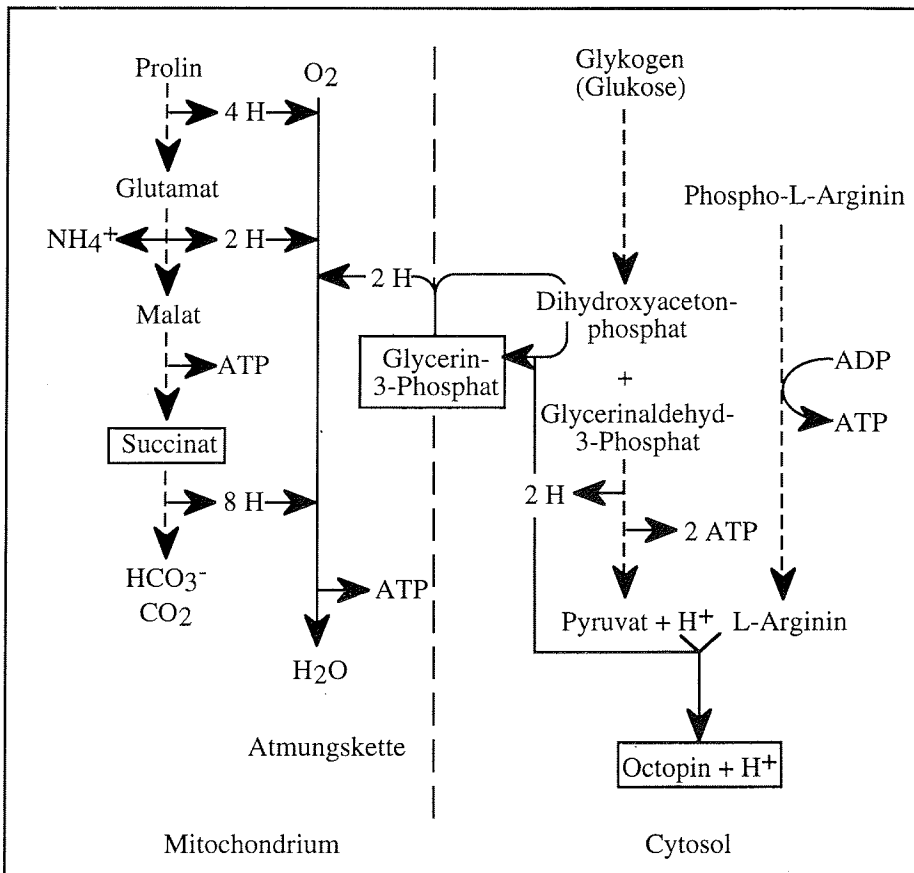


Abb. 1 Vereinfachte Darstellung der wichtigsten Vorgänge des aeroben und anaeroben Stoffwechsels von Cephalopoden (ohne strenge Berücksichtigung der stöchiometrischen Zusammenhänge). Endprodukte des aeroben Stoffwechsels sind CO₂ und Wasser. Während einer Sauerstoffmangelsituation reichern sich Octopin, Glycerin-3-Phosphat und Succinat im Gewebe an (verändert nach Pörtner 1994a, 1997).

energiereicher Wasserstoff durch die Oxidation von Glukose gebildet und auf Dihydroxyacetonphosphat übertragen. Anschließend wird dieser energiereiche Wasserstoff über das Glycerinphosphat-Shuttlesystem in die Mitochondrien übertragen (Hochachka et al. 1975; Stryer 1990). Bei intensiver Muskelarbeit werden die relativ geringen Glykogenvorräte schon nach wenigen Minuten aufgebraucht (Storey und Storey 1979, 1983; O'Dor und Webber 1986). Unter diesen Bedingungen ist der Abbau von Kohlenhydraten in der Glykolyse mit der Hydrolyse von Phospho-L-Arginin (PLA) gekoppelt (Abb. 1; Storey und Storey 1983). PLA, das Phosphagen aller Mollusken, stellt im Muskel einen Vorrat an energiereichem Phosphat dar, der mehrfach größer ist als der des ATP (Urich 1990), dem wichtigsten Energieüberträger in der Zelle. Durch die Übertragung der Phosphat-

gruppe von PLA auf ADP kann schnell ATP regeneriert werden (Grieshaber et al. 1994), wenn bei hohem Energieumsatz mehr ATP verbraucht wird, als in den Mitochondrien bereitgestellt werden kann. Das durch die Transphosphorylierung des PLA entstandene L-Arginin kondensiert mit Pyruvat zu Octopin. Auf diese Weise wird das für die ATP-Bildung in der Glykolyse notwendige NAD^+ regeneriert (Grieshaber und Gäde 1976; Storey und Storey 1983). Neben Octopin häuft sich Glycerin-3-Phosphat in der Mantelmuskulatur an, wenn der Sauerstofftransport zu den Mitochondrien nicht mehr ausreicht und dadurch der energiereiche Wasserstoff nicht mehr hinreichend in der Atmungskette verwertet werden kann (Hochachka et al. 1975; Pörtner 1994a, 1997). Außerdem akkumuliert in den Mitochondrien Succinat, ein Produkt des anaeroben Stoffwechsels vieler Evertebraten (Zebe et al. 1980; Grieshaber et al. 1994).

Neben den hohen Stoffwechselraten haben alle untersuchten Cephalopodenarten, mit Ausnahme von *Nautilus*, höhere Wachstumsraten als poikilotherme Vertebraten (Fische, Amphibien, Reptilien) und erreichen zum Teil sogar die Wachstumsraten von Säugtieren. Mit den hohen Wachstums- und Stoffwechselraten der Cephalopoden geht eine kurze Lebensdauer einher, die von weniger als einem Jahr bis zu maximal 3 Jahren reicht. In der Regel sterben die Tiere nach nur einmaliger Reproduktion (Calow 1987; Pörtner 1994a, 1997). In dieser Hinsicht bildet *Nautilus* mit einer Lebensdauer von über 4 Jahren und mehrmaliger Reproduktion die Ausnahme (Rodhouse 1998). Im Hinblick auf die hier erwähnten Besonderheiten der Cephalopoden - hohe Stoffwechsel- und Wachstumsraten, kurze Lebensdauer - stellte sich die Frage nach den physiologischen Merkmalen, die eine Anpassung dieser Tiere an verschiedene abiotische Faktoren ermöglichen. Von besonderem Interesse war dabei, inwieweit eine Änderung abiotischer Faktoren die Leistungsfähigkeit dieser Organismen einschränkt.

Temperatureffekte

Als einer der wichtigsten abiotischen Faktoren kann die Temperatur angesehen werden, da sie die Geschwindigkeit biochemischer und physiologischer Prozesse beeinflusst (siehe Übersichtsartikel von Prosser 1991; Somero 1997). Zwischen den Tropen und den Polen gibt es nicht nur einen ausgeprägten Temperaturgradienten, sondern auch das Ausmaß der saisonalen Temperaturschwankungen ändert sich. Ein Organismus, der in einem thermisch stabilen Bereich lebt wie z. B. den Polargebieten, zeigt eine limitierte Temperaturtoleranz (Stenothermie). Ein Organismus aus einem Lebensraum mit sich schnell oder saisonal verändernden Temperaturen muß dagegen einen Mechanismus entwickeln,

der es ihm erlaubt, im ganzen erfahrenen Temperaturbereich erfolgreich zu leben (Eurythermie). In jedem Fall gilt, daß extreme Temperaturen oder Temperaturänderungen Schädigungen verursachen können (Prosser 1991; Somero 1997). Temperaturextreme charakterisieren die geographischen Verbreitungsgrenzen vieler mariner Arten. In der Vergangenheit führten extreme Witterungsbedingungen oder globale Temperaturveränderungen zu Änderungen der Artenzusammensetzung in Lebensgemeinschaften und zu Verschiebungen von Verbreitungsgrenzen (Beukema 1979, 1992; Southward et al. 1995). In diesem Zusammenhang stellt sich die Frage, welche Mechanismen der Anpassung an verschiedene Temperaturegime zugrunde liegen und welche ihr Grenzen setzen. Ein Vergleich zwischen Arten aus polaren und gemäßigten bzw. warmen Gewässern könnte dazu beitragen, die biochemischen und physiologischen Mechanismen herauszuarbeiten, die die geographische Verbreitung einer Art bestimmen.

Neben Lebensräumen, in denen jahreszeitlich bedingt niedrige Temperaturen auftreten können, sind die Tiefsee und die polaren Meere durch anhaltend niedrige Temperaturen gekennzeichnet. Im Südpolarmeer herrschen in der Nähe des antarktischen Kontinents Temperaturen nahe des Gefrierpunktes (Clarke 1988b). Trotz dieser - aus menschlicher Sicht - extremen Temperaturen, sind die polaren Meere reich an Leben (Clarke 1983), das aber nur durch spezielle Anpassungen möglich ist. Die Fähigkeit zur Kälteanpassung ist keine grundlegende Eigenschaft aller Organismen, sondern sie entwickelte sich in einigen Warmwasserorganismen, die so die Möglichkeit erhielten, in sich abkühlenden Gebieten zu bleiben oder in kältere Regionen einzuwandern (Arntz et al. 1994; Thiel et al. 1996). Eine der notwendigen Anpassungen an die polaren Regionen ist die Entwicklung von Gefrierschutz (Thiel et al. 1996), jedoch reicht Gefrierschutz allein nicht aus, um in der Kälte erfolgreich zu leben. Vielmehr muß der Herabsetzung der Reaktionsgeschwindigkeit biochemischer Reaktionen bei niedrigen Temperaturen entgegen gewirkt werden. Unkompensiert könnte dieser Temperatureffekt dazu führen, daß lebensnotwendige Prozesse nicht mehr schnell genug ablaufen. Ein Ausgleich kann durch eine Konzentrationserhöhung der am Stoffwechsel beteiligten Enzyme erreicht werden, durch eine temperaturabhängige Konformationsänderung von Enzymen (Hochachka und Somero 1984) oder durch die Expression von Isoenzymen (Hochachka und Somero 1984; Prosser 1991). Eine Beschleunigung der Reaktionsgeschwindigkeiten kann daneben durch Veränderungen in der Enzymumgebung bewirkt werden (Prosser 1991; Miranda und Hazel 1996). In diesem Zusammenhang wird auch eine Erhöhung der Enzymaktivität durch die Herabsetzung der Aktivierungsenergie diskutiert (Dahlhoff und Somero 1993; Vetter und Buchholz 1998). Eine Erhöhung der aeroben Kapazität des Gewebes soll die Verteilung von Metaboliten und Sauerstoff im Körper sicherstellen (siehe Übersichts-

artikel Guderley 1998; Pörtner et al. 1998). Zu den dafür notwendigen Mechanismen gehören eine Zunahme der Mitochondriendichte (Campell und Davies 1978; Egginton und Sidell 1989), eine Änderung der Mitochondrienstruktur (Gaebel und Roots 1989) oder die Aktivitätssteigerung einzelner Enzyme (Guderley und Blier 1988; Foster et al. 1993). Zusätzlich können Änderungen der Membranzusammensetzung zur Aufrechterhaltung der Fluidität (Prosser 1991; Miranda und Hazel 1996), sowie eine Ausbalancierung der Ionenaustauschprozesse für die Kälteanpassung erforderlich sein. Letzteres könnte durch eine Aktivitätserhöhung der Ionenpumpen oder durch eine Herabsetzung des passiven Flusses von Ionen durch die Membranen erreicht werden (Hochachka 1988). Der Gegenstand vieler der hier erwähnten Studien waren Fische, während Cephalopoden bisher in derartigen Untersuchungen unberücksichtigt blieben.

Auch eine Temperaturerhöhung kann die Funktionsfähigkeit von Organismen beeinträchtigen. Viele biochemische Strukturen werden durch sogenannte schwache Bindungen aufrecht erhalten. Hohe Temperaturen können diese Bindungen und somit die Tertiär- und Quartärstruktur von Enzymen, Enzym-Liganden-Komplexen oder Membran- oder Nukleinsäurestrukturen zerstören. Weiterhin bewirkt ein Anstieg der Temperatur eine Beschleunigung von Stoffwechselprozessen. Werden einzelne Reaktionen unterschiedlich beschleunigt, so resultieren daraus Verschiebungen zwischen den einzelnen Stoffwechselwegen. Außerdem könnte der Energieverbrauch so intensiviert werden, daß die Versorgung mit Nahrung und Sauerstoff nicht mehr gewährleistet werden kann (Hochachka und Somero 1984; Somero 1997). Wahrscheinlich tragen Prozesse wie eine Erhöhung der Membranpermeabilität oder ein Versagen der synaptischen Funktionen ebenfalls zu einer Limitierung der Temperaturtoleranz bei (Prosser 1991; Somero 1997). Unklar ist bisher jedoch immer noch, welche Mechanismen schließlich zu Schädigungen und zum Hitzetod führen, da einzelne Proteine und Lipide in einem weiteren Temperaturbereich funktionsfähig bleiben als Zellen oder gar der ganze Organismus (Cossins und Bowler 1987; Prosser 1991).

Sauerstofftransport im Blut

Temperaturänderungen beeinflussen nicht nur Stoffwechselfvorgänge, sondern auch die Sauerstoffversorgung des Gewebes, da der Sauerstofftransport durch respiratorische Farbstoffe temperaturabhängig ist. Generell nimmt die Sauerstoffaffinität der respiratorischen Farbstoffe mit steigender Temperatur ab. Arten, bei denen die Sauerstoffaffinität des Blutes weniger durch die Temperatur beeinflusst wird, können in einem

größeren Temperaturbereich die Versorgung ihrer Gewebe mit Sauerstoff sicherstellen, als Arten, deren Sauerstoffbindung im Blut stärker von der Temperatur beeinflusst wird (Brix et al. 1989, 1994). Untersuchungen an Cephalopoden verschiedener geographischer Breiten könnten zeigen, wie sich ihr respiratorischer Farbstoff an unterschiedliche Temperaturen angepaßt hat, gleichzeitig aber auch Optimierungs- und damit Verbreitungsgrenzen aufzeigen.

Der Sauerstofftransport im Blut von Cephalopoden erfolgt mit Hilfe des Hämocyanins (Mangum 1990). Hämocyanine sind sehr große, Kupfer enthaltende respiratorische Proteine, die im Blut von Arthropoden und Mollusken vorkommen. Die Hämocyanine dieser beiden Gruppen unterscheiden sich deutlich in ihrer Quartärstruktur, enthalten jedoch ähnliche Sauerstoffbindungszentren. Diese aktiven Zentren bestehen aus 6 Histidinseitenketten, an die 2 Kupferatome gebunden sind, die zusammen ein Molekül Sauerstoff reversibel binden können (Terwilliger 1998). Bei der Oxygenierung des Hämocyanins gehen die Kupferatome vom ein- in den zweiwertigen Zustand über, das vorher farblose Protein wird dabei blau (Linzen 1989). Bei den Cephalopoden bilden 10 Untereinheiten von je 350 bis 400 kDa ein zylindrisches Molekül, wobei jede Untereinheit bei den Oktopoden und bei *Nautilus* 7 und bei den Kalmaren 8 Sauerstoffbindungsstellen enthält (siehe Übersichtsartikel Miller 1994; Terwilliger 1998). Die Hämocyanine liegen nicht in Zellen, sondern stets frei gelöst im Blut der Organismen vor (Linzen 1989). Damit sind der Konzentrierung des Hämocyanins im Blut Grenzen gesetzt, da Proteine Wasser binden und dieses dem Gewebe entziehen können (kolloidosmotischer Druck). Außerdem führt eine hohe Proteinkonzentration zu einer Erhöhung der Blutviskosität (Mangum 1983, 1990). Somit wird bei den Cephalopoden trotz der im Tierreich höchsten Konzentrationen von Hämocyanin im Blut nur eine Sauerstoffbindungskapazität von 1 - 2 mmol O₂ pro Liter erreicht, während bei Fischen, deren respiratorischer Farbstoff Hämoglobin in Zellen vorliegt, die gebundene Sauerstoffmenge 4 - 5 mmol O₂ pro Liter betragen kann (Pörtner 1994a, b).

Zur Beschreibung der funktionellen Eigenschaften eines respiratorischen Farbstoffes dient ein Sauerstoffsättigungsdiagramm, in dem die Sättigung gegen den Sauerstoffpartialdruck (P_{O₂}) aufgetragen wird. Die Affinität des respiratorischen Pigments wird durch den P_{O₂} angegeben, bei dem das Pigment zur Hälfte mit Sauerstoff beladen ist (P₅₀). Die Sauerstoffaffinität wird neben der Temperatur auch durch den pH-Wert beeinflusst. Eine Abnahme des pH-Wertes bewirkt eine Erniedrigung der Sauerstoffaffinität, die sich durch eine Rechtsverschiebung der Bindungskurve ausdrückt. Diese pH-Abhängigkeit der Sauerstoffbindung wird als Bohr-Effekt bezeichnet und durch den Bohr-Koeffizienten

$\Delta \log P_{50} / \Delta \text{pH}$ quantifiziert, der ein negatives Vorzeichen trägt (Stryer 1990; Penzlin 1991). Die Grundlage für die pH-Abhängigkeit der Sauerstoffbindung ist die reversible Bindung von Protonen an den respiratorischen Farbstoff. Bei der Oxygenierung wird eine bestimmte Menge Protonen frei, bei der Deoxygenierung werden sie wieder aufgenommen. Diese Protonen werden dem Dissoziationsgleichgewicht der Kohlensäure hinzugefügt oder entzogen¹. Je größer der Bohr-Effekt ist, desto größer ist die Menge der vom respiratorischen Farbstoff aufgenommenen oder abgegebenen Protonen. Gleichzeitig entsteht entsprechend Bikarbonat oder es wird verbraucht. Die Änderung der Bikarbonatkonzentration in Abhängigkeit von der Sauerstoffbindung wird durch den Haldane-Koeffizienten quantifiziert, der dem Bohr-Koeffizienten numerisch entspricht. Dieser Prozeß, der als Haldane-Effekt bezeichnet wird, erhöht die Gesamtmenge des im Blut als Bikarbonat vom Gewebe zu den Kiemen transportierten CO_2 . Es zeigt sich also, daß O_2 - und CO_2 -Transport durch den Protonenaustausch des respiratorischen Farbstoffes miteinander verbunden sind (Pörtner 1994a).

Im Gewebe wird der Sauerstoff vom Hämocyanin abgegeben und in den Mitochondrien veratmet. Dabei bestimmt der Konzentrationsgradient des Sauerstoffes zwischen den Mitochondrien und den Kapillaren, wieviel Sauerstoff durch Diffusion in die Zellen gelangt. Der Bohr-Effekt unterstützt die Sauerstoffversorgung des Gewebes in der Weise, daß Sauerstoff bei höheren Partialdrücken abgegeben wird und dadurch der Konzentrationsgradient zwischen Blut und Mitochondrien erhöht wird. Voraussetzung dafür, daß der Bohr-Effekt die Sauerstoffversorgung des Gewebes unterstützen kann, ist eine Abnahme des Blut-pH von den Kiemen zum Gewebe (Pörtner 1994a). Bei Cephalopoden, mit Ausnahme von *Nautilus*, treten in der Regel Bohr-Koeffizienten von unter -1 auf (Bridges 1994). Bohr-Koeffizienten von < -1 bedeuten, daß pro mmol abgegebenem Sauerstoff mehr als ein mmol Protonen am Pigment gebunden werden. Da aber die Hauptenergiequelle der Cephalopoden Proteine sind und der respiratorische Quotient daher ca. 0,85 beträgt (Agnisola et al. 1991; Lee 1994), entstehen im Stoffwechsel insgesamt weniger Protonen als durch Deoxygenierung des Hämocyanins verbraucht werden. Infolgedessen kann eine Erhöhung des venösen pH-Wertes auftreten, wie es z. B. von Johansen et al. (1982a) für *Sepia officinalis* gefunden wurde. Diese Alkalose würde dazu führen, daß Sauerstoff noch stärker an das Hämocyanin gebunden wird und erst bei niedrigeren Po_2 -Werten abgegeben würde. Auf diese Weise würde der Po_2 -Gradient zwischen Kapillaren und Zelle verkleinert und entsprechend auch der Sauerstofffluß zu den Mitochondrien (Pörtner 1994b).

¹ $\text{Hämocyanin-O}_2 + \text{H}^+ \rightleftharpoons \text{Hämocyanin-H} + \text{O}_2 / \text{H}^+ + \text{HCO}_3^- \rightleftharpoons \text{H}_2\text{CO}_3 \rightleftharpoons \text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O}$

Für Kalmare wird diskutiert, daß sie zusätzlich über die Haut Sauerstoff aufnehmen und somit mehr CO_2 zur Verfügung steht, als aus dem Verbrauch des im Blut transportierten Sauerstoffes zu erwarten wäre. Ein Teil dieses zusätzlich produzierten CO_2 fließt in das Blut ab und bewirkt dort die für die Sauerstofffreisetzung im Blut erforderliche pH-Abnahme (Pörtner 1994b). Desweiteren wurde vorgeschlagen, daß der Bohr-Effekt bei Cephalopoden besonders eine Bedeutung für die Sauerstoffaufnahme an den Kiemen hat und weniger für die Abgabe im Gewebe (Brix et al. 1981). Dahingegen scheint bei *Sepia latimanus* und *Sepia officinalis* ein anderer Mechanismus für die notwendige pH-Erniedrigung zu sorgen. Über einen noch unbekanntem Mechanismus erfolgt am Hämocyanin dieser Arten eine sauerstoffabhängige Bindung von CO_2 , d. h. bei der Oxygenierung an den Kiemen würde überschüssiges CO_2 an den respiratorischen Farbstoff gebunden. Bei der Deoxygenierung im Gewebe würde dieses CO_2 ebenfalls freigesetzt und zusammen mit dem metabolisch produziertem CO_2 für die notwendige Ansäuerung sorgen (Lykkeboe et al. 1980; Brix et al. 1981).

Im deoxygeniertem Zustand liegt der respiratorische Farbstoff in einem niederaffinen Zustand vor. Durch die Bindung einiger Sauerstoffmoleküle erfolgt durch Wechselwirkungen zwischen den Untereinheiten eine Konformationsänderung, die dazu führt, daß weitere Sauerstoffmoleküle schneller gebunden werden können. Dieser Vorgang, den man als Kooperativität bezeichnet, führt zu einem sigmoiden Verlauf der Bindungskurven mit einem besonders steilem Verlauf in der Nähe des P_{50} . Eine hohe Kooperativität bewirkt, daß das Pigment bei seiner Deoxygenierung im Gewebe viel Sauerstoff bei einer nur geringen Abnahme des P_{O_2} abgeben kann (Stryer 1990; Mangum 1990; Pörtner 1994a). Bei einigen Krebsarten wurde sowohl eine pH- als auch eine Temperaturabhängigkeit der Kooperativität gefunden (Mauro und Mangum 1982a, b), ebenso bei dem Oktopoden *Octopus dofleini* (Miller 1985).

Die klassische Auftragungsweise im Sauerstoffsättigungsdiagramm (siehe oben) kann die Beziehung zwischen pH, Sauerstoffbindung und Sauerstoffpartialdruck nur ungenügend veranschaulichen und quantifizieren (Pörtner 1994a). Dies erfolgt besser in Form einer pH-Sättigungsanalyse. Dazu wird die Sauerstoffsättigung des Hämocyanins gegen den gemessenen pH-Wert aufgetragen. Jede Linie in diesem Diagramm stellt eine Sauerstoffisobare dar, d. h. eine Linie konstanten Sauerstoffpartialdruckes. Durch diese Form der Analyse wird die Sauerstoffbindung am Hämocyanin in Abhängigkeit vom pH-Wert bei konstantem P_{O_2} widerspiegelt. Dadurch wird berücksichtigt, daß vor allem bei hohen Bohr-Koeffizienten die Oxygenierung bzw. Deoxygenierung durch eine pH-Änderung

bewirkt wird. Weiterhin ist dadurch auch die Bestimmung des Hill-Koeffizienten bei einem spezifischen pH möglich (Pörtner 1990b).

Anpassung an Hypoxie

Die Sauerstoffversorgung des Gewebes wird nicht nur durch die Temperatur beeinflusst, sondern auch durch das Sauerstoffangebot im Seewasser. In den meisten Ozeanen sind sogenannte *oxygen minimum layers* in mittleren Wassertiefen (400 - 1000 m) zu finden, die durch einen konstant niedrigen Sauerstoffgehalt gekennzeichnet sind und auch Cephalopoden als Lebensraum dienen (Fenchel und Finlay 1995; Childress und Seibel 1998). In der Gezeitenzone lebende Oktopodenarten können während Niedrigwasser in Gezeitentümpel eingeschlossen werden (Borer und Lane 1971; Hunt 1996). Aufgrund des dann unterbrochenen Austausches mit sauerstoffreichem Wasser kann eine Sauerstoffmangelsituation auftreten (Morris und Taylor 1983). In küstennahen Gewässern treten in den Sommermonaten periodisch hypoxe Wasserschichten auf (Harper et al. 1981; Dethlefsen und von Westerhagen 1983; Ehrhardt und Wenk 1984). Im Golf von Mexico konnte der Kalmar *Lolliguncula brevis* in solchen Wasserschichten beobachtet werden (Vecchione 1991a). Dies erscheint zunächst überraschend, da von Kalmaren aufgrund ihrer hohen Stoffwechselraten angenommen wird, daß sie unter den Cephalopoden am wenigsten gegenüber Hypoxie tolerant sind (Pörtner und Zielinski 1998). Der Kalmar *Illex illecebrosus* nutzt den verfügbaren Sauerstoff schon unter Kontrollbedingungen maximal aus. Außerdem ist bei dieser Art der Sauerstofftransport am Hämocyanin in der Weise optimiert, daß eine größtmögliche Sauerstoffabgabe im Gewebe erreicht wird. Dieser Kalmar ist daher vermutlich auch gegenüber einer nur geringen Abnahme des Sauerstoffpartialdruckes intolerant, jedoch wurden die limitierenden Sauerstoffkonzentrationen bisher noch nicht bestimmt (Pörtner 1990b, 1997; Pörtner und Zielinski 1998). In diesem Zusammenhang stellte sich daher die Frage, welche Mechanismen die Hypoxietoleranz des Kalmaren *Lolliguncula brevis* ermöglichen.

Das Überleben in Lebensräumen mit niedrigem oder fluktuierendem Sauerstoffangebot wird durch eine Reihe von Anpassungsmechanismen erreicht (Übersichtsartikel McMahon 1988; Grieshaber et al. 1994; Childress und Seibel 1998). Viele marine Tiere erhöhen ihre Ventilationsrate, um die reduzierte Sauerstoffverfügbarkeit zu kompensieren (Taylor 1976; Houlihan et al. 1982). Dies ist auch für *Octopus briareus* bekannt (Borer und Lane 1971). Daneben unterstützt die Modulation der Sauerstoffbindungseigen-

schaften der respiratorischen Farbstoffe die Aufrechterhaltung der Sauerstoffversorgung (Lallier und Truchot 1989). Desweiteren trägt auch die Fähigkeit, durch anaerobe Stoffwechselwege Energie zu produzieren, zum Überleben bei (Zebe et al. 1980). Tiere, die an konstant niedrige Konzentrationen von Sauerstoff angepaßt sind, erreichen durch eine vergrößerte Kiemenoberfläche und durch kurze Diffusionswege zwischen Wasser und Blut eine Erleichterung der Sauerstoffaufnahme (Belman und Childress 1976; Childress und Seibel 1998). Diese Form der Anpassung an ein reduziertes Sauerstoffangebot wurde bei verschiedenen Tiefsee-Cephalopoden gefunden (Madan und Wells 1995). Durch eine Reduktion der Stoffwechselrate kann *Nautilus pompilius* hypoxe Bedingungen bis zu einen Tag überstehen. Gleichzeitig werden anaerobe Stoffwechselprozesse in einem geringen Umfang an der Energiegewinnung beteiligt. Außerdem wird die Aktivität, die Ventilation sowie die Zirkulation eingeschränkt (Wells et al. 1992; Boutilier et al. 1996).

Radikalbildung und Oxidationsschutz

Neben Sauerstoffmangel kann auch die Anwesenheit von Sauerstoff zu Problemen für Organismen führen, denn im Stoffwechsel aller sauerstoffverbrauchenden Lebewesen entstehen reaktive Sauerstoffspezies (ROS), d. h. Wasserstoffperoxid (H_2O_2) und toxische Sauerstoffradikale, die DNA, Lipide und Proteine schädigen können (Halliwell und Gutteridge 1989). Der oxidative Streß wird als einer der wichtigsten Faktoren für die Alterung angesehen (Harman 1956; Sohal und Allen 1986; Ku et al. 1993; Sohal und Weindruch 1996). Die mit dem Alter fortschreitende Akkumulation von schadhaften Makromolekülen (Lipide und Proteine) trägt möglicherweise signifikant dazu bei, daß einzelne Zellen und der ganze Organismus in ihrer physiologischen Funktion beeinträchtigt sind (Reiss und Gershon 1976). Die Zunahme beschädigter Makromoleküle kann dabei entweder auf eine altersbedingte Erhöhung der oxidativen Schäden und/oder auf den Verlust der Fähigkeit zurückzuführen sein, diese Moleküle zu reparieren oder abzubauen (Stadtman 1992).

Möglicherweise wird die maximal mögliche Lebensspanne einer Art durch die Stoffwechselrate beeinflusst. Eine erhöhte Stoffwechselrate scheint dadurch einen negativen Einfluß auf die Lebensdauer zu haben, daß sie die Bildung freier Radikale erhöht und so oxidative Schäden vermehrt (Sohal 1981a). Für eine Abhängigkeit der Radikalbildung von der Stoffwechselrate sprechen Untersuchungen von Ku et al. (1993) an verschiedenen Säugetierarten. Diese Autoren zeigten, daß die Tiere mit der höchsten Stoffwechselrate auch die höchste mitochondriale Superoxid- und H_2O_2 -Produktion

aufwiesen. Gleichzeitig war die ROS-Bildung negativ mit der MLSP korreliert, d. h. die Tiere mit der längsten Lebenserwartung wiesen die geringste Radikalbildung auf. Die gleiche Abhängigkeit zwischen Radikalbildung und maximal möglicher Lebensdauer wurde auch von Sohal et al. (1989, 1990b) für verschiedene Säugetiere und für die Stubenfliege *Musca domestica* gefunden. Aufgrund dieser Betrachtungen stellte sich die Frage, ob der oxidative Streß zu der kurzen Lebenserwartung der Cephalopoden beiträgt und ob die antioxidative Kapazität ausreicht, einer aufgrund der hohen Stoffwechselrate vieler Cephalopoden möglicherweise ebenfalls hohen Rate der Radikalbildung entgegenzuwirken.

Eine der wichtigsten Quellen für die endogene Bildung von ROS ist die Atmungskette der Mitochondrien (Shigenaga et al. 1994). Radikale werden außerdem in verschiedenen enzymatischen Reaktionen (u. a. Xanthin-Oxidase, Aldehyd-Oxidase, Glycolat-Oxidase) sowie in den Peroxisomen (Urat-Oxidase) und in den Mikrosomen gebildet. Daneben kann Superoxid ($O_2^{\bullet -}$) durch die Autoxidation verschiedener Moleküle entstehen, z. B. der reduzierten Form des Riboflavins und seiner Derivate (Flavinmononucleotid, Flavinadeninucleotid), des Adrenalins und des Hämoglobins. H_2O_2 wird wahrscheinlich hauptsächlich durch die von der Superoxid-Dismutase (SOD) katalysierte Dismutation von Superoxid gebildet (Abb. 2; Halliwell und Gutteridge 1989). Wasserstoffperoxid kann im Gegensatz zu Superoxid leicht durch Membranen diffundieren und dadurch nicht nur am Entstehungsort, sondern auch an anderen Makromolekülen zum Hydroxylradikal (OH^{\bullet}) umgesetzt werden, das reaktiver ist als Superoxid. Die Bildung von OH^{\bullet} erfolgt in der Haber-Weiss-Reaktion² durch die Reduktion von H_2O_2 mit Hilfe von Superoxid (Abb. 2). Diese Reaktion wird hauptsächlich durch Fe^{3+} katalysiert (Leibovitz und Siegel 1980; Stadtman 1992; Storey 1996). Superoxid und das Hydroxylradikal können andere Moleküle angreifen und so weitere Radikale bilden. Besonders mehrfach ungesättigte Fettsäuren scheinen von Radikalangriffen betroffen zu sein. Die Abspaltung von H^+ durch freie Radikale (R^{\bullet}) führt zu Lipidradikalen (Lipid $^{\bullet}$), die mit molekularem Sauerstoff zu Lipidperoxyradikalen (Lipid- OO^{\bullet}) reagieren. Unter Abgabe eines Protons und eines

² Haber-Weiss-Reaktion: $O_2^{\bullet -} + H_2O_2 \rightarrow O_2 + OH^- + OH^{\bullet}$

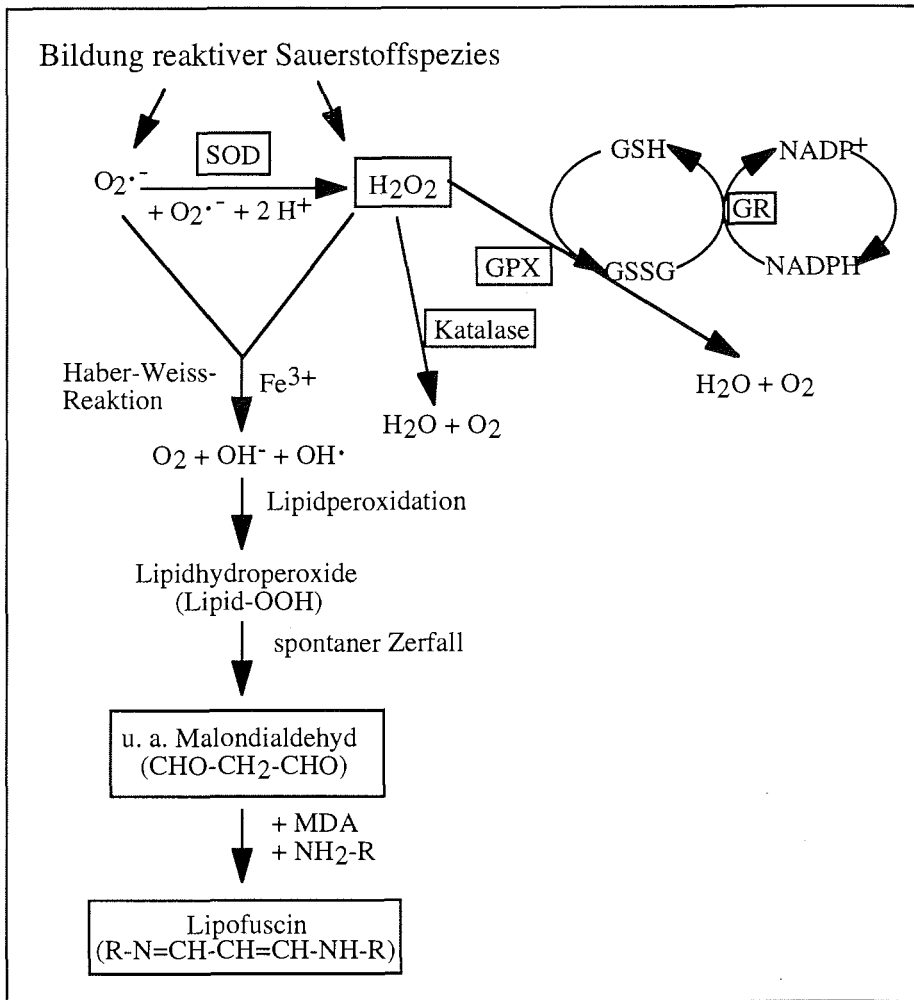


Abb. 2 Zusammenstellung der wichtigsten Prozesse der Radikalbildung, der oxidativen Schädigung und der enzymatischen Abwehrmechanismen. Die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Parameter sind durch Kästchen gekennzeichnet. (Die Stöchiometrie ist nicht immer exakt wiedergegeben. Zusammengestellt nach Leibovitz und Siegel 1980 und Storey 1996).

Elektrons entstehen Lipidhydroperoxide³ (Lipid-OOH; Abb. 2; Leibovitz und Siegel 1980; Gutteridge und Halliwell 1990; Storey 1996). Die Bildung von Lipidhydroperoxide führt zu einer Beeinträchtigung von Membranfunktionen. Die Folgen sind Änderung der Fluidität, Inaktivierung von membranständigen Rezeptoren und Enzymen und Erhöhung der unspezifischen Permeabilität für Ionen wie z. B. Ca^{2+} (Halliwell und Gutteridge

³ $Lipid-H + R^{\cdot} \rightarrow Lipid^{\cdot}$ $Lipid^{\cdot} + O_2 \rightarrow Lipid-OO^{\cdot}$
 $Lipid-OO^{\cdot} + Lipid-H \rightarrow Lipid^{\cdot} + Lipid-OOH$

1989; Gutteridge und Halliwell 1990; Halliwell 1992). Durch spontanen Zerfall der Lipidhydroperoxide entstehen kleinere Moleküle wie Alkane, Alkene, Ketone und Aldehyde. Einer dieser Stoffe ist Malondialdehyd (MDA; Abb. 2), der mit den Aminogruppen von Proteinen, Phospholipiden und Nukleinsäuren Schiff'sche Basen bildet. Daraus resultieren extrem große Biomoleküle, die als Lipofuscin bezeichnet werden. Aufgrund ihrer ungewöhnlichen Struktur können sie in den Lysosomen nicht abgebaut werden und akkumulieren dort mit zunehmendem Alter (Abb. 2; Leibovitz und Siegel 1980; Halliwell und Gutteridge 1989).

Aufgrund der toxischen Effekte von ROS besteht für aerobe Organismen die Notwendigkeit, ein Oxidationsschutzsystem zu entwickeln. Dieser Schutz kann auf verschiedenen Ebenen erreicht werden. Eine Verhinderung der Radikalbildung kann durch die Chelatbildung von Ionen, wie z. B. die Eisenbindung an Ferritin erfolgen (Halliwell und Gutteridge 1989). Eine weitere Möglichkeit besteht im Abfangen der ROS durch Oxidationsschutzenzyme und nicht-enzymatische Radikalfänger. Zu den enzymatischen Antioxidantien zählt die SOD, die wie bereits erwähnt Superoxid zu Wasserstoffperoxid disproportioniert. Enzyme, denen H_2O_2 als Substrat dient, sind Katalasen und Peroxidasen. Bei der Katalasereaktion wird H_2O_2 zu Wasser und molekularem Sauerstoff abgebaut. Peroxidasen katalysieren Reaktionen, bei denen H_2O_2 unter Oxidation eines Elektronendonors zu H_2O reduziert wird. Eines dieser Enzyme ist die Glutathion-Peroxidase (GPX), die Wasserstoffperoxid mit Hilfe von reduziertem Glutathion (GSH) reduziert. Dabei entsteht oxidiertes Glutathion (GSSG), das in einer anschließenden von der Glutathion-Reduktase (GR) katalysierten Reaktion wieder in reduziertem Glutathion überführt wird (Abb. 2). Damit steht das Tripeptid Glutathion der Zelle erneut zur Verfügung. Glutathion dient nicht nur als Substrat für die Oxidationsschutzenzyme, sondern ist auch selber ein Radikalfänger. Daneben spielt GSH eine Rolle in der Regeneration von Vitamin E (α -Tocopherol; Halliwell und Gutteridge 1989), einem weiteren nicht-enzymatischen Antioxidant. Weiterhin sind zahlreiche andere niedermolekulare Verbindungen bekannt, die in Zellen als Radikalfänger fungieren. Hierzu zählen u. a. Vitamin C (Ascorbinsäure), Harnsäure, Flavonoide und Phenolsäuren (Bors 1987; zitiert nach Elstner 1990). Bereits beschädigte Moleküle können durch verschiedene Mechanismen repariert werden. So werden z. B. beschädigte DNA-Abschnitte durch Exo- und Endonucleasen entfernt und die fehlenden Abschnitte anschließend durch Glyoxylasen und Polymerasen ersetzt. Oxidierte Proteine werden durch Proteinasen, Proteasen und Peptidasen gespalten, und die daraus resultierenden Aminosäuren können zur Herstellung neuer Proteine verwendet werden (Rusting 1993).

Zielsetzung

Aufgrund der besonderen Bedeutung der Temperatur für die Verbreitung von Arten wurde in der vorliegenden Arbeit der Einfluß dieses abiotischen Faktors auf den Stoffwechsel von Cephalopoden untersucht. Neben der Erarbeitung von ersten physiologischen Daten antarktischer Cephalopoden stellte sich die Frage nach den an der Temperaturanpassung beteiligten Mechanismen. Durch den Vergleich der kaltangepaßten antarktischen Arten mit Arten aus wärmeren Gewässern sollten die biochemischen und physiologischen Mechanismen herausgearbeitet werden, die an der Anpassung an unterschiedliche Temperaturregime beteiligt sind. Im einzelnen sollten folgende Fragen geklärt werden:

- Welchen Einfluß besitzt die Temperatur auf den aeroben und anaeroben Stoffwechsel sowie auf den Säure-Basen-Haushalt eines kaltstenothermen antarktischen (*Pareledone charcoti*) und eines Warmwasser-Cephalopoden (*Lolliguncula brevis*)?
- Hat bei antarktischen Cephalopoden (*Pareledone charcoti*, *Pareledone polymorpha*, *Psychroteuthis glacialis*) auf der Enzymebene eine Anpassung der aeroben und anaeroben Kapazitäten stattgefunden?
- Welche Rolle spielt das Hämocyanin beim Sauerstofftransport im Blut des antarktischen Cephalopoden *Megaleledone senoi*? Wie wird dieser Transport am Hämocyanin von *Megaleledone senoi* und im Vergleich dazu von *Sepia officinalis* durch die Temperatur beeinflusst?

Der hohe Sauerstoffbedarf besonders der Kalmare (Wells 1994) könnte die Toleranz dieser Tiere gegenüber einer Herabsetzung der Sauerstoffverfügbarkeit einschränken. Da der Kalmar *Lolliguncula brevis* auch in hypoxen Wasserschichten angetroffen werden kann, ergab sich folgende Frage:

- In welchem Ausmaß ist der Kalmar *Lolliguncula brevis* gegenüber Hypoxie tolerant und durch welche Mechanismen wird diese Toleranz charakterisiert?

Ein weiteres Ziel der vorliegenden Arbeit war, die Bedeutung des oxidativen Stresses für Cephalopoden zu untersuchen. Die Untersuchungen erfolgten unter dem Aspekt, daß der oxidative Streß möglicherweise zu der kurzen Lebensdauer der Cephalopoden beitragen könnte. Außerdem wurde in einer Reihe von Arbeiten ein Zusammenhang zwischen der

Höhe der Stoffwechselrate und dem Ausmaß der Radikalbildung gefunden (z. B. Ku et al. 1993). Daher stellte sich die Frage, ob ein solcher Zusammenhang auch bei Cephalopoden auftritt und möglicherweise in Form einer Erhöhung der oxidativen Schäden erkennbar wird. Konkret sollte folgende Fragestellung bearbeitet werden:

- Ist das Oxidationsschutzsystem der Cephalopoden *Sepia officinalis* und *Lolliguncula brevis* im Hinblick auf ihre hohe Stoffwechselraten besonders ausgeprägt? Gibt es Unterschiede im enzymatischen Oxidationsschutz dieser beider Cephalopodenarten, deren Stoffwechselrate sich um den Faktor zwei unterscheidet? Welche Änderungen treten im Verlauf der Lebensdauer von *Sepia officinalis* im enzymatischen Oxidationsschutzsystem auf und ist eine Änderung des Ausmaßes oxidativer Schäden erkennbar?

2. Material und Methoden

Nachfolgend werden die angewendeten Methoden kurz erläutert. Eine detaillierte Beschreibung der Versuche und Methoden ist in den jeweiligen Publikationen enthalten.

2.1 Fang und Hälterung der Versuchstiere

In Tabelle 1 sind die genauen Hälterungsbedingungen für die einzelnen in dieser Arbeit untersuchten Cephalopodenarten angegeben. Außerdem ist eine Auflistung enthalten, in welchen Experimenten diese Arten Verwendung fanden. Die Cephalopoden der Art *Sepia officinalis* wurden im Marine Biomedical Institute, Galveston gezüchtet und aufgezogen. Mitarbeiter dieses Institutes fingen die Kalmare der Art *Lolliguncula brevis* im Galveston Ship Channel und im Galveston Harbour mit Hilfe eines knotenlosen Grundschiepnetzes. Den Tieren wurden mindestens 48 h zur Akklimatisation an die Hälterungs-

Tabelle 1 Auflistung der in der vorliegenden Arbeit untersuchten Cephalopodenarten und der entsprechenden Hälterungsbedingungen. Angeben sind ferner Fangdatum und das Gewicht der verwendeten Tiere und außerdem in welchen Experimenten die jeweiligen Arten eingesetzt wurden.

Art	Hälterungsbedingungen		Versuch	Fangdatum	Gewicht (g)
	‰	°C			
<i>Lolliguncula brevis</i>	20 - 25	20 - 22	Hypoxieversuche	April 1993	5 - 22
			Temperaturinkubationen	März/April 1995 + Mai 1997	7 - 36 3 - 19
			Oxidationsschutz	März/April 1995	
<i>Sepia officinalis</i>	35	20 - 22	Oxidationsschutz	-	5 - 953
<i>Pareledone charcoti</i>	34	0	Temperaturinkubationen	November/ Dezember 1996	21 - 91
			Enzymmessungen	Februar 1996	7 - 84
<i>Pareledone polymorpha</i>	34	0	Enzymmessungen	Februar 1996	74 - 179
<i>Psychroteuthis glacialis</i>	-	-	Enzymmessungen	Februar 1996	72 - 133
<i>Megaleledone senoi</i>	-	-	Sauerstoffbindungskurven	November/ Dezember 1996	-

bedingungen gewährt. Beide Arten wurden außer in den letzten 24 Stunden vor den Experimenten mit kleinen Fischen und Garnelen gefüttert. Der Fang der antarktischen Cephalopoden erfolgte im östlichen Weddellmeer während der Polarstern-Expedition ANT XIII/3 bzw. in den Gewässern um Elephant Island an der Antarktischen Halbinsel während der Polarstern-Expedition ANT XIV/2. Auf beiden Expeditionen wurden die Tiere mit Grundslepp- und Agassiznetzen gefangen. Während die Probennahme an *Psychroteuthis glacialis* und *Megaleledone senoi* direkt im Anschluß an den Fang erfolgte, wurden die Tiere der Arten *Pareledone charcoti* und *Pareledone polymorpha* an Bord gehältert. Sie konnten sich für mindestens eine Woche an die Bedingungen im Aquarium anpassen und wurden außer in den letzten 24 Stunden vor den Experimenten mit antarktischem Krill gefüttert.

2.2 Inkubationsexperimente unter Hypoxie

Für die Inkubation des Kalmaren *Lolliguncula brevis* bei Sauerstoffpartialdrücken (P_{O_2}) zwischen 19,3 (Normoxie) und 6,6 kPa befanden sich die Tiere in abgedunkelte Gefäßen mit kontinuierlichem Seewasserdurchfluß. In den ersten 30 Minuten war das durchfließende Seewasser luftgesättigt, damit sich die Tiere an die Versuchsbedingungen anpassen konnten. Anschließend erfolgte durch Mischung von luftgesättigtem Wasser und mit Stickstoff begastem Wasser die Einstellung der verschiedenen Sauerstoffpartialdrücke in den Inkubationsgefäßen, bei denen die Tiere weitere 2 Stunden inkubiert wurden. Der P_{O_2} des ausfließenden Wassers wurde in regelmäßigen Abständen kontrolliert.

Für die Experimente bei extremer Hypoxie wurden die Tiere in einem abgedunkelten Behälter in Wasser mit einem Sauerstoffpartialdruck zwischen 4,6 und 5,1 kPa eingesetzt. Nach 30 Minuten war der experimentelle P_{O_2} von $2,8 \pm 0,3$ kPa erreicht, und die Tiere wurden dann für weitere 15 bis 60 Minuten bei diesem P_{O_2} inkubiert.

2.3 Temperaturinkubationen

Die Tiere wurden einzeln in abgedunkelte Gefäße mit sauerstoffgesättigtem natürlichem Seewasser überführt. Für *Lolliguncula brevis* lagen die Inkubationstemperaturen zwischen 11 und 31 °C, für *Pareledone charcoti* zwischen -1,8 und 10 °C. Die Versuchsdauer betrug für die Kalmare mit Ausnahme von 31 °C jeweils eine Stunde bei

der entsprechenden Temperatur. Bei 31 °C erfolgte die Entnahme der Tiere jedoch schon nach 2 bis 6 Minuten, da die Kalmare deutliche Anzeichen von Streß (Tintenaustoß) aufwiesen. Aufgrund der wesentlich geringeren Stoffwechselrate von *Pareledone charcoti* betrug die Inkubationsdauer für diesen Oktopoden 24 Stunden, nachdem die jeweilige Temperatur durch schrittweise Änderungen von 1,8 bzw. 2 °C pro Tag erreicht wurde.

2.4 Gewinnung und Aufbereitung der Gewebeproben

Die Zugabe von 2 oder 4 % (v/v) Ethanol zum Inkubationswasser nach Beendigung der Hypoxie- und Temperaturinkubationen führte zur Betäubung der Tiere. Nach Eintreten der Narkose wurden die Versuchstiere dem Wasser entnommen, und ein linealähnlicher Plexiglasstab wurde ventral in die Mantelhöhle eingeführt. Der Plexiglasstab diente als Unterlage für ein Doppelskalpell mit zwei parallel angeordneten Skalpellklingen (Pörtner et al. 1991a), das eine schnelle Entnahme der ersten Muskelprobe ermöglichte. Die Entnahme weiterer Gewebeproben erfolgte mit Pinzette und Schere. Alle Proben wurden unverzüglich schockgefroren und bis zur Analyse in flüssigem Stickstoff aufbewahrt, um unerwünschte Abbauprozesse während der mehr oder weniger langfristigen Aufbewahrung auszuschließen.

Die Entnahme der Proben für die Analysen zum enzymatischen Oxidationsschutz bzw. oxidativer Schädigung erfolgte an mit Magnesiumchlorid betäubten Tieren. Für *Sepia officinalis* wurden 7,5 % MgCl₂ (w/v) und für *Lolliguncula brevis* 4,7 % MgCl₂ (w/v) in Seewasser verwendet (Messinger et al. 1985). Die unterschiedliche Konzentration an MgCl₂ ist durch die verschiedenen Salinitäten bedingt, bei denen die beiden Arten gehältert wurden. Nach Eintreten der Betäubung erfolgte die Öffnung der Mantelhöhle von *Sepia officinalis* durch einen Schnitt auf der Ventralseite und die anschließende Blutentnahme mit Hilfe einer Kanüle aus der Vena cava, den Kiemenherzen und dem systemischen Herz. Von beiden Arten wurden Gewebeproben mit Hilfe einer Schere und Pinzette genommen, schockgefroren und in flüssigem Stickstoff aufbewahrt.

Die Entnahme von Blutproben für die Messung von Sauerstoffbindungseigenschaften aus *Sepia officinalis* und dem Oktopoden *Megaleledone senoi* erfolgte wie oben beschrieben, nachdem die Tiere mit 2% Ethanol (v/v) in Seewasser betäubt worden waren. Mögliche Verunreinigungen im Blut wurden durch kurze Zentrifugation in einer Kühlzentrifuge entfernt und das Blut anschließend bis zur Messung bei < -20°C eingefroren.

2.5 Untersuchungen zum Sauerstofftransport im Blut

Für die Messung der Sauerstoffbindungseigenschaften wurden 0,45 bis 0,50 ml Blut in eine speziell konstruierte Dünnschichtküvette gegeben (Abb. 3). Diese Küvette, die nach einem Entwurf von H.O. Pörtner und F.J. Sartoris entstand, ist in einen oberen und einen unteren Teil gegliedert, in denen jeweils ein Magnetrührstäbchen für eine gleichmäßige Durchmischung sorgt. Diese beiden Bereiche sind durch zwei zylindrische Schächte und einen schmalen Spalt miteinander verbunden. Durch Bohrungen im Deckel der Küvette wurde eine pH-Elektrode (#811 Long Micro Needle Electrode, Diamond General Corp, Ann Arbor, MI, USA) verbunden mit einem PHM 93 Reference pH-Meter (Radiometer, Kopenhagen, Dänemark), in einen der beiden Schächte eingeführt, so daß während der gesamten Messung Änderungen des pH-Wertes im Blut kontinuierlich verfolgt werden konnten. Zum Einstellen verschiedener Sauerstoffsättigungswerte des Hämocyanins mußte der P_{O_2} sowie der Blut-pH während der Messung variiert werden. Die Einstellung des Blut-pH erfolgte entweder durch Änderungen des CO_2 -Partialdruckes (P_{CO_2}) oder durch Ersetzen eines kleinen Blutvolumens durch Säure ($1 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1} \text{ HCl}$) oder Base ($2 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1} \text{ NaOH}$; Pörtner 1990b). Um dabei ein Ausfallen des Hämocyanins zu ver-

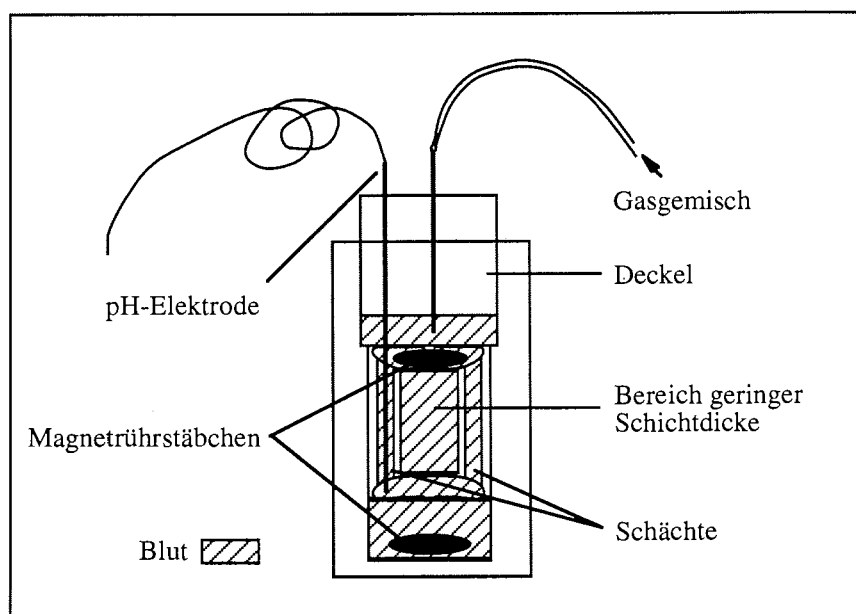


Abb. 3 Küvette zur Messung der Sauerstoffbindungseigenschaften an Cephalopodenhämocyanin (nach einem Entwurf von H.O. Pörtner und F.J. Sartoris). Die Extinktionsmessung erfolgte im Bereich geringster Schichtdicke, während die zylindrischen Schächte den oberen und unteren Teil der Küvette verbinden und zusammen mit den Magnetrührstäbchen für eine gleichmäßige Durchmischung des Blutes sorgen. Durch Bohrungen im Deckel wurden die pH-Elektrode sowie eine mit einem Schlauch verbundene Kanüle für die Gaszufuhr eingeführt.

hindern, wurde das Hämocyanin durch einstündige Zentrifugation bei 100.000xg mit einer luftbetriebenen Ultrazentrifuge (Beckman Instruments Inc, Fullerton, Kalifornien, USA) sedimentiert, ein Teil des Überstandes durch Säure oder Base (< 10 µl pro 2 ml Blut) ersetzt und das abzentrifugierte Hämocyanin mit dem Überstand resuspendiert (Pörtner 1990b).

Zur Einstellung des P_{CO_2} bzw. P_{O_2} im Blut wurden die entsprechenden Gasgemische durch die Mischung der Gase O_2 , N_2 und CO_2 mit Hilfe zweier Gasmischpumpen (2M303/a-F, Wösthoff, Bochum) hergestellt und über eine Kanüle durch den Deckel in die Küvette geleitet. Vor Einleitung in die Küvette wurde das Gas angefeuchtet und auf 3 bis 4 °C oberhalb der entsprechenden Meßtemperatur temperiert, um dadurch eine optimale Anfeuchtung zu erreichen.

Der Sättigungsgrad des Blutes wurde über die Extinktion bei 345 nm mit Hilfe eines Diodenarrayphotometers mit Lichtleitertechnik (X-Dap, Polytec GmbH, Waldbronn) bestimmt. Für die Einstellung der gewünschten Meßtemperatur im Blutes befand sich der Küvettenhalter in einem temperierbaren Wasserbad. Die Sauerstoffbindungseigenschaften des Blutes von *Sepia officinalis* wurden bei 0, 10 und 20 °C gemessen, die des Blutes von *Megaleledone senoi* bei 0, 5 und 10 °C. Die Auswertung der Daten erfolgte in Form der pH-Sättigungsanalyse (Pörtner 1990b), bei der die Sättigung gegen den pH aufgetragen wird. Jede Linie in diesem Diagramm stellt eine P_{O_2} -Isobare dar, die die Änderung der Sauerstoffbindung mit dem pH bei konstanten P_{O_2} beschreibt.

Die Bestimmung der CO_2 -Konzentration in oxygeniertem und deoxygeniertem Blut erfolgte in 50 µl Proben, die mit Hilfe einer gasdichten Spritze aus der Küvette entnommen wurden. Die weitere Messung erfolgte wie unter 2.6.1 beschrieben.

2.6 Analysen und Berechnungen

2.6.1 Bestimmung der intrazellulären Säure-Basen-Parameter

Die Bestimmung des intrazellulären pH-Wertes (pH_i) und des CO_2 -Gesamtgehaltes (C_{CO_2}) erfolgten mittels der von Pörtner et al. (1990) entwickelten Homogenatmethode. Bei dieser Methode wird unter flüssigem Stickstoff aufgeschlossenes Gewebe in einem wässrigem Medium aus Nitrilotriessigsäure und Kaliumfluorid aufgetaut. Anschließend wird der pH-Wert mit Hilfe einer temperierten Glaskapillarelektrode bestimmt und der

CO₂-Gesamtgehalt gaschromatographisch gemessen. Nitrilotriessigsäure und Kaliumfluorid bewirken eine Komplexierung bzw. Fällung von Ca²⁺- und Mg²⁺-Ionen. Dadurch werden ATPasen-abhängige protonenfreisetzende oder -aufnehmende Reaktionen im Gewebehomogenat weitgehend unterbunden. Aufgrund der starken Pufferung des Intrazellulärtraumes und einer vergleichsweise geringen Pufferung der Extrazellulärflüssigkeit und des Mediums entspricht der im Homogenat gemessene pH-Wert mit einer Abweichung von unter 0,01 pH-Einheiten dem intrazellulären pH (Pörtner et al. 1990).

Aus dem Cco₂ und dem pH-Wert können der CO₂-Partialdruck (Pco₂) und die Bikarbonatkonzentration ([HCO₃⁻]) gemäß der Henderson-Hasselbalch-Gleichung berechnet werden:

$$P_{iCO_2} = C_{CO_2} \cdot (10^{pH-pK'''} \cdot \alpha_{CO_2} + \alpha_{CO_2})^{-1} \quad (1)$$

$$[HCO_3^-] = C_{CO_2} - \alpha_{CO_2} \cdot P_{CO_2} \quad (2)$$

pK''' = negativ dekadischer Logarithmus der Dissoziationskonstanten K''' von H₂CO₃ unter physiologischen Bedingungen, berechnet für die verschiedenen pH-Werte nach Heisler (1986)

α_{CO₂} = Löslichkeitskoeffizient für CO₂, berechnet nach Heisler (1986)

2.6.2 Pufferwertbestimmung

In Homogenaten aus der Mantelmuskulatur von *Pareledone charcoti* wurde der intrazelluläre Nichtphosphat-Nichtbikarbonat-Pufferwert (β_{NB}) mittels einer Methode nach Pörtner (1990a) bestimmt. Die Aufnahme des Gewebehomogenates in ein Medium aus Nitrilotriessigsäure und Kaliumfluorid bewirkte eine Hemmung des Stoffwechsels, während das Homogenat mit verschiedenen CO₂-Partialdrücken äquilibriert wurde. Die Änderung des pH-Wertes im Homogenat ist ein Maß für die Fähigkeit des Gewebes, die zugeführte Kohlensäure als flüchtige Säure zu puffern. Nach jedem Äquilibrierungsschritt wurde eine Probe entnommen, um die CO₂-Gesamtkonzentration (Pörtner et al. 1990) sowie den Phosphatgehalt nach Pörtner (1990a) zu bestimmen. Die Berechnung des Pco₂ und der Bikarbonatkonzentration erfolgte nach den unter 2.6.1 aufgeführten Gleichungen (1) und (2).

2.6.3 Bestimmung von Metaboliten des Energiestoffwechsels

Für die Bestimmung verschiedener Metabolite des Energiestoffwechsels mußten diese aus den tiefgefrorenen Gewebeproben mit Perchlorsäure extrahiert werden (Beis und Newsholme 1975; modifiziert nach Pette und Reichmann 1982). Anschließend erfolgte die Quantifizierung folgender Metabolite photometrisch gemäß enzymatischer Standardmethoden: ATP, ADP, AMP, Succinat und Glycerin-3-Phosphat nach Bergmeyer et al. (1986), anorganisches Phosphat gemäß Pörtner (1990a) und Phospho-L-Arginin, L-Arginin und Octopin entsprechend Grieshaber et al. (1978). Die für einen Teil der Bestimmungen notwendige Octopin-Dehydrogenase wurde nach einer Vorschrift von Gäde und Carlsson (1984) aus dem Schließmuskel von *Pecten maximus* isoliert. Die flüchtige Fettsäure Acetat wurde mittels Ionenchromatographie gemäß einer veränderten Methode nach Hardewig et al. (1991) bestimmt.

2.6.4 Bestimmung von Enzymaktivitäten

Die Aktivitäten verschiedener Enzyme wurden photometrisch in der Mantelmuskulatur und dem Arm- und Kiemengewebe der antarktischen Cephalopoden *Pareledone charcoti*, *Pareledone polymorpha* und *Psychroteuthis glacialis* gemessen. Die Bestimmung der Aktivitäten von Octopin-Dehydrogenase, Malat-Dehydrogenase und Arginin-Kinase erfolgte mit Hilfe photometrischer Tests in Homogenaten aus frischen (nicht eingefrorenen) Geweben (van Thoai und Robin 1959; Ballantyne et al. 1981; Baldwin 1982; Doumen und Ellington 1990). Für die weiteren Enzyme wurden Homogenate aus gefrorenem Gewebe hergestellt. Die Bestimmung der Aktivität der Phosphofruktokinase und der Pyruvat-Kinase folgte einer Vorschrift von Sidell et al. (1987), der Glycerinaldehydphosphat-Dehydrogenase gemäß Shaklee et al. (1977), der Glykogen-Phosphorylase gemäß einer nach Bergmeyer et al. (1986) modifizierten Methode, der Glutamat-Dehydrogenase nach Storey et al. (1978) und Glycerin-3-phosphat-Dehydrogenase nach Baldwin und England (1980). Die Homogenisation für die Bestimmung der Aktivität der Citrat-Synthase sowie der anschließende photometrische Test folgten einer Vorschrift von Sidell et al. (1987). Dabei wurde die Reduktion von 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid) bei 412 nm verfolgt. Für alle anderen Enzyme erfolgte die Bestimmung mit Hilfe der Konzentrationsänderung von Pyridinnukleotiden bei 339 nm. Die Meßtemperatur betrug 0 °C für die Proben aus den Temperaturinkubationen von *Pareledone charcoti*. Diese Messungen wurden einheitlich bei der Hälterungstemperatur dieser Art durchgeführt, um den Einfluß der Meßtemperatur auszuschließen und eine Aussage über die Bedeutung der

Umgebungstemperatur auf die Enzymaktivitäten treffen zu können. Weiterhin wurden an Proben von bei 0 °C gehälterten Tieren der Arten *Pareledone charcoti*, *Pareledone polymorpha* und *Psychroteuthis glacialis* Meßtemperaturen von 0, 10, 20 und 30 °C eingestellt, damit der direkte Einfluß der Temperatur auf die Reaktionsgeschwindigkeiten abgeschätzt werden kann. Diese Messungen ermöglichen auch eine Berechnung der Arrhenius-Aktivierungsenergie.

In Geweben von *Sepia officinalis* und *Lolliguncula brevis* erfolgte die Bestimmung verschiedener am Oxidationsschutz beteiligter Enzyme. Die Aktivität der Superoxid-Dismutase (SOD) und der Glutathion-Peroxidase (GPX) wurde in Homogenaten aus frischen (nicht eingefrorenen) Geweben von *Sepia officinalis* und *Lolliguncula brevis* bestimmt, während für die Messungen der Aktivitäten von Katalase und Glutathion-Reduktase (GR) eingefrorenes Gewebe eingesetzt wurde. Die Messung der SOD-Aktivität erfolgt mit Hilfe eines photometrischen Testes nach Marklund und Marklund (1974). Das Prinzip dieser Methode beruht auf der bei 420 nm meßbaren Autoxidation von Pyrogallol durch Sauerstoff. Bei dieser Reaktion entsteht Superoxid, welches wiederum die Autoxidationsrate des Pyrogallols erhöht. Die SOD hemmt die Autoxidationsrate des Pyrogallols, wodurch sich die Aktivität der SOD bestimmen läßt. Eine 8 mmol · l⁻¹ Pyrogallollösung ergibt eine Extinktionszunahme von 0,02 ΔE · min⁻¹. Ein Unit SOD hemmt die Autoxidationsrate um 50%. Da hier aufgrund der Methode eine andere als die übliche Unit-Definition Verwendung findet, wird die Aktivität der SOD zur Unterscheidung in "SOD-Units" (SOD-U) angegeben.

Die Bestimmung der GPX-Aktivität erfolgte nach einer Vorschrift von Günzler und Flohé (1985), die der Aktivität der GR entsprechend einer nach Goldberg und Sparner (1987) veränderten Methode. Für die Bestimmung der Aktivitäten dieser beiden Enzyme wurde die mit der Oxidation von NADPH+H⁺ einhergehende Extinktionsabnahme bei 339 nm verfolgt. Die Bestimmung der Katalaseaktivität erfolgte nach Aebi (1985). Der H₂O₂-Abbau durch die Katalase wurde photometrisch bei 240 nm gemessen.

2.6.5 Quantifizierung von Oxidationsprodukten

Die Konzentration von Wasserstoffperoxid (H₂O₂) wurde sowohl im Hälterungswasser als auch im Blut von *Sepia officinalis* nach einer Vorschrift von Pamatmat (1990) bestimmt. Diese Methode nutzt Scopoletin (7-hydroxy-6-methoxy-2H-benzopyran) als Fluoreszenzindikator. Der Abbau von H₂O₂ durch eine Peroxidase führt zur Oxidation

von Scopoletin. Dies bewirkt eine Fluoreszenzabnahme, die bei einer Anregungswellenlänge von 365 nm und einer Emissionswellenlänge von 490 nm verfolgt werden kann.

Malondialdehyd (MDA) wurde gemäß einer von Uchiyama und Mihara (1978) beschriebenen Methode gemessen. Das Gewebe wird dabei nach Aufschluß mit flüssigem Stickstoff mit Phosphorsäure extrahiert. Anschließend wurde das Homogenat nach Zugabe von Thiobarbitursäure gekocht, welche einen Komplex mit MDA bildet, der bei 532 nm absorbiert. Nach Überführung des Komplexes in eine Butanolphase wurde photometrisch die Absorptionsdifferenz zwischen 532 und 600 nm bestimmt, um Interferenzen auszuschließen.

Für die Messung von Lipofuscin wurde das Gewebe in flüssigem Stickstoff aufgeschlossen und in einem Chloroform-Methanol-Gemisch (v/v = 2:1) aufgenommen (modifiziert nach Sheldahl und Tappel 1974 und Ettershank 1983, 1984). Nach Zentrifugation befindet sich das fluoreszierende Lipofuscin in der Chloroformphase. In dieser wurde zunächst ein Emissionsspektrum von 350 bis 550 nm bei einer Anregungswellenlänge von 350 nm aufgenommen und die Probenlumineszenz anschließend beim Emissionsmaximum bestimmt (Nicol 1987), das für *Sepia officinalis* bei 435 nm liegt. Die Probenlumineszenz wurde auf einen Standard von 0,1 µg Quinine pro ml 1 N H₂SO₄ bezogen und als relative Fluoreszenzintensität (RFI) ausgedrückt (Hill und Womersley 1991).

$$\text{RFI} = \frac{\text{Probenlumineszenz}}{\text{Standardlumineszenz}} \cdot \frac{\text{Extraktionsvolumen (ml)}}{\text{Einwaage (mg)}} \cdot 100 \quad (3)$$

2.6.6 Berechnung der Gibbs'schen freien Energie der ATP-Hydrolyse

Die Konzentrationen an freiem ADP und AMP sowie die Gibbs'sche freie Energie der ATP-Hydrolyse ($dG/d\xi$) wurden nach Pörtner (1993) und Pörtner et al. (1996) unter der Berücksichtigung der Gleichgewichte von Arginin-Kinase und Myokinase berechnet. Änderungen der apparenten Gleichgewichtskonstanten mit der Temperatur und dem intrazellulären pH-Wert wurde im Hinblick auf sich ändernde Protonen- und Magnesiumbindung an die Adenylate und auf den Protonenumsatz der Arginin-Kinasereaktion berücksichtigt. Die Konzentration des freien AMP ergibt sich aus folgender Formel:

$$[\text{AMP}]_{\text{frei}} = K_{\text{appMK}} \cdot [\text{ADP}]_{\text{frei}}^2 \cdot [\text{ATP}]^{-1} \quad (4)$$

- $[\text{AMP}]_{\text{frei}}$ = Konzentration des freien AMP ($\text{mol} \cdot \text{kg}^{-1}$)
 K_{appMK} = apparente Gleichgewichtskonstante der Myokinase-
 reaktion
 $[\text{ADP}]_{\text{frei}}$ = Konzentration des freien ADP ($\text{mol} \cdot \text{kg}^{-1}$)
 $[\text{ATP}]$ = Konzentration des ATP ($\text{mol} \cdot \text{kg}^{-1}$)

Die Berechnung der Konzentration an freiem ADP erfolgte nach der Formel:

$$[\text{ADP}]_{\text{frei}} = ([\text{ATP}] \cdot [\text{L-Arg}]) \cdot ([\text{PLA}] \cdot 10^{-\text{pH}} + K_{\text{eqAK}})^{-1} \quad (5)$$

- $[\text{ADP}]_{\text{frei}}$ = Konzentration des freien ADP ($\text{mol} \cdot \text{kg}^{-1}$)
 $[\text{ATP}]$ = Konzentration des ATP ($\text{mol} \cdot \text{kg}^{-1}$)
 $[\text{L-Arg}]$ = Konzentration des L-Arginins ($\text{mol} \cdot \text{kg}^{-1}$)
 $[\text{PLA}]$ = Konzentration des Phospho-L-Arginins ($\text{mol} \cdot \text{kg}^{-1}$)
 K_{eqAK} = Gleichgewichtskonstante der Arginin-Kinasereaktion

Aus Gleichung (6) ergibt sich die Gibbs'sche freie Energie der ATP-Hydrolyse:

$$dG/d\xi = \Delta G'^{\circ} + R \cdot T \cdot \ln ([\text{ADP}]_{\text{frei}} \cdot [\text{P}_i]_{\text{frei}} \cdot [\text{ATP}]^{-1}) \quad (6)$$

- $dG/d\xi$ = Gibbs'sche freie Energieänderung der ATP-Hydrolyse
 ($\text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$)
 $\Delta G'^{\circ}$ = apparente Standard-Gibbs'sche freie Energieänderung
 ($\text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$)
 R = allgemeine Gaskonstante ($8,3143 \text{ J} \cdot \text{K}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1}$)
 T = Temperatur (Kelvin)
 $[\text{ADP}]_{\text{frei}}$ = Konzentration des freien ADP ($\text{mol} \cdot \text{kg}^{-1}$)
 $[\text{P}_i]_{\text{frei}}$ = Konzentration des freien anorganischen Phosphats
 ($\text{mol} \cdot \text{kg}^{-1}$)
 $[\text{ATP}]$ = Konzentration des ATP ($\text{mol} \cdot \text{kg}^{-1}$)

2.6.7 Berechnung der Aktivierungsenergie

Die Auswertung der Enzymaktivitäten, die bei Temperaturen zwischen 0 und 30 °C bestimmt wurden, erfolgte nach der Arrhenius-Gleichung. Diese beschreibt die Temperaturabhängigkeit enzymatischer Reaktionen:

$$k = A e^{-E_a/RT} \quad (7)$$

A	= eine für die untersuchte Reaktion charakteristische Konstante
e	= Basis des natürlichen Logarithmus
E _a	= Aktivierungsenergie
R	= allgemeine Gaskonstante (J · K ⁻¹ · mol ⁻¹)
T	= absolute Temperatur (Kelvin)

Der Faktor ($e^{-E_a/RT}$) gibt den Bruchteil der Teilchen an, deren Energie größer oder gleich der Aktivierungsenergie ist (Maxwell-Verteilungsgesetz). Durch eine Umformung der Gleichung kann die Aktivierungsenergie nach folgender Gleichung berechnet werden (Segal 1976):

$$E_a = 2,3 \cdot R \cdot T_1 \cdot T_2 \cdot \log(k_2/k_1) \cdot (T_2 - T_1)^{-1} \quad (8)$$

T ₁ , T ₂	= tiefere bzw. höhere Temperatur (Kelvin)
k ₁ , k ₂	= Enzymaktivität bei der tieferen bzw. höheren Temperatur
R	= allgemeine Gaskonstante (J · K ⁻¹ · mol ⁻¹)

Graphisch kann die Aktivierungsenergie direkt aus der Steigung der Geraden im Arrhenius-Plot abgelesen werden.

2.6.8 Berechnung der Q₁₀-Werte

Die Berechnung der Q₁₀-Werte erfolgte nach einer modifizierten van't Hoff'schen Gleichung für die Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von der Temperatur, mit der auch Temperaturintervalle von < 10 °C berücksichtigt werden können:

$$Q_{10} = (k_2/k_1)^{10/(T_2-T_1)} \quad (9)$$

T_1, T_2 = tiefere bzw. höhere Temperatur (Kelvin)
 k_1, k_2 = Enzymaktivität bei der tieferen bzw. höheren Temperatur

2.6.9 Berechnung der Protonenproduktion

Die Protonenbilanz des anaeroben Metabolismus (ΔH^+_{met}) wurde nach Pörtner (1987a, b) berechnet. Für die Berechnung der Protonenkonzentration wird angenommen, daß mit der Akkumulation von Octopin und Acetat eine equimolare Menge Protonen gebildet wird. Pro mol Succinat werden dagegen 2 mol Protonen freigesetzt. Die Protonenbalance durch die Änderung der Phospho-L-Arginin-Konzentration wurde für den endgültigen pH berechnet. Der Anteil des protonierten Phosphats (F) wird nach Gleichung (10) mit $\text{pKa}_{(10\text{ }^\circ\text{C})} = 6,836$, $\text{pKa}_{(31\text{ }^\circ\text{C})} = 6,772$ und $\text{pKa}_{(20\text{ }^\circ\text{C})} = 6,805$ berechnet (Pörtner 1990a):

$$F = 1 / (10^{\text{pH} - \text{pKa}} + 1) \quad (10)$$

Die Abschätzung der nicht-respiratorischen Protonen erfolgte nach Pörtner (1987b):

$$\Delta H^+_{\text{nicht-resp}} = -|\beta_{\text{NB}}| \cdot \Delta \text{pH}_i - \Delta \text{Bik} \quad (11)$$

nicht-resp = nicht-respiratorisch
 β_{NB} = Nichtbikarbonat-Pufferwert
 Bik = Bikarbonat

mit $\beta_{\text{NB}} = 23,7 \pm 5,1 \text{ mmol} \cdot \text{pH-Einheiten}^{-1} \cdot \text{kg}^{-1}$ für *Lolliguncula brevis* (21°C; Pörtner et al. 1996) und $\beta_{\text{NB}} = 13,6 \pm 6,6 \text{ mmol} \cdot \text{pH-Einheiten}^{-1} \cdot \text{kg}^{-1}$ für *Pareledone charcoti* (0 °C; Publikation II).

