

Zoologie

**Biochemische und physiologische Mechanismen
der Anpassung an variable Temperaturbedingungen
bei Organismen des limnischen Zooplanktons**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften im Fachbereich Biologie
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

vorgelegt von
Marcin Prokopiak
aus Dębno

Münster, 2009

Dekan: Prof. Dr. C. Klämbt
Erster Gutachter: Prof. Dr. R. J. Paul
Zweiter Gutachter: Prof. Dr. E. I. Meyer

Tag der mündlichen Prüfung: 01. 04. 2009
Tag der Promotion: 24. 04. 2009

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	7
1.1. Temperatur als ein wichtiger abiotischer Faktor.....	7
1.2. Larven der Büschelmücke <i>Chaoborus crystallinus</i>	9
1.3. Glaskrebse <i>Leptodora kindtii</i>	11
1.4. Kleinkrebs <i>Daphnia magna</i>	13
1.5. Zielsetzung der Arbeit.....	15
2. Material und Methoden	16
2.1. Organismen	16
2.1.1. Taxonomie	16
2.1.2. Die Larven der Büschelmücke <i>Chaoborus crystallinus</i>	17
2.1.3. Der Glaskrebs <i>Leptodora kindtii</i>	17
2.1.4. Kleinkrebs <i>Daphnia magna</i>	18
2.1.5. Tierinkubation.....	19
2.2. Methoden	20
2.2.1. Frischgewichtsbestimmung.....	20
2.2.2. Mortalität.....	21
2.2.3. Thermopräferenz	21
2.2.4. Schwimmaktivität	22
2.2.5. Sauerstoffverbrauchsrate.....	23
2.2.6. Berechnung der kritischen PO_2 -Werte für <i>Chaoborus</i> -Larven.....	24
2.2.7. NADH-Fluoreszenz	24
2.2.8. Herzfrequenz.....	25
2.2.9. Präparation des Rohextraktes.....	26
2.2.10. Metabolitbestimmung und Analyse der Enzymaktivität.....	27
2.2.10.1. Glykogen- und Glukose-Bestimmung im fluorimetrischen Test.....	27
2.2.10.2. Bestimmung der L-Laktat-Konzentration.....	30
2.2.10.3. Bestimmung der L-Alanin-Konzentration	31
2.2.10.4. Bestimmung der L-Malat-Konzentration.....	32
2.2.10.5. Untersuchung der LDH-Aktivität	33
2.2.11. Bestimmung des Gesamtproteingehalts nach Bradford.....	36
2.2.12. Quantifizierung von RNA und DNA	36
2.2.13. Extraktion der genomischen Daphnien-DNA	39

2.2.14. Extraktion der gesamten Daphnien-RNA mit RNAiso [®]	40
2.2.15. Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	41
2.2.16. Elektrophorese von DNA auf Agarosegelen.....	42
2.2.17. Elektrophorese von RNA auf Agarosegelen.....	42
2.2.18. Fluoreszenzfärbung von <i>Daphnia magna</i>	43
2.2.19. Mikroskopie und Dokumentation	44
3. Ergebnisse	45
3.1. <i>Chaoborus crystallinus</i>	45
3.1.1. Mortalität.....	45
3.1.2. Thermopräferenz	46
3.1.3. Schwimmaktivität	47
3.1.4. Sauerstoffverbrauchsrate.....	47
3.1.5. P_{CO_2}	48
3.1.6. NADH-Signal.....	48
3.1.7. Herzfrequenz.....	48
3.1.8. Konzentration von Kohlenhydraten und anaeroben Metaboliten	49
3.1.8.1. Kohlenhydrate	49
3.1.8.2. Anaerobe Metabolite	50
3.1.9. LDH-Aktivität.....	51
3.1.10. RNA-, DNA-Gehalt und RNA/DNA-Verhältnis in <i>Chaoborus crystallinus</i> ..	52
3.2. <i>Leptodora kindtii</i>	53
3.2.1. Thermopräferenz.....	53
3.2.2. Schwimmaktivität	53
3.2.3. Sauerstoffverbrauchsrate.....	54
3.2.4. Berechnung der kritischen P_{O_2} -Werte für <i>Leptodora kindtii</i>	54
3.2.5. L-Laktatkonzentration.....	55
3.3. <i>Daphnia magna</i>	56
3.3.1. RNA-, DNA-Gehalt und RNA/DNA-Verhältnis in <i>Daphnia magna</i>	56
3.3.1.1. RNA-, DNA-Gehalt und RNA/DNA-Verhältnis als Funktion der Körpergröße der Tiere und der Hälterungstemperatur	56
3.3.1.2. RNA-, DNA-Gehalt und RNA/DNA-Verhältnis in 20 °C akklimatisierten <i>Daphnia magna</i> als Funktion der Temperatur nach 2-tägiger Inkubation.....	57
3.3.1.3. RNA-, DNA-Gehalt und RNA/DNA-Verhältnis in 10 °C akklimatisierten <i>Daphnia magna</i> als Funktion der Inkubationszeit	59

