

Der Einfluß von Temperaturänderungen auf Enzyme der Fischmuskulatur. Versuche mit Goldorfen *Idus idus**

H. KÜNNEMANN, H. LAUDIEN und H. PRECHT

Zoologisches Institut der Universität Kiel (Lehrstuhl für vergleichende Physiologie und Tierpsychologie); Kiel, Germany

Abstract

*The influence of temperature changes on enzymes of fish muscles.
Experiments with golden orfs *Idus idus**

Succinate respiration and various enzyme activities were measured in the white dorsal muscles of golden orfs (gold-coloured race of *Idus idus* L.) adapted to different temperatures. Some of the values obtained on enzyme activities measured on successive days revealed significant differences in fish adapted to the same temperature. These differences could not be attributed to variations between experimental groups, nor to disturbances caused by the removal of some fish (Figs. 2 and 3). In adaptation experiments, attention must be paid to diurnal fluctuations in enzyme activity; such fluctuations were especially apparent with isocitrate-dehydrogenase. Season can also influence the level of enzyme activity, possibly through changes in day-length. Succinate respiration of golden orfs adapted to 5 °C is about 10% higher than in individuals adapted to 20 °C (experimental temperature 25 °C). Following reverse adaptation from 20° to 5 °C (at the rate of 5 °C/h), the values approach, after fluctuations, those of 5 °C individuals. After raising or lowering the adaptation temperature at the rate of 5 or 2 °C/h, fluctuations in several enzymes appeared initially, as in the abrupt transfers reported by LEHMANN (1970a); even if significant, these were, however, not always reproducible. Change in temperature causes a limited phase of increased functional lability.

Einleitung

Die Leistungswerte wechselwarmer Tiere (Sauerstoffverbrauch intakter Tiere, Organfunktionen, Zellstoffwechselprozesse usw.) hängen nicht nur von der Versuchstemperatur (VT) ab, sondern oft auch von der Vorbehandlungstemperatur (Adaptationstemperatur AT). Bei Versuchen mit intakten Tieren kann man messen: (1) Die Abhängigkeit des Stoffwechsels von der VT (bei konstanter AT). (2) Die Abhängigkeit von der AT (bei konstanter VT). (3) Die Stoffwechsellistung, wenn die VT stets der jeweiligen AT entspricht. (4) Die Stoffwechsellistung unterschiedlich adaptierter Tiere jeweils bei verschiedenen VTs. Die letzte Methode wird wegen des größten Aussagewertes der Befunde bevorzugt. Durch dieses Verfahren werden die nach den ersten 3 Methoden gewonnenen Kurven miterfaßt. Es erlaubt z. B. eine Entscheidung darüber,

ob gewisse Konstanzbereiche der Abhängigkeitskurven mit niedrigen Q_{10} -Werten durch eine Leistungsadaptation zustandekommen oder nicht.

Einem Q_{10} -Wert = 1 der AT = VT-Kurven kann eine Leistungsadaptation nach Typ 2 oder auch eine einfache VT-Abhängigkeit (einfache Reaktionen; "direct responses" im Sinne von PROSSER, 1967) zugrundeliegen (oder auch eine Regulation; PRECHT, 1968). Ein Q_{10} -Wert > 1 kann für eine Adaptation nach den Typen 3 oder 5 sprechen oder fehlende Adaptation (Typ 4) bedeuten. Q_{10} -Werte < 1 können wiederum durch eine Leistungsadaptation (Typ 1) zustandekommen oder durch einfache Reaktionen (vgl. z. B. WIESER und NOPP-PAMMER, 1968). Weitere Komplikationen treten auf, wenn sich die VT-Kurven schneiden (vgl. z. B. PRECHT, 1968, Abb. 2). Bloße AT = VT-Kurven (Methode 3) sind somit recht eindeutig (vgl. auch FREY *in*: DILL et al., 1964)¹.

Das dritte Verfahren ist das einzige, bei dem Temperaturänderungen vor den Messungen vermieden werden und somit auch damit zusammenhängende Störeffekte. Es handelt sich dabei um vorübergehende, sich aber doch über Tage erstreckende Nachwirkungen der Temperaturänderungen; kurzfristige over- und undershoots, deren Abklingen man vor den Messungen abwarten kann, sollen außer Betracht bleiben. Auch Temperaturänderungen im „normalen“ Bereich können wahrscheinlich als Streß wirken und zu Störungen führen. Nach HUGGEL et al. (1963) gilt dies bereits für das Einsetzen der Versuchstiere (Fische) in die Apparatur, das zu einem Anstieg des Na- und Cl-Gehaltes des Blutes führt. Karpfen zeigten im Anschluß an eine stärkere, 1 bis 10 min dauernde Störung (verbunden mit erhöhter Muskeltätigkeit) fortdauernde

¹ Temperaturkoeffizienten (Q_{10} -Werte) sollte man eigentlich im Sinne von VAN'T HOFF nur für chemische Reaktionen und vergleichbare physiologische Reaktionen angeben, doch ist oft schwer zu entscheiden, ob bei einer Abhängigkeitskurve von der VT (bei konstanter AT) auch Regulationen beteiligt sind; AT = VT-Kurven sind, wie erwähnt, ohne zusätzliche Untersuchungen kaum zu analysieren. Wegen dieser Unsicherheiten sprechen viele Autoren von Temperaturkoeffizienten nicht nur im oben erwähnten engeren Sinne, sondern berechnen Q_{10} -Werte für alle anfangs erwähnten Abhängigkeitskurven von der Temperatur.

* Herrn Prof. Dr. Dr. h. c. W. HERRE zum 60. Geburtstag gewidmet.

Aktivitätssteigerungen der GOT (siehe unten) und Glutamat-Pyruvat-Transaminase in Muskel, Leber und Blutplasma (PORA et al., 1968).

Auch der Spiegel an Cortisol kann im Blutplasma der Fische durch eine Beunruhigung ansteigen (FAGERLUND, 1967, vgl. HANE et al., 1966, WEDEMEYER, 1969).

Ändert man bei Fischen nach einer längeren Anpassung die Wassertemperatur, so hat dies Veränderungen der ionalen Zusammensetzung der Gewebe zur Folge (Literatur bei MEINCKE, 1970), ferner Schwankungen des Gehalts an Aminosäuren (BASLOW in: PROSSER, 1967) und solche vieler Fermentaktivitäten und des RNS-Gehalts (siehe unten) des Muskelgewebes (LEHMANN, 1970b); im Gegensatz zu diesen nach Abklingen der Streßsituation vorübergehenden Veränderungen stehen die bleibenden im Vollzug der Leistungsadaptation. LEHMANN verfolgte eine Woche lang die Enzymaktivitäten im Seitenrumpfmuskel von Goldfischen nach einem plötzlichen Wechsel der AT ($15^{\circ} \rightarrow 5^{\circ}\text{C}$). Kurz nach der Änderung der Temperatur traten (besonders deutlich nur bei den abgebildeten Werten) Schwankungen der Aktivitäten auf; zwischen der 48. und 72. Std wurden die Werte gleichmäßiger. Am Ende des Versuchs war im allgemeinen die Höhe der zu erwartenden Aktivitäten der langfristig an 5°C adaptierten Fische noch nicht erreicht. Ein weiterer Versuch mit kurzfristiger Abkühlung der Goldfische ($15^{\circ} \rightarrow 0,5^{\circ} \rightarrow 15^{\circ}\text{C}$) ergab zum Teil ähnliche Aktivitätsveränderungen (Unterschiede zeigten sich vor allem bei den NADP-abhängigen Dehydrogenasen).

