

In vivo MR Bildgebung und Spektroskopie an Meeresorganismen

Seit Kurzen wird die *in vivo* MR Bildgebung und Spektroskopie nicht mehr nur in der medizinischen Diagnostik oder in der experimentellen Medizin genutzt, sondern es kommen vermehrt auch Anwendungen aus dem Bereich der allgemeinen Biologie hinzu. Eine besondere Herausforderung stellen dabei Untersuchungen an wasseratmenden Organismen, insbesondere von Meeresorganismen, dar. Diese zumeist wechselwarmen Tiere haben im Laufe der Evolution zum einen ganz besondere Körpereigenschaften entwickelt, die sie sehr stark von den typischen medizinischen Tiermodellen wie kleine Nagetiere unterscheiden, zum anderen werden durch ihr Umgebungsmedium dem Wasser besondere Anforderungen an die MR Bildgebung und Spektroskopie gestellt. Typischerweise müssen die Organismen in kleinen Aquarien gehalten werden, um untersucht werden zu können. Darüber hinaus erzeugt das Umgebungswasser bereits einen sehr guten Bild Kontrast, der die Bildgebung am eigentlichen Objekt erschwert. Im Fall von Meeresorganismen und das sie umgebende Seewasser kommt die hohe Leitfähigkeit des Medium dazu, die zusätzlich besondere Anforderungen an die Hardware des MR Tomographen stellt. Gerade die Einzigartigkeit der Meeresorganismen und ihr hoch angepasster Stoffwechsel machen diese Objekte aber besonders interessant für vergleichende Untersuchungen in der Physiologie. Zudem sind gerade auf ihre Umgebung spezialisierte Meeresorganismen, wie z.B. niedere und höhere Weichtiere, vom derzeitigt stattfindenden Klimawandel besonders betroffen. Der Klimawandel macht sich in den Ozeanen nicht nur durch eine Erwärmung, sondern auch durch einen erhöhten Eintrag von Kohlendioxid bemerkbar, der das Säure-Basen-Gleichgewicht der Ozeane verändert. Dies hat einen Abfall des pH Wertes in den Ozeanen zur Folge, der in den Medien als Ozeanversauerung bezeichnet wird. Die Körpertemperatur von wechselwarmen Meeresorganismen folgt ihrer Umgebungstemperatur, so dass eine Meerreserwärmung auch eine Erhöhung der Körpertemperatur, der darin lebenden wechselwarmen Tiere zu Folge hat. Gemäß den Gesetzen der Thermodynamik erfordert dieses eine Erhöhung des Grundstoffwechsels in den Tieren, die somit erhöhte Kosten für ihren Routinestoffwechsel haben. Einfach gesagt, läuft bei höheren Temperaturen die Stoffwechsellaschinerie der Organismen schneller ab und erfordert mehr Energie. Den Organismen bleibt dadurch weniger Energie für Wachstum, Reproduktion und Aktivität, die sie z.B. zur Nahrungssuche und Jagd benötigen. Die erhöhten Grundkosten finden sich dabei auf der Zellebene mit ihren temperaturangepassten Enzymen, als auch auf organismsicher und systemischen Ebene wieder, wie der Organfunktionen z.B. bei der Verdauung, der Herz-Kreislaufatfähigkeit und bei Ventilation und des Gesamtsauerstoffverbrauchs vom Organismus. Im Falle der Ozeanversauerung kommen bei den schalenbeziehungsweise den kalkbildenden Organismen weitere energetische Kosten hinzu, da die Kalzifizierung bei erniedrigten pH erschwert wird.

Mit Hilfe der *in vivo* MR Bildgebung und Spektroskopie können Experimente zur Ozeanerwärmung und Ozeanversauerung simuliert werden, um Aussagen zu treffen, wie die Meeresorganismen in der Zukunft auf den Klimawandel reagieren werden. Wie die *in vivo* MR Bildgebung und Spektroskopie zu neuen Einsichten und Erkenntnissen zur Physiologie von Meeresorganismen im Klimawandel beitragen kann, soll im folgendem an einem Beispiel zur Temperaturtoleranz vom gemeinen Tintenfisch erläutert werden.