3.3.1.4. RNA-, DNA-Gehalt und RNA/DNA-Verhältnis in 10 °C akklimatisierten <i>Daphnia magna</i> als Funktion der Inkubationstemperatur.....	60
3.3.2. Bestimmung des Nukleinsäure-Gehalts in <i>Daphnia magna</i> als Funktion der Inkubationstemperatur nach einer bestimmten Zeit in einem spezifischen Ernährungsmedium	61
3.3.2.1. DNA-Gehalt in <i>Daphnia magna</i> als Funktion der Inkubationstemperatur....	61
3.3.2.2. RNA-, DNA-Gehalt und RNA/DNA-Verhältnis in <i>Daphnia magna</i> als Funktion der Temperatur nach der Inkubation und nach der Rückkehr zur Hälterungstemperatur	62
3.3.2.3. RNA-, DNA-Gehalt und RNA/DNA-Verhältnis in <i>Daphnia magna</i> als Funktion der Temperatur nach der zwei- und dreitägigen Inkubation und nach der Rückkehr zur Hälterungstemperatur.....	63
3.3.2.4. Proteinkonzentration und Frischgewicht von <i>Daphnia magna</i> als Funktion der Temperatur nach der zwei- und dreitägigen Inkubation und nach der Rückkehr zur Hälterungstemperatur	66
3.3.3. Quantitative Analyse der DNA-Fluoreszenz	68
3.3.4. Semiquantitative PCR für die Gene von Hämoglobin, Hsp70, rDNA und Actin bei <i>Daphnia magna</i>	71
3.3.5. rRNA-Elektrophorese bei <i>Daphnia magna</i>	72
4. Diskussion.....	74
4.1. Untersuchungen zur Thermotoleranz von <i>Chaoborus crystallinus</i> -Larven und <i>Leptodora kindtii</i>	74
4.1.1. Mortalität.....	74
4.1.2. Thermopräferenz.....	75
4.1.3. Schwimmaktivität	76
4.1.4. Sauerstoffbedarf.....	78
4.1.5. NADH-Fluoreszenz	81
4.1.6. Herzfrequenz.....	83
4.1.7. Metabolite	84
4.1.8. Laktatdehydrogenase (LDH).....	85
4.1.9. Einfluss der Umgebungstemperatur auf RNA-, DNA-Gehalt und RNA/DNA-Verhältnis	87
4.1.10. Thermotoleranz von <i>Chaoborus crystallinus</i> und <i>Leptodora kindtii</i> : Fazit....	88