Diese bisher kaum beachteten Erscheinungen, deren Erforschung für die Durchführung von exakten Messungen der Temperaturabhängigkeit von Lebensprozessen nach allgemein angewandten Methoden wichtig ist, sollen an Fermentaktivitäten der weißen Rumpfmuskulatur zweier Fischarten fortgeführt werden; es handelt sich um den Bitterling (*Rhodeus amarus* BLOCH; BRAUN et al., 1970) und in den hier mitgeteilten Versuchen um die Goldorfe (*Idus idus* L.), die goldgefärbte Zuchtform der Silberorfe (auch Nerfling oder Aland genannt).

Ein Streß wird um so stärker wirken, je größer der Temperatursprung ist und je schneller er durchgeführt wird. Da die sehr wirksamen plötzlichen Temperaturwechsel von LEHMANN (1970b) aber in der Natur selten vorkommen dürften, haben wir bei den meisten Versuchen die AT in einer Geschwindigkeit von $2^{\circ}\text{C}/\text{Std}$ erhöht bzw. erniedrigt (ausgehend von den ATs 7° und 21°C) und nur in einigen Kontrollversuchen eine schnellere Temperaturänderung (in 3 Std) durchgeführt. Am deutlichsten müßte sich eine Streßwirkung bei solchen Fermentaktivitäten zeigen, die nicht noch zusätzlich durch eine Leistungsadaptation verändert werden.

Ein Temperaturwechsel des Gewebeextrakts hat im allgemeinen wohl keine Nachwirkungen auf die

Enzymaktivitäten; man pflegt diese bei relativ hohen VTs zu messen, nachdem man den gewonnenen Extrakt zur Erhöhung der Haltbarkeit bei tiefen Temperaturen aufbewahrt. Die Frage, ob es vergleichbare Nachwirkungen gibt, wenn nicht die intakten Tiere, sondern überlebende Organe oder gar gezüchtete Gewebe einem Temperaturwechsel ausgesetzt werden, ist noch nicht bearbeitet worden.

BASLOW (in: PROSSER, 1967) erhielt bei seinen schon erwähnten Untersuchungen an Fischen sehr schwankende Kurven. Auch wir stießen auf ähnliche Schwierigkeiten. Da die Messung von Enzymaktivitäten zu den gängigsten Methoden der Biochemie gehört, haben wir dem Problem der Reproduzierbarkeit der Meßwerte besondere Beachtung geschenkt.

Gebrauchte Abkürzungen: AT (Adaptationstemperatur), ATP (Adenosintriphosphat), EDTA (Äthylen-diamintetraacetat), GAPDH (Glyceraldehyd-3P-Dehydrogenase), GOT (Glutamat-Oxalacetat-Transaminase), G6PDH (Glucose-6P-Dehydrogenase), ICDH (Isocitrat-Dehydrogenase), I.E. (internationale Einheiten), KT (Kurztag), LDH (Laktat-Dehydrogenase), LT (Langtag), MDH (Malat-Dehydrogenase), ME (malic-enzyme), NADH (Nikotinamid-adenin-dinukleotid, reduzierte Form), NADP⁺, NADPH (Nikotinamid-adenin-dinukleotid-phosphat, oxidierte und reduzierte Form), 3-PGS (3-Phosphoglycerinsäure), PK (Pyruvat-Kinase), RNS (Ribonukleinsäure), SDH (Succinat-Dehydrogenase), TIM (Triosephosphat-Isomerase), VT (Versuchstemperatur).

Material und Methodik

Tiermaterial

Die noch nicht geschlechtsreifen Orfen *Idus idus* L. (Länge 5 bis 7 cm, Gewicht 3 bis 4 g) stammten von einer Zuchtanstalt in Hohenwestedt, die der Abb. 6b von einem Züchter aus Solingen. Alle Fische hielten wir mindestens 6 Wochen vor Beginn der Versuche in Hälterungsbecken von 150 l Inhalt bei durchströmendem Leitungswasser und zusätzlich guter Belüftung, und zwar stets unter Langtagsbedingungen (16 Std Belichtung, ohne Temperaturregulierung). Die lange Eingewöhnungszeit genügte, um Krankheiten der Tiere erkennen zu können. Als Futter benutzten wir Vitakraft-Teichfutter und lebende Tubificiden.

Temperaturanpassung

Zur Anpassung an die verschiedenen ATs hielten wir die Fische in 30 bis 60 l fassenden Becken für mindestens 2 und nicht länger als 4 Wochen (gute Durchlüftung, durchströmendes Leitungswasser). Die bei tiefen Temperaturen gehaltenen Versuchstiere nahmen allerdings kaum Nahrung auf, was eine Leistungsadaptation nach Typ 5 vortäuschen oder eine Kompensation ausgleichen kann (WIESER, 1963),

doch stand die Untersuchung der Leistungsadaptation bei unseren Versuchen nicht im Vordergrund.

Präparation der Gewebe

Unter Vermeidung allzu großer Beunruhigung haben wir die Tiere aus dem Adaptationsbecken gefangen und sofort dekapitiert. Schnitte entlang der Seitenlinien ermöglichten ein Abziehen der Haut und der Rückenflosse mit der roten Muskulatur. Der nun freiliegende weiße Rückenmuskel wurde abgetrennt und für die Versuche im Warburgapparat auf eisgekühlter Glasplatte zu Schabebrei verarbeitet. Für die Enzymbestimmungen im optischen Test setzten wir dem Rückenmuskel im Verhältnis 1:11 (Gewicht/Volumen) Phosphatpuffer (100 mM K-Na-Phosphat, 2 mM EDTA, pH 7,3) zu und homogenisierten im Eisbad 6×20 sec in jeweils 2 minütigem Abstand mit dem Ultra Turrax (Fa. Janke und Kunkel). Das Homogenat wurde 20 min bei $30.000 \times G$ in der Kühlzentrifuge Zeta 20 zentrifugiert (Fa. Heraeus-Christ). Den schwach gelb gefärbten Überstand setzten wir, eventuell nach zweiter Verdünnung, in den Test ein. Die Succinatdehydrogenase bestimmten wir im unzentrifugierten Homogenat.

Bestimmung der Succinatatmung im Warburg-Apparat

Das Atmungsmedium (3 ml in ca. 15 ml-Warburg-trögen; 0,2 ml 20% NaOH im Mittelstutzen) enthält: 75 mM Na-succinat als Substrat, 25 mM Phosphatpuffer pH 7,4, 100 mM Saccharose und 0,5 mM CaCl_2 . Die angegebene Substratkonzentration liegt ausreichend weit über der Sättigungskonzentration und nicht im Hemmbereich. Auch bei der Wahl der Molarität des Puffers, der Saccharose und des Calciums prüften wir in Vorversuchen, ob die gewählten Konzentrationen eine optimale Oxydation des Na-Succinats erlaubten. Dieses Medium ist etwa isotonisch mit dem Fischblut.

Möglichst schnell nach der Präparation wurde der Schabebrei (pro Warburgtrog ca. 100 mg) in die vorher gewogenen und gekühlten Tröge eingegeben und durch Rückwägung die Einwaage bestimmt. Eine endogene Atmung war nur in den ersten 10 min festzustellen. Bei der Auswertung wurden diese anfänglichen Werte vernachlässigt und die Atmung bis zur 30. Min berücksichtigt (MALESSA, 1969). In unseren Versuchen blieb der Sauerstoffverbrauch nach dem Abklingen der endogenen Komponente etwa bis zum Ende der 2. Std konstant, um dann langsam abzufallen.