Für die Berechnung der respiratorischen Protonen wurde folgende Gleichung nach Pörtner (1982) verwendet:

$$\Delta H^+_{\text{resp}} = \beta_{\text{NB}} \cdot \Delta \text{pH} \quad (12)$$

resp = respiratorisch

Die pH-Änderung ergibt sich ausgehend vom Ruhewert entlang der Puffergeraden bei einer gemessenen Änderung des Pco_2 .

2.6.10 Berechnung des Bohr- und Hill-Koeffizienten

Zur Ermittlung des Bohr-Koeffizienten $\Delta \log P_{50} / \Delta \text{pH}$ wurde für die linearen Bereiche der einzelnen Po_2 -Isobaren eine lineare Regression berechnet. Durch die graphische Auftragung des $\log P_{50}$ gegen den pH-Wert ergab sich der Bohr-Koeffizient aus der Steigung.

Der Hill-Koeffizient n_{50} wurde mit Hilfe folgender Formel nach Pörtner (1990b) für jede Po_2 -Isobare bei 40% und bei 60% Sauerstoffsättigung berechnet:

$$\log \frac{S}{1 - S} = n_{50} (\log \text{Po}_2 - \log P_{50}) \quad (13)$$

- n_{50} = Hill-Koeffizient
- Po_2 = Po_2 der Isobaren (kPa)
- S = Sättigung des Blutes am Po_2 bei einem spezifischen pH-Wert
- P_{50} = Po_2 für $S = 0,5$ bei demselben pH-Wert

Durch die Auftragung der im oxygenierten und deoxygenierten Blut gemessenen Bikarbonatkonzentration ($C_{\text{co}_2} - \alpha P_{\text{co}_2}$) gegen den pH-Wert ergeben sich zwei Pufferlinien, deren Steigung den Nichtbikarbonat-Pufferwert β_{NB} ($\text{mmol} \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{pH-Einheit}^{-1}$) angeben. Aus der vertikalen Differenz dieser beiden Pufferlinien kann der Haldane-Koeffizient $\Delta \text{HCO}_3^- / \Delta \text{HcyO}_2$ bestimmt werden, wobei HCO_3^- die Bikarbonatkonzentration bezeichnet und HcyO_2 die Konzentration der oxygenierten Sauerstoffbindungsstellen.

2.6.11 Abschätzung des sauerstoffabhängigen CO_2 -Transportes

Zur Abschätzung, ob im Blut von *Megaleledone senoi* ein sauerstoffabhängiger Transport von CO_2 erfolgt, wurde die Bikarbonatkonzentration mit Hilfe der Gleichung (2) (siehe 2.6.1) anhand des bei der Messung eingestellten P_{co_2} berechnet und mit der gemessenen Bikarbonatkonzentration verglichen. Ergibt sich eine Differenz zwischen berechneter und gemessener Bikarbonatkonzentration, kann ein O_2 -abhängiger Transport angenommen werden.

2.7 Statistik

Für die Änderungen der Metabolitkonzentrationen, sowie von pH_i , P_iCO_2 und $[\text{HCO}_3^-]$ nach Inkubation von *Lolliguncula brevis* bei Sauerstoffpartialdrücken zwischen 19,3 und 6,6 kPa wurden lineare bzw. sekundäre polynomische Regressionen berechnet. Die Werte, die signifikant von der Norm abwichen (Pearson und Hartley's sowie Nalimov's Test) wurden aus dem Datensatz entfernt. Zur Abschätzung der Signifikanz wurde das Bestimmtheitsmaß (r^2) berechnet und im Anschluß an eine Varianzanalyse ein F-Test mit Hilfe von Statview II (Abacus Concepts) durchgeführt. Wiesen diese Tests eine signifikante Änderung auf, konnte mit Hilfe der einfaktoriellen Varianzanalyse (ANOVA; SuperAnova, Abacus Concepts) und des Student-Newman-Keuls-Testes ein kritischer Punkt für die Änderung zum *non-steady state* des Stoffwechsels bestimmt werden.

Meßergebnisse aus den Temperaturinkubationen von *Lolliguncula brevis* und *Pareledone charcoti*, aus der Inkubation von *Lolliguncula brevis* bei einem Po_2 von $2,8 \pm 0,3$ kPa, aus der Bestimmung von Enzymaktivitäten antarktischer Cephalopoden sowie aus den Untersuchungen zum Oxidationsschutz von *Sepia officinalis* wurden der einfaktoriellen Varianzanalyse (ANOVA) unterworfen. Ergaben sich signifikante Unterschiede, konnte durch einen anschließenden Student-Newman-Keuls-Test ermittelt werden, welche Paarungen sich signifikant unterschieden. Signifikant von der Norm (Nalimov's Test) abweichende Werte wurden aus dem Datensatz entfernt.

Die in den antarktischen Cephalopoden bestimmten Enzymaktivitäten und die daraus berechneten Arrhenius-Aktivierungsenergien wurden mit Hilfe des Student's t-Test auf Unterschiede zwischen den einzelnen Geweben und Arten untersucht. Die Bestimmung von Diskontinuitäten im Arrhenius-Plot folgte einer von Yeager und Ultsch (1989) beschriebenen Methode, mit einer anschließenden Überprüfung signifikanter Unterschiede zwischen den erhaltenen Regressionsgeraden durch eine Analyse der Kovarianz (ANCOVA; SuperAnova, Abacus Concepts).

Zur Analyse, ob die Konzentrationen der anaeroben Endprodukte nach Temperaturstreß und Hypoxie mit den Änderungen des pH_i korrelierten, wurden lineare Regressionen berechnet. Die Ermittlung der Signifikanz erfolgte durch die Bestimmung des Bestimmtheitsmaßes und mit Hilfe eines F-Testes im Anschluß an eine Varianzanalyse (Statview II, Abacus Concepts).

In allen Fällen diente eine Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0,05$ als Signifikanzgrenze.

3. Publikationen

Liste der Publikationen bzw. beabsichtigten Publikationen und Erklärung über den von mir geleisteten Anteil.

Publikation I

Zielinski S, Lee PG, Pörtner HO (angenommen): Metabolic performance of the squid *Lolliguncula brevis* (Cephalopoda) during hypoxia: an analysis of the critical PO_2 .
Journal of Experimental Marine Biology and Ecology

Die diesen Untersuchungen zugrunde liegende Idee entstand in Kooperation mit dem Drittautor. Die Experimente wurden gemeinsam geplant und von mir durchgeführt. Ich habe die erste Version des Manuskriptes geschrieben, dessen Überarbeitung zusammen mit den Koautoren erfolgte.

Publikation II

Zielinski S, Hirse T, Klein B, Finke E, Wegewitz V, Pörtner HO: Temperature as a critical constraint in warm water and Antarctic cephalopods.

Die Experimente wurden zu einem Teil von mir und zu einem größeren Teil von den Koautoren geplant und durchgeführt. Sämtliche biochemischen Analysen erfolgten durch mich. Das Manuskript wurde von mir geschrieben, an dessen Überarbeitung der Fünftautor beteiligt war.

Publikation III

Zielinski S, Sartoris FJ, Pörtner HO: Temperature effects on haemocyanin oxygen binding in an Antarctic cephalopod.

Der experimentelle Grundsatz entstand in Zusammenarbeit mit dem Drittautor. Die Messungen wurden von mir durchgeführt. Der Entwurf für die bei den Messungen verwendete Küvette stammt von den beiden Koautoren. Die erste Version des Manuskriptes wurde von mir geschrieben, die Überarbeitung erfolgte in Kooperation mit den Koautoren.

Publikation IV

Zielinski S, Pörtner HO: Oxidative stress and antioxidative defense in cephalopods: a function of metabolic rate or age?

Die diesen Untersuchungen zugrunde liegende Idee entstand in Zusammenarbeit mit dem Koautor. Die Messungen wurden von mir geplant und durchgeführt. Ich habe die erste Version des Manuskriptes geschrieben, dessen Überarbeitung in Kooperation mit dem Koautor erfolgte.

Metabolic performance of the squid *Lolliguncula brevis* (Cephalopoda) during hypoxia: an analysis of the critical P_{O_2}

S. Zielinski*, P.G. Lee[†] and H.O. Pörtner*

*Alfred-Wegener-Institut für Polar- und Meeresforschung, Biologie I/Ökophysiologie
Columbusstrasse, 27568 Bremerhaven, Germany

[†] Marine Biomedical Institute, University of Texas Medical Branch, Galveston, Texas
77550, USA

Journal of Experimental Marine Biology and Ecology (excepted)
(reprinted with permission from Elsevier Science)

Correspondence address:

Prof. Dr. H.O. Pörtner, Alfred-Wegener-Institut für Polar- und Meeresforschung,
Biologie I/Ökophysiologie, Columbusstr., 27568 Bremerhaven, Germany

Phone: ++49 471 4831 307 FAX: ++49 471 4831 149

email: hpoertner@AWI-Bremerhaven.de

Abstract

Brief squid *Lolliguncula brevis* are regularly exposed to fluctuating oxygen levels in their shallow coastal environment. To assess hypoxia resistance, animals were exposed for two hours to ambient oxygen partial pressures (P_{O_2}) between 19.3 kPa (normoxia) and 6.6 kPa (34.2 % air saturation) at $20 \pm 1^\circ\text{C}$. In a second set of experiments, the animals were subjected to a low P_{O_2} of 2.8 ± 0.3 kPa (14.5 ± 1.6 % air saturation) for 15 to 60 minutes. Subsequently, metabolic, energy and acid-base status were analysed in the mantle tissue. Onset of anaerobic metabolism was observed between 9.4 and 7.9 kPa (48.7 and 40.9 % air saturation) reflecting the critical oxygen tension for this species. The formation of octopine and acetate indicates a simultaneous onset of anaerobic metabolism in both the cytosol and the mitochondria during progressive hypoxia. Concomitantly an intracellular acidosis developed.

During exposure to oxygen partial pressures between 19.3 and 6.6 kPa, aerobic and anaerobic processes were sufficient to maintain energy status in the mantle musculature. No significant changes in ATP and phospho-L-arginine (PLA) concentrations were observed. In contrast, both ATP and PLA levels declined significantly after 15 minutes at an ambient P_{O_2} of 2.8 ± 0.3 kPa. Concomitantly, the Gibb's free energy change of ATP hydrolysis fell to a minimum value of about -44 kJ mol^{-1} , a level suggested to reflect limiting energy availability for cellular ATPases. These results indicate that hypoxia at 2.8 kPa (14.5 % air saturation) rapidly takes *Lolliguncula brevis* to the limits of performance. However, it is probably capable of withstanding longer periods of moderate hypoxia close to 50% air saturation (9.7 kPa), enabling the squids to cope with oxygen fluctuations in their shallow estuarine environment or to dive into hypoxic waters by use of their economic jetting strategy. Nonetheless, the critical P_{O_2} is considered to be high compared to other hypoxia tolerant animals, an observation likely related to the high metabolic rate of these squids.

Keywords: hypoxia, critical oxygen tension, anaerobic metabolism, energy status, *Lolliguncula brevis*

1. Introduction

The geographic range of the brief squid *Lolliguncula brevis* extends from Maryland on the east coast of North America to the Rio de la Plata, Argentina, and includes the Caribbean Sea and the Gulf of Mexico (Voss, 1956). These animals are able to enter shallow waters of inshore and estuarine environments (Hendrix et al., 1981; Hanlon et al., 1983). Peak abundances of *Lolliguncula brevis* are found during the summer months in these waters (Dragovich and Kelly, 1962, 1964, 1967; Copeland, 1965; Livingston et al., 1976; Laughlin and Livingston, 1982), at a time of the year when hypoxic water layers are frequently formed nearshore and in bays (Harper et al., 1981; Turner and Allen, 1982; Gaston, 1985; Pokryfki and Randall, 1987). *Lolliguncula brevis* has indeed been found in hypoxic water (Vecchione, 1991a,b; Vecchione and Roper, 1991). It was even reported to be quite active down to an oxygen partial pressure of 2.1 kPa at temperatures around 25°C. Furthermore, it was suggested that it dives into hypoxic waters to avoid predators and/or to feed (Vecchione 1991a and personal communications).

Animals prone to experience regular periods of hypoxia in their natural habitat exploit a variety of mechanisms to cope with reduced oxygen availability (for review see Grieshaber et al., 1994). Tolerance to progressive hypoxia has frequently been determined by an analysis of the critical oxygen partial pressure (P_c). In oxyconformers oxygen consumption declines continuously with falling ambient P_{O_2} and the P_c is characterized by the transition to anaerobic metabolism at low oxygen tensions (Pörtner and Grieshaber, 1993). Oxyregulating animals like *Lolliguncula brevis* (Wells et al., 1988) can maintain their oxygen consumption independent of ambient P_{O_2} until a critically low oxygen partial pressure is reached. Below this P_c oxygen consumption finally declines and anaerobic metabolism sets in (see Pörtner and Grieshaber, 1993 for review).

In extreme hypoxia many animals show a depression in metabolic rate, and can survive by compensating for the deficit in aerobic energy production by the depletion of phosphagens (e.g. phosphocreatine, phospho-L-arginine) and/or by ATP production through anaerobic metabolism (Pörtner and Grieshaber, 1993; van den Thillart et al., 1994). Nonetheless, survival under hypoxic conditions is time limited, since eventually the energy status becomes impaired, reflected by a drop in the cellular Gibb's free energy of ATP hydrolysis to possibly limiting levels (Kammermeier, 1987; Pörtner, 1993).

Survival depends on the maintenance of key functions like ventilation. In squid ventilation and locomotion are coupled through action of the mantle musculature. Oxygen demand of this tissue during swimming is crucial for hypoxia tolerance. Oxygen limitation during swimming is indicated by the onset of anaerobic glycolytical and mitochondrial energy production above a critical swimming speed of 1.5 to 2 mantle lengths s^{-1} (Finke et al., 1996). Although comparative data are lacking, this anaerobic

threshold is interpreted to be low compared to other species like *Illex illecebrosus* and *Loligo pealei*, where, based on an analysis of the maximal sustainable speed, the approximate critical swimming speed would be 3 and 2.5 mantle lengths s^{-1} , respectively (Webber and O'Dor, 1986; O'Dor and Webber, 1991).

The question arises which mechanisms characterize hypoxia tolerance in *Lolliguncula brevis*. Previous work indicates that *Lolliguncula brevis* uses an economic swimming strategy by cycling between purely aerobic and mixed aerobic and anaerobic swimming phases. This strategy implies an economized use of aerobic and anaerobic resources and may be helpful when the animals dive into hypoxic waters (Finke et al., 1996). Oxygen availability will nonetheless limit the stay in hypoxic environments. Therefore, the present study was designed to investigate the mode of energy metabolism as it depends on ambient oxygen concentration at 20°C, with the goal to define a critical oxygen partial pressure. The level of the Gibbs free energy change of ATP hydrolysis was investigated as a parameter that may limit performance of the mantle musculature in hypoxic waters (cf. Pörtner et al., 1996).

2. Materials and methods

2.1 Animals

Brief squid (*Lolliguncula brevis* Blainville, 6.8 - 36.2 g) were caught in March and April 1995 and in May 1997 in the Galveston Ship Channel and Galveston Harbour by fishermen of the Marine Biomedical Institute of the University of Texas, Galveston, Texas, USA and kept in aquaria with recirculating natural sea water under conditions similar to those in the natural habitat (20 - 25 ‰, at 20 - 22°C). The squid were allowed to adjust to the aquarium for at least 48 hours. The animals were fed fish and mysid shrimp up until the last 24 h before the experiment.

2.2 Control animals

The collection of control samples (n = 5 for experiments at P_{O_2} between 6.6 to 19.3 kPa; n = 4 for experiments at $P_{O_2} = 2.8 \pm 0.3$ kPa) followed the procedure described by Finke et al. (1996). Animals were kept in aerated seawater at 20 - 24 ‰ salinity and $20 \pm 1^\circ\text{C}$. After 70 to 100 minutes of recovery from handling ethanol was slowly added as an anaesthetic to a maximal concentration of 2 % (v/v). Muscles samples were obtained using a parallel arrangement of scalpel blades as described by Pörtner et al. (1991a). Tissue samples were freeze-clamped, wrapped in aluminium foil and stored under liquid nitrogen until analysed.

2.3 Experimental procedures

Experimental animals (n = 23) were kept in a darkened container (volume 2.5 l) supplied with flowing sea water. For the first 30 min, the incoming water was air-saturated to allow the animals to acclimate. Previous work had shown that recovery periods from stress are extremely short in squid, including this species (Pörtner et al. 1993; Finke et al. 1996). Within the next 30 to 45 minutes P_{O_2} was lowered to levels between 16.9 and 6.6 kPa (87.5 to 34.2 % air saturation) by mixing air saturated water and water continuously gassed with nitrogen. These waters were drawn from two separate tanks (22 l and 18 l, respectively) by using two roller pumps (Masterflex variable speed console drive with easy load Masterflex pumphead model 7518-10, Cole-Palmer Instrument Company, Niles, Illinois, USA). All containers were kept in a water bath where temperature was regulated to $20 \pm 1^\circ\text{C}$. The calculation of the flow required to keep P_{O_2} constant was based on a resting (routine) oxygen consumption rate of *Lolliguncula brevis* of $21 \mu\text{mol O}_2 \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$ body mass at 20°C (Finke et al., 1996) and an average body mass of 12 g. Flow was set between 100 and $250 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ for a fine adjustment of P_{O_2} . The P_{O_2} of the outgoing water was measured with an oxygen electrode (YSI 5739 with YSI Model 58 Dissolved Oxygen Meter, YSI Inc., Yellow Springs, Ohio, USA) at regular intervals.

After 2 hours ethanol was added to a final concentration of 2%, and samples were taken as described for control animals.

In a second set of experiments animals ($n = 5 - 7$ per exposure time) were held in a darkened container (volume 4 l) at lower oxygen tensions obtained by gassing the water with a mixture of 10 % air and 90 % nitrogen. For these experiments the animals were placed into the water at a P_{O_2} of between 4.6 kPa and 5.1 kPa (23.8 to 26.4 % air saturation). After 30 minutes the experimental P_{O_2} of 2.8 ± 0.3 kPa (14.5 ± 1.6 % air saturation) was reached and kept constant throughout the experimental period. Ethanol was added after periods of 15, 30, 45 or 60 minutes, respectively, and samples were taken as described above.

2.4 Analyses

Intracellular pH (pH_i) and tissue concentrations of CO_2 (C_{CO_2}) were measured applying the homogenate technique described by Pörtner et al. (1990) using media containing $160 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ potassium fluoride and $1 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ nitrilotriacetic acid. The remaining tissue powder was extracted in perchloric acid following the procedure of Beis and Newsholme (1975), modified according to Pette and Reichmann (1982). The adenylates ATP, ADP, AMP and succinate and glycerol-3-phosphate were assayed according to Bergmeyer et al. (1986), inorganic phosphate was estimated according to Pörtner (1990) and phospho-L-arginine, arginine and octopine quantities were determined following the procedure of Grieshaber et al. (1978). The concentration of acetate was analyzed with a Dionex LC ion chromatograph (Idstein, FRG). The measurement followed a procedure modified from Hardewig et al. (1991), using $0.125 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ octane sulphonic acid as eluent. The column was maintained at 40°C for the separation. Peaks were monitored with a conductivity detector.

The levels of free ADP and AMP and the Gibb's free energy change of ATP hydrolysis ($dG/d\xi$) were calculated according to Pörtner (1993) and Pörtner et al. (1996) based on the equilibria of arginine kinase and myokinase. Equilibrium constants for both enzymes were corrected for experimental temperatures and pH dependence as related to changing proton and magnesium binding of the adenylates and the proton turnover of the arginine kinase reaction.

2.5 Statistics

Up to second-order polynomial regressions were calculated for the changes in metabolite concentrations, pH_i , P_iCO_2 and $[HCO_3^-]$ with decreasing P_{O_2} between 19.3 and 6.6 kPa (100 and 34.2 % air saturation). The decision of whether data were better fitted by linear or second order regressions was made on the basis of calculated coefficients of

determination (r^2). Values from two animals were eliminated from the data set since they were differing significantly from the norm (Pearson and Hartley's and Nalimov's tests). Significance of changes was evaluated at the 5% level by the analysis of coefficients of determination and by using an F-test following an analysis of variance using Statview II (Abacus Concepts). Solid lines in graphs indicate significant regression curves, with broken lines depicting the 95% confidence interval. When regressions were significant, a critical point of transition to non-steady state metabolism was determined following a method described by Yeager and Ultsch (1989). For this, the data were sorted into descending order using oxygen tension as a key parameter. Then the data were separated into two groups, where the first group contained the points at the highest oxygen partial pressure (19.3 kPa; control values) and the second group the remaining data points. The two groups were compared by one-way analysis of variance (ANOVA) and Student-Newman-Keuls posthoc tests. In a stepwise procedure the first point from the second group was transferred to the first group and ANOVA was repeated. This procedure was repeated until only five data points were left in the second group. A minimum p was assumed to indicate the P_c between the lowest P_{O_2} of the first data group and the highest P_{O_2} of the second group. ANOVA and Student-Newman-Keuls posthoc tests were also applied for the evaluation of significant changes during exposure to $P_{O_2} = 2.8 \pm 0.3$ kPa (14.5 ± 1.6 % air saturation).

p-values given throughout the text reflect results from regression analyses unless the note "ANOVA" is given to indicate the use of stepwise ANOVA procedure.

3. Results

Data collected at oxygen partial pressures (P_{O_2}) between 19.3 and 6.6 kPa (100 to 34.2 % air saturation) are depicted in Figures 1 to 6. At all of these oxygen tensions animals were able to maintain their position in the water column. When the squids were gently placed into water of 4.6 to 5.1 kPa (23.8 to 26.4 % air saturation) prior to a decrease in P_{O_2} to 2.8 ± 0.3 kPa (14.5 ± 1.6 % air saturation; extreme hypoxia), they initially showed the same behaviour and no jetting owing to handling was visible. Towards the end of exposure to extreme hypoxia squids were quite inactive and hovered at the bottom of the animal tank. Data collected after 60 minutes of extreme hypoxia were included (in brackets) in the figures.

Despite reduced oxygen partial pressures in the ambient water, intracellular pH (pH_i) for most animals was constant above a P_{O_2} of about 10 kPa, but below this threshold it started to fall significantly ($p < 0.01$) after two hours of incubation. Similarly, intracellular P_{CO_2} (P_{iCO_2}) and intracellular bicarbonate concentrations declined significantly ($p < 0.001$; Fig. 1). In all cases the transition to significantly lower values occurred, when P_{O_2} fell to between 10 and 9.4 kPa (ANOVA, $p < 0.001$). During exposure to extreme hypoxia, P_{CO_2} and bicarbonate values remained at higher levels probably because of the short term nature (60 minutes) of the experiment (Tab. 1).

Two hours of hypoxic exposure at oxygen partial pressure below 10 kPa led to the significant accumulation of the anaerobic metabolites octopine ($p < 0.01$), glycerol-3-phosphate ($p < 0.01$) and acetate ($p < 0.05$) in the mantle musculature of *Lolliguncula brevis*. Changes in succinate levels remained insignificant owing to high inter-individual variability ($p = 0.249$; Fig. 2). The onset of anaerobic metabolism at oxygen tensions between 7.9 kPa and 9.4 kPa (ANOVA, $p < 0.05$) defines the critical P_{O_2} . Intracellular pH decreased significantly with increasing concentrations of octopine ($p < 0.001$), glycerol-3-phosphate ($p < 0.01$), succinate ($p < 0.05$) and acetate ($p < 0.001$), while the Gibb's free energy change of ATP hydrolysis was maintained constant regardless of a decline in pH_i ($p = 0.164$; Fig. 3). In contrast to these findings, immediate exposure to extreme hypoxia caused only octopine levels to rise significantly after 15 minutes ($p < 0.01$), whereas the concentrations of the other metabolites, succinate ($p = 0.500$), glycerol-3-phosphate ($p = 0.483$) and acetate ($p = 0.171$), did not increase significantly during 60 minutes of exposure (Table 1).

Fig. 4 shows, that hypoxic exposure down to 6.6 kPa did not lead to a significant decrease in ATP levels ($p = 0.756$), although the increase in ADP ($p < 0.01$) and AMP ($p < 0.01$) concentrations was significant. As with the change in pH_i significantly higher ADP and AMP levels were found below a P_{O_2} of 9.1 to 9.4 kPa (ANOVA, $p < 0.05$). The summed concentrations of the adenylates ($\sum Ade = [ATP] + [ADP] + [AMP]$)

remained unchanged ($p = 0.633$). Even under extreme hypoxia, when a significant drop in ATP levels ($p < 0.001$) occurred in parallel with a drastic rise in AMP levels ($p < 0.001$), the drop in $\sum \text{Ade}$ was still insignificant ($p = 0.160$; Fig. 7, Table 1).

Phospho-L-arginine (PLA) levels did not change at P_{O_2} values between 19.3 and 6.6 kPa ($p = 0.387$; Fig. 5). Accordingly, L-arginine (L-Arg) concentrations ($p = 0.051$) and the sum of all L-arginine containing metabolites ($\sum \text{L-Arg} = [\text{PLA}] + [\text{L-Arg}] + [\text{octopine}]$) remained more or less constant ($p = 0.223$). These small changes are reflected in an insignificant decrease of the ratio of PLA over the sum of L-Arg and PLA concentrations ($p = 0.061$; Fig. 5). The ratio dropped significantly ($p < 0.01$) to a low value of 0.32 ± 0.09 only at a P_{O_2} of 2.8 ± 0.3 kPa due to significant PLA depletion. Under these conditions even the sum of all L-arginine containing metabolites decreased significantly ($p < 0.01$; Table 1).

The small changes in ATP and PLA concentrations at oxygen tensions between 19.3 and 6.6 kPa caused no significant changes in free ADP ($p = 0.550$) and AMP levels ($p = 0.604$) or in the Gibb's free energy change of ATP hydrolysis ($dG/d\xi$; $p = 0.567$; Fig. 6). $dG/d\xi$ remained above the value of $-47.99 \pm 2.48 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ found during short term exposure to extreme hypoxia (Fig. 7)

Exposure of *Lolliguncula brevis* to a low P_{O_2} of 2.8 ± 0.3 kPa (14.5 ± 1.6 % air saturation) led to a significant depletion in ATP and PLA concentrations ($p < 0.001$) and a drop in the Gibb's free energy change of ATP hydrolysis ($dG/d\xi$; $p < 0.01$) during the first 15 minutes (Fig. 7). At the same time AMP levels increased significantly ($p < 0.001$) after 15 minutes and inorganic phosphate concentrations rose; the latter change became significant after 45 minutes ($p < 0.05$; Table 1). Table 1 also confirms that most changes in energy metabolism occurred within 15 minutes after exposure to extreme hypoxia, followed by minimal changes during longer periods of hypoxia. This may be related to the observation that the animals reduced activity during exposure to extreme hypoxia.

4. Discussion

4.1 Anaerobic metabolism and the critical P_{O_2}

The critical P_{O_2} (P_c) in oxyregulators can be defined in two ways: (1) the oxygen partial pressure below which oxygen consumption becomes dependent on ambient P_{O_2} and (2) the oxygen partial pressure indicating the point of transition to anaerobic metabolism. Usually, these two P_c values are identical (Pörtner and Grieshaber, 1993). P_c values differ between various aquatic species as shown in Table 2. For example, a P_c value between 8.6 to 6.7 kPa was derived from aerobic-anaerobic transition or oxygen consumption data in the burrowing marine teleost *Lumpenus lampretaeformis* (Pelster et al., 1988). In the flatfish *Solea solea* the P_c ranged between 4.0 and 2.4 kPa (van den Thillart et al., 1994), while the P_c was 6.7 kPa in *Octopus vulgaris* (Wells and Wells, 1995) and between 7.0 and 4.0 kPa in the bivalve *Scapharca inaequivalvis* (van den Thillart et al., 1992). In some animals, for example the toad *Bufo marinus* (Pörtner et al., 1991b), a transient increase in oxygen consumption has been reported to set in at the P_c when anaerobic metabolism starts. This may also be the case in *Lolliguncula brevis*, which increases its oxygen consumption when ambient P_{O_2} falls to about 7.7 kPa (Wells et al., 1988). The P_c estimated from the onset of anaerobic metabolism in this study ranged between 7.9 to 9.4 kPa. A comparison of oxygen consumption data shows that the metabolic rates of *Lolliguncula brevis* ($18.29 \pm 0.80 \mu\text{mol O}_2 \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$ at 15°C ; Wells et al., 1988) and other squids like *Illex illecebrosus* ($13.96 \mu\text{mol O}_2 \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$; Webber and O'Dor, 1985, 1986) and *Loligo opalescens* ($11.33 \mu\text{mol O}_2 \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$; O'Dor, 1982) are much higher than the metabolic rates of many other aquatic species (see Table 2) including *Octopus vulgaris* and *Nautilus pompilius*. At the same time, the critical oxygen tension for the latter two species (determined by oxygen consumption analysis; Wells and Wells, 1995; Wells, 1990) is lower than that for *Lolliguncula brevis*. Therefore, the high oxygen demand even under control conditions in *Lolliguncula brevis* (Finke et al., 1996) likely explains the high P_c of this species and of squid in general.

Vecchione (1991a) reported *Lolliguncula brevis* to be quite active in water with a P_{O_2} of 2.1 kPa (10.9 % air saturation) and estimated from catches collected by trawls that *Lolliguncula brevis* is highly abundant in water with oxygen tensions between 8.6 and 4.3 kPa. Furthermore, it has been shown for fish that species with the ability to tolerate hypoxia have lower critical oxygen partial pressures than species which are more sensitive towards hypoxia (Beamish, 1964). Therefore, a lower P_c would have been expected for these squids. However, a rather high P_c was found in our experiments indicating that *Lolliguncula brevis* found in the wild at the low oxygen levels reported may be utilizing anaerobic pathways.

The onset of anaerobic metabolism during two hours of exposure to ambient oxygen tensions between 19.3 and 6.6 kPa, indicated by the accumulation of octopine and acetate, which coincides with a decrease in pH_i (cf. Fig. 3), since the production of opines, acetate and succinate from glycogen is accompanied by the production of protons (Pörtner, 1987). On the other hand, many aquatic animals increase ventilation during hypoxia to compensate for reduced oxygen availability. This has been shown for example for *Octopus briareus* (Borer and Lane, 1971) and *Octopus vulgaris* (Houlihan et al., 1982). The increased gas exchange causes a higher CO_2 release into the ambient water resulting in a decrease of $P_{i\text{CO}_2}$ as seen for *Lolliguncula brevis* after 2 hours at oxygen tensions between 19.3 and 6.6 kPa. Due to the equilibrium between CO_2 and HCO_3^- a rise in pH_i would be expected, but a decrease occurred. Obviously, metabolic acidification more than compensates for the respiratory alkalosis.

The extent of succinate and octopine accumulation in *Lolliguncula brevis* during 2 hours at moderate hypoxia was similar to that seen during exercise above a critical swimming speed (Finke et al., 1996). The finding of a simultaneous onset of anaerobic metabolism in the mitochondria and the cytosol indicates that insufficient oxygen supply to mantle muscle mitochondria elicits anaerobic metabolism both during environmental and functional hypoxia. On the other hand, exposure of *Lolliguncula brevis* for 15 to 60 minutes to an oxygen tension of 2.8 ± 0.3 kPa (14.5 ± 1.6 % air saturation) caused only octopine to accumulate significantly. At oxygen tensions between 19.3 and 6.6 kPa, animals stayed in the water column, whereas during extreme hypoxia many of the squids were quite inactive and hovered at the bottom of their tanks. This behaviour probably resulted in a decrease in metabolic rate and a rise in the fraction of aerobic metabolism (cf. Branco et al., 1993) and would, together with the short exposure period, explain why anaerobic mitochondrial metabolism was not yet visible. Mantle activity was supported by octopine accumulation and the significant depletion of ATP and PLA. AMP and inorganic phosphate accumulation may have contributed to the stimulation of glycolysis resulting in the observed octopine accumulation.

The results of these experiments lead to the conclusion that anaerobic processes are sufficient to support energy production for periods of at least two hours when oxygen tension does not fall below 6.6 kPa (34.2 % air saturation). Considering the findings by Finke et al. (1996) and Pörtner et al. (1996) that anaerobic processes can significantly support swimming of *Lolliguncula brevis*, the brief squid seems to be able to tolerate fluctuations of oxygen partial pressure in the ambient water to a certain extent and maintain muscular activity. However, when Po_2 falls to very low values, high energy phosphates are rapidly depleted and activity is reduced.

4.2 Gibb's free energy levels

In many animals, hypoxia results in the depletion of energy rich metabolites. For example, phosphocreatine was depleted in the marine teleost *Lumpenus lampretaeformis* during 7 hours at 15 °C and P_{O_2} levels below 10.6 kPa (54.9 % air saturation), thereby buffering ATP levels which remained almost constant (Pelster et al., 1988). Similar results were obtained for the trout *Salmo gairdneri* after 24 hours at 9°C and $P_{O_2} = 4$ kPa (Boutilier et al., 1988). Exposure of the brief squid *Lolliguncula brevis* to ambient oxygen partial pressures not lower than 6.6 kPa (34.2 % air saturation) for 2 hours did not cause a change in PLA levels, while at a P_{O_2} of 2.8 ± 0.3 kPa (14.5 % air saturation) both PLA and ATP levels dropped significantly after only 15 minutes. Such an immediate use of the phosphagen was also found in the goldfish *Carassius auratus* and the tilapia *Oreochromis mossambicus* after 30 minutes at very low oxygen tensions (van Waarde et al., 1990). In contrast to these species of fish, the level of free ADP did not rise in the squid *Lolliguncula brevis* during hypoxia, while the concentration of total ADP increased. This observation is consistent with previous findings during exercise (Finke et al., 1996). Obviously, free levels of ADP were buffered, delaying phosphagen hydrolysis and also a drop in the Gibb's free energy change of ATP hydrolysis (cf. Pörtner et al., 1996). When the animals were exposed to water with oxygen partial pressures between 19.3 and 6.6 kPa (34.2 to 100 % air saturation), $dG/d\xi$ remained larger than $-50 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ in almost all investigated animals, while at a P_{O_2} of 2.8 ± 0.3 kPa a minimum value of $-44.4 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ was calculated. These levels are below the aerobic steady-state energy requirements calculated by Kammermeier (1987) for the function of actomyosin-ATPase (-45 - $50 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$) or sarcolemmal Ca^{2+} -ATPase ($-51 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$) in rat myocardium. The minimum value found during hypoxia is comparable to a minimum value of $-44 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ for *Lolliguncula brevis* seen during fatigue from exercise (Pörtner et al., 1996). Although a decrease in $dG/d\xi$ might be tolerated to a certain extent a fatigue-like situation may result, contributing to the depression of spontaneous activity at extreme hypoxia and limiting hypoxia tolerance.

4.3 Ecological perspectives

Similar to *Lolliguncula brevis*, *Nautilus* species encounter water layers of low oxygen concentration. These cephalopods have the capacity to survive prolonged periods of low oxygen levels by metabolic depression and a modest reliance on anaerobic energy production as reflected in a small extent of octopine formation. These strategies are accompanied by a decrease in activity and a reduction in ventilatory and circulatory movements (Wells et al., 1992, Boutilier et al., 1996). In *Lolliguncula brevis*, anaerobic processes also contribute to energy production during hypoxia. The onset of anaerobic

metabolism characterized the P_c at a P_{O_2} between 9.4 and 7.9 kPa (48.7 to 40.9 % air saturation). Down to an oxygen tension of 6.6 kPa (34.2 % air saturation) aerobic and anaerobic processes appear to be sufficient to maintain a relatively high energy status in the mantle musculature and a normal level of activity. This leads to the conclusion that *Lolliguncula brevis* has the ability to withstand moderate hypoxia down to P_{O_2} values of around 6.6 kPa for limited periods of time (at least 2 hours). Only at oxygen tensions of 2.8 ± 0.3 kPa (14.5 ± 1.6 % air saturation), activity levels seemed to decrease thereby lowering the energy demand as seen in *Nautilus*. Nevertheless, energy requirements could not be met under these conditions and the length of the tolerance period appeared considerably reduced.

Vecchione (1991a) observed these squids to be active in water at a P_{O_2} of about 2.1 kPa (10.9 % air saturation) by use of a remotely operated vehicle. He suggested that these squids dive into hypoxic waters to avoid predators and/or to feed. For that purpose they would have to travel at elevated swimming speeds at oxygen tensions below the P_c . This appears possible since these animals use an energy saving jetting strategy that involves the cycling between purely aerobic and mixed aerobic and anaerobic swimming phases and allows an extended net use of anaerobic resources before fatigue sets in (Finke et al., 1996; Pörtner et al., 1996). Nevertheless, the critical swimming speed would drop during hypoxia which should accelerate the reduction of energy status. Swimming should therefore limit the time available for excursions into hypoxic layers. In consequence, animals might go into a low activity phase to escape predators, while predation in water with very low oxygen tensions is only possible for very short periods and they would probably have to leave these waters as soon as possible.

Acknowledgments:

The excellent technical and logistical help by the staff of the Marine Biomedical Institute is gratefully acknowledged. Supported by grants of the Deutsche Forschungsgemeinschaft to H.O. Pörtner (Po 278). Alfred-Wegener-Institut Publication No.

References

- Beamish, F.W.H., 1964. Respiration of fishes with special emphasis on standard oxygen consumption. III. Influence of oxygen. *Can. J. Zool.*, Vol. 42, pp. 355-367.
- Beis, I. and E.A. Newsholme, 1975. The contents of adenine nucleotides, phosphagens and some glycolytic intermediates in resting muscles from vertebrates and invertebrates. *Biochem. J.*, Vol. 152, pp. 23-32.
- Bergmeyer, H.U., J. Bergmeyer and M. Graßl, 1983-1986. Methods of enzymatic analysis. Verlag Chemie, Weinheim
- Borer, K.T. and C.E. Lane, 1971. Oxygen requirements of *Octopus briareus* Robson at different temperatures and oxygen concentrations. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, Vol. 7, pp. 263-269.
- Boutilier, R.G., G. Dobson, U. Hoeger and D.J. Randall, 1988. Acute exposure to graded levels of hypoxia in rainbow trout (*Salmo gairdneri*): metabolic and respiratory adaptations. *Respir. Physiol.*, Vol. 71, pp. 69-82.
- Boutilier, R.G., T.G. West, G.H. Pogson, K.A. Mesa, J. Wells and M.J. Wells, 1996. *Nautilus* and the art of metabolic maintenance. *Nature*, Vol. 382, pp. 534-536.
- Branco, L.G.S., H.O. Pörtner and S.C. Wood, 1993. Interaction between temperature and hypoxia in the alligator. *Am. J. Physiol.*, Vol. 265, pp. R1339-R1343.
- Burton, D.T. and A.G. Heath, 1980. Ambient oxygen tension (P_{O_2}) and transition to anaerobic metabolism in three species of freshwater fish. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, Vol. 37, pp. 1216-1224
- Copeland, B.J., 1965. Fauna of the Aransas Pass Inlet, Texas. I. Emigration as shown by tide trap collections. *Contrib. Mar. Sci.*, Vol. 10, pp. 9-21.
- Dragovich, A. and J.A. Kelly jr., 1962. A biological study and some economic aspects of squid in Tampa Bay, Florida. *Proc. Gulf Caribb. Fish. Inst. 15th An. Session*, pp. 87-103.
- Dragovich, A. and J.A. Kelly jr., 1964. Ecological observations of macroinvertebrates in Tampa Bay, Florida 1961 - 1962. *Bull. Mar. Sci. Gulf Caribb.*, Vol. 14, pp. 74-102.
- Dragovich, A. and J.A. Kelly jr., 1967. Occurrence of the squid *Lolliguncula brevis*, in some coastal waters of western Florida. *Bull. Mar. Sci. Gulf Caribb.*, Vol. 17, pp. 840-844.
- Finke, E., H.O. Pörtner, P.G. Lee and D.M. Webber, 1996. Squid (*Lolliguncula brevis*) life in shallow waters: oxygen limitation of metabolism and swimming performance. *J. Exp. Biol.*, Vol. 199, pp. 911-921.
- Gaston, G.R., 1985. Effects of hypoxia on macrobenthos of the inner shelf off Cameron, Louisiana. *Estuar. Coast. Mar. Sci.*, Vol. 20, pp. 603-613.

- Grieshaber, M., E. Kronig and R. Koormann, 1978. A photometric estimation of phospho-L-arginine, arginine and octopine using homogenous octopine dehydrogenase isoenzyme 2 from the squid *Loligo vulgaris* Lam. Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem., Vol. 359, pp. 133-136.
- Grieshaber, M.K., I. Hardewig, U. Kreutzer and H.O. Pörtner, 1994. Physiological and metabolic responses to hypoxia in invertebrates. Rev. Physiol. Biochem. Pharmac., Vol. 125, pp. 43-147.
- Hanlon, R.T., R.F. Hixon and W.H. Hulet, 1983. Survival, growth, and behaviour of the loliginid squids *Loligo plei*, *Loligo pealei*, and *Lolliguncula brevis* (Mollusca: Cephalopoda) in closed sea water systems. Biol. Bull., Vol. 165, pp. 637-685.
- Hardewig, I., A.D.F. Addink, M.K. Grieshaber, H.O. Pörtner and G. van den Thillart, 1991. Metabolic rates at different oxygen levels determined by direct and indirect calorimetry in the oxyconformer *Sipunculus nudus*. J. exp. Biol., Vol. 157, pp. 143-160.
- Harper jr., D.E., L.D. McKinney, R.R. Salzer and R.J. Case, 1981. The occurrence of hypoxic bottom water off the upper Texas coast and its effects on the benthic biota. Contrib. Mar. Sci. Vol. 24, pp. 53-79.
- Hendrix, J.P., W.R. Hulet and M.J. Greenberg, 1981. Salinity tolerance and the responses to hypoosmotic stress of the bay squid *Lolliguncula brevis*, a euryhaline cephalopod mollusc. Comp. Biochem. Physiol., Vol. 69A, pp. 641-648.
- Houlihan, D.F., A.J. Innes, M.J. Wells and J. Wells, 1982. Oxygen consumption and blood gases of *Octopus vulgaris* in hypoxic conditions. J. Comp. Physiol., Vol. 148, pp. 35-40.
- Kammermeier, H., 1987. High energy phosphate of the myocardium: concentration versus free energy change. Basic Res. Cardiol. Vol. 82, Suppl. 2, pp. 31-36.
- Laughlin, R.A. and R.J. Livingston, 1982. Environmental and trophic determinants of the spatial/temporal distribution of the brief squid (*Lolliguncula brevis*) in the Apalachicola estuary (North Florida, USA). Bull. Mar. Sci., Vol. 32, pp. 489-497.
- Livingston, R.J., G.J. Kobylinski, F.G. Lewis III. and P.F. Sheridan, 1976. Long-term fluctuations of epibenthic fish and invertebrate populations in Apalachicola Bay, Florida. Fish. Bull., Vol. 74, pp. 311-321.
- O'Dor, R.K., 1982. Respiratory metabolism and swimming performance of the squid, *Loligo opalescens*. Can. J. Fish. Aquat. Sci., Vol. 39, pp. 580-587.
- O'Dor, R.K. and D.M. Webber, 1991. Invertebrates athletes: tradeoffs between transport efficiency and power density in cephalopod evolution. J. exp. Biol., Vol. 160, pp. 93-112.

- Pelster, B., C.R. Bridges and M.K. Grieshaber, 1988. Respiratory adaptations of the burrowing marine teleost *Lumpenus lampretaeformis* (Walbaum). II. Metabolic adaptations. J. Exp. Mar. Biol. Ecol., Vol. 124, pp. 43-55.
- Pette, D. and H. Reichmann, 1982. A method for quantitative extraction of enzymes and metabolites from tissue samples in the milligram range. J. Histochem. Cytochem., Vol. 30, pp. 401-402.
- Pörtner, H.O., 1987. Contributions of anaerobic metabolism to pH regulation in animal tissues: theory. J. exp. Biol., Vol. 131, pp. 69-87.
- Pörtner, H.O., 1990. Determination of intracellular buffer values after metabolic inhibition by fluoride and nitrilotriacetic acid. Respir. Physiol., Vol. 81, pp. 275-288.
- Pörtner, H.O., 1993. Multicompartmental analyses of acid-base and metabolic homeostasis during anaerobiosis: invertebrate and lower vertebrate examples. In: Surviving hypoxia: mechanisms of control and adaptation, edited by P.W. Hochachka, P.L. Lutz, T. Sick, M. Rosenthal and G. van den Thillart, CRC Press, Boca Raton Fl, USA, pp. 139-156.
- Pörtner, H.O. and M.K. Grieshaber, 1993. Critical P_{O_2} (s) in oxyconforming and oxyregulating animals: gas exchange, metabolic rate and the mode of energy production. In: The vertebrate gas transport cascade: adaptations to environment and mode of life, edited by J.E.P. Bicudo, CRC Press Inc, Boca Raton FL, USA, pp. 330-357.
- Pörtner, H.O., R.G. Boutilier, Y. Tang and D.P. Toews, 1990. Determination of intracellular pH and P_{CO_2} after metabolic inhibition by fluoride and nitrilotriacetic acid. Respir. Physiol., Vol. 81, pp. 255-274.
- Pörtner, H.O., D.M. Webber, R.G. Boutilier and R.K. O'Dor., 1991a. Acid-base regulation in exercising squid (*Illex illecebrosus*, *Loligo pealei*). Am. J. Physiol., Vol. 261, pp. R239-R246.
- Pörtner, H.O., L.M. MacLatchy and D.P. Toews, 1991b. Metabolic responses of the toad *Bufo marinus* to environmental hypoxia: an analysis of the critical P_{O_2} . Physiol. Zool., Vol. 64, pp. 836-849.
- Pörtner, H.O., D.M. Webber, R.K. O'Dor and R.G. Boutilier, 1993. Metabolism and energetics in squid (*Illex illecebrosus*, *Loligo pealei*) during muscular fatigue and recovery. Am. J. Physiol., Vol. 265, pp. R157-R165.
- Pörtner, H.O., E. Finke and P.G. Lee, 1996. Effective Gibb's free energy change of ATP hydrolysis and metabolic correlates of intracellular pH in progressive fatigue of squid (*Lolliguncula brevis*) mantle muscle. Am. J. Physiol., Vol. 271, pp. R1403-R1414.

- Pokryfki, L. and R.E. Randall, 1987. Nearshore hypoxia in the bottom water of the northwestern Gulf of Mexico from 1981 to 1984. *Mar. Env. Res.* 22, pp. 75-90.
- Taylor, E.W., P.J. Butler and A. Al-Wassia, 1977. Some responses of the shore crab, *Carcinus maenas* (L.) to progressive hypoxia at different acclimation temperatures and salinities. *J. comp. Physiol. B*, Vol. 122, pp. 391-402.
- Turner, R.E. and R.L. Allen, 1982. Bottom water oxygen concentration in the Mississippi river delta bight. *Contrib. Mar. Sci.*, Vol. 25, pp. 181-172.
- van den Thillart, G., G. van Lieshout, K. Storey, P. Cortesi and A. de Zwaan, 1992. Influence of long-term hypoxia on the energy-metabolism of the haemoglobin-containing bivalve *Scapharca inaequivalvis*: critical O₂ levels for metabolic depression. *J. Comp. Physiol.*, Vol. 162, pp. 297-304.
- van den Thillart, G., J. Dalla Via, G. Vitali and P. Cortesi, 1994. Influence of long-term hypoxia exposure on the energy metabolism of *Solea solea*. I. Critical O₂ levels for aerobic and anaerobic metabolism. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, Vol. 104, pp. 109-117.
- van Waarde, A., G. van den Thillart, C. Erkelens, A. Addink and J. Lugtenburg, 1990. Functional coupling of glycolysis and phosphocreatine utilization in anoxic fish muscle. *J. Biol. Chem.*, Vol. 265, pp. 914-923.
- Vecchione, M., 1991a. Dissolved oxygen and the distribution of the euryhaline squid *Lolliguncula brevis*. *Bull. Mar. Sci.*, Vol. 49, pp. 668-669.
- Vecchione, M., 1991b. Observations on the paralarval ecology of a euryhaline squid *Lolliguncula brevis* (Cephalopoda: Loliginidae). *Fish Bull, U.S.*, Vol. 89, pp. 515-521.
- Vecchione, M. and C.F.E. Roper, 1991. Cephalopods observed from submersibles in the western north Atlantic. *Bull. Mar. Sci.*, Vol. 49, pp. 433-445.
- Voss, G.L., 1956. A review of the cephalopods of the Gulf of Mexico. *Bull. Mar. Sci. Gulf Caribb.*, Vol. 6, pp. 85-178.
- Webber, D.M. and R.K. O'Dor, 1985. Respiration and swimming performance of short-finned squid (*Illex illecebrosus*). *NAFO Sci. Coun. Studies.*, Vol. 9, pp. 133-138.
- Webber, D.M. and R.K. O'Dor, 1986. Monitoring the metabolic rate and activity of free-swimming squid with telemetered jet pressure. *J. exp. Biol.*, Vol. 126, pp. 205-224.
- Wells, M.J., 1990. Oxygen extraction and jet propulsion in cephalopods. *Can. J. Zool.*, Vol. 68, pp. 815-824
- Wells, M.J. and J. Wells, 1995. The control of ventilatory and cardiac responses to changes in ambient oxygen tension and oxygen demand in *Octopus*. *J. exp. Biol.*, Vol. 198, pp. 1717-1727.

- Wells, M.J., R.T. Hanlon, P.G. Lee and F.P. Dimarco, 1988. Respiratory and cardiac performance in *Lolliguncula brevis* (Cephalopoda, Myopsida): the effects of activity, temperature and hypoxia. *J. exp. Biol.*, Vol. 138, pp. 17-36.
- Wells, M.J., J. Wells and R.K. O'Dor, 1992. Life at low oxygen tensions: the behaviour and physiology of *Nautilus pompilius* and the biology of extinct forms. *J. mar. biol. Ass. U.K.*, Vol. 72, pp. 313-328.
- Yeager, D.P. and G.R. Ultsch, 1989. Physiological regulation and conformation: a BASIC program for the determination of critical points. *Physiol. Zool.* Vol. 62, pp. 888-907.

Table 1 Intracellular pH, P_{CO_2} (P_{iCO_2} ; kPa), and HCO_3^- levels ($\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$), the ratio of the levels of PLA over the summed concentrations of PLA and L-arginine, and the concentrations ($\text{mmol}\cdot\text{g}^{-1}$ fresh weight) of various metabolites including the summed levels of L-arginine containing metabolites in the mantle musculature of *Lolliguncula brevis* during incubation at a P_{O_2} of 2.8 ± 0.3 kPa (14.5 ± 1.6 % air saturation). (* - significantly different from values at 0 min; values are means \pm SD)

	0 min (n = 4)	15 min (n = 7)	30 min (n = 5)	45 min (n = 5)	60 min (n = 5)
pH _i	7.28 \pm 0.02	6.90 \pm 0.15*	6.88 \pm 0.15*	6.81 \pm 0.22*	6.88 \pm 0.19*
P_{iCO_2}	0.85 \pm 0.18	1.17 \pm 0.38	1.20 \pm 0.58	1.00 \pm 0.50	0.78 \pm 0.41
HCO_3^-	3.08 \pm 0.55	1.81 \pm 0.66*	1.87 \pm 0.84*	0.89 \pm 0.27*	1.62 \pm 0.85*
[PLA]/[PLA]+[L-Arg]	0.67 \pm 0.10	0.37 \pm 0.14*	0.36 \pm 0.09*	0.40 \pm 0.14*	0.32 \pm 0.09*
P_{i}	7.11 \pm 4.22	20.75 \pm 11.95	22.02 \pm 7.65	25.96 \pm 2.23*	19.23 \pm 10.92
Σ L-Arg	45.22 \pm 6.56	31.10 \pm 4.45*	33.97 \pm 4.17*	33.34 \pm 7.99*	29.89 \pm 3.10*
Σ Ade	5.80 \pm 0.36	4.52 \pm 1.50	5.26 \pm 1.14	4.97 \pm 1.46	3.68 \pm 1.30
Octopine	1.10 \pm 1.06	10.34 \pm 6.54*	10.85 \pm 3.65*	16.32 \pm 5.18*	8.18 \pm 7.06
Glycerol-3-phosphate	0.77 \pm 0.42	1.26 \pm 0.80	1.33 \pm 0.48	1.47 \pm 0.61	1.38 \pm 0.53
Succinate	0.25 \pm 0.07	0.32 \pm 0.15	0.42 \pm 0.15	0.37 \pm 0.15	0.35 \pm 0.18
Acetate	0.17 \pm 0.12	0.47 \pm 0.34	0.56 \pm 0.14	0.55 \pm 0.19	0.41 \pm 0.28
free ADP	0.14 \pm 0.07	0.05 \pm 0.04	0.12 \pm 0.11	0.12 \pm 0.10	0.04 \pm 0.03

Table 2 Critical oxygen tensions (P_c) and oxygen consumption rates of selected species at temperatures (T) close to 20°C. Oxygen consumption rates are valid under normoxia with the exception of *Nautilus pompilius* where it represents the rate found at 13.3 kPa. Furthermore, the weight (W) of animals used for oxygen consumption measurements are given. (n.a. - data not available)

Species	P_c (kPa) determined by		$\dot{M}O_2$ ($\mu\text{mol O}_2 \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$) (control conditions)	T (°C)	W (g)	Reference
	oxygen consumption	aerobic-anaerobic transition				
Fishes:						
<i>Lumpenus lampretaeformis</i>	6.7 - 8.0	≤ 8.6	2.66 ± 0.41	15	4.7 - 14.3	Pelster et al. (1988)
<i>Solea solea</i>		2.4 - 4.0		19	70 - 120	van den Thillart et al. (1994)
<i>Lepomis macrochirus</i>		1.2 - 2.5		20	51 - 190	Burton and Heath (1980)
<i>Ictalurus nebulosus</i>		1.2 - 2.5		20	40 - 122	Burton and Heath (1980)
Invertebrates:						
<i>Scapharca inaequivalvis</i>	4.0 - 7.0	4.0 - 7.0	2.3 ± 0.8	20	n.a.	van den Thillart et al. (1992)
<i>Carcinus maenas</i>	8.0		1.8 ± 0.1	18	60 - 80	Taylor et al. (1977)
<i>Octopus vulgaris</i>	6.7 ¹		3.1 ± 1.4 ²	19 ¹ / 22 ²	620 - 2864	Wells and Wells (1995) ¹ Houlihan et al. (1982) ²
<i>Nautilus pompilius</i>	2.7 ³		1.0 ⁴	18	300 - 450	Wells (1990) ³ Boutilier et al. (1996) ⁴
<i>Lolliguncula brevis</i>	7.7 ⁵	8.6-9.7	21.0 ⁶	20	6.6 - 34.2	Wells et al. (1988) ⁵ Finke et al. (1996) ⁶

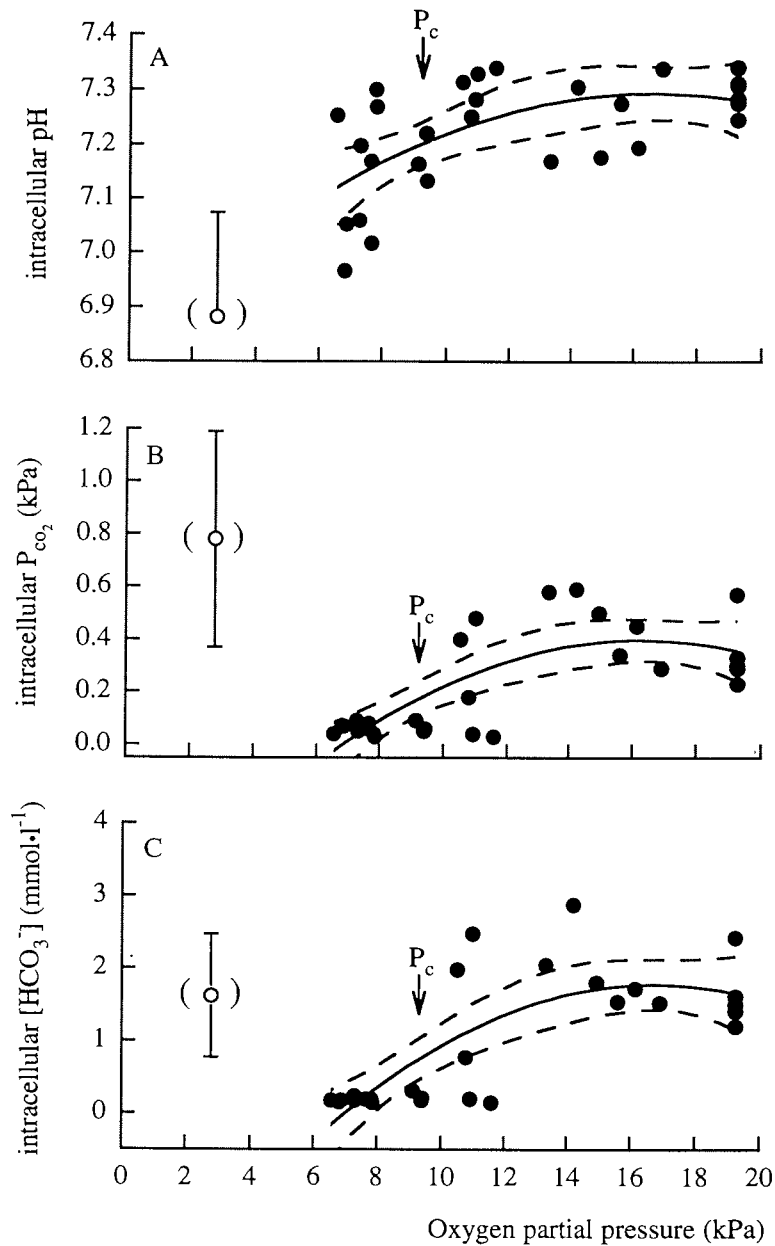


Fig. 1 Changes in (A) intracellular pH ($r^2 = 0.374$), (B) intracellular P_{co_2} ($r^2 = 0.522$) and (C) intracellular HCO_3^- concentration ($r^2 = 0.549$) in the mantle musculature of *Lolliguncula brevis* with oxygen partial pressure in the ambient water after 2 hours of exposure. ($n = 28$; second-order regressions; solid lines depict a significant trend, short dashed lines the 95 % confidence interval. Values in brackets are means \pm SD, $n = 5$, after 60 min of exposure to a P_{O_2} of 2.8 ± 0.3 kPa equivalent to 14.5 ± 1.6 % air saturation. P_c is indicated as evaluated for the individual process investigated.)

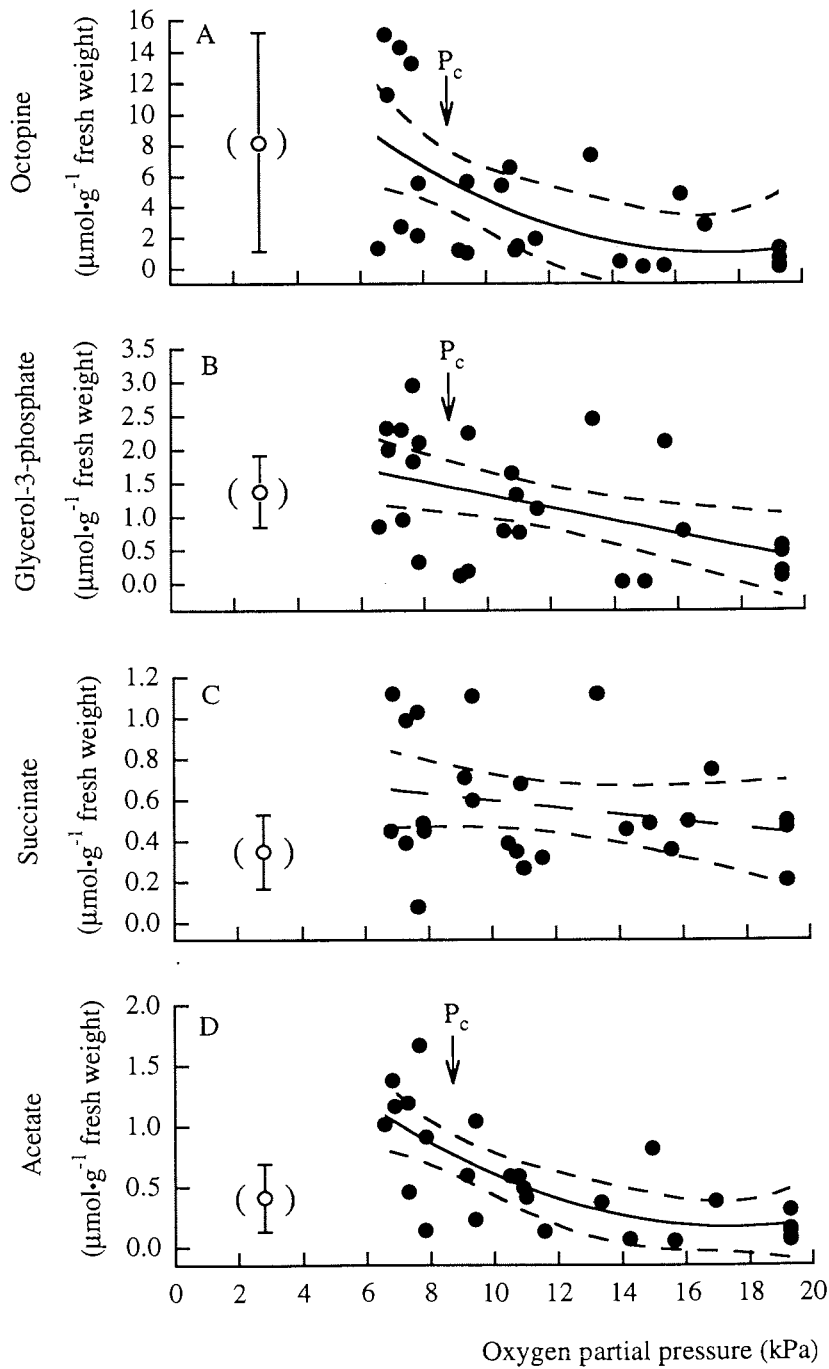


Fig. 2 Changes in (A) octopine ($r^2 = 0.390$), (B) glycerol-3-phosphate ($r^2 = 0.239$), (C) succinate ($r^2 = 0.057$) and (D) acetate ($r^2 = 0.302$) levels in the mantle musculature of *Lolliguncula brevis* with oxygen partial pressure. (n = 28; B, C - first-order regressions; A, D - second order regressions; for further explanation see Fig. 1)

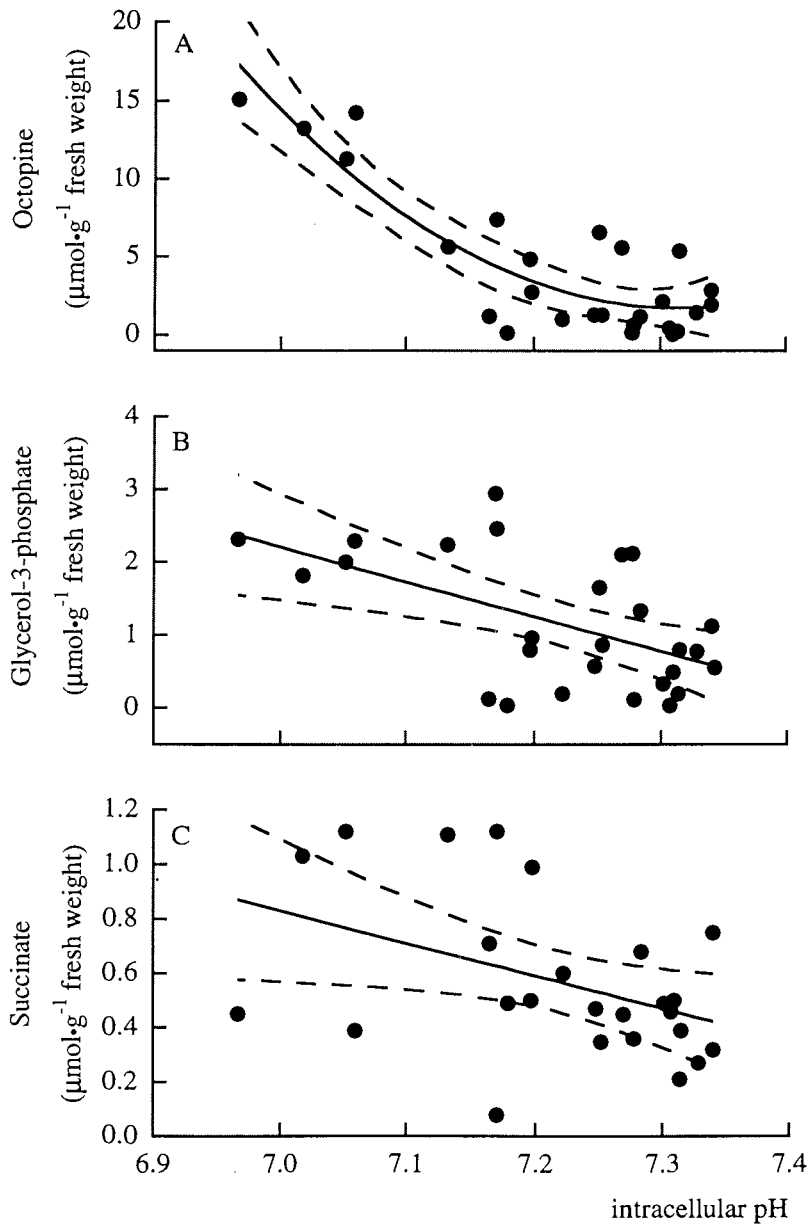


Fig. 3 Intracellular pH in relation to (A) octopine ($r^2 = 0.482$), (B) glycerol-3-phosphate ($r^2 = 0.282$), (C) succinate ($r^2 = 0.234$), (D) acetate concentrations ($r^2 = 0.524$), and (E) the Gibb's free energy change of ATP hydrolysis ($r^2 = 0.082$) in the mantle musculature of *Lolliguncula brevis* after 2 hours of exposure to oxygen partial pressures between 19.3 and 6.6 kPa (100 -34.2 % air saturation). (n = 28; B, C, D, E - first-order regressions; A - second-order regressions)

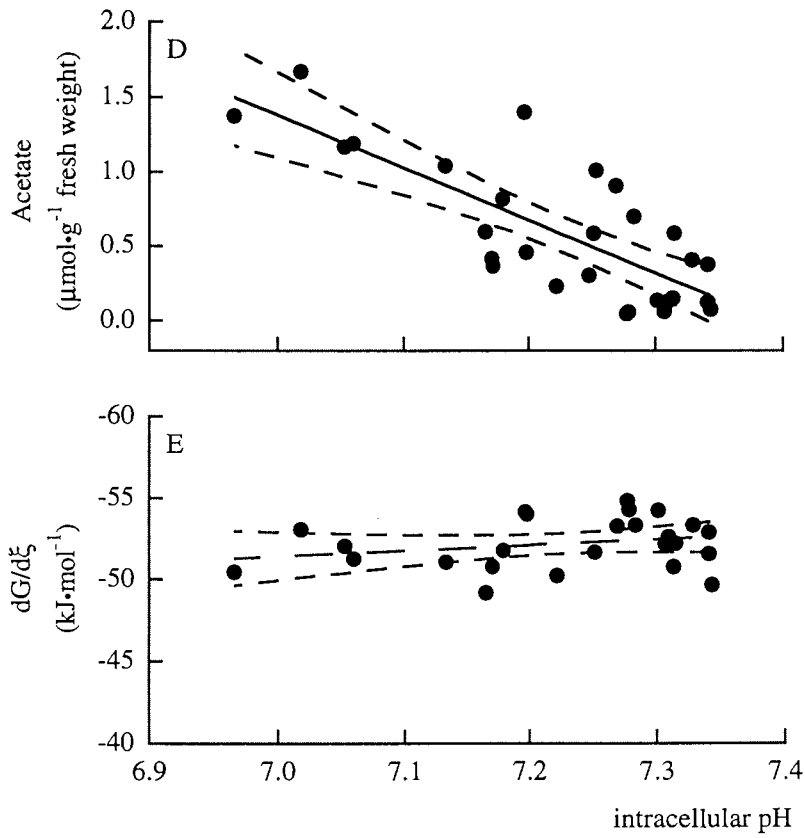


Fig. 3 continued

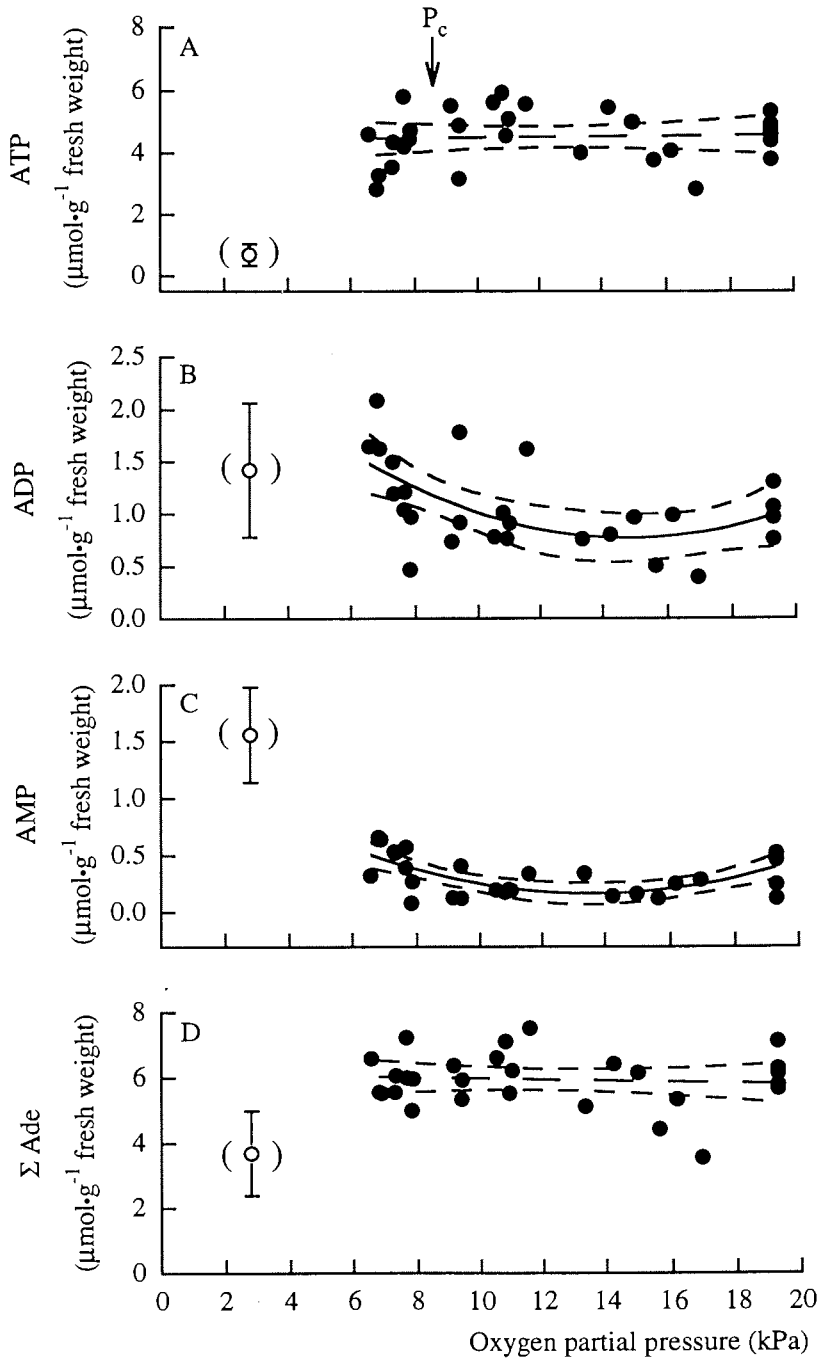


Fig. 4 Changes in (A) ATP ($r^2 = 0.004$), (B) ADP ($r^2 = 0.312$), (C) AMP ($r^2 = 0.387$) and (D) the summed concentrations of all adenylates (Σ Ade; $r^2 = 0.009$) in the mantle musculature of *Lolliguncula brevis* with oxygen partial pressure. ($n = 28$; A, D - first order-regressions; B, C - second-order regressions; for further explanation see Fig 1. P_c is indicated as evaluated from concentration changes of anaerobic metabolites as shown in Fig. 2)

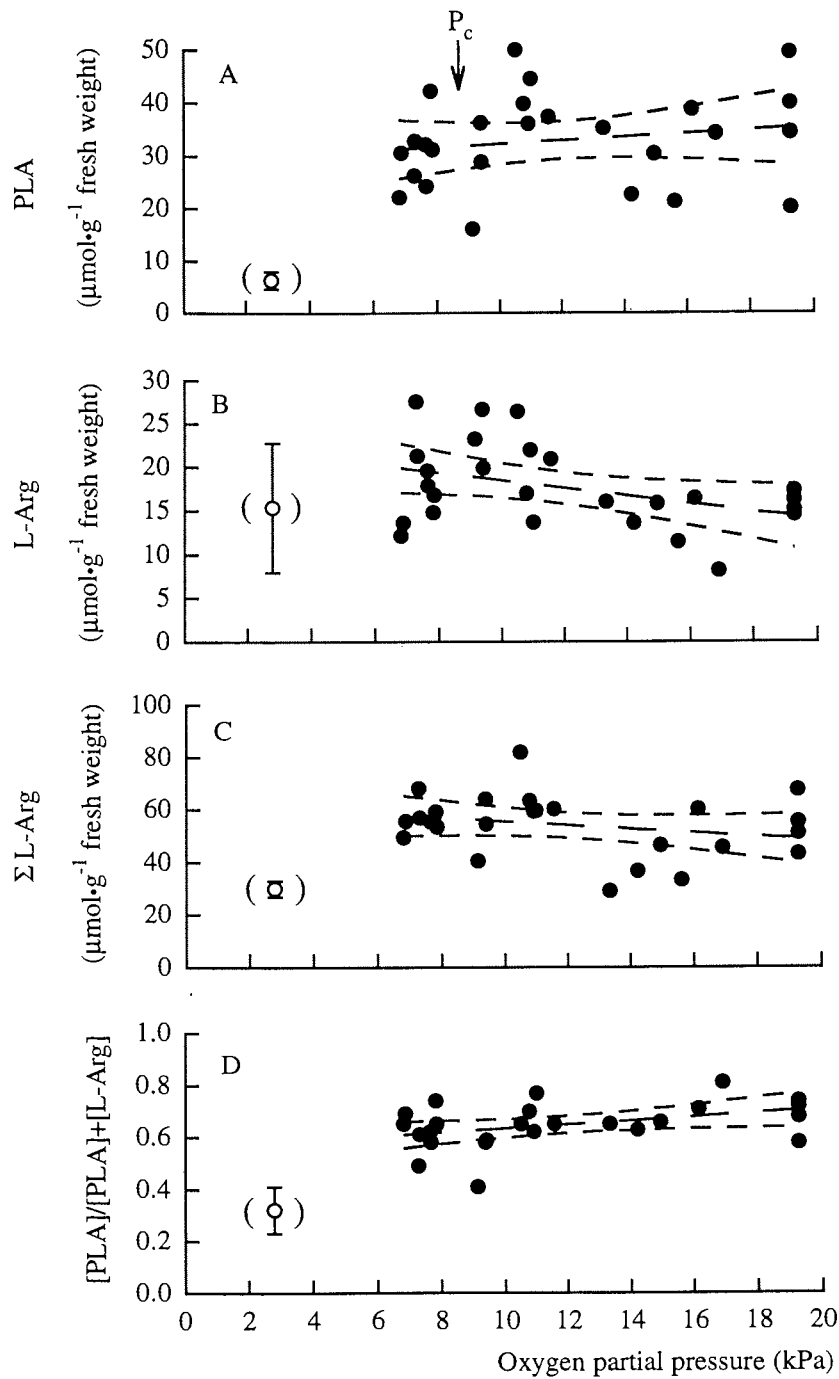


Fig. 5 Levels of (A) phospho-L-arginine ($r^2 = 0.031$), (B) L-arginine ($r^2 = 0.162$) and (C) the concentrations of all L-arginine containing metabolites ($r^2 = 0.064$) as well as (D) the ratio of the levels of phospho-L-arginine over the sum of PLA and L-arginine concentrations ($r^2 = 0.138$) in the mantle musculature of *Lolliguncula brevis* after 2 hours of exposure to various oxygen partial pressures. ($n = 28$; first-order regression; for further explanation see Figs. 1 and 4)

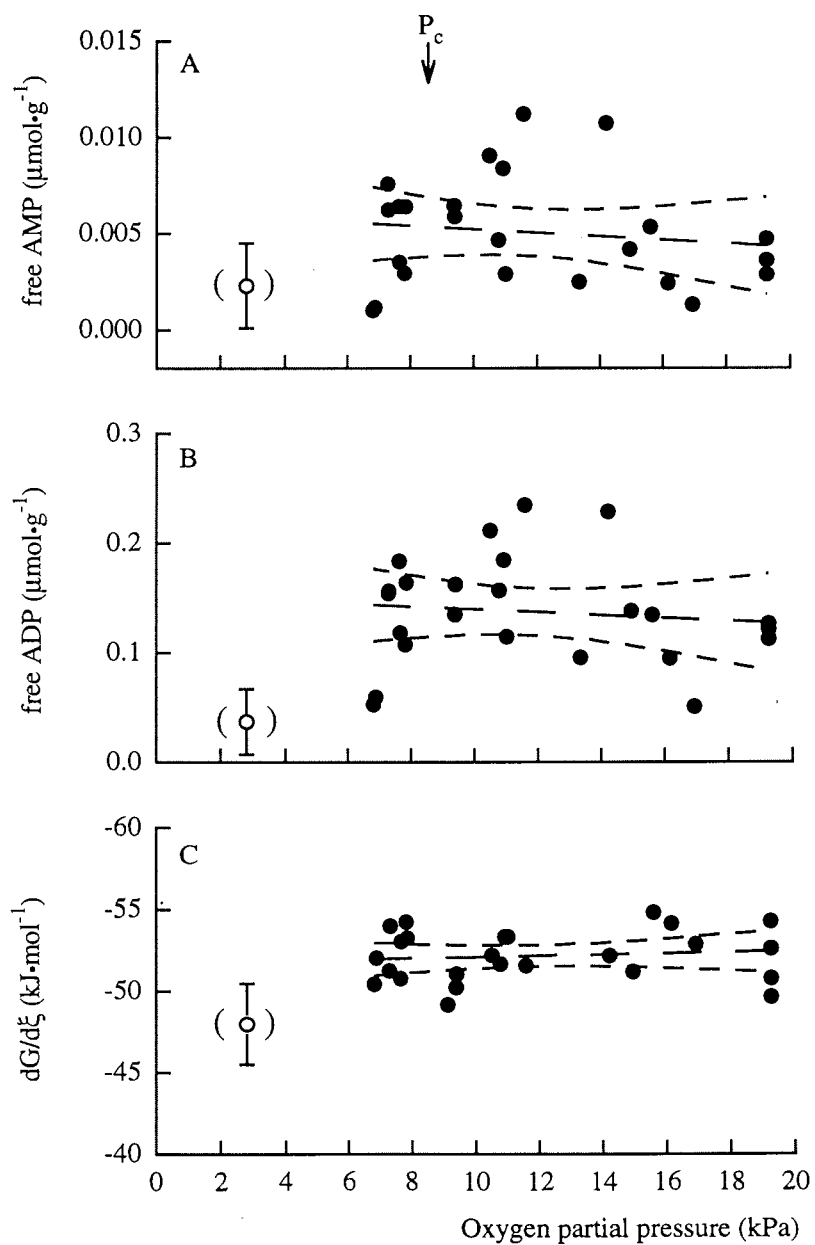


Fig. 6 Levels of (A) free AMP ($r^2 = 0.006$), (B) free ADP ($r^2 = 0.003$) and (C) the Gibb's free energy change of ATP hydrolysis ($r^2 = 0.014$) in the mantle musculature of *Lolliguncula brevis* after 2 hours of exposure to various oxygen partial pressures. ($n = 28$; first-order regressions; for further explanation see Figs. 1 and 4)

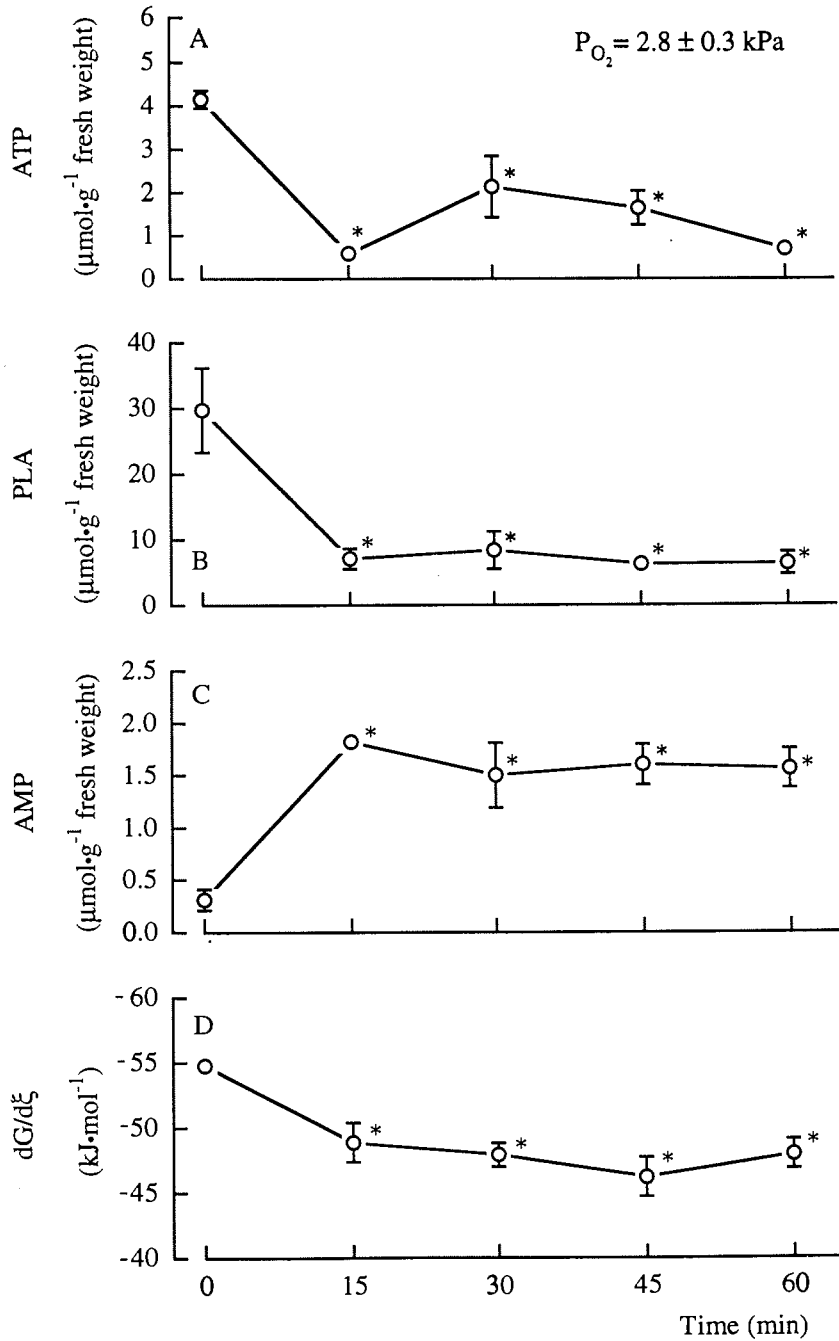


Fig. 7 (A) ATP, (B) phospho-L-arginine, (C) AMP concentrations and (D) the Gibb's free energy change of ATP hydrolysis in the mantle musculature of *Lolliguncula brevis* during exposure to a P_{O_2} of $2.8 \pm 0.3 \text{ kPa}$. (* - significantly different from values at 0 min; 0 min: n = 4; 15 min: n = 7; 30, 45 and 60 min: n = 5; values are means \pm SD)

Temperature as a critical constraint in warm water and Antarctic cephalopods

S. Zielinski, T. Hirse, B. Klein, E. Finke, V. Wegewitz and H.O. Pörtner

Alfred-Wegener-Institut für Polar- und Meeresforschung, Biologie I/Ökophysiologie
Columbusstrasse, 27568 Bremerhaven, Germany

running head: Heat tolerance in two cephalopods

Correspondence address:

Prof. Dr. H.O. Pörtner, Alfred-Wegener-Institut für Polar- und Meeresforschung,
Biologie I/Ökophysiologie, Columbusstr., 27568 Bremerhaven, Germany

Phone: ++49 471 4831 307 FAX: ++49 471 4831 149

email: hpoertner@AWI-Bremerhaven.de

Abstract

For an assessment of the sensitivity to temperature changes, the Antarctic octopod *Pareledone charcoti* was incubated for 24 hours at temperatures between -1.8 to 10°C. For comparison, the warm water squid *Lolliguncula brevis* was exposed to temperatures between 11 and 31°C. Changes in energy and acid-base status were analysed in the mantle musculature. A high critical temperature (T_c) could be defined for both cephalopods which relates to ambient temperature and is characterized by the onset of anaerobic metabolism. Anaerobic metabolism was not sufficient to maintain energy status as indicated by the drop in the levels of ATP, phospho-L-arginine and the Gibb's free energy change of ATP hydrolysis. Furthermore, an intracellular acidosis developed above the T_c . Quantification of the processes contributing to intracellular acidification revealed that net proton uptake occurred which exceeded the proton uptake expected from alphastat pH-regulation and metabolic acidification and might indicate a heat induced failure of pH regulation.