Der gemeine Tintenfisch *Sepia officinalis* gehört zu den Cephalopoden. Er kann bis zu 50 cm lang und 4 kg schwer werden. Sein Verbreitungsgebiet reicht von der nordafrikanischen Küste bis nach Süd-Norwegen und er kommt dabei in Tiefen von 10-200 m vor. Dabei kann er in einem Temperaturfenster von Wasser Temperaturen zwischen 10-25°C angetunden werden. Cephalopoden wie *Sepia officinalis* zeichnen sich durch besondere physiologische Eigenschaften aus. Sie besitzen 10 Arme (8 Greif- und 2 Fangarme) und haben ein hochentwickeltes visuelles System entwickelt, dass dem menschlichen Auge vergleichbar ist. Tintenfische schwimmen im Rückstoßverfahren, indem sie über den Mantelinnendruck schubweise Wasser ausstoßen. *Sepia officinalis* kann zusätzlich seinen Mantel/Flossensaum zum Bewegen und Manövrieren nutzen. Tintenfische ventilieren über ihren Mantelinnendruck, an der recht kostenintensive Art der Atmung, da im Prinzip der gesamte Körpermuskel an der Atmung beteiligt ist. Aufgrund des hohen Stoffwechsels haben Tintenfische daher auch ein komplexes Herz-Kreislaufsystem entwickelt. Neben dem systemischen Herzen besitzen sie noch zwei Kiemenherzen, die dafür sorgen, dass das sauerstoffreiche Blut im Körper verteilt wird. Zum Sauerstofftransport in der Hämolymphe nutzen Tintenfische Hämocyanin als Atmungspigment, ein Protein mit einem Porphyrinring, dass Kupfer als Zentralatom zur Sauerstoffbindung nutzt. Daher ist das sauerstoffreiche Blut von Tintenfischen auch blau. Hämocyanine sind die größten Proteine, die in der Natur gefunden werden können. Daher können sie auch nicht, wie im Falle von Hämoglobin, dem menschlichen Blutfarbstoff, in Zellen (unseren Erythrozyten) gepackt werden. Es existieren Tintenfisch-Hämocyanine, die bis zu 60 Sauerstoffmoleküle auf einmal binden und transportieren können!

Dieser Exkurs gibt vielleicht schon einen kleinen Eindruck über die faszinierenden Eigenschaften dieser außergewöhnlichen Tiere. In dem *in vivo* MR Experiment ging es nun darum, die Temperaturtoleranz des gemeinen Tintenfisch anhand vom Herz-Kreislaufsystem und dem Energiestoffwechsel im Mantelmuskel zu untersuchen.



Abb. 1: Spezielles Aquarium für Sepien

Sepien verstecken sich gern in kleinen dunklen Höhlen, diese Eigenschaft konnte ausgenutzt werden, so dass die Tiere während der MR Experimente nicht anästhesiert oder relaxiert werden mussten. Dazu wurde ein spezielles Aquarium für Sepien aus Plexiglas entwickelt, dessen Größe optimal für die Bohrung des Magneten angepasst und kontinuierlich mit temperierten und belüfteten Seewasser durchspült wurde (siehe Abbildung 1).

Nach einer angemessenen Eingewöhnungszeit für die Tiere im Magneten, in der Regel mindestens 6 Stunden, bei dem erste Kontrollmessungen durchgeführt wurden, konnte mit dem eigentlichen Experiment begonnen werden. Es wurden kontinuierlich im Wechsel Messungen zum Energiestoffwechsel mit Hilfe der ^3P -NMR Spektroskopie und der Herz-Kreislaufaktivität mit einer fluss-empfindlichen Gradienten-Echo MR-Bildgebung durchgeführt. Alle 6 Stunden wurde die Temperatur des Seewassers innerhalb von 3 Stunden um 3°C erhöht oder erniedrigt, und die temperaturinduzierten Veränderungen im Energiestoffwechsel und im Herz-Kreislaufsystem aufgenommen. Diese Messungen wurden in Experimenten in einem Temperaturbereich von 5°C bis zu 26°C durchgeführt, dabei verblieben die Tiere maximal 4 Tage im Magneten, um keine Nebeneffekte im Stoffwechsel durch Nahrungsmangel zu erzeugen.

Die Abbildungen 2A-H zeigen den zeitlichen Verlauf von axialen fluss-empfindlichen MR Schnittbildern, die so vor dem systemischen Herzen positioniert wurden, um den Blutfluss und die Koordination der Herzaktivität zu dokumentieren. Die hellen Punkte konnten dem Fluss in der Zentral-Arterie (CA) und der zentralen Vene (AVC), sowie dem efferenten und afferenten Fluss zu und von den Kiemenherzen zugeordnet werden.