4.2. Temperaturinduzierende Änderungen der RNA- und DNA-Menge in <i>Daphnia magna</i>	90
4.2.1. RNA-, DNA-Gehalt und RNA/DNA-Verhältnis in <i>Daphnia magna</i>	90
4.2.1.1. RNA-, DNA-Gehalt und RNA/DNA-Verhältnis als Funktion der Körpergröße der Tiere und der Hälterungstemperatur	91
4.2.1.2. RNA-, DNA-Gehalt und RNA/DNA-Verhältnis als Funktion der Inkubationstemperatur und Inkubationszeit.....	91
4.2.1.3. Nukleinsäure-Gehalt und RNA/DNA-Verhältnis als Funktion der Temperatur nach Inkubation im spezifischen Ernährungsmedium.....	94
4.2.2. Quantitative Analyse der DNA anhand der Fluoreszenzbilder.....	96
4.2.3. Einfluss der Temperatur auf Genexpression und rRNA-Gehalt	96
4.2.4. Diskussion der Befunde	97
4.2.5. Nukleinsäurekonzentrationen als Fitness-Parameter bei <i>Daphnia</i> : Fazit	103
5. Zusammenfassung.....	104
6. Literatur.....	106
7. Anhang	123
7.1. Verwendete Abkürzungen.....	123
7.2. Chemikalien und Fertiglösungen	125
7.3. Enzyme und Proteine	126
7.4. Medien und Puffer	127
7.4.1. Medium für Daphnienzucht (M4-Medium nach Elendt & Bias 1990).....	128
7.5. Geräte und Verbrauchsmaterialien.....	129
Danksagung.....	132
Lebenslauf.....	133

1. Einleitung

1.1. Temperatur als ein wichtiger abiotischer Faktor

Temperatur ist ein bedeutender abiotischer Faktor, der weit reichenden Einfluss auf alle biologischen Prozesse hat. Die starke und häufig dominierende Rolle, die die Temperatur in der Steuerung der Verteilungsmuster von Organismen spielt, erfordert die Analyse der grundlegenden Einwirkungsmechanismen der Temperatur auf biologische Abläufe, von molekularen Prozessen bis zum Ökosystem. Eine solche Analyse liefert auch Hinweise, wie sich zukünftige Temperaturveränderungen, aufgrund der globalen Erwärmung, auf die Verteilung und den physiologischen Status der Organismen auswirken. Es gibt daher einen praktischen Grund mit erheblicher ökonomischer und auch politischer Bedeutung zur Förderung unseres Verständnisses der thermischen Effekte auf Organismen (Hochachka und Somero, 2002).

Oszillationen im Erdklima führen zu Fluktuationen in den Temperaturregimen vieler mariner, limnischer und terrestrischer Ökosysteme. Konsequenzen sind in vielen Ökosystemen umfassende Veränderungen in der Reproduktionszeit, des reproduktiven Erfolges, des Wachstums und der Sterblichkeit tierischer Organismen (Pörtner, 2002). Kleine, schnell wachsende Organismen können auf Temperaturwechsel kurzfristig möglicherweise über durch Mutation oder Migration eingeführte Variation reagieren. Sie sind dadurch weniger direkt von der globalen Erwärmung beeinträchtigt (Mitchell und Lampert, 2000). Das Thermotoleranzfenster dieser poikilothermen Tiere, das schmal (stenotherm) oder breit (eurytherm) sein kann, enthält einen Bereich der optimalen physiologischen Fitness. Dieser lässt maximales somatisches Wachstum und Reproduktion zu. Suboptimale Temperaturbereiche werden als Pessimbereiche bezeichnet und durch abnehmende Leistung charakterisiert. In den angrenzenden Pessimumbereichen ist das Überleben nur während kurzfristiger Exposition möglich. Ein Überschreiten dieser Grenzen oder ausgedehnte Exposition führt zum Tod. Kritische Temperaturbereiche werden am oberen und unteren Ende des Thermotoleranzfensters erreicht (Pörtner, 2002; Zeis et al., 2004). Das Thermotoleranzfenster unterscheidet sich zwischen verschiedenen Gattungen und lässt sich als folgendes Muster (Abb. 1) darstellen (Pörtner, 2002).