Activities of enzymes involved in glycolysis, amino acid degradation and citrate cycle were analysed in the Antarctic octopods *Pareledone charcoti* and *Pareledone polymorpha* and the muscular squid *Psychroteuthis glacialis*. Temperature incubations of whole animals indicate an imbalance between protein synthesis and degradation to set in above the T_c . Arrhenius activation energies in extracted enzymes of amino acid degradation and glycolysis were found to depend on tissue function and to be high at low metabolic flux.

Comparison of enzyme activities from Antarctic cephalopods with species from lower latitudes showed the Antarctic squid to have similar aerobic and to some extent anaerobic capacities as squids from temperate waters. In contrast, enzyme activities in the Antarctic octopods appear not to be compensated for low temperatures. This difference between squid and octopods indicates the importance of life style for metabolic cold adaptation which is maximised in the active squid.

Keywords: critical temperature, anaerobic metabolism, energy status, aerobic and anaerobic capacities, enzyme activities, *Lolliguncula brevis*, *Pareledone charcoti*, *Pareledone polymorpha*, *Psychroteuthis glacialis*

1. Introduction

Temperature is considered to be an important environmental parameter due to its influence on the rate of biochemical and physiological processes. Extreme temperatures or temperature variations can cause lethal injuries (for reviews see: Prosser 1991; Somero 1997) and are important in characterising the limits of geographical distribution of a species. The effects of temperature on marine coastal ecosystems have come into focus owing to the process of global warming, which has already caused a change in the distribution of species (Southward et al. 1995). The comparison of marine ectothermal animals living in seasonally or permanently cold environments with those from temperate and warm waters might help to reveal the biochemical or physiological mechanisms which contribute to determining geographical distribution.

The Antarctic marine environment is characterized by low and very stable water temperatures, with values close to freezing, varying by only 0.2°C throughout the year near the Antarctic continent. Towards the Antarctic convergence both the mean annual temperature and the extent of seasonal variability increase (Clarke 1988). Antarctic fish and invertebrates show numerous resistance adaptations which enable them to live at temperatures far below the lethal limits of temperate and tropical species (Johnston 1990). Investigations on Antarctic fish have shown that activities of some enzymes of aerobic energy metabolism and fatty acid oxidation are higher than in temperate zone species when measured at equivalent temperatures (Torres and Somero 1988; Crockett and Sidell 1990), thus showing that their aerobic metabolism is at least partly cold compensated. Whether this extends to the rates of resting metabolism is a continuing matter of debate.

Cephalopods occupy a similar position in the ecosystem and food web as marine fishes (Packard 1972; Pörtner 1997), both in the benthos as well as in the pelagic. Among Antarctic octopods, the genus *Pareledone* forms the most abundant group (Kuehl 1988). While *Pareledone charcoti* has been reported to have a circum-Antarctic distribution, *Pareledone polymorpha* is known from the Atlantic sector of the Southern Ocean and from the Ross Sea (Roper et al. 1984). The Antarctic squid *Psychroteuthis glacialis* also shows a circumpolar distribution (Filippova and Pakhomov 1994) with a bathypelagic mode of life close to the shore (Rodhouse 1989). Until now, many studies on Antarctic cephalopods have focussed on taxonomy, geographical distribution and their role in the food chain (Nemoto et al. 1985, Voss 1988, Rodhouse and Prince 1993, Clarke and Goodall 1994, Kubodera and Okutani 1994). Little is known about their physiology. Therefore, one aim of this study was to gain basic physiological data on cold adaptation. Most studies concerning metabolic cold compensation focussed on Notothenioid fishes. Therefore, the comparison with a group of animals which leads a fish like mode of life should contribute to reveal whether the mechanisms of adaptation to cold discussed for

Notothenioid fishes reflect unifying principles or rather special features of this fish family.

We measured activities of enzymes for an estimate of aerobic and anaerobic metabolic capacities. Furthermore, animals were exposed to elevated temperatures to test their thermal sensitivity. Preliminary experiments were conducted with the brief squid *Lolliguncula brevis*, which is found in the Gulf of Mexico and along the Atlantic coast from Maryland in the United States south to the Rio de la Plata in South America (Voss 1956). It is able to enter shallow waters of inshore and estuarine environments (Hendrix et al. 1981) where it can encounter temperatures as high as 32°C, while the minimal temperature in its environment is about 12°C (Dragovich and Kelly 1962). Since *Lolliguncula brevis* lives in an environment with larger temperature fluctuations than the Antarctic species, the question arose how thermal sensitivity compares in a stenothermal Antarctic and a eurythermal warm water cephalopod.

2. Materials and Methods

2.1 Animals

Antarctic octopods (*Pareledone charcoti*, 7 - 84 g; *Pareledone polymorpha*, 74 - 179 g) and squids (*Psychroteuthis glacialis*, 72 - 133 g) were caught in February 1996 in the eastern Weddell Sea during the cruise ANT XIII/3 of RV 'Polarstern'. *Pareledone charcoti* (21 - 91 g) used for temperature incubations and oxygen consumption measurements were caught in November and December 1996 close to Elephant Island, Antarctica during 'Polarstern' cruise ANT XIV/2. The animals were collected from bottom and agassiz trawls. The octopods were kept on board in aquaria with natural sea water under conditions close to those in their natural environment (0°C, 34 ‰). They were allowed to acclimate to the aquarium for at least one week and were fed both life and dead Antarctic krill every three to four days. Samples for enzyme analysis in Antarctic squid were taken immediately after capture. *Pareledone charcoti* used for oxygen consumption measurements were transported to the AWI by plane and kept in aquaria under the same conditions as on board 'Polarstern'. They were allowed to adjust to these conditions for a couple of weeks and were fed weekly with living sandshrimps *Crangon crangon* until two days prior to experimentation.

Brief squid (*Lolliguncula brevis* Blainville, 5.1 - 21.6 g) were caught in April 1993 in the Galveston Ship Channel and Galveston Harbour by fishermen of the Marine Biomedical Institute of the University of Texas, Galveston, Texas, USA and kept in aquaria with recirculating natural sea water under conditions similar to those in the natural habitat (24 - 25 ‰, 20 - 22°C). The squid were allowed to adjust to the aquarium for at least 48 hours. The animals were fed fish and mysid shrimp, but not during the last 24 h before experimentation.

2.2 Experimental procedures

Temperature incubation. All incubations were carried out in darkened containers (volume: 5 l for *Lolliguncula brevis*; 3 l for *Pareledone charcoti*) with aerated natural sea water. The containers were placed into a water bath thermostatted to the experimental temperatures (all temperatures $\pm 0.5^\circ\text{C}$).

Specimens of *Lolliguncula brevis* were gently transferred into water thermostatted to 11, 16, 21 (control temperature), 26 and 31°C. They were incubated for one hour except during exposure to 31°C. At this temperature, the animals had to be removed after 2 to 6 minutes since they showed signs of stress indicated by the release of ink. At the end of each experiment animals were anaesthetized by the addition of ethanol to the water to a level of 3 % ethanol (v/v). Muscles samples were obtained from these specimens using a parallel arrangement of scalpel blades as described by Pörtner et al. (1991).

Tissue samples were freeze-clamped, wrapped in aluminium foil and stored under liquid nitrogen until analysed.

Temperature incubations of *Pareledone charcoti* were carried out onboard of RV 'Polarstern'. For this, animals were placed into water of 0°C (control temperature) and incubated for 24 hours. Considering the slow metabolic rate and the high thermal sensitivity of these Antarctic compared to warm water cephalopods, temperature was changed at a rate of 1.8 to 2°C/day, until the experimental temperatures of -1.8, 4, 6, 8 and 10°C were reached. The octopods were incubated for another 24 hours at the final temperature. Control animals were incubated in the same experimental setup for 24 hours at 0°C. At the end of the incubation periods, 4 % ethanol (required for full anaesthesia of this species) were added and samples were taken as described above. Part of the tissue was used without freezing for the assay of octopine dehydrogenase, malate dehydrogenase and arginine kinase.

Oxygen consumption analyses. Specimens of *Pareledone charcoti* were placed into containers (0.8 l) in a flow through respirometer. Oxygen consumption was recorded continuously by use of a Clark type Po₂-electrode (Eschweiler, Kiel, Germany). The experiment started at 0°C and temperature was elevated to 12°C in a stepwise procedure: After 5 days at 0°C, temperature was increased to 2°C for two days. Then temperature was elevated to 4°C and after another 13 days to 6°C. The animals were kept for 4 days at this temperature before it was increased to 8°C for 4 days. Finally temperature was increased to 12°C and the animals were incubated for 3 more days. These long term incubations were carried out in order to exclude the influence of under- or overshoot phenomena and to evaluate standard metabolic rate by correcting for the influence of spontaneous activity.

2.3 Analyses in tissues samples

Intracellular pH (pH_i) and tissue concentrations of CO₂ (Cco₂) were determined in both *Lolliguncula brevis* and *Pareledone charcoti* by application of the homogenate technique described by Pörtner et al. (1990) using a medium containing 160 mmol l⁻¹ KF and 1 mmol l⁻¹ nitrilotriacetic acid.

The remaining tissue powder was extracted in perchloric acid following the procedure of Beis and Newsholme (1975), modified according to Pette and Reichmann (1982). The following metabolites were determined enzymatically in extracts from the mantle muscle of both species: ATP, ADP, AMP and succinate according to Bergmeyer et al. (1986), phospho-L-arginine, arginine and octopine according to Grieshaber et al. (1978) and inorganic phosphate according to Pörtner (1990). The concentration of acetate

was analyzed with a Dionex LC ion chromatograph (Idstein, FRG). The measurement followed a procedure modified from Hardewig et al. (1991), using 0.125 mmol l⁻¹ octane sulphonic acid as an eluent at 40°C. Peaks were monitored with a conductivity detector.

The levels of free ADP and AMP and the Gibb's free energy change of ATP hydrolysis ($dG/d\xi$) were calculated based on the equilibria of arginine kinase and myokinase according to Pörtner (1993) and Pörtner et al. (1996). Equilibrium constants of both enzymes were corrected for experimental temperatures and pH related to pH and temperature dependent changes of proton and magnesium binding of the adenylates and to the proton turnover of the arginine kinase reaction.

The intracellular non-bicarbonate buffer value (β_{NB}) of mantle tissue of *Pareledone charcoti* under resting conditions was determined at 0°C following the method of Pörtner (1990). Briefly, 0.4 g of ground tissue were suspended in 4 ml ice-cold medium (540 mmol l⁻¹ KF, 10 mmol l⁻¹ nitrilotriacetic acid) in a temperature controlled tonometer (Instrumentation Laboratory, Padorno Dugano, Italy). The homogenate was equilibrated with different mixtures of CO₂ in air before analysis of pH and Cco₂ took place as mentioned above. Values of free inorganic phosphate were measured enzymatically according to Pörtner (1990).

Determination of enzyme activities. Enzyme activities were assayed in mantle, arm and gill tissue of the Antarctic cephalopods *Pareledone charcoti*, *Pareledone polymorpha* and *Psychroteuthis glacialis* using either a Beckman DU 7400 or a Pharmacia Ultraspec 3000 spectrophotometer. Assay temperature was controlled at 0°C for samples taken from incubations of *Pareledone charcoti* at various temperatures. For *in vitro* analyses of thermal sensitivity assay temperatures were 0, 10, 20 and 30°C. Tissue samples for these measurements were obtained from animals kept at 0°C.

Homogenates for the measurement of octopine dehydrogenase, malate dehydrogenase and arginine kinase were prepared immediately using freshly excised tissue, which was minced by the use of scissors and homogenized in ice-cold extraction buffer using an Ultra-Turrax (IKA-Labortechnik, Staufen). Activities of all other enzymes were measured in frozen samples after verifying from the literature that freezing did not change enzyme properties. The tissue was ground under liquid nitrogen, homogenized with an Ultra-Turrax in ice-cold extraction buffer. Enzyme activities were assayed in the supernatant after centrifugation.

Phosphofructokinase (PFK; EC 2.7.1.11), pyruvate kinase (PK; EC 2.7.1.40), and citrate synthase (CS; EC 4.1.3.7) were assayed after Sidell et al. (1987), glyceraldehyde-phosphate dehydrogenase (GAPDH; EC 1.2.1.12) according to Shaklee et al. (1977). Octopine dehydrogenase (ODH; EC 1.1.5.11), arginine kinase (AK; EC 2.7.3.3) and

malate dehydrogenase (MDH; EC 1.1.1.37) were extracted according to Ballantyne et al. (1981). Measurement of ODH followed a procedure described by van Thoai and Robin (1959), while AK activity was measured according to Doumen and Ellington (1990) and MDH according to Baldwin (1982). Activity of glutamate dehydrogenase (GluDH; EC 1.4.1.2) was determined according to Storey et al. (1978), the determination of α -glycerophosphate dehydrogenase activity (GPDH; EC 1.1.1.8) followed the procedure of Baldwin and England (1980). The measurement of glycogen phosphorylase (GP; EC 2.4.1.1) followed a procedure modified from Bergmeyer et al. (1986) using 50 mM imidazole, 20 mM NaF and 5 mM EDTA, pH 7.0 as extraction medium.

All enzyme activities are given in U g⁻¹ fresh weight. Because ODH, MDH and AK were measured on board RV 'Polarstern' weighing of the tissue used for homogenate preparation was not possible due to the movements of the ship. Determinations of the protein content per g tissue and per volume of extract according to Bradford (1976) allowed the conversion from U mg protein⁻¹ to U g⁻¹ fresh weight.

Calculation of proton production. The proton balance of anaerobic metabolism (ΔH^+_{met}) was evaluated according to Pörtner (1987a,b) from tissue concentration changes between samples taken just below and above the upper critical temperatures. Proton binding by the phosphate buffer was calculated for the final pH_i. The fraction of protonized phosphate (F) is calculated using equation (1) for pKa_(10°C) = 6.836 and pKa_(31°C) = 6.772 (Pörtner 1990):

$$F = 1/(10^{\text{pH}-\text{pKa}+1}) \quad (1)$$

The amount of non-respiratory protons was estimated according to Pörtner (1987b):

$$\Delta H^+_{\text{non-resp}} = -\beta_{\text{NB}} \times \Delta \text{pH}_i - \Delta \text{Bic} \quad (2)$$

(non-resp: non respiratory; β_{NB} : non-bicarbonate buffer value; Bic: bicarbonate)

with $\beta_{\text{NB}} = 23.7 \pm 5.1$ mmol pH unit⁻¹ kg⁻¹ for *Lolliguncula brevis* (21°C; Pörtner et al. 1996) and $\beta_{\text{NB}} = 13.6 \pm 6.6$ mmol pH unit⁻¹ kg⁻¹ (n = 3) for *Pareledone charcoti* (0°C).

2.4 Statistics

Significance of changes in pH_i, intracellular Pco₂ and metabolite concentrations were tested by one-way analysis of variance (ANOVA) and Student-Newman-Keuls posthoc tests using SuperAnova (Abacus Concepts). Values differing significantly from the norm (Nalimov's test) were eliminated from the data set. The correlation of changes in anaerobic end products and in intracellular pH was estimated by linear regression analyses. For the evaluation of whether enzyme activities and Arrhenius activation energies of enzymatic reactions varied between cephalopod species and between tissues,

data were compared using Student's t-test. Discontinuities in the Arrhenius plot were determined by the method of Yeager and Ultsch (1989) identifying significantly different regressions by analysis of covariance (ANCOVA). In all cases, $p < 0.05$ was accepted to indicate a significant difference.

3. Results

3.1 pH_i and metabolite levels

Fig. 1A and 1B show the temperature dependence of mantle muscle pH_i. At control temperatures, pH_i in the mantle tissue was 7.27 ± 0.01 (21°C) in *Lolliguncula brevis* and 7.53 ± 0.03 (0°C) in *Pareledone charcoti*. The pH_i/T slope was in good agreement with the alphastat-hypothesis ($\Delta\text{pH}_i/\Delta^\circ\text{C} = -0.017$, Reeves 1972) in *Pareledone charcoti*. A deviation from the alphastat pattern occurred at 10°C, leading to a significantly lowered pH_i value compared to the values at 0 and 8°C. This decrease in pH_i was accompanied by both a non-significant increase of intracellular Pco₂ (P_ico₂) and a decrease of the intracellular bicarbonate concentration (Fig. 1C, E). In *Lolliguncula brevis* pH_i also decreased with increasing temperature, but the slope was not linear between 11 and 26°C, possibly due the short incubation period of one hour. At the highest incubation temperature (31°C) intracellular pH was significantly reduced compared to the control value at 21°C and to the value at 26°C (Fig. 1B). Furthermore, the P_ico₂ was significantly increased, while no uniform trend was found between 11 and 26°C (Fig. 1D). Intracellular bicarbonate levels increased significantly between 21 and 26°C, while at 31°C the concentration was significantly lower compared to 26°C (Fig. 1F).

Between -1.8 and 8°C, the concentrations of ATP and phospho-L-arginine (PLA) in the mantle muscle of *Pareledone charcoti* remained more or less constant, while levels dropped significantly at 10°C compared to control values (0°C; Fig. 2B,C). Simultaneously, the levels of AMP and L-arginine rose significantly, while the summed concentrations of the adenylates ($\Sigma [\text{Ade}] = [\text{ATP}] + [\text{ADP}] + [\text{AMP}]$) and the summed concentrations of L-arginine containing metabolites ($\Sigma [\text{L-Arg}] = [\text{PLA}] + [\text{L-arginine}] + [\text{octopine}]$) remained unchanged (Table 1). PLA depletion resulted in a significant drop of the ratio of PLA over the sum of PLA and L-arginine contents. The concentrations of free ADP and free AMP showed a transient decrease between 0 and 8°C and increased again at 10°C, but these changes were not significant (Fig. 2C). In parallel to the drop in free ADP, a linear increase ($r = 0.52$) was observed between 0 and 8°C for the Gibb's free energy change of ATP hydrolysis ($dG/d\xi$). A further increase in temperature led to a significant drop of $dG/d\xi$ at 10°C compared to the value at 8°C (Fig. 2D).

Similar results were obtained for *Lolliguncula brevis*. The concentrations of ATP and PLA remained almost constant between 11 and 26°C. PLA dropped significantly at 31°C (Fig. 3A,B). Concomitantly, the ratio of PLA over the sum of PLA and L-arginine concentrations fell, while $\Sigma [\text{L-Arg}]$ remained close to control levels at all temperatures (Table 1). Furthermore, the level of free ADP rose significantly between 26 and 31°C, while the increase in free AMP was not significant (Fig. 3C). A linear increase ($r = 0.52$)

in $dG/d\xi$ was observed with rising temperature between 11 and 26°C. At 31°C, $dG/d\xi$ fell significantly to a low value of $-43.64 \pm 1.84 \text{ kJ mol}^{-1}$ (Fig. 3D).

As depicted in Fig. 4, an accumulation of anaerobic endproducts occurred at extreme temperatures indicating tissue hypoxia at high incubation temperatures. In the mantle muscle of *Pareledone charcoti* only the accumulation of acetate was significant at 10°C. Octopine and succinate levels remained close to control levels at 0°C (Table 1). In contrast, octopine concentrations in the mantle muscle of *Lolliguncula brevis* reached a significantly increased level at 31°C (Fig. 4B). Succinate and acetate levels did not change significantly, very likely due to the short incubation period. However, both metabolites showed a trend to rise at extreme temperatures (Table 1).

Both the elevated levels of acetate in *Pareledone charcoti* and of octopine in *Lolliguncula brevis* are significantly correlated with changes in pH_i ($r = 0.64$ and $r = 0.88$, respectively). As shown in table 2 some metabolic proton production was visible in *Lolliguncula brevis* but not in *Pareledone charcoti*. An excess of non-respiratory over metabolic proton quantities resulted in both species indicating a temperature induced loss of base equivalents from the tissues.

3.2 Temperature dependence of metabolic rate in *Pareledone charcoti*

When temperature was elevated in a stepwise procedure oxygen consumption increased from $0.26 \mu\text{mol O}_2 \text{ h}^{-1} \text{ g}^{-1}$ fresh weight at 0°C to a significantly higher level of $1.01 \mu\text{mol O}_2 \text{ h}^{-1} \text{ g}^{-1}$ fresh weight at 12°C (Fig. 5). However, the rise in metabolic rate with temperature was not uniform, as evidenced by an increase of Q_{10} from a value of 1.9 between 0 and 8°C to an extreme of 8.4 between 8 and 12°C.

3.3 Thermal sensitivity of enzyme activities

Enzyme activities in *Pareledone charcoti* incubated at temperatures between -1.8 and 10°C were determined at 0°C. As a general trend, enzyme activities (measured at 0°C) appeared to increase between 0 and 6 or 8°C and decreased at higher temperatures, sometimes even below the control level as in the case of α -glycerophosphate dehydrogenase (GPDH) in the gills (Fig. 6, Table 3).

Considering that the use of mantle and arm musculatures differs between octopods and squids, table 4 shows enzyme activities in mantle and arm tissues of *Pareledone charcoti*, *Pareledone polymorpha* and *Psychroteuthis glacialis* measured at 0°C. It becomes evident, that with the exception of GPDH all enzyme activities were significantly higher in the mantle musculature of the Antarctic squid than of the octopods. Furthermore, only glycogen phosphorylase (GP) was significantly higher in arm tissue of *Psychroteuthis glacialis* compared to the mantle, whereas all other enzyme activities were

significantly lower in the arms. Additionally, only arginine kinase (AK) and GP activities in the arm tissue of *Psychroteuthis glacialis* were higher than in octopod tissue, while glutamate dehydrogenase activity (GluDH) was similar in all three species. The activities of the other enzymes in this tissue were significantly lower in the squid. Comparison of the two octopod species showed, that only AK activity in the arm tissue of *Pareledone polymorpha* was significantly higher than that of *Pareledone charcoti* while activities of phosphofructokinase (PFK), citrate synthase (CS) and GP in the arm tissue, glyceraldehyde-phosphate dehydrogenase (GAPDH), GPDH and AK in the mantle musculature and pyruvate kinase (PK), octopine dehydrogenase (ODH) and malate dehydrogenase (MDH) in both tissues were significantly lower (Table 4).

As expected, an increase in assay temperature led to increased enzyme activities. In some cases this was only true until a threshold temperature was reached. GP activity in arm tissue of *Psychroteuthis glacialis* showed an early drop as soon as temperature rose to 10°C, whereas it levelled off at 20°C in the octopods (Fig. 7C) as well as in the mantle of the squid (not shown). GluDH activity reached an almost constant level at 20°C in the mantle musculature (not shown) and at 10°C in the arm tissue of *Pareledone charcoti* and *Psychroteuthis glacialis* (Fig. 7B).

Table 5 depicts Q_{10} values and Arrhenius activation energies (E_a). Fig. 7D, E, F show the Arrhenius plots for PFK, GluDH and GP. A break was found at 20°C for PFK from the arm tissues of all three Antarctic cephalopods, associated with a drop of activation energies (Table 5). For GluDH in arm tissues only the enzyme from *Psychroteuthis glacialis* showed a discontinuity in the Arrhenius plot at 20°C. A break at this temperature was also visible for GP and PK from the mantle tissue and GPDH from the arm tissue of *Psychroteuthis glacialis* and for GP from the arm tissue of *Pareledone polymorpha*. In all cases, E_a was again higher in the lower temperature interval compared to the upper interval (Table 5). Only PK from the mantle musculature of *Pareledone polymorpha* and GAPDH from the arm tissue of *Psychroteuthis glacialis* showed a break at 10°C. The latter was the only enzyme where a higher E_a value was found in the upper temperature range. All other investigated enzymes showed no discontinuities in the Arrhenius plot between 0 and 30°C (Table 5).

4. Discussion

4.1 Critical temperature and energy metabolism

The onset of anaerobic metabolism characterises both a high and a low critical temperature (T_c) in marine invertebrates as shown for the intertidal worms *Sipunculus nudus* and *Arenicola marina* (Zielinski and Pörtner 1996; Sommer et al. 1997). A high T_c was identified for Antarctic and temperate zone eelpouts *Pachycara brachycephalum* and *Zoarces viviparus* (C. Tesch, I. Hardewig, P. van Dijk and H.O. Pörtner, unpublished data). The onset of anaerobic pathways at extreme temperatures is probably linked to the failure of ventilatory mechanisms, since ventilatory movements are reduced at low temperatures (Baumfalk 1979; Seymour 1972), and they can not be increased above a certain temperature (Seymour 1972; Kristensen 1983). This has also been shown for *Lolliguncula brevis*, where ventilatory frequency reached a plateau at about 25°C (Wells et al. 1988). The high T_c for *Lolliguncula brevis* is found close to this temperature, between 26 and 31°C, indicated by a significant accumulation of octopine at 31°C (Fig. 4). Similarly, the high T_c was characterized by a progressive levelling off of ventilation frequency in the Antarctic notothenioid fish, *Lepidonotothen nudifrons* (H.O. Pörtner, L.S. Peck and I. Hardewig, unpublished data). Critical temperatures shift in parallel with acclimation temperature as seen for the lugworm *Arenicola marina* (Sommer et al. 1997). A shift of lethal temperatures was observed in the blue crab *Portunus pelagicus* (Neverauskas and Butler 1982), and the bivalves *Tellina fabula* and *Tellina tenuis* (Ansell et al. 1980). This needs to be taken into account, whenever critical temperatures are compared between animals from habitats with fluctuating temperatures.

Critical temperatures vary among Antarctic species. Some species of the genera *Trematomus* display a low upper lethal temperature of 6°C (Somero and DeVries 1967). Even lower limits between 2 and 4.5°C were found in the brachiopod *Liothyrella uva* and for the bivalve *Limopsis marionensis* (Peck 1989; Pörtner et al. 1999). The latter two species show a similar immobile life style (Peck 1989; Hain 1990). For more active animals like the fish *Lepidonotothen nudifrons*, the burrowing bivalve *Laternula elliptica* and the intertidal Antarctic limpet *Nacella concinna* critical levels were reached at about 9°C (Peck 1989; H.O. Pörtner, L.S. Peck and I. Hardewig, unpublished data), similar to the T_c in *Pareledone charcoti*. This comparison shows, that for most of these species the critical temperature is above the environmental temperature which they usually encounter. It also seems that for animals living under the same ambient temperature regime the level of critical temperature might vary with the level of activity and aerobic scope, associated with a larger flexibility of ventilatory mechanisms. This is likely to be true for *Pareledone charcoti* in comparison to immobile *Liothyrella uva* or *Limopsis marionensis*.

In contrast to *Pareledone charcoti*, the upper limit for *Lolliguncula brevis* is found just above the upper range of ambient temperature in its natural environment. Considering the high oxygen demand of this squid (Finke et al. 1996) together with the assumption that oxygen supply may be a critical factor at elevated temperatures, these considerations imply that this squid operates at its functional and environmental limits (Pörtner and Zielinski 1999).

4.2 Acid-base regulation

Intracellular pH (pH_i) in the mantle musculature of *Pareledone charcoti* changed in accordance with the alaphastat-hypothesis ($\Delta pH/\Delta^\circ C = -0.017$; Reeves 1972), whereas in *Lolliguncula brevis* temperature dependent changes of pH_i did not as clearly follow the alaphastat pattern. This might be due to the fluctuations in intracellular P_{CO_2} during the short incubation period of *Lolliguncula brevis* (Fig. 1). Also, the adjustment of alaphastat pH is time dependent as shown for some crustaceans (Sartoris and Pörtner 1997).

Increases in temperature above the upper T_c resulted in significantly lower pH_i values compared to values at temperatures just below the respective T_c , causing an acidification by about 0.3 pH-units in the Antarctic cephalopod and by 0.37 pH-units in the warm water squid. At the same time, intracellular P_{CO_2} increased, leading to some respiratory acidification. The calculation of metabolic proton production revealed an excess of $2.1 \mu\text{mol H}^+ \text{g}^{-1}$ fresh weight in *Lolliguncula brevis* and a deficit of $0.2 \mu\text{mol H}^+ \text{g}^{-1}$ fresh weight in *Pareledone charcoti* (Table 2). This is related to the much smaller concentration changes of anaerobic end products in the Antarctic octopod despite much longer exposure periods. Although changes in metabolite levels partly show some inter-individual variability (cf. Fig. 2-4, Table 1), the calculation from the mean values reveals a difference between metabolic and non-respiratory H^+ quantities. Obviously, net proton uptake or base loss occurred in the muscle tissue during warming to an extent, which exceeded the proton uptake expected from the alaphastat-pattern and from metabolic acidification (Table 2). This discrepancy may indicate a failure of ion transport to maintain alaphastat pH-regulation.

Alaphastat-regulation of pH supports the maintenance of phosphagen levels and cellular energy status quantified as the Gibb's free energy change of ATP hydrolysis ($dG/d\xi$), which represents the true driving force for any ATP dependent reaction. Model calculations show a slight increase in $dG/d\xi$ with increasing temperature when pH_i follows the alaphastat pattern (Pörtner et al. 1998). Experimental data for *Pareledone charcoti* and *Lolliguncula brevis* confirm this analysis for temperatures below the upper T_c . Above this temperature a depletion of PLA and ATP together with the rise in free ADP contents and the enhanced acidosis led to the observed drop of $dG/d\xi$. The minimum

value of $-43.64 \pm 1.84 \text{ kJ mol}^{-1}$ in the mantle muscle of *Lolliguncula brevis* is close to those evaluated for the same species during fatiguing exercise (-44 kJ mol^{-1} ; Pörtner et al. 1996) and during extreme environmental hypoxia ($-44.4 \text{ kJ mol}^{-1}$; S. Zielinski, P.G. Lee and H.O. Pörtner, unpublished data). These levels may be limiting since they are below those calculated by Kammermeier (1987) as being required for the function of actomyosin-ATPase (-45 to -50 kJ mol^{-1}) or sarcolemmal Ca^{2+} -ATPase (-51 kJ mol^{-1}) (cf. Pörtner 1993; Combs and Ellington 1995).

4.3 Oxygen consumption of *Pareledone charcoti*

Warming led to elevated oxygen consumption rates of *Pareledone charcoti*. Between 0 and 8°C oxygen consumption varied with a Q_{10} of 1.9 which ranges low compared to the metabolic fluctuations with temperature seen in the Antarctic invertebrates *Nacella concinna* and *Liothyrella uva* (Peck 1989). However, when temperature was increased to above the critical threshold, the increase in oxygen consumption followed a Q_{10} of 8.4. This increment was probably supported by respiratory control, since levels of ATP were reduced and of free ADP increased above the T_c (cf. Fig. 2).

An overshoot in oxygen consumption after any increase in temperature was found for the Antarctic bivalve *Limopsis marionensis* (Pörtner et al. 1999) and the Antarctic limpet *Nacella concinna* (Peck 1989), but was not visible in *Pareledone charcoti*. However, oxygen consumption rates in both species declined when the critical threshold was surpassed. In contrast to these findings, *Pareledone charcoti* died after three days at 12°C before a drop in oxygen consumption occurred. Nevertheless, the rise in Mo_2 is interpreted to coincide with anaerobic ATP production as seen for *Arenicola marina* (A. Sommer and H.O. Pörtner, unpublished data), probably associated with a failure of ventilatory mechanisms to meet oxygen requirements. Future study must elucidate whether progressive uncoupling of mitochondria contributes to the drastic rise in Mo_2 close to the T_c .

Comparison of oxygen consumption rates show *Pareledone charcoti* to have a lower metabolic rate ($0.26 \mu\text{mol h}^{-1} \text{g}^{-1}$ fresh weight) than other Antarctic species even when considering the effect of body size. A higher metabolic rate was found in sedentary fish of similar size, in *Notothenia neglecta* ($0.82 \mu\text{mol h}^{-1} \text{g}^{-1}$ fresh weight at 0°C; Johnston et al. 1991) and in the zoarcid fishes *Melanostigma gelatinosum* ($0.94 \mu\text{mol h}^{-1} \text{g}^{-1}$ fresh weight at 0.5°C; Torres and Somero 1988) and *Pachycara brachycephalum* ($0.47 \mu\text{mol h}^{-1} \text{g}^{-1}$ fresh weight at 0°C; C. Tesch, I. Hardewig, P. van Dijk, H.O. Pörtner, unpublished). In contrast, metabolic rate of *Pareledone charcoti* was similar to the rates found in deep-sea octopods of similar size at 5°C, $0.25 \mu\text{mol h}^{-1} \text{g}^{-1}$ fresh weight in *Japetella diaphana* and $0.17 \mu\text{mol h}^{-1} \text{g}^{-1}$ fresh weight in *Eledonella pygmaea* (Seibel et al.

1997). It has been suggested, that the lower metabolic rates of the latter species are due to decreased activity levels of animals living in the aphotic zone (Childress 1995; Seibel et al. 1997). Accordingly, the relatively low rate of oxygen consumption in *Pareledone charcoti* also reflects a low activity mode of lifestyle.

4.4 Enzymes activities

Incubation of *Pareledone charcoti* at temperatures between -1.8°C and 10°C caused enzyme activities to increase between 0 to 6 or 8°C . Further temperature elevation to 10°C reversed this trend. Since all assays were carried out at 0°C , these changes may reflect a change in enzyme quantities. The decrease of enzyme activities observed *in vivo* at 10°C may involve protein denaturation. This transition does not closely correlate with Arrhenius break temperatures (see below). In fish, gross denaturation usually occurs well above the lethal temperature as shown for pyruvate kinase and lactate dehydrogenase from the Antarctic fish *Pagothenia borchgrevinki* (Low and Somero 1976; Donahue 1982 as cited in Somero 1991). Small changes in enzyme conformation which lead to changes in ligand binding may be the physiologically relevant form of "heat denaturation" encountered by proteins (Somero 1991, 1996). Alternatively, incubation at elevated temperatures may have influenced the balance of protein synthesis and degradation, considering that proteins show half-lives between minutes and up to 200 hours. Especially enzymes which are rate limiting in a pathway show short half-lives (for review see: Goldberg and Dice 1974; Rechsteiner et al. 1987). In animal anaerobes anoxia and acidosis are suitable to depress protein synthesis (Kwast and Hand 1996). Temperature induced anaerobiosis and acidosis at 10°C may shift the balance between protein synthesis and degradation towards degradation, but more data are needed before definite conclusions can be drawn.

Arrhenius break temperatures (ABT) might indicate progressive denaturation or simply conformational alterations in the enzyme leading to a change in catalytic properties (Moon and Storey 1975; Kaletha and Skladanowski 1981). For the Antarctic clam *Laternula elliptica* and *Arenicola marina* from the White sea it has been found that the ABT of NADP dependent isocitrate dehydrogenase and mitochondrial respiration matches the high T_c of these species, while such a coincidence was not found in Antarctic fish (A. Sommer and H.O. Pörtner, unpublished data; H.O. Pörtner, I. Hardewig and L.S. Peck, unpublished data). In *Pareledone charcoti* ABTs of 20°C for PFK from the mantle and arm tissues and GluDH from the mantle musculature are not correlated with the T_c of the octopod. No ABT was found for all other investigated enzymes of this species. This comparison shows, that ABT and T_c do not necessarily go hand in hand. The significance and mechanisms of these break temperatures require further investigation.

Reduced activation energies (E_a) of enzymatic reactions at low temperatures seem to compensate for the reduced levels of kinetic energy available at low temperatures (e.g. Dahlhoff and Somero 1993). Examples include MDH, LDH and myofibrillar ATPase of fish (Johnston and Goldspink 1975), GluDH of sea anemones (Walsh 1981) and CS of krill and isopod species (Vetter 1995). Such a comparison is not feasible for cephalopods since E_a values are not available for cephalopods from various latitudes. Activation energy for GluDH from the arms of Antarctic cephalopods was calculated between $32.0 \pm 5.0 \text{ kJ mol}^{-1}$ and $81.0 \pm 13.6 \text{ kJ mol}^{-1}$, higher than the values of $15.2 \pm 0.6 \text{ kJ mol}^{-1}$ and $20.0 \pm 0.7 \text{ kJ mol}^{-1}$ found for temperate sea anemones, *Metridium senile* and *Anthopleura elegantissima* (Walsh, 1981). Moreover, activation energies calculated for CS in the mantle musculature of the Antarctic cephalopods ($35.9 \pm 0.5 \text{ kJ mol}^{-1}$ to $38.0 \pm 0.2 \text{ kJ mol}^{-1}$) were higher than in the Antarctic krill *Euphausia superba* (11 kJ mol^{-1}) but in the same range as found for the Nordic krill *Meganyctiphanes norvegica* and the Baltic sea isopod *Idotea baltica*, which both encounter higher temperatures than the Antarctic species (45 kJ mol^{-1} and 44 kJ mol^{-1} ; Vetter 1995). These comparisons appear to contradict the expected fall in E_a and emphasize that comparisons are not feasible between very distant groups. Moreover, the level of E_a appears to not only depend upon the ambient temperature regime but also on the extent to which a metabolic reaction or pathway is used (see below). Nonetheless, high levels of activation energy in some metabolic reactions of polar species indicate a high temperature dependence of metabolic pathways (Vosjan and Olanczuk-Neyman 1991; H.O. Pörtner, P.L.M. van Dijk, I. Hardewig and A. Sommer, unpublished). The expression of enzymes with high activation energies may reflect the necessity to maintain a high enough enzyme concentration at low metabolic flux. This strategy would avoid large diffusion distances between enzyme molecules in the cold. It will also support reduced metabolic rates as seen in the Antarctic octopod (H.O. Pörtner, P.L.M. van Dijk, I. Hardewig and A. Sommer, unpublished).

4.5 Aerobic and anaerobic capacities of Antarctic cephalopods

Enzyme activities of aerobic and anaerobic metabolism were significantly higher in the mantle muscle of the squid *Psychroteuthis glacialis* than in the Antarctic octopods (Table 4). Driedzic et al. (1990) reported PFK, CS and ATPase activities in the hearts of decapod cephalopods which were higher than in octopods. These differences are related to the generally higher metabolic rate of squids compared to octopods (for example: Houlihan et al. 1982; Webber and O'Dor 1985, 1986; Finke et al. 1996; Seibel et al. 1997). Further comparison of enzyme activities shows, that with the exception of GP the activities are lower in the arm tissue of *Psychroteuthis glacialis* than in the mantle musculature and that the activities of several enzymes from the arm tissue of the squid are

even lower than in arm and mantle of the octopods (Table 4). This probably reflects the different life styles of squid and octopods. Squids use their mantle musculature for locomotion, whilst arms and tentacles are utilized in prey capture. In contrast, benthic octopods use their arms for locomotion when crawling, thus requiring a higher metabolic capacity in this tissue.

The activities of the glycolytic enzymes PFK and PK in Antarctic cephalopods (Table 4) appear to be lower than the respective values in Antarctic fish (PFK: 0.03 to 0.08 vs. 1.53 U g⁻¹ fresh weight, PK: 0.74 to 4.03 vs. 6.98 U g⁻¹ fresh weight in white muscle of *Notothenia gibberiformis*; Crockett and Sidell 1990). In contrast, activities of CS as a marker of aerobic capacity (Torres and Somero, 1988), were in the same range in the octopods *Pareledone charcoti* and *Pareledone polymorpha* (0.71 and 0.82 U g⁻¹ fresh weight, respectively) and in mesopelagic fishes *Bathylagus antarcticus* and *Cyclothone microdon* (0.36 U g⁻¹ fresh weight; Torres and Somero 1988). In the squid *Psychroteuthis glacialis* CS activity was considerably higher (6.89 U g⁻¹ fresh weight), indicating a higher aerobic capacity than in polar fishes.

Cold compensation in Notothenioidae led to a rise in aerobic lipid metabolism rather than carbohydrate catabolism and anaerobic pathways (Crockett and Sidell 1990). Maximal activities of CS and some enzymes of fatty acid oxidation were higher in polar species (Notothenioidea) than in temperate zone fish when measured at 1°C, while activities of PFK, PK and lactate dehydrogenase were depressed (Crockett and Sidell 1990). When enzyme activities are compared in octopods from Antarctica and lower latitudes it becomes evident, that the activities of ODH (anaerobic metabolism) and of GPDH, MDH and CS (aerobic metabolism) are lower in Antarctic species. For example, a CS activity of 2.2 U g⁻¹ fresh weight and a GPDH level of 0.9 U g⁻¹ fresh weight in *Pareledone charcoti* (analysed at 20°C) compares with activities of 4.4 U g⁻¹ fresh weight and 6.8 U g⁻¹ fresh weight in *Octopus macropus*, respectively (Baldwin 1982). It appears, that aerobic capacity is lower in polar octopods than in species from warmer environments and that anaerobic pathways are also not cold compensated. In contrast, ODH and CS activities in the mantle musculature of the Antarctic squid *Psychroteuthis glacialis* at 0°C (Table 4) are comparable to those in *Loligo opalescens* at 25°C (ODH: 82 vs. 132 U g⁻¹ fresh weight, CS: 6.9 vs. 8.0 U g⁻¹ fresh weight; Ballantyne et al. 1981), while activities of PFK, PK and GluDH (measured at 20°C) are lower than in *Loligo opalescens* (PFK: 4.4 vs. 27.1 U g⁻¹ fresh weight, PK: 39.2 vs. 142.4 U g⁻¹ fresh weight, GluDH: 0.6 vs. 2.9 U g⁻¹ fresh weight; 25°C; Ballantyne et al. 1981). These results indicate, that the aerobic capacity of Antarctic squid at its ambient temperature is close to the aerobic capacity of cephalopods of the temperate zone. In contrast to the picture prevailing for polar fish not only aerobic but also anaerobic pathways seem to be

partly cold compensated in *Psychroteuthis glacialis*. This difference between squid and octopods emphasizes the relevance of life style for the degree of metabolic cold compensation which is maximised in the active, pelagic squid.

Acknowledgements:

The excellent technical and logistical help by the staff of the Marine Biomedical Institute is gratefully acknowledged. We thank the captains and crews of RV 'Polarstern' during the expeditions ANT XIII/3 and ANT XIV/4. Special thanks go to Louise Allcock and Silke Steimer for their help in identifying Antarctic cephalopods during both 'Polarstern' cruises. Supported by grants of the Deutsche Forschungsgemeinschaft to HO Pörtner (Po 278).

Alfred-Wegener-Institut Publication No.

References

- Ansell A.D., P.R.O. Barnett, A. Bodoy, and H. Massé. 1980. Upper temperature tolerances of some European molluscs. I. *Tellina fabula* and *T. tenuis*. *Marine Biology* 58:33-39.
- Baldwin J. 1982. Correlations between enzyme profiles in cephalopod muscle and swimming behaviour. *Pacific Science* 36:349-356.
- Baldwin J. and W.R. England. 1980. A comparison of anaerobic energy metabolism in mantle and tentacle muscle of the blue-ringed octopus, *Hapalochlaena maculosa*, during swimming. *Australian Journal of Zoology* 28:407-412.
- Ballantyne J.S., P.W. Hochachka, and T.P. Mommsen. 1981. Studies on the metabolism of the migratory squid, *Loligo opalescens*: enzymes of tissues and heart mitochondria. *Marine Biology Letters* 2:75-85.
- Baumfalk Y.A. 1979. On the pumping activity of *Arenicola marina*. *Netherlands Journal of Sea Research* 13:422-427.
- Beis I. and E.A. Newsholme. 1975. The contents of adenine nucleotides, phosphagens and some glycolytic intermediates in resting muscles from vertebrates and invertebrates. *Biochemical Journal* 152:23-32.
- Bergmeyer H.U., J. Bergmeyer, and M. Graßl, eds. 1983-1986. *Methods of enzymatic analysis*. Verlag Chemie, Weinheim.
- Bradford M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72:248-254.
- Childress J.J. 1995. Are there physiological and biochemical adaptations of metabolism in deep-sea animals? *Trends in Ecology and Evolution* 10:30-36.
- Clarke A. 1988. Seasonality in the Antarctic marine environment. *Comparative Biochemistry and Physiology* 90B:461-473.
- Clarke M. and N. Goodall. 1994. Cephalopods in the diets of three odontocete cetacean species stranded at Tierra del Fuego, *Globicephala melaena* (Traill, 1809), *Hyperoodon planifrons* Flower, 1882 and *Cephalorhynchus commersonii* (Lacepede, 1804). In P.G. Rodhouse, U. Piatkowski, and C.C. Lu, eds. *Southern Ocean cephalopods: life cycles and populations*. *Antarctic Science* 6:149-154.
- Combs C.A. and W.R. Ellington. 1995. Graded intracellular acidosis produces extensive and reversible reductions in the effective free energy change of ATP hydrolysis in a molluscan muscle. *Journal of Comparative Physiology B* 165:203-212.
- Crockett E.L. and B.D. Sidell. 1990. Some pathways of energy metabolism are cold adapted in antarctic fishes. *Physiological Zoology* 63:472-488.

- Dahlhoff E. and G.N. Somero. 1993. Kinetic and structural adaptations of cytoplasmic malate dehydrogenases of eastern pacific abalone (genus *Haliotis*) from different thermal habitats: biochemical correlates of biogeographic patterning. *Journal of Experimental Biology* 185:137-150.
- Doumen C. and W.R. Ellington. 1990. Mitochondrial arginine kinase from the heart of the horseshoe crab, *Limulus polyphemus* I. Physico-chemical properties and nature of interaction with the mitochondrion. *Journal of Comparative Physiology B* 160:449-457.
- Dragovich A. and J.A. Kelly jr. 1962. A biological study and some economic aspects of squid in Tampa Bay, Florida. *Proceedings of the Gulf and Caribbean Fisheries Institute* 15:87-103.
- Driedzic W.R., B.D. Sidell, J.M. Stewart, and I.A. Johnston. 1990. Maximal activities of enzymes of energy metabolism in cephalopod systemic and branchial hearts. *Physiological Zoology* 63:615-629.
- Filippova J.A. and E.A. Pakhomov. 1994. Young squid in the plankton of Prydz Bay, Antarctica. In P.G. Rodhouse, U. Piatkowski, and C.C. Lu, eds. *Southern Ocean cephalopods: life cycles and populations*. *Antarctic Science* 6:171-173.
- Finke E., H.O. Pörtner, P.G. Lee, and D.M. Webber. 1996. Squid (*Lolliguncula brevis*) life in shallow waters: oxygen limitation of metabolism and performance. *Journal of Experimental Biology* 199:911-921.
- Goldberg A.L. and J.F. Dice. 1974. Intracellular protein degradation in mammalian and bacterial cells. *Annual Review of Biochemistry* 43:835-869.
- Grieshaber M., E. Kronig, and R. Koormann. 1978. A photometric estimation of phospho-L-arginine, arginine and octopine using homogenous octopine dehydrogenase isoenzyme 2 from the squid *Loligo vulgaris* Lam. *Hoppe-Seyler's Zeitschrift für physiologische Chemie* 359:133-136.
- Hain S. 1990. Die beschalteten benthischen Mollusken (Gastropoda und Bivalvia) des Weddellmeeres, Antarktis. *Berichte zur Polarforschung* 70:181 pp
- Hardewig I., A.D.F. Addink, M.K. Grieshaber, H.O. Pörtner, and G. van den Thillart. 1991. Metabolic rates at different oxygen levels determined by direct and indirect calorimetry in the oxyconformer *Sipunculus nudus*. *Journal of Experimental Biology* 157:143-160.
- Hendrix jr J.P., W.H. Hulet, and M.J. Greenberg. 1981. Salinity tolerance and the responses to hypoosmotic stress of the bay squid *Lolliguncula brevis*, a euryhaline cephalopod mollusc. *Comparative Biochemistry and Physiology* 89A:641-648.

- Houlihan D.G., A.J. Innes, M.J. Wells, and J. Wells. 1982. Oxygen consumption and blood gases of *Octopus vulgaris* in hypoxic conditions. *Journal of Comparative Physiology* 148:35-40.
- Johnston I.A. 1990. Cold adaptation in marine organisms. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B* 326:655-667.
- Johnston I.A. and G. Goldspink. 1975. Thermodynamic activation parameters of fish myofibrillar ATPase enzyme and evolutionary adaptations to temperature. *Nature* 257:620-622.
- Johnston I.A., A. Clarke, and P. Ward. 1991. Temperature and metabolic rate in sedentary fish from the Antarctic, North Sea and Indo-West Pacific ocean. *Marine Biology* 109:191-195.
- Kaletha K. and A. Skladanoski. 1981. Effect of temperature on the activity of AMP deaminase from chicken heart and skeletal muscle at different stages of development. *Experientia* 37:232-234.
- Kammermeier H. 1987. High energy phosphate of the myocardium: concentration versus free energy change. *Basic Research Cardiology* 82 Supplement 2:31-36.
- Kristensen E. 1983. Ventilation and oxygen uptake by three species of *Nereis* (Annelida: Polychaeta) II. Effects of temperature and salinity changes. *Marine Ecology Progress Series* 12:299-306.
- Kubodera T. and T. Okutani. 1994. Eledonine octopods from the Southern Ocean: systematics and distribution. In P.G. Rodhouse, U. Piatkowski, and C.C. Lu, eds. *Southern Ocean cephalopods: life cycles and populations*. *Antarctic Science* 6:205-214.
- Kuehl S. 1988. A contribution to the reproductive biology and geographical distribution of Antarctic Octopodidae (Cephalopoda). *Malacologia* 29:89-100.
- Kwast K.E. and S.C. Hand. 1996. Oxygen and pH regulation of protein synthesis in mitochondria from *Artemia franciscana* embryos. *Biochemical Journal* 313:207-213.
- Low P.S. and G.N. Somero. 1976. Adaptation of muscle pyruvate kinases to environmental temperatures and pressures. *Journal of Experimental Zoology* 198:1-12.
- Moon T.W. and K.B. Storey. 1975. The effects of temperature and hydrostatic pressure on enzymes of an abyssal fish, *Antimora rostrata*: liver NADP-linked isocitrate dehydrogenase. *Comparative Biochemistry and Physiology* 52B:51-57.
- Nemoto T., M. Okiyama, and M. Takahashi. 1985. Aspects of the roles of squid in food chains of marine Antarctic ecosystems. Pp. 415-420 in W.R. Siegfried, P.R. Condy, and L.M. Laws, eds. *Antarctic nutrient cycles and food webs*. Springer Verlag Berlin Heidelberg.

- Neverauskas V.P. and A.J. Butler. 1982. Tolerance of blue crab, *Portunus pelagicus* (L), to high temperature. Transaction of the Royal Society of South Australia 106:215-216.
- Packard A. 1972. Cephalopods and fish: the limits of convergence. Biological Reviews 47:241-307.
- Peck L.S. 1989. Temperature and basal metabolism in two Antarctic marine herbivores. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology 127:1-12.
- Pette D. and H. Reichmann. 1982. A method for quantitative extraction of enzymes and metabolites from tissue samples in the milligram range. Journal of Histochemistry & Cytochemistry 30:401-402.
- Pörtner H.O. 1987a. Contributions of anaerobic metabolism to pH regulation in animal tissues: theory. Journal of Experimental Biology 131:69-87.
- Pörtner H.O. 1987b. Anaerobic metabolism and changes in acid-base status: quantitative interrelationships and pH regulation in the marine worm *Sipunculus nudus*. Journal of Experimental Biology 131:89-105.
- Pörtner H.O. 1990. Determination of intracellular buffer values after metabolic inhibition by fluoride and nitrilotriacetic acid. Respiration Physiology 81:275-288.
- Pörtner H.O. 1993. Multicompartmental analyses of acid-base and metabolic homeostasis during anaerobiosis: Invertebrate and lower vertebrate examples. Pp. 139-156 in P.W. Hochachka, P.L. Lutz, T. Sick, M. Rosenthal, and G. van den Thillart, eds. Surviving hypoxia: mechanisms of control and adaption. CRC Press, Boca Raton Fl, USA.
- Pörtner H.O. 1997. Oxygen limitation of metabolism and performance in pelagic squid. Proceedings of the 30th European Marine Biological Symposium, pp. 45-56
- Pörtner H.O. and S. Zielinski. 1999. Environmental constraints and the physiology of performance in squid. CIAC Symposium proceedings, Cape Town, South African Journal of Marine Science. in press.
- Pörtner H.O., R.G. Boutilier, Y. Tang, and D.P. Toews DP (1990) Determination of intracellular pH and P_{CO_2} after metabolic inhibition by fluoride and nitrilotriacetic acid. Respiration Physiology 81:255-274.
- Pörtner H.O., D.M. Webber, R.G. Boutilier and R.K. O'Dor. 1991. Acid-base regulation in exercising squid (*Illex illecebrosus*, *Loligo pealeii*). American Journal of Physiology 261:R239-R246
- Pörtner H.O., E. Finke, and P.G. Lee. 1996. Effective Gibb's free-energy change of ATP hydrolysis and metabolic correlates of intracellular pH in progressive fatigue of squid (*Lolliguncula brevis*) mantle muscle. American Journal of Physiology 271: R1403-R1414

- Pörtner H.O., I. Hardewig, F.J. Sartoris, and P.L.M. van Dijk. 1998. Energetic aspects of cold adaptation: critical temperatures in metabolic, ionic and acid-base regulation. Pp. 88-120 in H.O. Pörtner and R.C. Playle, eds. Cold ocean physiology. Cambridge University Press, Cambridge.
- Pörtner H.O., L. Peck, S. Zielinski, and L.Z. Conway. 1999. Intracellular pH and energy metabolism in the highly stenothermal Antarctic bivalve *Limopsis marionensis* as a function of ambient temperature. Polar Biology. in press.
- Prosser C.L. 1991. Temperature. Pp. 109-165 in C.L. Prosser, ed. Environmental and metabolic animal physiology. Wiley-Liss, New York.
- Rechsteiner M., S. Rogers, K. Rote. 1987. Protein structure and intracellular stability. Trends in Biochemical Science 12:390-394.
- Reeves R.B. 1972. An imidazole alphastat hypothesis for vertebrate acid-base-regulation: tissue carbon dioxide content and body temperature in bullfrogs. Respiration Physiology 81:255-274.
- Rodhouse P.G. 1989. Pelagic cephalopods caught by nets during the Antarctic research cruises of the 'Polarstern' and 'Walther Herwig', 1985-1987. Archiv für Fischereiwissenschaft 39 Beiheft 1:111-121.
- Rodhouse P.G. and P.A. Prince. 1993. Cephalopod prey of the black-browed albatross *Diomedea melanophrys* at South Georgia. Polar Biology 13:373-376.
- Roper C.F.E., M.J. Sweeney, and C.E. Nauen. 1984. FAO species catalogue. Vol. 3: Cephalopods of the world. An annotated and illustrated catalogue of species of interest to fisheries. FAO Fisheries synopses 125.
- Sartoris F.J. and H.O. Pörtner. 1997. Temperature dependence of ionic and acid-base regulation in boreal and arctic *Crangon crangon* and *Pandalus borealis*. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology 211:69-83.
- Seibel B.A., E.V. Thuesen, J.J. Childress, and L.A. Gorodezky. 1997. Decline in pelagic cephalopod metabolism with habitat depth reflects differences in locomotory efficiency. Biological Bulletin 192:262-278.
- Seymour M.K. 1972. Effects of temperature change on irrigation rate in *Arenicola marina* (L.). Comparative Biochemistry and Physiology 43A:553-564.
- Shaklee J.B., J.A. Christiansen, B.D. Sidell, C.L. Prosser, and G.S. Whitt. 1977. Molecular aspects of temperature acclimation in fish: contributions of changes in enzyme activities and isozyme pattern in metabolic reorganization in the green sunfish. Journal of Experimental Zoology 201:1-20.
- Sidell B.D., W.R. Driedzic, D.B. Stowe, and I.A. Johnston. 1987. Biochemical correlations of power development and metabolic fuel preferenda in fish hearts. Physiological Zoology 60:221-232.

- Somero G.N. 1991. Biochemical mechanisms of cold adaptation and stenothermality in Antarctic fish. Pp. 232-247 in G. di Prisco, B. Maresca, and B. Tota, eds. *Biology of Antarctic fishes*. Springer-Verlag, Berlin.
- Somero G.N. 1996. Temperature and proteins: little things can mean a lot. *News in Physiological Science* 11:72-77.
- Somero G.N. 1997. Temperature relationships: from molecules to biogeography. Pp. 1391-1444 in W.H. Dantzler, ed. *Handbook of Physiology*. Section 13: Comparative Physiology. Oxford University Press, New York, Oxford.
- Somero G.N. and A.L. DeVries. 1967. Temperature tolerance of some antarctic fishes. *Science* 156:257-258.
- Sommer A., B. Klein, and H.O. Pörtner. 1997. Temperature induced anaerobiosis in two populations of the polychaete worm *Arenicola marina* (L.). *Journal of Comparative Physiology B* 167:25-35.
- Southward A.J., S.J. Hawkins, and M.T. Burrows. 1995. Seventy years' observations of changes in distribution and abundance of zooplankton and intertidal organisms in the western English channel in relation to rising sea temperature. *Journal of Thermal Biology* 20:127-155.
- Storey K.B., J.H.A. Fields, and P.W. Hochachka. 1978. Purification and properties of glutamate dehydrogenase from the mantle muscle of the squid, *Loligo pealeii*. Role of the enzyme in energy production from amino acids. *Journal of Experimental Zoology* 205:111-118.
- Torres J.J. and G.N. Somero. 1988. Metabolism, enzymic activities and cold adaptation in Antarctic mesopelagic fishes. *Marine Biology* 98:169-180.
- van Thoai N. and Y. Robin. 1959. Métabolisme des dérivés guanidylés. VIII. Biosynthese de l'octopine et répartition de l'enzyme opérant chez les invertébrés. *Biochimica et Biophysica Acta* 35:446-453.
- Vetter R.A.H. 1995. Ecophysiological studies on citrate-synthase: (I) Enzyme regulation of selected crustaceans with regard to temperature adaptation. *Journal of Comparative Physiology B* 165:46-55.
- Vosjan J.H. and K.M. Olanczuk-Neyman. 1991. Influence of temperature on respiratory ETS-activity of micro-organisms from Admiralty Bay, King George Island, Antarctica. *Netherlands Journal of Sea Research* 28:221-225.
- Voss G.L. 1956. A review of the cephalopods of the Gulf of Mexico. *Bulletin of Marine Science of the Gulf and the Caribbean* 6:85-178.
- Voss G.L. 1988. The biogeography of the deep-sea octopoda. *Malacologia* 29:295-307.

- Walsh P.J. 1981. Purification and characterization of glutamate dehydrogenases from three species of sea anemones: adaptation to temperature within and among species from different thermal environments. *Marine Biology Letters* 2:289-299.
- Webber D.M. and R.K. O'Dor. 1985. Respiration and swimming performance of short-finned squid (*Illex illecebrosus*). *North Atlantic Fisheries Organization Science Council Studies* 9:133-138.
- Webber D.M. and R.K. O'Dor. 1986. Monitoring the metabolic rate and activity of free-swimming squid with telemetered jet pressure. *Journal of Experimental Biology* 126:203-224.
- Wells M.J., R.T. Hanlon, P.G. Lee, and F.P. Dimarco. 1988. Respiratory and cardiac performance in *Lolliguncula brevis* (Cephalopoda, Myopsida): the effects of activity, temperature and hypoxia. *Journal of Experimental Biology* 138:17-36.
- Yeager D.P. and G.R. Ullsch. 1989. Physiological regulation and conformation: a BASIC program for the determination of critical points. *Physiological Zoology* 62:888-907.
- Zielinski S. and H.O. Pörtner. 1996. Energy metabolism and ATP free-energy change of the intertidal worm *Sipunculus nudus* below a critical temperature. *Journal of Comparative Physiology B* 166:492-500.

Table 1 Concentration of several metabolites ($\mu\text{mol g}^{-1}$ fresh weight) as well as the ratio of the levels of phospho-L-arginine over the sum of PLA and L-arginine concentrations in the mantle musculature of *Pareledone charcoti* and *Lolliguncula brevis* at control temperatures and the respective highest incubation temperature (* - significantly different from control values; values are given as means \pm SD; for further metabolites see Figs. 2 and 3).

	<i>Lolliguncula brevis</i>		<i>Pareledone charcoti</i>	
	21°C (n = 5)	31°C (n = 5)	0°C (n = 7)	10°C (n = 4)
ADP	1.52 \pm 0.21	2.12 \pm 0.69	0.81 \pm 0.34	0.96 \pm 0.54
AMP	0.58 \pm 0.13	0.51 \pm 0.19	0.19 \pm 0.15	0.79 \pm 0.46*
Σ [Ade]	6.18 \pm 0.23	5.28 \pm 0.87	4.23 \pm 0.32	3.52 \pm 0.95
P _i	13.09 \pm 2.26	27.43 \pm 3.87*	8.61 \pm 5.16	13.58 \pm 8.07
L-Arg	13.11 \pm 1.87	18.42 \pm 2.19*	14.51 \pm 5.96	27.85 \pm 7.46*
Σ [L-Arg]	30.89 \pm 4.96	31.64 \pm 4.94	39.45 \pm 5.69	32.26 \pm 13.18
Octopine	1.28 \pm 0.94	11.18 \pm 6.46*	0.38 \pm 0.41	0.58 \pm 0.49
Succinate	0.27 \pm 0.11	0.43 \pm 0.25	0.82 \pm 0.16	0.62 \pm 0.22
Acetate	0.15 \pm 0.10	0.34 \pm 0.12	0.19 \pm 0.18	0.59 \pm 0.42*
[PLA]/[PLA]+[L-Arg]	0.57 \pm 0.11	0.10 \pm 0.07*	0.63 \pm 0.11	0.27 \pm 0.10*

88

Table 2 Mean concentration changes ($\mu\text{mol g}^{-1}$ fresh weight) of metabolites and associated H^+ quantities in the mantle musculature of *Lolliguncula brevis* and of *Pareledone charcoti* after exposure to high temperatures. Concentration changes were calculated between values just below and above the respective critical temperature. α -stat $\Delta\text{H}^+_{\text{non-resp}}$ gives the value of theoretically generated protons during temperature transition from 26 to 31°C or 8 to 10°C, respectively, when intracellular pH follows the alphastat-pattern.