Bestimmung der Enzymaktivitäten

Die Bestimmung der Enzymaktivitäten erfolgte nach der Methode des optischen Tests. Die Extinktionsänderung ΔE_{366} wurde mit einem Eppendorf-

Photometer (Fa. Netheler und Hinz) gemessen und von einem Kompensationsschreiber (Fa. Philips) mit Linearisierungsglied (Fa. Netheler und Hinz) aufzeichnet. Es fanden Küvetten von 1 cm Schichtdicke Verwendung. Die Aktivität wird in μMol Substrat-

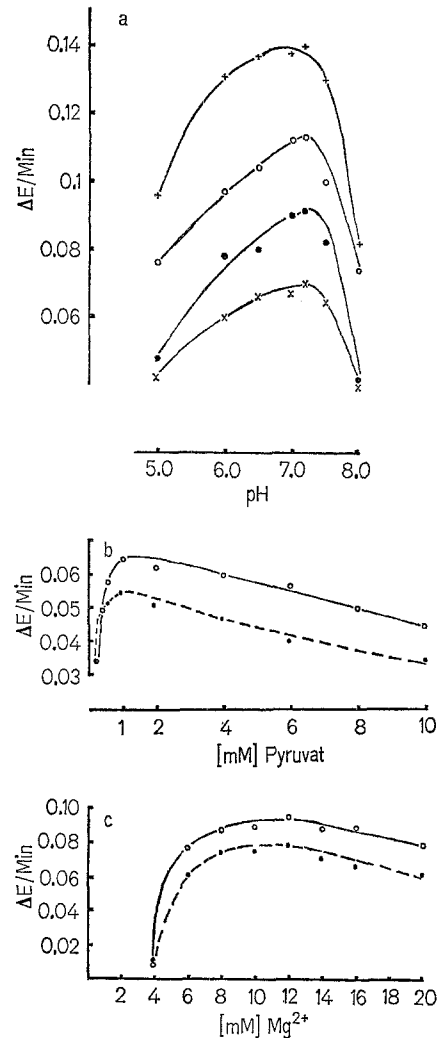


Abb. 1. *Idus idus*. Prüfung eines möglichen Einflusses der Adaptationstemperatur auf die Enzymtestzusammensetzung. (a) Einfluß des pH; (b) der Pyruvatkonzentration beim Test der Laktat-Dehydrogenase (LDH) — ATs 20 °C (+, O) und 5 °C (x, ●); (c) Einfluß der Magnesiumkonzentration beim Test der NADP^+ -abhängigen Isocitrat-Dehydrogenase — ATs 20 °C (O) und 5 °C (●). Jeder Kurve liegt der Extrakt eines Fisches zugrunde. Ordinate: Extinktionsänderung pro min

umsatz/Min und Gramm Frischgewicht angegeben (Internationale Einheiten, I.E.). Alle verwendeten Chemikalien waren von p.a.-Qualität und stammten von Fa. Merck, Darmstadt und Fa. Boehringer, Mannheim.

Bei der Zusammenstellung der Enzymtests legten wir die Angaben von BÜCHER et al. (1964) zugrunde. Um diese Vorschriften an unser Versuchstier anzupassen, prüften wir den Einfluß verschiedener pH-Werte, Substrat-, Cosubstrat- bzw. Aktivator-Konzentrationen. Bei einem Teil der Enzymtests konnten die angegebenen Konzentrationen übernommen werden, notwendige Veränderungen bei anderen sind in Klammern angegeben: (1) Laktat-Dehydrogenase, LDH (E.C. 1.1.1.27) (Phosphatpuffer 50 mM, Pyruvat 1 mM, pH 7,2); (2) Malat-Dehydrogenase, MDH (E.C. 1.1.1.37); (3) "malic enzyme", ME (E.C. 1.1.1.38); (4) Isocitrat-Dehydrogenase, ICDH (E.C. 1.1.1.42) (Phosphatpuffer 50 mM, NADP⁺ 0,4 mM, MgSO₄ 12 mM, d-Isocitrat 0,48 mM, pH 8,0); (5) Glucose-6P-Dehydrogenase, G6PDH (E.C. 1.1.1.49) (Phosphatpuffer 50 mM, pH 8,0); (6) Glyceraldehyd-3P-Dehydrogenase, GAPDH (E.C. 1.2.1.12) (ATP 4 mM, 3-PGS 14 mM); (7) Succinat-Dehydrogenase, SDH (1.3.99.1) (nach SLATER, 1964; $\lambda = 405$ nm); (8) Glutamat-Oxalacetat-Transaminase, GOT (E.C. 2.6.1.1); (9) Pyruvat-Kinase, PK (E.C. 2.7.1.40); (10) Triosephosphat-Isomerase, TIM (E.C. 5.3.1.1).

Für jedes Enzym wurde durch Einsetzen verschiedener Homogenatmengen der Bereich ermittelt, in dem Proportionalität zwischen Aktivität und Enzymkonzentration vorlag.

In Abb. 1 sind als Beispiel einige Versuche dargestellt, die zeigen sollen, daß es nicht nötig war, für die Enzymbestimmung in Geweben unterschiedlich adaptierter Orfen verschiedene Testzusammensetzung zu wählen (LDH-Test: Pyruvat stets 1 mM, vgl. jedoch WINER und SCHWERT, 1958).

Ergebnisse

Gleichbleibende Adaptationstemperatur

Wirkung von Außeneinflüssen auf die Enzymaktivität

Es mußte zunächst geklärt werden, ob eine bestimmte Enzymaktivität einer gegebenen AT zugeordnet werden kann, oder ob schon geringfügig erscheinende Außeneinflüsse eine Veränderung bewirken. Um diese Frage zu prüfen, haben wir langfristig in 2 nebeneinanderstehenden Aquarien bei 20 °C gehaltene Orfen immer wieder zur gleichen Tageszeit untersucht. Auf diese Weise sollte ermittelt werden, ob Außeneinflüsse, die sich in beiden Becken hätten bemerkbar machen müssen, die Enzymaktivitäten beider Fischgruppen gleichsinnig ansteigen oder abfallen lassen. Es ergaben sich zum Teil starke Schwankungen der Aktivität; ein paralleler Kurvenverlauf ist aber nicht erkennbar (Abb. 2). Die Veränderungen von Tag zu Tag können also nicht auf Außenfaktoren zurückgeführt werden, die auf die Fische beider Becken gleichsinnig einwirkten.

Durch eine gleichzeitig ausgeführte Meßreihe versuchten wir weiterhin zu klären, ob ein Herausfangen

von Fischen die Zurückbleibenden derart beunruhigt, daß es zu einer Veränderung der Enzymaktivität kommt. Dieser Effekt müßte um so stärker werden, je öfter man die Fische beunruhigt.

Als Meßergebnisse gestörter Tiere haben wir die oben beschriebenen Versuche angesehen und dazu Vergleichsexperimente mit solchen Fischen durchgeführt, die wir für jeden Versuchstag gesondert in einem kleinen Becken hielten. Alle Aquarien mit der AT 20° bzw. 21 °C wurden mit Wasser aus derselben Vorwärmwanne versorgt, in der das Leitungswasser auf die geforderte Temperatur aufgeheizt wurde. In Abb. 2 sind diese Versuche mit eingezeichnet. Es ergab sich kein wesentlicher Unterschied zu den gemeinsam gehaltenen Fischen. Daher dürfen wir annehmen, daß das Herausfangen von Versuchstieren die Meßwerte des folgenden Tages nicht beeinflußt.

Veränderungen der Enzymaktivität im Laufe eines Tages

Bei den oben beschriebenen Versuchen haben wir die Fische stets zur selben Tageszeit getötet und bald danach die Enzymaktivität bestimmt. Bei Umadaptationsversuchen kann es aber wesentlich sein, in schneller Folge Messungen vorzunehmen, z. B. alle 6 Std. Es besteht dann die Möglichkeit, daß tageszeitabhängige Veränderungen den Vorgang der Umadaptation überlagern und die Meßergebnisse verfälschen, da derartige Einflüsse auf Enzymaktivitäten bekannt sind und sogar für die Form und Anzahl der Mitochondrienchristae nachgewiesen wurden (KÖNITZ, 1965, vgl. MAYERSBACH und YAP, 1965; MÜLLER et al., 1966; RENSING in: BIRUKOW und RENSING, 1967; RAO und GOVINDAPPA, 1967; HARDELAND und RENSING, 1968; HARDELAND, 1969). In Tabelle 1 ist als Beispiel die ICDH dargestellt. Es zeigt sich, daß bei diesem Enzym die 8.00 Uhr-Werte über den 20.00 Uhr-Werten liegen. Bei anderen Enzymen war diese tagesperiodische Abhängigkeit nicht so deutlich erkennbar.