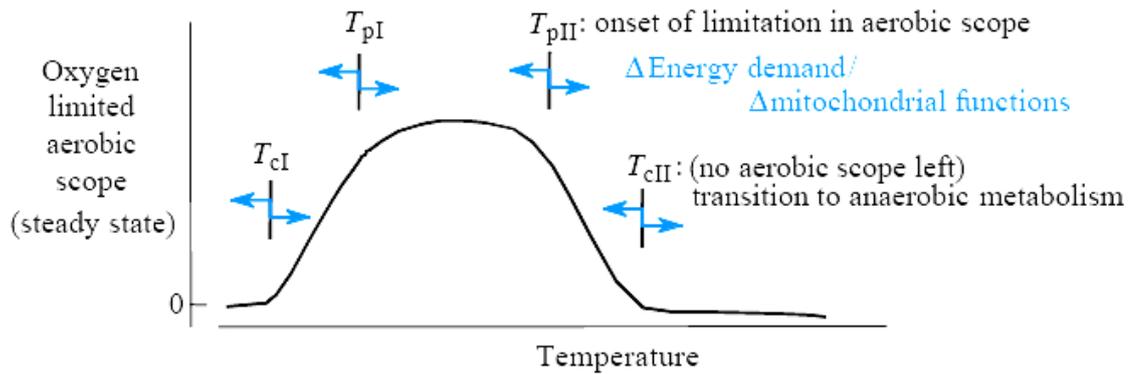


Abb. 1. Vereinfachtes Modell der Thermotoleranz bei Tieren (Pörtner, 2002). Die Grafik stellt die untere (I) und höhere (II) Pejunkturtemperatur (T_p , Beginn der Abnahme des aeroben Bereiches) und kritische Temperatur (T_c , Beginn des anaeroben Metabolismus) dar.

Als Ergebnis verschiedener Regulationsprozesse kann das Thermotoleranzfenster sowohl durch Akklimatisierung auf einer Lebenszeitskala als auch durch Anpassung während der Evolution verschoben werden. Temperaturakklimatisation erhöht das Überleben am oberen thermischen Limit nur geringfügig (Zeis et al., 2004). Erhöhung der Wassertemperaturen geht Hand in Hand mit der Abnahme der Sauerstoffkonzentration. Bei zunehmenden Temperaturen steigen der Stoffwechsel und der Sauerstoffbedarf ektothermer Tiere. In aquatischen Lebensräumen ist aufgrund der verringerten Sauerstofflöslichkeit im Wasser die Sauerstoffverfügbarkeit reduziert. Daher beeinflussen Temperaturänderungen sowohl die Sauerstoffkonzentration im Wasser als auch den Sauerstoffbedarf der Ektothermen. Wenn erhöhte Versorgung durch den konvektiven Sauerstofftransport nicht imstande ist, den erhöhten Sauerstoffbedarf zu decken, muss das Energiedefizit durch anaeroben Stoffwechsel ergänzt werden. So limitiert zunehmende Temperatur den aeroben Bereich eines Organismus, der seine physiologische Toleranz bestimmt (Pörtner, 2002). Obwohl der Sauerstoffbedarf in der Kälte verringert wird, kann der restliche Energiemetabolismus nicht ausreichend mit Sauerstoff beliefert werden, da die für diese Prozesse notwendige Ventilation und Perfusion verringert werden. Folglich kann auch die untere kritische Temperatur, die den Anfang des Pessimums anzeigt, durch einen Anstieg anaerober Metabolite gekennzeichnet werden (Pörtner, 2002; Zeis et al., 2004). So wird das Thermotoleranzfenster durch ein Ungleichgewicht zwischen Sauerstoffversorgung und Sauerstoffbedarf am Ende des Temperaturoptimums limitiert. Zusätzlich können Verschiebungen des aeroben Bereiches für die Verschiebung des

Thermotoleranzfensters während der Akklimatisation verantwortlich sein – eine verbesserte Energielieferung der konvektiven Organe in der Kälte wird durch erhöhte mitochondriale Kapazität erreicht, der höhere Energiekosten bei erhöhten Temperaturen nachteilig gegenüberstehen (Zeis et al., 2004). Die Position des metabolischen Optimums nur einige Grad unterhalb des thermischen Limits ist eine Konsequenz der Temperatureffekte auf unterliegende biologische Prozesse, wie enzymatische Reaktionen (Mitchell und Lampert, 2000). Auf Proteinniveau sind die Beeinträchtigungen der Enzymkinetik und Denaturierung der Proteine (Hitzeschock-Proteine, die als molekulare Chaperone dienen, wirken diesem entgegen) vorherrschende Prozesse nahe den thermischen Toleranzgrenzen.