	<i>Lolliguncula brevis</i>		<i>Pareledone charcoti</i>	
	concentration changes (26 - 31°C)	mean $\Delta\text{H}^+_{\text{met}}$ (26 - 31°C)	concentration changes (8 - 10°C)	mean $\Delta\text{H}^+_{\text{met}}$ (8 - 10°C)
Octopine	+ 10.60	+ 10.60	+ 0.46	+ 0.40
Acetate	+ 0.13	+ 0.13	+ 0.59	+ 0.59
Succinate	+ 0.19	+ 0.38	+ 0.06	+ 0.12
ATP	- 1.84	+ 0.79	- 1.94	+ 1.07
Phospho-L-arginine	- 12.70	- 9.85	- 16.55	- 2.39
$\Delta\text{H}^+_{\text{met}}$:		+ 2.05		- 0.21
$\Delta\text{H}^+_{\text{non-resp}}$:		+ 7.20		+ 2.41
Discrepancy:		- 5.15		- 2.62
α -stat $\Delta\text{H}^+_{\text{non-resp}}$:		+ 3.07		+ 0.92

Table 3 Enzyme activities (U g^{-1} fresh weight) in mantle, arm and gill tissues of *Pareledone charcoti* after exposure to different temperatures for 24 h. (All activities determined at 0°C ; * - significantly different from animals incubated at 0°C ; $n = 4$; values are given as means \pm SD; for further enzymes see Fig. 6)

		-1.8°C	0°C	4°C	6°C	8°C	10°C
PFK	Mantle	0.20 ± 0.07	0.12 ± 0.04	0.14 ± 0.02	0.20 ± 0.06	0.17 ± 0.03	0.09 ± 0.06
	Arms	0.09 ± 0.03	0.07 ± 0.02	0.09 ± 0.03	0.08 ± 0.02	0.09 ± 0.04	0.05 ± 0.01
	Gills	0.04 ± 0.02	0.04 ± 0.02	0.03 ± 0.02	0.04 ± 0.01	0.05 ± 0.03	0.02 ± 0.01
PK	Arms	3.02 ± 0.45	2.92 ± 0.38	3.14 ± 0.54	2.66 ± 0.16	3.41 ± 0.26	2.94 ± 0.09
	Gills	1.63 ± 0.64	0.79 ± 0.13	1.51 ± 0.24	1.61 ± 0.26	1.01 ± 0.48	1.21 ± 0.71
CS	Mantle	1.68 ± 0.45	1.36 ± 0.38	1.52 ± 0.26	1.70 ± 0.45	1.33 ± 0.25	1.10 ± 0.15
	Arms	1.01 ± 0.16	0.66 ± 0.12	0.66 ± 0.12	0.83 ± 0.11	0.84 ± 0.10	0.68 ± 0.05
	Gills	0.85 ± 0.23	0.75 ± 0.07	0.99 ± 0.26	0.96 ± 0.25	0.80 ± 0.22	0.57 ± 0.10
GAPDH	Arms	2.28 ± 1.02	2.55 ± 0.76	2.99 ± 0.71	2.56 ± 0.68	2.92 ± 1.12	3.59 ± 0.78
	Gills	1.53 ± 0.37	1.18 ± 0.10	0.56 ± 0.18	1.37 ± 0.23	1.53 ± 0.47	0.96 ± 0.54
GPDH	Mantle	0.59 ± 0.17	0.55 ± 0.13	0.43 ± 0.13	0.42 ± 0.15	0.49 ± 0.14	0.48 ± 0.13
	Arms	0.39 ± 0.10	0.25 ± 0.03	0.24 ± 0.03	0.25 ± 0.05	$0.73 \pm 0.48^*$	0.30 ± 0.11
	Gills	0.85 ± 0.11	0.58 ± 0.09	0.74 ± 0.31	0.69 ± 0.22	0.62 ± 0.10	$0.28 \pm 0.09^*$
GluDH	Arms	0.08 ± 0.03	0.03 ± 0.01	0.02 ± 0.01	0.05 ± 0.00	0.07 ± 0.03	0.05 ± 0.03
GP	Arms	0.29 ± 0.06	0.27 ± 0.04	0.31 ± 0.02	0.26 ± 0.04	0.28 ± 0.08	0.33 ± 0.06

Table 4 Activities (U g^{-1} fresh weight) of enzymes of various metabolic pathways in mantle and arm musculature of Antarctic cephalopods measured at 0°C . (*P. charcoti*: n = 5; *P. polymorpha*: n = 4; *P. glacialis*: n = 5-6; * - significantly different from levels in the same tissue of *P. charcoti* and *P. polymorpha*; + - significantly different from levels in the same tissue of *P. charcoti*; ° - significantly different from levels in mantle tissue of the same species; values are given as means \pm SD)

	<i>Pareledone charcoti</i>		<i>Pareledone polymorpha</i>		<i>Psychroteuthis glacialis</i>	
	Mantle	Arms	Mantle	Arms	Mantle	Arms
PFK	0.03 ± 0.01	0.04 ± 0.01	0.03 ± 0.03	$0.01 \pm 0.01^+$	$0.08 \pm 0.02^*$	$0.01 \pm 0.00^{+\circ}$
PK	2.47 ± 0.65	2.78 ± 0.70	$0.74 \pm 0.18^+$	$1.47 \pm 0.06^{+\circ}$	$4.03 \pm 0.36^*$	$0.66 \pm 0.09^{*\circ}$
CS	0.71 ± 0.06	0.64 ± 0.09	0.82 ± 0.11	$0.33 \pm 0.08^{+\circ}$	$6.89 \pm 1.08^*$	$0.38 \pm 0.24^{+\circ}$
GAPDH	1.85 ± 0.17	2.05 ± 0.36	$1.03 \pm 0.02^+$	1.66 ± 0.79	$2.05 \pm 0.61^*$	$0.53 \pm 0.05^{*\circ}$
GPDH	0.69 ± 0.15	$0.43 \pm 0.14^\circ$	$0.20 \pm 0.07^+$	$0.31 \pm 0.01^\circ$	$0.41 \pm 0.07^+$	$0.15 \pm 0.02^{*\circ}$
GluDH	0.02 ± 0.01	0.02 ± 0.01	0.02 ± 0.00	0.01 ± 0.00	$0.13 \pm 0.02^*$	$0.01 \pm 0.01^\circ$
GP	0.04 ± 0.01	$0.12 \pm 0.05^\circ$	0.06 ± 0.03	$0.06 \pm 0.01^+$	$0.19 \pm 0.01^*$	$0.40 \pm 0.08^{*\circ}$
ODH	7.67 ± 2.09	$12.83 \pm 4.15^\circ$	$4.70 \pm 1.90^+$	$6.38 \pm 1.05^+$	$82.26 \pm 45.62^*$	$2.21 \pm 1.83^{*\circ}$
MDH	6.54 ± 2.58	5.43 ± 3.51	$2.25 \pm 0.81^+$	$1.19 \pm 0.10^{+\circ}$	$36.58 \pm 10.72^*$	$3.16 \pm 1.24^{+\circ}$
AK	11.08 ± 2.33	9.68 ± 6.09	$5.17 \pm 1.32^+$	$4.38 \pm 0.81^+$	$19.52 \pm 2.59^*$	$11.68 \pm 3.94^{+\circ}$

Table 5 Activation energy (Ea) and Q₁₀ values for enzymes of various metabolic pathways extracted from mantle and arm tissue of *Pareledone charcoti* (n = 5), *Pareledone polymorpha* (n = 4) and *Psychroteuthis glacialis* (n = 5-6)* - significantly different from Ea values in the same tissue of *P. charcoti* and *P. glacialis*; + - significantly different to Ea values in the same tissue of *P. glacialis*; • - significantly different to Ea values in the same tissue of *P. polymorpha*; ° - significantly different to Ea values in the mantle musculature of the same species; values are given as means ± SD)

Enzyme	Tissue	<i>Pareledone charcoti</i>			<i>Pareledone polymorpha</i>			<i>Psychroteuthis glacialis</i>		
		T Range (°C)	Q ₁₀	Ea (kJ mol ⁻¹)	T Range (°C)	Q ₁₀	Ea (kJ mol ⁻¹)	T Range (°C)	Q ₁₀	Ea (kJ mol ⁻¹)
PFK	Mantle	0 - 20	8.8 ± 1.5	94.88 ± 5.97	0 - 30	3.8 ± 1.1	54.79 ± 6.93*	0 - 20	7.6 ± 2.1	89.41 ± 9.23
	Arms	0 - 20	8.4 ± 0.9	93.46 ± 3.43 ⁺	0 - 20	8.2 ± 2.7	91.48 ± 10.68°	0 - 20	6.1 ± 1.1	82.41 ± 6.47
PK	Mantle	0 - 30	2.4 ± 0.0	45.18 ± 0.35 ⁺	0 - 10	2.9 ± 0.1	68.07 ± 2.38*	0 - 20	3.1 ± 0.2	60.84 ± 1.60
	Arms	0 - 30	2.4 ± 0.2	45.38 ± 2.04	0 - 20	2.3 ± 0.2	50.77 ± 3.61*°	0 - 30	2.2 ± 0.3	43.37 ± 2.75°
CS	Mantle	0 - 30	1.6 ± 0.1	36.12 ± 1.80	0 - 30	1.8 ± 0.3	38.00 ± 0.20 ⁺	0 - 30	1.6 ± 0.0	35.86 ± 0.54
	Arms	0 - 30	1.5 ± 0.1	34.13 ± 0.80 [•]	0 - 30	1.7 ± 0.0	36.55 ± 0.54°	0 - 30	1.5 ± 0.2	34.96 ± 2.15
GAPDH	Mantle	0 - 30	2.1 ± 0.2	42.12 ± 2.25	0 - 30	2.3 ± 0.1	44.10 ± 1.43	0 - 30	2.1 ± 0.2	41.55 ± 2.52
	Arms	0 - 30	2.2 ± 0.1	43.60 ± 1.15 ⁺	0 - 30	2.4 ± 0.2	44.64 ± 2.21 ⁺	0 - 10	1.6 ± 0.1	31.17 ± 5.57°
GPDH	Mantle	0 - 30	1.7 ± 0.3	37.05 ± 4.62	0 - 30	2.3 ± 0.2	44.17 ± 1.99*	0 - 30	1.5 ± 0.2	34.86 ± 3.02
	Arms	0 - 30	1.8 ± 0.2	38.53 ± 2.73 ⁺	0 - 30	2.0 ± 0.1	40.71 ± 0.57 [°]	0 - 20	2.2 ± 0.4	48.16 ± 5.47°
GluDH	Mantle	0 - 20	6.1 ± 2.2	80.98 ± 13.63 ⁺	0 - 30	1.9 ± 0.3	40.14 ± 3.55*	0 - 30	1.4 ± 0.3	31.97 ± 5.00
	Arms	0 - 30	2.0 ± 0.9	38.26 ± 12.38 [°]	0 - 30	2.0 ± 0.5	39.93 ± 6.40 ⁺	0 - 20	5.9 ± 2.6	79.15 ± 15.73°
GP	Mantle	0 - 30	1.7 ± 0.3	38.66 ± 6.40	0 - 30	1.9 ± 0.4	39.57 ± 4.37	0 - 20	2.1 ± 0.3	46.66 ± 4.22
	Arms	0 - 30	1.9 ± 0.3	39.02 ± 3.68 [•]	0 - 20	3.3 ± 0.5	61.87 ± 5.64°	0 - 30	0.7 ± 0.1	36.88 ± 25.80

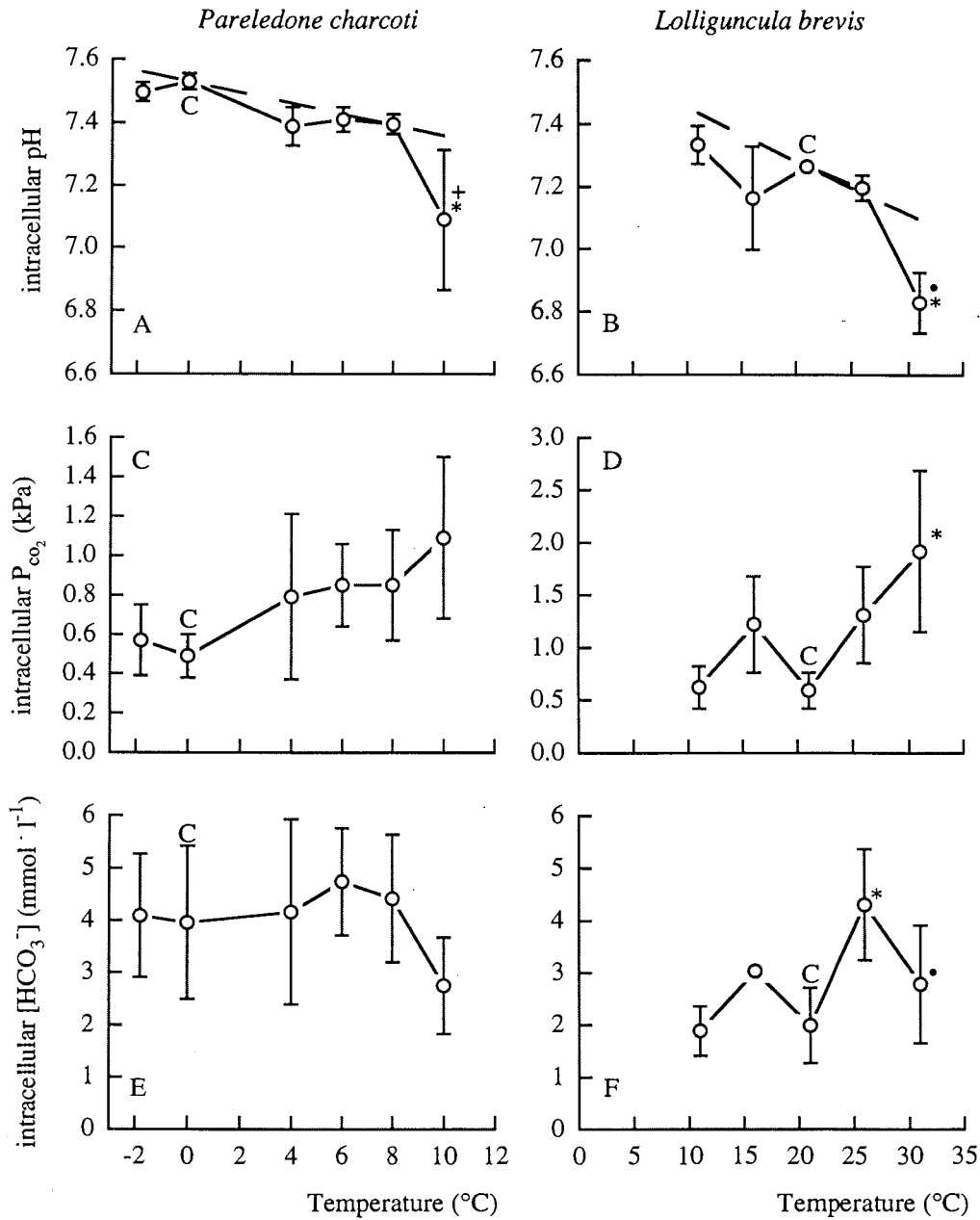


Fig. 1 (A, B) Intracellular pH, (C, D) intracellular P_{co2} and (E, F) intracellular bicarbonate concentration in the mantle musculature after incubation at various temperatures for 24 hours in *Pareledone charcoti* and for one hour in *Lolliguncula brevis*. For *Pareledone charcoti* a $\Delta\text{pH}/\Delta\text{T}$ slope of -0.017 results in the temperature range between 0 and 8°C. Dashed lines indicate pH changes according to alphastat-pattern. (C - control value; * - significantly different from control value; + - significantly different from value at 8°C; • - significantly different from value at 10°C; *P. charcoti*: n = 4 except 0°C: n = 7; *L. brevis*: n = 5; values are means ± SD)

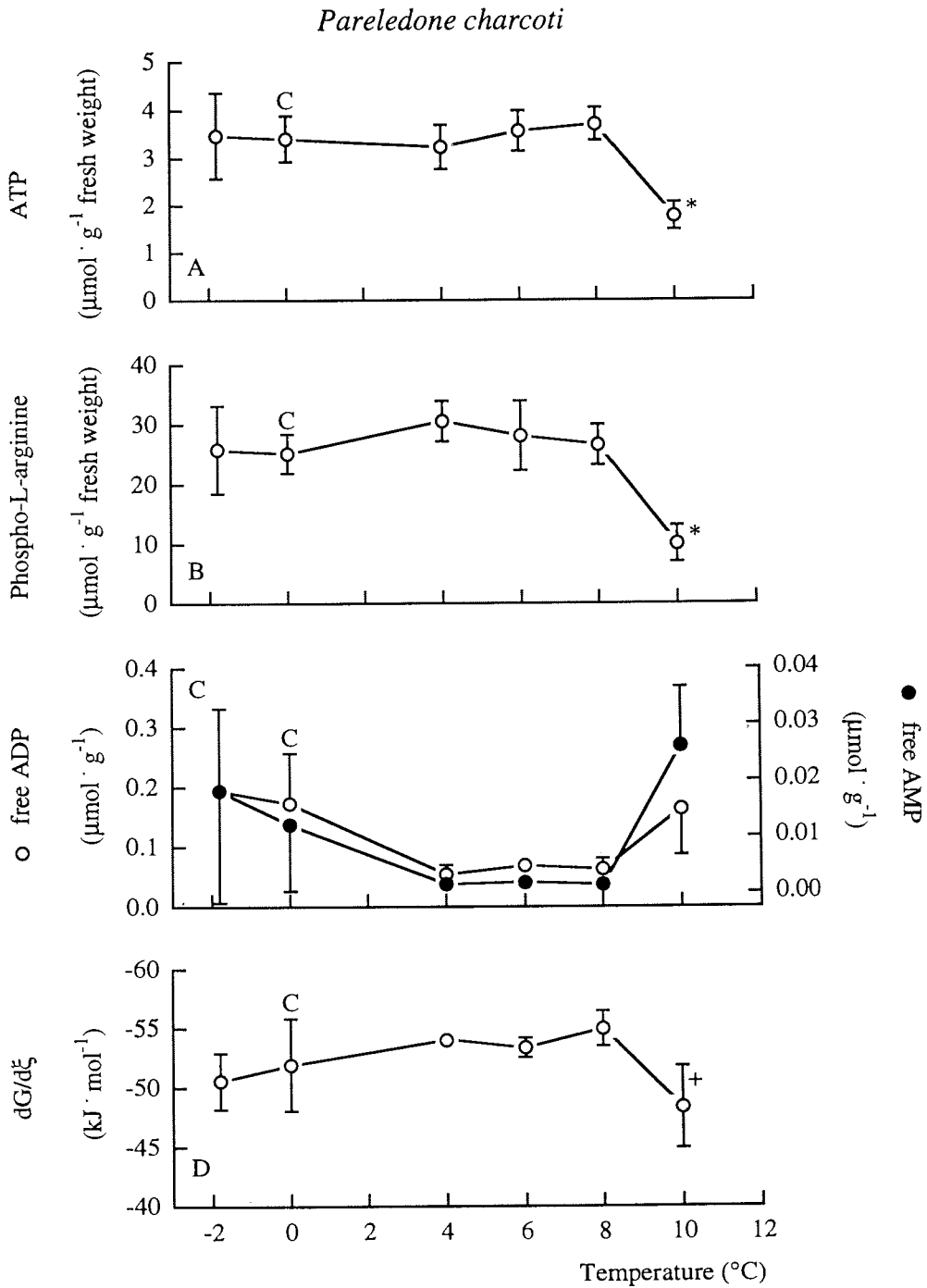


Fig. 2 The concentrations of (A) ATP, (B) phospho-L-arginine and (C) free ADP and AMP as well as (D) the Gibb's free energy change of ATP hydrolysis in the mantle musculature of the Antarctic octopus *Pareledone charcoti* after 24 hour incubation at different temperatures. (C - control value; * - significantly different from control value; + - significantly different from value at 8°C; n = 4 except 0°C: n = 7; values are means ± SD)

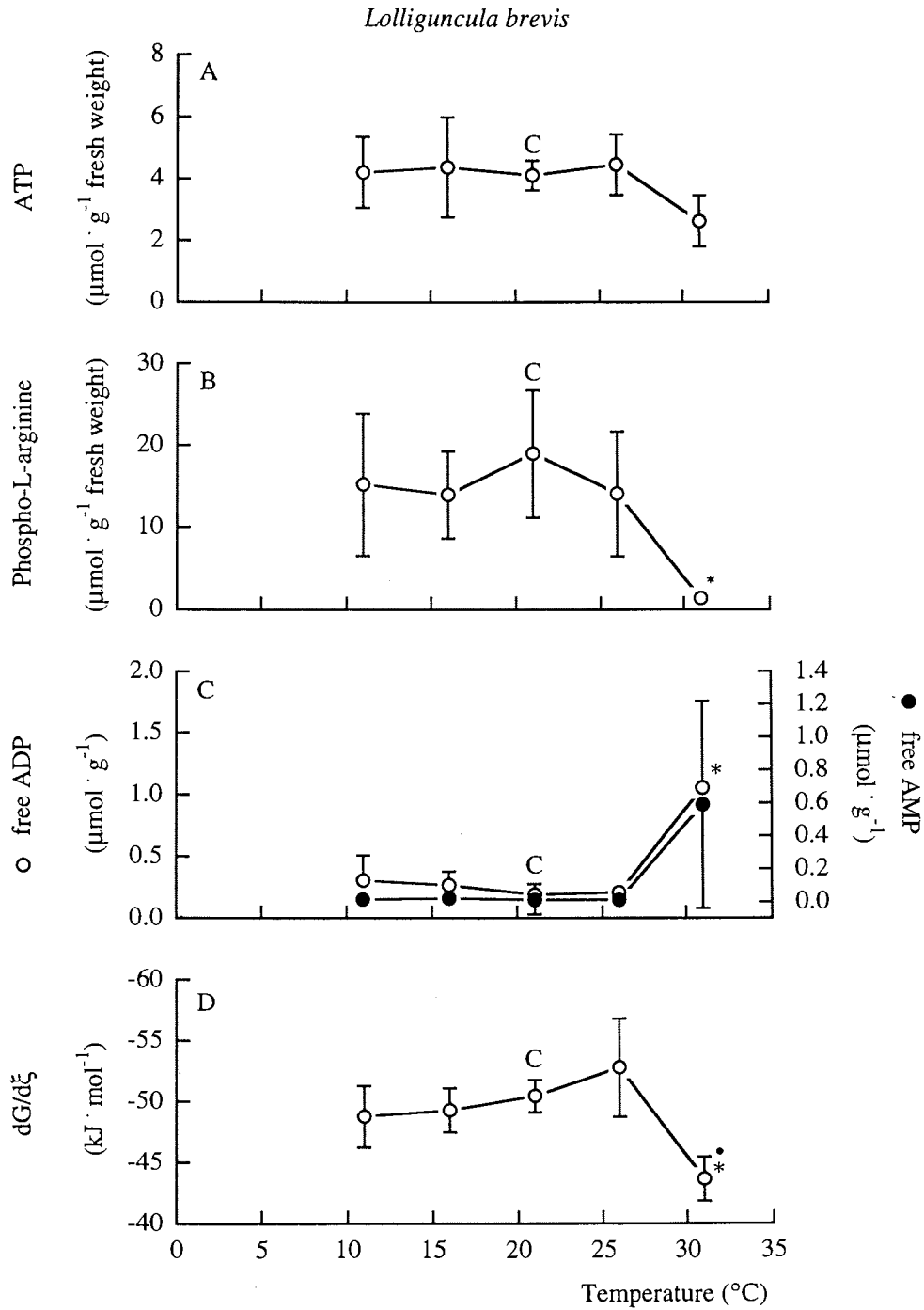


Fig. 3 Influence of temperature on the levels of (A) ATP, (B) phospho-L-arginine, (C) free ADP and free AMP and (D) the Gibb's free energy change of ATP hydrolysis in the mantle musculature of the squid *Lolliguncula brevis*. (C - control value; * - significantly different from control value; • - significantly different from value at 26°C; n = 5; values are means ± SD)

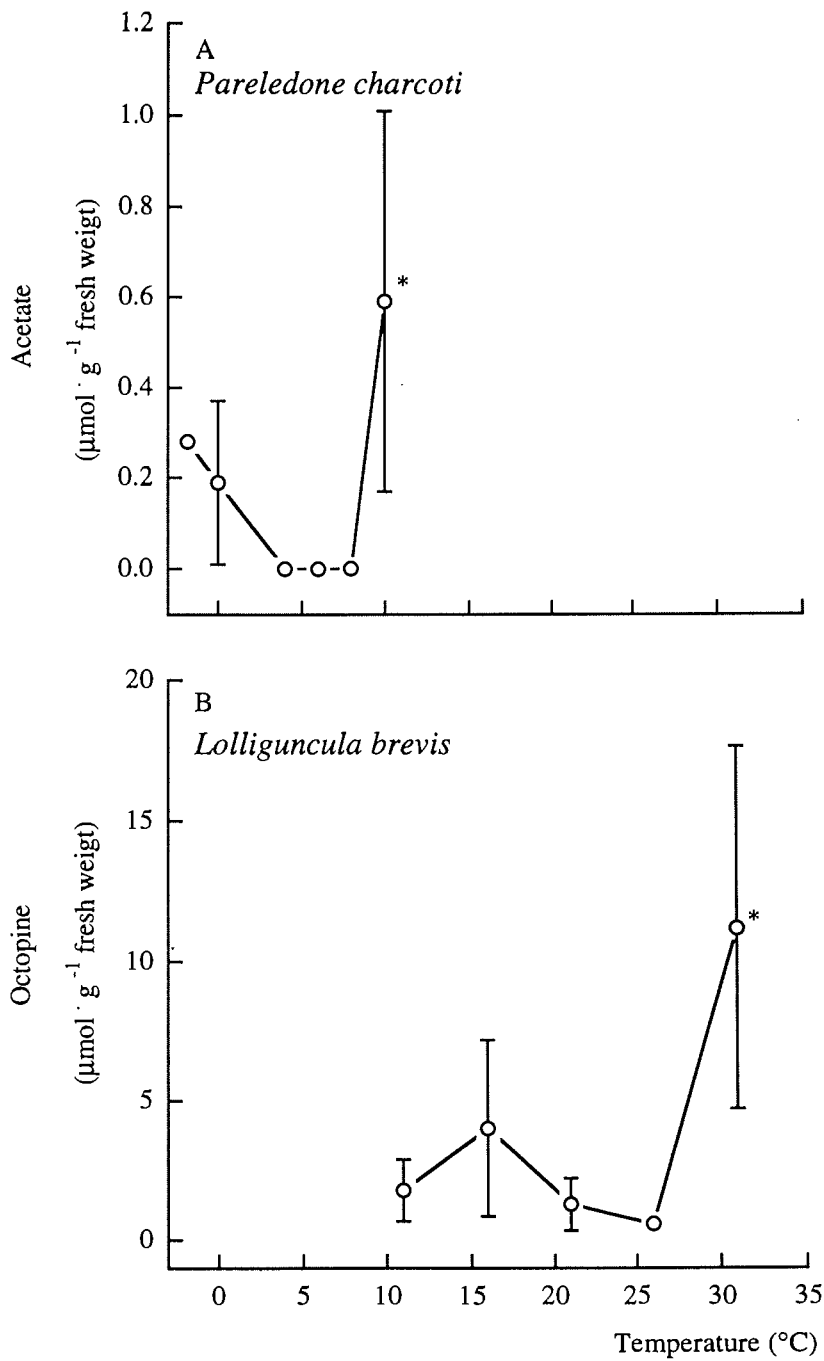


Fig. 4 Levels of (A) acetate in the mantle musculature of *Pareledone charcoti* and the concentration of (B) octopine in the mantle musculature of *Lolliguncula brevis* after exposure to different temperatures. (C - control value; * - significantly different from control value; *P. charcoti*: n = 4 except at 0°C when n = 7; *L. brevis*: n = 5; values are means ± SD)

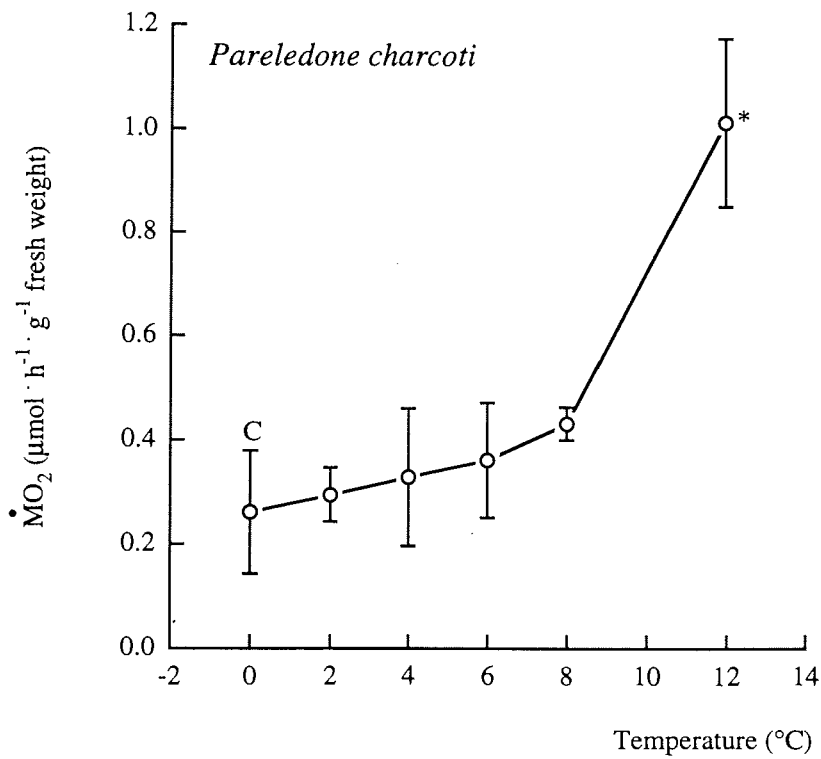


Fig. 5 Oxygen consumption of *Pareledone charcoti* during incubation at different temperatures. Both animals showed the same rate of $\dot{M}O_2$ at 0°C and up to 4°C when one specimen died from an accident in the system. (C - control value; * - significantly different from control value; values are means \pm SD of 4 to 9 measurements)

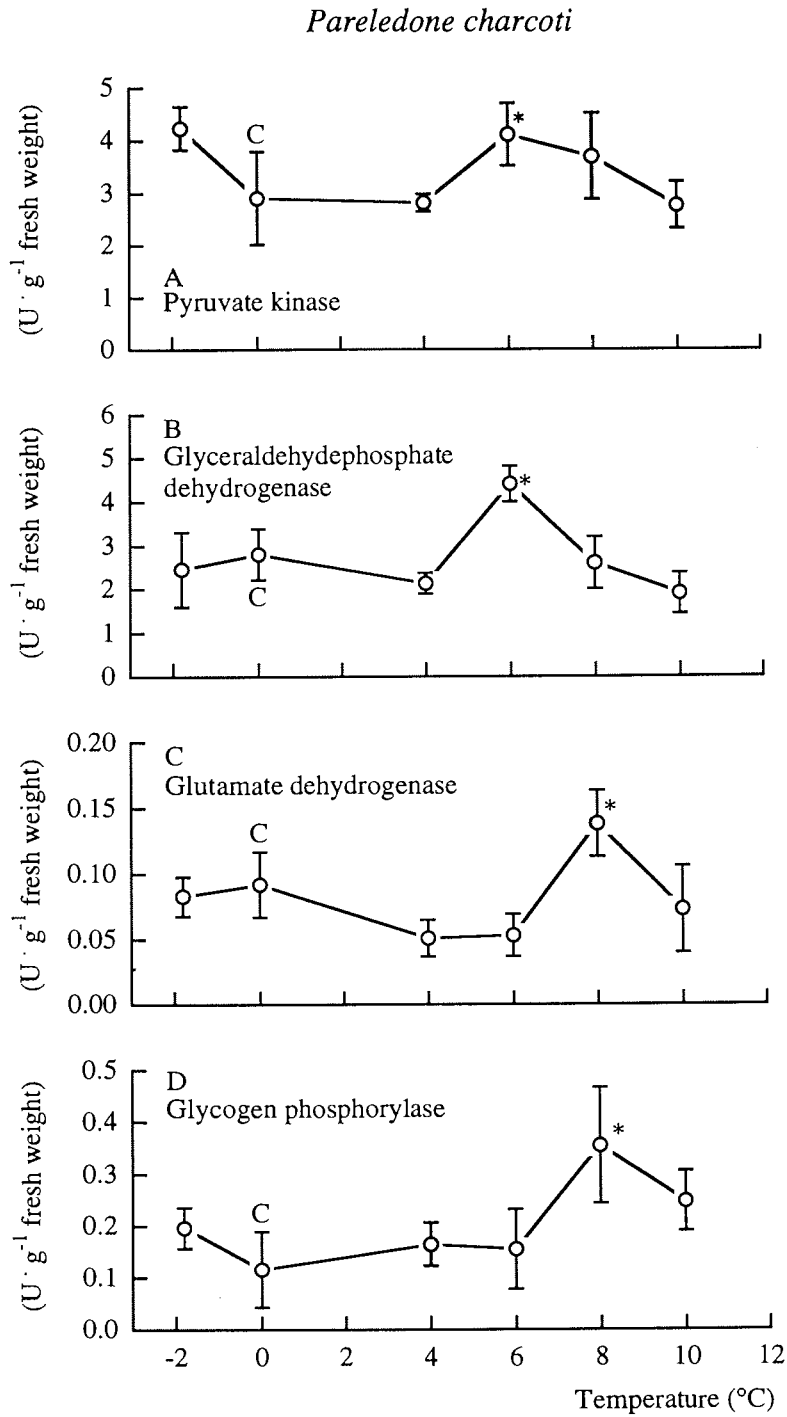


Fig 6 Activities of various enzymes in mantle musculature of *Pareledone charcoti* after incubation for 24 hours at different temperatures (assayed at 0°C; C - control value; * - significantly different from the control value; n = 4 ; values are means ± SD)

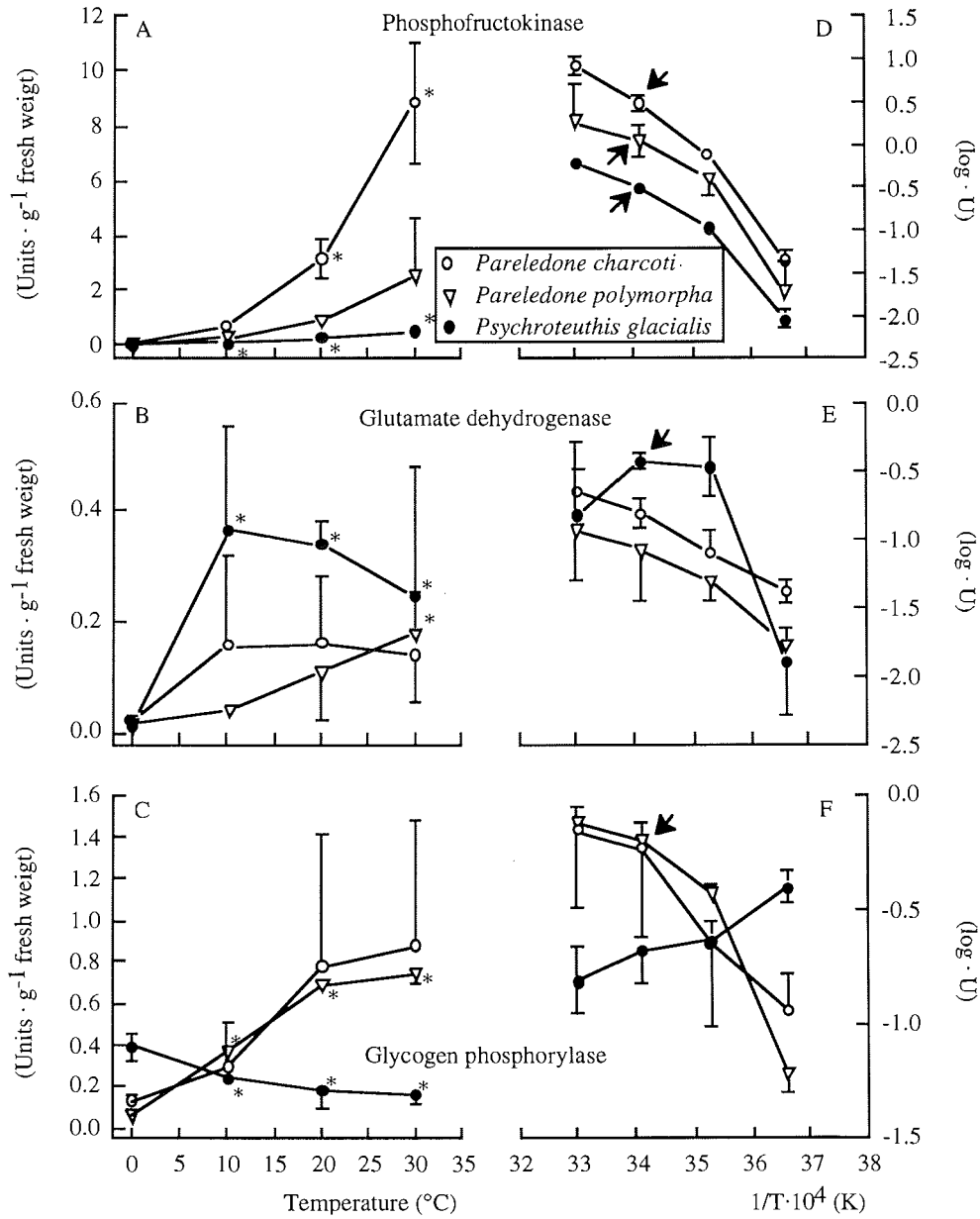


Fig 7 Activities of (A) phosphofructokinase (B) glutamate dehydrogenase and (C) glycogen phosphorylase in the arm tissue of *Pareledone charcoti* (n = 5), *Pareledone polymorpha* (n = 4) and *Psychroteuthis glacialis* (n = 5-6) determined *in vitro* at temperatures between 0°C and 30°C. (D, E, F) show the respective Arrhenius plots. Arrows indicate the Arrhenius break temperature. (* - significantly different from the respective finding at 0°C; values are means ± SD)

Temperature effects on haemocyanin oxygen binding in an Antarctic cephalopod

S. Zielinski, F.J. Sartoris and H.O. Pörtner

Alfred-Wegener-Institut für Polar- und Meeresforschung, Biologie I/Ökophysiologie
Columbusstrasse, 27568 Bremerhaven, Germany

running head: Antarctic cephalopod haemocyanin function

Correspondence address:

Prof. Dr. H.O. Pörtner, Alfred-Wegener-Institut für Polar- und Meeresforschung,
Biologie I/Ökophysiologie, Columbusstr., 27568 Bremerhaven, Germany
Phone: ++49 471 4831 307 FAX: ++49 471 4831 149
email: hpoertner@awi-bremerhaven.de

Abstract

The temperature dependence of oxygen binding to haemocyanin was investigated in the sterno-thermal Antarctic octopod *Megaleledone senoi* and in the eurythermal cuttlefish *Sepia officinalis*. A technique was developed which allowed continuous recordings of changes in pH and haemocyanin oxygen saturation. Oxygen affinity of *Sepia officinalis* decreased at a rate of $\Delta P_{50}/^{\circ}\text{C} = 0.12$ kPa (pH 7.4) with increasing temperatures, whereas in *Megaleledone senoi* this ratio was much smaller (< 0.01 kPa, pH 7.2). Furthermore, *Megaleledone senoi* haemocyanin displayed one of the highest levels of oxygen affinity ($P_{50} < 1$ kPa, pH 7.6, 0°C) found so far in cephalopods and a low cooperativity ($n_{50} = 1.4$ at 0°C). In both species pH sensitivity of oxygen binding increased with increasing temperature. A pH-independent venous reserve was visible which was 43% in *Megaleledone senoi* at 0°C and 19% in *Sepia officinalis* at 20°C . In the context of literature data these data confirm that the lower metabolic rate of octopods compared to cuttlefish and squid eliminates the necessity to maximise pH dependent oxygen transport to the extent seen in other cephalopods. The temperature independent, extremely high oxygen affinity reflects the stenothermality and the very low metabolic rate of these cold water octopods.

1. Introduction

Cephalopods are found throughout the seas of the world, from warm tropical waters to polar oceans (Roper *et al.*, 1984). Representatives of this group, especially squids, display the highest metabolic rates among marine invertebrates, even higher than those of fish of similar size and mode of life (Webber and O'Dor, 1985; O'Dor and Webber, 1986). Oxygen transport to tissues in cephalopods occurs by use of haemocyanin (Mangum, 1990). This pigment is found in extracellular solution (Linzen, 1989). Haemocyanin concentration in the blood determines its capacity to bind and transport oxygen. However, there is a limit to the concentration of pigment due to its influence on colloidal osmotic pressure and on blood viscosity (Mangum, 1983; 1990). Therefore, although squid display the highest haemocyanin concentrations in the animal kingdom, the level of bound oxygen does not exceed 1 - 2 mmol l⁻¹, which is below the typical 4 - 5 mmol l⁻¹ found in active fish (Pörtner, 1994; 1997). For being able to make full use of the limited amount of oxygen available for their high metabolic rates these animals need to optimise haemocyanin oxygen transport in every possible way. Since haemocyanin levels in octopods range around 50% of those in squid an even lower oxygen binding capacity results (Miller and Mangum, 1988; Senozan *et al.*, 1988).

Oxygen binding properties of respiratory pigments are modified by several internal parameters, among others pH, CO₂ and organic molecules. Haemocyanin function in most cephalopods relies on cooperativity and the pH dependence of oxygen binding since low molecular weight effectors are not involved (e.g. Mangum, 1990; Pörtner, 1990). High Bohr coefficients ($\Delta \log P_{50} / \Delta \text{pH} < -1$) are common in cephalopods (Bridges, 1994) and pH dependent cooperativity has been found in several species (Miller, 1985; Pörtner, 1990).

A change in ambient temperature has a large effect on haemocyanin oxygen transport of some cephalopods, caused by an increase in cooperativity and a fall in oxygen affinity with rising temperature (Brix *et al.*, 1989; 1994; Mangum, 1990). Since temperature exerts a profound influence on the ecological range of various species (Brix *et al.*, 1989), the thermal sensitivity of the respiratory pigment may contribute to set the limits of thermal tolerance. If a rise in metabolic rate with temperature is supported by an adequate rise in P₅₀ the respective species should be able to live in a greater temperature range than a species where P₅₀ remains constant or where the change in P₅₀ is too large. For example, the high thermal sensitivity of haemocyanin oxygen affinity in the giant squid *Architeuthis monachus* suggests that arterial saturation becomes impossible at high temperatures (Brix, 1983). Comparison of haemocyanin oxygen binding in cephalopods from various latitudes should show how haemocyanin oxygen transport has adapted to different temperature regimes.

The Antarctic marine environment is characterized by low and very stable water temperatures close to freezing (Clarke, 1988). Under these conditions physically dissolved oxygen will permanently and to a great extent contribute to oxygen supply. Some investigations suggest, that oxygen transport by haemocyanin or blood pigments in general may be less important at low temperatures (for haemocyanin see Mauro and Mangum, 1982b; Burnett *et al.*, 1988). Some Antarctic fishes have even lost their respiratory pigments (Ruud, 1954). These relationships have not yet been investigated in Antarctic cephalopods. Life specimens of the octopod *Megaleledone senoi* became available during a recent expedition to Antarctica with RV 'Polarstern'. This species is found in the indo-atlantic sector of the Antarctic ocean (Taki, 1961; Kubodera and Okutani, 1986; 1994). In our study we were interested in how this stenothermal Antarctic octopod utilizes its haemocyanin for oxygen transport. Furthermore, we investigated how oxygen binding properties were influenced by temperature and whether this might contribute to setting the thermal limits for this species. For comparison, a eurythermal cephalopod from lower latitudes, the cuttlefish *Sepia officinalis* was included in our analyses.

2. Materials and Methods

2.1 Animals

Antarctic octopods (*Megaleledone senoi*) were caught in November and December 1996 close to Elephant Island Antarctica during expedition ANT XIV/2 of RV 'Polarstern'. The animals were collected from bottom and agassiz trawls. Samples were taken immediately after capture.

Cuttlefish *Sepia officinalis* were obtained from the Marine Biomedical Institute of the University of Texas, Galveston, Texas, USA, where this species has been bred and grown for several consecutive generations. They were kept at a salinity of 35‰ at temperatures of 20 to 22°C.

2.2 Sampling procedure

Animals were anaesthetised by transferring them into seawater which contained 2% ethanol (v/v). After full anaesthesia was reached, the animals were removed from the seawater and the mantle was opened by a ventral incision. Blood was collected from the vena cava, the systemic heart and the gill hearts. Blood samples from all animals were pooled, frozen and stored at close to -20°C until utilized for in vitro studies of oxygen binding.

2.3 Analysis of oxygen binding

Oxygen binding characteristics of cephalopod haemocyanin were studied using a specially constructed cuvette, built by Hellma GmbH & Co (Mülheim, Germany; Fig. 1). The cuvette is divided in an upper and a lower part where stirrers ensure the uniform mixture of the blood. Both parts are connected via two shafts (diameter: 1.5 and 2 mm, respectively). In the centre part of the cuvette the blood formed a thin layer only 0.45 mm thick which allowed continuous monitoring of oxygen saturation through the absorbance at 345 nm using a diodearray spectro-photometer with fibre optics (X-dap, IKS Optoelektronik Meßgeräte GmbH, Waldbronn, Germany). Blood samples were equilibrated by introducing humidified gas mixtures through a hole in the lid of the cuvette. Gas mixtures of variable P_{O_2} (between 1.0 and 20.0 kPa) were prepared from pure O_2 , CO_2 and N_2 by gas-mixing pumps (type 2M303/a-F, Wösthoff, Bochum, Germany). Blood pH was varied by changing P_{CO_2} (between 0.09 and 1.01 kPa) or by replacing small volumes (<10 µl per 2 ml of blood) of supernatant plasma after ultracentrifugation (1 h at 120000g; Beckman Airfuge, Beckman Instruments Inc, Fullerton Ca, USA) with fixed acid (1 mol l⁻¹ HCl) or base (2 mol l⁻¹ NaOH; Morris *et al.*, 1985; Pörtner, 1990). Changes in blood pH during oxygenation/deoxygenation of haemocyanin were measured continuously by using a needle pH-electrode (long micro

needle electrode #811, Diamond General Corp, Ann Arbor MI, USA) which was introduced into one of the shafts via a second hole in the lid. Total CO₂ was analysed at 0°C in 50 µl blood samples of *Megaleledone senoi* using the gas chromatography method of Lenfant and Aucutt (1966) modified after Boutilier *et al.* (1985). Measurements of oxygen binding properties were carried out at 0, 5 and 10°C for samples of *Megaleledone senoi* and at 0, 10 and 20°C for samples of *Sepia officinalis*.

2.4 Graphical analysis and calculations

Changes in haemocyanin oxygenation and pH were plotted in a pH/saturation diagram according to Pörtner (1990). The resulting oxygen-binding curves represent isobars delineating the change in oxygenation with pH at constant P_{O₂}. The points of intersection of the oxygen isobars with the line of half saturation quantify P₅₀ as it depends on pH. From these intersections the Bohr coefficient, ΔlogP₅₀/ΔpH could be evaluated by linear regression analysis. The Haldane coefficient (ΔHCO₃⁻/ΔHcyO₂) was evaluated from the vertical distance between buffer lines in a pH/bicarbonate diagram (Pörtner 1990). For an evaluation of whether oxygen linked CO₂ binding occurs to the haemocyanin (Lykkeboe *et al.*, 1980), "measured" and calculated apparent bicarbonate levels were compared. "Measured" bicarbonate was calculated from measured CO₂ concentration (Cco₂) using applied Pco₂ and measured pH according to

$$[\text{HCO}_3^-] = \text{Cco}_2 - \alpha \text{Pco}_2 \quad (1)$$

where α is the solubility of CO₂. Calculated bicarbonate was determined according to equation (1) with Cco₂ values calculated from the Henderson-Hasselbalch equation:

$$\text{Cco}_2 = \text{Pco}_2 \cdot (\alpha \cdot 10^{\text{pH}-\text{pK}'''} + \alpha) \quad (2)$$

α and pK''' were calculated according to Heisler (1986).

Along each isobar in the pH/saturation diagram, values of saturation S depend on pH values and the P_{O₂} of the isobar. The pH/saturation diagram allows comparison of S and logP_{O₂} with P₅₀ at the same pH (= pH₅₀). This leads to an analysis of cooperativity at a specific pH. If this is done in the range of saturation S between 0.4 and 0.6, the analysis leads to an estimate of Hill coefficients (n₅₀) according to

$$\log(S/1-S) = n_{50}(\log P_{O_2} - \log P_{50}) \quad (3)$$

where P_{O₂} is the P_{O₂} of the isobar, S results from P_{O₂} at a specific pH (pH₅₀) and P₅₀ is the P_{O₂} for S = 0.5 at the same pH (Pörtner, 1990).

3. Results

Fig. 2 shows the oxygen binding curves for *Megaleledone senoi* haemocyanin at temperatures between 0 and 10°C. The highest pH sensitivity of oxygen binding was found at 10°C as indicated by high slopes $\Delta S/\Delta pH$. Lower temperatures resulted in a somewhat decreased pH sensitivity of oxygen affinity. $\Delta S/\Delta pH$ dropped from a maximum of $\Delta S/\Delta pH = 13\%$ per pH-unit at 10°C to a maximum of 10% per pH-unit at 0°C. Saturation at 0°C did not fall below 43% even at low pH (6.4 and 6.6) and low P_{O_2} (1 kPa). At 10°C, saturation dropped to a minimum of 32% at the same P_{O_2} . Intermediate values of pH sensitivity and maximum unloading were found at 5°C.

A high Bohr coefficient of -2.33 was found at 10°C (Table 1). The exact evaluation of this coefficient was not possible at lower temperatures due to the fact that saturation did not drop below 50% at most oxygen partial pressures. An extrapolation of binding data to very low oxygen partial pressures revealed a Bohr coefficient of approximately -0.9 at 0°C. Furthermore, oxygen affinity (P_{50}) at pH 7.2 changed slightly at a rate of $\Delta P_{50}/^\circ C < 0.01$ kPa from 0.98 kPa at 0°C to 1.1 kPa at 10°C (Table 1).

For *Sepia officinalis* haemocyanin, pH sensitivity was high at 20°C reaching a maximum of $\Delta S/\Delta pH$ of 41% per pH-unit. Especially in the pH-range between 7.4 and 7.8 very small pH-changes were sufficient to cause maximal unloading of oxygen down to 19% saturation. pH sensitivity at 20°C was higher than found for *Megaleledone senoi* at all temperatures. Similar to *Megaleledone senoi* lower temperatures resulted in a decreased pH sensitivity of oxygen binding. At 0°C, $\Delta S/\Delta pH$ reached only a maximal value of 7% per pH-unit. Oxygen saturation remained above 50% at all investigated oxygen partial pressures and pH values. The drop in pH sensitivity with falling temperature was also reflected in a change of the Bohr coefficient. At 20°C it was -1.33, while it dropped to -0.99 at 10°C. At pH 7.4 oxygen affinity fell at a rate of $\Delta P_{50}/^\circ C = 0.12$ kPa from $P_{50} = 5.3$ kPa at 10°C to $P_{50} = 6.5$ kPa at 20°C (Table 2).

Fig. 4 shows the change in cooperativity with pH and temperature for *Sepia officinalis*. At 20°C, the largest Hill coefficient (n_{50}) of 5.9 was found at a pH (7.48) where pH sensitivity ($\Delta S/\Delta pH$) was also high. A decrease in temperature to 10°C resulted in a decrease of the maximal Hill coefficient to $n_{50} = 4.6$ (pH 7.29). The maximum was shifted to lower pH. In contrast to cuttlefish, much lower Hill coefficients were found for *Megaleledone senoi* (Table 1). At 0°C n_{50} was 1.4 (pH 7.43), while it varied between 1.0 (pH 6.83) and 1.4 (pH 7.31) at 10°C. In contrast to the cuttlefish no clear maximum could be found.

Analysis of total CO_2 in *Megaleledone senoi* blood during variations of P_{O_2} and P_{CO_2} yields the buffer lines depicted in the pH/bicarbonate diagrams (Fig. 5). The position of the buffer line shifts between oxygenated and deoxygenated blood according to the

quantity of H^+ bound by the pigment. The vertical distance between the buffer lines yields the Haldane coefficient ($\Delta HCO_3^-/\Delta HcyO_2$). For *Megaleledone senoi* haemocyanin it ranged between 0.39 (pH 7.2) and 0.66 (pH 6.2) at 0°C (Table 1). The diagram also includes the calculated apparent bicarbonate levels for oxygenated and deoxygenated blood. These theoretical values diverge only slightly from the measured values and suggest that O_2 linked CO_2 binding does not exist. Non-bicarbonate buffer values (β_{NB}) of 4.25 mmol l⁻¹ pH-units⁻¹ result for *Megaleledone senoi* blood at 0°C (Table 1) a value in the same range as in the squids *Illex illecebrosus* and *Loligo pealei* (5.0 and 5.8 mmol l⁻¹ pH-units⁻¹, respectively; Pörtner 1990).

4. Discussion

A number of factors are known to influence oxygen binding of respiratory pigments. Among the most important for cephalopods are pH (Bridges, 1994; Pörtner, 1994) and temperature (Brix *et al.*, 1989). Temperature dependence of P_{50} varies between species. For example, the oxygen affinity of the haemocyanin of the giant squid *Architeuthis monachus* decreases at a rate of $\Delta P_{50}/\Delta T = 1.89$ kPa per °C temperature increase (pH 7.4), while for the octopod *Octopus vulgaris* only a rate of $\Delta P_{50}/\Delta T = 0.20$ kPa/°C (pH 7.4) was found (calculated after Brix *et al.*, 1989). An even lower value of $\Delta P_{50}/\Delta T = 0.12$ kPa/°C (pH 7.4) was calculated for the haemocyanin of *Sepia officinalis*. In *Megaleledone senoi* the ratio was much smaller ($\Delta P_{50}/\Delta T = 0.01$ kPa/°C, pH 7.2). In eurythermal cephalopods a rise in P_{50} with temperature should occur in order to support PO_2 buffering at a high enough capillary PO_2 . This is required for adequate oxygen supply to mitochondria when temperature causes a rise in metabolic rate. Extreme thermal sensitivity of P_{50} in giant squid may eliminate haemocyanin oxygen transport and cause a low heat tolerance (Brix, 1983). Similarly, a too small adjustment of P_{50} may be detrimental since blood PO_2 will be buffered at too low levels when temperature rises, not being able to adequately support the increase in metabolic rate. This may be the case in the stenothermal Antarctic octopod, *Megaleledone senoi*.

With an extremely low temperature dependence of P_{50} in *Megaleledone senoi* haemocyanin, a change in temperature nonetheless influenced the pH sensitivity of oxygen binding. In both the Antarctic octopod *Megaleledone senoi* and *Sepia officinalis* an increase in temperature resulted in an increased pH sensitivity of oxygen affinity although at much lower levels in the octopod. For *Sepia officinalis* at 20°C maximum pH sensitivity was found in the range of *in vivo* blood pH (7.4 - 7.8 at 17 - 19°C; Johansen *et al.*, 1982). Maximum and high slopes of the oxygen isobars in the range of *in vivo* pH suggest that the oxygen transport system is designed to respond to even small changes in extracellular acid-base status thereby supporting the PO_2 buffer function of the haemocyanin (Pörtner, 1994). The *in vivo* blood pH of the Antarctic octopod is not known. Assuming that this parameter follows α -stat predictions (Reeves, 1972) and is high in the cold as seen in *Loligo pealei* blood *in vitro* (Howell and Gilbert, 1976) the *in vivo* pH range for *Megaleledone senoi* will be located between pH 7.7 and 7.9 at 0°C. With the highest pH sensitivity in this pH range, oxygen unloading would occur at very low oxygen tensions (< 1kPa) supporting only very low metabolic rates.

The temperature dependent change in the pH sensitivity of oxygen affinity is also reflected by a change in Bohr coefficients ($\Delta \log P_{50}/\Delta pH$) with temperature. Similar to findings in the crustaceans *Cancer magister*, *Cancer anthonyi* and the abalone *Haliotis corrugata* (Burnett *et al.*, 1988), the Bohr coefficient evaluated for both investigated

cephalopod species dropped when temperature decreased. In *Sepia officinalis* $\Delta \log P_{50} / \Delta \text{pH}$ decreased from -1.33 at 20°C to -0.99 at 10°C. An extremely high value of -2.33 was found at 10°C for the haemocyanin of *Megaleledone senoi*, whereas at 0°C a much smaller Bohr coefficient of approximately -0.9 results. The role of the large negative Bohr coefficients found for most cephalopods (<-1.0) is still under debate (see Bridges, 1994; Pörtner, 1994 for review). It has been proposed, that the Bohr effect in cephalopods is more important for oxygen loading at the gills than for oxygen unloading in the tissues (Brix *et al.*, 1981). The reason is that haemocyanin binds protons during deoxygenation which are usually provided by respiratory acidification. At normal RQ values, however, metabolism does not deliver enough CO₂ to exploit Bohr coefficients <-1. Venous pH rises causing buffering of venous Po₂ at lower values than may be required to maintain a diffusion gradient to mitochondria. Later on, it was discussed for squids, that significant uptake of oxygen via the skin should lead to additional CO₂ formation in metabolism. This would support venous acidification as required for oxygen unloading in the tissues at high enough oxygen tensions (Pörtner, 1990; 1994). Alternatively, a mechanism of oxygen-linked CO₂-binding has been proposed for *Sepia* haemocyanin which transports both O₂ and CO₂ to the tissues. CO₂ produced in metabolism and the CO₂ released during deoxygenation would elicit a drop in pH (Lykkeboe *et al.*, 1980; Brix *et al.*, 1981). Such a mechanism has been found for sepioids, among them *Sepia officinalis* (Brix *et al.*, 1981) and would facilitate oxygen unloading at high Po₂ in the tissues at 20°C. However, the Bohr coefficient dropped to $\Delta \log P_{50} / \Delta \text{pH} = -0.99$ at 10°C, such that this mechanism may become less important for oxygen delivery to tissues in *Sepia officinalis* at lower temperature. No oxygen-linked CO₂-transport was found in *Megaleledone senoi*. At 0°C, the estimated Bohr coefficient of $\Delta \log P_{50} / \Delta \text{pH} \approx -0.9$ would reflect normal function of the Bohr effect, while the extremely high Bohr coefficient at 10°C would be counterproductive for oxygen transport, again a finding in line with the stenothermality of Antarctic animals.

A reduced pH sensitivity of haemocyanin oxygen binding in *Megaleledone senoi* compared to *Sepia officinalis* and squids is also reflected in the magnitude of the pH-independent venous reserve. This reserve represents the amount of oxygen which is still bound to the respiratory pigment even when pH falls to very low values. Comparison of this venous reserve for several cephalopod species at normal environmental temperatures shows that it is below 10% for the squid *Illex illecebrosus* (15°C; Pörtner, 1990), whereas values are 19% for *Sepia officinalis* (20°C; this study), 40% for the temperate octopod *Octopus dofleini* (20°C; Pörtner, 1990; calculated after Miller and Mangum, 1988) and 43% for the Antarctic octopod *Megaleledone senoi* (0°C; this study). The high pH sensitivity of squid haemocyanins maximises the release of oxygen in the tissues and

supports the high metabolic rate (Pörtner 1990, 1994). Sepioids and even more so, octopods display a less active life style with lower metabolic rates (for example: Houlihan *et al.*, 1982; Webber and O'Dor, 1985; 1986; Finke *et al.*, 1996; Seibel *et al.*, 1997). This may eliminate the necessity to maximise pH dependent oxygen transport to the extent seen in squids.

The cooperativity of respiratory pigments is characterised by the Hill coefficient (n_{50}). Several investigations have shown pH dependent cooperativity (Mauro and Mangum, 1982a, b; Burnett *et al.*, 1988; Pörtner, 1990). In *Sepia officinalis* at 20°C and in the squids *Illex illecebrosus* and *Loligo vulgaris* the highest cooperativity coincided with the highest pH sensitivity of oxygen binding ($\Delta S/\Delta pH$) in the range of *in vivo* pH (Pörtner, 1990). Therefore, maximum cooperativity in the range of *in vivo* pH supports maximal deoxygenation while the pH change required for deoxygenation is minimised (Pörtner, 1990; 1994). A decrease in temperature to 10°C caused the maximal Hill coefficient of *Sepia officinalis* haemocyanin to drop from $n_{50} = 5.9$ at 20°C to $n_{50} = 4.6$. At the same time, this maximal value was shifted to lower pH values, when *in vivo* pH should rise according to α -stat predictions (Reeves, 1972). A similar temperature dependence of the Hill coefficient was found for several crustaceans (Mauro and Mangum, 1982a, b). Due to the shift of the maximal n_{50} to lower pH values, the highest cooperativity is found below the *in vivo* pH range. Thus, cooperativity no longer supports optimum oxygen transport in *Sepia officinalis* haemocyanin at lower temperatures. Overall, these data indicate that haemocyanin oxygen transport in those *Sepia officinalis* used was optimal at 20°C, which is close to the maintenance temperature in the aquarium. However, 10° can be reached in the northern part of the distribution range depending on the season (Isemer and Hasse, 1981). A seasonal adjustment of haemocyanin oxygen binding properties may occur as found in some crustaceans (Truchot, 1975; Mauro and Mangum, 1982a).

For *Megaleledone senoi*, a much lower cooperativity of $n_{50} = 1.4$ was found at 0°C, which did not increase with increasing temperature. Furthermore, the P_{50} of below 1 kPa (pH 7.6; 0°C) is one of the highest oxygen affinities reported so far for cephalopods. This value is close to the P_{50} of 0.47 to 0.55 kPa evaluated for the cold water vampire squid *Vampyroteuthis infernalis* (5°C; Seibel *et al.*, 1999).

In summary, *Megaleledone senoi* haemocyanin shows a high oxygen affinity together with an extremely low thermal sensitivity (see above), a high Bohr coefficient and a low cooperativity. These characteristics cause Po_2 to be buffered at low values even when oxygen consumption will be elevated at higher temperatures (5 and 10°C). They therefore will contribute to the limited thermal tolerance of this Antarctic species. Moreover, Po_2 buffering at low values suggests that oxygen transport in this Antarctic

cephalopod at 0°C is adjusted to the very low metabolic rates found in this group of cephalopods (H.O. Pörtner, T. Hirse, V. Wegewitz, unpublished data). At low metabolic rate leads us to expect low blood P_{O_2} values to minimise oxidative stress. However, this example also emphasises that these cephalopods make use of haemocyanin oxygen transport even at the low temperatures of Antarctica when some fish exclusively rely on the transport of physically dissolved oxygen in the blood.

Acknowledgments:

The authors like to thank Iris Hardewig and Boris Klein for sampling of blood from *Megaleledone senoi* during the expedition with RV 'Polarstern'. The technical and logistical help by the staff of the Marine Biomedical Institute is gratefully acknowledged. Supported by grants of the Deutsche Forschungsgemeinschaft to HO Pörtner (Po 278). Alfred-Wegener-Institut Publication No.

References

- Boutilier, R. G., G. K. Iwama, T. A. Heming, and D. J. Randall. 1985. The apparent pK of carbonic acid in rainbow trout blood plasma between 5 and 15°C. *Respir. Physiol.* 61: 237-254.
- Bridges, C. R. 1994. Bohr and Root effects in cephalopod haemocyanins - paradox or pressure in *Sepia officinalis*? Pp. 121-130 in *Physiology of cephalopod molluscs - lifestyle and performance adaptations*, H. O. Pörtner, R. K. O'Dor and D. MacMillan, eds. Gordon and Breach Publishers, Basel.
- Brix, O. 1983. Giant squids may die when exposed to warm water currents. *Nature* 303: 422-423.
- Brix O., G. Lykkeboe, and K. Johansen. 1981. The significance of the linkage between the Bohr and Haldane effects in cephalopod bloods. *Respir. Physiol.* 44: 177-186.
- Brix O., A. Bardgard, A. Cau, A. Colosimo, S. G. Condò, and B. Giardina. 1989. Oxygen-binding properties of cephalopod blood with special reference to environmental temperatures and ecological distribution. *J. Exp. Zool.* 252: 34-42.
- Brix O., A. Colosimo, and B. Giardina. 1994. Temperature dependence of oxygen binding to cephalopod haemocyanins: ecological implications. Pp. 149-162 in *Physiology of cephalopod molluscs - lifestyle and performance adaptations*, H. O. Pörtner, R. K. O'Dor and D. MacMillan, eds. Gordon and Breach Publishers, Basel.
- Burnett L. E., D. A. Scholnick, and C. P. Mangum. 1988. Temperature sensitivity of molluscan and arthropod hemocyanins. *Biol. Bull.* 174: 153-162.
- Clarke A. 1988. Seasonality in the Antarctic marine environment. *Comp. Biochem. Physiol.* 90B: 461-473.
- Finke E., H. O. Pörtner, P. G. Lee, and D. M. Webber. 1996. Squid (*Lolliguncula brevis*) life in shallow waters: oxygen limitation of metabolism and swimming performance. *J. Exp. Biol.* 199: 911-921.
- Heisler N. 1986. Buffering and transmembrane ion transfer processes. Pp. 3-47 in *Acid-base regulation in animals*, N. Heisler, ed. Elsevier Science Publishers, Amsterdam.
- Houlihan D. G., A. J. Innes, M. J. Wells, and J. Wells. 1982. Oxygen consumption and blood gases of *Octopus vulgaris* in hypoxic conditions. *J. Comp. Physiol.* 148: 35-40.
- Howell B. J., and D. L. Gilbert. 1976. pH-temperature dependence of the hemolymph of the squid, *Loligo pealei*. *Comp. Biochem. Physiol.* 55A: 287-289
- Isemer H. J., and L. Hasse. 1985. *The Bunker climate atlas of the North Atlantic ocean. Vol I: observations.* Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, Tokyo. 218 pp.

- Johansen K., O. Brix, and G. Lykkeboe. 1982. Blood gas transport in the cephalopod, *Sepia officinalis*. J. Exp. Biol. 99: 331-338.
- Kubodera T., and T. Okutani. 1986. New and rare cephalopods from the Antarctic waters. Mem. Natl. Inst. Polar Res., Spec. Issue 44: 129-143.
- Kubodera T., and T. Okutani. 1994. Eledonine octopods from the Southern Ocean: systematics and distribution. In Southern Ocean cephalopods: life cycles and populations, P. G. Rodhouse, U. Piatkowski and C.C. Lu, eds. Ant. Sci. 6: 205-214.
- Lenfant C., and C. Aucutt. 1966. Measurement of blood gases by gas chromatography. Respir. Physiol. 1: 398-407.
- Linzen B. 1989. Blaues Blut: Struktur und Evolution der Hämocyane. Naturwissenschaften 76: 206-211.
- Lykkeboe G., O. Brix, and K. Johansen. 1980. Oxygen-linked CO₂ binding independent of pH in cephalopod blood. Nature 287: 330-331.
- Mangum C. P. 1983. Oxygen transport in the blood. Pp. 373-429 in The biology of Crustacea Vol. 3, L. H. Mantel, ed. Academic Press, New York, London.
- Mangum C. P. 1990. Gas transport in the blood. Pp. 443-468 in Squid as experimental animals, D. L. Gilbert, E. J. Adelman jr and J. M. Arnold, ed. Plenum Publishing Corporation, New York.
- Mauro N. A., and C. P. Mangum. 1982a. The role of the blood in the temperature dependence of oxidative metabolism in decapod crustaceans. I. Intraspecific responses to seasonal differences in temperature. J. Exp. Zool. 219: 179-188.
- Mauro N. A., and C. P. Mangum. 1982b. The role of the blood in the temperature dependence of oxidative metabolism in decapod crustaceans. II. Interspecific adaptations to latitudinal changes. J. Exp. Zool. 219: 189-195.
- Miller K.I. 1985. Oxygen equilibria of *Octopus dofleini* hemocyanin. Biochemistry 24: 4582-4586.
- Miller K., and C. P. Mangum. 1988. An investigation of the nature of Bohr, Root, and Haldane effects in *Octopus dofleini* hemocyanin. J. Comp. Physiol. 158B: 547-552.
- Morris S., A. C. Taylor, C. R. Bridges, and M. K. Grieshaber. 1985. Respiratory properties of the haemolymph of the intertidal prawn *Palaemon elegans* (Rathke). J. Exp. Zool. 233: 175-186.
- O'Dor R. K., and D. M. Webber. 1986. The constraints on cephalopods: why squid aren't fish. Can. J. Zool. 64: 1591-1605.
- Pörtner H. O. 1990. An analysis of the effects of pH on oxygen binding by squid *Illex illecebrosus*, *Loligo pealei*) haemocyanin. J. Exp. Biol. 150: 407-424.

- Pörtner H. O. 1994. Coordination of metabolism, acid-base regulation and haemocyanin function in cephalopods. Pp. 131-148 in Physiology of cephalopod molluscs - lifestyle and performance adaptations, H. O. Pörtner, R. K. O'Dor and D. MacMillan, eds. Gordon and Breach Publishers, Basel.
- Pörtner H. O. 1997. Oxygen limitation of metabolism and performance in pelagic squid. Proceedings of the 30th European Marine Biological Symposium, 45-56.
- Reeves R. B. 1972. An imidazole alaphastat hypothesis for vertebrate acid-base-regulation: tissue carbon dioxide content and body temperature in bullfrogs. *Respir. Physiol.* 81: 255-274.
- Roper C. F. E., M. J. Sweeney, and C. E. Nauen. 1984. FAO species catalogue. Vol. 3: Cephalopods of the world. An annotated and illustrated catalogue of species of interest to fisheries. FAO Fisheries synopses 125. 277 pp.
- Ruud J. T. 1954. Vertebrates without erythrocytes and blood pigment. *Nature* 173: 848-850.
- Seibel B. A., E. V. Thuesen, J. J. Childress, and L. A. Gorodezky. 1997. Decline in pelagic cephalopod metabolism with habitat depth reflects differences in locomotory efficiency. *Biol. Bull.* 192: 262-278.
- Seibel B. A., F. Chausson, F. H. Lallier, F. Zal, and J. J. Childress. 1999. Vampire blood: respiratory physiology of the vampire squid (Cephalopoda: Vampyromorpha) in relation to the oxygen minimum layer. *Exp Biol Online* 4: 1.
- Senozan N. M., A. Avinc, and Z. Unver. 1988. Hemocyanin levels in *Octopus vulgaris* and the cuttlefish *Sepia officinalis* from the Aegean sea. *Comp. Biochem. Physiol.* 91A: 581-585.
- Taki I. 1961. On two new eledonid octopods from the Antarctic sea. *J. Fac. Fish. Anim. Husb. Hiroshima Univ.* 3: 297-316.
- Truchot J. P. 1975. Factors controlling the *in vitro* and *in vivo* oxygen affinity of the hemocyanin in the crab *Carcinus maenas* (L.). *Respir. Physiol.* 24: 173-189.
- Webber D. M., and R. K. O'Dor. 1985. Respiration and swimming performance of short-finned squid (*Illex illecebrosus*). *NAFO Sci. Coun. Studies* 9: 133-138.
- Webber D. M., and R. K. O'Dor. 1986. Monitoring the metabolic rate and activity of free-swimming squid with telemetered jet pressure. *J. Exp. Biol.* 126: 203-224

Table 1 Haemocyanin oxygen affinity (P_{50}), Bohr, Haldane and Hill coefficients and the non-bicarbonate buffer value (β_{NB}) of blood in the Antarctic octopod *Megaleledone senoi* at different temperatures. P_{50} , Haldane and Hill coefficients are valid for the pH values given in brackets (nd - not determined; $HcyO_2$ - concentration of oxygenated haemocyanin).

Temperature (°C)	P_{50} (kPa)	Bohr coefficient ($\Delta \log P_{50}$ / ΔpH)	Haldane coefficient (ΔHCO_3^- / $\Delta HcyO_2$)	Hill coefficient (n_{50})	β_{NB} (mmol l ⁻¹ pH-units ⁻¹)
0	0.98 (pH 7.2)	≈ -0.90	0.66 (pH 6.2) 0.50 (pH 6.8) 0.39 (pH 7.2)	1.4 (pH 7.43)	4.25
5	nd	nd	nd	1.5 (pH 7.24) 1.0 (pH 7.31)	nd
10	1.10 (pH 7.2)	-2.33	nd	1.2 ± 0.1 (pH 6.83-7.31)	nd

Table 2 Oxygen affinity (P_{50}) and Bohr coefficients of cuttlefish (*Sepia officinalis*) haemocyanin at different temperatures (for further explanation see Table 1).

Temperature (°C)	P_{50} (kPa)	Bohr coefficient ($\Delta \log P_{50}$ / ΔpH)
10	5.3 (pH 7.4)	-0.99
20	6.5 (pH 7.4)	-1.33

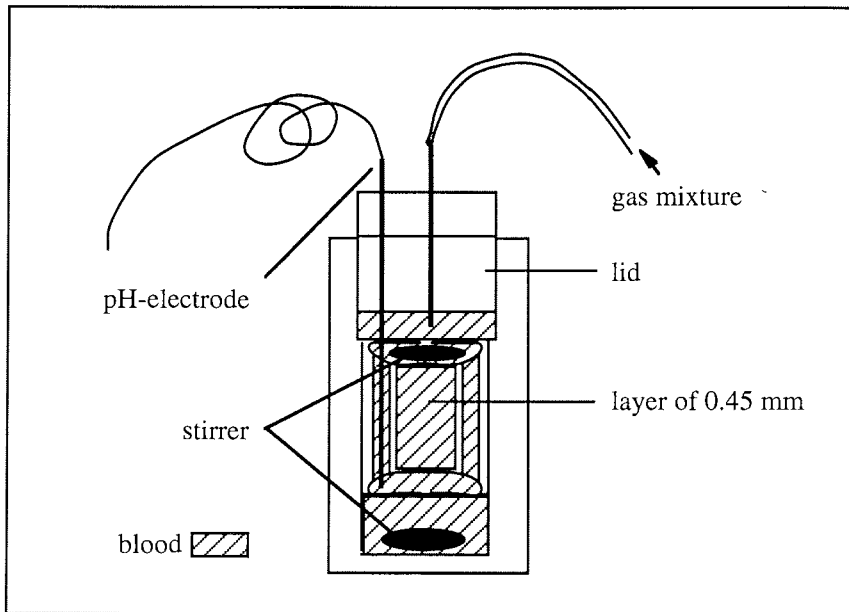


Fig. 1 Cuvette used for the measurement of oxygen binding properties. Dashed areas show parts of the cuvette filled with blood. Extinction was measured through the thin layer of 0.45 nm in the centre of the cuvette.

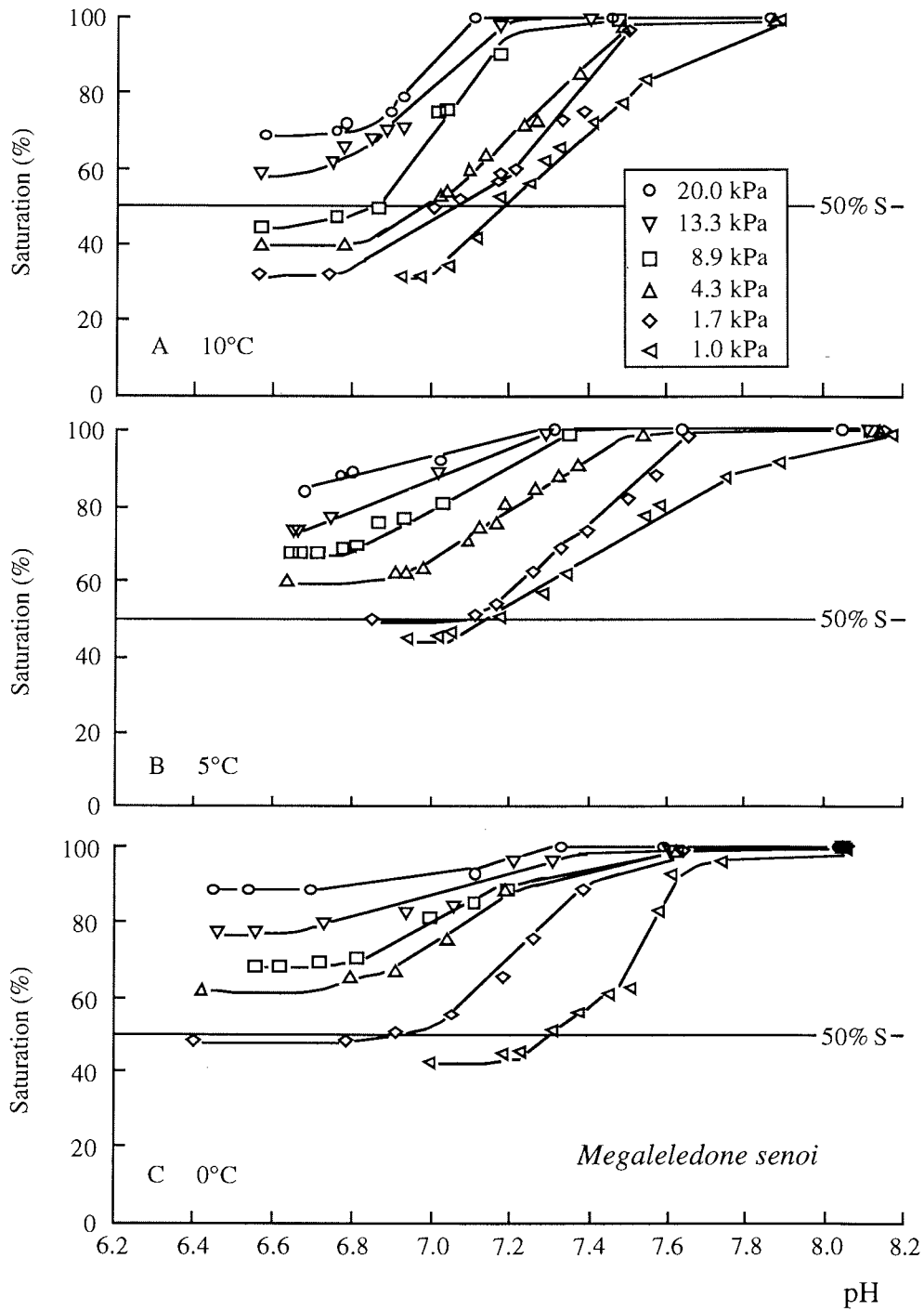


Fig. 2 Graphical presentation of the interrelationship between oxygen binding, pH and Po₂ in whole blood of the Antarctic octopod *Megaleledone senoi* at temperatures between 0 and 10°C (S - saturation).

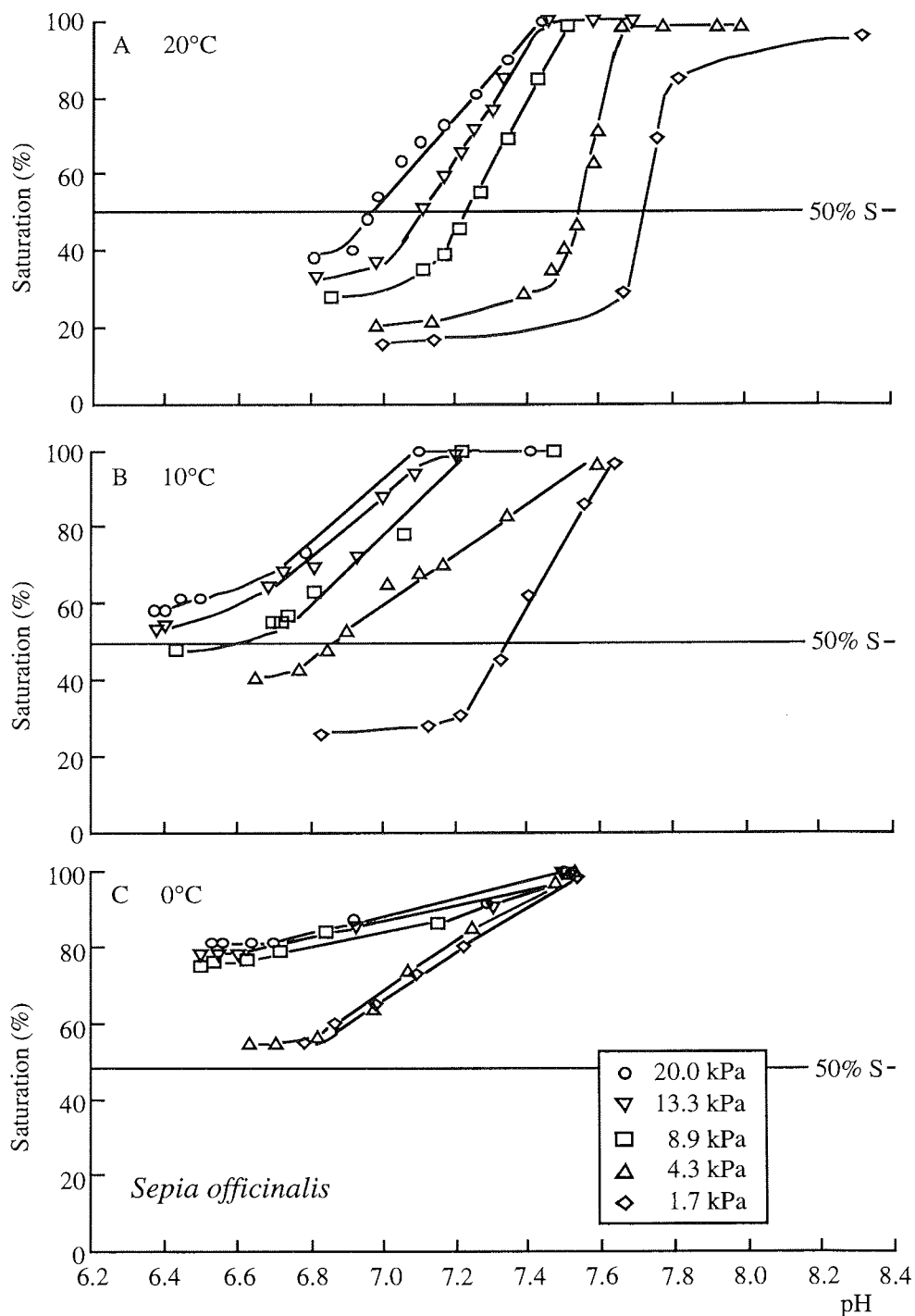


Fig. 3 Depiction of oxygen binding properties at temperatures between 0 and 20°C of *Sepia officinalis* haemocyanin as pH/saturation diagram. Each line indicates an oxygen isobar and shows the changes in oxygen binding depending on pH (S - saturation).