Veränderungen der Enzymaktivitäten bei täglichen Messungen

Aus Abb. 2 geht weiterhin hervor, daß relativ starke Schwankungen von Tag zu Tag zu messen sind, die zum Teil so groß sind, daß sich signifikante Unterschiede ergeben. Sie verlaufen bei verschiedenen Enzymen in unterschiedliche Richtungen, und zwar auch bei den sogenannten proportionskonstanten Gruppen (PETTE, 1965). In unseren Versuchen bleibt die Enzymaktivität in aufeinanderfolgenden Tagen wohl in der gleichen Größenordnung, aber nicht auf dem gleichen Wert, wie es auch von PETTE et al. (1962) für verschiedene Enzyme angegeben wird (vgl. KELLER, 1965).

Beim Vergleich der Ergebnisse von Fischen aus verschiedenen ATs kann deren Einfluß nur ermittelt

Tabelle 1. *Idus idus*. Tagesperiodische Änderungen der Aktivität der Isocitrat-Dehydrogenase. Versuchszeit Januar, 1970, Signifikanzgrenze bei $P < 0,05$, S: signifikant; NS: nicht signifikant

1. Tag	8.00	4,91 ± 0,4	S	NS
	20.00	3,60 ± 1,0		
2. Tag	8.00	5,70 ± 0,3	S	NS
	20.00	2,70 ± 0,3		
3. Tag	8.00	5,00 ± 0,3	S	NS
	20.00	3,56 ± 0,4		

werden, wenn man außer der Signifikanzkontrolle auch darauf achtet, ob die Ergebnisse reproduzierbar sind. Aus diesem Grunde haben wir Orfen bei 21° und bei 7 °C über längere Zeit gehalten und dann gleichzeitig untersucht (Abb. 3). Ein deutlicher Adaptationseffekt zeigt sich nur bei der ICDH, und zwar an 9 von 10 Versuchstagen. Am 7. Tag war zwischen den beiden Fischgruppen kein Unterschied zu bemerken. Auch LEHMANN (1970a) fand zwischen ähnlichen Adaptationstemperaturen (8° und 21 °C) bei den Enzymen TIM, GAPDH und G6PDH keine Aktivitätsunterschiede, eine deutliche Differenz bei der ICDH und zusätzlich bei der LDH.

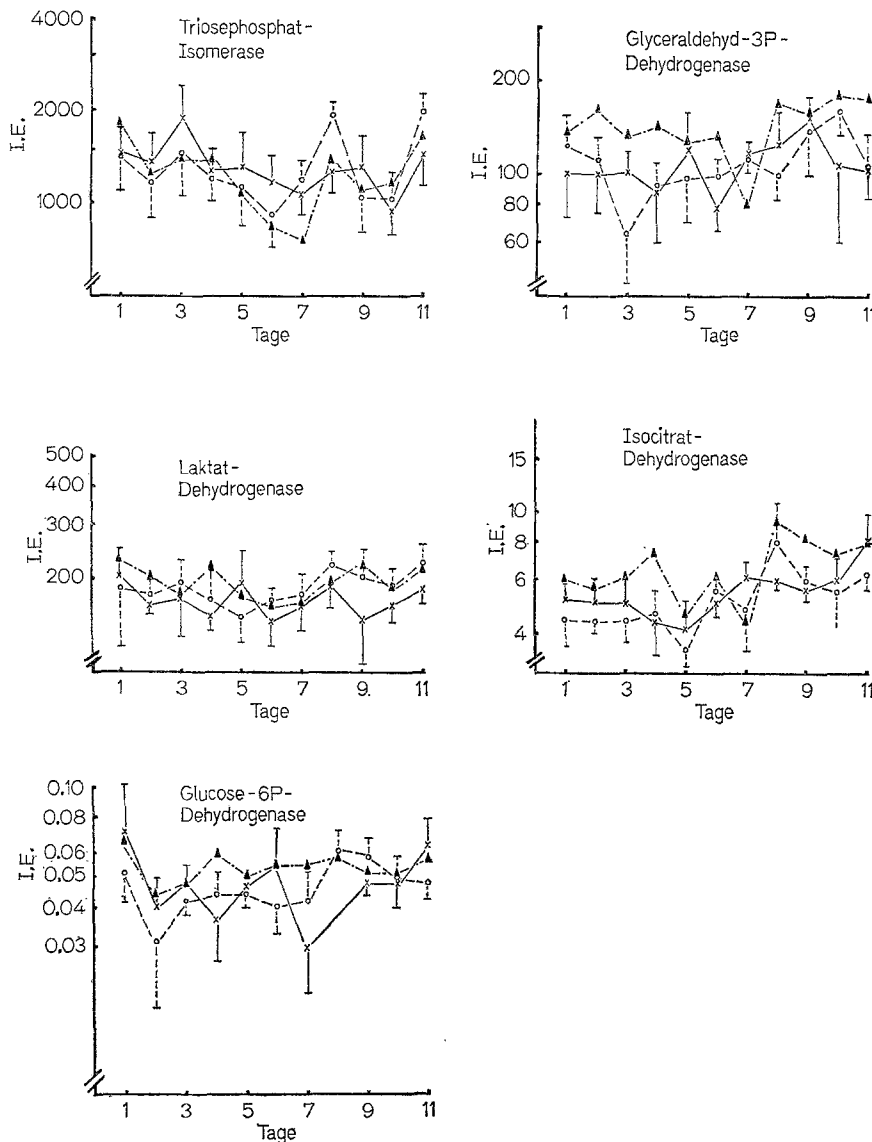


Abb. 2. *Idus idus*. Die Aktivitäten fünf verschiedener Enzyme in internationalen Einheiten (I.E.) bei täglichen Messungen, AT = 21 °C. Fische aus Aquarium I (x—x), aus dem benachbarten Becken II (o—o), alle Fische eines Beckens gleichzeitig verwendet (▲—▲). Jedem Meßpunkt liegen 6 Versuche mit 6 Individuen zugrunde. Eingezeichnet sind (wie bei allen Abbildungen) die mittleren Fehler der Einzelmessungen. Weitere Erklärungen im Text