Für die Beurteilung der Thermotoleranzfenster von poikilothermen Organismen können Indikatoren verschiedener Organisationsebenen herangezogen werden. Auf der systemischen Ebene können die Parameter Mortalität, Thermopräferenz oder Motilität Auskunft über die Grenzen des Temperaturoptimums geben (Lamkemeyer et al., 2003; Paul et al., 2004; Zeis et al., 2004). Auf der physiologischen Ebene können die Stoffwechselrate, die in respirometrischen Messungen aus dem Sauerstoffverbrauch bestimmt werden kann, sowie Herz-Kreislaufparameter, die Aufschluss über den Sauerstofftransport geben, herangezogen werden (Paul et al., 2004). Weiterhin kann die Messung der NADH-Fluoreszenz Aufschluss über den Redoxzustand der Zellen geben (Paul & Schneckenburger, 1996, Paul et al 2004). Auf der biochemischen Ebene können die Konzentrationen verschiedener Metabolite des anaeroben Stoffwechsels sowie Speicherstoffe Anhaltspunkte für den Thermotoleranzbereich der Tiere liefern (Hochachka & Somero, 2002). Aus dem Verhältnis von RNA und DNA ergeben sich Hinweise auf den Wachstumsstatus der Tiere (Saiz et al., 1998; Vrede et al., 2002), der als Maß für die Fitness herangezogen werden kann (Lampert & Trubetskova, 1996). Die spezifischen Eigenschaften von Stoffwechsellenzymen lassen ebenfalls auf Anpassungsreaktionen an veränderte Bedingungen schließen (Hochachka & Somero, 2002).

1.2. Larven der Büschelmücke *Chaoborus crystallinus*

Büschelmücken *Chaoborus* (Chaoboridae, Diptera) haben eine aquatische Larve, die dichte Populationen in Seen und Teichen ausbilden kann (Liljendahl-Nurminen et al., 2002). Die räuberischen Larven spielen eine wichtige Rolle in der Struktur des Zoo-

planktons. Neben Fischen sind diese wirbellosen Tiere die am stärksten verbreiteten planktonfressenden Räuber in Seen (Wissel et al., 2003; Arcifa, 2000). Die Gattung verteilt sich über die gemäßigten, subtropischen und tropischen Bereiche der nördlichen und südlichen Hemisphären (Wissel et al., 2003; Liljendahl-Nurminen et al., 2002; Persaud und Yan 2001; Pagano et al. 2003). Andererseits sind diese Tiere selbst Beute, die Fischen als Nahrung dienen (Xie et al., 1998).

Der Fraßdruck ist einer der Schlüsselfaktoren, der die Struktur und die Dynamik der natürlichen Ökosysteme kontrolliert (Van de Meutter et al., 2005; Xie et al., 1998; Pagano et al. 2003) und *Chaoborus*-Larven spielen hier eine wichtige Rolle (Jäger und Walz, 2003). Die Population der *Chaoborus*-Larven kann von 2 bis zu 90 % der Beutepopulation pro Tag entfernen (Pagano et al., 2003). *Chaoborus*-Larven bevorzugen kleine Beutetiere (Wissel et al., 2003). Sie ernähren sich vor allem von Rotatorien und Crustaceen des Planktons (Smyly, 1980), wie Copepoden und Cladoceren (Boeing et al., 2003; Saether, 1970), darunter Daphnien.