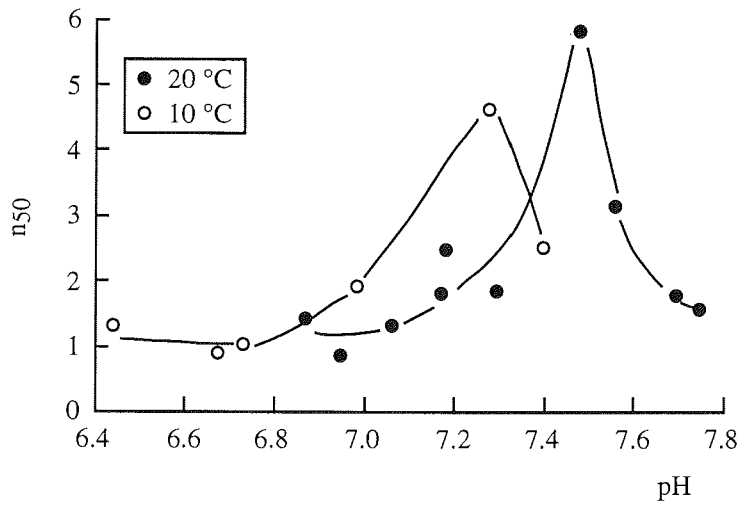


Fig. 4 Hill coefficients (n_{50}) of *Sepia officinalis* haemocyanin as they depend on pH and temperature.

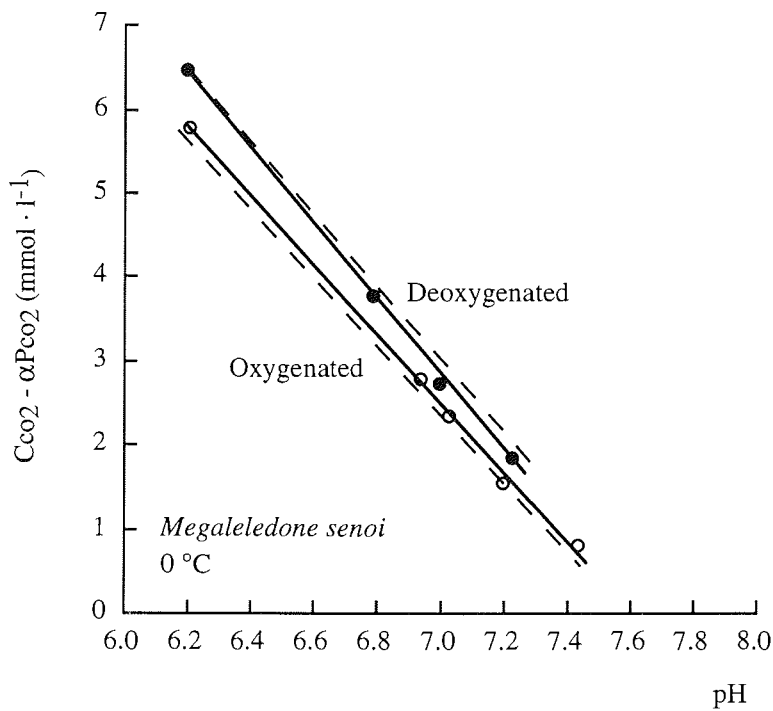


Fig. 5 pH/bicarbonate diagram for whole blood of *Megaleledone senoi* showing the buffer lines of oxygenated and deoxygenated blood as well as the calculated values of apparent bicarbonate levels (broken lines).

Oxidative stress and antioxidative defense in cephalopods: a function of metabolic rate or age?

Susanne Zielinski and Hans-Otto Pörtner

Alfred-Wegener-Institut für Polar- und Meeresforschung, Biologie I/Ökophysiologie
Columbusstrasse, 27568 Bremerhaven, Germany

running head: Antioxidative defense in cephalopods

Correspondence address:

Prof. Dr. H.O. Pörtner, Alfred-Wegener-Institut für Polar- und Meeresforschung,
Biologie I/Ökophysiologie, Columbusstr., 27568 Bremerhaven, Germany

Phone: ++49 471 4831 307 FAX: ++49 471 4831 149

email: hpoertner@awi-bremerhaven.de

Abstract

Activities of the antioxidative enzymes superoxide dismutase (SOD), catalase, glutathione peroxidase (GPX) and glutathione reductase (GR) were measured in the cephalopods *Sepia officinalis* and *Lolliguncula brevis*. Maximal enzyme activities were higher in gill tissue than in the mantle musculature of both species. Activities were generally lower in tissues of *Lolliguncula brevis* than in *Sepia officinalis*. Comparison with other ectothermic animals showed both cephalopod species to have a low enzymatic antioxidative status despite their high metabolic rate.

Furthermore, changes in antioxidative enzyme activities were measured in the cuttlefish *Sepia officinalis* with increasing age. The concentrations of malondialdehyde (MDA) and lipofuscin were determined as indicators of lipid peroxidation. Investigated animals were between 1.5 months and over 12 months old. Changes of antioxidative enzyme activities with age were not uniform. SOD and GPX activities increased with age, while catalase activity declined. In contrast, GR activity remained almost unchanged in all age groups. The low level of antioxidative defense might allow for the significant age-induced rise in MDA levels in gills and mantle musculature and for the increase in lipofuscin levels in mantle and brain tissue. It might thereby contribute to increased oxidative damage and a short life span of these cephalopods.

Keywords: ageing, catalase, lipofuscin, *Lolliguncula brevis*, malondialdehyde, metabolic rate, *Sepia officinalis*, superoxide dismutase

1. Introduction

Oxygen radicals and hydrogen peroxide (H_2O_2) are continually produced as biproducts of aerobic metabolism and may cause oxidative damage to lipids, proteins and nucleic acids (25, 26, 45, 70). Although all classes of macromolecules are susceptible to radical attack, polyunsaturated fatty acids are especially sensitive to oxidation owing to their conjugated double bond structures (71). A radical attack on lipids leads to the formation of lipidhydroperoxides (lipid-OOH; 25, 33, 71), which can decompose to yield alkanes, alkenes, ketones and aldehydes. The most important aldehyde produced is malondialdehyde (MDA), which forms Schiff bases with amines of proteins, phospholipids, and nucleic acids. The products of these reactions are extremely large fluorescent biomolecules, named age pigments or lipofuscin, which are not digested in the lysosomes because of unusual structures. They therefore accumulate with age (26, 33).

Oxidative damage is counteracted by antioxidant defense systems and repair mechanisms. Enzymes catalysing the breakdown of oxygen radicals and H_2O_2 serve as primary antioxidants. Superoxide ($\text{O}_2^{\bullet-}$) generated in peroxisomes and mitochondria is converted to hydrogen peroxide by the enzyme superoxide dismutase (SOD: $\text{O}_2^{\bullet-} + 2\text{H}_2\text{O} \rightarrow 2\text{H}_2\text{O}_2$). Catalase removes H_2O_2 via $2\text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow 2\text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$. Among low molecular weight antioxidants, vitamins and glutathione are considered to be important (14). The reduced form of glutathione (GSH) may be oxidized by H_2O_2 or organic peroxides to oxidized glutathione (GSSG) either spontaneously or via glutathione peroxidase (GPX) catalysis. Compensatory reduction of GSSG is catalysed by glutathione reductase (GR): $\text{GSSG} + \text{NADPH} + \text{H}^+ \rightarrow 2\text{GSH} + \text{NADP}^+$.

Despite antioxidant defense systems and repair mechanisms oxidative stress appears to be one of the most important factors contributing to aging (27, 32, 61, 64). For example, the progressive accumulation of damaged protein molecules as a function of age may significantly contribute to the inability of individual cells and therefore the entire organism to fulfil various physiological functions (51). The accumulation of defective macromolecules with age is either caused by an age related increase of oxidative damage and/or by the loss of the ability to repair or degrade these molecules (70).

The maximal life span potential (MLSP) of a species might be influenced by its metabolic rate. An increased metabolic rate appears to have a negative influence on the life span in a way, that it causes an increase in radical production and therewith oxidative damage (58). This is supported by different investigations on mammalian species (32, 66, 68; for review see 47). Animals with the highest rates of oxygen consumption displayed the highest mitochondrial production of superoxide and H_2O_2 . At the same time, the production of reactive oxygen species (ROS) was negatively correlated with MLSP, that means, species with the highest life span potential showed the lowest rate of radical

formation. A correlation of life span and ROS production was also found for the housefly *Musca domestica*. Flies with a lower metabolic rate at lower activity levels lived longer than more active specimens (59, 63).

Among marine invertebrates, cephalopods display the highest metabolic rates. Squids even have metabolic rates higher than fishes of similar size and life style (43). High metabolic rates correspond with high growth rates in cephalopods. All cephalopod species investigated except for *Nautilus* species have higher growth rates than poikilothermic vertebrates (fishes, amphibians, reptiles), even reaching growth rates comparable to those of mammals (10). In contrast to mammals, high metabolic and growth rates of cephalopods are linked to a short life expectancy between less than one year and a maximum of about three years (48, 49). These considerations led us to ask whether oxidative stress might be a factor contributing to the short life expectancies of cephalopods and whether the antioxidative capacity of cephalopods is adapted to match a possibly higher radical generation at high metabolic rate. For this purpose, the activities of antioxidative enzymes (SOD, catalase, GR and GPX) were compared in cuttlefish *Sepia officinalis* and the squid *Lolliguncula brevis*. The adult squid are about 20-fold smaller and possess a two times higher metabolic rate than the cuttlefish. Furthermore, oxidative damage was investigated by analysing the levels of malondialdehyde and lipofuscin in different age groups of laboratory reared *Sepia officinalis*. Constant breeding conditions guaranteed, that aging occurs continuously and is not influenced by variable and unknown conditions in the natural environment.

2. Material and Methods

2.1 Animals

Sepia officinalis were obtained from the Marine Biomedical Institute of the University of Texas, Galveston, Texas, USA, where this species has been bred and grown for several consecutive generations. They were kept at a salinity of 35 ‰ at temperatures of 20 to 22°C and fed regularly on small fishes and mysid shrimps. This species reaches a maximum age of 2 years in its natural environment (81), while a maximum age of 14 months was achieved in captivity (20). This may be related to the constant and high maintenance temperatures in the laboratory, whereas the life span may be significantly extended during seasonal cooling in the field (see discussion). Animals of the following age groups were available for experiments: 1.5 months (5.3 - 23.7 g), 2.5 months (27.0-142.7 g), 7 months (193.5 - 334.4 g), 10 months (469.8 - 773.0 g) and 12 months (805.7 - 963.2 g) old.

Brief squid (*Lolliguncula brevis* Blainville, 3.1 - 18.9 g) were caught in April 1995 in the Galveston Ship Channel and Galveston Harbour by fishermen of the Marine Biomedical Institute of the University of Texas, Galveston, Texas, USA and kept in aquaria with recirculating natural sea water under conditions similar to those in the natural habitat (24 - 25 ‰ at 20 - 22°C). The squid were allowed to adjust to the aquarium for at least 48 hours. The animals were fed fish and mysid shrimp, but not during the last 24 h prior to sampling.

2.2 Samples

Sepia officinalis was anaesthetized with 7.5 % MgCl₂ (w/v) in seawater, while for *Lolliguncula brevis* 4.7% MgCl₂ (w/v) was used (38). The mantle of the animals was opened by a ventral incision. In case of *Sepia officinalis* blood was collected from the vena cava, the systemic heart and the gill hearts. Afterwards samples of different tissues (mantle, gills and brain) were taken. SOD and GPX activity as well as lipofuscin concentrations were immediately measured in freshly sampled tissues. All other enzymes and malondialdehyde concentrations were measured in samples that had previously been freeze-clamped and stored in liquid nitrogen.

2.3 Analyses

Hydrogen peroxide measurements: Immediately after sampling the H₂O₂ concentration in the blood was measured fluorimetrically in a peroxidase catalysed reaction, using scopoletin (7-hydroxy-6-methoxy-2H-benzopyran) as a fluorescence indicator (46). A fluorimeter (Shimadzu RF 5000 U) was used at 365 nm excitation and 490 nm emission wavelengths. The concentration was assayed in potassium phosphate buffer (0.1 mol l⁻¹,

pH 7.0) to which scopoletin (0.17 mg dissolved in 2 ml phosphate buffer) and horseradish peroxidase (EC 1.11.1.7, 1.25 mg dissolved in 1 ml phosphate butter) were added. After the reaction terminated, H₂O₂ (0.4 nmol in purified Milli-Q water) was added and used as standard for the calculation of H₂O₂ levels. The standard solution of H₂O₂ was calibrated iodometrically.

Preparation of tissue extracts for enzyme assays: For the evaluation of catalase and glutathione reductase activity frozen tissue samples were ground under liquid nitrogen. Homogenates for the measurement of superoxide dismutase and glutathione peroxidase were prepared by using freshly excised tissue, which was minced by the use of scissors. All samples were homogenized 1:3 to 1:5 (w/v) in the respective homogenisation buffer (see below) by using a micro homogenizer (Biospec Products, Bartlesville, OK, USA). After centrifugation (10 min at 14000xg) enzyme activities were measured in the supernatant.

Catalase: Catalase activity (EC 1.11.1.6) was determined after Aebi (4). 50 mmol l⁻¹ potassium phosphate buffer (pH 7.0) containing 1 part of 1% Triton-X100 in water and 10 parts of buffer were used as homogenisation buffer. The assay contained 50 mmol l⁻¹ potassium phosphate buffer (pH 7.0) and 12.1 mmol l⁻¹ H₂O₂ as a substrate. The decay of peroxide was monitored at 240 nm and 25°C. One unit catalase decomposes 1 μmol H₂O₂ min⁻¹ under the assay conditions applied.

Superoxide dismutase (SOD): SOD (EC 1.15.1.1) activity was determined after Marklund and Marklund (37), using 50 mmol l⁻¹ Tris-succinate buffer (pH 8.2) for homogenisation. One unit of SOD (SOD-U) inhibits the autoxidation of an pyrogallol solution (8 mmol l⁻¹) in air saturated 50 mmol l⁻¹ Tris-succinate buffer (pH 8.2) at 420 nm and 25°C by 50%.

Glutathione reductase (GR): 120 mol l⁻¹ phosphate buffer (pH 7.2) was used as homogenisation buffer. GR (EC 1.6.4.2) activity was determined spectrophotometrically in the supernatant at 25°C and 339 nm using a method modified after Goldberg and Sparner (23). The assay contained (in mmol l⁻¹) 100 Tris buffer (pH 8.2), 0.94 EDTA, 4.6 GSSG and 0.16 NADPH.

Glutathione peroxidase (GPX; EC 1.11.1.9): Tissue was homogenized in Tris-HCl buffer (20 mmol l⁻¹, pH 7.6) including 1 mmol l⁻¹ EDTA and 1 mmol l⁻¹ dithiotreitol. The assay contained (in mmol l⁻¹) 100 potassium phosphate buffer (pH 7.0), 10 GSH, 1.5 NADPH, 1.5 H₂O₂ and 10 U ml⁻¹ GR. The oxidation of NADPH was followed spectrophotometrically at 339 nm (24). One unit GPX or GR activity, respectively is defined as a decrease of 1 μmol NADPH min⁻¹ under the assay conditions applied.

All enzyme assays were tested with commercial enzymes obtained from Sigma (St. Louis, USA).

Determination of malondialdehyde (MDA): MDA concentrations were assayed in mantle and gill tissue of *Sepia officinalis* according to Uchiyama and Mihara (73). Tissue was ground under liquid nitrogen and homogenised in 1:5 (w/v) 0.2 % H₃PO₄. 0.4 ml of the homogenate was mixed with 0.4 ml of 1% thiobarbituric acid (TBA). The TBA forms a complex with MDA. Individual blanks were prepared by replacing the TBA solution with 3 mmol l⁻¹ HCl. The pH of all samples was adjusted to 1.6 with either 10 mol l⁻¹ NaOH or 12 mol l⁻¹ HCl. Afterwards, the samples were heated to 100°C for 15 min. After cooling to room temperature, 1.5 ml butanol were added to samples and blanks, which were then mixed vigorously to transfer the MDA-acid-complex into the butanol phase. This phase was separated by centrifugation and the absorbance of the MDA-acid-complex was measured as the difference between 532 and 600 nm. The concentration was quantified by using the TBA-MDA extinction coefficient ($\epsilon = 156 \text{ mmol l}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

Assay of Lipofuscin: Mantle and brain tissue of *Sepia officinalis* were ground under liquid nitrogen and homogenized in a chloroform-methanol mixture (1:20, w/v). After centrifugation for 10 min at 2000xg (modified after 15, 16, 57), lipofuscin can be found in the chloroform phase. In this phase an emission spectrum between 350 and 550 nm was obtained at an excitation wavelength of 350 nm using a Shimadzu RF 5000 U fluorimeter. The luminescence of the sample was determined at the emission maximum (41) at 435 nm in case of *Sepia officinalis*. Lipofuscin concentrations are expressed as relative fluorescence intensity (RFI) according to Hill and Womersley (28), using 0.1 µg quinine per ml 1 N H₂SO₄ as a standard.

2.4 Statistics

The significance of differences between different age groups of *Sepia officinalis* was tested by one-way analysis of variance (ANOVA) and Student-Newman-Keuls posthoc tests. Data are given as means \pm standard deviation. Linear regressions were calculated to evaluate whether activities of antioxidative enzymes and oxygen consumption rates of different species are correlated. Outliers were eliminated from the data set by use of Pearson and Hartley's test. In all cases, $p < 0.05$ was accepted to indicate a significant difference.

3. Results

As shown in Fig. 1, H_2O_2 concentration decreased in the blood of *Sepia officinalis* from $31.1 \mu\text{mol l}^{-1}$ in the youngest to about half of this level in the oldest animals (12 months), but this change was not significant owing to a high inter-individual variability. Figures 2 and 3 show the activities of the enzymes superoxide dismutase (SOD), catalase, glutathione peroxidase (GPX) and glutathione reductase (GR) in the mantle musculature and gill tissues of *Sepia officinalis* in relation to the age of the animals. For all investigated enzymes higher activities were found in gill tissue compared to mantle tissue. In three of four enzymes, activities changed with increasing age. SOD activity increased twofold in the mantle and sixfold in gill tissue with maximal activities in animals 12 months old (mantle: $157.2 \pm 38.9 \text{ SOD-U g}^{-1}$ fresh weight, gills: $491.5 \pm 234.4 \text{ SOD-U g}^{-1}$ fresh weight; Fig. 2). Likewise, GPX activity in the gill tissue was significantly and 2.5-fold increased in the oldest animals, while only a slight, insignificant rise was seen in the mantle musculature (Fig. 3). Catalase activity in the mantle musculature dropped from $20.6 \pm 25.3 \text{ U g}^{-1}$ fresh weight in the youngest animals to values below detection limits in the oldest animals. A transient increase of activity was found in gill tissue of animals 2.5 and 7 months old. Catalase activity in gills of the oldest animals was significantly below levels found in the youngest animals (Fig. 2). GR activity did not change with age. Values remained around 0.04 U g^{-1} fresh weight in the mantle and around 0.29 U g^{-1} fresh weight in the gill tissue (Fig. 3).

Similar to *Sepia officinalis*, enzyme activities were higher in the gills than in the mantle musculature of *Lolliguncula brevis* (table 1). In general, no catalase or GR activity could be found in the mantle of *Lolliguncula brevis*. Activities were always lower in *Lolliguncula brevis* than in *Sepia officinalis*.

Fig. 4 displays the concentration of malondialdehyde (MDA) in tissues of *Sepia officinalis*. The highest concentration of $234.8 \pm 155.5 \text{ nmol g}^{-1}$ fresh weight were reached in the mantle musculature of animals 10 months old. This increase was significant compared to animals 1.5, 2.5 and 7 months old. In 12 months old *Sepia*, the concentration had returned to low values. Furthermore, a transient decrease in MDA concentrations was found in the gill tissue of 7 months old compared to the youngest animals, while the concentration was significantly increased in older compared to the youngest specimens. Lipofuscin concentrations rose significantly with increasing age in both mantle and gill tissue (Fig. 4).

4. Discussion

4.1 Oxidative damage and antioxidative defense in relation to metabolic rate

In both investigated cephalopods, *Sepia officinalis* and *Lolliguncula brevis*, higher activities of antioxidative enzymes were found in the gill tissues compared to the mantle musculature. This reminds of similar findings in cod, *Gadus morhua* (34) and might be due to the fact, that the gills are exposed to higher (ambient and arterial) oxygen concentrations than other tissues, possibly leading to a higher rate of radical production. Hence, a higher level of protection would be necessary.

Differences in enzyme activities are not only found between mantle and gill tissue of cephalopods but vary in general between tissues as shown in table 1. This should be taken into account when comparing antioxidative status. For some species, a high antioxidative status was found in some internal organs like the digestive gland. The evaluation of the antioxidative capacity of the digestive gland was not possible for the cephalopods since the colour of this tissue interfered with the assay. Nevertheless, the highest level of antioxidative protection found in a species will be used for further comparison assuming that tissues with the highest levels are the most important in antioxidative defense.

Comparison between the two cephalopod species reveals, that enzyme activities in *Lolliguncula brevis* are two to fivefold lower than the maximal activities found in *Sepia officinalis* despite the twofold higher metabolic rate in *Lolliguncula brevis*. Further comparison (table 1) demonstrates that the antioxidative capacity is lower in these two cephalopod species than in the fish species *Gadus morhua* and *Salmo trutta* with metabolic rates similar to *Sepia officinalis*. Even species with much lower metabolic rates like *Mytilus edulis* or *Arenicola marina*, for example, display a higher enzymatic antioxidative capacity than the cephalopods. This already casts some doubt on whether antioxidative defense is correlated with the level of metabolic rate in cephalopods.

Generally, there is no clear trend of a correlation of SOD and catalase activities with metabolic rate among the ectothermic species listed in table 1 (Fig. 5). Similarly, no trend was found for GPX and GR activities. If compared to endothermic species (table 1) the latter display the highest metabolic rates as well as the highest levels of SOD, GPX, and GR activities. Among invertebrates, high levels of antioxidative enzymes were found in intertidal species like *Arenicola marina*, *Heteromastus filiformis*, *Sipunculus nudus* and *Nereis diversicolor*, which can be exposed to very high environmental H₂O₂ concentrations in summer, owing to UV-induced radical formation in surface waters (2, 3). Overall this comparison shows, that among ectothermic species and at least for the two investigated cephalopods *Sepia officinalis* and *Lolliguncula brevis* a high metabolic rate does not necessarily go hand in hand with a high capacity of antioxidative enzymes.

Investigations in several mammalian species showed a clear correlation between oxygen radical production and metabolic rate. The species with the highest metabolic rate produced the highest concentrations of superoxide and H₂O₂ in mitochondria (32). If this holds true also for cephalopods with their relatively high metabolic rate (48), it appears conceivable that a higher degree of oxidative damage develops due to the relatively low antioxidative capacity (see below).

4.2 Antioxidative defense and aging

Changes in antioxidative enzyme activities in tissues of *Sepia officinalis* with increasing age of the animals were not uniform. While SOD and GPX activity increased with age, catalase activity decreased and GR activity remained almost unchanged. The picture arising from the literature is similarly diverse. For example, GR activity in younger *Arenicola marina* was higher than in older lugworms, while in the latter catalase activity was increased (9). In contrast, catalase activity in *Mytilus edulis* decreased with increasing age of the animals (78). In the liver of the frog *Rana perezi*, the activities of catalase, GR and GPX showed no age dependence at all (35), while in the tissues of the housefly *Musca domestica* both SOD and catalase activities were lower in older animals (65). Nonetheless, catalase and SOD seem to influence aging. Simultaneous overexpression of both enzymes resulted in an increased life span of the fruit fly *Drosophila melanogaster* (44) and the nematode *Caenorhabditis elegans* (30, 74). Therefore, decreasing activities of one or both of these enzymes with increasing age may have a detrimental effect on life span.

Changes in antioxidative enzyme activities not only vary between species, but also between tissues of a given species. For example, SOD activity increased in liver and heart of rats with increasing age, while it was lowered in the brain. At the same time, the production of oxygen radicals was increased in older compared to younger rats (67). Such an increase in radical generation during aging was also found in other species (17, 52, 65). Sohal et al. (67) therefore concluded, that the production rate of radicals is more important for aging than a potentially limiting capacity of antioxidative processes. This hypothesis is supported by the finding, that the mitochondrial radical production in several mammalian species is negatively correlated with the maximal life span potential. Animals with the shortest life expectancy and at the same time highest metabolic rates exhibit the highest rates of radical production (32, 66, 68). The authors concluded that faster aging is probably caused by higher radical production rates, resulting in increased cellular damage (58). This is supported by the fact, that the rate of lipofuscin accumulation is correlated with metabolic rate. A faster rate of lipofuscin accumulation was found in *Drosophila melanogaster* with a rise in metabolic rate at increased

temperature compared to animals kept at lower temperatures (57). Similarly, *Musca domestica* with higher metabolic rates at elevated activity levels displayed higher lipofuscin contents than flies with low activity levels (62, 63).

If aging in *Sepia officinalis* is also accompanied by an increased generation of oxygen radicals (see above), the elevation of SOD activity with increasing age (Fig. 2) would compensate to some extent for the expected rise in superoxide formation, but lead to increased H₂O₂ formation. A decrease of catalase activity in old *Sepia officinalis* would then impede the degradation of the intracellular hydrogen peroxide. It seems unlikely that this loss of catalase activity was compensated for by the rise in GPX activity, because GPX activity was 800times lower than maximal catalase activity. It has been suggested that relatively high levels of SOD combined with low levels of catalase and GPX increase not only the intracellular concentration of H₂O₂ but also the formation of hydroxyl radicals (60). Due to the extreme reactivity of the hydroxyl radicals low molecular weight antioxidants may not balance this increase (13, 60). Information on intracellular H₂O₂ levels is not available but the drop in extracellular levels, although not significant, is not in line with these considerations. However, extracellular hydrogen peroxide levels do not necessarily reflect intracellular levels. Although some of the H₂O₂ generated in the cells will presumably diffuse into the blood, part of it might be converted to the reactive hydroxyl radicals in an iron or copper mediated reaction (26, 33).

Hydrogen peroxide concentrations in the blood of *Sepia officinalis* range between a mean of 31.3 $\mu\text{mol l}^{-1}$ in the youngest and about half of this level in the oldest animals. This concentration is in the range of the 15.3 $\mu\text{mol l}^{-1}$ found in the haemolymph of *Astarte borealis*, but much lower than the concentration of 154 $\mu\text{mol l}^{-1}$ in the blood of *Arenicola marina* (1). Hydrogen peroxide can be produced and accumulated in the blood owing to the autoxidation of the respiratory pigment (12, 39) or due to SOD activity as found in *Arenicola marina* and *Astarte borealis* (1) and fish (18). Catalase activity as found in fish blood would minimize H₂O₂ levels. These relationships remain to be investigated in cephalopod blood.

4.3 Indicators of oxidative stress and age

Final evidence for the increase in oxidative stress with increasing age arises from the accumulation of MDA and lipofuscin (26, 33). An increase in MDA levels with age was found in the digestive gland of *Mytilus edulis* (76, 78), while in the liver of *Rana perezi* no age dependent change occurred (35). In liver and kidney of rats MDA concentrations were even lower in older animals (11). Furthermore, seasonal oscillation in MDA levels has been shown for *Mytilus galloprovincialis* (79). In the mantle musculature of *Sepia officinalis* only 10 months old animals displayed a significant increase in MDA

concentration. In the mantle of the oldest animals the concentration was again in the same range as in the youngest ones, whereas MDA levels were still significantly elevated in the gill tissue. Probably, the continuous contact of this tissue with oxygen rich water leads to a higher rate of radical formation and thus to more continuous formation of MDA. The maximal concentration of MDA found in *Sepia officinalis* was 234.8 nmol g⁻¹ fresh weight in the mantle musculature and 494 nmol g⁻¹ fresh weight in the gill tissue. These values are considerably higher than the 81.7 to 89.9 nmol g⁻¹ fresh weight found in the liver of *Rana perezi* (35) or the 45.4 to 75.8 nmol g⁻¹ fresh weight found in the bivalves *Mytilus edulis*, *Adamussium colbecki* and *Mytilus galloprovincialis* (77, 78, 80). The considerably higher concentration of MDA in the tissues of *Sepia officinalis* is probably favoured by the relatively low level of antioxidative protection and the high metabolic rate.

The decrease in MDA concentrations in older animals might be caused by the transformation of MDA into lipofuscin (11). Accordingly, lipofuscin concentrations were significantly elevated in both mantle musculature and brain of old specimens. An age related increase in lipofuscin levels has also been found in several species of crustaceans (42, 55, 56), fish (75) and insects (58, 59, 62). Since lipofuscin levels are not expressed as a definite concentrations but rather in relative units which also differ among studies, a comparison of levels between species is not possible. Furthermore, it seems that lipofuscin does not accumulate continuously over time. In the Australian crayfish *Cherax quadricarinatus* Sheehy et al. (55) found fluctuations in lipofuscin levels, which are most likely related to seasonal oscillations in environmental parameters. A slowing down of lipofuscin accumulation appears to occur in older crustaceans, probably related to a lower metabolic rate in older/larger animals (53, 54). In our study of laboratory maintained cuttlefish, environmental influences were largely excluded. The exponential rise of lipofuscin levels over time (Fig. 4) suggests that lipofuscin accumulation is more uniform than MDA accumulation. This indicates not only that lipofuscin is a better indicator of age related stress than MDA, but also that lipofuscin accumulation and thus oxidative change occur at a larger rate in aged animals. However, although the exponential rise in lipofuscin levels may reflect limits of tolerance to oxidative stress, it is not clear until now which levels of MDA and especially lipofuscin indicate irreversible damage to the organism. Therefore, no definite conclusions can be drawn yet to what extent these processes contribute to the short life expectancies of cephalopods.

4.4 Conclusions and perspectives

Similar to mammalian species (32, 66, 68), the high metabolic rate of cephalopods will correlate with a high rate of radical production. The comparatively low level of enzymatic antioxidant defense correlates with an increased level of oxidative damage, reflected by

much higher levels of MDA in gill and mantle tissue of cephalopods than in other species. It also correlates with an exponential accumulation of lipofuscin indicating oxidative stress to be higher in old specimens. This may be caused by a drop in catalase at elevated SOD activities in older animals, which favours oxygen radical formation and, obviously, oxidative stress. As a corollary, the relatively low antioxidative status found in cephalopods is in line with their short life expectancy. The question arises why antioxidative defense is not brought to a higher level in order to prolong cephalopod life. An explanation may be that the level of antioxidative protection is set to a level just high enough to allow for sufficient life span. Therefore, future research should focus on whether this low level of antioxidative protection is typical for cephalopods and, from a more general point of view, whether it is adjusted to a level just high enough to support the programmed life span of a species.

Acknowledgments:

The excellent technical and logistical help by the staff of the Marine Biomedical Institute is gratefully acknowledged. We would like to thank Dr. T.A. Heming from the Department of Internal Medicine at the University of Texas, Galveston for the possibility to use a fluorimeter in his lab. Special thanks go to Tanja Buchner for help with the methodology. Supported by grants of the Deutsche Forschungsgemeinschaft to H.O. Pörtner (Po 278). Alfred-Wegener-Institut Publication No.

References

1. Abele-Oeschger D, Oeschger R. Hypoxia-induced autoxidation of haemoglobin in the benthic invertebrates *Arenicola marina* (Polychaeta) and *Astarte borealis* (Bivalvia) and the possible effects of sulphide. *J Exp Mar Biol Ecol* 1995;187:63-80.
2. Abele-Oeschger D, Oeschger R, Theede H. Biochemical adaptations of *Nereis diversicolor* (Polychaeta) to temporarily increased hydrogen peroxide levels in intertidal sandflats. *Mar Ecol Prog Ser* 1994;106:101-110.
3. Abele D, Großpietsch H, Pörtner HO. Temporal fluctuations and spatial gradients of environmental Po_2 , temperature, H_2O_2 and H_2S in its intertidal habitat trigger enzymatic antioxidant protection in the capitellid worm *Heteromastus filiformis*. *Mar Ecol Prog Ser* 1998;163:179-191.
4. Aebi HE. Catalase. In: Bergmeyer HU, Bergmeyer J, Graßl M, editors. *Methods of enzymatic analysis*. Vol VIII. Weinheim: Verlag Chemie, 1985:273-286.
5. Arp AJ, Childress JJ, Fisher jr. CR. Metabolic and blood gas transport characteristics of the hydrothermal vent bivalve *Calymene magnifica*. *Physiol Zool* 1984;57:648-662.
6. Blum J, Fridovich I. Enzymatic defense against oxygen toxicity in the hydrothermal vent animals *Riftia pachyptila* and *Calymene magnifica*. *Arch Biochem Biophys* 1984;228:617-620.
7. Boutilier RG. Physiological ecology in cold ocean fisheries: a case study in Atlantic cod. In: Pörtner HO, Playle RC, editors. *Cold Ocean Physiology*. Cambridge: Cambridge University Press, 1998:464-489.
8. Brand AR, Roberts D. The cardiac responses of the scallop *Pecten maximus* (L.) to respiratory stress. *J exp mar Biol Ecol* 1973;13:29-43.
9. Buchner T, Abele-Oeschger D, Theede H. Aspects of antioxidant status in the polychaete *Arenicola marina*: tissue and subcellular distribution, and reaction to environmental hydrogen peroxide and elevated temperature. *Mar Ecol Prog Ser* 1996;143:141-150.
10. Calow P. Fact and theory - an overview. In: Boyle PR, editor. *Cephalopod life cycles* Vol. II. London: Academic Press, 1987:351-365.
11. Cand F, Verdeti J. Superoxide dismutase, glutathione peroxidase, catalase, and lipid peroxidation in the major organs of the aging rats. *Free Rad Biol Med* 1989;7:59-63.
12. Caughey WS, Watkins JA. Oxy radical and peroxide formation by hemoglobin and myoglobin. In: Greenwald RA, editor. *CRC handbook of methods for oxygen radical research*. Boca Raton, FL: CRC Press Inc., 1985:95-104.

13. Chance B, Sies H, Boveris A. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol Rev* 1979;59:527-605.
14. Elstner EF. Der Sauerstoff. Biochemie, Biologie, Medizin, Mannheim Wien Zürich: Wissenschaftsverlag, 1990.
15. Eftershank G. Age structure and cyclical annual size change in the Antarctic krill, *Euphausia superba* Dana. *Polar Biol* 1983;2:189-193.
16. Eftershank G. A new approach to the assessment of longevity in the Antarctic krill, *Euphausia superba*. *J Crust Biol* 1984;4:295-305.
17. Farmer KJ, Sohal RS. Relationship between superoxide anion radical generation and aging in the housefly, *Musca domestica*. *Free Rad Biol Med* 1993;7:23-29.
18. Filho DW, Giulivi C, Boveris A. Antioxidant defences in marine fish. I. Teleosts. *Comp Biochem Physiol* 1993;106C:409-413.
19. Finke E, Pörtner HO, Lee PG, Webber DM. Squid (*Lolliguncula brevis*) life in shallow waters: Oxygen limitation of metabolism and swimming performance. *J exp Biol* 1996;199:911-921.
20. Forsythe JW, DeRusha RH, Hanlon RT. Growth, reproduction and life span of *Sepia officinalis* (Cephalopoda: Mollusca) cultured through seven consecutive generations. *J Zool Lond* 1994;233:175-192.
21. Foster AR, Hall SJ, Houlihan DF. The effects of temperature acclimation on organ/tissue mass and cytochrome c oxidase activity in juvenile cod (*Gadus morhua*). *J Fish Biol* 1993; 42:947-957.
22. Gamble SC, Goldfarb PS, Porte C, Livingstone DR. Glutathione peroxidase and other antioxidant enzyme function in marine invertebrates (*Mytilus edulis*, *Pecten maximus*, *Carcinus maenas* and *Asterias rubens*). *Mar Env Res* 1995;39:191-195.
23. Goldberg DM, Sparner RJ. Glutathione reductase. In: Bergmeyer HU, Bergmeyer J, Graßl M, editors. *Methods of enzymatic analysis*. Vol. III. Weinheim: Verlag Chemie, 1987:258-265.
24. Günzler A, Flohé L. Glutathione peroxidase. In: Greenwald RA, editor. *CRC Handbook of methods for oxygen radical research*. Boca Raton, FL: CRC Press Inc., 1985:285-289.
25. Gutteridge JMC, Halliwell B. The measurement and mechanism of lipid peroxidation in biological system. *Trends Biochem Sci* 1990;15:129-135.
26. Halliwell B, Gutteridge JMC. *Free radicals in biology and medicine*. Oxford: Clarendon Press, 1989.
27. Harman D. A theory based on free radical and radiation chemistry. *J Geront* 1956;11:298-300.

28. Hill KT, Womersley C. Critical aspects of fluorescent age-pigment methodologies: modification for accurate analysis and age assessments in aquatic organisms. *Mar Biol* 1991;109:1-11.
29. Johansen K, Brix O, Kornerup S, Lykkeboe G. Factors affecting O₂-uptake in the cuttlefish, *Sepia officinalis*. *J mar biol Ass UK* 1982;62:187-191.
30. Johnson TE. Increased life-span of age-1 mutants in *Caenorhabditis elegans* and lower Gompertz rate of aging. *Science* 1990;249:908-912.
31. Kristensen E. Ventilation and oxygen uptake by three species of *Nereis* (Annelida: Polychaeta) II. Effects of temperature and salinity changes. *Mar Ecol Progr Ser* 1983;12:299-306.
32. Ku HH, Brunk UT, Sohal RS. Relationship between mitochondrial superoxide and hydrogen peroxide production and longevity of mammalian species. *Free Rad Biol Med* 1993;15:621-627.
33. Leibovitz BE, Siegel BV. Aspects of free radical reactions in biological systems: aging. *J Geront* 1980;35:45-56.
34. Lemaire P, Viarengo A, Canesi L, Livingstone DR. Pro-oxidant and antioxidant processes in gas gland and other tissues of cod (*Gadus morhua*). *J Comp Physiol* 1993;163B:477-486.
35. López-Torres M, Pérez-Campo R, Barja de Quiroga G. Effect of natural ageing and antioxidant inhibition on liver antioxidant enzymes, glutathione system, peroxidation, and oxygen consumption in *Rana perezi*. *J Comp Physiol* 1991;160B:655-661.
36. López-Torres M, Pérez-Campo R, Rojas C, Cadenas S, Barja G. Maximum life span in vertebrates: relationship with liver antioxidant enzymes, glutathione system, ascorbate, urate, sensitivity to peroxidation, true malondialdehyde, in vivo H₂O₂, and basal and maximum aerobic capacity. *Mech Ageing Dev* 1993;70:177-199.
37. Marklund S, Marklund G. Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. *Eur J Biochem* 1974;47:469-479.
38. Messenger JB, Nixon M, Ryan KP. Magnesiumchloride as an anaesthetic for cephalopods. *Comp Biochem Physiol* 1985;82C:203-205.
39. Misra HP, Fridovich I. The generation of superoxide radical during the autoxidation of hemoglobin. *J Biol Chem* 1972;247:6960-6962.
40. Newell RC, Bayne BL. A review of temperature and metabolic acclimation in intertidal marine invertebrates. *Neth J Sea Res* 1973;7:421-433.
41. Nicol S. Some limitations on the use of lipofuscin ageing technique. *Mar Biol* 1987;93:609-614.

42. Nicol S, Stolp M, Hosei GW. Accumulation of fluorescent age pigments in a laboratory population of Antarctic krill *Euphausia superba* Dana. *J exp mar Biol Ecol* 1991;146:153-161.
43. O'Dor RK, Webber DM. The constraints on cephalopods: why squid aren't fish. *Can J Zool* 1986;64:1591-1605.
44. Orr WC, Sohal RS. Extension of life-span by overexpression of superoxide dismutase and catalase in *Drosophila melanogaster*. *Science* 1994;263:1128-1130.
45. Ozawa T. Genetic and functional changes in mitochondria associated with aging. *Physiol Rev* 1997;77:425-464.
46. Pamatmat MM. Catalase activity: a variable affecting H₂O₂ distribution in Kiel Bight. *Meeresforschung* 1990;32:261-275.
47. Pérez-Campo R, López-Torres M, Cadenas S, Rojas C, Barja G. The rate of free radical production as a determinant of the rate of aging: evidence from the comparative approach. *J Comp Physiol* 1998;168:149-158.
48. Pörtner HO. Coordination of metabolism, acid-base regulation and haemocyanin function in cephalopods. In: Pörtner HO, O'Dor RK, MacMillan D, editors. *Physiology of cephalopod molluscs - lifestyle and performance adaptations*. Basel: Gordon and Breach Publishers, 1994:131-148.
49. Pörtner HO. Oxygen limitation of metabolism and performance in pelagic squid. *Proceedings of the 30th European Marine Biological Symposium*, 1997;45-56.
50. Pörtner HO, Heisler N, Grieshaber MK. Oxygen consumption and mode of energy production in the intertidal worm *Sipunculus nudus* L.: definition and characterization of the critical Po₂ for an oxyconformer. *Respir Physiol* 1985;59:361-377.
51. Reiss U, Gershon D. Rat-liver superoxide dismutase. *Eur J Biochem* 1976;63:617-623.
52. Sawada M, Carlson JC. Changes in superoxide radical and lipid peroxide formation in the brain, heart and liver during the lifetime of the rat. *Mech Ageing Dev* 1987;41:125-137.
53. Sheehy MRJ. Individual variation in, and the effect of rearing temperature and body size on, the concentration of fluorescent morphological lipofuscin in the brains of freshwater crayfish, *Cherax cuspidatus* (Crustacea: Parastacidae). *Comp Biochem Physiol* 1990;96A:281-286.
54. Sheehy MRJ. Lipofuscin age-pigment accumulation in the brains of ageing field- and laboratory-reared crayfish *Cherax quadricarinatus* (von Martens) (Decapoda: Parastacidae). *J Exp Mar Biol Ecol* 1992;161:79-89.

55. Sheehy MRJ, Greenwood JG, Fielder DR. More accurate chronological age determination of crustaceans from field situations using the physiological age marker, lipofuscin. *Mar Biol* 1994;121:237-245.
56. Sheehy M, Cameron E, Marsden G, McGrath J. Age structure of female giant tiger prawns *Penaeus monodon* as indicated by neuronal lipofuscin concentration. *Mar Ecol Prog Ser* 1995;117:59-63.
57. Sheldahl JA, Tappel AL. Fluorescent products from aging *Drosophila melanogaster*: an indicator of free radical lipid peroxidation damage. *Exp Geront* 1974;9:43-41.
58. Sohal RS. Metabolic rate, aging, and lipofuscin accumulation. In: Sohal RS, editor. *Age pigments*. Amsterdam: Elsevier/North-Holland Biomedical Press, 1981:303-316.
59. Sohal RS. Relationship between metabolic rate, lipofuscin accumulation and lysosomal enzyme activity during aging in the adult housefly, *Musca domestica*. *Exp Geront* 1981;16:347-355.
60. Sohal RS. Hydrogen peroxide production by mitochondria may be a marker of aging. *Mech Ageing Dev* 1991;60:189-198.
61. Sohal RS, Allen RG. Relationship between oxygen metabolism, aging and development. *Adv Free Rad Biol Med* 1986;2:117-160.
62. Sohal RS, Donato H. Effects of experimentally altered life spans on the accumulation of fluorescent age pigment in the housefly, *Musca domestica*. *Exp Geront* 1978;13:335-341.
63. Sohal RS, Donato H. Effect of experimental prolongation of life span on lipofuscin content and lysosomal enzyme activity in the brain of the housefly, *Musca domestica*. *J Geront* 1979;34:489-496.
64. Sohal RS, Weindruch R. Oxidative stress, caloric restriction, and aging. *Science* 1996;273:59-63.
65. Sohal RS, Farmer KJ, Allen RG, Cohen NR. Effect of age on oxygen consumption, superoxide dismutase, catalase, glutathione, inorganic peroxides and chloroform-soluble antioxidants in the adult male housefly, *Musca domestica*. *Mech Ageing Dev* 1983;24:185-195.
66. Sohal RS, Svensson I, Sohal BH, Brunk UT. Superoxide anion radical production in different animal species. *Mech Ageing Dev* 1989;49:129-135.
67. Sohal RS, Arnold LA, Sohal BH. Age-related changes in antioxidant enzymes and prooxidant generation in tissues of the rat with special reference to parameters in two insect species. *Free Rad Biol Med* 1990;10:495-500.
68. Sohal RS, Svensson I, Brunk UT. Hydrogen peroxide production by liver mitochondria in different species. *Mech Ageing Dev* 1990;53:209-215.

69. Sommer A. Mechanismen und Grenzen der Temperaturanpassung beim Pierwurm *Arenicola marina* (L.). Ber Polarforsch 1998;285.
70. Stadtman ER. Protein oxidation and aging. Science 1992;257:1220-1224.
71. Storey KB. Oxidative stress: animal adaptations in nature: Braz J Med Biol Res 1996;29:1715-1733
72. Taylor EW, Butler PJ, Al-Wassia A. Some responses of the shore crab, *Carcinus maenas* (L.) to progressive hypoxia at different acclimation temperatures and salinities. J Comp Physiol 1977;122 B:39-42.
73. Uchiyama M, Mihara M. Determination of malonaldehyde precursor in tissues by thiobarbituric acid test. Analytical Biochem 1978;86:271-278.
74. Vanfleteren JR. Oxidative stress and ageing in *Caenorhabditis elegans*. Biochem J. 1993;292:605-608.
75. Vernet M, Hunter JR, Vetter RD. Accumulation of age pigments (lipofuscin) in two cold-water fishes. Fish Bull 1988;86:401-407.
76. Viarengo A, Pertica M, Canesi L, Accomando R, Mancinelli G, Orunesu M. Lipid peroxidation and level of antioxidant compounds (GSH, vitamin E) in the digestive glands of mussels of three different age groups exposed to anaerobic and aerobic conditions. Mar Env Res 1989;39:191-195.
77. Viarengo A, Canesi L, Pertica M, Poli G, Moore MN, Orunesu M. Heavy metal effects on lipid peroxidation in the tissues of *Mytilus galloprovincialis* Lam. Comp Biochem Physiol 1990;97C:37-42.
78. Viarengo A, Canesi L, Pertica M, Livingstone DR, Orunesu M. Age-related lipid peroxidation in the digestive gland of mussels: the role of the antioxidant defense systems. Experientia 1991;47:454-457.
79. Viarengo A, Canesi L, Pertica M, Livingstone DR. Seasonal variations in the antioxidant defence systems and lipid peroxidation of the digestive gland of mussels. Comp Biochem Physiol 1991;100C:187-190.
80. Viarengo A, Canesi L, Garcia Martinez P, Peters LD, Livingstone DR. Pro-oxidant and antioxidant defence systems in the tissues of the Antarctic scallop (*Adamussium colbecki*) compared with the Mediterranean scallop (*Pecten jacobaeus*). Comp Biochem Physiol 1995;111B:119-126.
81. von Boletzky S. *Sepia officinalis*. In: Boyle PR, editor. Cephalopod life cycles Vol. I. London: Academic Press, 1983:31-52.

Table 1 Comparison of antioxidative enzyme activities and the oxygen consumption rates of selected species. T is the temperature at which $\dot{M}O_2$ was determined. (* - data were converted from U mg⁻¹ protein to U g⁻¹ fresh weight with the assumption of a mean protein concentration of about 150 mg protein g⁻¹ fresh weight as found for fish (21); DG - digestive gland; HP - hepatopancreas; BWM - body wall musculature; CG - chloragoc; nd - no data available; *Sepia officinalis* n = 3-11; *Lolliguncula brevis* n = 4-6; values are means \pm SD; References for oxygen consumption: a - 29; b - 19; c - 40; d - 8; e - 72; f - 5; g - 50; h - 69; i - 31; j - 7)

Species	Tissue	SOD (SOD-U g ⁻¹ fresh wt.)	Catalase (U g ⁻¹ fresh wt.)	GPX (U g ⁻¹ fresh wt.)	GR (U g ⁻¹ fresh wt.)	$\dot{M}O_2$ (μ mol O ₂ g ⁻¹ h ⁻¹)	T (°C)	Reference
<i>Sepia officinalis</i>	gills	491.5 \pm 234.4	416.0 \pm 195.2	0.26 \pm 0.03	0.30 \pm 0.06	8.9 ^a	17	this study
	mantle	157.2 \pm 38.9	20.6 \pm 25.3	0.03 \pm 0.00	0.04 \pm 0.03			
<i>Lolliguncula brevis</i>	gills	99.4 \pm 28.9	255.7 \pm 106.9	0.04 \pm 0.04	0.08 \pm 0.02	21.0 ^b	20	this study
	mantle	88.0 \pm 25.1	0.0 \pm 0.0	0.01 \pm 0.01	0.00 \pm 0.00			
Mussel (<i>Mytilus edulis</i>)	gills	nd	nd	0.60 \pm 0.03	nd			22
	muscle	nd	nd	0.72 \pm 0.24		0.14 ^c	20	
	DG	615 \pm 52	5870 \pm 1060	0.60 \pm 0.15				
Scallop (<i>Pecten maximus</i>)	gills	nd	nd	0.45 \pm 0.15	nd			22
	muscle	nd	nd	0.29 \pm 0.12		8.9 - 11.2 ^d	10	
	DG	324 \pm 6	36100 \pm 600					
Shore crab (<i>Carcinus maenas</i>)	gills	nd	nd	0.02 \pm 0.01	nd			22
	muscle	nd	nd	0.11 \pm 0.02		1.8 \pm 0.1 ^e	18	
	HP	173 \pm 10	280 \pm 110					
Clam* (<i>Calyptogena magnifica</i>)	gills	495	0	0.14	nd	1.6 \pm 0.8 ^f	8	6
	muscle	795	0	0.26				

Table 1 - continued Comparison of antioxidative enzyme activities and the oxygen consumption rates of selected species. T is the temperature at which $\dot{M}O_2$ was determined. (* - data were converted from U mg⁻¹ protein to U g⁻¹ fresh weight with the assumption of a mean protein concentration of about 150 mg protein g⁻¹ fresh weight as found for fish (21); DG - digestive gland; HP - hepatopancreas; BWM - body wall musculature; CG - chloragog; nd - no data available; *Sepia officinalis* n = 3-11; *Lolliguncula brevis* n = 4-6; values are means \pm SD; References for oxygen consumption: a - 29; b - 19; c - 40; d - 8; e - 72; f - 5; g - 50; h - 69; i - 31; j - 7)

Species	Tissue	SOD (SOD-U g ⁻¹ fresh wt.)	Catalase (U g ⁻¹ fresh wt.)	GPX (U g ⁻¹ fresh wt.)	GR (U g ⁻¹ fresh wt.)	$\dot{M}O_2$ (μ mol O ₂ g ⁻¹ h ⁻¹)	T (°C)	Reference
Intertidal worm* (<i>Sipunculus nudus</i>)	BWM	2540 \pm 1250	996 \pm 275	nd	nd	0.7 - 0.8g	15	Buchner, Abele, Pörtner, unpub.
Lugworm* (<i>Arenicola marina</i>)	BWM	860 \pm 423	1210 \pm 360	nd	0.56 \pm 0.18	1.31 \pm	10	9
Polychaete (<i>Heteromastus filiformis</i>)	CG	2670 \pm 675	69300 \pm 34500		4.95 \pm 1.35	1.01h	10	3
Polychaete* (<i>Nereis diversicolor</i>)	whole animal	2170 \pm 610	1190 \pm 260			0.3 \pm 0.1	10	3
Polychaete* (<i>Nereis diversicolor</i>)	whole animal	660	5070	nd	nd	6.3i	10	2
Cod (<i>Gadus morhua</i>)	gills	1640 \pm 140	4140 \pm 710	2.88 \pm 0.44	nd	3.9j	15	34
Trout (<i>Salmo trutta</i>)	muscle	175 \pm 17	260 \pm 50	0.30 \pm 0.06				
Frog (<i>Rana perezi</i>)	liver	2700	16700	10	0.15	10.1	25	36
Guinea pig	liver	8200	110000	10	1.0	3.0 \pm 0.2	25	36
Rat (Wistar)	liver	25000	90000	40	4.0	30.4 \pm 1.2	25	36
Mouse (OF1)	liver	17700	76700	220	6.0	35.2 \pm 2.0	25	36
Pigeon (<i>Columbia livia</i>)	liver	nd	26700	nd	3.8	115.5	25	36
Pigeon (<i>Columbia livia</i>)	liver	29100	26700	10	3.8	67 \pm 4.3	25	36

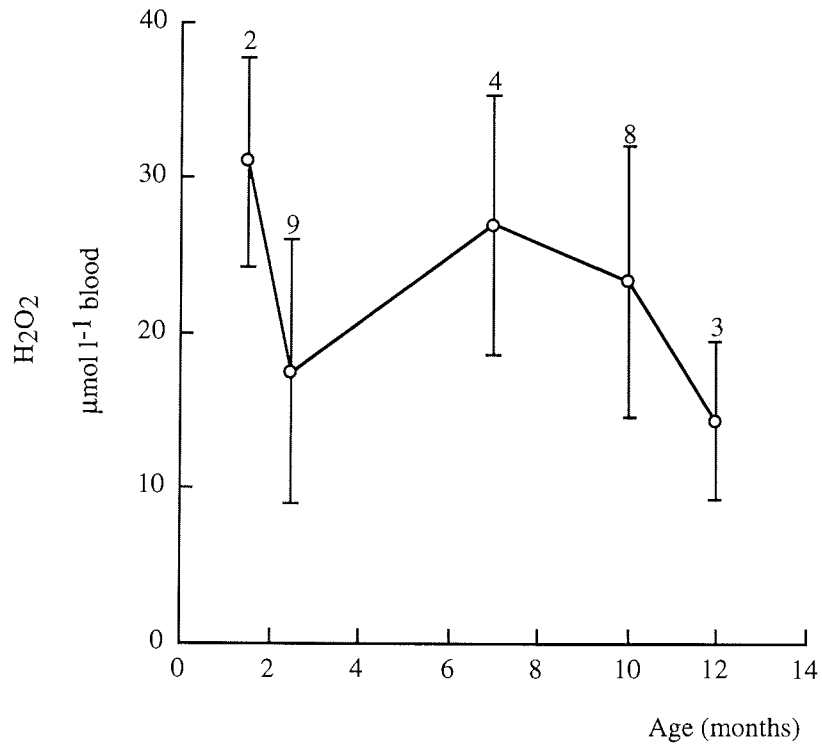


Fig. 1 Concentration of hydrogen peroxide in the blood of *Sepia officinalis* in relation to the age of the animals (numbers on top of bars = n; values are means \pm SD, or \pm range for n = 2).

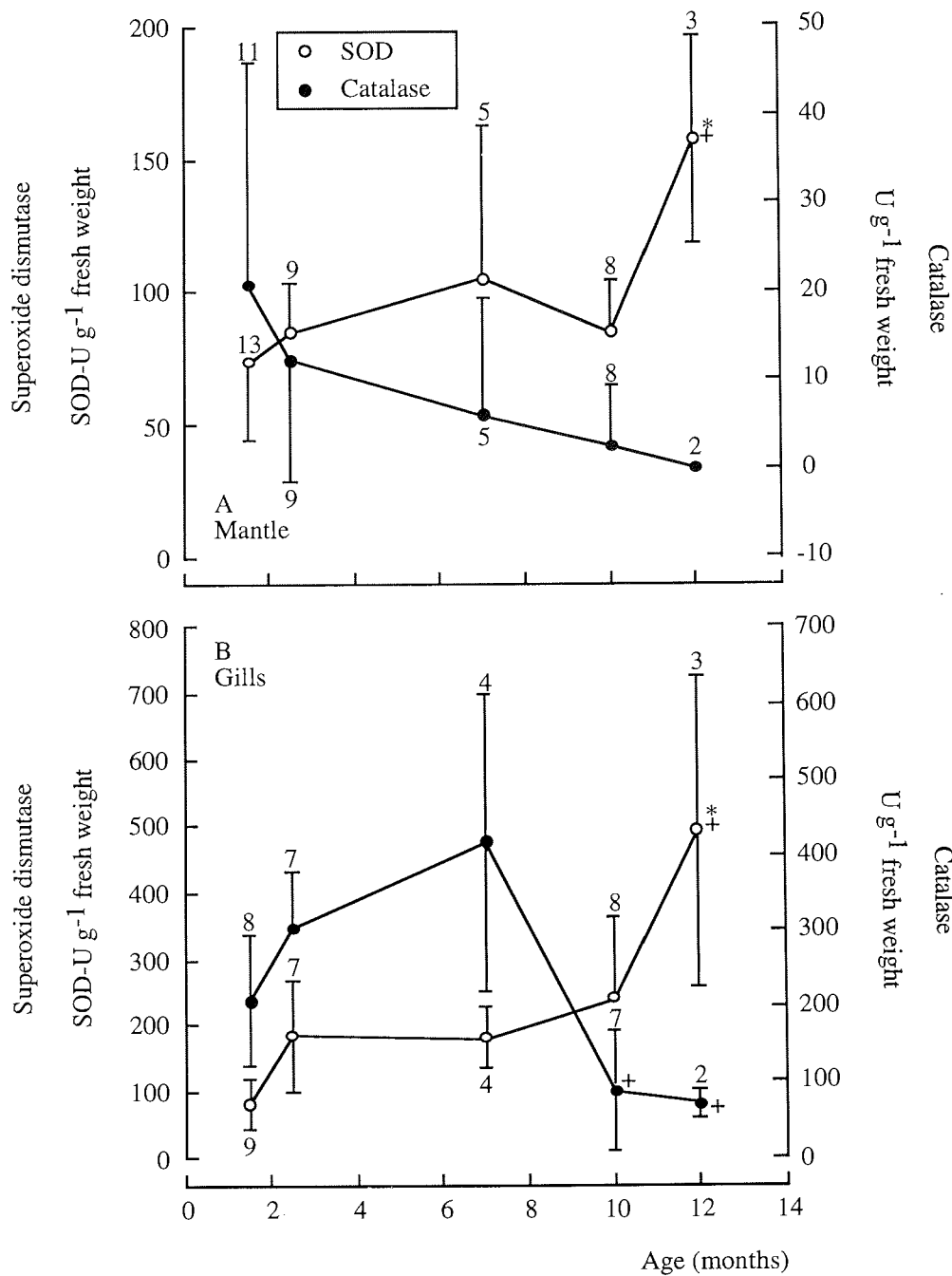


Fig. 2 Activities of superoxide dismutase and catalase in (A) mantle musculature and (B) gill tissue of different age groups of *Sepia officinalis* (* - significantly different from animals 1.5 months old; + significantly different from animals 2.5 months old; for further explanations see Fig. 1).

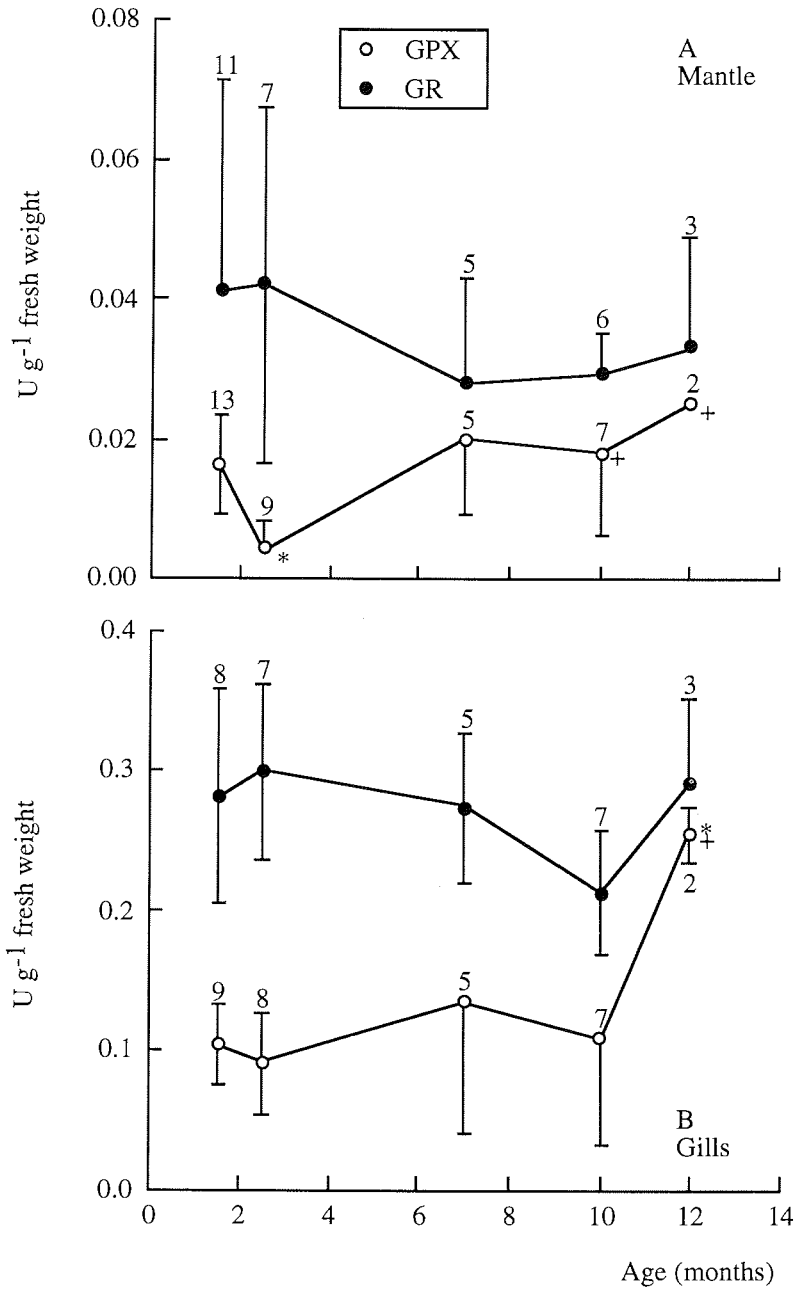


Fig. 3 Activities of glutathione peroxidase and glutathione reductase in (A) mantle musculature and (B) gill tissue of different age groups of *Sepia officinalis* (* - significantly different from animals 1.5 months old; + - significantly different from animals 2.5 months old; for further explanation see Fig. 1).

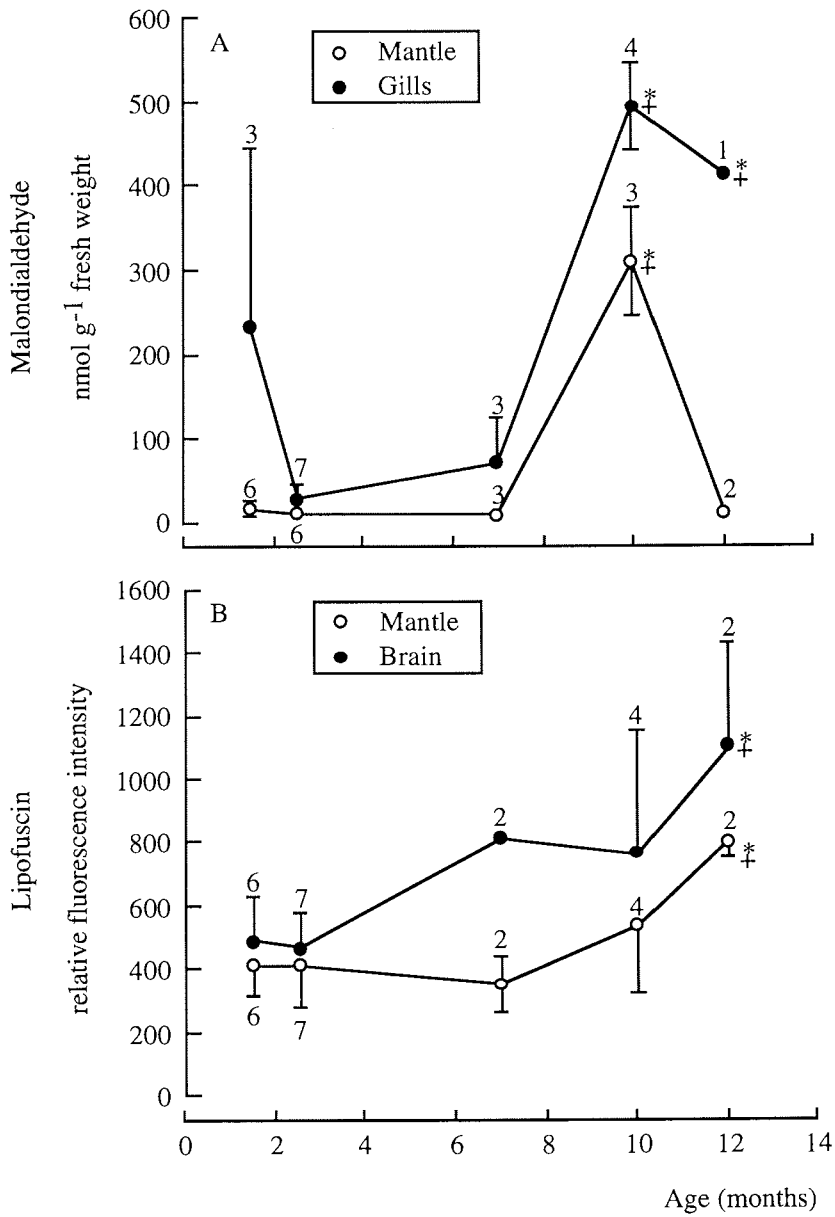


Fig. 4 The concentration of (A) malondialdehyde in mantle and gill tissue and (B) lipofuscin in mantle and brain tissue of *Sepia officinalis* in relation to the age of the animals (* - significantly different from animals 1.5 months old; † - significantly different from animals 2.5 and 7 months old; for further explanations see Fig. 1).

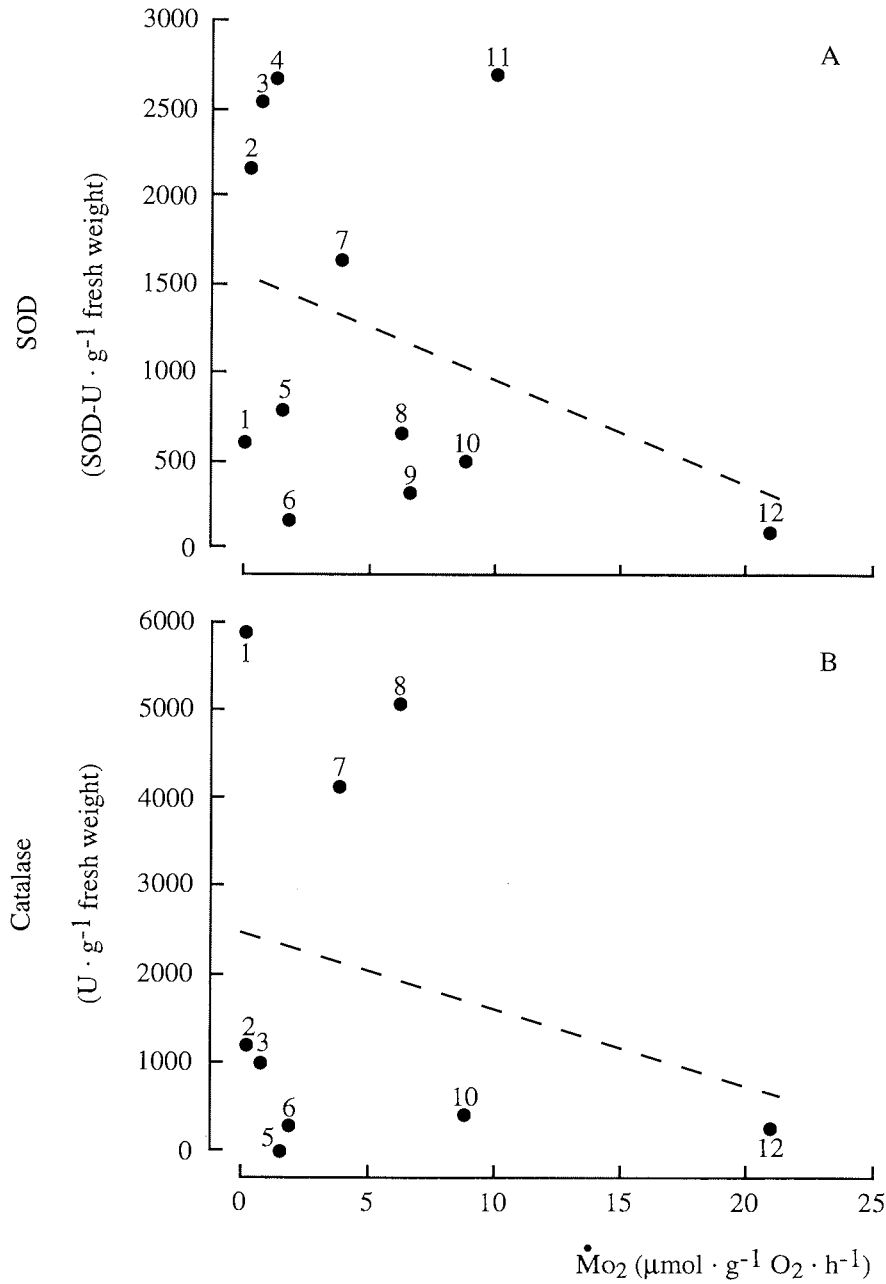


Fig. 5 Activities of superoxide dismutase and catalase in ectothermic aquatic species in relation to their metabolic rate. (Error bars omitted for the sake of clarity; see table 1 for SD and references; SOD: $r = 0.30$; Catalase: $r = 0.24$; 1 - *Mytilus edulis*, 2 - *Heteromastus filiformis*, 3 - *Sipunculus nudus*, 4 - *Arenicola marina*, 5 - *Calypptogena magnifica*, 6 - *Carcinus maenas*, 7 - *Gadus morhua*, 8 - *Nereis diversicolor*, 9 - *Pecten maximus*, 10 - *Sepia officinalis*, 11 - *Salmo trutta*, 12 - *Loliguncula brevis*)

4. Diskussion

Die vorliegende Arbeit behandelt Untersuchungen zum Einfluß von Temperatur und Sauerstoffverfügbarkeit auf den Energiestoffwechsel von Cephalopoden verschiedener geographischer Breiten. Sie beschäftigt sich auch mit der Bedeutung des Faktors Temperatur für den Sauerstofftransport am Hämocyanin und mit Untersuchungen zum enzymatischen Oxidationsschutz sowie zum Auftreten oxidativer Schäden mit besonderem Hinblick auf die hohen Stoffwechselraten von Cephalopoden. Im folgenden werden die wichtigsten Ergebnisse zusammenfassend diskutiert. Eine detaillierte Diskussion der einzelnen Daten ist in Abschnitt 3 in den entsprechenden Veröffentlichungen zu finden.

4.1 Der Einfluß von Hypoxie und Temperatur auf den Stoffwechsel von Cephalopoden

4.1.1 Anaerober Stoffwechsel als Indikator für kritische Umweltbedingungen

Cephalopoden sind in den verschiedensten marinen Lebensräumen zu finden, die sich in ihren abiotischen Faktoren wie Temperatur, Salinität und Sauerstoffverfügbarkeit unterscheiden. Der Kalmar *Lolliguncula brevis* kann in seinem Lebensraum jahreszeitlich bedingt Temperaturen zwischen 11 und 31 °C ausgesetzt sein (Gunter 1950; Dragovich und Kelly 1962). Außerdem kommt es besonders in den Sommermonaten in Küstengewässern und Ästuaren des Verbreitungsgebietes dieses Kalmaren zur Bildung hypoxer Wasserschichten (Livingston et al. 1976; Harper et al. 1981; Pokryfki und Randall 1987). Tatsächlich wurde *Lolliguncula brevis* in solchen Wasserschichten beobachtet. Die höchste Bestandsdichte trat in Wasserschichten mit einem P_{O_2} zwischen 4,3 und 8,6 kPa auf, jedoch waren auch bei einem P_{O_2} von 2,1 kPa noch Tiere zu finden (Vecchione 1991a, b; Vecchione und Roper 1991). In Experimenten wurde in der Mantelmuskulatur von *Lolliguncula brevis* eine Akkumulation von Octopin, Glycerin-3-Phosphat und Acetat nachgewiesen, wenn der P_{O_2} im Inkubationswasser unter 7,9 bis 9,4 kPa sank (Publikation I). Diese Stoffe werden im Cytoplasma bzw. in den Mitochondrien gebildet, wenn der P_{O_2} im Gewebe unter einen kritischen Sauerstoffpartialdruck (P_c) sinkt und aerobe Prozesse nicht mehr zur Energiegewinnung ausreichen (Zebe 1975; Pörtner et al. 1984). Das Einsetzen des anaeroben Stoffwechsels ist eine Möglichkeit, den P_c zu bestimmen. Bei oxyregulierenden Tieren, zu denen auch diese Art zählt (Wells et al. 1988), ist der P_c auch als der Sauerstoffpartialdruck sichtbar, bei dem diese Tiere ihren

Sauerstoffverbrauch nicht mehr unabhängig vom Sauerstoffpartialdruck in der Umgebung regulieren können (Pörtner und Grieshaber 1993). Oberhalb des P_c wird bei oxy-regulierenden Tieren trotz sinkendem P_{O_2} im Umgebungswasser der Sauerstoffverbrauch z. B. durch Erhöhung der Ventilationsrate oder der Herzfrequenz zunächst konstant gehalten (Pörtner und Grieshaber 1993). Bei *Lolliguncula brevis* trat eine vorübergehende Erhöhung des Sauerstoffverbrauches auf, als der P_{O_2} im Wasser auf ca. 7,7 kPa abnahm (Wells et al. 1988). Diese Änderung korreliert mit dem in der vorliegenden Arbeit beobachtetem Einsetzen des anaeroben Stoffwechsels.

Vergleicht man den kritischen P_{O_2} von 7,9 bis 9,4 kPa mit dem anderer Arten (siehe Tabelle 1), so ergibt sich ein vergleichsweise hoher P_c für *Lolliguncula brevis*. Die Begründung dafür könnte der weitaus höhere Sauerstoffverbrauch von *Lolliguncula brevis* im Vergleich mit anderen aquatischen Organismen sein (Tabelle 1). So weisen *Octopus vulgaris* und *Nautilus pompilius* neben niedrigeren Stoffwechselraten auch einen niedrigeren P_c als *Lolliguncula brevis* auf (Wells 1990; Wells und Wells 1995). Ein entsprechender Zusammenhang zwischen Stoffwechselrate und P_c konnte auch im Vergleich mehrerer Krebsarten untereinander beobachtet werden (Torres et al. 1994). Eine hohe Stoffwechselrate könnte bedeuten, daß der Sauerstoffverbrauch nur in einem geringeren P_{O_2} -Bereich konstant gehalten werden kann und der P_c somit bei relativ hohen Sauerstoffpartialdrücken zu finden ist. Daher erklärt möglicherweise die schon unter Kontrollbedingungen hohe Stoffwechselrate von *Lolliguncula brevis* (Finke et al. 1996) den hohen kritischen P_{O_2} dieser Art.