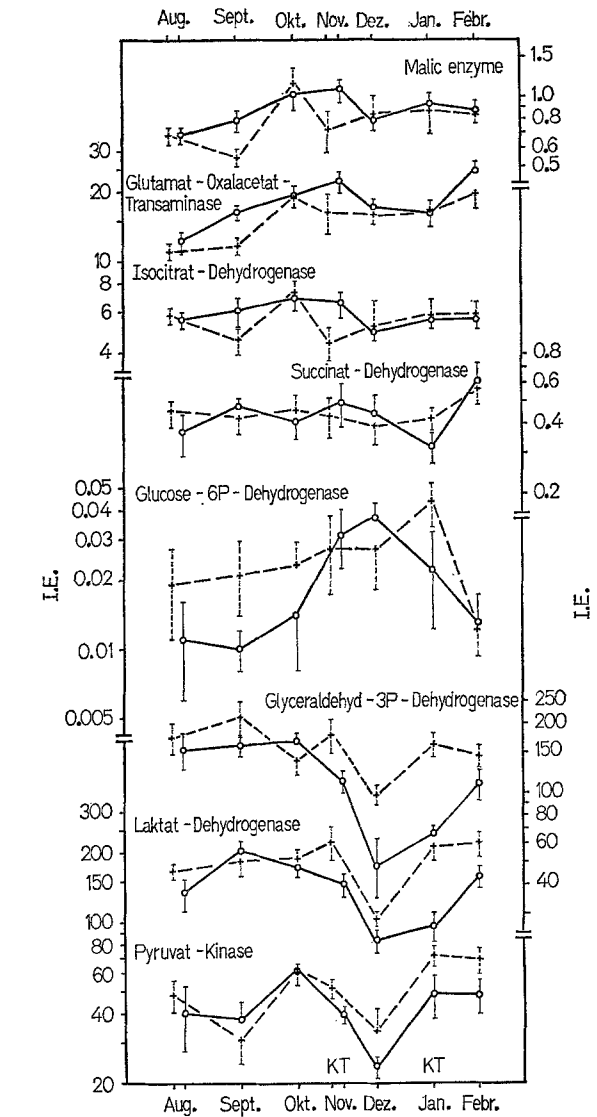
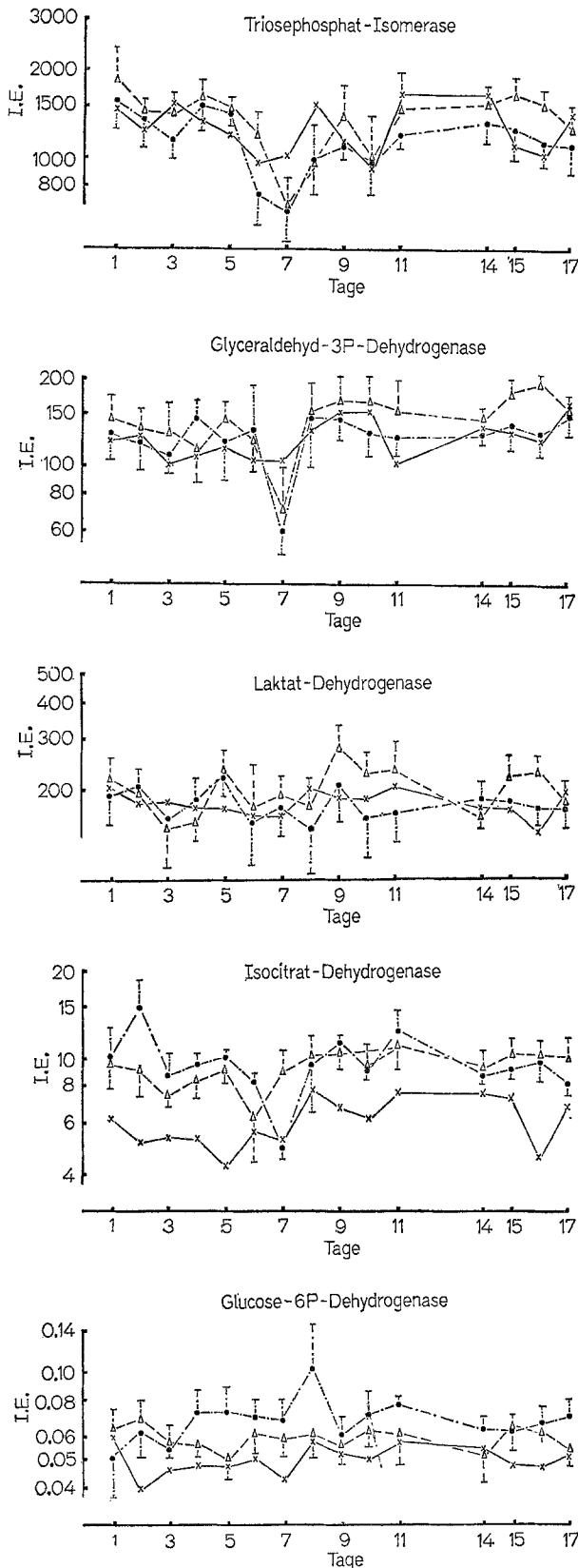


Abb. 4. *Idus idus*. Veränderungen der Enzymaktivität bei monatlichen Messungen und Einfluß der Photoperiode. ATs 7°C (○—○) und 21°C (+—+). Bei den mit KT bezeichneten Versuchen herrschten während der Adaptation Kurztags-, bei den übrigen Versuchen Langtagsbedingungen. Steht links (rechts) der Enzymname an der Kurve, dann gilt die linke (rechte) Ordinate. Angaben in internationalen Einheiten (I.E.). Weitere Erklärungen im Text

Abb. 3. *Idus idus*. Einfluß der Adaptationstemperatur auf die Aktivitäten (in internationalen Einheiten, I.E.) von 5 verschiedenen Enzymen. AT = 21°C (×—×), 18 Versuche pro Meßpunkt; AT = 7°C (●—●), 6 Versuche pro Meßpunkt; Umadaptation 21° → 7°C (▲—.—▲), Temperaturwechsel mit 2°C/Std in der Nacht vor dem ersten Versuchstag, 6 Individuen pro Meßpunkt

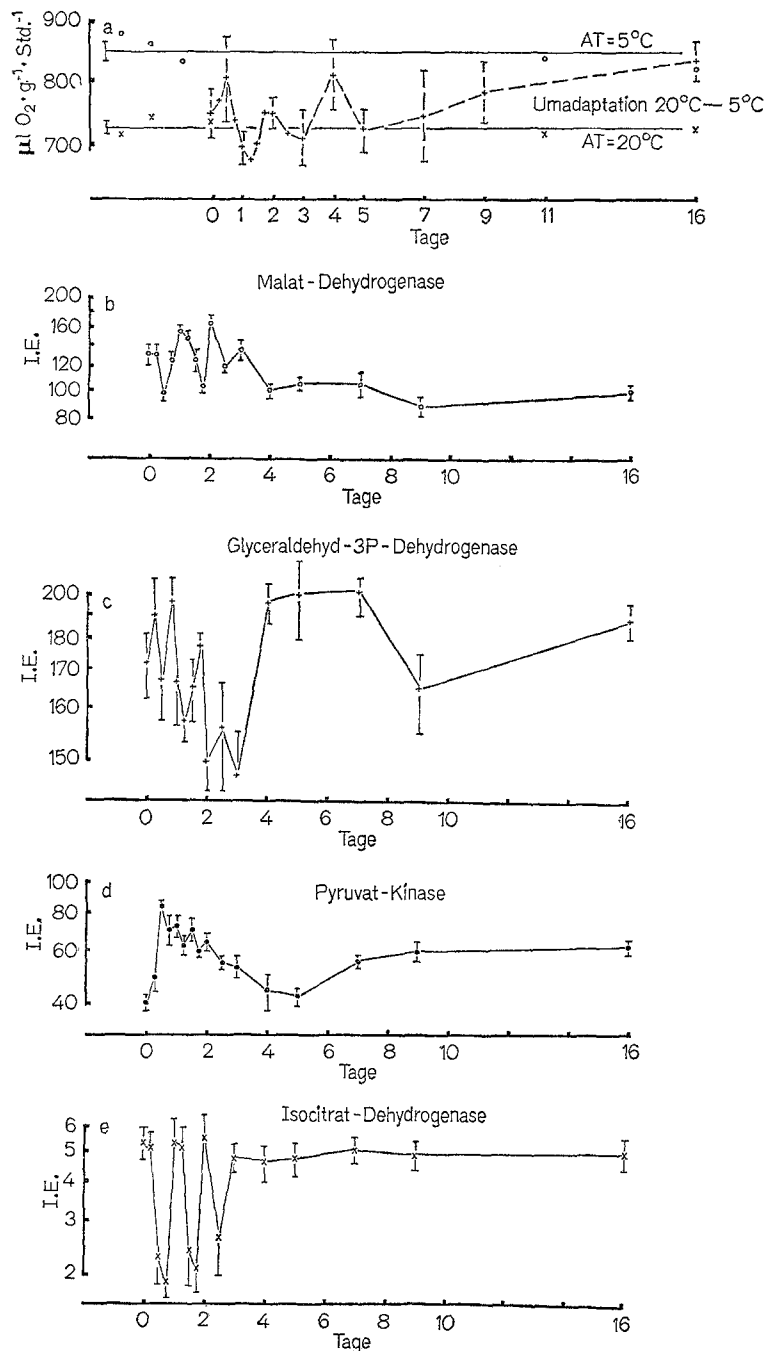


Abb. 5. *Idus idus*. Umadaptation von AT 20° → 5°C (Temperaturwechsel in 5°C/Std). (a) Succinatatmung: + — + Umadaptation; ○ langfristig an 5°C, × an 20°C angepaßte Individuen (die eingezeichneten Meßpunkte ○ und × wurden gemittelt und als Strich dargestellt). (b) bis (e) Aktivitäten von vier verschiedenen Enzymen in internationalen Einheiten (I. E.), 6 Individuen pro Meßpunkt