Büschelmückenlarven durchlaufen vier Entwicklungsstadien. Stadien I und II sind planktonisch (Xie et al., 1998) und Stadien III und IV führen tagesperiodische Vertikalwanderungen durch (Xie et al., 1998; Lampert und Sommer, 1993). Tagsüber befinden sie sich im anaeroben Hypolimnion und betreiben dort Anoxibiose. Oft graben sie sich sogar in den Schlamm ein. Nachts kommen sie zum Fressen und zur Erholungsatmung ins Epilimnion (Lampert und Sommer, 1993). Diese Fähigkeit erlaubt ihnen, dem Fischfraß zu entgehen (Lampert und Sommer, 1993; Jäger und Walz 2002). Demzufolge müssen die Larven im Tagesverlauf niedrigere Sauerstoffbedingungen (anaerobe Bedingungen) und niedrigere Temperaturen bewältigen. Mit dieser Strategie sind physiologische „Kosten“, wie Energiegebrauch für Migration oder Reduktion der Wachstumsrate, verbunden (Jäger und Walz, 2002). Unter den Insekten führt nur die Gattung *Chaoborus* in ihrer Larvalform tagesperiodische Vertikalmigrationen durch (Büns und Ratte, 1991) und gilt deshalb unter anderem als optimal der pelagischen Lebensweise angepasst (Weserberg-Lund, 1943). Die Larven können sogar periodischer Anoxie widerstehen (Jäger und Walz, 2002). Bei *Chaoborus*-Larven ist es umso interessanter, dass sie keine atmungsunterstützenden Organe besitzen (Weserberg-Lund, 1943) (Abb. 2). Das Tracheensystem ist vollständig geschlossen. Die beiden großen Tracheenstämme sind nur beim ersten Stadium ausgebildet und verschwinden später. Das Tracheensystem dient nicht mehr als Atmungsorgan, sondern als hydrostatischer Apparat (Saether, 1970); die Atmung er-

folgt nur noch durch die Haut, die bei dieser Funktion durch vier nicht sehr gut entwickelte Rektalkiemien unterstützt wird (Weserberg-Lund, 1943). Obwohl *Chaoborus*-Larven als gut angepaßt an die sich ständig verändernden Umgebungsbedingungen gelten, können sie Anoxie trotzdem nur ca. 24 Stunden überleben (Jäger und Walz, 2002; Englisch et al., 1981), was im Vergleich zu manchen Anneliden oder Bivalvia relativ kurz ist (Englisch et al., 1981).

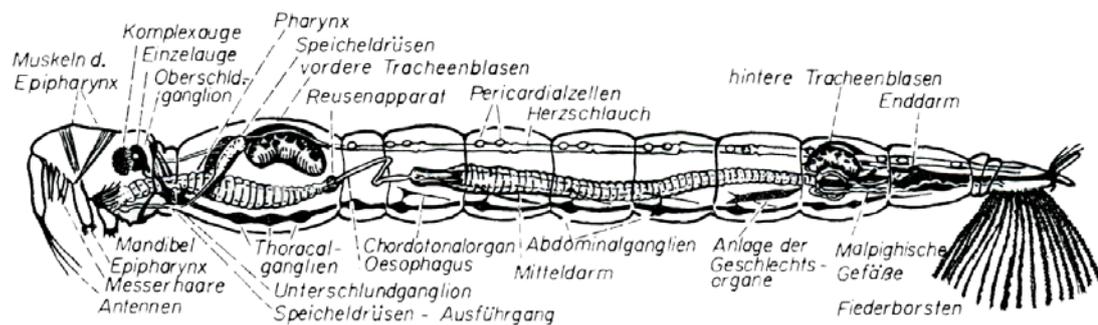


Abb. 2. Larve der Büschelmücke *Chaoborus* sp. (Schönfeld, 1957)

1.3. Glaskrebse *Leptodora kindtii*

Der Glaskrebs *Leptodora kindtii* (Cladocera, Leptodoridae) ist ein allgemeiner Planktonräuber, der weit in paläarktischen Regionen verteilt ist (Abrusán, 2003; Vijverberg und Koelewijn, 2004). Seine Bedeutung in den Nahrungsnetzen der Seen ist ausführlich erforscht (Pilichova et al., 2004). Der sehr transparente Zooplankter ist 2-14 Millimeter groß (Vijverberg und Koelewijn, 2004) (Abb. 3). Seine Hauptbeutetiere sind andere Cladoceren (Abrusán, 2003). *Leptodora kindtii* bevorzugt kleine Cladoceren mit Körpergrößen < 1,5 Millimeter, einschließlich *Daphnia* (Herzig und Auer, 1990; Chang und Hanazato, 2004; Manca und Comoli, 1995; Branstrator und Lehman, 1991; Berg und Garton, 1988). Aufgrund der Eigenschaften von *Leptodora* wird sein Raubverhalten als ein wichtiger Faktor für die Kontrolle der Cladocerenpopulation in vielen Seen betrachtet (Herzig, 1995; Chang und Hanazato, 2004). Es ist bekannt, dass auch Daphnienpopulationen von *Leptodora* kontrolliert werden.