Über die zeitliche Auswertung der Pixelintensitäten in den jeweiligen Bildregionen, in denen sich die Gefäße befanden, konnten so die Flussänderungen in den einzelnen Gefäßen ausgewertet werden. Die zeitliche Darstellung der Blutflussänderungen in Verbindung mit der Ventilationsaktivität (Abbildung 2I) verdeutlicht sehr schön, wie hoch-reguliert und koordiniert die drei Herzen mit der Zentralvene zusammenarbeiten, um die Blutversorgung durch den Körper der Tiere zu gewährleisten. Diese Dokumentation über das zeitliche Zusammenspiel des Herz-Kreislaufsystems in Kombination mit der Atmung in Tintenfischen war so vorher noch nicht möglich gewesen und macht das ungeheure Potential der MR Bildgebung für Untersuchungen an wasseratmenden Organismen deutlich.

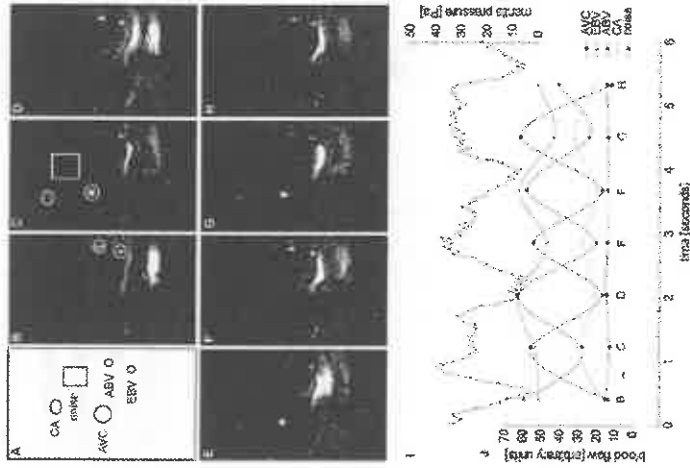


Abb. 2A-H zeigen den zeitlichen Verlauf von axialen fluss-empfindlichen MR Schnittbildern und die zeitliche Darstellung der Blutfluss Änderungen (I) in Verbindung mit der Ventilationsaktivität

Abbildung 3 fasst die Ergebnisse aus der *in vivo* ^3P -NMR Spektroskopie über die temperaturinduzierten Veränderungen im Energiestoffwechsel in *Sepia officinalis* zusammen. Abbildung 3A zeigt einen sogenannten „Stackplot“, verschiedener ^3P -NMR Spektren, die bei exemplarischen Temperaturen zwischen 5°C bis 26°C aufgenommen wurden. Die Signale in den ^3P -NMR Spektren können den energiereichen Phosphaten der Zelle zugeordnet werden. Dazu gehören wie bei allen Organismen die Signale der drei Phosphatgruppen des Hauptenergieträgers, das Adenosintriphosphat (α -, β - und γ -ATP). Das prominenteste Signal im ^3P -NMR Spektrum vom Mantel-Muskel bildet das Phosphagen, das zur schnellen Bereitstellung von ATP wie z.B. bei der Muskelaktivität dient. Bei den Wirbeltieren, wie uns Menschen, ist dies das Kreatinphosphat. Wie bei vielen Wirbellosen bildet im Falle der Tintenfische das Argininphosphat (PLA) die schnelle Energiereserve. Bei den hohen und niedrigen Temperaturen kann der Anstieg eines weiteren Signales in den Spektren beobachtet werden. Dieses Signal wird vom Abbauprodukt im Adenylat-Stoffwechsel, dem anorganischen Phosphat (P_i), erzeugt. Wie aus den Abbildungen 3B+C zu entnehmen, korreliert dieser Anstieg im anorganischen Phosphat mit dem

Rückgang im PLA Signal. Dies verdeutlicht, dass bei Temperaturen unterhalb von 10°C und oberhalb von 25°C die ATP-Versorgung nicht mehr allein durch die Atmung aufrechterhalten werden kann und PLA für die ATP-Produktion zur Verfügung gestellt werden muss. Aus der Position vom anorganischen Phosphat-Signal kann zu dem der intrazelluläre pH bestimmt werden (Abbildung 3D), der bei 26°C von erwarteten pH Verlauf abweicht und weiter abfällt. Diese verstärkte Ansäuerung des pH im Mantelmuskel ist ein weiterer Hinweis auf den Beginn von anaeroben energetischen Bedingungen.