Veränderungen der Enzymaktivität bei monatlichen Messungen und der Einfluß der Photoperiode

Um jahreszeitliche Einflüsse zu erfassen sind 8 Enzyme der weißen Seitenrumpfmuskulatur von Fischen aus Hohenwestedt über einen längeren Zeitraum gemessen worden (ATs 7° und 21°C). Die Fische

der ersten Kurvenpunkte (Abb. 4) erhielten wir am 17. Juli, der zweiten am 24. August, der dritten am 9. Oktober und die Fische der weiteren Versuche, bei denen diese im Gegensatz zu allen anderen nicht bei Langtag, sondern bei Kurztag (8stündige Belichtung) gehältert wurden, am 1. November, 68. Während

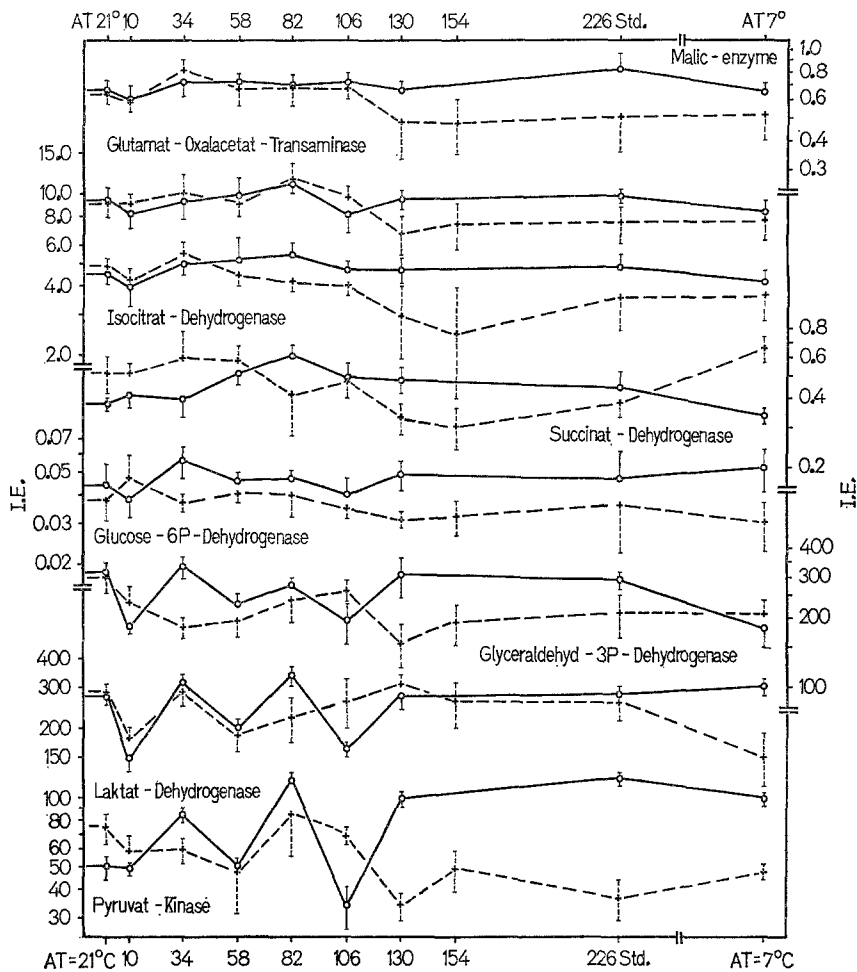


Abb. 6. (a) *Idus idus*. Umadaptationen (Temperaturwechsel in 2 C°/Std). AT 21° → 7°C (Versuchszeit ○ — ○ Juli, + — + Oktober). Steht links (rechts) der Enzymname an der Kurve, dann gilt die links (rechts) stehende Ordinate. Angaben in internationalen Einheiten (I. E.)

der Anpassung in den AT-Becken herrschten für die Letztgenannten weiterhin Kurztags- (KT) oder (3¹/₂ Wochen) Langtagsbedingungen (LT). Für den Jahresvergleich unter gleichen (im Winter allerdings unnatürlichen) Bedingungen entfallen somit die mit KT markierten Punkte.

Abb. 4 zeigt bei einigen Enzymen (GOT, GAPDH, LDH, PK) einen stärkeren zeitlichen Einfluß, bei den anderen einen geringeren. Auch der Adaptationseffekt kann zeitlich anscheinend verschieden sein, z. B. bei der LDH. Der Einfluß der Photoperiode ist aus Abb. 4 schwer erkennbar, da sich bereits Änderungen der Aktivitäten von Monat zu Monat zeigen und die Versuche mit Kurztags- und Langtagsvorbehandlung etwa monatlich abwechseln (die letzten 4 Kurvenpunkte). Oft fehlt ein solcher Einfluß offensichtlich. Eine Regelmäßigkeit läßt die Meßwerte der Kurztag-

tiere stets höher liegen als die der vorher bei Langtag gehaltenen. Bei der SDH z. B. zeigt sich weder ein Einfluß der Photoperiode, noch ein solcher der AT.

Umadaptationsversuche

Succinatatmung

Die Wirkung einer relativ schnellen Temperaturänderung (20° → 5°C in 3 Std am Vormittag des ersten Tages) ist in Abb. 5 dargestellt. Die Messungen im Warburgapparat (Abb. 5a) erfolgten anfangs alle 6 Std (Beginn 8.00 Uhr), später in größerem Abstand. Langangepaßte Fische zeigen eine deutliche Leistungsadaptation: Die an 5°C adaptierten Individuen haben eine um etwa 10% höhere Succinatatmung als die an 20°C angepaßten (VT 25°C). Bei der Umadaptation 20° → 5°C nähern sich die Werte nach anfänglichen Schwankungen denen der AT 5°C-Fische.