L. kindtii kann 25-35% der Daphniapopulation entfernen (Herzig und Auer, 1990). Andererseits ist *L. kindtii* selbst eine bevorzugte Beute der planktonfressenden Fische, obwohl der Glaskrebs extrem durchsichtig ist. Der stark pigmentierte Bereich innerhalb des zusammengesetzten Auges führt zur erhöhten Sichtbarkeit des Tieres (Her-

zig, 1995). Während der Anwesenheit von räuberischen Fischen führen adulte *Leptodora* tagesperiodische Vertikalmigration durch (Vijverberg et al., 2005; Vijverberg und Koelewijn, 2004). Bei Cladoceren bestimmt die Umwelttemperatur kurzfristige metabolische Funktionen, einschließlich der Gesamtaktivität, der metabolischen Rate, der embryonalen Entwicklungsrate, der Wachstumsrate, der Größe bei erster Reproduktion, der langfristigen Antworten wie Bildung von männlichen Tieren und der sexuellen Dauereier innerhalb der Population. (Garton et al., 1990). Der Einfluss von *L. kindtii* hat das Potential, Räuber-Beute-Systeme zu regulieren und zu strukturieren (Herzig, 1994). Glaskrebse sind typische Sommerarten (Herzig, 1995). Die Abundanz von *Leptodora* ist positiv mit der Seetemperatur korreliert (Herzig, 1995; Vijverberg und Koelewijn, 2004). Die maximale Biomasse und das stärkste Wachstum wird während der Sommermonate erreicht (tägliche Durchschnittstemperatur: 16-26 °C) (Herzig und Auer, 1990). Ein verstärktes Vorkommen von *Leptodora* in tiefen Seen gibt es meistens von Anfang Juli bis Mitte/Ende August (Vijverberg und Koelewijn, 2004; Herzig, 1995; Wagner et al., 2007). Die ersten Männchen erscheinen Mitte/Ende August und die maximale Dauereierproduktion tritt im September auf. Bei Temperaturen unterhalb 10 °C sinkt die Population und geht in die Diapause über (Herzig, 1995).