Im Hinblick auf die von Vecchione (1991a) mit Hilfe eines ROV (remotely operated vehicle) gemachten Beobachtungen, daß die Kalmare selbst bei einem Sauerstoffpartialdruck von 2,1 kPa noch recht aktiv waren, scheint dieses Ergebnis überraschend. Außerdem wurde in Untersuchungen an Fischen gezeigt, daß bei hypoxietoleranten Arten der P_c gegenüber hypoxiesensitiven Arten zu niedrigeren Sauerstoffpartialdrücken verschoben ist (Beamish 1964). Aus diesen Gründen hätte man zunächst einen niedrigeren P_c für *Lolliguncula brevis* erwartet. Jedoch zeigte sich in Inkubationen dieser Tiere bei einem P_{O_2} von $2,8 \pm 0,3$ kPa (extreme Hypoxie) schon nach 15 Minuten eine signifikante Akkumulation von Octopin (Publikation I). Daher ist es denkbar, daß die von Vecchione (1991a) in hypoxen Wasserschichten beobachteten Tiere teilweise anaerob waren.

Tabelle 1 Kritischer Sauerstoffpartialdruck (P_c) und Stoffwechselraten verschiedener Arten unter Kontrollbedingungen bei Temperaturen (T) im Bereich von 20 °C. Der Sauerstoffverbrauch wurde unter normoxen Bedingungen bestimmt mit Ausnahme von *Nautilus pompilius*, für den die Messung bei 13,3 kPa durchgeführt wurde (aus Publikation I).

Art	P_c (kPa) bestimmt durch		Sauerstoff- verbrauch ($\mu\text{mol O}_2 \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$)	T (°C)	Quelle
	Sauerstoff- verbrauchs- messungen	aerober/ anaerober Übergang			
Fische:					
<i>Lumpenus lamprataeformis</i>	6,7 - 8,0	< 8,6	$2,7 \pm 0,4$	15	Pelster et al. (1988)
<i>Solea solea</i>		2,4 - 4,0		19	van den Thillart et al. (1994)
<i>Lepomis macrochirus</i>		1,2 - 2,5		20	Burton und Heath (1980)
<i>Ictalurus nebulosus</i>		1,2 - 2,5		20	Burton und Heath (1980)
Evertebraten:					
<i>Scapharca inaequalvis</i>	4,0 - 7,0	4,0 - 7,0	$2,3 \pm 0,8$	20	van den Thillart et al. (1992)
<i>Carcinus maenas</i>	8,0		$1,8 \pm 0,1$	18	Taylor et al. (1977)
<i>Octopus vulgaris</i>	$6,7^1$		$3,1 \pm 1,4^2$	19^1 22^2	Wells und Wells (1995) ¹ Houlihan et al. (1982) ²
<i>Nautilus pompilius</i>	$2,7^3$		$1,0^4$	18	Wells (1990) ³ Boutilier et al. (1996) ⁴
<i>Lolliguncula brevis</i>	$7,7^5$	7,9 - 9,4	$21,0^6$	20	Wells et al. (1988) ⁵ Finke et al. (1996) ⁶

Das Einsetzen des anaeroben Stoffwechsels kann nicht nur als Indikator für eine Sauerstoffmangelsituation in der Umgebung dienen, sondern kann ebenfalls zur Definition sowohl hoher als auch niedriger kritischer Temperaturen (T_c) herangezogen werden. Diesen Zusammenhang zeigten Untersuchungen am Spritzwurm *Sipunculus nudus* und am Wattwurm *Arenicola marina*, bei denen sowohl beim Unterschreiten einer niedrigen als auch beim Überschreiten einer hohen kritischen Temperatur die anaeroben Endprodukte Acetat, Propionat sowie verschiedene Opine (Octopin, Alanopin und Strombin)

akkumulierten (Zielinski und Pörtner 1996; Sommer et al. 1997). Auch bei dem Kalmar *Lolliguncula brevis* und dem antarktischen Oktopoden *Pareledone charcoti* war bei hohen Temperaturen eine Akkumulation von anaeroben Stoffwechselprodukten in der Mantelmuskulatur nachweisbar. Dadurch ließen sich die oberen kritischen Temperaturen für beide Arten definieren. Für den Warmwasser-Kalmar *Lolliguncula brevis* lag dieser Wert zwischen 26 bis 31 °C, für den antarktischen Oktopoden *Pareledone charcoti* im Bereich von 8 bis 10 °C (Publikation II). Jenseits der kritischen Temperaturen scheint jedoch nicht die Verfügbarkeit von Sauerstoff aus der Umgebung limitierend zu sein. Stattdessen ist wahrscheinlich eine nicht ausreichende Sauerstoffaufnahme oder -verteilung als Ursache für die Anaerobiose anzusehen (siehe Übersichtsartikel Pörtner et al. 1998). Für diese Annahme spricht, daß bei *Lolliguncula brevis* wie auch bei einigen anderen Arten (Seymour 1972; Kristensen 1983) die Ventilationsaktivität nicht kontinuierlich mit der Temperatur zunimmt, sondern bei Erreichen eines Schwellenwertes eingeschränkt wird. So erreichte die Ventilationsaktivität von *Lolliguncula brevis* bei 25 °C ein Plateau, wenn die Temperatur von 14 auf 31 °C angehoben wurde (Wells et al. 1988).

Interessanterweise liegt die obere kritische Temperatur von *Lolliguncula brevis* gerade oberhalb der natürlichen Temperaturen im Lebensraum. Wie schon im Hinblick auf die Lage des kritischen PO_2 von *Lolliguncula brevis* erwähnt wurde (siehe oben), könnte auch hier der schon unter Kontrollbedingungen hohe Sauerstoffbedarf dieses Kalmaren (Finke et al. 1996) die Toleranz gegenüber hohen Temperaturen einschränken. Anders als bei *Lolliguncula brevis* liegt die kritische Temperatur von *Pareledone charcoti* mit 8 bis 10 °C deutlich über den Umgebungstemperaturen, die diese Art normalerweise in ihrem Lebensraum erlebt. Die Letaltemperatur des antarktischen Brachiopoden *Liothyrella uva* ist dagegen bereits bei 4,5 °C erreicht (Peck 1989), während die kritische Temperatur der antarktischen Muschel *Limopsis marionensis* bei 2 bis 4 °C zu finden ist (Pörtner et al. 1999a). Mit diesen niedrigen Schwellenwerten geht eine inaktive, sessile Lebensweise einher (Peck 1989; Hain 1990). Im Gegensatz dazu wurden für aktivere antarktische Arten wie den Fisch *Lepidonotothen nudifrons*, die grabende Muschel *Laternula elliptica* und die im Gezeitenbereich vorkommende Napfschnecke *Nacella concinna* eine kritische bzw. letale Temperatur im Bereich von 9 °C bestimmt (Peck 1989; H.O. Pörtner, I. Hardewig, L.S. Peck, unveröffentlichte Daten). Obwohl nur wenig über die Lebensweise von *Pareledone charcoti* bekannt ist, kann eine aktivere Lebensweise als die der sessilen Arten *Liothyrella uva* und *Limopsis marionensis* angenommen werden. Diese Ergebnisse deuten für antarktische marine Tiere darauf hin, daß die Lage der kritischen Temperatur mit ihrem Aktivitätsniveau zusammenhängt.

4.1.2 Säure-Basen-Haushalt in Abhängigkeit von der Temperatur

Enzymatische Reaktionen und damit auch der Energiestoffwechsel stehen in engem Zusammenhang mit dem Säure-Basen-Haushalt (Pörtner 1989). Änderungen des pH-Wertes können die Geschwindigkeit enzymatischer Reaktionen beeinflussen (Hochachka und Somero 1984; Somero 1997). In einigen Studien wurde eine Verschiebung des intrazellulären pH-Wertes (pH_i) bei sich ändernden Temperaturen beobachtet (Reeves 1972; Malan et al. 1976). Nach der Alphastat-Hypothese (Reeves 1972) erfolgt die Regulation des pH-Wertes bei einer Temperaturänderung in der Weise, daß eine konstante Dissoziation der Imidazolgruppen von Histidin-Seitenketten in Proteinen erreicht wird (Howell et al. 1973; Malan et al. 1976). Dadurch wird der Protonierungszustand (α) der Imidazolgruppe, der für die Funktion vieler Enzyme von besonderer Bedeutung ist, konstant gehalten und damit auch die Geschwindigkeit enzymatischer Reaktionen (Hazel et al. 1978; Somero 1981, 1983; Hochachka und Somero 1984). Eine der Alphastat-Hypothese entsprechende Verschiebung des pH_i ($\Delta\text{pH}_i/\Delta T = -0.017$) in Abhängigkeit von der Temperatur wurde bei verschiedenen Tieren gefunden, z. B. in der Muskulatur des Frosches *Rana catesbeiana* und der Kröte *Bufo marinus* oder auch im Blut der Forelle *Salmo trutta* (Malan et al. 1976; Butler und Day 1993). Unterhalb der oberen kritischen Temperatur konnte dieser Zusammenhang ebenfalls in der Mantelmuskulatur des antarktischen Oktopoden *Pareledone charcoti* beobachtet werden. Bei *Lolliguncula brevis* folgten die temperaturabhängigen pH-Änderungen nicht eindeutig der Alphastat-Hypothese (Publikation II). Dies ist möglicherweise zusammen mit der Fluktuation des intrazellulären Pco_2 (siehe Abb. 1 in Publikation II) auf die kurze Inkubationszeit von nur einer Stunde zurückzuführen, da die Alphastat-Regulation des pH_i zeitabhängig erfolgt (Sartoris und Pörtner 1997).

Eine Erhöhung der Inkubationstemperatur über die kritische Temperatur hinaus bewirkte bei beiden untersuchten Cephalopodenarten einen signifikant erniedrigten pH_i -Wert verglichen mit den Kontrollwerten. Desweiteren war der pH_i in der Mantelmuskulatur von *Pareledone charcoti* um 0,30 pH-Einheiten bzw. bei *Lolliguncula brevis* um 0,37 pH-Einheiten gegenüber den Werten gerade unterhalb des T_c (8 bzw. 26 °C) erniedrigt (Publikation II). Diese Änderung ist ein Hinweis darauf, daß auch die pH-Regulation von extremen Temperaturen beeinflusst wird. In eurythermen Tieren erfolgt die Änderung des pH-Wertes mit der Temperatur sowohl durch passive Dissoziationsvorgänge, die auf temperaturbedingte Änderungen der pK-Werte körpereigener Puffersysteme zurückzuführen sind, als auch durch aktive Säure-Basen-Regulation (van Dijk et al. 1997; Sartoris und Pörtner 1997). Die aktive Regulation erfolgt in wasseratmenden Tieren vor allem

über Ionenaustauschprozesse, da einer Regulation über das CO₂-Bikarbonat-System aufgrund der geringen Unterschiede zwischen dem körpereigenen CO₂-Partialdruck (Pco₂) und dem Pco₂ in der Umgebung Grenzen gesetzt sind (Pörtner und Sartoris 1998). Dementsprechend war der Anteil der unter Temperaturstreß respiratorisch produzierten Protonen (ΔH^+_{resp}) an der in beiden Cephalopodenarten beobachteten Azidose gering (Abb. 4A).

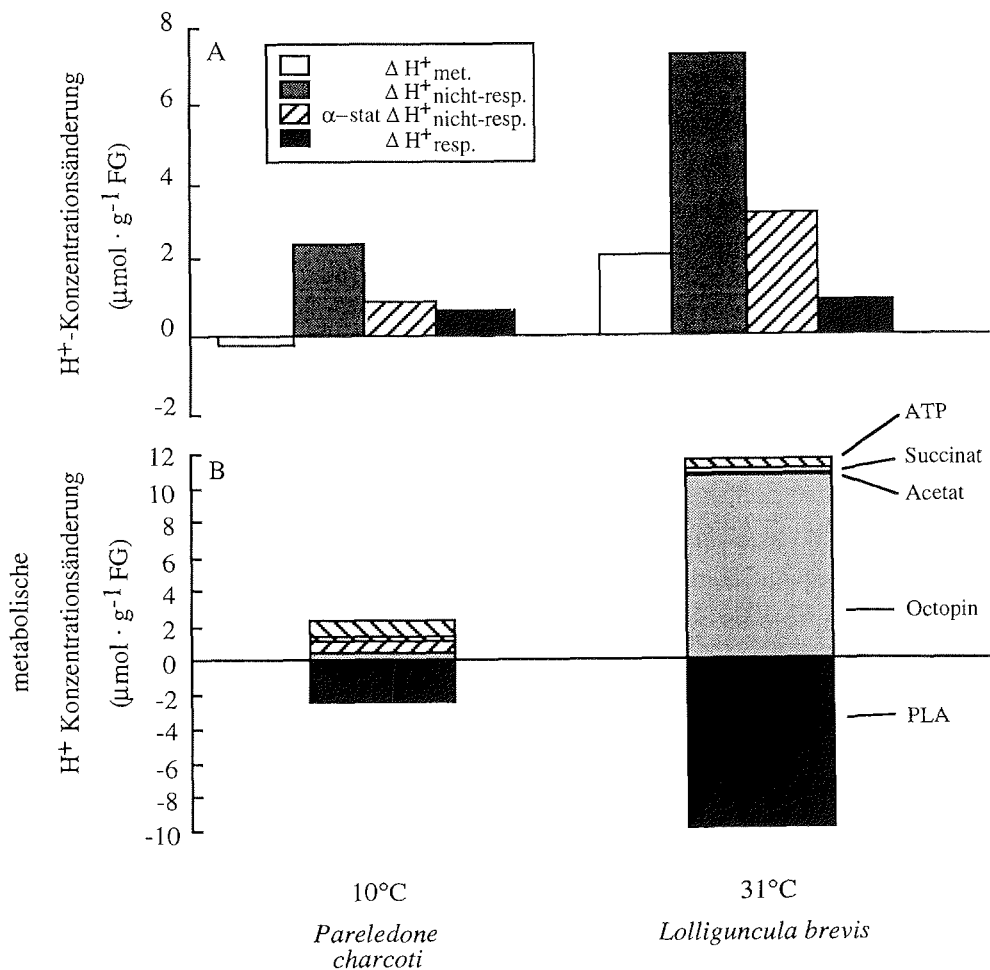


Abb. 4 (A) Änderung der Protonenkonzentration ($\mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1}$ Frischgewicht) in der Mantelmuskulatur von *Pareledone charcoti* und *Lolliguncula brevis* nach Überschreiten der kritischen Temperatur. $\alpha\text{-stat } \Delta H^+_{nicht-resp}$ gibt die Menge der Protonen an, die einer pH-Änderung nach der Alphastat-Hypothese zugrunde liegt. (B) Anteile der Konzentrationsänderungen verschiedener Metabolite an der metabolischen Protonenproduktion. Die Protonenbilanz wurde aus den gemittelten Konzentrationsänderungen (Daten aus Publikation II) nach Pörtner (1987a, b) berechnet (*Pareledone charcoti*: n = 4; *Lolliguncula brevis*: n = 5).

Neben respiratorischen Prozessen können auch Änderungen im Stoffwechsel zu Verschiebungen des Säure-Basen-Gleichgewichtes beitragen, wenn Stoffwechselreaktionen mit der Aufnahme oder Freisetzung von Protonen einhergehen (Pörtner 1987a, b). Die Berechnung der metabolischen Protonenproduktion (ΔH^+_{met}) ergab, daß in der Mantelmuskulatur von *Lolliguncula brevis* unter Temperaturstreß die protonenfreisetzenden Prozesse überwiegen (Abb. 4B), so daß es durch die Bildung der anaeroben Endprodukte insgesamt zu einer Netto- Protonenproduktion kam, die einen größeren Anteil an der beobachteten Azidose hatte als ΔH^+_{resp} . Dagegen überwogen durch die wesentliche niedrigere Akkumulation anaerober Endprodukte in der Mantelmuskulatur von *Pareledone charcoti* geringfügig die protonenbindenden Prozesse, so daß bei diesem Oktopoden ΔH^+_{met} nur zu einem geringen Teil an den temperaturbedingten Änderungen des Säure-Basen-Haushaltes beteiligt ist (Abb. 4).

Änderungen der Protonenkonzentration in den Zellen können auch durch Ionenaustauschprozesse hervorgerufen werden. Diese ergeben zusammen mit ΔH^+_{met} den nicht-respiratorischen Anteil von ΔH^+ ($\Delta H^+_{\text{nicht-resp}}$). Die Berechnung der H^+ -Konzentrationsänderungen durch die unterschiedlichen Prozesse ergab eine Diskrepanz zwischen ΔH^+_{met} und $\Delta H^+_{\text{nicht-resp}}$ in beiden untersuchten Cephalopodenarten (Abb. 4A). Der größere Anteil der nicht-respiratorischen gegenüber der metabolischen Protonenproduktion nach Temperaturstreß deutet auf einen Netto H^+ -Transport in die Zelle hin, bzw. auf eine Abgabe von Basenäquivalenten (Bikarbonat) aus der Zelle. Im Vergleich zu anderen Arten scheinen Cephalopoden hauptsächlich den extrazellulären pH zu regulieren und nicht den pH_i . Aufgrund der bei Cephalopoden gefundenen hohen pH-Sensitivität des Sauerstofftransportes am Hämocyanin hat die Regulation des extrazellulären pH-Wertes eine besondere Bedeutung für die Sauerstoffversorgung (Pörtner 1994b, 1997; siehe auch 4.2). Die Abweichung zwischen ΔH^+_{met} und $\Delta H^+_{\text{nicht-resp}}$ ist daher vermutlich auf eine Herabregulation des intrazellulären pH während Azidose zurückzuführen (Pörtner 1993). Nach Überschreiten der kritischen Temperaturen wird die Aufrechterhaltung der Alaphastat-Regulation des pH_i eventuell außerdem durch eine Fehlfunktion des Ionentransportes behindert. Dies läßt sich aus der Tatsache schließen, daß der tatsächliche Wert für $\Delta H^+_{\text{nicht-resp}}$ sowohl für *Pareledone charcoti* als auch für *Lolliguncula brevis* höher liegt als der theoretisch erwartete Wert, wenn sich der pH_i entsprechend der Alaphastat-Hypothese verändert hätte (Abb. 4; Publikation II).

4.1.3 Energiestoffwechsel in Abhängigkeit von Hypoxie und Temperatur

Wie bei vielen anderen Arten beschrieben (z. B. Pelster et al. 1988; van Waarde et al. 1990; van Raaij et al. 1994) zeigten die Untersuchungen zur Hypoxietoleranz von *Lolliguncula brevis*, daß eine zweistündige Inkubation bei moderater Hypoxie (19,3 bis 6,6 kPa) nur zu einer geringfügigen Abnahme der Phospho-L-Arginin- (PLA) und ATP-Konzentration führte. Erst bei extremer Hypoxie ($2,8 \pm 0,3$ kPa) sind die Energiereserven signifikant von der Hypoxie betroffen (Publikation I), so daß die Tiere zunächst noch Aktivität aufrecht erhalten können. Untersuchungen von Finke et al. (1996) zeigten für diese Art beim Schwimmen einen Wechsel zwischen Phasen rein aerober und gemischt anaerober/aerober Energiegewinnung. Diese Strategie erlaubt es diesem Kalmaren möglicherweise, längerfristig hypoxe Wasserschichten zu tolerieren. Sinkt jedoch der PO_2 auf sehr niedrige Werte um 2,8 kPa ab, werden die Energiereserven rasch abgebaut und die Aktivität muß reduziert werden.

Ein drastischer Energieverbrauch wurde in der Mantelmuskulatur von *Lolliguncula brevis* und *Pareledone charcoti* auch bei Temperaturen oberhalb der kritischen Temperatur beobachtet. Unterhalb der kritischen Temperatur konnten dagegen die ATP- und die Phospho-L-Arginin-Konzentration auf einem konstanten Niveau gehalten werden (Publikation II). Auch bei verschiedenen anderen Arten wurde nach Überschreiten der kritischen Temperatur zusammen mit einer Akkumulation anaerober Endprodukte eine Abnahme der Energiereserven beobachtet (Sommer und Pörtner 1999; Pörtner et al. 1999a). Diese Untersuchungen deuten daraufhin, daß die anaeroben Stoffwechselwege nicht genügend Energie bereitstellen können, um den erhöhten Energiebedarf bei hohen Temperaturen zu decken.

Der Energiezustand der Zelle wird durch die Gibbs'sche freie Energie der ATP-Hydrolyse ($dG/d\xi$) quantifiziert, die die treibende Kraft für alle ATP-abhängigen Reaktionen darstellt (Pörtner et al. 1993). Analysen zeigten, daß die Alphastat-Regulation des intrazellulären pH-Wertes bei Temperaturänderungen die Erhaltung der Phosphagenkonzentration unterstützt und somit auch die Gibbs'sche freie Energie der ATP-Hydrolyse. Modellrechnungen ergaben einen leichten Anstieg von $dG/d\xi$ mit zunehmender Temperatur, wenn sich der intrazelluläre pH entsprechend der Alphastat-Hypothese ändert (Pörtner et al. 1998). Dieser Zusammenhang konnte in den Untersuchungen zur Temperatursensitivität für die Cephalopoden *Pareledone charcoti* und *Lolliguncula brevis* bei Temperaturen unterhalb der kritischen Temperaturen bestätigt werden (Publikation II). Oberhalb der kritischen Temperaturen führte die Reduzierung der PLA-Konzentration und die

Zunahme der Konzentration an freiem ADP zusammen mit der beobachteten Azidose (siehe 4.1.2) zu einer Abnahme der Gibbs'schen freien Energie der ATP-Hydrolyse (Abb. 5; Publikation II). Auch während Inkubation von *Lolliguncula brevis* bei extremer Hypoxie führten entsprechende Konzentrationsänderungen zusammen mit einer Azidose zu einer Abnahme von $dG/d\xi$, während bei moderater Hypoxie keine Änderung im Energiestatus zu beobachten war (Publikation I). Unter diesen Bedingungen stieg der

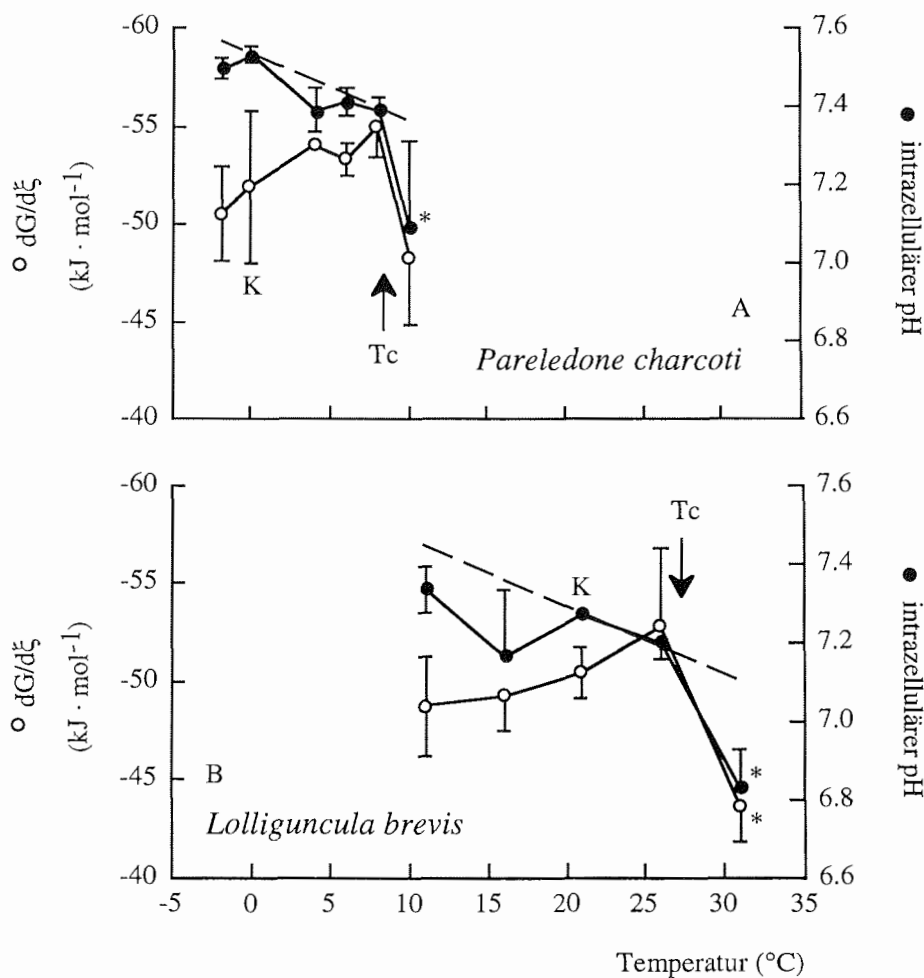


Abb. 5 Die Änderung der Gibbs'schen freien Energie der ATP-Hydrolyse ($dG/d\xi$) und des intrazellulären pH-Wertes in der Mantelmuskulatur von (A) *Pareledone charcoti* und (B) *Lolliguncula brevis* in Abhängigkeit von der Temperatur. Unterhalb der kritischen Temperatur (T_c) steigt $dG/d\xi$ bei beiden Arten linear mit zunehmender Temperatur an, während der pH_i sinkt. Bei der jeweils höchsten Inkubationstemperatur sind $dG/d\xi$ und pH_i gegenüber dem Kontrollwert erniedrigt. (* - signifikant verschieden vom Kontrollwert K; gestrichelte Linie: Nach der Alaphastat-Hypothese vorhergesagte pH-Änderung mit sich ändernder Temperatur. Die Berechnung erfolgte ausgehend vom Kontroll-pH. Modifiziert nach Publikation II.)

Gehalt an freiem ADP in der Mantelmuskulatur nicht signifikant an, während die Konzentration des Gesamt-ADP zunahm. Diese Beobachtung bestätigt Befunde, die während und nach Schwimmbelastung erhoben wurden (Finke et al. 1996). Anscheinend wurde die Konzentration an freiem ADP gepuffert, so daß die Phosphagenhydrolyse und damit auch die Abnahme der Gibbs'schen freien Energie der ATP-Hydrolyse hinausgezögert wurde.

Während die Abnahme von $dG/d\xi$ im Gewebe von *Pareledone charcoti* nach Temperaturstreß wohl aufgrund der großen individuellen Unterschiede unter Kontrollbedingungen nicht signifikant war, sank die Gibbs'sche freie Energie in der Mantelmuskulatur von *Lolliguncula brevis* sowohl nach Temperaturstreß, während extremer Hypoxie (Publikation I, II) als auch nach funktioneller Anaerobiose (Pörtner et al. 1996) signifikant auf Werte von rund $-44 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ ab. Diese Werte liegen unter denen der aeroben *steady-state* Energieanforderungen, die von Kammermeier (1987) für die Funktion der Actomyosin-ATPase (-45 bis $-50 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$) oder die Ca^{2+} -ATPase des Sakrolemmas ($-51 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$) im Rattenmyocardium berechnet wurde. Da es sich bei diesen Werten um *steady-state* Anforderungen handelt, wird eine Abnahme der Gibbs'schen freien Energie der ATP-Hydrolyse möglicherweise in einem geringem Umfang toleriert. Dennoch kann nicht völlig ausgeschlossen werden, daß die Abnahme der freien Energie ein limitierender Faktor für Tiere während Temperaturstreß darstellt und auch die Hypoxietoleranz einschränkt. Hier sind weitere Untersuchungen notwendig, um eine klare Aussage zu ermöglichen.

4.1.4 Temperatursensitivität von Enzymaktivitäten

In den Geweben des antarktischen Oktopoden *Pareledone charcoti* wurden die Aktivitäten einer Reihe von Enzymen bestimmt, die an Reaktionen verschiedener Stoffwechselwege wie Glykolyse, Zitronensäurezyklus oder Aminosäurekatabolismus beteiligt sind. Die Aktivitätsbestimmungen wurden bei einer Temperatur von $0 \text{ }^\circ\text{C}$ durchgeführt, nachdem die Tiere bei Temperaturen zwischen $-1,8$ und $10 \text{ }^\circ\text{C}$ inkubiert worden waren. Für alle untersuchten Enzyme ergab sich ein punktueller Anstieg der Aktivität zwischen 0 und 6 bzw. $8 \text{ }^\circ\text{C}$, wie es in Abb. 6 beispielhaft für die Glycerinaldehydphosphat-Dehydrogenase (GAPDH) dargestellt ist. Eine weitere Erhöhung der Inkubationstemperatur führte dann zu einer Abnahme der Enzymaktivitäten. Die Aktivität der Glycerin-3-phosphat-Dehydrogenase (GPDH) aus dem Kiemengewebe war bei $10 \text{ }^\circ\text{C}$ sogar signifikant

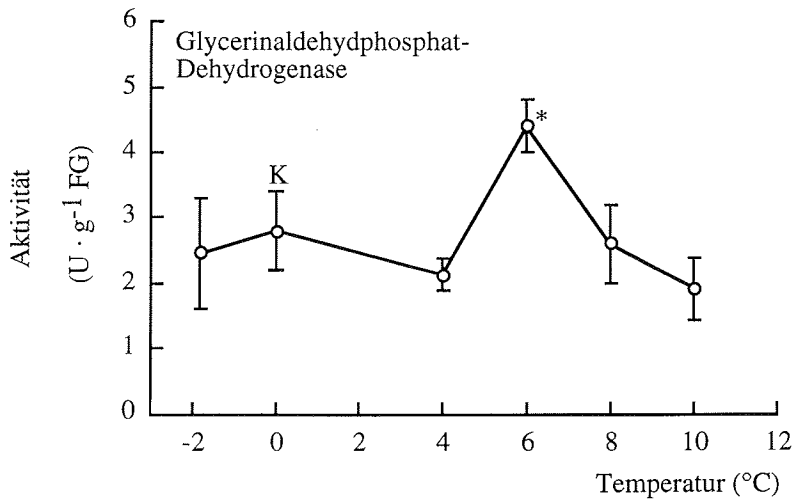


Abb. 6 Aktivitätsänderung der Glycerinaldehydphosphat-Dehydrogenase in der Mantelmuskulatur von *Pareledone charcoti* nach Inkubation bei Temperaturen zwischen -1,8 und 10 °C. Die Meßtemperatur betrug jeweils 0 °C (* - signifikant verschieden vom Kontrollwert K; n = 4; Mittelwerte ± SD; verändert nach Publikation II).

gegenüber dem Kontrollwert bei 0 °C erniedrigt (siehe Tabelle 3 und Abb. 6 in Publikation II). Die Ursachen für diese Aktivitätsmuster sind noch unklar. Möglicherweise wurden sie durch temperaturbedingte Änderungen in der Enzymkonformation bedingt, da sich dadurch Änderungen in den Enzym-Substrat-Interaktionen ergeben können (Somero 1991, 1996). Wahrscheinlicher wäre eine temperaturinduzierte Verschiebung zwischen Proteinsynthese und Proteinabbau. Bei *Artemia franciscana* führt Anoxie zusammen mit Azidose zu einer Herabsetzung der Proteinsynthese (Kwast und Hand 1996). Die Abnahme der Enzymaktivitäten in den Geweben von *Pareledone charcoti* stimmt mit der Lage der kritischen Temperatur überein. Daher könnte die bei 10 °C beobachtete Anaerobiose und die gleichzeitig auftretende Azidose dazu beitragen, daß unter diesen Bedingungen das Gleichgewicht zwischen Proteinsynthese und -abbau zum Proteinabbau hin verschoben wird.

In weiteren Untersuchungen wurden die Homogenate von Tieren gewonnen, die bei 0 °C gehältert wurden und die Aktivitäten der gleichen Enzyme bei Temperaturen zwischen 0 und 30 °C bestimmt. Dabei wurden zwei weitere antarktische Cephalopodenarten einbezogen, die Oktopodenart *Pareledone polymorpha* und die Kalmarart *Psychroteuthis glacialis*. Für mehrere der untersuchten Enzyme ergaben sich Brüche im Arrhenius-Plot. Nur für die Pyruvat-Kinase (PK) aus der Mantelmuskulatur von *Pareledone polymorpha* und der GAPDH aus dem Armgewebe von *Psychroteuthis glacialis* wurde ein Bruch bei 10 °C festgestellt, in allen anderen Fällen trat er bei 20 °C auf (Tabelle 2; Publikation II).

Die Gründe für diese Diskontinuitäten sind noch nicht hinlänglich verstanden, aber sie werden möglicherweise durch Konformationsänderungen verursacht, die zu Änderungen der katalytischen Eigenschaften führen (Moon und Storey 1975; Kaletha und Skladanowski 1981). In den Fällen, bei denen ein Bruch im Arrhenius-Plot auftrat, lagen mit Ausnahme der GAPDH aus dem Armgewebe von *Psychroteuthis glacialis* die Aktivierungsenergien jeweils im unteren Temperaturbereich höher als im oberen. Dies steht im Gegensatz zu der Hypothese, daß eine Herabsetzung der Aktivierungsenergie bei niedrigen Temperaturen die Reduzierung der Reaktionsgeschwindigkeit enzymatischer Reaktionen aufgrund erniedrigter thermischer Energie kompensiert (Dahlhoff und Somero 1993). Andererseits würde die Expression von Enzymen mit hoher Aktivierungsenergie die Stoffflüsse gering halten. Gleichzeitig könnte eine so hohe Enzymkonzentration aufrechterhalten werden, daß die Diffusionsstrecke zwischen den Enzymmolekülen nicht zu

Tabelle 2 Aktivierungsenergie (Ea) der Enzyme aus Geweben von *Pareledone charcoti*, *Pareledone polymorpha* und *Psychroteuthis glacialis*, bei denen ein Bruch im Arrhenius-Plot aufgetreten ist. Angegeben ist der jeweilige Temperaturbereich (T), für den die Angaben gelten (Mittelwerte \pm SD; n = 4 - 6; PFK - Phosphofruktokinase, GluDH - Glutamat-Dehydrogenase, PK - Pyruvat-Kinase, GP - Glykogen-Phosphorylase, GAPDH - Glycerinaldehydphosphat-Dehydrogenase, GPDH - Glycerin-3-phosphat-Dehydrogenase; verändert nach Publikation II).

Enzym	Gewebe	T (°C)	Ea (kJ · mol ⁻¹)	T (°C)	Ea (kJ · mol ⁻¹)
<i>Pareledone charcoti</i>					
PFK	Mantel	0 - 20	94,9 \pm 6,0	20 - 30	79,7 \pm 28,0
	Arm	0 - 20	93,5 \pm 3,4	20 - 30	75,4 \pm 15,2
GluDH	Mantel	0 - 20	81,0 \pm 13,6	20 - 30	- 3,9 \pm 35,9
<i>Pareledone polymorpha</i>					
PFK	Arm	0 - 20	91,5 \pm 10,7	20 - 30	64,5 \pm 7,9
PK	Mantel	0 - 10	68,1 \pm 2,4	10 - 30	49,1 \pm 1,2
	Arm	0 - 20	50,8 \pm 3,6	20 - 30	14,4 \pm 28,9
GP	Arm	0 - 20	61,9 \pm 5,6	20 - 30	13,0 \pm 10,8
<i>Psychroteuthis glacialis</i>					
PFK	Mantel	0 - 20	89,4 \pm 9,2	20 - 30	45,5 \pm 5,0
	Arm	0 - 20	82,4 \pm 6,5	20 - 30	45,6 \pm 59,2
PK	Mantel	0 - 20	60,8 \pm 1,6	20 - 30	53,0 \pm 7,8
GAPDH	Arm	0 - 10	31,2 \pm 5,6	10 - 30	53,4 \pm 2,1
GPDH	Arm	0 - 20	48,2 \pm 5,5	20 - 30	24,5 \pm 24,8
GluDH	Arm	0 - 20	79,2 \pm 15,7	20 - 30	- 69,4 \pm 108,9
GP	Mantel	0 - 20	46,7 \pm 4,2	20 - 30	- 16,4 \pm 8,5

groß wird. Dadurch wird ein ausreichender Stoffumsatz ermöglicht (Pörtner et al. 1999b). Für *Pareledone charcoti* wurde ein niedrigerer Sauerstoffverbrauch ($0,26 \mu\text{mol O}_2 \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$ bei $0 \text{ }^\circ\text{C}$; Publikation II) gemessen als für andere antarktische Arten. So hatten z. B. die bodennah lebenden Fische *Notothenia neglecta* ($0,82 \mu\text{mol O}_2 \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$ bei $0 \text{ }^\circ\text{C}$; Johnston et al. 1991) und *Melanostigma gelatinosum* ($0,94 \mu\text{mol O}_2 \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$ bei $0,5 \text{ }^\circ\text{C}$; Torres und Somero 1988) höhere Stoffwechselraten als der Oktopode. Die Herabregulation der Geschwindigkeit enzymatischer Reaktionen aufgrund hoher Aktivierungsenergien würde mit der vergleichsweise niedrigen Stoffwechselrate von *Pareledone charcoti* im Einklang stehen.

4.1.5 Aerobe und anaerobe Kapazitäten antarktischer Cephalopoden

Die Bestimmung der Enzymaktivitäten (siehe 4.1.4) in den Geweben der antarktischen Cephalopoden bei verschiedenen Temperaturen ermöglicht eine Abschätzung der aeroben und anaeroben Kapazitäten dieser Arten im Vergleich zu Tieren aus wärmeren Gewässern. Als Indikator für die aerobe Kapazität eines Organismus kann die Aktivität der Citrat-Synthase (CS) angesehen werden (Torres und Somero 1988), während die Aktivitäten der Phosphofruktokinase (PFK), PK und Laktat-Dehydrogenase bzw. Octopin-Dehydrogenase (ODH) als Indikatoren für den anaeroben Stoffwechsel gelten (Crockett und Sidell 1990). In der Mantelmuskulatur des Eiskalmaren *Psychroteuthis glacialis* erreichten die Aktivitäten der CS und ODH schon bei $0 \text{ }^\circ\text{C}$ Aktivitäten, die für die Arten der Gattung *Loligo* bei $25 \text{ }^\circ\text{C}$ gemessen wurden. Im Gegensatz dazu liegen die Aktivitäten der PFK und der Glutamat-Dehydrogenase (GluDH) des antarktischen Kalmaren selbst bei einer Meßtemperatur von $20 \text{ }^\circ\text{C}$ niedriger als bei den *Loligo*-Arten (Tabelle 3). Diese Ergebnisse deuten daraufhin, daß die aerobe Kapazität des antarktischen Kalmaren bei $0 \text{ }^\circ\text{C}$ ähnlich der von Kalmaren aus gemäßigten Breiten bei höheren Temperaturen ist. Außerdem scheint auch der anaerobe Stoffwechsel zum Teil eine Kältekompensation erfahren zu haben. Eine Kälteanpassung aerober Stoffwechselwege wurde auch bei den antarktischen Fischen *Notothenia gibberiformis* und *Trematomus newnesi* gefunden (Crockett und Sidell 1990). Demgegenüber liegen die Aktivitäten der CS und der GPDH in der Mantelmuskulatur der antarktischen Oktopoden *Pareledone charcoti* und *Pareledone polymorpha* auch bei $20 \text{ }^\circ\text{C}$ niedriger als die entsprechenden Enzymaktivitäten von *Octopus macropus* und *Octopus horridus* (Tabelle 4). Somit scheinen die aeroben Kapazitäten der antarktischen Oktopoden niedriger zu liegen als die der Tiere aus wärmeren Lebensräumen. Die Aktivität der Citrat-Synthase der

Diskussion

Tabelle 3 Aktivitäten verschiedener Enzyme ($U \cdot g^{-1}$ FG) in der Mantelmuskulatur von Kalmaren verschiedener geographischer Breiten (Mittelwerte \pm SD; $n = 5 - 6$; PFK - Phosphofruktokinase, PK - Pyruvat-Kinase, ODH - Octopin-Dehydrogenase, CS - Citrat-Synthase, GPDH - Glycerin-3-phosphat-Dehydrogenase, GluDH - Glutamat-Dehydrogenase; Werte für *Psychroteuthis glacialis* aus Publikation II; Daten für *Loligo forbesi* aus Zammit und Newsholme 1976 und für *Loligo opalescens* aus Ballantyne et al. 1981).

Enzym	<i>Psychroteuthis glacialis</i>		<i>Loligo opalescens</i>	<i>Loligo forbesi</i>
	0 °C	20 °C	25 °C	25 °C
PFK	0,1 \pm 0,0	4,4 \pm 1,4	142,2 \pm 20,0	-
PK	4,0 \pm 0,4	9,2 \pm 2,8	27,1	9,8
ODH	82,3 \pm 45,6	-	132,0 \pm 5,4	146,5
CS	6,9 \pm 1,1	19,8 \pm 5,6	8,0 \pm 0,1	-
GPDH	0,4 \pm 0,1	0,9 \pm 0,6	5,9 \pm 1,2	-
GluDH	0,1 \pm 0,0	0,6 \pm 0,6	-	2,9 \pm 0,6

antarktischen Oktopoden ist jedoch vergleichbar mit der CS-Aktivität in der Muskulatur der antarktischen mesopelagischen Fische *Bathylagus antarcticus* und *Cyclothone microdon* ($0,36 U \cdot g^{-1}$ FG; Torres und Somero 1988), während die aerobe Kapazität des Eiskalmaren *Psychroteuthis glacialis* deutlich über derjenigen der Fische liegt. Die Kalmare der Antarktis können zu den pelagischen Schnellschwimmern gezählt werden (Piatkowski 1995), während die Oktopoden benthisch leben. Daher sind die beobachteten Unterschiede zwischen den antarktischen Cephalopoden wahrscheinlich auf die unterschiedliche Lebensweise dieser Arten zurückzuführen. Besonders die Kältekompensation des aeroben Stoffwechsels von *Psychroteuthis glacialis* unterstützt möglicherweise die Aufrechterhaltung eines hohen Aktivitätsniveaus bei niedrigen Temperaturen (Crockett und Sidell 1990).

Tabelle 4 Vergleich der Aktivitäten verschiedener Enzyme ($U \cdot g^{-1}$ FG) in der Mantelmuskulatur von Oktopoden aus der Antarktis und aus wärmeren Gewässern. (Mittelwerte \pm SD; $n = 4 - 5$; CS - Citrat-Synthase, GPDH - Glycerin-3-phosphat-Dehydrogenase; Werte für die antarktischen Cephalopoden aus Publikation II; Daten für die *Octopus*-Arten aus Baldwin 1982)

Enzym	<i>Pareledone charcoti</i>		<i>Pareledone polymorpha</i>		<i>Octopus macropus</i>	<i>Octopus horridus</i>
	0 °C	20 °C	0 °C	20 °C	25 °C	25 °C
CS	0,7 \pm 0,1	2,2 \pm 0,6	0,8 \pm 0,1	2,8 \pm 0,2	4,4	3,3
GPDH	0,7 \pm 0,2	1,4 \pm 0,9	0,2 \pm 0,1	1,4 \pm 0,1	6,8	12,7

4.2 Temperatureinfluß auf den Sauerstofftransport am Hämocyanin

Die bereits mehrfach angesprochenen hohen Stoffwechselraten vieler Cephalopoden machen es notwendig, daß der Sauerstofftransport am Hämocyanin dem hohen Sauerstoffbedarf angepaßt ist. Bei Kalmaren ist eine hohe pH-Sensitivität der Sauerstoffbindung zu finden. Diese pH-Sensitivität bewirkt, daß schon bei geringen Änderungen im extrazellulären Säure-Basen-Status eine maximale Menge Sauerstoff abgegeben wird. Auf diese Weise wird die Sauerstoffpufferfunktion des Hämocyanins unterstützt und ermöglicht die Aufrechterhaltung der schon unter Kontrollbedingungen hohen Stoffwechselraten (Pörtner 1990b, 1994b). Eine hohe pH-Sensitivität der Sauerstoffbindung ist im pH/Sättigungsdiagramm durch eine große Steigung ($\Delta S/\Delta pH$) der Sauerstoffbindungskurven zu erkennen. Wie bei den Kalmaren *Illex illecebrosus* und *Loligo pealei* beobachtet (Pörtner 1990b), war für das Hämocyanin von *Sepia officinalis* bei 20 °C die größte pH-Sensitivität im Bereich des *in vivo* pH-Wertes im Blut (pH 7,4 - 7,8 bei 17 - 19 °C; Johansen et al. 1982a) zu erkennen (Abb. 7; Publikation III). Dadurch wird unter physiologischen Bedingungen eine Maximierung der Sauerstoffversorgung erreicht. Eine Temperaturemiedrigung bis auf 0 °C führte zu einer Abnahme der pH-Sensitivität. Während bei 20 °C $\Delta S/\Delta pH$ maximal 41 % pro pH-Einheit betrug, wurden bei 0 °C nur maximal 7 % pro pH-Einheit erreicht. Auch die pH-Sensitivität des Hämocyanins des antarktischen Oktopoden *Megaleledone senoi* wurde durch die Temperatur beeinflusst, jedoch in einem geringeren Umfang als bei *Sepia officinalis*. $\Delta S/\Delta pH$ sank von maximal 13 % pro pH-Einheit bei 10 °C auf maximal 10 % pro pH-Einheit bei 0 °C ab (Publikation III). Im jeweils physiologisch relevanten Temperaturbereich, d. h. 0 °C für den antarktischen Oktopoden und 20 °C für die Sepien, ist die pH-Sensitivität des Hämocyanins der antarktischen Art weniger ausgeprägt.

Die geringere pH-Sensitivität des Hämocyanins von *Megaleledone senoi* im Vergleich zu *Sepia officinalis* zeigt sich auch im Ausmaß der pH-unabhängigen venösen Reserve. Diese pH-unabhängige venöse Reserve gibt die Menge des Sauerstoffs an, der am Hämocyanin gebunden bleibt, selbst wenn der pH auf extrem niedrige Werte abfällt. Vergleicht man diese Werte bei den normalerweise im Lebensraum vorherrschenden Temperaturen, so ergibt sich für *Sepia officinalis* eine venöse Reserve von 19 % (20 °C) und für *Megaleledone senoi* ein Wert von 43 % (0 °C; Publikation III). Eine ebenso hohe venöse Reserve von 40 % wurde auch für *Octopus dofleini* ermittelt (20 °C; Pörtner 1990b, berechnet nach Miller und Mangum 1988). Im Gegensatz dazu weist der Kalmar *Illex illecebrosus* eine wesentlich geringere venöse Reserve von unter 10 % auf (15 °C).

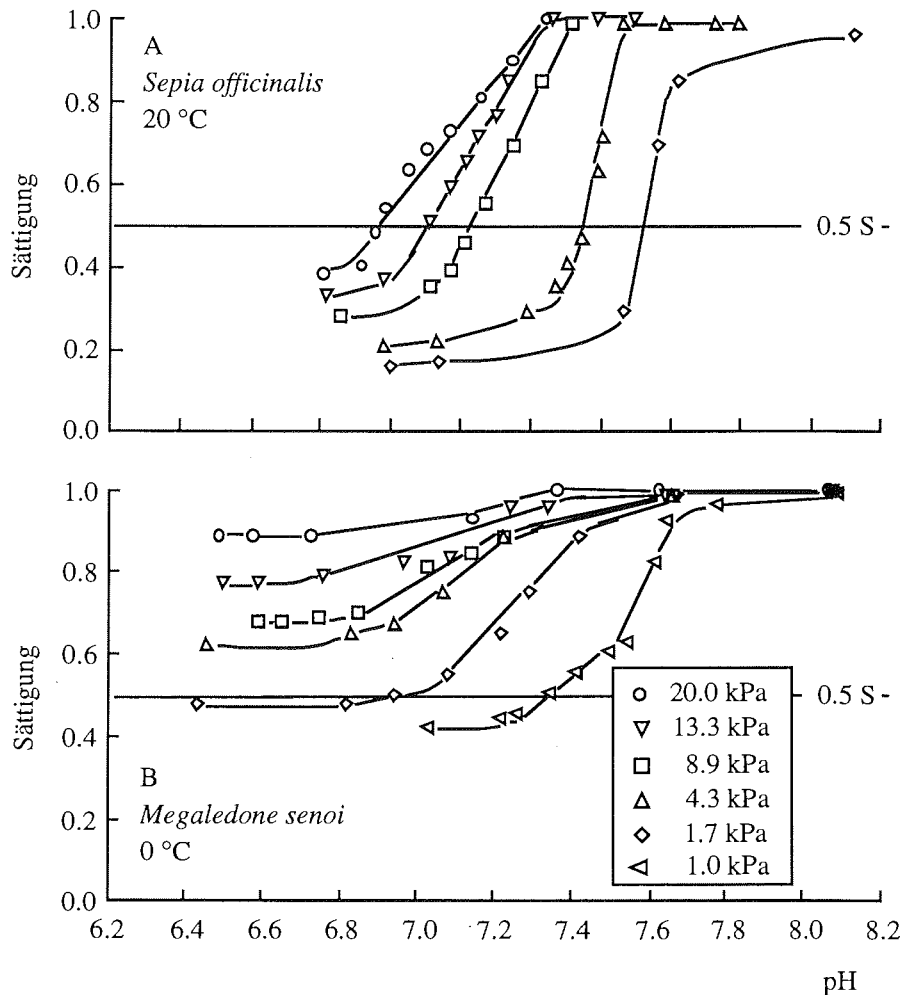


Abb. 7 Darstellung der Sauerstoffbindungseigenschaften des Hämocyanins von *Sepia officinalis* bei 20 °C und des Hämocyanins von *Megaledone senoi* bei 0 °C im pH/Sättigungsdiagramm. Jede einzelnen Linie in diesem Diagramm stellt eine Sauerstoffsobare dar und verdeutlicht die Änderung der Sauerstoffbindung in Abhängigkeit vom pH-Wert bei konstantem P_{O_2} (S - Sättigung; verändert nach Publikation III).

Zusammen mit der hohen pH-Sensitivität des Sauerstofftransportes am Hämocyanin dieses Kalmaren zeigt dieses Ergebnis, daß auf diese Weise eine größtmögliche Sauerstoffversorgung des Gewebes erreicht wird (Pörtner 1990b). Im Gegensatz dazu führen Oktopoden ein inaktiveres Leben und haben entsprechend niedrigere Sauerstoffverbrauchsraten als Kalmare (z. B. Houlihan et al. 1982; Webber und O'Dor 1985, 1986; Finke et al. 1996; Seibel et al. 1997). Daher scheint bei den Oktopoden nicht die Notwendigkeit zu bestehen, den pH-abhängigen Sauerstofftransport in dem selben Umfang wie bei *Sepia officinalis* oder bei Kalmaren zu maximieren.

Die bei beiden untersuchten Arten beobachtete temperaturabhängige Änderung der pH-Sensitivität spiegelt sich auch in der Änderung der Bohr-Koeffizienten mit der Temperatur wider. Für das Hämocyanin von *Sepia officinalis* betrug der Bohr-Koeffizient -1,33 bei 20 °C und -0,99 bei 10 °C (Publikation III). Der Wert von -1,33 liegt im Bereich des Bohr-Koeffizienten von -1,57, der von Brix et al. (1981) für diese Art gefunden wurde. Auch bei vielen anderen Cephalopoden treten in der Regel Bohr-Koeffizienten von < -1 auf (z. B. Brix et al. 1981, 1989; Houlihan et al. 1982). Bohr-Koeffizienten von < -1 bedeuten, daß pro mmol abgegebenem Sauerstoff mehr Protonen an das Pigment gebunden werden als im Stoffwechsel durch die Veratmung von Sauerstoff entstehen. Infolgedessen kann eine Erhöhung des venösen pH-Wertes auftreten (Johansen et al. 1982a). Bei *Sepia officinalis* sorgt ein sauerstoffabhängiger CO₂-Transport für die Abgabe des Sauerstoffs notwendige Ansäuerung im Gewebe (Lykkeboe et al. 1980; Brix et al. 1981). Für das Hämocyanin von *Megaleledone senoi* wurde bei 0 °C kein sauerstoffabhängiger CO₂-Transport festgestellt (Publikation III). Bei niedrigen Temperaturen fiel die Sättigung nur bei sehr geringen Po₂-Werten unter 50 %, daher konnte unter diesen Bedingungen der Bohr-Koeffizient nur durch Extrapolation der Daten auf noch niedrigere Sauerstoffpartialdrücke abgeschätzt werden. Es ergab sich ein Bohr-Koeffizient von ca. -0,9, der eine normale Funktion des Bohr-Effektes bewirken sollte. Demgegenüber erschwert der extrem hohe Bohr-Koeffizient von -2,33 bei 10 °C (Publikation III) wahrscheinlich die Abgabe des Sauerstoffs vom Hämocyanin.

Die Sauerstoffaffinität (P₅₀) der respiratorischen Farbstoffe wird durch die Temperatur beeinflusst. Dabei kann die Temperaturabhängigkeit bei verschiedenen Arten unterschiedlich ausgeprägt sein wie die Aufstellung in Tabelle 5 zeigt. Die Sauerstoffaffinität des Hämocyanins von *Sepia officinalis* sank mit einer Rate von 0,12 kPa pro °C Temperaturerhöhung ($\Delta P_{50}/\Delta T$). Etwas höhere Raten wurden für *Octopus vulgaris* und *Octopus dofleini* berechnet. Bei eurythermen Cephalopoden sollte bei einer Temperaturerhöhung der P₅₀ so weit ansteigen, daß der Sauerstoffpartialdruck in den Kapillaren bei einem ausreichend hohem Po₂ gepuffert wird. Dadurch bleibt der Konzentrationsgradient zwischen den Kapillaren zu den Mitochondrien groß genug, um eine ausreichende Sauerstoffversorgung zu sichern. Die extreme thermische Sensitivität des Hämocyanins des Kalmaren *Architeuthis monachus* könnte bedeuten, daß bei erhöhten Temperaturen und hohem Sauerstoffpartialdruck das Hämocyanin nicht mit Sauerstoff gesättigt wird und somit die Sauerstoffversorgung nicht sichergestellt werden kann (Brix 1983; Brix et al. 1989, 1994). Die bei dem antarktischen Oktopoden *Megaleledone senoi* beobachtete sehr geringe Temperatursensitivität (Tabelle 5; Publikation III) könnte dagegen bewirken, daß bei hohen Temperaturen der Sauerstoffpartialdruck im Blut bei zu niedrigen Werten

gepuffert wird. Auf diese Weise wird vermutlich der Konzentrationsgradient zwischen Kapillaren und Mitochondrien zu gering, um den aufgrund der mit der Temperaturzunahme zu erwartenden Anstieg des Sauerstoffverbrauchs zu decken.

Tabelle 5 Rate der Sauerstoffaffinitätsabnahme mit zunehmender Temperatur ($\Delta P_{50}/\Delta T$) des Hämocyanins verschiedener Cephalopodenarten. Angegeben ist der Temperaturbereich und der pH-Wert, für den diese Werte gelten (Werte für *Sepia officinalis* und *Megaleledone senoi* nach Publikation III; die übrigen Werte wurden nach Brix et al. 1989 berechnet).

Art	Verbreitung	pH	Temperaturbereich (° C)	$\Delta P_{50}/\Delta T$ (kPa/°C)
<i>Sepia officinalis</i>	Atlantik, Mittelmeer	7,4	10 - 20	0,12
<i>Megaleledone senoi</i>	Antarktis	7,2	0 - 10	< 0,01
<i>Todarodes sagittatus</i>	Nordatlantik	7,4	6 - 10	0,39
			10 - 15	0,40
<i>Architeuthis monachus</i>	Nordatlantik	7,4	6 - 10	1,89
			10 - 15	1,34
<i>Loligo vulgaris</i>	Mittelmeer	7,4	10 - 20	0,57
<i>Octopus vulgaris</i>	Mittelmeer	7,4	15 - 25	0,20
<i>Octopus dofleini</i>	Pazifik	7,4	11 - 26	0,24

Die Kooperativität der Sauerstoffbindung am respiratorischen Farbstoff wird durch den Hill-Koeffizienten (n_{50}) ausgedrückt. Bei Cephalopoden kann die Kooperativität durch den pH (Miller 1985; Miller und Mangum 1988; Pörtner 1990b) und durch die Temperatur (Brix et al. 1989) beeinflusst werden. Für das Hämocyanin von *Sepia officinalis* zeigte sich bei 20 °C eine deutliche pH-Abhängigkeit der Kooperativität mit einem Maximum ($n_{50} = 5,9$), das zusammen mit der größten pH-Sensitivität im Bereich des *in vivo* pH-Wertes im Blut gefunden wurde (Abb. 8; Publikation III). Auf diese Weise unterstützt eine hohe Kooperativität eine größtmögliche Sauerstoffabgabe im *in vivo* pH-Bereich bei einer nur sehr geringen Ansäuerung des Blutes (Pörtner 1990b). Der maximal für *Sepia officinalis* berechnete Hill-Koeffizient liegt im Bereich der Werte, die für einige andere Cephalopodenarten gefunden wurden (z. B. Miller und Mangum 1988; Brix et al. 1989; Pörtner 1990b). Die Herabsetzung der Temperatur auf 10 °C führte zu

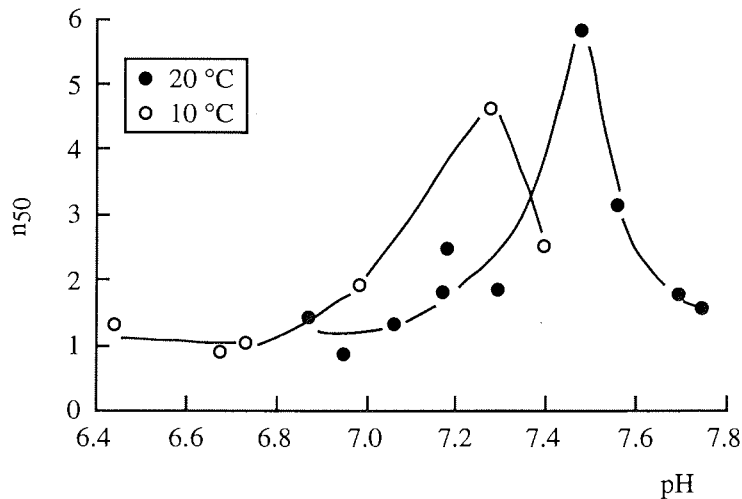


Abb. 8 Darstellung der Abhängigkeit der Kooperativität (n_{50}) des Hämocyanins von *Sepia officinalis* vom pH-Wert und der Temperatur (Publikation III).

einer Erniedrigung der maximalen Kooperativität des Hämocyanins von *Sepia officinalis* auf 4,6. Zudem war dieses Maximum wie auch die Lage des pH-sensitivsten Bereiches der Bindungskurven zu niedrigen pH-Werten hin verschoben (Abb. 8; Publikation III). Gleichzeitig ist zu erwarten, daß sich der *in vivo* pH-Wert bei einer Temperaturabnahme entsprechend der Alaphastat-Hypothese (Reeves 1972) zu höheren Werten hin verschiebt, wie es von Howell und Gilbert (1976) *in vitro* für das Blut von *Loligo pealei* nachgewiesen wurde. Folglich wird bei *Sepia officinalis* die Sauerstoffabgabe vom Hämocyanin bei niedrigeren Temperaturen nicht mehr optimal durch die Kooperativität unterstützt. Außerdem wird die Sauerstoffversorgung durch die Steigerung der Sauerstoffaffinität bei niedrigeren Temperaturen beeinträchtigt, da aufgrund dessen der Sauerstoff erst bei einem niedrigeren Sauerstoffpartialdruck vom Hämocyanin abgegeben wird. Insgesamt zeigen diese Untersuchungen für *Sepia officinalis*, daß der Sauerstofftransport am Hämocyanin für eine Temperatur von 20 °C optimiert ist. Im nördlichen Verbreitungsgebiet dieser Art kann die Temperatur jahreszeitlich bedingt bis auf 10 °C absinken (Isemer und Hasse 1981). Durch eine saisonale Anpassung der Sauerstoffbindungseigenschaften, wie sie für das Hämocyanin der Strandkrabbe *Carcinus maenas* und des Krebses *Callinectes sapidus* bekannt sind (Truchot 1975; Mauro und Mangum 1982a), könnte die Sauerstoffversorgung des Gewebes von *Sepia officinalis* bei niedrigen Temperaturen sichergestellt werden.

Im Gegensatz zu *Sepia officinalis* wurde für das Hämocyanin von *Megaleledone senoi* weder eine Temperatur- noch eine pH-Abhängigkeit der Kooperativität festgestellt

(Publikation III). Für das Hämocyanin dieser Art wurde eine der höchsten Sauerstoffaffinitäten gefunden, die bisher bei Cephalopoden bekannt sind. Der P_{50} von < 1 kPa bei 0 °C (pH 7,6; Publikation III) liegt nur wenig oberhalb des P_{50} von $0,47 - 0,55$ kPa des Kaltwasser-Kalmaren *Vampyroteuthis infernalis* (5 °C ; Seibel et al. 1999). Insgesamt deuten die für das Hämocyanin dieses antarktischen Oktopoden gefundenen Sauerstoffbindungseigenschaften darauf hin, daß der Sauerstofftransport am Hämocyanin auf die ungewöhnlich niedrigen Sauerstoffverbrauchsraten antarktischer Oktopoden (Publikation II) abgestimmt zu sein scheint. Möglicherweise spielt der Sauerstofftransport am Hämocyanin von *Megaleledone senoi* besonders in Situationen eine Rolle, in denen der P_{O_2} im Gewebe auf extrem niedrige Werte absinkt. Dies kann z. B. während funktioneller Hypoxie hervorgerufen durch schnelles Schwimmen während Flucht oder Beutefang der Fall sein. Bei einer Temperaturerhöhung kann die hohe Sauerstoffaffinität zusammen mit dem hohen Bohr-Koeffizienten (siehe oben) und der niedrigen Kooperativität dazu führen, daß die Sauerstoffabgabe vom Hämocyanin zu stark behindert wird, um den erhöhten Sauerstoffbedarf zu decken. Die Sauerstoffbindungseigenschaften des Hämocyanins von *Megaleledone senoi* könnten daher zu einer limitierten Temperaturtoleranz dieser Art beitragen.

4.3 Untersuchungen zum Oxidationsschutz

4.3.1 Enzymatischer Oxidationsschutz und oxidative Schäden in Relation zur Stoffwechselrate

Organismen haben verschiedene Abwehrmechanismen entwickelt, um die im aeroben Stoffwechsel aller Lebewesen entstehenden reaktiven Sauerstoffspezies (ROS), d. h. Wasserstoffperoxid und toxische Sauerstoffradikale abzufangen. Dazu zählen die Enzyme Superoxid-Dismutase (SOD), Katalase, Glutathion-Peroxidase (GPX) und Glutathion-Reduktase (GR). Im Vergleich der Aktivitäten der Oxidationsschutzenzyme aus Geweben von *Lolliguncula brevis* und *Sepia officinalis* zeigt sich, daß die Enzymaktivitäten bei den Kalmaren zwei- bis fünffach niedriger liegen als in den entsprechenden Geweben der Sepien (Publikation IV). Gleichzeitig weisen diese Kalmare eine über doppelt so hohe Stoffwechselrate auf (Tabelle 6). Eine hohe Stoffwechselrate scheint also nicht gleichbedeutend mit einem gut ausgeprägten enzymatischen Oxidationsschutzsystem zu sein. Dies zeigt auch ein Vergleich mit anderen ektothermen Tieren (Tabelle 7). Bei den

Tabelle 6 Maximale Aktivitäten der SOD (SOD-U · g⁻¹ FG), Katalase, GPX und GR (U · g⁻¹ FG) in Mantel- und Kiemengewebe von *Sepia officinalis* und *Lolliguncula brevis*. Angegeben sind ferner die Sauerstoffverbrauchsraten (μmol O₂ · h⁻¹ · g⁻¹) beider Arten, sowie in Klammern die Temperatur (°C), bei der der Sauerstoffverbrauch bestimmt wurde. (Angaben zum Sauerstoffverbrauch: für *Sepia officinalis* nach Johansen et al. 1982b; für *Lolliguncula brevis* nach Finke et al. 1996; *Sepia officinalis*: n = 3 - 11; *Lolliguncula brevis*: n = 4 - 6; Mittelwerte ± SD; aus Publikation IV).

Enzym	Gewebe	<i>Sepia officinalis</i>	<i>Lolliguncula brevis</i>
SOD	Kiemen	491,5 ± 234,4	99,4 ± 28,9
	Mantel	157,2 ± 38,9	88,0 ± 25,1
Katalase	Kiemen	416,0 ± 195,2	255,7 ± 106,9
	Mantel	20,6 ± 25,3	0,0 ± 0,0
GPX	Kiemen	0,26 ± 0,03	0,04 ± 0,04
	Mantel	0,03 ± 0,00	0,01 ± 0,01
GR	Kiemen	0,30 ± 0,06	0,08 ± 0,02
	Mantel	0,05 ± 0,03	0,00 ± 0,00
Sauerstoffverbrauch		8,9 (17)	21,0 (20)

beiden Fischarten *Gadus morhua* und *Salmo trutta*, deren Stoffwechselrate im gleichen Bereich liegt wie die von *Sepia officinalis*, ist das Oxidationsschutzsystem insgesamt besser ausgeprägt als in den beiden Cephalopodenarten. Dies gilt auch für die Muscheln *Mytilus edulis* und *Pecten maximus* sowie den Wattwurm *Arenicola marina* und den Spritzwurm *Sipunculus nudus* mit wesentlich niedrigeren Stoffwechselraten (Tabelle 7). Unter den Evertebraten wurden die höchsten Katalaseaktivitäten bei Tieren aus der Gezeitenzone gefunden, nämlich *Mytilus edulis*, *Heteromastus filiformis* und *Arenicola marina*. Diese Tiere können im Sommer oft hohen H₂O₂-Konzentrationen im Wasser ausgesetzt sein (Abele-Oeschger et al. 1994; Abele-Oeschger und Oeschger 1995a). Daher müssen sie neben dem endogen produzierten auch das aus dem Lebensraum aufgenommene H₂O₂ entgiften. Aus diesem Grund haben sie wahrscheinlich besonders hohe Katalaseaktivitäten. Setzt man die Stoffwechselraten der in Tabelle 7 genannten ektothermen, aquatischen Arten in Relation zur Aktivität der SOD (Abb. 9), so zeigt sich keine eindeutige Korrelation zwischen diesen beiden Parametern. Dies gilt ebenso für die Aktivitäten der Katalase, GPX und GR. Im Gegensatz dazu wurden bei einer Reihe von endothermen Tieren zusammen mit den höchsten Stoffwechselraten auch die höchsten Aktivitäten der Oxidationsschutzenzyme gefunden (Tabelle 7). Insgesamt zeigen diese Vergleiche, daß bei ektothermen Tieren und zumindest bei den beiden untersuchten Cephalopodenarten eine hohe Stoffwechselrate nicht unbedingt mit einem hohen enzymatischen Oxidationsschutz einhergeht.

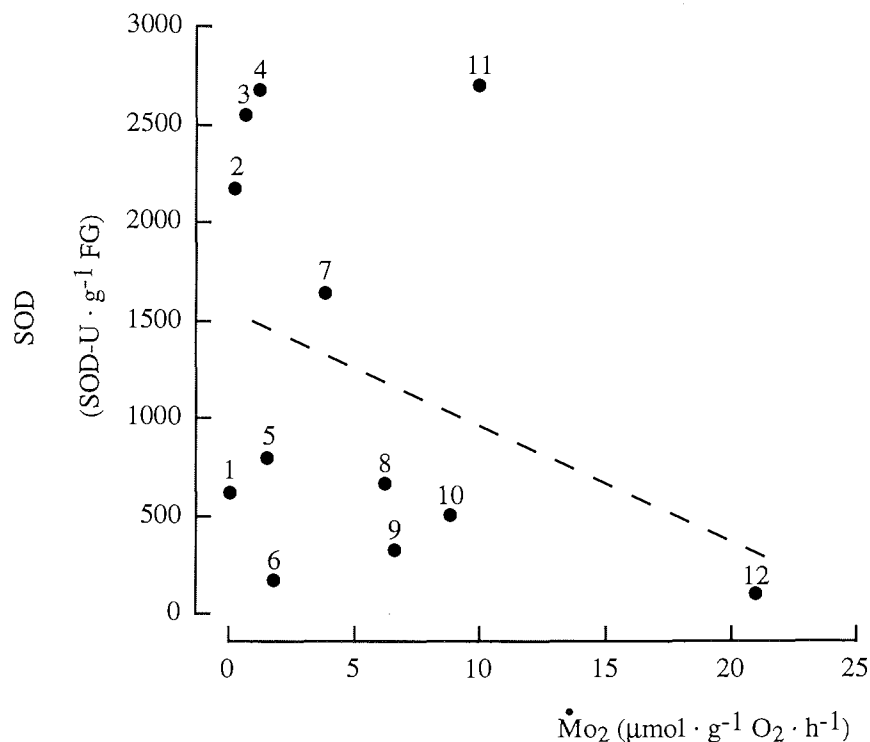


Abb. 9 Die Darstellung der Superoxid-Dismutaseaktivität in Abhängigkeit von der Stoffwechselrate verschiedener ektothermer, aquatischer Arten zeigt keine klare Korrelation. Da in den einzelnen Arbeiten unterschiedliche Gewebe untersucht wurden, wurde in dieser Abbildung die jeweils höchste in einer Art gemessene Aktivität aufgetragen. Weiterhin wurde der Übersicht wegen auf die Standardabweichung verzichtet. (1: *Mytilus edulis*; 2: *Heteromastus filiformis*; 3: *Sipunculus nudus*; 4: *Arenicola marina*; 5: *Calypptogena magnifica*; 6: *Carcinus maenas*; 7: *Gadus morhua*; 8: *Nereis diversicolor*; 9: *Pecten maximus*; 10: *Sepia officinalis*; 11: *Salmo trutta*; 12: *Lolliguncula brevis*; Quellen siehe Tabelle 7; nach Publikation IV)

Untersuchungen an verschiedenen Säugetierarten zeigten einen korrelativen Zusammenhang zwischen Radikalbildung und Stoffwechselrate. Die Arten mit den höchsten Stoffwechselraten produzierten auch die höchsten Konzentrationen an Superoxid und H_2O_2 in den Mitochondrien (Ku et al. 1993). Sollte dies auch für Cephalopoden mit ihrer vergleichsweise hohen Stoffwechselrate (Pörtner 1994a) gelten, könnte bedingt durch die relativ geringe antioxidative Kapazität eine verstärkte Schädigung der Zellen auftreten. Um diesen Aspekt näher zu betrachten, wurden die Konzentrationen von MDA in verschiedenen Geweben von *Sepia officinalis* bestimmt. Die maximalen Konzentrationen lagen bei $235 \text{ nmol} \cdot \text{g}^{-1}$ FG in der Mantelmuskulatur und bei $494 \text{ nmol} \cdot \text{g}^{-1}$ FG im Kiemengewebe von *Sepia officinalis* (Publikation IV). Diese Werte sind wesentlich höher als die $81,7$ bis $89,9 \text{ nmol} \cdot \text{g}^{-1}$ FG in der Leber von *Rana perezi* (López-Torres et al. 1991) oder den $45,4$ bis $75,8 \text{ nmol} \cdot \text{g}^{-1}$ FG in den Muscheln *Mytilus edulis*,

Adamussium colbecki und *Mytilus galloprovincialis* (Viarengo et al. 1990, 1991a, 1995). Die höheren MDA-Konzentrationen in den Geweben von *Sepia officinalis* weisen eventuell auf eine erhöhte Zellschädigung durch eine hohe Produktionsrate reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) hin, die durch den relativ niedrigen enzymatischen Oxidationsschutz nicht abgefangen werden können.

Tabelle 7 Aktivitäten der SOD (SOD-U · g⁻¹ FG), Katalase und GPX (U · g⁻¹ FG) in den Geweben verschiedener Arten. Ausgewählt wurde jeweils das Gewebe mit der höchsten Enzymaktivität. Ferner sind die Stoffwechselraten (μmol O₂ · h⁻¹ · g⁻¹) dieser Arten angegeben. Der Wert in Klammern gibt die Temperatur (T in °C) an, bei der die Stoffwechselrate ermittelt wurde. (MDD - Mitteldarmdrüse; HP - Hepatopankreas; HMS - Hautmuskelschlauch; GT - gesamtes Tier; CG - Chloragog; verändert nach Publikation IV; Quellen (Q.): 1 - Gamble et al. 1995; 2 - Newell & Bayne 1973; 3 - Brand & Roberts 1973; 4 - Taylor et al. 1977; 5 - Blum & Fridovich 1984; 6 - Arp et al. 1984; 7 - Buchner, Abele, Pörtner, unveröffentlicht; 8 - Pörtner et al. 1985; 9 - Abele et al. 1998; 10 - Buchner et al. 1996; 11 - Sommer 1998; 12 - Abele-Oeschger et al. 1994; 13 - Kristensen 1983; 14 - Lemaire et al. 1993; 15 - Boutilier 1998; 16 - López-Torres et al. 1993).

Art	Gewebe	SOD	Katalase	GPX	Mo ₂ (T)	Q.
<i>Mytilus edulis</i>	Muskel	-	-	0,7 ± 0,2	0,1 (20)	1, 2
	MDD	615 ± 52	5870 ± 1060			
<i>Pecten maximus</i>	Kiemen	-	-	0,5 ± 0,2	8,9 (10)	1, 3
	MDD	324 ± 6	36100 ± 600			
<i>Carcinus maenas</i>	Muskel	-	-	0,1 ± 0,0	1,8 (18)	1, 4
	HP	173 ± 10	280 ± 110			
<i>Calyptogena magnifica</i>	Muskel	795	0	0,3	1,6 (8)	5, 6
<i>Sipunculus nudus</i>	HMS	2540 ± 1250	996 ± 275	-	0,8 (15)	7, 8
<i>Heteromastus filiformis</i>	GT	2170 ± 610	1190 ± 260	-	0,3 (10)	9
<i>Arenicola marina</i>	CG	2670 ± 675	69300 ± 34500	-	1,3 (10)	10, 11
<i>Nereis diversicolor</i>	GT	660	5070	-	6,3 (10)	12, 13
<i>Gadus morhua</i>	Kiemen	1640 ± 140	4140 ± 710	2,9 ± 0,9	3,9 (15)	14, 15
<i>Salmo trutta</i>	Leber	2700	16700	10	10,1 (25)	16
<i>Rana perezi</i>	Leber	8200	110000	10	3,0 (25)	16
Meerschweinchen	Leber	25000	90000	40	30,4 (25)	16
Ratte	Leber	17700	76700	220	35,2 (25)	16
Maus	Leber	-	26700	-	116 (25)	16
Taube (<i>Columbia livia</i>)	Leber	29100	26700	10	67 (25)	16

4.3.2 Bedeutung der Radikalbildung und des Oxidationsschutzes für die Alterung

Die Aktivitäten der Oxidationsschutzenzyme SOD, Katalase, GPX und GR wurden auch in Abhängigkeit vom Alter von *Sepia officinalis* untersucht. Diese Messungen wurden an Tieren durchgeführt, die im Labor aufgezogen wurden. Unter diesen Bedingungen erreicht *Sepia officinalis* nur ein maximales Alter von 14 Monaten (Forsythe et al. 1994), während im natürlichen Lebensraum eine Lebensspanne von bis zu 2 Jahren möglich ist (von Boletzky 1983). Abiotische Faktoren wie z. B. Temperatur und Hypoxie können auch oxidative und antioxidative Prozesse beeinflussen (siehe 4.4). Da die einzelnen Individuen in der natürlichen Umgebung Änderungen der abiotischen Faktoren im unterschiedlichen Ausmaß ausgesetzt sind, ist auch der auf sie einwirkende oxidative Streß nicht einheitlich. Demgegenüber garantiert die Zucht im Labor gleichartige Bedingungen für alle untersuchten Tiere.