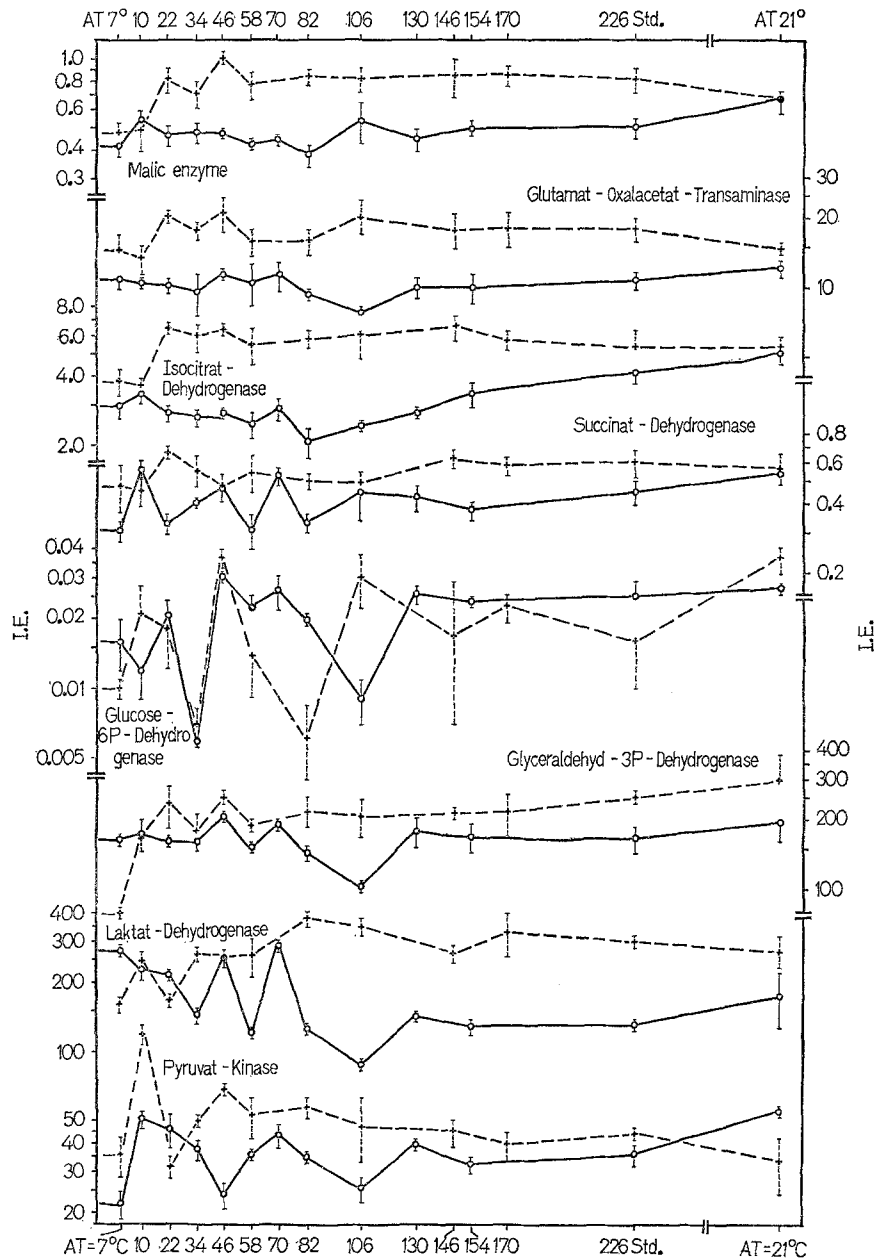


Abb. 6. (b) *Idus idus*. Umadaptationen (Temperaturwechsel in 2°C/Std). AT 7° → 21°C (Versuchszeit ○ — ○ Februar, + — + Mai). Steht links (rechts) der Enzymname an der Kurve, dann gilt die (links (rechts) stehende Ordinate. Angaben in internationalen Einheiten (I. E.)

Enzymaktivitäten

Änderung der AT um 5°C pro Std. Parallel zu den Warburg-Messungen haben wir die Aktivitäten der Enzyme MDH, PK, GAPDH und ICDH desselben Tiermaterials gemessen, indem ein Teil des Schabebräus (p. 73) zum Homogenisieren mit dem Ultraturrax eingesetzt wurde. Bei der MDH, PK und GAPDH (Abb. 5b, c, d) treten, besonders gleich nach dem Temperaturwechsel, größere Abweichungen auf. Tagesperiodische Änderungen finden sich besonders bei der ICDH (Abb. 5e), wie sie auch für andere En-

zyme bekannt sind. Im diesem Versuch zeigte sich eine geringere Leistungsadaptation der ICDH als in den Versuchen der Abb. 3. Dies ist ein Hinweis für die Vermutung, daß es eine untere Grenze für die Leistungsadaptation gibt, die oft auf einen artgemäßen Bereich beschränkt ist (PRECHT, 1968).

Änderung der AT um 2°C pro Std. Die Wirkungen der Änderung der AT in 2°C/Std sind in Abb. 3a—d (21° → 7°C), Abb. 6a (21° → 7°C) und Abb. 6b (7° → 21°C) dargestellt. In Abb. 6a, b sind links die Ausgangswerte langfristig angepaßter (und bei Lang-

tag aufbewahrter) Fische angegeben, rechts die Endwerte von langfristige an die neue AT angepaßten Individuen aus dem gleichen Material. Die Fische zeigten, äußerlich betrachtet, keine Beunruhigung durch den Temperaturwechsel. Die gleichmäßige Temperaturänderung mit Hilfe eines Thermosistors mit Programmgeber (Fa. Haake, Berlin) begann abends (20.00 Uhr), die Tötung der Fische erfolgte stets morgens um 8.00 Uhr, so daß Einflüsse der Tagesperiodik hier entfallen.

Die von LEHMANN (1970b) gefundenen anfänglichen Schwankungen der Fermentaktivitäten (die bei den Goldfischen allerdings zum Teil auch wegen der kurzen Untersuchungsintervalle auf tagesperiodische Schwankungen zurückzuführen sind), zeigten sich nur bei einigen Enzymen (in Abb. 6a bei PK, LDH, G6PDH und SDH, in 6b bei PK, LDH und GAPDH). Die anfänglichen Abweichungen lassen sich durchaus absichern (in den Abbildungen sind stets die mittleren Fehler der Einzelmessungen eingezeichnet worden), doch waren sie bei den Wiederholungsversuchen nicht immer reproduzierbar. Dies lag sicherlich nicht, wie auch Versuche an Bitterlingen zeigten, an dem zeitlichen Unterschied der Versuche. Auch werden, wie bei den Versuchen von LEHMANN (1970b), die Endwerte voll adaptierter Tiere nicht immer erreicht.

Schlußfolgerungen

Da die Fermente ein labiles System darstellen, d. h. deren Aktivität sich bei stündlichen, täglichen oder monatlichen Messungen trotz gleicher Vorbehandlung der Fische leicht ändert, muß man beim Vergleich von Individuen aus unterschiedlichen ATs möglichst auch die Reproduzierbarkeit und nicht nur die Absicherbarkeit der Meßwerte prüfen. Dies geschah bisher kaum. Die Versuche von LEHMANN (1970a) an Goldorfen aus vielen ATs ergaben allerdings deutliche Tendenzen, die sicherlich nicht nur durch derartige Schwankungen zustandekommen.

Bei einer Änderung der Temperatur ist auf tagesperiodische Einflüsse zu achten, wenn die Versuche sich über einen längeren Zeitraum erstrecken. Es ist ferner zu beachten, daß das Fermentsystem nach einer solchen Änderung besonders zu Schwankungen neigt. Warum diese oft bei allen Fischen in gleicher Richtung auftreten (kleine Schwankungsbreiten) und doch in Wiederholungsversuchen oft nicht reproduzierbar sind, konnte noch nicht geklärt werden.

Bei Messungen der VT-Abhängigkeit von Lebensprozessen, bei denen man zumeist von der AT ausgeht und diese in einem Schritt ändert, muß man somit auch bei Verwendung desselben Tiermaterials in den nächsten Tagen mit einer gesteigerten Labilität des Fermentsystems rechnen (PRECHT, 1968).

Zusammenfassung

1. Es wurden die Succinatatmung und verschiedene Enzymaktivitäten des weißen Rückenmuskels von Goldorfen (goldgefärbte Zuchtform von *Idus idus* L.) bestimmt, welche an unterschiedliche Temperaturen adaptiert worden waren.

2. Bestimmungen der Enzymaktivitäten an Fischen einer Adaptationstemperatur ergaben an aufeinanderfolgenden Tagen zum Teil signifikant verschiedene Werte. Derartige Unterschiede konnten nicht auf Differenzen zwischen verschiedenen Fischgruppen oder auf Störungen durch das Herausfangen einiger Fische zurückgeführt werden (Abb. 2 und 3).

3. Bei Umadaptationsversuchen müssen tagesperiodische Schwankungen der Enzymaktivitäten berücksichtigt werden. Sie traten besonders bei der Isocitrat-Dehydrogenase auf.

4. Auch die Jahreszeit kann die Leistungsadaptation der Fermentaktivitäten beeinflussen; dies hängt möglicherweise mit der Tageslänge zusammen.