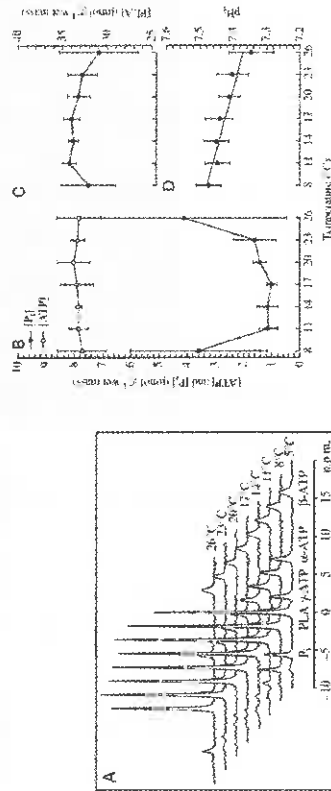


Abb. 3A: "Stackplot"

Abb. 3BCD: Ergebnisse aus der 31P-NMR Spektroskopie über die temperaturinduzierten Veränderungen im Energiestoffwechsel in *Sepia officinalis*

Die Aufrechterhaltung vom anaeroben Energiestoffwechsel ist zeitlich limitiert, ein längerfristiges Überleben bei diesen Temperaturen wäre für die Tiere nicht mehr gegeben. Dieser „Laborbefund“ kann auch erklären, warum der gemeine Tintenfisch in seinem Verbreitungsraum nur bei Temperaturen zwischen 10°-25°C angefundene wird. Hiermit kann also eine direkte Korrelation zwischen Laborexperiment und dem Verhalten der Tiere im Ökosystem gezeigt werden. Die Simulation (zukünftiger Umweltbedingungen wie des Klimawandels und die Untersuchung von deren Einfluss auf den Stoffwechsel von Meeresorganismen mit *in vivo* MR Experimenten erlaubt somit Aussagen über potentielle Veränderungen im Ökosystem. Im Falle vom gemeinen Tintenfisch bedeutet die Erwärmung der Ozeane, dass man diese Tiere in Gebieten, in denen die Wassertemperatur längerfristig über 25°C ansteigt, nicht mehr antreffen wird.

Dr. Christian Bock
 Alfred-Wegener-Institut, Helmholtz-Zentrum für Polar- und Meeresforschung, Bremerhaven
 Frank Melzner, Christian Bock, Hans-O. Pörner: J Comp Physiol B
 DOI 10.1007/s00360-006-0104-9, 2006
 Frank Melzner, Christian Bock, Hans-O. Pörner: J Exp Biol
 DOI:10.1242/jeb.02054



Ihre Ansprechpartner in Schleswig-Holstein

1. Vorsitzender:

Dr. Martin Nickol, M.A.
 Botanischer Garten der Universität Kiel
 24098 Kiel
 Tel.: 0431/880-4273
 Fax: 0431/880-4295
 mnickol@bot.uni-kiel.de

Schatzmeisterin:

N.N.



Ihre Ansprechpartner in Mecklenburg-Vorpommern

Vorsitzender:

PD Dr. Andreas Bick
 Universität Rostock
 Institut für Biowissenschaften
 Allgemeine & Spezielle Zoologie
 Universitätsplatz 2
 18051 Rostock
 Tel.: 0381/498-6267
 Fax: 0381/498-6262
 andreas.bick@uni-rostock.de

Landesbeauftragte für den KvF-Preis:

Prof. Dr. Carolin Retzlaff-Fürst
 Universität Rostock
 Institut für Biowissenschaften
 Fachdidaktik Biologie
 Universitätsplatz 4
 18055 Rostock
 Tel.: 0381/498-6190
 Fax: 0381/498-6262
 carolin.retzlaff-fuerst@uni-rostock.de



Ihre Ansprechpartner in Hamburg

1. Vorsitzender:

Dr. Martin Nickol, M.A., FLS
 Botanischer Garten der Universität Kiel
 24098 Kiel
 Tel.: 0431/880-4273
 Fax: 0431/880-4295
 mnickol@bot.uni-kiel.de

Kassenwartin:

Michaela Morlock
 In de Wisch 14
 22869 Schenefeld
 morlock.michaela@web.de

2. Vorsitzender:

Henning Jacobsen
 Grüner Deich 23
 20097 Hamburg
 Henning.Jacobsen@gmx.net