Die Änderung der Aktivitäten der am Oxidationsschutz beteiligten Enzyme mit zunehmendem Alter von *Sepia officinalis* waren für jedes Enzym spezifisch. Während die SOD-Aktivität sowohl in der Mantelmuskulatur als auch im Kiemengewebe der ältesten Tiere (12 Monate) signifikant gegenüber den Aktivitäten in den Geweben der jüngsten Tiere (1,5 Monate) erhöht war, konnte für die GPX nur in den Kiemen eine signifikante Aktivitätssteigerung beobachtet werden. Im Gegensatz dazu sank die Aktivität der Katalase in der Mantelmuskulatur älterer Tiere sogar bis auf nicht mehr nachweisbare Werte ab, wohingegen für die GR keine altersabhängige Aktivitätsänderung festgestellt werden konnte (Abb. 10; Publikation IV). Ein ähnlich diverses Bild findet sich auch in der Literatur. Buchner et al. (1996) zeigten z. B. für den Wattwurm *Arenicola marina*, daß die GR-Aktivität in jüngeren Tieren höher war als in älteren, während sich bei den älteren die Aktivität der Katalase gegenüber den jüngeren Tieren erhöhte. Dagegen nahm bei *Mytilus edulis* die Katalaseaktivität bei alten Tieren ab (Viarengo et al. 1991a), und in den Geweben der Stubenfliege *Musca domestica* sank mit zunehmendem Alter sowohl die SOD- als auch die Katalaseaktivität (Sohal et al. 1983). Im Gegensatz dazu wiesen die Aktivitäten von Katalase, GR und GPX in der Leber des Frosches *Rana perezi* keine Altersabhängigkeit auf (López-Torres et al. 1991).

Die in den Geweben von *Sepia officinalis* beobachtete Aktivitätszunahme der SOD mit zunehmendem Alter der Tiere (Abb. 10; Publikation IV) könnte bedeuten, daß ein Schutz gegen eine erhöhte Superoxidproduktion nötig ist (Rady 1993; Parihar et al. 1997). Eine

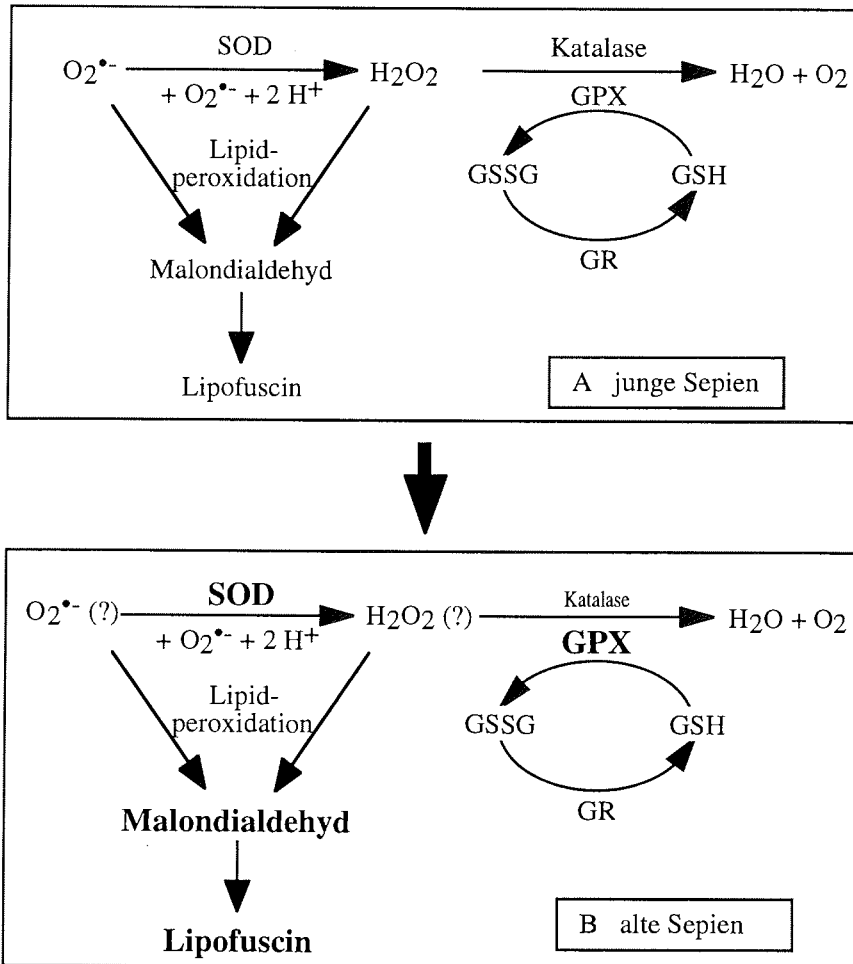


Abb. 10 Schematische Darstellung der in der vorliegenden Arbeit untersuchten oxidativen und antioxidativen Prozesse sowie deren Veränderung mit zunehmendem Alter von *Sepia officinalis*. Superoxid ($O_2^{\bullet-}$) wird durch die Superoxid-Dismutase (SOD) zu H_2O_2 umgesetzt, das durch die Katalase oder die Glutathion-Peroxidase (GPX) abgebaut wird. Die Glutathion-Reduktase (GR) überführt oxidiertes Glutathion (GSSG) wieder in die reduzierte Form (GSH). Dies steht dann der GPX wieder zur Verfügung. Die Bildung von Radikalen kann zur Lipidperoxidation führen, wodurch Malondialdehyd und Lipofuscin entstehen. Die in den jungen Sepien (1,5 Monate) gemessenen Aktivitäten und Konzentrationen werden als Ausgangswert betrachtet (A). Die Änderung dieser Parameter in den ältesten Tieren (12 Monate) werden in (B) durch eine Veränderung der Schriftgröße dargestellt. Während die Katalaseaktivität sank und die Aktivität der GR unverändert blieb, stiegen die Aktivitäten von SOD und GPX an. Außerdem konnte eine Zunahme der Konzentrationen von Malondialdehyd und Lipofuscin beobachtet werden. Die Konzentrationen von Superoxid und Wasserstoffperoxid im Gewebe wurden nicht gemessen, jedoch sollten die Aktivitätsänderungen der Oxidationsschutzenzyme einen Einfluß auf die Konzentrationen haben. Dies wird durch die Fragezeichen angedeutet. (Erstellung der schematischen Darstellung nach den Daten aus Publikation IV).

Zunahme der SOD-Aktivität aufgrund erhöhter Radikalbildung wurde bei der Miesmuschel *Mytilus edulis* gefunden (Livingstone et al. 1990). Möglicherweise ist dies ein Hinweis darauf, daß wie bei anderen Arten (z. B. Sohal et al. 1983; Sawada und Carlson 1987; Farmer und Sohal 1993) auch bei *Sepia officinalis* Alterung mit einer Erhöhung der Radikalproduktion verbunden ist. Da die SOD Superoxid zu H_2O_2 umsetzt und zusammen mit der Aktivitätssteigerung der SOD in den alten Sepien eine drastische Abnahme der Katalaseaktivität zu beobachten war (Abb. 10; Publikation IV), wäre eine Zunahme der intrazellulären H_2O_2 -Konzentration zu erwarten. Außerdem war die Aktivität der ebenfalls Wasserstoffperoxid umsetzenden GPX 800fach gegenüber der maximalen Katalaseaktivität erniedrigt (Publikation IV), somit kann dieses Enzym den Aktivitätsverlust der Katalase mit zunehmenden Alter vermutlich nicht kompensieren.

Eine Erhöhung des oxidativen Stresses mit zunehmenden Alter sollte durch die Zunahme oxidativer Schäden erkennbar sein, u. a. durch die Akkumulation von Malondialdehyd und Lipofuscin. Tatsächlich konnte sowohl in der Mantelmuskulatur als auch im Gehirn von *Sepia officinalis* eine signifikante Erhöhung der Lipofuscinkonzentration in den ältesten Tieren beobachtet werden (Publikation IV). Eine solche altersabhängige Akkumulation von Lipofuscin wurde auch für verschiedene Krebse (Nicol et al. 1991; Sheehy et al. 1994, 1995), Fische (Vernet et al. 1988) und Insekten (Sohal und Donato 1978; Sohal 1981a, b) gefunden. Die Anreicherung von Lipofuscin erfolgt wahrscheinlich nicht kontinuierlich. Bei Krebsen scheint bedingt durch eine Erniedrigung der Stoffwechselrate bei älteren/größeren Tieren eine Verlangsamung der Lipofuscinakkumulation stattzufinden (Sheehy 1990, 1992). Außerdem wurden für den australischen Flußkrebis *Cherax quadricarinatus* Fluktuationen in der Akkumulationsrate gefunden, die wahrscheinlich auf saisonale Schwankungen abiotischer Parameter zurückzuführen sind (Sheehy et al. 1994). Eine solche saisonale Oszillation wurde in der Muschel *Mytilus edulis* auch für die Malondialdehydkonzentration gemessen (Viarengo et al. 1991b). Weiterhin scheint die Anreicherung von MDA nicht eindeutig mit dem Alter zusammenzuhängen. Während die MDA-Konzentration in der Mitteldarmdrüse der Miesmuschel *Mytilus edulis* in den älteren Tieren signifikant höher lag als in jungen Tieren (Viarengo et al. 1989, 1991a), wurden in der Leber und den Nieren von älteren Ratten sogar geringere Konzentrationen gemessen als in jüngeren (Cand und Verdetti 1989). Auch in den Geweben von *Sepia officinalis* zeigte sich kein klarer Zusammenhang zwischen der MDA-Konzentration und dem Alter (Abb. 11; Publikation IV). In den Kiemen war die MDA-Konzentration bei den ältesten gegenüber den jüngsten Sepien signifikant höher, während in der Mantelmuskulatur ein signifikanter Anstieg der MDA-Konzentration nur bei den 10 Monate alten Tieren beobachtet werden konnte. In den

ältesten Tieren war die Konzentration dagegen nicht höher als in den jüngeren Tieren. Möglicherweise bewirkte der ständige Kontakt der Kiemen mit sauerstoffreichem Wasser eine anhaltende Produktion von Malondialdehyd. Die beobachtete Abnahme der MDA-Konzentration in der Mantelmuskulatur ist eventuell darauf zurückzuführen, daß MDA zu Lipofuscin weiter reagiert. Entsprechend war die Lipofuscinkonzentration im Mantelgewebe der ältesten Tiere am höchsten. Die bisherigen Untersuchungen zeigen allerdings noch nicht, welche MDA- bzw. Lipofuscinkonzentrationen eine irreversible Schädigung bedeuten. Daher kann nicht abschließend geklärt werden, ob diese Prozesse signifikant zu der kurzen Lebenserwartung der Cephalopoden beitragen.

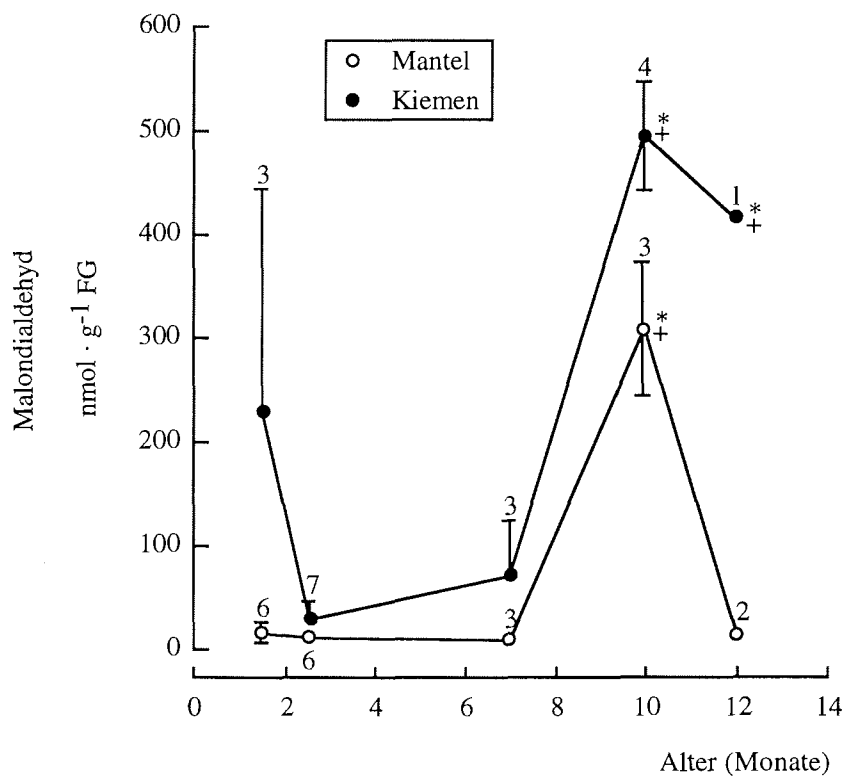


Abb. 11 Änderung der Malondialdehydkonzentration in der Mantelmuskulatur und im Kiemengewebe von *Sepia officinalis* in Abhängigkeit vom Alter der Tiere (* - signifikant verschieden von den 1,5 Monate alten Tieren; + - signifikant verschieden von den 2,5 Monate alten Sepien; Mittelwerte \pm SD; Zahlen an den Fehlerbalken = n).

Die für die Cephalopoden gewonnen Daten stimmen mit der Hypothese überein, daß möglicherweise die Bildungsrate von Radikalen einen größeren Einfluß auf die Alterung hat als die begrenzte Kapazität des Oxidationsschutzes (Sohal et al. 1990a). Dies zeigte sich auch in Untersuchungen an mehreren Säugetierarten, bei denen die H₂O₂- und die

Superoxidationradikalbildung in den Mitochondrien negativ mit der maximal möglichen Lebensspanne der untersuchten Arten korreliert. Die Tiere mit der kürzesten Lebensspanne und gleichzeitig auch mit den höheren Stoffwechselraten bildeten die größten Mengen an ROS (Sohal et al. 1989, 1990b; Ku et al. 1993). Das für *Sepia officinalis* gefundene Enzymmuster trägt eventuell zu einer Erhöhung der Radikalbildung mit zunehmenden Alter bei. Es wird angenommen, daß eine relativ hohe SOD-Aktivität zusammen mit verhältnismäßig niedrigen Aktivitäten der Katalase und GPX nicht nur zu einer Erhöhung der intrazellulären H_2O_2 -Konzentration führt, sondern auch zu der Bildung des hochreaktiven Hydroxylradikals (Chance et al. 1979; Sohal 1991). Eine besondere Bedeutung kommt möglicherweise der Katalase zu. So zeigte sich in der Leber des Frosches *Rana perezi* keine altersabhängige Änderung der Katalaseaktivität, gleichzeitig auch keine Änderung der MDA-Konzentration (López-Torres et al. 1991). Im Gegensatz dazu sank in den Geweben von *Sepia officinalis* die Katalaseaktivität, während die oxidativen Schäden zunahm, angezeigt durch hohe MDA-Konzentrationen in den Kiemen und erhöhte Lipofuscin-Konzentrationen in der Mantelmuskulatur und im Gehirn (siehe oben). Allerdings werden nicht nur Lipide, sondern auch Proteine und Nucleinsäuren durch Radikale geschädigt. Besonders eine Schädigung von Proteinen kann bedeutsam sein, da die hohen Wachstumsraten der Cephalopoden durch eine hohe Proteinsyntheserate und -retention bei nur geringem Proteinabbau erreicht werden, wie es für *Octopus vulgaris* gezeigt werden konnte (Houlihan et al. 1990). Da der Proteinumsatz u. a. zur Eliminierung beschädigter Proteine dient (Hershko und Ciechanover 1982), könnte der relativ geringe Proteinabbau zur frühen Seneszenz der Cephalopoden beitragen (Houlihan et al. 1990).

4.4 Ausblick: Temperatur und Sauerstoff als limitierende Faktoren für Cephalopoden

Oxidative und antioxidative Prozesse können durch Fluktuationen abiotischer Faktoren wie Temperatur und Sauerstoffverfügbarkeit beeinflusst werden. Hypoxe Bedingungen führen dazu, daß in der Atmungskette der Mitochondrien Sauerstoff als terminaler Elektronenakzeptor fehlt. Als Folge davon nimmt der Anteil der reduzierten, elektronenübertragenden Komponenten der Elektronentransportkette zu und es entsteht ein "reduktiver Streß", bei dem die Konzentration der potentiellen Elektronendonatoren erhöht ist. Diese Akkumulation von Redoxäquivalenten kann zu einer erhöhten ROS-Bildung führen, wenn bei Wiederaufnahme von Sauerstoff die Elektronen direkt auf diesen überführt werden (Jones 1985; Halliwell und Gutteridge 1989).

Ein Temperaturanstieg führt zu einer Erhöhung der Stoffwechselrate. Ein gesteigener Sauerstoffverbrauch sollte eine vermehrte Radikalbildung in den Mitochondrien zur Folge haben, da ungefähr 2 - 3% des veratmeten Sauerstoffes in der aeroben Zelle zu Superoxid und H_2O_2 umgesetzt wird (Sohal und Weindruch 1996). Somit könnten hohe Temperaturen zu einer vermehrten Freisetzung von ROS führen und auf diese Weise das Risiko oxidativer Schäden steigern (Abele et al. 1998). Diese Zusammenhänge zwischen den abiotischen Faktoren Temperatur und Hypoxie und der Radikalbildung könnten bedeuten, daß speziell Arten aus Lebensräumen mit fluktuierenden Umweltparametern, z. B. *Lolliguncula brevis* und *Sepia officinalis*, im besonderem Ausmaß oxidativem Streß ausgesetzt sind. Im Gegensatz dazu leben die antarktischen Cephalopoden in einem Lebensraum, der durch stabile, niedrige Temperaturen gekennzeichnet ist. Die niedrige Stoffwechselrate, die für den Oktopoden *Pareledone charcoti* gemessen wurde, könnte bedeuten, daß der Sauerstoffpartialdruck im Blut gering gehalten werden kann. Auf diese Weise würde eine Minimierung des oxidativen Stresses erreicht.

Das Hämocyanin der Kalmare ist mit seiner extremen pH-Abhängigkeit auf eine effiziente arterielle Beladung und völlige venöse Entladung ausgelegt. Auf diese Weise kann das Hämocyanin zu den höchsten gemessenen Sauerstoffverbrauchsdaten mariner Evertebraten beitragen. Schon unter Kontrollbedingungen und nicht erst während Phasen großer Aktivität erfolgt eine maximale Abgabe des Sauerstoffes vom Hämocyanin (Pörtner 1994a, b). Die maximale Nutzung des verfügbaren Sauerstoffes deutet darauf hin, daß die Verfügbarkeit von Sauerstoff zu einem limitierenden Faktor werden kann (Hochachka 1994; Pörtner 1994a). Aus diesem Grund wird angenommen, daß Kalmare die am wenigsten gegenüber Hypoxie toleranten Cephalopoden sind (Pörtner und Zielinski 1998). Für den Kalmaren *Lolliguncula brevis* haben die im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführten Experimente gezeigt, daß diese Art durchaus in der Lage ist, eine moderate Hypoxie (19,3 bis 6,6 kPa) für mindestens 2 Stunden zu tolerieren. Im Unterschied zu anderen marinen Evertebraten und Fischen tragen allerdings schon relativ früh, d. h. bei einem verhältnismäßig hohen Sauerstoffpartialdruck im Bereich von 7,9 bis 9,4 kPa, anaerobe Prozesse zur Energieversorgung bei. Das Einsetzen des anaeroben Stoffwechsels wurde auch nach Überschreiten der oberen kritischen Temperaturen beobachtet. In diesem Fall ist nicht die Verfügbarkeit von Sauerstoff in der Umgebung limitierend, sondern vermutlich die Unzulänglichkeit von Ventilation und Kreislauf, genügend Sauerstoff zu den Geweben zu transportieren (Pörtner et al. 1998). Diese Zusammenhänge deuten daraufhin, daß die Lage des kritischen Po_2 von der Temperatur abhängt und umgekehrt auch die Toleranz gegenüber fluktuierenden Temperaturen eng mit der Hypoxietoleranz verbunden ist. Tatsächlich

konnten solche Zusammenhänge in verschiedenen Arbeiten gezeigt werden. Die obere letale Temperatur des Hummer *Homarus americanus* verschob sich zu niedrigeren Temperaturen, wenn der Sauerstoffpartialdruck im Wasser abnahm (McLeese 1956). Bei mehreren Krebsarten führte eine Temperaturerhöhung zu einer Abnahme der Hypoxietoleranz (Taylor et al. 1977; Cowles et al. 1991). Eine kurzfristige Inkubation von Karpfen (*Cyprinus carpio*) unter hypoxen Bedingungen bewirkte eine Abnahme der Phosphagenkonzentration in der Muskulatur, die nach Ende der Hypoxie innerhalb von 2 Stunden wieder den Ausgangswert erreichte. Wurden die Fische vor der hypoxen Inkubation zusätzlich einem Temperaturstreß (Temperaturerhöhung von 25 auf 33 °C) ausgesetzt, so war selbst nach 6 Stunden der Kontrollwert des Phosphagens noch nicht wieder erreicht. Eine vierwöchige Akklimation an 33 °C führte zur Wiederherstellung der ursprünglichen Erholungsfähigkeit (Borger et al. 1998). Diese Beziehung zwischen Hypoxie- und Temperaturtoleranz scheint besonders für den Kalmaren *Lolliguncula brevis* bedeutsam zu sein, da diese Art in einem Lebensraum mit saisonal fluktuierenden Umweltparametern lebt. Der für diese Art gefundene kritische P_{O_2} von 7,9 bis 9,4 kPa wurde bei einer Temperatur von 20 °C bestimmt. Im natürlichen Lebensraum dieses Kalmaren treten hypoxe Bedingungen besonders in den Sommermonaten auf, wenn gleichzeitig auch die Temperaturen am höchsten sind (Gunter 1950; Livingston et al. 1976). Selbst unter Berücksichtigung der Tatsache, daß eine gewisse Anpassung an sommerliche Temperaturen stattfindet, wird sich vermutlich eine Abnahme der Hypoxietoleranz einstellen. Außerdem wird die kritische Temperatur, die schon unter normoxen Bedingungen nur gerade oberhalb der im Lebensraum auftretenden Temperaturen liegt, unter hypoxen Bedingungen niedriger liegen. Im Hinblick auf die Umgebungsparameter von *Lolliguncula brevis* legen diese Ergebnisse nahe, daß diese Kalmare an den Grenzen ihrer physiologischen Möglichkeiten agieren (Pörtner und Zielinski 1998).

6. Literaturverzeichnis

- Abele D, Großpietsch H, Pörtner HO (1998) Temporal fluctuations and spatial gradients of environmental Po_2 , temperature, H_2O_2 and H_2S in its intertidal habitat trigger enzymatic antioxidant protection in the capitellid worm *Heteromastus filiformis*. Mar Ecol Prog Ser 163: 179-191
- Abele-Oeschger D, Oeschger R (1995a) Enzymatic antioxidant protection in spawn, larvae and adult worms of *Phyllodoce mucosa* (Polychaeta). Ophelia 43: 101-110
- Abele-Oeschger D, Oeschger R (1995b) Hypoxia-induced autoxidation of haemoglobin in the benthic invertebrates *Arenicola marina* (Polychaete) and *Astarte borealis* (Bivalvia) and the possible effects of sulphide. J Exp Mar Biol Ecol 187: 63-80
- Abele-Oeschger D, Oeschger R, Theede H (1994) Biochemical adaptations of *Nereis diversicolor* (Polychaeta) to temporarily increased hydrogen peroxide levels in intertidal sandflats. Mar Ecol Prog Ser 106: 101-110
- Aebi HE (1985) Catalase. In: Bergmeyer HU, Bergmeyer J, Graßl M (Hrsg.) Methods of enzymatic analysis. Vol VIII. Verlag Chemie, Weinheim, S. 273-286
- Agnisola C, Driedzic WR, Foster AR, Houlihan DF (1991) Oxygen consumption, carbon dioxide production and enzyme activities of isolated working *Octopus* heart. J exp Biol 157: 543-549
- Ansell AD, Barnett PRO, Bodoy A, Massé H (1980) Upper temperature tolerances of some European molluscs. I. *Tellina fabula* and *T. tenuis*. Mar Biol 58: 33-39
- Arntz WE, Brey T, Gallardo VA (1994) Antarctic zoobenthos. Ocean Mar Biol Ann Rev 32: 241-304
- Arp AJ, Childress JJ, Fisher jr CR (1984) Metabolic and blood gas transport characteristics of the hydrothermal vent bivalve *Calyptogena magnifica*. Physiol Zool 57: 648-662
- Baldwin J (1982) Correlations between enzyme profiles in cephalopod muscle and swimming behaviour. Pac Sci 36: 349-356
- Baldwin J, England WR (1980) A comparison of anaerobic energy metabolism in mantle and tentacle muscle of the blue-ringed octopus, *Hapalochlaena maculosa*, during swimming. Aust J Zool 28: 407-412
- Ballantyne JS, Hochachka PW, Mommsen TP (1981) Studies on the metabolism of the migratory squid, *Loligo opalescens*: enzymes of tissues and heart mitochondria. Mar Biol Lett 2: 75-85
- Baumfalk YA (1979) On the pumping activity of *Arenicola marina*. Neth J Sea Res 13: 422-427

- Beamish FWH (1964) Respiration of fishes with special emphasis on standard oxygen consumption. III. Influence of oxygen. *Can J Zool* 42: 355-367
- Beis I, Newsholme EA (1975) The contents of adenine nucleotides, phosphagens and some glycolytic intermediates in resting muscles from vertebrates and invertebrates. *Biochem J* 152: 23-32
- Belman BW, Childress JJ (1976) Circulatory adaptations to the oxygen minimum layer in the bathypelagic mysid *Gnathophausia ingens*. *Biol Bull* 150: 15-37
- Bergmeyer HU, Bergmeyer J, Graßl M (1983-1986) *Methods of enzymatic analysis*. Verlag Chemie, Weinheim
- Beukema JJ (1979) Biomass and species richness of macrozoobenthic animals living on a tidal flat area in the Dutch Wadden Sea: effects of a severe winter. *Neth J Sea Res* 13: 203-223
- Beukema JJ (1992) Expected changes in the Wadden Sea benthos in a warmer world: lessons from periods with mild winters. *Neth J Sea Res* 30: 73-79
- Blum J, Fridovich I (1984) Enzymatic defense against oxygen toxicity in the hydrothermal vent animals *Riftia pachyptila* and *Calyptogena magnifica*. *Arch Biochem Biophys* 228: 617-620
- Borer KT, Lane CE (1971) Oxygen requirements of *Octopus briareus* Robson at different temperatures and oxygen concentrations. *J Exp Mar Biol Ecol* 7: 263-269
- Borger R, de Boeck G, van Audekerke J, Domisse R, Blust R, van der Linden A (1998) Recovery of the energy metabolism after a hypoxic challenge at different temperature conditions: a ³¹P-nuclear magnetic resonance spectroscopy study with common carp. *Comp Biochem Physiol A* 120: 143-150
- Boucher-Rodoni R, Mangold K (1985) Ammonia excretion during feeding and starvation in *Octopus vulgaris*. *Mar Biol* 86: 193-197
- Boucher-Rodoni R, Mangold K (1994) Ammonia production in cephalopods, physiological and evolutionary aspects. In: Pörtner HO, O'Dor RK, MacMillan D (Hrsg.) *Physiology of cephalopod molluscs - lifestyle and performance adaptations*. Gordon and Breach Publishers, Basel, S. 53-60
- Boutilier RG (1998) Physiological ecology in cold ocean fisheries: a case study in Atlantic cod. In: Pörtner HO, Playle RC (Hrsg.) *Cold ocean physiology*. Cambridge University Press, Cambridge, S. 464-489
- Boutilier RG, Iwama GK, Heming TA, Randall DJ (1985) The apparent pK of carbonic acid in rainbow trout blood plasma between 5 and 15°C. *Respir Physiol* 61: 237-254
- Boutilier RG, Dobson G, Hoeger U, Randall DJ (1988) Acute exposure to graded levels of hypoxia in rainbow trout (*Salmo gairdneri*): metabolic and respiratory adaptations. *Respir Physiol* 71: 69-82

- Boutilier RG, West TG, Pogson GH, Mesa KA, Wells J, Wells MJ (1996) *Nautilus* and the art of metabolic maintenance. *Nature* 382: 534-536
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248-254
- Branco LGS, Pörtner HO, Wood SC (1993) Interaction between temperature and hypoxia in the alligator. *Am J Physiol* 265: R1339-R1343
- Brand AR, Roberts D (1973) The cardiac responses of the scallop *Pecten maximus* (L.) to respiratory stress. *J Exp Mar Biol Ecol* 13: 29-43
- Bridges CR (1994) Bohr and Root effects in cephalopod haemocyanins - paradox or pressure in *Sepia officinalis*? In: Pörtner HO, O'Dor RK, MacMillan D (Hrsg.) *Physiology of cephalopod molluscs - lifestyle and performance adaptations*. Gordon and Breach Publishers, Basel, S. 121-130
- Brix O (1983) Giant squids may die when exposed to warm water currents. *Nature* 303: 422-423
- Brix O, Lykkeboe G, Johansen K (1981) The significance of the linkage between the Bohr and Haldane effects in cephalopod bloods. *Respir Physiol* 44: 177-186
- Brix O, Bårdgard A, Cau A, Colosimo A, Condò SG, Giardina B (1989) Oxygen-binding properties of cephalopod blood with special reference to environmental temperatures and ecological distribution. *J Exp Zool* 252: 34-42
- Brix O, Colosimo A, Ciardina B (1994) Temperature dependence of oxygen binding to cephalopod haemocyanins: ecological implications. In: Pörtner HO, O'Dor RK, MacMillan D (Hrsg.) *Physiology of cephalopod molluscs - lifestyle and performance adaptations*. Gordon and Breach Publishers, Basel, S. 149-162
- Buchner T, Abele-Oeschger D, Theede H (1996) Aspects of antioxidant status in the polychaete *Arenicola marina*: tissue and subcellular distribution, and reaction to environmental hydrogen peroxide and elevated temperature. *Mar Ecol Prog Ser* 143: 141-150
- Burnett LE, Scholnick DA, Mangum CP (1988) Temperature sensitivity of molluscan and arthropod hemocyanins. *Biol Bull* 174: 153-162
- Burton DT, Heath AG (1980) Ambient oxygen tension (P_{O₂}) and transition to anaerobic metabolism in three species of freshwater fish. *Can J Fish Aquat Sci* 37: 1216-1224
- Butler PJ, Day N (1993) The relationship between intracellular pH and seasonal temperature in the brown trout *Salmo trutta*. *J exp Biol* 177: 293-297
- Calow P (1987) Fact and theory - an overview. In: Boyle PR (Hrsg.) *Cephalopod life cycles* Vol. II. Academic Press, London, S. 351-365

- Campbell CM, Davies PS (1978) Temperature acclimation in the teleost, *Blennius pholis*: changes in enzyme activity and cell structure. *Comp Biochem Physiol* 61B: 165-167
- Cand F, Verdetti J (1989) Superoxide dismutase, glutathione peroxidase, catalase, and lipid peroxidation in the major organs of the aging rats. *Free Rad Biol Med* 7: 59-63
- Caughey WS, Watkins JA (1985) Oxy radical and peroxide formation by hemoglobin and myoglobin. In: Greenwald RA (Hrsg.) *CRC handbook of methods for oxygen radical research*. CRC Press, Boca Raton, S. 95-104
- Chance B, Sies H, Boveris A (1979) Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol Rev* 59: 527-605
- Childress JJ (1995) Are there physiological and biochemical adaptations of metabolism in deep-sea animals? *Trends Ecol Evol* 10: 30-36
- Childress JJ, Seibel BA (1998) Life at stable low oxygen levels: adaptations of animals to oceanic oxygen minimum layers. *J exp Biol* 201: 1223-1232
- Clarke A (1983) Life in cold water: the physiological ecology of polar marine ectotherms. *Oceanogr Mar Biol Ann Rev* 21: 341-453
- Clarke A (1988b) Seasonality in the Antarctic marine environment. *Comp Biochem Physiol* 90B: 461-473
- Clarke MR (1988a) Evolution of recent Cephalopods - a brief review. In: Wilbur KM (Hrsg.) *The Mollusca* Vol. 12. Academic Press, New York, London, S. 331-340
- Clarke M, Goodall N (1994) Cephalopods in the diets of three odontocete cetacean species stranded at Tierra del Fuego, *Globicephala melaena* (Traill, 1809), *Hyperoodon planifrons* Flower, 1882 and *Cephalorhynchus commersonii* (Lacepede, 1804). In: Rodhouse PG, Piatkowski U, Lu CC (Hrsg.) *Southern Ocean cephalopods: life cycles and populations*. *Ant Sci* 6: 149-154
- Combs CA, Ellington WR (1995) Graded intracellular acidosis produces extensive and reversible reductions in the effective free energy change of ATP hydrolysis in a molluscan muscle. *J Comp Physiol* 165B: 203-212
- Copeland BJ (1965) Fauna of the Aransas Pass Inlet, Texas. I. Emigration as shown by tide trap collections. *Contrib Mar Sci* 10: 9-21
- Cossins AR, Bowler K (1987) *Temperature biology of animals*. Chapman and Hall, London, 339 S.
- Cowles DL, Childress JJ, Wells ME (1991) Metabolic rates of midwater crustaceans as a function of depth of occurrence off Hawaiian Islands: food availability as a selective factor? *Mar Biol* 110: 75-83
- Crockett EL, Sidell BD (1990) Some pathways of energy metabolism are cold adapted in antarctic fishes. *Physiol Zool* 63: 472-488

- Dahlhoff E, Somero GN (1993) Kinetic and structural adaptations of cytoplasmic malate dehydrogenases of eastern pacific abalone (genus *Haliotis*) from different thermal habitats: biochemical correlates of biogeographic patterning. *J Exp Biol* 185: 137-150
- Dethlefsen V, von Westernhagen H (1983) Oxygen deficiency and effects on bottom fauna in the eastern German Bight 1982. *Meeresforsch* 30: 42-53
- Doumen C, Ellington WR (1990) Mitochondrial arginine kinase from the heart of the horseshoe crab, *Limulus polyphemus* L. Physico-chemical properties and nature of interaction with the mitochondrion. *J Comp Physiol* 160B: 449-457
- Dragovich A, Kelly jr JA (1962) A biological study and some economic aspects of squid in Tampa Bay, Florida. *Proc Gulf Caribb Fish Inst* 15: 87-103
- Dragovich A, Kelly jr JA (1964) Ecological observations of macroinvertebrates in Tampa Bay, Florida 1961 - 1962. *Bull Mar Sci Gulf Caribb* 14: 74-102
- Dragovich A, Kelly jr JA (1967) Occurrence of the squid *Lolliguncula brevis*, in some coastal waters of western Florida. *Bull Mar Sci Gulf Caribb* 17: 840-844
- Driedzic WR, Sidell BD, Stewart JM, Johnston IA (1990) Maximal activities of enzymes of energy metabolism in cephalopod systemic and branchial hearts. *Physiol Zool* 63: 615-629
- Egginton S, Sidell BD (1989) Thermal acclimation induces adaptive changes in subcellular structure of fish skeletal muscle. *Am J Physiol* 256: R1-R9
- Ehrhardt M, Wenck A (1984) Wind pattern and hydrogen sulfide in shallow waters of Western Baltic Sea, a cause and effect relationship? *Meeresforsch* 30: 101-110
- Elstner EF (1990) *Der Sauerstoff*. Biochemie, Biologie, Medizin. Wissenschaftsverlag Mannheim, Wien, Zürich, 529 S.
- Ettershank G (1983) Age structure and cyclical annual size change in the Antarctic krill, *Euphausia superba* Dana. *Polar Biol* 2: 189-193
- Ettershank G (1984) A new approach to the assessment of longevity in the Antarctic krill, *Euphausia superba*. *J Crust Biol* 4: 295-305
- Farmer KJ, Sohal RS (1993) Relationship between superoxide anion radical generation and aging in the housefly, *Musca domestica*. *Free Rad Biol Med* 7: 23-29
- Fenchel T, Finlay BJ (1995) *Ecology and evolution in anoxic worlds*. Oxford University Press, Oxford, New York, Tokyo, 276 S.
- Filho DW, Giulivi C, Boveris A (1993) Antioxidant defences in marine fish. I. Teleosts. *Comp Biochem Physiol* 106C: 409-413
- Filippova JA, Pakhomov EA (1994) Young squid in the plankton of Prydz Bay, Antarctica. In: Rodhouse PG, Piatkowski U, Lu CC (Hrsg.) *Southern Ocean cephalopods: life cycles and populations*. *Ant Sci* 6: 171-173

- Finke E, Pörtner HO, Lee PG, Webber DM (1996) Squid (*Lolliguncula brevis*) life in shallow waters: oxygen limitation of metabolism and swimming performance. J exp Biol 199: 911-921
- Fischer W, Hureau JC (1985) FAO species identification sheets for fishery purposes. Southern ocean. FAO, S. 118-205
- Forsythe JW, DeRusha RH, Hanlon RT (1994) Growth, reproduction and life span of *Sepia officinalis* (Cephalopoda: Mollusca) cultured through seven consecutive generations. J Zool Lond 233: 175-192
- Foster AR, Hall SJ, Houlihan DF (1993) The effects of temperature acclimation on organ/tissue mass and cytochrome c oxidase activity in juvenile cod (*Gadus morhua*). J Fish Biol: 42: 947-957
- Gaebel K, Roots BI (1989) Stereological analysis of mitochondria from brains of temperature acclimated goldfish, *Carassius auratus* L. (5 and 30°C). J therm Biol 14: 187-190
- Gäde G, Carlsson KH (1984) Purification and characterisation of octopine dehydrogenase from the marine nemertean *Cerebratulus lacteus* (Anopla: Heteronemerta): comparison with scallop octopine dehydrogenase. Mar Biol 79: 39-45
- Gamble SC, Goldfarb PS, Porte C, Livingstone DR (1995) Glutathione peroxidase and other antioxidant enzyme function in marine invertebrates (*Mytilus edulis*, *Pecten maximus*, *Carcinus maenas* and *Asterias rubens*). Mar Env Res 39: 191-195
- Gaston GR (1985) Effects of hypoxia on macrobenthos of the inner shelf off Cameron, Louisiana. Estuar Coast Mar Sci 20: 603-613
- Goldberg AL, Dice JF (1974) Intracellular protein degradation in mammalian and bacterial cells. Annu Rev Biochem 43: 835-869
- Goldberg DM, Sparner RJ (1987) Glutathione reductase. In: Bergmeyer HU, Bergmeyer J, Graßl M (Hrsg.) Methods of enzymatic analysis. Vol. III. Verlag Chemie, Weinheim, S. 258-265
- Grieshaber M, Gäde G (1976) The biological role of octopine in the squid, *Loligo vulgaris* (Lamarck). J Comp Physiol 108B: 225-232
- Grieshaber M, Kronig E, Koormann R (1978) A photometric estimation of phospho-L-arginine, arginine and octopine using homogenous octopine dehydrogenase isoenzyme 2 from the squid *Loligo vulgaris* Lam. Hoppe-Seyler's Z Physiol Chem 359: 133-136
- Grieshaber MK, Hardewig I, Kreutzer U, Pörtner HO (1994). Physiological and metabolic responses to hypoxia in invertebrates. Rev Physiol Biochem Pharmacol 125: 43-147

- Guderley H (1998) Temperature and growth rates as modulators of metabolic capacities of fish muscle. In: Pörtner HO, Playle RC (Hrsg.) Cold ocean physiology. Cambridge University Press, Cambridge, S. 58-87
- Guderley H, Blier P (1988) Thermal acclimation in fish: conservative and labile properties. Can J Zool 66: 1105-1115
- Günzler A, Flohé L (1985) Glutathione peroxidase. In: Greenwald RA (Hrsg.) CRC Handbook of methods for oxygen radical research. CRC Press, Boca Raton, S. 285-289
- Gunter G (1950) Seasonal population changes and distribution as related to salinity, of certain invertebrates of the Texas coast, including the commercial shrimp. Contrib Mar Sci 1: 7-51
- Gutteridge JMC, Halliwell B (1990) The measurement and mechanism of lipid peroxidation in biological system. Trends Biochem Sci 15: 129-135
- Hain S (1990) Die beschalten benthischen Mollusken (Gastropoda und Bivalvia) des Weddellmeeres, Antarktis. Ber Polarforsch 70, 181 S.
- Halliwell B (1992) Reactive oxygen species and the central nervous system. J Neurochem 59: 1609-1623
- Halliwell B, Gutteridge JMC (1989) Free radicals in biology and medicine. Clarendon Press, Oxford, 543 S.
- Hanlon RT, Hixon RF, Hulet WH (1983) Survival, growth, and behaviour of the loliginid squids *Loligo plei*, *Loligo pealei*, and *Lolliguncula brevis* (Mollusca: Cephalopoda) in closed sea water systems. Biol Bull 165: 637-685
- Hardewig I, Addink ADF, Grieshaber MK, Pörtner HO, van den Thillart G (1991) Metabolic rates at different oxygen levels determined by direct and indirect calorimetry in the oxyconformer *Sipunculus nudus*. J Exp Biol 157: 143-160
- Harman D (1956) A theory based on free radical and radiation chemistry. J Geront 11: 298-300
- Harper jr DE, McKinney LD, Salzer RR, Case RJ (1981) The occurrence of hypoxic bottom water off the upper Texas coast and its effects on the benthic biota. Contrib Mar Sci 24: 53-79
- Hazel JR, Garlick WS, Sellner PA (1978) The effects of assay temperature upon the pH optima of enzymes from poikilotherms: a test of the imidazole alphastat hypothesis. J Comp Physiol 123B: 97-104
- Heisler N (1986) Buffering and transmembrane ion transfer processes. In: Heisler N (Hrsg.) Acid-base regulation in animals. Elsevier Science Publishers, Amsterdam, S. 3-47

- Hendrix jr JP, Hulet WH, Greenberg MJ (1981) Salinity tolerance and the responses to hypoosmotic stress of the bay squid *Lolliguncula brevis*, a euryhaline cephalopod mollusc. *Comp Biochem Physiol* 89A: 641-648
- Hershko A, Ciechanover A (1982) Mechanisms of intracellular protein breakdown. *Annu Rev Biochem* 51: 335-364
- Hill KT, Womersley C (1991) Critical aspects of fluorescent age-pigment methodologies: modification for accurate analysis and age assessments in aquatic organisms. *Mar Biol* 109: 1-11
- Hochachka PW (1988) Channels and pumps - determinants of metabolic cold adaptation strategies. *Comp Biochem Physiol* 90B: 515-519
- Hochachka PW (1994) Oxygen efficient design of cephalopod muscle metabolism. In: Pörtner HO, O'Dor RK, MacMillan D (Hrsg.) *Physiology of cephalopod molluscs - lifestyle and performance adaptations*. Gordon and Breach Publishers, Basel, S. 61-67
- Hochachka PW, Somero GN (1984) *Biochemical adaptation*. Princeton University Press, Princeton NJ, 537 S.
- Hochachka PW, Moon TW, Mustafa T, Storey KB (1975) Metabolic sources of power for mantle muscle of a fast swimming squid. *Comp Biochem Physiol* 52B: 151-158
- Houlihan DG, Innes AJ, Wells MJ, Wells J (1982) Oxygen consumption and blood gases of *Octopus vulgaris* in hypoxic conditions. *J Comp Physiol* 148: 35-40
- Houlihan DF, McMillan DN, Agnisola C, Trara Genoio I, Foti L (1990) Protein synthesis and growth in *Octopus vulgaris*. *Mar Biol* 106: 251-259
- Howell BJ, Gilbert DL (1976) pH-temperature dependence of the hemolymph of the squid, *Loligo pealei*. *Comp Biochem Physiol* 55A: 287-289
- Howell BJ, Rahn H, Goodfellow D, Herreid C (1973) Acid-base regulation and temperature in selected invertebrates as a function of temperature. *Amer Zool* 13: 557-563
- Hunt JC (1996) *Octopods and squid*. Monterey Bay Aquarium Foundation, Monterey, 64 S.
- Isemer HJ, Hasse L (1985) *The Bunker climate atlas of the North Atlantic ocean*. Vol I: observations. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, Tokyo, 218 S.
- Johansen K, Brix O, Lykkeboe G (1982a) Blood gas transport in the cephalopod, *Sepia officinalis*. *J exp Biol* 99: 331-338
- Johansen K, Brix O, Kornerup S, Lykkeboe G (1982b) Factors affecting O₂-uptake in the cuttlefish, *Sepia officinalis*. *J mar biol Ass UK* 62: 187-191
- Johnson TE (1990) Increased life-span of *age-1* mutants in *Caenorhabditis elegans* and lower Gompertz rate of aging. *Science* 249: 908-912

- Johnston IA (1990) Cold adaptation in marine organisms. *Phil Trans R Soc Lond B* 326: 655-667
- Johnston IA, Goldspink G (1975) Thermodynamic activation parameters of fish myofibrillar ATPase enzyme and evolutionary adaptations to temperature. *Nature* 257: 620-622
- Johnston IA, Clarke A, Ward P (1991) Temperature and metabolic rate in sedentary fish from the Antarctic, North Sea and Indo-West Pacific ocean. *Mar Biol* 109: 191-195
- Jones DP (1985) The role of oxygen concentration in oxidative stress: hypoxic and hyperoxic models. In: Sies H (Hrsg.) Academic Press, London, S. 151-195
- Kaletha K, Skladanoski A (1981) Effect of temperature on the activity of AMP deaminase from chicken heart and skeletal muscle at different stages of development. *Experientia* 37: 232-234
- Kammermeier H (1987) High energy phosphate of the myocardium: concentration versus free energy change. *Bas Res Cardiol* 82 Suppl 2: 31-36
- Kristensen E (1983) Ventilation and oxygen uptake by three species of *Nereis* (Annelida: Polychaeta) II. Effects of temperature and salinity changes. *Mar Ecol Prog Ser* 12: 299-306
- Ku HH, Brunk UT, Sohal RS (1993) Relationship between mitochondrial superoxide and hydrogen peroxide production and longevity of mammalian species. *Free Rad Biol Med* 15: 621-627
- Kubodera T, Okutani T (1986) New and rare cephalopods from the Antarctic waters. *Mem Natl Inst Polar Res, Spec Issue* 44: 129-143
- Kubodera T, Okutani T (1994) Eledonine octopods from the Southern Ocean: systematics and distribution. In: Rodhouse PG, Piatkowski U, Lu CC (Hrsg.) Southern Ocean cephalopods: life cycles and populations. *Ant Sci* 6: 205-214
- Kuehl S (1988). A contribution to the reproductive biology and geographical distribution of Antarctic Octopodidae (Cephalopoda). *Malacologia* 29: 89-100
- Kwast KE, Hand SC (1996). Oxygen and pH regulation of protein synthesis in mitochondria from *Artemia franciscana* embryos. *Biochem J* 313: 207-213
- Laughlin RA, Livingston RJ (1982) Environmental and trophic determinants of the spatial/temporal distribution of the brief squid (*Lolliguncula brevis*) in the Apalachicola estuary (North Florida, USA). *Bull Mar Sci* 32: 489-497
- Lallier F, Truchot JP (1989) Hemolymph oxygen transport during environmental hypoxia in the shore crab, *Carcinus maenas*. *Respir Physiol* 77: 323-336
- Lee PG (1994) Nutrition in cephalopods: fueling the system. In: Pörtner HO, O'Dor RK, MacMillan D (Hrsg.) Physiology of cephalopod molluscs - lifestyle and performance adaptations. Gordon and Breach Publishers, Basel, S. 35-51

- Lefant C, Aucutt C (1966) Measurement of blood gases by gas chromatography. *Respir Physiol* 1: 398-407
- Lehmann U (1987) Ammoniten. Ihr Leben und ihre Umwelt. Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart, 173 S.
- Leibovitz BE, Siegel BV (1980) Aspects of free radical reactions in biological systems: aging. *J Geront* 35: 45-56
- Lemaire P, Viarengo A, Canesi L, Livingstone DR (1993) Pro-oxidant and antioxidant processes in gas gland and other tissues of cod (*Gadus morhua*). *J Comp Physiol* 163B: 477-486
- Linzen B (1989) Blaues Blut: Struktur und Evolution der Hämocyane. *Naturwissenschaften* 76: 206-211
- Livingston RJ, Kobylinski GJ, Lewis III. FG, Sheridan PF (1976) Long-term fluctuations of epibenthic fish and invertebrate populations in Apalachicola Bay, Florida. *Fish Bull* 74: 311-321
- Livingstone DR, Garcia Martinez P, Michel X, Narbonne JF, O'Hara S, Ribera D, Winston GW (1990) Oxyradical production as a pollution-mediated mechanism of toxicity in the common mussle, *Mytilus edulis* L., and other molluscs. *Functional Ecology* 4: 415-424
- López-Torres M, Pérez-Campo R, Barja de Quiroga G (1991) Effect of natural ageing and antioxidant inhibition on liver antioxidant enzymes, glutathione system, peroxidation, and oxygen consumption in *Rana perezi*. *J Comp Physiol B* 160: 655-661
- López-Torres M, Pérez-Campo R, Rojas C, Cadenas S, Barja G (1993) Maximum life span in vertebrates: relationship with liver antioxidant enzymes, glutathione system, ascorbate, urate, sensitivity to peroxidation, true malondialdehyde, in vivo H_2O_2 , and basal and maximum aerobic capacity. *Mech Ageing Dev* 70: 177-199
- Low PS, Somero GN (1976) Adaptation of muscle pyruvate kinases to environmental temperatures and pressures. *J Exp Zool* 198: 1-12
- Lykkeboe G, Brix O, Johansen K (1980) Oxygen-linked CO_2 binding independent of pH in cephalopod blood. *Nature* 287: 330-331
- Madan JJ, Wells MJ (1995) Why squid can breathe easy. *Nature* 380: 590
- Malan A, Wilson TL, Reeves RB (1976) Intracellular pH in cold-blooded vertebrates as a function of body temperature. *Respir Physiol* 28: 29-47
- Mangold-Wirz K (1963) Biologie des céphalopode benthiques et nectonique de la Mer Catalane. *Vie Milieu Suppl* 13: 1-285
- Mangum CP (1983) Oxygen transport in the blood. In: Mantel LH (Hrsg.) *The biology of Crustacea* Vol. 3. Academic Press, New York, London, S. 373-429

- Mangum CP (1990) Gas transport in the blood. In: Gilbert DL, Adelman jr WJ, Arnold JM (Hrsg.) Squid as experimental animals. Plenum Publishing Corporation, New York, S. 443-468
- Marklund S, Marklund G (1974) Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. Eur J Biochem 47: 469-479
- Mauro NA, Mangum CP (1982a) The role of the blood in the temperature dependence of oxidative metabolism in decapod crustaceans. I. Intraspecific responses to seasonal differences in temperature. J Exp Zool 219: 179-188
- Mauro NA, Mangum CP (1982b) The role of the blood in the temperature dependence of oxidative metabolism in decapod crustaceans. II. Interspecific adaptations to latitudinal changes. J Exp Zool 219: 189-195
- McLeese DW (1956) Effects of temperature, salinity and oxygen on the survival of the American lobster. J Fish Res Bd Canada 13: 247-272
- McMahon BR (1988) Physiological responses to oxygen depletion in intertidal animals. Amer Zool 28: 39-53
- Messenger JB, Nixon M, Ryan KP (1985) Magnesiumchloride as an anaesthetic for cephalopods. Comp Biochem Physiol 82C: 203-205
- Miller K (1985) Oxygen equilibria of *Octopus dofleini* haemocyanin. Biochemistry 24: 4582-4586
- Miller KI (1994) Cephalopod haemocyanins. A review of structure and function. In: Pörtner HO, O'Dor RK, MacMillan D (Hrsg.) Physiology of cephalopod molluscs - lifestyle and performance adaptations. Gordon and Breach Publishers, Basel, S. 101-120
- Miller K, Mangum CP (1988) An investigation of the nature of Bohr, Root, and Haldane effects in *Octopus dofleini* hemocyanin. J Comp Physiol 158B: 547-552
- Miranda EJ, Hazel JR (1996) Temperature-induced changes in the transbilayer distribution of phosphatidylethanolamine in mitoplasts of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) liver. J Exp Zool 274: 32-32
- Misra HP, Fridovich I (1972) The generation of superoxide radical during the autoxidation of hemoglobin. J Biol Chem 247: 6960-6962
- Mommsen TP, Hochachka PW (1981) Respiratory and enzymatic properties of squid heart mitochondria. Eur J Biochem 120: 345-350
- Moon TW, Storey KB (1975) The effects of temperature and hydrostatic pressure on enzymes of an abyssal fish, *Antimora rostrata*: liver NADP-linked isocitrate dehydrogenase. Comp Biochem Physiol 52B: 51-57

- Morris S, Taylor AC (1983) Diurnal and seasonal variation in physico-chemical conditions within intertidal rock pools. *Estuar Coast Mar Sci* 17: 339-355
- Morris S, Taylor AC, Bridges CR, Grieshaber MK (1985) Respiratory properties of the haemolymph of the intertidal prawn *Palaemon elegans* (Rathke). *J Exp Zool* 233: 175-186
- Nemoto T, Okiyama M, Takahashi M (1985) Aspects of the roles of squid in food chains of marine Antarctic ecosystems. In: Siegfried WR, Condy PR, Laws LM, (Hrsg.) Antarctic nutrient cycles and food webs. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, S. 415-420
- Nesis KN (1987) Cephalopods of the world. TFH Publications, Neptune City, 351 S.
- Neverauskas VP, Butler AJ (1982) Tolerance of blue crab, *Portunus pelagicus* (L), to high temperature. *Trans R Soc S Aust* 106: 215-216
- Newell RC, Bayne BL (1973) A review of temperature and metabolic acclimation in intertidal marine invertebrates. *Neth J Sea Res* 7: 421-433
- Nicol S (1987) Some limitations on the use of lipofuscin ageing technique. *Mar Biol* 93: 609-614
- Nicol S, Stolp M, Hosei GW (1991) Accumulation of fluorescent age pigments in a laboratory population of Antarctic krill *Euphausia superba* Dana. *J Exp Mar Biol Ecol* 146: 153-161
- O'Dor RK (1982) Respiratory metabolism and swimming performance of the squid, *Loligo opalescens*. *Can J Fish Aquat Sci* 39: 580-587
- O'Dor RK, Webber DM (1986) The constraints on cephalopods: why squid aren't fish. *Can J Zool* 64: 1591-1605
- O'Dor RK, Webber DM (1991) Invertebrates athletes: tradeoffs between transport efficiency and power density in cephalopod evolution. *J exp Biol* 160: 93-112
- Orr WC, Sohal RS (1994) Extension of life-span by overexpression of superoxide dismutase and catalase in *Drosophila melanogaster*. *Science* 263: 1128-1130
- Ozawa T (1997) Genetic and functional changes in mitochondria associated with aging. *Physiol Rev* 77: 425-464
- Packard A (1972) Cephalopods and fish: the limits of convergence. *Biol Rev* 47: 241-307
- Pamatmat MM (1990) Catalase activity: a variable affecting H₂O₂ distribution in Kiel Bight. *Meeresforsch* 32: 261-275
- Parihar MS, Javeri T, Hemnani T, Dubey AK, Prakash P (1997) Responses of superoxide dismutase, glutathione peroxidase and reduced glutathione antioxidant defenses in the gills of the freshwater catfish (*Heteropneustes fossilis*) to short-term elevated temperature. *J therm Biol* 22: 151-156

- Peck LS (1989) Temperature and basal metabolism in two Antarctic marine herbivores. *J Exp Mar Biol Ecol* 127: 1-12
- Pelster B, Bridges CR, Grieshaber MK (1988) Respiratory adaptations of the burrowing marine teleost *Lumpenus lampretaeformis* (Walbaum). II. Metabolic adaptations. *J Exp Mar Biol Ecol* 124: 43-55
- Penzlin H (1991) Lehrbuch der Tierphysiologie. Gustav Fischer Verlag, Jena, 657 S.
- Pette D, Reichmann H (1982) A method for quantitative extraction of enzymes and metabolites from tissue samples in the milligram range. *J Histochem Cytochem* 30: 401-402
- Pérez-Campo R, López-Torres M, Cadenas S, Rojas C, Barja G (1998) The rate of free radical production as a determinant of the rate of aging: evidence from the comparative approach. *J Comp Physiol* 168B: 149-158
- Piatkowski U (1995) Kalmare der Polarmeere. In: Hempel I, Hempel G (Hrsg.) *Biologie der Polarmeere*. Gustav Fischer Verlag, Jena Stuttgart New York, S. 216-221
- Piatkowski U, Allcock L, Hevia M, Steimer S, Vecchione M (1998) Cephalopod ecology. In: Kattner G (Hrsg.) *The expedition Antarktis XIV/2 of RV "Polarstern" in 1996/97*. *Ber Polarforsch* 274: 41-47
- Pörtner HO (1982) Biochemische und physiologische Anpassungen an das Leben im marinen Sediment: Untersuchungen am Spritzwurm *Sipunculus nudus*. Dissertation, Düsseldorf
- Pörtner HO (1987a) Contributions of anaerobic metabolism to pH regulation in animal tissues: theory. *J exp Biol* 131: 69-87
- Pörtner HO (1987b) Anaerobic metabolism and changes in acid-base status: quantitative interrelationships and pH regulation in the marine worm *Sipunculus nudus*. *J exp Biol* 131: 89-105
- Pörtner HO (1989) The importance of metabolism in acid-base regulation and acid-base methodology. *Can J Zool* 67: 3005-3017
- Pörtner HO (1990a) Determination of intracellular buffer values after metabolic inhibition by fluoride and nitrilotriacetic acid. *Respir Physiol* 81: 275-288
- Pörtner HO (1990b) An analysis of the effects of pH on oxygen binding by squid (*Illex illecebrosus*, *Loligo pealei*) haemocyanin. *J exp Biol* 150: 407-424
- Pörtner HO (1993) Multicompartmental analyses of acid-base and metabolic homeostasis during anaerobiosis: invertebrate and lower vertebrate examples. In: Hochachka PW, Lutz PL, Sick T, Rosenthal M, van den Thillart G (Hrsg.) *Surviving hypoxia: mechanisms of control and adaptation*. CRC Press, Boca Raton, S. 139-156
- Pörtner HO (1994a) Athleten des Meeres: Zur Ökophysiologie pelagischer Kalmare. *Biologie in unserer Zeit* 24: 192-199

- Pörtner HO (1994b) Coordination of metabolism, acid-base regulation and haemocyanin function in cephalopods. In: Pörtner HO, O'Dor RK, MacMillan D (Hrsg.) Physiology of cephalopod molluscs - lifestyle and performance adaptations. Gordon and Breach Publishers, Basel, S. 131-148
- Pörtner HO (1997) Oxygen limitation of metabolism and performance in pelagic squid. Proceedings of the 30th European Marine Biological Symposium, 45-56
- Pörtner HO, Grieshaber MK (1993) Critical P_{O_2} (s) in oxyconforming and oxyregulating animals: gas exchange, metabolic rate and the mode of energy production. In: Bicudo JEP (Hrsg.) The vertebrate gas transport cascade: adaptations to environment and mode of life. CRC Press, Boca Raton, S. 330-357
- Pörtner HO, Sartoris FJ (1998) Invasive studies of intracellular acid-base parameters: quantitative analyses during environmental and functional stress. In: Taylor EW, Egginton S, Raven JA (Hrsg.) Regulation of tissue pH in plants and animals: a reappraisal of current techniques. Cambridge University Press, Cambridge. Im Druck.
- Pörtner HO, Zielinski S (1998) Environmental constraints and the physiology of performance in squid. CIAC symposium proceedings, Cape Town, Payne ALL, Lipinski MR, Clarke MR, Roeleveld MAC (eds.). South Afr J Mar Sci: 207-221
- Pörtner HO, Kreutzer U, Siegmund B, Heisler N, Grieshaber MK (1984) Metabolic adaptation of the intertidal worm *Sipunculus nudus* to functional and environmental hypoxia. Mar Biol 79: 237-247
- Pörtner HO, Heisler N, Grieshaber MK (1985) Oxygen consumption and mode of energy production in the intertidal worm *Sipunculus nudus* L.: definition and characterization of the critical P_{O_2} for an oxyconformer. Respir Physiol 59: 361-377
- Pörtner HO, Boutilier RG, Tang Y, Toews DP (1990) Determination of intracellular pH and P_{CO_2} after metabolic inhibition by fluoride and nitrilotriacetic acid. Respir Physiol 81: 255-274
- Pörtner HO, Webber DM, Boutilier RG, O'Dor RK (1991a) Acid-base regulation in exercising squid (*Illex illecebrosus*, *Loligo pealeii*). Am J Physiol 261: R239-R246
- Pörtner HO, MacLachy LM, Toews DP (1991b) Metabolic responses of the toad *Bufo marinus* to environmental hypoxia: an analysis of the critical P_{O_2} . Physiol Zool 64: 836-849
- Pörtner HO, Webber DM, O'Dor RK, Boutilier RG (1993) Metabolism and energetics in squid (*Illex illecebrosus*, *Loligo pealei*) during muscular fatigue and recovery. Am J Physiol 265: R157-R165

- Pörtner HO, Finke E, Lee PG (1996) Effective Gibb's free-energy change of ATP hydrolysis and metabolic correlates of intracellular pH in progressive fatigue of squid (*Lolliguncula brevis*) mantle muscle. *Am J Physiol* 271: R1403-R1414
- Pörtner HO, Hardewig I, Sartoris FJ, van Dijk PLM (1998). Energetic aspects of cold adaptation: critical temperatures in metabolic, ionic and acid-base regulation. In: Pörtner HO, Playle RC (Hrsg.) *Cold ocean physiology*. Cambridge University Press, Cambridge, S. 88-120
- Pörtner HO, Peck L, Zielinski S, Conway LZ (1999a) Intracellular pH and energy metabolism in the highly stenothermal Antarctic bivalve *Limopsis marionensis* as a function of ambient temperature. *Polar Biol* 22: 17-30
- Pörtner HO, van Dijk PLM, Hardewig I, Sommer A (1999b) Levels of metabolic cold adaptation: tradeoffs in eurythermal and stenothermal ectotherms. In: Davison W, Williams CH (Hrsg.) *Antarctic ecosystems: models for wider ecological understanding*. Caxton Press, Christchurch New Zealand, angenommen.
- Pokryfki L, Randall RE (1987) Nearshore hypoxia in the bottom water of the northwestern Gulf of Mexico from 1981 to 1984. *Mar Env Res* 22: 75-90
- Prosser CL (1991) Temperature. In: Prosser CL (Hrsg.) *Environmental and metabolic animal physiology*. Wiley-Liss, New York, S. 109-165
- Rady AA (1993) Effect of change in environmental temperature on antioxidant enzyme activities and lipid peroxidation in red blood cells of carp. *Comp Biochem Physiol* 104B: 695-698
- Rechsteiner M, Rogers S, Rote K (1987) Protein structure and intracellular stability. *Trends Biochem Sci* 12: 390-394
- Reeves RB (1972) An imidazole alphastat hypothesis for vertebrate acid-base-regulation: tissue carbon dioxide content and body temperature in bullfrogs. *Respir Physiol* 81: 255-274
- Reiss U, Gershon D (1976) Rat-liver superoxide dismutase. *Eur J Biochem* 63: 617-623
- Remane A, Storch V, Welsch U (1986) *Systematische Zoologie*. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, New York, 698 S.
- Rodhouse PG (1989) Pelagic cephalopods caught by nets during the Antarctic research cruises of the 'Polarstern' and 'Walther Herwig', 1985-1987. *Arch Fisch Wiss* 39 (Beih 1): 111-121
- Rodhouse PG (1998) Physiological progenesis in cephalopod molluscs. *Biol Bull* 195: 17-20
- Rodhouse PG, Prince PA (1993) Cephalopod prey of the black-browed albatross *Diomedea melanophrys* at South Georgia. *Polar Biol* 13: 373-376

- Roper CFE, Sweeney MJ, Nauen CE (1984) FAO species catalogue. Vol. 3: Cephalopods of the world. An annotated and illustrated catalogue of species of interest to fisheries. FAO Fisheries synopses 125, 277 S.
- Rusting RL (1993) Warum altern wir? Spektrum der Wissenschaft 2: 60-67
- Ruud JT (1954) Vertebrates without erythrocytes and blood pigment. Nature 173: 848-850
- Sartoris FJ, Pörtner HO (1997) Temperature dependence of ionic and acid-base regulation in boreal and arctic *Crangon crangon* and *Pandalus borealis*. J Exp Mar Biol Ecol 211: 69-83
- Sawada M, Carlson JC (1987) Changes in superoxide radical and lipid peroxide formation in the brain, heart and liver during the lifetime of the rat. Mech Ageing Dev 41: 125-137
- Segal IH (1976) Biochemical calculations. John Wiley & Sons, New York, S. 203-204
- Segawa S, Hanlon RT (1988) Oxygen consumption and ammonia excretion rates in *Octopus maya*, *Loligo forbesi* and *Lolliguncula brevis* (Mollusca: Cephalopoda). Mar Behav Physiol 13: 389-400
- Seibel BA, Thuesen EV, Childress JJ, Gorodezky LA (1997) Decline in pelagic cephalopod metabolism with habitat depth reflects differences in locomotory efficiency. Biol Bull 192: 262-278
- Seibel BA, Chausson F, Lallier FH, Zal F, Childress JJ (1999) Vampire blood: respiratory physiology of the vampire squid (Cephalopoda: Vampyromorpha) in relation to the oxygen minimum layer. Exp Biol Online 4:1
- Senozan NM, Avinc A, Unver Z (1988) Hemocyanin levels in *Octopus vulgaris* and the cuttlefish *Sepia officinalis* from the Aegean sea. Comp Biochem Physiol 91A: 581-585
- Seymour MK (1972) Effects of temperature change on irrigation rate in *Arenicola marina* (L.). Comp Biochem Physiol 43A: 553-564
- Shaklee JB, Christiansen JA, Sidell BD, Prosser CL, Whitt GS (1977) Molecular aspects of temperature acclimation in fish: contributions of changes in enzyme activities and isozyme pattern in metabolic reorganization in the green sunfish. J Exp Zool 201: 1-20
- Sheehy MRJ (1990) Individual variation in, and the effect of rearing temperature and body size on, the concentration of fluorescent morphological lipofuscin in the brains of freshwater crayfish, *Cherax cuspidatus* (Crustacea: Parastacidae). Comp Biochem Physiol 96A: 281-286

- Sheehy MRJ (1992) Lipofuscin age-pigment accumulation in the brains of ageing field- and laboratory-reared crayfish *Cherax quadricarinatus* (von Martens) (Decapoda: Parastacidae). *J Exp Mar Biol Ecol* 161: 79-89
- Sheehy MRJ, Greenwood JG, Fielder DR (1994) More accurate chronological age determination of crustaceans from field situations using the physiological age marker, lipofuscin. *Mar Biol* 121: 237-245
- Sheehy M, Cameron E, Marsden G, McGrath J (1995) Age structure of female giant tiger prawns *Penaeus monodon* as indicated by neuronal lipofuscin concentration. *Mar Ecol Prog Ser* 117: 59-63
- Sheldahl JA, Tappel AL (1974) Fluorescent products from aging *Drosophila melanogaster*: an indicator of free radical lipid peroxidation damage. *Exp Geront* 9: 43-41
- Shigenaga MK, Hagen TM, Ames BN (1994) Oxidative damage and mitochondrial decay in aging. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 10771-10778
- Sidell BD, Driedzic WR, Stowe DB, Johnston IA (1987) Biochemical correlations of power development and metabolic fuel preferenda in fish hearts. *Physiol Zool* 60: 221-232
- Siewing R (1985) *Lehrbuch der Zoologie. Band 2: Systematik.* Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, New York, 1107 S.
- Sohal RS (1981a) Metabolic rate, aging, and lipofuscin accumulation. In: Sohal RS (Hrsg.) *Age pigments.* Elsevier/North-Holland Biomedical Press, Amsterdam, S. 303-316
- Sohal RS (1981b) Relationship between metabolic rate, lipofuscin accumulation and lysosomal enzyme activity during aging in the adult housefly, *Musca domestica*. *Exp Geront* 16: 347-355
- Sohal RS (1991) Hydrogen peroxide production by mitochondria may be a marker of aging. *Mech Ageing Dev* 60: 189-198
- Sohal RS, Allen RG (1986) Relationship between oxygen metabolism, aging and development. *Adv Free Rad Biol Med* 2: 117-160
- Sohal RS, Donato H (1978) Effects of experimentally altered life spans on the accumulation of fluorescent age pigment in the housefly, *Musca domestica*. *Exp Geront* 13: 335-341
- Sohal RS, Donato H (1979) Effect of experimental prolongation of life span on lipofuscin content and lysosomal enzyme activity in the brain of the housefly, *Musca domestica*. *J Geront* 34: 489-496
- Sohal RS, Weindruch R (1996) Oxidative stress, caloric restriction, and aging. *Science* 273: 59-63

- Sohal RS, Farmer KJ, Allen RG, Cohen NR (1983) Effect of age on oxygen consumption, superoxide dismutase, catalase, glutathione, inorganic peroxides and chloroform-soluble antioxidants in the adult male housefly, *Musca domestica*. *Mech Ageing Dev* 24: 185-195
- Sohal RS, Svensson I, Sohal BH, Brunk UT (1989) Superoxide anion radical production in different animal species. *Mech Ageing Dev* 49: 129-135
- Sohal RS, Arnold LA, Sohal BH (1990a) Age-related changes in antioxidant enzymes and prooxidant generation in tissues of the rat with special reference to parameters in two insect species. *Free Rad Biol Med* 10: 495-500
- Sohal RS, Svensson I, Brunk UT (1990b) Hydrogen peroxide production by liver mitochondria in different species. *Mech Ageing Dev* 53: 209-215
- Somero GN (1981) pH-temperature interactions on proteins: principles of optimal pH and buffer system design. *Mar Biol Lett* 2: 163-178
- Somero GN (1983) Environmental adaptation of proteins: strategies for conservation of critical functional and structural traits. *Comp Biochem Physiol* 76A: 621-633
- Somero GN (1991) Biochemical mechanisms of cold adaptation and stenothermality in Antarctic fish. In: di Prisco G, Maresca B, Tota B (Hrsg.) *Biology of Antarctic fishes*. Springer-Verlag, Berlin, S. 232-247
- Somero GN (1996) Temperature and proteins: little things can mean a lot. *News Physiol Sci* 11: 72-77
- Somero GN (1997) Temperature relationships: from molecules to biogeography. In: Dantzer WH (Hrsg.) *Handbook of physiology. Section 13: Comparative physiology*. Oxford University Press, New York, Oxford, S. 1391-1444
- Somero GN, DeVries AL (1967). Temperature tolerance of some antarctic fishes. *Science* 156: 257-258
- Sommer A (1998) Mechanismen und Grenzen der Temperaturanpassung beim Pierwurm *Arenicola marina* (L.). *Ber Polarforsch* 1998: 285, 168 S.
- Sommer A, Pörtner HO (1999) Exposure of *Arenicola marina* (L.) to extreme temperatures: adaptive flexibility of a boreal and a subpolar population. *Mar Ecol Prog Ser* 181: 215-226
- Sommer A, Klein B, Pörtner HO (1997). Temperature induced anaerobiosis in two populations of the polychaete worm *Arenicola marina* (L.). *J Comp Physiol* 167B: 25-35
- Southward AJ, Hawkins SJ, Burrows MT (1995) Seventy years' observations of changes in distribution and abundance of zooplankton and intertidal organisms in the western English channel in relation to rising sea temperature. *J therm Biol* 20: 127-155

- Stadtman ER (1992) Protein oxidation and aging. *Science* 257: 1220-1224
- Storey KB (1996) Oxidative stress: animal adaptations in nature: *Braz J Med Biol Res* 29: 1715-1733
- Storey KB, Storey JM (1979) Octopine metabolism in the cuttlefish, *Sepia officinalis*: octopine production by muscle and its role as an aerobic substrate for non-muscular tissues. *J Comp Physiol* 131B: 311-319
- Storey KB, Storey JM (1983) Carbohydrate metabolism in cephalopod molluscs. In: Hochachka PW (Hrsg.) *The Mollusca* Vol. 1. Academic Press, New York, London, S. 91-136
- Storey KB, Fields JHA, Hochachka PW (1978) Purification and properties of glutamate dehydrogenase from the mantle muscle of the squid, *Loligo pealeii*. Role of the enzyme in energy production from amino acids. *J Exp Zool* 205: 111-118
- Stryer L (1990) *Biochemie*. Spektrum der Wissenschaft, Heidelberg, 1127 S.
- Taki I (1961) On two new eledonid octopods from the Antarctic sea. *J Fac Fish Anim Husb Hiroshima Univ* 3: 297-316
- Taylor AC (1976) The respiratory responses of *Carcinus maenas* to declining oxygen tension. *J exp Biol* 65: 309-322
- Taylor EW, Butler PJ, Al-Wassia A (1977) Some responses of the shore crab, *Carcinus maenas* (L.) to progressive hypoxia at different acclimation temperatures and salinities. *J Comp Physiol* 122B: 391-402
- Teichert C (1988) Main features of Cephalopod evolution. In: Wilbur KM (Hrsg.) *The Mollusca* Vol. 12. Academic Press, New York, London, S. 11-79
- Terwilliger N (1998) Functional adaptations of oxygen transport proteins. *J exp Biol* 201: 1085-1098
- Thiel H, Pörtner HO, Arntz WE (1996) Marine life at low temperatures - a comparison of polar and deep-sea characteristics. In: Uiblein F, Ott J, Stachowitsch M (Hrsg.) *Deep-sea and extreme shallow-water habitats: affinities and adaptations*. *Biosys Ecol Ser* 11: 183-219
- Torres JJ, Somero GN (1988) Metabolism, enzymic activities and cold adaptation in Antarctic mesopelagic fishes. *Mar Biol* 98: 169-180
- Torres JJ, Aarset AV, Donnelly J, Hopkins TL, Lancraft TM, Ainley DG (1994) Metabolism of Antarctic micronektonic Crustacea as a function of depth of occurrence and season. *Mar Ecol Prog Ser* 113: 207-219
- Truchot JP (1975) Factors controlling the *in vitro* and *in vivo* oxygen affinity of the hemocyanin in the crab *Carcinus maenas* (L.). *Respir Physiol* 24: 173-189
- Turner RE, Allen RL (1982) Bottom water oxygen concentration in the Mississippi river delta bight. *Contrib Mar Sci* 25: 181-172

- Uchiyama M, Mihara M (1978) Determination of malonaldehyde precursor in tissues by thiobarbituric acid test. *Analytical Biochem* 86: 271-278
- Urich K (1990) *Vergleichende Biochemie der Tiere*. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 710 S.
- van den Thillart G, van Lieshout G, Storey K, Cortesi P, de Zwaan A (1992) Influence of long-term hypoxia on the energy-metabolism of the haemoglobin-containing bivalve *Scapharca inaequivalvis*: critical O₂ levels for metabolic depression. *J Comp Physiol* 162B: 297-304
- van den Thillart G, Dalla Via J, Vitali G, Cortesi P (1994) Influence of long-term hypoxia exposure on the energy metabolism of *Solea solea*. I. Critical O₂ levels for aerobic and anaerobic metabolism. *Mar Ecol Prog Ser* 104: 109-117
- van Dijk PLM, Hardewig I, Pörtner HO (1997) Temperature-dependent shift of pH_i in fish white muscle: contributions of passive and active processes. *Am J Physiol* 272: R84-R89
- van Raaij MTM, Bakker E, Nieveen MC, Zirkzee H, van den Thillart GEEJM (1994) Energy status and free fatty acid patterns in tissues of common carp (*Cyprinus carpio*, L.) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, L.) during severe oxygen restriction. *Comp Biochem Physiol* 109A: 755-767
- van Thoai N, Robin Y (1959) Métabolisme des dérivés guanidylés. VIII. Biosynthèse de l'octopine et répartition de l'enzyme opérant chez les invertébrés. *Biochim Biophys Acta* 35: 446-453
- van Waarde A, van den Thillart G, Erkelens C, Addink A, Lugtenburg J (1990) Functional coupling of glycolysis and phosphocreatine utilization in anoxic fish muscle. *J Biol Chem* 265: 914-923
- Vanfleteren JR (1993) Oxidative stress and ageing in *Caenorhabditis elegans*. *Biochem J* 292: 605-608
- Vecchione M (1991a) Dissolved oxygen and the distribution of the euryhaline squid *Lolliguncula brevis*. *Bull Mar Sci* 49: 668-669
- Vecchione M (1991b) Observations on the paralarval ecology of a euryhaline squid *Lolliguncula brevis* (Cephalopoda: Loliginidae). *Fish Bull* 89: 515-521
- Vecchione M, Roper CFE (1991) Cephalopods observed from submersibles in the western north Atlantic. *Bull Mar Sci* 49: 433-445
- Vernet M, Hunter JR, Vetter RD (1988) Accumulation of age pigments (lipofuscin) in two cold-water fishes. *Fish Bull* 86: 401-407
- Vetter RAH (1995) Ecophysiological studies on citrate-synthase: (I) Enzyme regulation of selected crustaceans with regard to temperature adaptation. *J Comp Physiol* 165B: 46-55

- Vetter RAH, Buchholz F (1998) Kinetics of enzymes in cold-stenothermal invertebrates. In: Pörtner HO, Playle RC (Hrsg.) Cold ocean physiology. Cambridge University Press, Cambridge, S. 190-211
- Viarengo A, Pertica M, Canesi L, Accomando R, Mancinelli G, Orunesu M (1989) Lipid peroxidation and level of antioxidant compounds (GSH, vitamin E) in the digestive glands of mussels of three different age groups exposed to anaerobic and aerobic conditions. *Mar Env Res* 39: 191-195
- Viarengo A, Canesi L, Pertica M, Poli G, Moore MN, Orunesu M (1990) Heavy metal effects on lipid peroxidation in the tissues of *Mytilus galloprovincialis* Lam. *Comp Biochem Physiol* 97C: 37-42
- Viarengo A, Canesi L, Pertica M, Livingstone DR, Orunesu M (1991a) Age-related lipid peroxidation in the digestive gland of mussels: the role of the antioxidant defense systems. *Experientia* 47: 454-457
- Viarengo A, Canesi L, Pertica M, Livingstone DR (1991b) Seasonal variations in the antioxidant defence systems and lipid peroxidation of the digestive gland of mussels. *Comp Biochem Physiol* 100C: 187-190
- Viarengo A, Canesi L, Garcia Martinez P, Peters LD, Livingstone DR (1995) Pro-oxidant and antioxidant defence systems in the tissues of the Antarctic scallop (*Adamussium colbecki*) compared with the Mediterranean scallop (*Pecten jacobaeus*). *Comp Biochem Physiol* 111B: 119-126
- von Boletzky S (1983) *Sepia officinalis*. In: Boyle PR (Hrsg.) Cephalopod life cycles Vol. I. Academic Press, London, S. 31-52
- Vosjan JH, Olanczuk-Neyman KM (1991) Influence of temperature on respiratory ETS-activity of micro-organisms from Admiralty Bay, King George Island, Antarctica. *Neth J Sea Res* 28: 221-225
- Voss GL (1956) A review of the cephalopods of the Gulf of Mexico. *Bull Mar Sci Gulf Caribb* 6: 85-178
- Voss GL (1977) Present status and new trends in Cephalopod systematics. *Symp Zool Soc Lond* 38: 49-60
- Voss GL (1988) The biogeography of the deep-sea octopoda. *Malacologia* 29: 295-307
- Walsh PJ (1981) Purification and characterization of glutamate dehydrogenases from three species of sea anemones: adaptation to temperature within and among species from different thermal environments. *Mar Biol Lett* 2: 289-299
- Ward P (1983) The extinction of the Ammonites. *Sci Amer* 249: 136-147
- Webber DM, O'Dor RK (1985) Respiration and swimming performance of short-finned squid (*Illex illecebrosus*). *NAFO Sci Coun Studies* 9: 133-138

- Webber DM, O'Dor RK (1986) Monitoring the metabolic rate and activity of free-swimming squid with telemetered jet pressure. *J exp Biol* 126: 203-224
- Wells MJ (1990) Oxygen extraction and jet propulsion in cephalopods. *Can J Zool* 68: 815-824
- Wells MJ (1994) The evolution of a racing snail. In: Pörtner HO, O'Dor RK, MacMillan D (Hrsg.) *Physiology of cephalopod molluscs - lifestyle and performance adaptations*. Gordon and Breach Publishers, Basel, S. 1-12
- Wells MJ, Wells J (1995) The control of ventilatory and cardiac responses to changes in ambient oxygen tension and oxygen demand in *Octopus*. *J exp Biol* 198: 1717-1727
- Wells MJ, Hanlon RT, Lee PG, Dimarco FP (1988) Respiratory and cardiac performance in *Lolliguncula brevis* (Cephalopoda, Myopsida): the effects of activity, temperature and hypoxia. *J exp Biol* 138: 17-36
- Wells MJ, Wells J, O'Dor RK (1992) Life at low oxygen tensions: the behaviour and physiology of *Nautilus pompilius* and the biology of extinct forms. *J mar biol Ass UK* 72: 313-328
- Yeager DP, Ultsch GR (1989) Physiological regulation and conformation: a BASIC program for the determination of critical points. *Physiol Zool* 62: 888-907
- Zammit VA, Newsholme EA (1976) The maximum activities of hexokinase, phosphorylase, phosphofructokinase, glycerol phosphate dehydrogenase, lactate dehydrogenase, octopine dehydrogenase, phosphoenolpyruvate carboxykinase, nucleoside diphosphate kinase, glutamate oxaloacetate transaminase and arginine kinase in relation to carbohydrate utilization in muscles from marine invertebrates. *Biochem J* 160: 447-462
- Zebe E (1975) *In vivo*-Untersuchungen über den Glucose-Abbau bei *Arenicola marina* (Annelida, Polychaeta). *J Comp Physiol* 101: 133-145
- Zebe E, Grieshaber M, Schöttler U (1980) Biotopbedingte und funktionsbedingte Anaerobiose. *Biologie in unserer Zeit* 10: 175-182
- Zielinski S, Pörtner HO (1996) Energy metabolism and ATP free-energy change of the intertidal worm *Sipunculus nudus* below a critical temperature. *J Comp Physiol* 166B: 492-500

Danksagung

Mein Dank gilt vor allem Herrn Prof. Dr. H.O. Pörtner für die Betreuung dieser Arbeit und für seine wissenschaftlichen Anregungen und Diskussionen und für alles was ich von ihm gelernt habe. Ich danke auch Herrn Dr. P.G. Lee, der mir den Aufenthalt am Marine Biomedical Institute in Galveston, Texas ermöglichte. Außerdem möchte ich mich bei allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Ökophysiologie und den anderen Kollegen der Sektion Biologie des Alfred-Wegener-Institutes für die gute Arbeitsatmosphäre, die Hilfsbereitschaft und die Unterstützung bedanken. Mein Dank gilt auch den Fahrtteilnehmern der Polarstern-Expedition ANT XIII/3, die dazu beigetragen haben, daß diese Reise ein besonderes Erlebnis wurde. Ein besonderer Dank geht dabei an Silke Steimer und Louise Allcock, die mir geholfen haben, die antarktischen Cephalopoden beim Namen zu nennen. Ganz besonders danke ich auch allen Freunden, meinen Eltern und meiner Schwester, die mich während dieser Zeit unterstützt und motiviert haben. Auch die "Trekki-Runde" soll nicht vergessen sein, die "Trekki-Abende" waren immer wieder aufbauend.