5. Bei der Succinatatmung im Warburgapparat zeigen langfristig an 5 °C angepaßte Orfen einen um 10% höheren Wert als an 20 °C adaptierte Individuen (Versuchstemperatur 25 °C). Bei der Umadaptation von 20° nach 5 °C (5 C°/Std) nähern sich die Werte nach anfänglichen Schwankungen denen der 5 °C-Fische.

6. Nach einer Steigerung oder Senkung der Adaptationstemperatur (5 bzw. 2 C°/Std) traten — wie bei den abrupten Umsetzungen von LEHMANN (1970a) — bei manchen Fermenten anfängliche Schwankungen auf; diese waren, auch wenn signifikant, nicht immer reproduzierbar. Der Temperaturwechsel hat eine zeitlich begrenzte Phase gesteigerter Labilität zur Folge.

Danksagungen. Für die Bereitstellung von Apparaten danken wir der Deutschen Forschungsgemeinschaft, für ihre tatkräftige Hilfe Frau H. PONICK.

Zitierte Literatur

- BIRUKOW, G. und L. RENSING (Eds.): Biologische Rhythmen. Nachr. Akad. Wiss. Göttingen (2 Math. phys. chem. VI.) 10, 103—105 (1967).
- BRAUN, K., H. KÜNNEMANN und H. LAUDIEN: Der Einfluß von Temperaturänderungen auf Enzyme der Fischmuskulatur. Versuche mit *Rhodeus amarus*. Mar. Biol. 7, 59—70 (1970).
- BÜCHER, T., W. LUH und D. PETTE: Einfache und zusammengesetzte optische Tests mit Pyridinnucleotiden. In: HOPPE-SEYLER, E. F. und H. THIERFELDER: Handbuch der physiologisch- und pathologisch-chemischen Analyse, Vol. 6 A. pp 292—339. Berlin: Springer Verlag 1964.
- DILL, D. B., E. F. ADOLPH and C. G. WILBER (Eds.): Adaptation to the environment. In: Handbook of physiology, Section 4, pp 715—728. Washington, D. C.: American Physiological Society 1964.
- FAGERLUND, U. H. M.: Plasma cortisol concentration in relation to stress in adult sockeye salmon during the freshwater stage of their life cycle. Gen. comp. Endocr. 8, 197—207 (1967).

- HANE, S., O. H. ROBERTSON, B. C. WEXLER and M. A. KRUPP: Adrenocortical response to stress and ACTH in pacific salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) and steelhead trout (*Salmo gairdnerii*) at successive stages in the sexual cycle. *Endocrinology* **78**, 791—800 (1966).
- HARDELAND, R.: Circadiane Rhythmik und Regulation von Enzymen des Tryptophan-Stoffwechsels in Rattenleber und -niere. *Z. vergl. Physiol.* **63**, 119—136 (1969).
- and L. RENSING: Circadian oscillation in the rat liver tryptophan pyrolase and its analysis by substrate and hormone induction. *Nature, Lond.* **219**, 619—621 (1968).
- HUGGEL, H., A. KLEINHAUS et M. HAMZEHPOUR: Composition du sang de *Salmo gairdnerii irideus* et *Squalus cephalus*. *Revue suisse Zool.* **70**, 286—290 (1963).
- KELLER, R.: Über eine portionskonstante Enzymgruppe beim Flußkrebs (*Cambarus affinis* SAY). *Naturwissenschaften* **8**, 192 (1965).
- KÖNTZ, W.: Elektronenmikroskopische Untersuchungen an „*Euglena gracilis*“ im tagesperiodischen Licht-Dunkel-Wechsel. *Planta* **66**, 345—373 (1965).
- LEHMANN, J.: Über die Abhängigkeit der Enzymaktivitäten von der Vorbehandlungstemperatur im Rumpfmuskel der Goldorfe (*Idus idus*). *Int. Rev. ges. Hydrobiol.* (1970a). (Im Druck).
- Über die Veränderungen der Enzymaktivitäten nach dem Wechsel der Adaptationstemperatur, untersucht am Seitenrumpfmuskel des Goldfisches. *Int. Rev. ges. Hydrobiol.* (1970b). (Im Druck).
- MALESSA, P.: Beiträge zur Temperaturadaptation des Aales (*Anguilla vulgaris*) III. Höhe und Verteilung der Aktivität von Succinodehydrogenase und Cytochromoxydase im Seitenmuskel juveniler und adulter Tiere. *Mar. Biol.* **3**, 143—158 (1969).
- MAYERSBACH, H. VON und P. H. K. YAP: Tagesrhythmische Schwankungen der Leberesterase. *Histochemie* **5**, 297—303 (1965).
- MEINCKE, K.-F.: Der Einfluß von Temperaturänderungen auf Ionen- und Wassergehalt in Blutplasma und Geweben von *Tinca tinca*. *Mar. Biol.* **6**, 281—290 (1970).
- MÜLLER, O., C. JERUSALEM und H. VON MAYERSBACH: Die Ultrastruktur der physiologischen Tagesschwankungen in Leberzellen von Ratten. *Z. Zellforsch. mikrosk. Anat.* **69**, 438—451 (1966).
- PETTE, D.: Plan und Muster im zellulären Stoffwechsel. *Naturwissenschaften* **22**, 597—616 (1965).
- , W. LUH and T. BÜCHER: A constant-proportion group in the enzyme activity pattern of the Embden-Meyerhof-chain. *Biochem. biophys. Res. Commun.* **7**, 419—424 (1962).
- PORA, E. A., D. SUTRU, M. GHIRCOLASIU et S. MANICULEA: Modifications métaboliques déterminées par l'effort musculaire chez la carpe. *Studia Univ. Babeş-Bolyai (Ser. Biol.)* **2**, 113—119 (1968).
- PRECHT, H.: Der Einfluß „normaler“ Temperaturen auf Lebensprozesse bei wechselwarmen Tieren unter Ausschluß der Wachstums- und Entwicklungsprozesse. *Helgoländer wiss. Meeresunters.* **18**, 487—548 (1968).
- PROSSER, C. L. (Ed.): Molecular mechanism of temperature adaption. *Publ. Am. Ass. Advmt Sci.* **84**, 205—226 (BASLOW), 351—376 (PROSSER) (1967).
- RAO, P. V. and S. GOVINDAPPA: Dehydrogenase activity and its diurnal variations in different muscles of the scorpion *Heteronemus fulvipes*. *Proc. Indian Acad. Sci.* **66**, 243—249 (1967).
- SLATER, E. C.: Succinate dehydrogenase (Succinate oxidase system). In: HOPPE-SEYLER, E. F. und H. THIERFELDER: *Handbuch der physiologisch- und pathologisch-chemischen Analyse*, Vol. 6 A. pp 633—637. Berlin: Springer Verlag 1964.
- WEDEMEYER, G.: Stress-induced ascorbic acid depletion and cortisol in two salmonid fishes. *Comp. Biochem. Physiol.* **29**, 1247—1251 (1969).
- WIESER, W.: Parameter des Sauerstoffverbrauchs. II. *Z. vergl. Physiol.* **47**, 1—16 (1963).
- and E. NOPP-PAMMER: Der Einfluß der Temperatur und des Häutungszyklus auf die Melaninsynthese von *Triturus cristatus*. *Zool. Anz. (Suppl. Bd)* **31**, 131—139 (1968).
- WINER, A. D. and G. W. SCHWERT: Lactic dehydrogenase IV. Influence of pH on the kinetic reaction. *J. biol. Chem.* **231**, 1065—1083 (1958).

First author's address: H. KÜNNEMANN
 Zoologisches Institut der
 Universität Kiel
 Hegewischstraße 3
 23 Kiel, Germany (FRG)

Date of final manuscript acceptance: June 12, 1970. Communicated by O. KINNE, Hamburg