Folgende Hefte der Reihe „Berichte zur Polarforschung“ sind bisher erschienen:

- * **Sonderheft Nr. 1/1981** – „Die Antarktis und ihr Lebensraum“
Eine Einführung für Besucher – Herausgegeben im Auftrag von SCAR
- Heft Nr. 1/1982** – „Die Filchner-Schelfeis-Expedition 1980/81“
zusammengestellt von Heinz Kohnen
- Heft Nr. 2/1982** – „Deutsche Antarktis-Expedition 1980/81 mit FS ‚Meteor‘“
First International BIOMASS Experiment (FIBEX) – Liste der Zooplankton- und Mikronektonnetzfüge
zusammengestellt von Norbert Klages
- Heft Nr. 3/1982** – „Digitale und analoge Krill-Echolot-Rohdatenerfassung an Bord des Forschungsschiffes ‚Meteor‘“ (im Rahmen von FIBEX 1980/81, Fahrtabschnitt ANT III), von Bodo Morgenstern
- Heft Nr. 4/1982** – „Filchner-Schelfeis-Expedition 1980/81“
Liste der Planktonfänge und Lichtstärkemessungen
zusammengestellt von Gerd Hubold und H. Eberhard Drescher
- * **Heft Nr. 5/1982** – „Joint Biological Expedition on RRS ‚John Biscoe‘, February 1982“
by G. Hempel and R. B. Heywood
- * **Heft Nr. 6/1982** – „Antarktis-Expedition 1981/82 (Unternehmen ‚Eiswarte‘)“
zusammengestellt von Gode Gravenhorst
- Heft Nr. 7/1982** – „Marin-Biologisches Begleitprogramm zur Standorterkundung 1979/80 mit MS ‚Polar-
sirkel‘ (Pre-Site Survey)“ – Stationslisten der Mikronekton- und Zooplanktonfänge sowie der Bodenfischerei
zusammengestellt von R. Schneppenheim
- Heft Nr. 8/1983** – „The Post-Fibex Data Interpretation Workshop“
by D. L. Cram and J.-C. Freytag with the collaboration of J. W. Schmidt, M. Mall, R. Kresse, T. Schwinghammer
- Heft Nr. 9/1983** – „Distribution of some groups of zooplankton in the inner Weddell Sea in summer 1979/80“
by I. Hempel, G. Hubold, B. Kaczmaruk, R. Keller, R. Weigmann-Haass
- Heft Nr. 10/1983** – „Fluor im antarktischen Ökosystem“ – DFG-Symposium November 1982
zusammengestellt von Dieter Adeling
- Heft Nr. 11/1983** – „Joint Biological Expedition on RRS ‚John Biscoe‘, February 1982 (II)“
Data of micronekton and zooplankton hauls, by Uwe Piatkowski
- Heft Nr. 12/1983** – „Das biologische Programm der ANTARKTIS-I-Expedition 1983 mit FS ‚Polarstern‘“
Stationslisten der Plankton-, Benthos- und Grundsleppnetzfüge und Liste der Probenahme an Robben
und Vögeln, von H. E. Drescher, G. Hubold, U. Piatkowski, J. Plötz und J. Voß
- **Heft Nr. 13/1983** – „Die Antarktis-Expedition von MS ‚Polarbjörn‘ 1982/83“ (Sommerkampagne zur
Atka-Bucht und zu den Kraul-Bergen), zusammengestellt von Heinz Kohnen
- * **Sonderheft Nr. 2/1983** – „Die erste Antarktis-Expedition von FS ‚Polarstern‘ (Kapstadt, 20. Januar 1983 –
Rio de Janeiro, 25. März 1983)“, Bericht des Fahrtleiters Prof. Dr. Gotthilf Hempel
- Sonderheft Nr. 3/1983** – „Sicherheit und Überleben bei Polarexpeditionen“
zusammengestellt von Heinz Kohnen
- Heft Nr. 14/1983** – „Die erste Antarktis-Expedition (ANTARKTIS I) von FS ‚Polarstern‘ 1982/83“
herausgegeben von Gotthilf Hempel
- Sonderheft Nr. 4/1983** – „On the Biology of Krill *Euphausia superba*“ – Proceedings of the Seminar
and Report of the Krill Ecology Group, Bremerhaven 12.–16. May 1983, edited by S. B. Schnack
- Heft Nr. 15/1983** – „German Antarctic Expedition 1980/81 with FRV ‚Walther Herwig‘ and RV ‚Meteor‘“ –
First International BIOMASS Experiment (FIBEX) – Data of micronekton and zooplankton hauls
by Uwe Piatkowski and Norbert Klages
- Sonderheft Nr. 5/1984** – „The observatories of the Georg von Neumayer Station“, by Ernst Augstein
- Heft Nr. 16/1984** – „FIBEX cruise zooplankton data“
by U. Piatkowski, I. Hempel and S. Rakusa-Suszczewski
- Heft Nr. 17/1984** – „Fahrtbericht (cruise report) der ‚Polarstern‘-Reise ARKTIS I, 1983“
von E. Augstein, G. Hempel und J. Thiede
- Heft Nr. 18/1984** – „Die Expedition ANTARKTIS II mit FS ‚Polarstern‘ 1983/84“,
Bericht von den Fahrtabschnitten 1, 2 und 3, herausgegeben von D. Fütterer
- Heft Nr. 19/1984** – „Die Expedition ANTARKTIS II mit FS ‚Polarstern‘ 1983/84“,
Bericht vom Fahrtabschnitt 4, Punta Arenas–Kapstadt (Ant-II/4), herausgegeben von H. Kohnen
- Heft Nr. 20/1984** – „Die Expedition ARKTIS II des FS ‚Polarstern‘ 1984, mit Beiträgen des FS ‚Valdivia‘
und des Forschungsflugzeuges ‚Falcon 20‘ zum Marginal Ice Zone Experiment 1984 (MIZEX)“
von E. Augstein, G. Hempel, J. Schwarz, J. Thiede und W. Weigel

- Heft Nr. 21/1985** – "Euphausiid larvae in plankton samples from the vicinity of the Antarctic Peninsula, February 1982" by Sigrid Marschall and Elke Mizdalski
- Heft Nr. 22/1985** – "Maps of the geographical distribution of macrozooplankton in the Atlantic sector of the Southern Ocean" by Uwe Piatkowski
- Heft Nr. 23/1985** – „Untersuchungen zur Funktionsmorphologie und Nahrungsaufnahme der Larven des Antarktischen Krills *Euphausia superba* Dana" von Hans-Peter Marschall
- Heft Nr. 24/1985** – „Untersuchungen zum Periglazial auf der König-Georg-Insel Südshetlandinseln/ Antarktika. Deutsche physiogeographische Forschungen in der Antarktis. – Bericht über die Kampagne 1983/84" von Dietrich Barsch, Wolf-Dieter Blümel, Wolfgang Flügel, Roland Mäusbacher, Gerhard Stäblein, Wolfgang Zick
- Heft Nr. 25/1985** – „Die Expedition ANTARKTIS III mit FS ‚Polarstern‘ 1984/85" herausgegeben von Gotthilf Hempel
- Heft Nr. 26/1985** – "The Southern Ocean"; A survey of oceanographic and marine meteorological research work by Hellmer et al.
- Heft Nr. 27/1986** – „Spätpleistozäne Sedimentationsprozesse am antarktischen Kontinentalhang vor Kapp Norvegia, östliche Weddell-See" von Hannes Grobe
- Heft Nr. 28/1986** – „Die Expedition ARKTIS III mit ‚Polarstern‘ 1985" mit Beiträgen der Fahrtteilnehmer, herausgegeben von Rainer Gersonde
- Heft Nr. 29/1986** – „5 Jahre Schwerpunktprogramm ‚Antarktisforschung‘ der Deutschen Forschungsgemeinschaft." Rückblick und Ausblick. Zusammenge stellt von Gotthilf Hempel, Sprecher des Schwerpunktprogramms
- Heft Nr. 30/1986** – "The Meteorological Data of the Georg-von-Neumayer-Station for 1981 and 1982" by Marianne Gube and Friedrich Obleitner
- Heft Nr. 31/1986** – „Zur Biologie der Jugendstadien der Notothenioidei (Pisces) an der Antarktischen Halbinsel" von A. Kellermann
- Heft Nr. 32/1986** – „Die Expedition ANTARKTIS IV mit FS ‚Polarstern‘ 1985/86" mit Beiträgen der Fahrtteilnehmer, herausgegeben von Dieter Fütterer
- Heft Nr. 33/1987** – „Die Expedition ANTARKTIS-IV mit FS ‚Polarstern‘ 1985/86 – Bericht zu den Fahrtabschnitten ANT-IV/3–4" von Dieter Karl Fütterer
- Heft Nr. 34/1987** – „Zoogeographische Untersuchungen und Gemeinschaftsanalysen an antarktischem Makroplankton" von U. Piatkowski
- Heft Nr. 35/1987** – „Zur Verbreitung des Meso- und Makrozooplanktons in Oberflächenwasser der Weddell See (Antarktis)" von E. Boysen-Ennen
- Heft Nr. 36/1987** – „Zur Nahrungs- und Bewegungsphysiologie von *Salpa thompsoni* und *Salpa fusiformis*" von M. Reinke
- Heft Nr. 37/1987** – "The Eastern Weddell Sea Drifting Buoy Data Set of the Winter Weddell Sea Project (WWSP)" 1986 by Heinrich Hoerber und Marianne Gube-Lehnhardt
- Heft Nr. 38/1987** – "The Meteorological Data of the Georg von Neumayer Station for 1983 and 1984" by M. Gube-Lehnhardt
- Heft Nr. 39/1987** – „Die Winter-Expedition mit FS ‚Polarstern‘ in die Antarktis (ANT V/1–3)" herausgegeben von Sigrid Schnack-Schiel
- Heft Nr. 40/1987** – "Weather and Synoptic Situation during Winter Weddell Sea Project 1986 (ANT V/2) July 16–September 10, 1986" by Werner Rabe
- Heft Nr. 41/1988** – „Zur Verbreitung und Ökologie der Seegurken im Weddellmeer (Antarktis)" von Julian Gutt
- Heft Nr. 42/1988** – "The zooplankton community in the deep bathyal and abyssal zones of the eastern North Atlantic" by Werner Beckmann
- Heft Nr. 43/1988** – "Scientific cruise report of Arctic Expedition ARK IV/3" Wissenschaftlicher Fahrtbericht der Arktis-Expedition ARK IV/3, compiled by Jörn Thiede
- Heft Nr. 44/1988** – "Data Report for FV ‚Polarstern‘ Cruise ARK IV/1, 1987 to the Arctic and Polar Fronts" by Hans-Jürgen Hirche
- Heft Nr. 45/1988** – „Zoogeographie und Gemeinschaftsanalyse des Makrozoobenthos des Weddellmeeres (Antarktis)" von Joachim Voß
- Heft Nr. 46/1988** – "Meteorological and Oceanographic Data of the Winter-Weddell-Sea Project 1986 (ANT V/3)" by Eberhard Fahrbach
- Heft Nr. 47/1988** – „Verteilung und Herkunft glazial-mariner Gerölle am Antarktischen Kontinentalrand des östlichen Weddellmeeres" von Wolfgang Oskierski
- Heft Nr. 48/1988** – „Variationen des Erdmagnetfeldes an der GvN-Station" von Arnold Brodscholl
- Heft Nr. 49/1988** – „Zur Bedeutung der Lipide im antarktischen Zooplankton" von Wilhelm Hagen
- Heft Nr. 50/1988** – „Die gezeitenbedingte Dynamik des Ekström-Schelfeises, Antarktis" von Wolfgang Kobarg

- Heft Nr. 51/1988** – „Ökomorphologie nototheniider Fische aus dem Weddellmeer, Antarktis“ von Werner Ekau
- Heft Nr. 52/1988** – „Zusammensetzung der Bodenfauna in der westlichen Fram-Straße“ von Dieter Piepenburg
- Heft Nr. 53/1988** – „Untersuchungen zur Ökologie des Phytoplanktons im südöstlichen Weddellmeer (Antarktis) im Jan./Febr. 1985“ von Eva-Maria Nöthig
- Heft Nr. 54/1988** – „Die Fischfauna des östlichen und südlichen Weddellmeeres: geographische Verbreitung, Nahrung und trophische Stellung der Fischarten“ von Wiebke Schwarzbach
- Heft Nr. 55/1988** – "Weight and length data of zooplankton in the Weddell Sea in austral spring 1986 (Ant V/3)" by Elke Mizdalski
- Heft Nr. 56/1989** – "Scientific cruise report of Arctic expeditions ARK IV/1, 2 & 3" by G. Krause, J. Meincke und J. Thiede
- Heft Nr. 57/1989** – „Die Expedition ANTARKTIS V mit FS ‚Polarstern‘ 1986/87“. Bericht von den Fahrtabschnitten ANT V/4–5 von H. Miller und H. Oerter
- Heft Nr. 58/1989** – „Die Expedition ANTARKTIS VI mit FS ‚Polarstern‘ 1987/88“ von D. K. Fütterer
- Heft Nr. 59/1989** – „Die Expedition ARKTIS V/1a, 1b und 2 mit FS ‚Polarstern‘ 1988“ von M. Spindler
- Heft Nr. 60/1989** – „Ein zweidimensionales Modell zur thermohalinen Zirkulation unter dem Schelfeis“ von H. H. Hellmer
- Heft Nr. 61/1989** – „Die Vulkanite im westlichen und mittleren Neuschwabenland, Vestfjella und Ahlmannryggen, Antarktika“ von M. Peters
- *Heft-Nr. 62/1989** – "The Expedition ANTARKTIS VII/1 and 2 (EPOS I) of RV 'Polarstern' in 1988/89", by I. Hempel
- Heft Nr. 63/1989** – „Die Eisalgenflora des Weddellmeeres (Antarktis): Artenzusammensetzung und Biomasse sowie Ökophysiologie ausgewählter Arten“ von Annette Bartsch
- Heft Nr. 64/1989** – "Meteorological Data of the G.-v.-Neumayer-Station (Antarctica)" by L. Helmes
- Heft Nr. 65/1989** – „Expedition Antarktis VII/3 in 1988/89“ by I. Hempel, P. H. Schalk, V. Smetacek
- Heft Nr. 66/1989** – „Geomorphologisch-glazilogische Detailkartierung des arid-hochpolaren Borgmassivet, Neuschwabenland, Antarktika“ von Karsten Brunk
- Heft-Nr. 67/1990** – „Identification key and catalogue of larval Antarctic fishes“, edited by Adolf Kellermann
- Heft-Nr. 68/1990** – „The Expedition Antarktis VII/4 (Epos leg 3) and VII/5 of RV 'Polarstern' in 1989“, edited by W. Arntz, W. Ernst, I. Hempel
- Heft-Nr. 69/1990** – „Abhängigkeiten elastischer und rheologischer Eigenschaften des Meereises vom Eisgefüge“, von Harald Hellmann
- Heft-Nr. 70/1990** – „Die beschalten benthischen Mollusken (Gastropoda und Bivalvia) des Weddellmeeres, Antarktis“, von Stefan Hain
- Heft-Nr. 71/1990** – „Sedimentologie und Paläomagnetik an Sedimenten der Maudkuppe (Nordöstliches Weddellmeer)“, von Dieter Cordes.
- Heft-Nr. 72/1990** – „Distribution and abundance of planktonic copepods (Crustacea) in the Weddell Sea in summer 1980/81“, by F. Kurbjeweit and S. Ali-Khan
- Heft-Nr. 73/1990** – „Zur Frühdiagenese von organischem Kohlenstoff und Opal in Sedimenten des südlichen und östlichen Weddellmeeres“, von M. Schlüter
- Heft-Nr. 74/1991** – „Expeditionen ANTARKTIS-VIII/3 und VIII/4 mit FS ‚Polarstern‘ 1989“, von Rainer Gersonde und Gotthilf Hempel
- Heft-Nr. 75/1991** – „Quartäre Sedimentationsprozesse am Kontinentalhang des Süd-Orkney-Plateaus im nordwestlichen Weddellmeeres (Antarktis)“, von Sigrun Grünig
- Heft-Nr. 76/1991** – „Ergebnisse der faunistischen Arbeiten in Benthal von King George Island (Südshetlandinseln, Antarktis)“, Martin Rauschert
- Heft-Nr. 77/1991** – „Verteilung von Mikroplankton-Organismen nordwestlich der Antarktischen Halbinsel unter dem Einfluß sich ändernder Umweltbedingungen in Herbst“, von Heinz Klöser
- Heft-Nr. 78/1991** – „Hochauflösende Magnetostratigraphie spätquartärer Sedimente arktischer Meeresgebiete“, von Norbert R. Nowaczyk
- Heft-Nr. 79/1991** – „Ökophysiologische Untersuchungen zur Salinitäts- und Temperaturtoleranz antarktischer Grünalgen unter besonderer Berücksichtigung des β -Dimethylsulfoniumpropionat (DMSP) - Stoffwechsels“, von Ulf Karsten
- Heft-Nr. 80/1991** – „Die Expedition ARKTIS VII/1 mit FS „POLARSTERN“ 1990“, herausgegeben von Jörn Thiede und Gotthilf Hempel
- Heft-Nr. 81/1991** – „Paläoglazilogie und Paläozeanographie im Spätquartär am Kontinentalrand des südlichen Weddellmeeres, Antarktis“, von Martin Melles

Heft-Nr. 82/1991 – „Quantifizierung von Meereiseigenschaften: Automatische Bildanalyse von Dünnschnitten und Parametrisierung von Chlorophyll- und Salzgehaltsverteilungen“, von Hajo Eicken

Heft-Nr. 83/1991 – „Das Fließen von Schelfeisen - numerische Simulationen mit der Methode der finiten Differenzen“, von Jürgen Determann

Heft-Nr. 84/1991 – Die Expedition ANTARKTIS VIII/1-2, 1989 mit der Winter Weddell Gyre Study der Forschungsschiffe „Polarstern“ und „Akademik Fedorov“, von Ernst Augstein, Nicolai Bagriantsev und Hans Werner Schenke

Heft-Nr. 85/1991 – „Zur Entstehung von Unterwassereis und das Wachstum und die Energiebilanz des Meereises in der Atka Bucht, Antarktis“, von Josef Kipfstuhl

Heft-Nr. 86/1991 – „Die Expedition ANTARKTIS-VIII mit FS „Polarstern“ 1989/90. Bericht vom Fahrtabschnitt ANT-VIII/5“, herausgegeben von Heinz Miller und Hans Oerter

Heft-Nr. 87/1991 – „Scientific cruise reports of Arctic expeditions ARK-VI/1-4 of RV „Polarstern“ in 1989“, edited by G. Krause, J. Meincke & H. J. Schwarz

Heft-Nr. 88/1991 – „Zur Lebensgeschichte dominanter Copepodenarten (*Calanus finmarchicus*, *C. glacialis*, *C. hyperboreus*, *Metridia longa*) in der Framstraße“, von Sabine Diel

Heft-Nr. 89/1991 – „Detaillierte seismische Untersuchungen am östlichen Kontinentalrand des Weddell-Meereres vor Kapp Norvegia, Antarktis“, von Norbert E. Kaul

Heft-Nr. 90/1991 – „Die Expedition ANTARKTIS VIII mit FS „Polarstern“ 1989/90. Bericht von Fahrtabschnitten ANT VIII/6-7“, herausgegeben von Dieter Karl Fütterer und Otto Schrems

Heft-Nr. 91/1991 – „Blood physiology and ecological consequences in Weddell Sea fishes (Antarctica)“, by Andreas Kunzmann.

Heft-Nr. 92/1991 – „Zur sommerlichen Verteilung des Mesozooplanktons im Nansen-Becken, Nordpolarmeer“, von Nicolai Mumm.

Heft-Nr. 93/1991 – Die Expedition ARKTIS VII mit FS „Polarstern“ 1990. Bericht von Fahrtabschnitten ARK VII/2“, herausgegeben vom Gunther Krause.

Heft-Nr. 94/1991 – „Die Entwicklung des Phytoplanktons im östlichen Weddellmeer (Antarktis) beim Übergang vom Spätwinter zum Frühjahr“, von Renate Scharek.

Heft-Nr. 95/1991 – „Radioisotopenstratigraphie, Sedimentologie und Geochemie jungquartärer Sedimente des östlichen Arktischen Ozeans“, von Horst Bohrmann.

Heft-Nr. 96/1991 – „Holozäne Sedimentationsentwicklung im Scoresby Sund, Ost-Grönland“, von Peter Marienfeld

Heft-Nr. 97/1991 – „Strukturelle Entwicklung und Abkühlungsgeschichte der Heimefrontfjella (Westliches Dronning Maud Land / Antarktika)“, von Joachim Jacobs

Heft-Nr. 98/1991 – „Zur Besiedlungsgeschichte des antarktischen Schelfes am Beispiel der Isopoda (Crustacea, Malacostraca)“, von Angelika Brandt

Heft-Nr. 99/1992 – „The Antarctic ice sheet and environmental change: a three-dimensional modelling study“, by Philippe Huybrechts

Heft-Nr. 100/1992 – „Die Expeditionen ANTARKTIS IX/1-4 des Forschungsschiffes 'Polarstern' 1990/91“, herausgegeben von Ulrich Bathmann, Meinhard Schulz-Baldes, Eberhard Fahrbach, Victor Smetacek und Hans-Wolfgang Hubberten

Heft-Nr. 101/1992 – „Wechselbeziehungen zwischen Spurenmetallkonzentrationen (Cd, Cu, Pb, Zn) im Meereswasser und in Zooplanktonorganismen (Copepoda) der Arktis und des Atlantiks“, von Christa Pohl

Heft-Nr. 102/1992 – „Physiologie und Ultrastruktur der antarktischen Grünalge *Prasiola crispa* ssp. *antarctica* unter osmotischem Stress und Austrocknung“, von Andreas Jacob

Heft-Nr. 103/1992 – „Zur Ökologie der Fische im Weddellmeer“, von Gerd Hubold

Heft-Nr. 104/1992 – „Mehrkanalige adaptive Filter für die Unterdrückung von multiplen Reflexionen in Verbindung mit der freien Oberfläche in marinen Seismogrammen“, von Andreas Rosenberger

Heft-Nr. 105/1992 – „Radiation and Eddy Flux Experiment 1991 (REFLEX I)“, von Jörg Hartmann, Christoph Kottmeier und Christian Wamser

Heft-Nr. 106/1992 – „Ostracoden im Epipelagial vor der Antarktischen Halbinsel - ein Beitrag zur Systematik sowie zur Verbreitung und Populationsstruktur unter Berücksichtigung der Saisonalität“, von Rüdiger Kock

Heft-Nr. 107/1992 – „ARCTIC '91: Die Expedition ARK-VIII/3 mit FS 'Polarstern' 1991“, herausgegeben von Dieter K. Fütterer

Heft-Nr. 108/1992 – „Dehnungsbeben an einer Störungszone im Ekström-Schelfeis nördlich der Georg-von-Neumayer Station, Antarktis. - Eine Untersuchung mit seismologischen und geodätischen Methoden“, von Uwe Nixdorf

Heft-Nr. 109/1992 – „Spätquartäre Sedimentation am Kontinentalrand des südöstlichen Weddellmeeres, Antarktis“, von Michael Weber

Heft-Nr. 110/1992 – „Sedimentfazies und Bodenwasserstrom am Kontinentalhang des nordwestlichen Weddellmeeres“, von Isa Brehme

Heft-Nr. 111/1992 – „Die Lebensbedingungen in den Solekanälen des antarktischen Meereises“, von Jürgen Weissenberger

Heft-Nr. 112/1992 – „Zur Taxonomie von rezenten benthischen Foraminiferen aus dem Nansen Becken, Arktischer Ozean“, von Jutta Wollenburg

Heft-Nr. 113/1992 – „Die Expedition ARKTIS VIII/1 mit FS 'Polarstern' 1991“, herausgegeben von Gerhard Kattner

Heft-Nr. 114/1992 – „Die Gründungsphase deutscher Polarforschung, 1865-1875“, von Reinhard A. Krause

Heft-Nr. 115/1992 – „Scientific Cruise Report of the 1991 Arctic Expedition ARK VIII/2 of RV 'Polarstern' (EPOS II)“, by Eike Rachor

Heft-Nr. 116/1992 – „The Meteorological Data of the Georg-von-Neumayer-Station (Antarctica) for 1988, 1989, 1990 and 1991“, by Gert König-Langlo

Heft-Nr. 117/1992 – „Petrogenese des metamorphen Grundgebirges der zentralen Heimefrontfjella (westliches Dronning Maud Land / Antarktis)“, von Peter Schulze

Heft-Nr. 118/1993 – „Die mafischen Gänge der Shackleton Range / Antarktika: Petrographie, Geochemie, Isotopengeochemie und Paläomagnetik“, von Rüdiger Hotten

Heft-Nr. 119/1993 – „Gefrierschutz bei Fischen der Polarmeere“, von Andreas P. A. Wöhrmann

Heft-Nr. 120/1993 – „East Siberian Arctic Region Expedition '92: The Laptev Sea – its Significance for Arctic Sea-Ice Formation and Transpolar Sediment Flux“, by D. Dethleff, D. Nürnberg, E. Reimnitz, M. Saarso and Y.P. Savchenko. – „Expedition to Novaja Zemlja and Franz Josef Land with RV 'Dalnie Zelentsy'“, by D. Nürnberg and E. Groth

Heft-Nr. 121/1993 – „Die Expedition ANTARKTIS X/3 mit FS 'Polarstern' 1992“, herausgegeben von Michael Spindler, Gerhard Dieckmann und David Thomas

Heft-Nr. 122/1993 – „Die Beschreibung der Korngestalt mit Hilfe der Fourier-Analyse: Parametrisierung der morphologischen Eigenschaften von Sedimentpartikeln“, von Michael Diepenbroek

Heft-Nr. 123/1993 – „Zerstörungsfreie hochauflösende Dichteuntersuchungen mariner Sedimente“, von Sebastian Gerland

Heft-Nr. 124/1993 – „Umsatz und Verteilung von Lipiden in arktischen marinen Organismen unter besonderer Berücksichtigung unterer trophischer Stufen“, von Martin Graeve

Heft-Nr. 125/1993 – „Ökologie und Respiration ausgewählter arktischer Bodenfischarten“, von Christian F. von Dorrien

Heft-Nr. 126/1993 – „Quantitative Bestimmung von Paläoumweltparametern des Antarktischen Oberflächenwassers im Spätquartär anhand von Transferfunktionen mit Diatomeen“, von Ulrich Zielinski

Heft-Nr. 127/1993 – „Sedimenttransport durch das arktische Meereis: Die rezente lithogene und biogene Materialfracht“, von Ingo Wollenburg

Heft-Nr. 128/1993 – „Cruise ANTARKTIS X/3 of RV 'Polarstern': CTD-Report“, von Marek Zwierz

Heft-Nr. 129/1993 – „Reproduktion und Lebenszyklen dominanter Copepodenarten aus dem Weddellmeer, Antarktis“, von Frank Kurbjeweit

Heft-Nr. 130/1993 – „Untersuchungen zu Temperaturregime und Massenhaushalt des Filchner-Ronne-Schelfeises, Antarktis, unter besonderer Berücksichtigung von Anfrier- und Abschmelzprozessen“, von Klaus Grosfeld

Heft-Nr. 131/1993 – „Die Expedition ANTARKTIS X/5 mit FS 'Polarstern' 1992“, herausgegeben von Rainer Gersonde

Heft-Nr. 132/1993 – „Bildung und Abgabe kurzkettiger halogener Kohlenwasserstoffe durch Makroalgen der Polarregionen“, von Frank Laturnus

Heft-Nr. 133/1994 – „Radiation and Eddy Flux Experiment 1993 (REFLEX II)“, by Christoph Kottmeier, Jörg Hartmann, Christian Wamser, Axel Bochert, Christof Lüpkes, Dietmar Freese and Wolfgang Cohrs

Heft-Nr. 134/1994 – „The Expedition ARKTIS-IX/1“, edited by Hajo Eicken and Jens Meincke

Heft-Nr. 135/1994 – „Die Expeditionen ANTARKTIS X/6-8“, herausgegeben von Ulrich Bathmann, Victor Smetacek, Hein de Baar, Eberhard Fahrback und Gunter Krause

Heft-Nr. 136/1994 – „Untersuchungen zur Ernährungsökologie von Kaiserpinguinen (*Aptenodytes forsteri*) und Königspinguinen (*Aptenodytes patagonicus*)“, von Klemens Pütz

Heft-Nr. 137/1994 – „Die känozoische Vereisungsgeschichte der Antarktis“, von Werner U. Ehrmann

Heft-Nr. 138/1994 – „Untersuchungen stratosphärischer Aerosole vulkanischen Ursprungs und polarer stratosphärischer Wolken mit einem Mehrwellenlängen-Lidar auf Spitzbergen (79°N, 12°E)“, von Georg Beyerle

Heft-Nr. 139/1994 – „Charakterisierung der Isopodenfauna (Crustacea, Malacostraca) des Scotia-Bogens aus biogeographischer Sicht: Ein multivariater Ansatz“, von Holger Winkler

Heft-Nr. 140/1994 – „Die Expedition ANTARKTIS X/4 mit FS 'Polarstern' 1992“, herausgegeben von Peter Lemke

- Heft-Nr. 141/1994** – „Satellitenaltimetrie über Eis – Anwendung des GEOSAT-Altimeters über dem Ekströmisen, Antarktis“, von Klemens Heidland
- Heft-Nr. 142/1994** – „The 1993 Northeast Water Expedition. Scientific cruise report of RV 'Polarstern' Arctic cruises ARK IX/2 and 3, USCG 'Polar Bear' cruise NEWP and the NEWLand expedition“, edited by Hans-Jürgen Hirche and Gerhard Kattner
- Heft-Nr. 143/1994** – „Detaillierte refraktionsseismische Untersuchungen im inneren Scoresby Sund/ Ost Grönland“, von Notker Fechner
- Heft-Nr. 144/1994** – „Russian-German Cooperation in the Siberian Shelf Seas: Geo-System Laptev Sea“, edited by Heidmarie Kassens, Hans-Wolfgang Hubberten, Sergey M. Pryamikov and Rüdiger Stein
- * **Heft-Nr. 145/1994** – „The 1993 Northeast Water Expedition. Data Report of RV 'Polarstern' Arctic Cruises IX/2 and 3“, edited by Gerhard Kattner and Hans-Jürgen Hirche
- Heft-Nr. 146/1994** – „Radiation Measurements at the German Antarctic Station Neumeyer 1982 – 1992“, by Torsten Schmidt and Gert König-Langlo
- Heft-Nr. 147/1994** – „Krustenstrukturen und Verlauf des Kontinentalrandes im Weddell Meer/Antarktis“, von Christian Hübscher
- Heft-Nr. 148/1994** – „The expeditions NORILSK/TAYMYR 1993 and BUNGER OASIS 1993/94 of the AWI Research Unit Potsdam“, edited by Martin Melles
- Heft-Nr. 149/1994** – „Die Expedition ANTARKTIS '93. Der Fahrtabschnitt ARK-IX/4 mit FS 'Polarstern' 1993“, herausgegeben von Dieter K. Fütterer
- Heft-Nr. 150/1994** – „Der Energiebedarf der Pygoscelis-Pinguine: eine Synopse“, von Boris M. Cullik
- Heft-Nr. 151/1994** – „Russian-German Cooperation: The Transdrift I Expedition to the Laptev Sea“, edited by Heidmarie Kassens and Valeriy Y. Karpiy
- Heft-Nr. 152/1994** – „Die Expedition ANTARKTIS-X mit FS 'Polarstern' 1992. Bericht von den Fahrtabschnitten ANT X/1a und 2“, herausgegeben von Heinz Miller
- Heft-Nr. 153/1994** – „Aminosäuren und Huminstoffe im Stickstoffkreislauf polarer Meere“, von Ulrike Hubberten
- Heft-Nr. 154/1994** – „Regional and seasonal variability in the vertical distribution of mesozooplankton in the Greenland Sea“, by Claudio Richter
- Heft-Nr. 155/1995** – „Benthos in polaren Gewässern“, herausgegeben von Christian Wiencke und Wolf Arntz
- Heft-Nr. 156/1995** – „An adjoint model for the determination of the mean oceanic circulation, air-sea fluxes and mixing coefficients“, by Reiner Schlitzer
- Heft-Nr. 157/1995** – „Biochemische Untersuchungen zum Lipidstoffwechsel antarktischer Copepoden“, von Kirsten Fahl
- * **Heft-Nr. 158/1995** – „Die deutsche Polarforschung seit der Jahrhundertwende und der Einfluß Erich von Drygalskis“, von Cornelia Lüdecke
- Heft-Nr. 159/1995** – „The distribution of $\delta^{18}\text{O}$ in the Arctic Ocean: Implications for the freshwater balance of the halocline and the sources of deep and bottom waters“, by Dorothea Bauch
- * **Heft-Nr. 160/1995** – „Rekonstruktion der spätquartären Tiefenwasserzirkulation und Produktivität im östlichen Südatlantik anhand von benthischen Foraminiferenvergesellschaftungen“, von Gerhard Schmiedl
- Heft-Nr. 161/1995** – „Der Einfluß von Salinität und Lichtintensität auf die Osmolytkonzentrationen, die Zellvolumina und die Wachstumsraten der antarktischen Eisdiatomeen *Chaetoceros* sp. und *Navicula* sp. unter besonderer Berücksichtigung der Aminosäure Prolin“, von Jürgen Nothnagel
- Heft-Nr. 162/1995** – „Meereistransportiertes lithogenes Feinmaterial in spätquartären Tiefseesedimenten des zentralen östlichen Arktischen Ozeans und der Framstraße“, von Thomas Letzig
- Heft-Nr. 163/1995** – „Die Expedition ANTARKTIS-XI/2 mit FS 'Polarstern' 1993/94“, herausgegeben von Rainer Gersonde
- Heft-Nr. 164/1995** – „Regionale und altersabhängige Variation gesteinsmagnetischer Parameter in marinen Sedimenten der Arktis“, von Thomas Frederichs
- Heft-Nr. 165/1995** – „Vorkommen, Verteilung und Umsatz biogener organischer Spurenstoffe: Sterole in antarktischen Gewässern“, von Georg Hanke
- Heft-Nr. 166/1995** – „Vergleichende Untersuchungen eines optimierten dynamisch-thermodynamischen Meereismodells mit Beobachtungen im Weddellmeer“, von Holger Fischer
- Heft-Nr. 167/1995** – „Rekonstruktionen von Paläo-Umweltparametern anhand von stabilen Isotopen und Faunen-Vergesellschaftungen planktischer Foraminiferen im Südatlantik“, von Hans-Stefan Niebler
- Heft-Nr. 168/1995** – „Die Expedition ANTARKTIS XII mit FS 'Polarstern' 1994/95. Bericht von den Fahrtabschnitten ANT XII/1 und 2“, herausgegeben von Gerhard Kattner und Dieter Karl Fütterer
- Heft-Nr. 169/1995** – „Medizinische Untersuchung zur Circadianrhythmik und zum Verhalten bei Überwinterern auf einer antarktischen Forschungsstation“, von Hans Wortmann
- Heft-Nr. 170/1995** – DFG-Kolloquium: Terrestrische Geowissenschaften – Geologie und Geophysik der Antarktis

- Heft Nr. 171/1995** – „Strukturentwicklung und Petrogenese des metamorphen Grundgebirges der nördlichen Heimfrontfjella (westliches Dronning Maud Land/Antarktika)“, von Wilfried Bauer
- Heft Nr. 172/1995** – „Die Struktur der Erdkruste im Bereich des Scoresby Sund, Ostgrönland: Ergebnisse refraktionsseismischer und gravimetrischer Untersuchungen“, von Holger Mandler
- Heft Nr. 173/1995** – „Paläozoische Akkretion am paläopazifischen Kontinentalrand der Antarktis in Nordvictorialand – P-T-D-Geschichte und Deformationsmechanismen im Bowers Terrane“, von Stefan Matzer
- Heft Nr. 174/1995** – „The Expedition ARKTIS-X/2 of RV 'Polarstern' in 1994“, edited by Hans-W. Hubberten
- Heft Nr. 175/1995** – „Russian-German Cooperation: The Expedition TAYMYR 1994“, edited by Christine Siegert and Dmitry Bolshiyarov
- Heft Nr. 176/1995** – „Russian-German Cooperation: Laptev Sea System“, edited by Heidemarie Kassens, Dieter Piepenburg, Jörn Thiede, Leonid Timokhov, Hans-Wolfgang Hubberten and Sergey M. Priamikov
- Heft Nr. 177/1995** – „Organischer Kohlenstoff in spätquartären Sedimenten des Arktischen Ozeans: Terrigener Eintrag und marine Produktivität“, von Carsten J. Schubert
- Heft Nr. 178/1995** – „Cruise ANTARKTIS XII/4 of RV 'Polarstern' in 1995: CTD-Report“, by Jüri Sildam
- Heft Nr. 179/1995** – „Benthische Foraminiferenfaunen als Wassermassen-, Produktions- und Eisdriftanzeiger im Arktischen Ozean“, von Jutta Wollenburg
- Heft Nr. 180/1995** – „Biogenopal und biogenes Barium als Indikatoren für spätquartäre Produktivitätsänderungen am antarktischen Kontinentalhang, atlantischer Sektor“, von Wolfgang J. Bonn
- Heft Nr. 181/1995** – „Die Expedition ARKTIS X/1 des Forschungsschiffes 'Polarstern' 1994“, herausgegeben von Eberhard Fahrbach
- Heft Nr. 182/1995** – „Laptev Sea System: Expeditions in 1994“, edited by Heidemarie Kassens
- Heft Nr. 183/1996** – „Interpretation digitaler Parasound Echolotaufzeichnungen im östlichen Arktischen Ozean auf der Grundlage physikalischer Sedimenteigenschaften“, von Uwe Bergmann
- Heft Nr. 184/1996** – „Distribution and dynamics of inorganic nitrogen compounds in the troposphere of continental, coastal marine, and Arctic areas“, by María Dolores Andrés Hernández
- Heft Nr. 185/1996** – „Verbreitung und Lebensweise der Aphroditiden und Polynoiden (Polychaeta) im östlichen Weddellmeer und im Lazarevmeer (Antarktis)“, von Michael Stiller
- Heft Nr. 186/1996** – „Reconstruction of Late Quaternary environmental conditions applying the natural radionuclides ²³⁰Th, ¹⁰Be, ²³¹Pa and ²³⁸U: A study of deep-sea sediments from the eastern sector of the Antarctic Circumpolar Current System“, by Martin Frank
- Heft Nr. 187/1996** – „The Meteorological Data of the Neumayer Station (Antarctica) for 1992, 1993 and 1994“, by Gert König-Langlo and Andreas Herber
- Heft Nr. 188/1996** – „Die Expedition ANTARKTIS-XI/3 mit FS 'Polarstern' 1994“, herausgegeben von Heinz Miller und Hannes Grobe
- Heft Nr. 189/1996** – „Die Expedition ARKTIS-VII/3 mit FS 'Polarstern' 1990“, herausgegeben von Heinz Miller und Hannes Grobe
- Heft Nr. 190/1996** – „Cruise report of the Joint Chilean-German-Italian Magellan 'Victor Hensen' Campaign in 1994“, edited by Wolf Arntz and Matthias Gorny
- Heft Nr. 191/1996** – „Leitfähigkeits- und Dichtemessung an Eisbohrkernen“, von Frank Wilhelms
- Heft Nr. 192/1996** – „Photosynthese-Charakteristika und Lebensstrategie antarktischer Makroalgen“, von Gabriele Weykam
- Heft Nr. 193/1996** – „Heterogene Reaktionen von N₂O₃ und HBr und ihr Einfluß auf den Ozonabbau in der polaren Stratosphäre“, von Sabine Seisel
- Heft Nr. 194/1996** – „Ökologie und Populationsdynamik antarktischer Ophiuroiden (Echinodermata)“, von Corinna Dahm
- Heft Nr. 195/1996** – „Die planktische Foraminifere Neogloboquadrina pachyderma (Ehrenberg) im Weddellmeer, Antarktis“, von Doris Berberich
- Heft Nr. 196/1996** – „Untersuchungen zum Beitrag chemischer und dynamischer Prozesse zur Variabilität des stratosphärischen Ozons über der Arktis“, von Birgit Heese
- Heft Nr. 197/1996** – „The Expedition ARKTIS-XI/2 of RV 'Polarstern' in 1995“, edited by Gunther Krause
- Heft Nr. 198/1996** – „Geodynamik des Westantarktischen Riftsystems basierend auf Apatit-Spaltspuranalysen“, von Frank Lisker
- Heft Nr. 199/1996** – „The 1993 Northeast Water Expedition. Data Report on CTD Measurements on RV 'Polarstern' Cruises ARKTIS IX/2 and 3“, by Gereon Budéus and Wolfgang Schneider
- Heft Nr. 200/1996** – „Stability of the Thermohaline Circulation in analytical and numerical models“, by Gerrit Lohman
- Heft Nr. 201/1996** – „Trophische Beziehungen zwischen Makroalgen und Herbivoren in der Potter Cove (King-George-Inseln, Antarktis)“, von Katrin Iken

* vergriffen/out of print

** nur noch beim Autor/only from the author

- Heft-Nr. 202/1996** – "Zur Verbreitung und Respiration ökologisch wichtiger Bodentiere in den Gewässern um Svalbard (Arktis)", von Michael K. Schmid.
- Heft-Nr. 203/1996** – "Dynamik, Rauigkeit und Alter des Meereises in der Arktis - Numerische Untersuchungen mit einem großskaligen Modell", von Markus Harder.
- Heft-Nr. 204/1996** – "Zur Parametrisierung der stabilen atmosphärischen Grenzschicht über einem antarktischen Schelfeis", von Dörthe Handorf.
- Heft-Nr. 205/1996** – "Textures and fabrics in the GRIP ice core, in relation to climate history and ice deformation", by Thorsteinn Thorsteinsson.
- Heft-Nr. 206/1996** – "Der Ozean als Teil des gekoppelten Klimasystems: Versuch der Rekonstruktion der glazialen Zirkulation mit verschiedenen komplexen Atmosphärenkomponenten", von Kerstin Fieg.
- Heft-Nr. 207/1996** – "Lebensstrategien dominanter antarktischer Oithonidae (Cyclopoida, Copepoda) und Oncaeiidae (Poecilostomatoida, Copepoda) im Bellingshausenmeer", von Cornelia Metz.
- Heft-Nr. 208/1996** – "Atmosphäreneinfluß bei der Fernerkundung von Meereis mit passiven Mikrowellenradiometern", von Christoph Oelke.
- Heft-Nr. 209/1996** – "Klassifikation von Radarsatellitendaten zur Meereiserkennung mit Hilfe von Line-Scanner-Messungen", von Axel Bochert.
- Heft-Nr. 210/1996** – "Die mit ausgewählten Schwämmen (Hexactinellida und Demospongiae) aus dem Weddellmeer, Antarktis, vergesellschaftete Fauna", von Kathrin Kunzmann.
- Heft-Nr. 211/1996** – "Russian-German Cooperation: The Expedition TAYMYR 1995 and the Expedition KOLYMA 1995", by Dima Yu. Bolshiyarov and Hans-W. Hubberten.
- Heft-Nr. 212/1996** – "Surface-sediment composition and sedimentary processes in the central Arctic Ocean and along the Eurasian Continental Margin", by Ruediger Stein, Gennadij I. Ivanov, Michael A. Levitan, and Kirsten Fahl.
- Heft-Nr. 213/1996** – "Gonadenentwicklung und Eiproduktion dreier *Calanus*-Arten (Copepoda): Freilandbeobachtungen, Histologie und Experimente", von Barbara Niehoff.
- Heft-Nr. 214/1996** – "Numerische Modellierung der Übergangszone zwischen Eisschild und Eisschelf", von Christoph Mayer.
- Heft-Nr. 215/1996** – "Arbeiten der AWI-Forschungsstelle Potsdam in Antarktika, 1994/95", herausgegeben von Ulrich Wand.
- Heft-Nr. 216/1996** – "Rekonstruktion quartärer Klimaänderungen im atlantischen Sektor des Südpolarmeeres anhand von Radiolarien", von Uta Brathauer.
- Heft-Nr. 217/1996** – "Adaptive Semi-Lagrange-Finite-Elemente-Methode zur Lösung der Flachwassergleichungen: Implementierung und Parallelisierung", von Jörn Behrens.
- Heft-Nr. 218/1997** – "Radiation and Eddy Flux Experiment 1995 (REFLEX III)", by Jörg Hartmann, Axel Bochert, Dietmar Freese, Christoph Kottmeier, Dagmar Nagel and Andreas Reuter.
- Heft-Nr. 219/1997** – "Die Expedition ANTARKTIS-XII mit FS 'Polarstern' 1995. Bericht vom Fahrtabschnitt ANT-XII/3", herausgegeben von Wilfried Jokat und Hans Oerter.
- Heft-Nr. 220/1997** – "Ein Beitrag zum Schwerfeld im Bereich des Weddellmeeres, Antarktis. Nutzung von Altimetermessungen des GEOSAT und ERS-1", von Tilo Schöne.
- Heft-Nr. 221/1997** – "Die Expeditionen ANTARKTIS-XIII/1-2 des Forschungsschiffes 'Polarstern' 1995/96", herausgegeben von Ulrich Bathmann, Mike Lucas und Victor Smetacek.
- Heft-Nr. 222/1997** – "Tectonic Structures and Glaciomarine Sedimentation in the South-Eastern Weddell Sea from Seismic Reflection Data", by László Oszkó.
- Heft-Nr. 223/1997** – "Bestimmung der Meereisdicke mit seismischen und elektromagnetisch-induktiven Verfahren", von Christian Haas.
- Heft-Nr. 224/1997** – "Troposphärische Ozonvariationen in Polarregionen", von Silke Wessel.
- Heft-Nr. 225/1997** – "Biologische und ökologische Untersuchungen zur kryopelagischen Amphipodenfauna des arktischen Meereises", von Michael Poltermann.
- Heft-Nr. 226/1997** – "Scientific Cruise Report of the Arctic Expedition ARK-XI/1 of RV 'Polarstern' in 1995", edited by Eike Rachor.
- Heft-Nr. 227/1997** – "Der Einfluß kompatibler Substanzen und Kryoprotektoren auf die Enzyme Malatdehydrogenase (MDH) und Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase (G6P-DH) aus *Acrosiphonia arctica* (Chlorophyta) der Arktis", von Katharina Kück.
- Heft-Nr. 228/1997** – "Die Verbreitung epibenthischer Mollusken im chilenischen Beagle-Kanal", von Katrin Linse.
- Heft-Nr. 229/1997** – "Das Mesozooplankton im Laptevmeer und östlichen Nansen-Becken - Verteilung und Gemeinschaftsstrukturen im Spätsommer", von Hinrich Hanssen.

* vergriffen/out of print.

** nur noch beim Autor/only from the author.

Heft-Nr. 230/1997 — "Modell eines adaptierbaren, rechnergestützten, wissenschaftlichen Arbeitsplatzes am Alfred-Wegener-Institut für Polar- und Meeresforschung", von Lutz-Peter Kurdelski.

Heft-Nr. 231/1997 — "Zur Ökologie arktischer und antarktischer Fische: Aktivität, Sinnesleistungen und Verhalten", von Christopher Zimmermann.

Heft-Nr. 232/1997 — "Persistente chlororganische Verbindungen in hochantarktischen Fischen", von Stephan Zimmermann.

Heft-Nr. 233/1997 — "Zur Ökologie des Dimethylsulfoniumpropionat (DMSP)-Gehaltes temperierter und polarer Phytoplanktongemeinschaften im Vergleich mit Laborkulturen der Coccolithophoride *Emiliana huxleyi* und der antarktischen Diatomee *Nitzschia lecontei*", von Doris Meyerdierks.

Heft-Nr. 234/1997 — "Die Expedition ARCTIC '96 des FS 'Polarstern' (ARK XIII) mit der Arctic Climate System Study (ACSYS)", von Ernst Augstein und den Fahrteilnehmern.

Heft-Nr. 235/1997 — "Polonium-210 und Blei-210 im Südpolarmeer: Natürliche Tracer für biologische und hydrographische Prozesse im Oberflächenwasser des Antarktischen Zirkumpolarstroms und des Weddellmeeres", von Jana Friedrich.

Heft-Nr. 236/1997 — "Determination of atmospheric trace gas amounts and corresponding natural isotopic ratios by means of ground-based FTIR spectroscopy in the high Arctic", by Arndt Meier.

Heft-Nr. 237/1997 — "Russian-German Cooperation: The Expedition TAYMYR / SEVERNAYA ZEMLYA 1996", edited by Martin Melles, Birgit Hagedorn and Dmitri Yu. Bolshiyarov

Heft-Nr. 238/1997 — "Life strategy and ecophysiology of Antarctic macroalgae", by Iván M. Gómez.

Heft-Nr. 239/1997 — "Die Expedition ANTARKTIS XIII/4-5 des Forschungsschiffes 'Polarstern' 1996", herausgegeben von Eberhard Fahrbach und Dieter Gerdes.

Heft-Nr. 240/1997 — "Untersuchungen zur Chrom-Speziation in Meerwasser, Meereis und Schnee aus ausgewählten Gebieten der Arktis", von Heide Giese.

Heft-Nr. 241/1997 — "Late Quaternary glacial history and paleoceanographic reconstructions along the East Greenland continental margin: Evidence from high-resolution records of stable isotopes and ice-rafted debris", by Seung-II Nam.

Heft-Nr. 242/1997 — "Thermal, hydrological and geochemical dynamics of the active layer at a continuous permafrost site, Taymyr Peninsula, Siberia", by Julia Boike.

Heft-Nr. 243/1997 — "Zur Paläoozeanographie hoher Breiten: Stellvertreterdaten aus Foraminiferen", von Andreas Mackensen.

Heft-Nr. 244/1997 — "The Geophysical Observatory at Neumayer Station, Antarctica. Geomagnetic and seismological observations in 1995 and 1996", by Alfons Eckstaller, Thomas Schmidt, Viola Gaw, Christian Müller and Johannes Rogenhagen.

Heft-Nr. 245/1997 — "Temperaturbedarf und Biogeographie mariner Makroalgen - Anpassung mariner Makroalgen an tiefe Temperaturen", von Bettina Bischoff-Bäsmann.

Heft-Nr. 246/1997 — "Ökologische Untersuchungen zur Fauna des arktischen Meereises", von Christine Friedrich.

Heft-Nr. 247/1997 — "Entstehung und Modifizierung von marinen gelösten organischen Substanzen", von Berit Kirchhoff.

Heft-Nr. 248/1997 — "Laptev Sea System: Expeditions in 1995", edited by Heidemarie Kassens.

Heft-Nr. 249/1997 — "The Expedition ANTARKTIS XIII/3 (EASIZ I) of RV 'Polarstern' to the eastern Weddell Sea in 1996", edited by Wolf Arntz and Julian Gutt.

Heft-Nr. 250/1997 — "Vergleichende Untersuchungen zur Ökologie und Biodiversität des Mega-Epibenthos der Arktis und Antarktis", von Andreas Starmans.

Heft-Nr. 251/1997 — "Zeitliche und räumliche Verteilung von Mineralvergesellschaftungen in spätquartären Sedimenten des Arktischen Ozeans und ihre Nützlichkeit als Klimaindikatoren während der Glazial/Interglazial-Wechsel", von Christoph Vogt.

Heft-Nr. 252/1997 — "Solitäre Ascidien in der Potter Cove (King George Island, Antarktis). Ihre ökologische Bedeutung und Populationsdynamik", von Stephan Kühne.

Heft-Nr. 253/1997 — "Distribution and role of microprotozoa in the Southern Ocean", by Christine Klaas.

Heft-Nr. 254/1997 — "Die spätquartäre Klima- und Umweltgeschichte der Bunger-Oase, Ostantarktis", von Thomas Kulbe.

Heft-Nr. 255/1997 — "Scientific Cruise Report of the Arctic Expedition ARK-XIII/2 of RV 'Polarstern' in 1997", edited by Ruediger Stein and Kirsten Fahl.

Heft-Nr. 256/1998 — "Das Radionuklid Tritium im Ozean: Meßverfahren und Verteilung von Tritium im Südatlantik und im Weddellmeer", von Jürgen Sültenfuß.

Heft-Nr. 257/1998 — "Untersuchungen der Saisonalität von atmosphärischem Dimethylsulfid in der Arktis und Antarktis", von Christoph Kleefeld.

Heft-Nr. 258/1998 — "Bellingshausen- und Amundsenmeer: Entwicklung eines Sedimentationsmodells", von Frank-Oliver Nitsche.

Heft-Nr. 259/1998 — "The Expedition ANTARKTIS-XIV/4 of RV 'Polarstern' in 1997", by Dieter K. Fütterer.

Heft-Nr. 260/1998 — "Die Diatomeen der Laptevsee (Arktischer Ozean): Taxonomie und biogeographische Verbreitung", von Holger Cremer.

Heft-Nr. 261/1998 — "Die Krustenstruktur und Sedimentdecke des Eurasischen Beckens, Arktischer Ozean: Resultate aus seismischen und gravimetrischen Untersuchungen", von Estella Weigelt.

Heft-Nr. 262/1998 — "The Expedition ARKTIS-XIII/3 of RV 'Polarstern' in 1997", by Gunther Krause.

Heft-Nr. 263/1998 — "Thermo-tektonische Entwicklung von Oates Land und der Shackleton Range (Antarktis) basierend auf Spaltspuranalysen", von Thorsten Schäfer.

Heft-Nr. 264/1998 — "Messungen der stratosphärischen Spurengase ClO, HCl, O₃, N₂O, H₂O und OH mittels flugzeuggetragener Submillimeterwellen-Radiometrie", von Joachim Urban.

Heft-Nr. 265/1998 — "Untersuchungen zu Massenhaushalt und Dynamik des Ronne Ice Shelves, Antarktis", von Astrid Lambrecht.

Heft-Nr. 266/1998 — "Scientific Cruise Report of the Kara Sea Expedition of RV 'Akademik Boris Petrov' in 1997", edited by Jens Matthiessen and Oleg Stepanets.

Heft-Nr. 267/1998 — "Die Expedition ANTARKTIS-XIV mit FS 'Polarstern' 1997. Bericht vom Fahrtabschnitt ANT-XIV/3", herausgegeben von Wilfried Jokat und Hans Oerter.

Heft-Nr. 268/1998 — "Numerische Modellierung der Wechselwirkung zwischen Atmosphäre und Meereis in der arktischen Eisrandzone", von Gerit Birnbaum.

Heft-Nr. 269/1998 — "Katabatic wind and Boundary Layer Front Experiment around Greenland (KABEG '97)", by Günther Heinemann.

Heft-Nr. 270/1998 — "Architecture and evolution of the continental crust of East Greenland from integrated geophysical studies", by Vera Schlindwein.

Heft-Nr. 271/1998 — "Winter Expedition to the Southwestern Kara Sea - Investigations on Formation and Transport of Turbid Sea-Ice", by Dirk Dethleff, Per Loewe, Dominik Weiel, Hartmut Nies, Gesa Kuhlmann, Christian Bahe and Genrady Tarasov.

Heft-Nr. 272/1998 — "FTIR-Emissionsspektroskopische Untersuchungen der arktischen Atmosphäre", von Edo Becker.

Heft-Nr. 273/1998 — "Sedimentation und Tektonik im Gebiet des Agulhas Rückens und des Agulhas Plateaus (SETARAP)", von Gabriele Uenzelmann-Neben.

Heft-Nr. 274/1998 — "The Expedition ANTARKTIS XIV/2", by Gerhard Kattner.

Heft-Nr. 275/1998 — "Die Auswirkung der 'NorthEastWater'-Polynya auf die Sedimentation vor NO-Grönland und Untersuchungen zur Paläo-Ozeanographie seit dem Mittelweichsel", von Hanne Notholt.

Heft-Nr. 276/1998 — "Interpretation und Analyse von Potentialfelddaten im Weddellmeer, Antarktis: der Zerfall des Superkontinents Gondwana", von Michael Studinger.

Heft-Nr. 277/1998 — "Koordiniertes Programm Antarktischforschung". Berichtskolloquium im Rahmen des Koordinierten Programms "Antarktischforschung mit vergleichenden Untersuchungen in arktischen Eisgebieten", herausgegeben von Hubert Miller.

Heft-Nr. 278/1998 — "Messung stratosphärischer Spurengase über Ny-Ålesund, Spitzbergen, mit Hilfe eines bodengebundenen Mikrowellen-Radiometers", von Uwe Raffalski.

Heft-Nr. 279/1998 — "Arctic Paleo-River Discharge (APARD). A New Research Programme of the Arctic Ocean Science Board (AOSB)", edited by Ruediger Stein.

Heft-Nr. 280/1998 — "Fernerkundungs- und GIS-Studien in Nordostgrönland", von Friedrich Jung-Rothenhäusler.

Heft-Nr. 281/1998 — "Rekonstruktion der Oberflächenwassermassen der östlichen Laptevsee im Holozän anhand von aquatischen Palynomorphen", von Martina Kunz-Pirring.

Heft-Nr. 282/1998 — "Scavenging of ^{231}Pa and ^{230}Th in the South Atlantic: Implications for the use of the $^{231}\text{Pa}/^{230}\text{Th}$ ratio as a paleoproductivity proxy", by Hans-Jürgen Walter.

Heft-Nr. 283/1998 — "Sedimente im arktischen Meereis - Eintrag, Charakterisierung und Quantifizierung", von Frank Lindemann.

Heft-Nr. 284/1998 — "Langzeitanalyse der antarktischen Meereisbedeckung aus passiven Mikrowellendaten", von Christian H. Thomas.

Heft-Nr. 285/1998 — "Mechanismen und Grenzen der Temperaturanpassung beim Pierwurm *Arenicola marina* (L.)", von Angela Sommer.

Heft-Nr. 286/1998 — "Energieumsätze benthischer Filtrierer der Potter Cove (King George Island, Antarktis)", von Jens Kowalke.

Heft-Nr. 287/1998 — "Scientific Cooperation in the Russian Arctic: Research from the Barents Sea up to the Laptev Sea", edited by Eike Rachor.

Heft-Nr. 288/1998 — "Alfred Wegener. Kommentiertes Verzeichnis der schriftlichen Dokumente seines Lebens und Wirkens", von Ulrich Wutzke.

Heft-Nr. 289/1998 — "Retrieval of Atmospheric Water Vapor Content in Polar Regions Using Spaceborne Microwave Radiometry", by Jungang Miao.

Heft-Nr. 290/1998 — "Strukturelle Entwicklung und Petrogenese des nördlichen Kristallingürtels der Shackleton Range, Antarktis: Proterozoische und Ross-orogene Krustendynamik am Rand des Ostantarktischen Kratons", von Axel Brommer.

Heft-Nr. 291/1998 — "Dynamik des arktischen Meereises - Validierung verschiedener Rheologieansätze für die Anwendung in Klimamodellen", von Martin Kreyscher.

Heft-Nr. 292/1998 — "Anthropogene organische Spurenstoffe im Arktischen Ozean. Untersuchungen chlorierter Biphenyle und Pestizide in der Laptevsee, technische und methodische Entwicklungen zur Probenahme in der Arktis und zur Spurenstoffanalyse", von Sven Utschakowski.

Heft-Nr. 293/1998 — "Rekonstruktion der spätquartären Klima- und Umweltgeschichte der Schirmacher Oase und des Wohlthat Massivs (Ostantarktika)", von Markus Julius Schwab.

Heft-Nr. 294/1998 — "Besiedlungsmuster der benthischen Makrofauna auf dem ostgrönländischen Kontinentalfang", von Klaus Schnack.

Heft-Nr. 295/1998 — "Gehäuseuntersuchungen an planktischen Foraminiferen hoher Breiten: Hinweise auf Umweltveränderungen während der letzten 140.000 Jahre", von Harald Hommers.

Heft-Nr. 296/1998 — "Scientific Cruise Report of the Arctic Expedition ARK-XIII/1 of RV 'Polarstern' in 1997", edited by Michael Spindler, Wilhelm Hagen and Dorothea Stübing.

Heft-Nr. 297/1998 — "Radiometrische Messungen im arktischen Ozean - Vergleich von Theorie und Experiment", von Klaus-Peter Johnsen.

Heft-Nr. 298/1998 — "Patterns and Controls of CO₂ Fluxes in Wet Tundra Types of the Taimyr Peninsula, Siberia - the Contribution of Soils and Mosses", by Martin Sommerkorn.

Heft-Nr. 299/1998 — "The Potter Cove coastal ecosystem, Antarctica. Synopsis of research performed within the frame of the Argentinean-German Cooperation at the Dallmann Laboratory and Jubany Station (King George Island, Antarctica, 1991-1997)", by Christian Wiencke, Gustavo Ferreyra, Wolf Arntz & Carlos Rinaldi.

Heft-Nr. 300/1999 — "The Kara Sea Expedition of RV 'Akademik Boris Petrov' 1997: First Results of a Joint Russian-German Pilot Study", edited by Jens Matthiessen, Oleg V. Stepanets, Ruediger Stein, Dieter K. Fütterer, and Eric M. Galimov.

Heft-Nr. 301/1999 — "The Expedition ANTARKTIS XV/3 (EASIZ II)", edited by Wolf E. Arntz and Julian Gutt.

Heft-Nr. 302/1999 — "Sterole im herbstlichen Weddellmeer (Antarktis): Großräumige Verteilung, Vorkommen und Umsatz", von Anneke Mühlebach.

Heft-Nr. 303/1999 — "Polare stratosphärische Wolken: Lidar-Beobachtungen, Charakterisierung von Entstehung und Entwicklung", von Jens Biele.

Heft-Nr. 304/1999 — "Spätquartäre Paläoumweltbedingungen am nördlichen Kontinentalrand der Barents- und Kara-See. Eine Multi-Parameter-Analyse", von Jochen Knies.

Heft-Nr. 305/1999 — "Arctic Radiation and Turbulence Interaction Study (ARTIST)", by Jörg Hartmann, Frank Albers, Stefania Argentini, Axel Bochert, Ubaldo Bonafé, Wolfgang Cohrs, Alessandro Conidi, Dietmar Freese, Teodoro Georgiadis, Alessandro Ippoliti, Lars Kaleschke, Christof Lüpkes, Uwe Maixner, Gianguseppe Mastrantonio, Fabrizio Ravegnani, Andreas Reuter, Giuliano Trivellone and Angelo Viola.

Heft-Nr. 306/1999 — "German-Russian Cooperation: Biogeographic and biostratigraphic investigations on selected sediment cores from the Eurasian continental margin and marginal seas to analyze the Late Quaternary climatic variability", edited by Robert F. Spielhagen, Max S. Barash, Gennady I. Ivanov, and Jörn Thiede.

Heft-Nr. 307/1999 — "Struktur und Kohlenstoffbedarf des Makrobenthos am Kontinentalhang Ostgrönlands", von Dan Seiler.

Heft-Nr. 308/1999 — "ARCTIC '98: The Expedition ARK-XIV/1a of RV 'Polarstern' in 1998", edited by Wilfried Jokat.

Heft-Nr. 309/1999 — "Variabilität der arktischen Ozonschicht: Analyse und Interpretation bodengebundener Millimeterwellenmessungen", von Björn-Martin Sinnhuber.

- Heft-Nr. 310/1999** — "Rekonstruktion von Meereisdrift und terrigenem Sedimenteintrag im Spätquartär: Schwermineralassoziationen in Sedimenten des Laptev-See-Kontinentalrandes und des zentralen Arktischen Ozeans", von Marion Behrends.
- Heft-Nr. 311/1999** — "Parameterisierung atmosphärischer Grenzschichtprozesse in einem regionalen Klimamodell der Arktis", von Christoph Abegg.
- Heft-Nr. 312/1999** — "Solare und terrestrische Strahlungswechselwirkung zwischen arktischen Eisflächen und Wolken", von Dietmar Freese.
- Heft-Nr. 313/1999** — "Snow accumulation on Ekströmisen, Antarctica", by Elisabeth Schlosser, Hans Oerter and Wolfgang Graf.
- Heft-Nr. 314/1999** — "Die Expedition ANTARKTIS XV/4 des Forschungsschiffes 'Polarstern'1998", herausgegeben von Eberhard Fahrbach.
- Heft-Nr. 315/1999** — "Expeditions in Siberia in 1998", edited by Volker Rachold.
- Heft-Nr. 316/1999** — "Die postglaziale Sedimentationsgeschichte der Laptevsee: schwermineralogische und sedimentpetrographische Untersuchungen", von Bernhard Peregovich.
- Heft-Nr. 317/1999** — "Adaptation an niedrige Temperaturen: Lipide in Eisdiatomeen", von Heidi Lehmal.
- Heft-Nr. 318/1999** — "Effiziente parallele Lösungsverfahren für elliptische partielle Differentialgleichungen in der numerischen Ozeanmodellierung", von Natalja Rakowsky.
- Heft-Nr. 319/1999** — "The Ecology of Arctic Deep-Sea Copepods (Euchaetidae and Aetideidae). Aspects of their Distribution, Trophodynamics and Effect on the Carbon Flux", by Holger Auel.
- Heft-Nr. 320/1999** — "Modellstudien zur arktischen stratosphärischen Chemie im Vergleich mit Meßdaten", von Veronika Eyring.
- Heft-Nr. 321/1999** — "Analyse der optischen Eigenschaften des arktischen Aerosols", von Dagmar Nagel.
- Heft-Nr. 322/1999** — "Messungen des arktischen stratosphärischen Ozons: Vergleich der Ozonmessungen in Ny-Ålesund, Spitzbergen, 1997 und 1998", von Jens Langer.
- Heft-Nr. 323/1999** — "Untersuchung struktureller Elemente des südöstlichen Weddellmeeres / Antarktis auf der Basis mariner Potentialfelddaten", von Uwe F. Meyer.
- Heft-Nr. 324/1999** — "Geochemische Verwitterungstrends eines basaltischen Ausgangsgesteins nach dem spätpleistozänen Gletscherrückzug auf der Taimyrhalbinsel (Zentralsibirien) - Rekonstruktion an einer sedimentären Abfolge des Lama Sees", von Stefanie K. Harwart.
- Heft-Nr. 325/1999** — "Untersuchungen zur Hydrologie des arktischen Meereises - Konsequenzen für den kleinskaligen Stofftransport", von Johannes Freitag.

Heft-Nr. 326/1999 — "Die Expedition ANTARKTIS XIV/2 des Forschungsschiffes 'Polarstern'1998", herausgegeben von Eberhard Fahrbach.

Heft-Nr. 327/1999 — "Gemeinschaftsanalytische Untersuchungen der Harpacticoidenfauna der Magellanregion, sowie erste similaritätsanalytische Vergleiche mit Assoziationen aus der Antarktis", von Kai Horst George.

Heft-Nr. 328/1999 — "Rekonstruktion der Paläo-Umweltbedingungen am Laptev-See-Kontinentalrand während der beiden letzten Glazial/Interglazial-Zyklen anhand sedimentologischer und mineralogischer Untersuchungen", von Claudia Müller.

Heft-Nr. 329/1999 — "Räumliche und zeitliche Variationen atmosphärischer Spurengase aus bodengebundenen Messungen mit Hilfe eines Michelson Interferometers", von Justus Notholt.

Heft-Nr. 330/1999 — "The 1998 Danish-German Excursion to Disko Island, West Greenland", edited by Angelika Brandt, Helge A. Thomsen, Henning Heide-Jørgensen, Reinhardt M. Kristensen and Hilke Ruhberg.

Heft-Nr. 331/1999 — "Poseidon" Cruise No. 243 (Reykjavik - Greenland - Reykjavik, 24 August-11 September 1998): Climate change and the Viking-age fjord environment of the Eastern Settlement, sw Greenland", by Gerd Hoffmann, Antoon Kuijpers, and Jörn Thiede.

Heft-Nr. 332/1999 — "Modeling of marine biogeochemical cycles with an emphasis on vertical particle fluxes", by Regina Usbeck.

Heft-Nr. 333/1999 — "Die Tanaidaceenfauna des Beagle-Kanals und ihre Beziehungen zur Fauna des antarktischen Festlandssockels", von Anja Schmidt.

Heft-Nr. 334/1999 — "D-Aminosäuren als Tracer für biogeochemische Prozesse im Fluß-Schelf-Ozean-System der Arktis", von Hans Peter Fitznar.

Heft-Nr. 335/1999 — "Ökophysiologische Ursachen der limitierten Verbreitung reptanter decapoder Krebse in der Antarktis", von Markus Frederich.

Heft-Nr. 336/1999 — "Ergebnisse der Untersuchung des grönländischen Inlandeises mit dem elektromagnetischen Reflexionsverfahren in der Umgebung von NGRIP", von Fidan Göktaş.

Heft-Nr. 337/1999 — "Paleozoic and mesozoic tectono-thermal history of central Dronning Maud Land, East Antarctica - evidence from fission-track thermochronology", by Stefanie Meier.

Heft-Nr. 338/1999 — "Probleme hoher Stoffwechselraten bei Cephalopoden aus verschiedenen geographischen Breiten", von Susanne Zielinski.