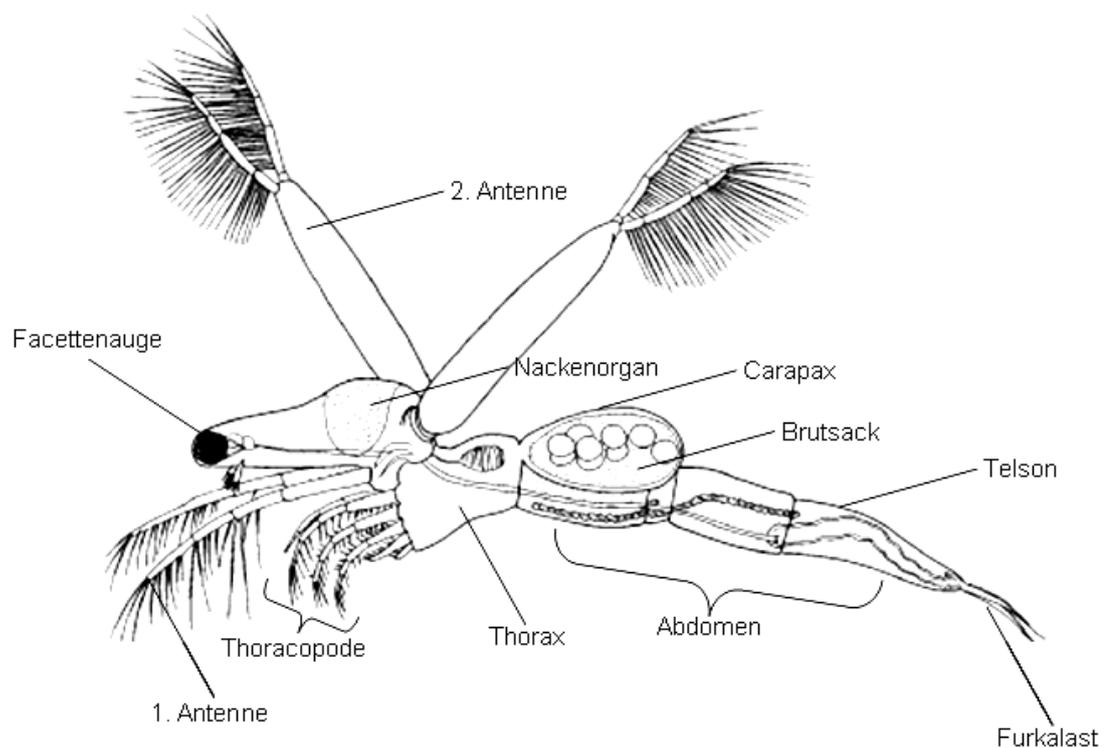


Abb. 3. *Leptodora kindtii* (Westheide und Rieger, 1996; nach Pennak, 1978)

1.4. Kleinkrebs *Daphnia magna*

Arten der Gattung *Daphnia* gehören zu den Blattfußkrebsen (Branchiopoda) (Abb. 4). Sie gelten als ökologischer und evolutionsbiologischer Modellorganismus. *Daphnia magna* ist eine Art, die unter natürlichen Bedingungen eutrophische Teiche und Tümpel besetzt (Flößner, 1972), wo sie häufig variierenden Sauerstoff- und Temperaturbedingungen ausgesetzt ist. Wie andere Ektotherme besitzen Daphnien erhebliche physiologische und biochemische Kapazitäten, um Temperaturschwankungen zu ertragen (Prosser, 1973). In der Natur spielt *Daphnia* eine große Rolle, da sie von zentraler Bedeutung in den Nahrungsnetzen ihrer Habitate ist (Colbourne et al., 1997). Einerseits filtrieren sie Algen und Mikropartikel aus dem Wasser und andererseits werden sie von anderen Tieren – planktonfressenden Fischen und wirbelloser Räubern (wie z.B. *Chaoborus* und *Leptodora kindtii*) gefressen.

Die Gattung *Daphnia* pflanzt sich parthenogenetisch fort. Unter optimalen Umgebungsbedingungen sind nur weibliche Individuen vorhanden. Die weibliche Population produziert weitere genetisch identische weibliche Nachkommen, was wiederum zur Entstehung einer klonalen Populationsstruktur führt (Giebelhausen & Lampert, 2001). Die asexuelle Fortpflanzung ist eine Anpassung an stabile, günstige ökologische Bedingungen, unter denen eine schnelle Zunahme der Population stattfindet. Die klonale genetische Struktur der natürlichen Populationen machen Daphnien ideale Objekte für Studien über z.B. Mikroevolution und lokale Anpassung (Weisse, 2006). Wenn sich die Umgebungsbedingungen verschlechtern, werden weibliche und männliche Nachkommen gebildet, die sich verpaaren. Es kommt zur Befruchtung und danach entstehen sogenannte Dauereier. Dauereier sind ein wichtiger Teil der Lebensstrategie, die dem Taxon ermöglichen ungünstige Umweltbedingungen zu überleben (Weisse, 2006). Die Dauereier werden ins Wasser abgegeben und sobald sich die Umgebungsbedingungen verbessern, schlüpfen weibliche Individuen, die sich wieder asexuell fortpflanzen (Storch & Welsch, 2002).

Wegen ihrer hohen Transparenz werden Daphnien auch für (opto-) physiologische Untersuchungen verwendet (Colmorgen & Paul, 1995; Paul et al., 1997). Sie werden weiterhin in der Ökotoxikologie als sog. Bioindikatoren zur Diagnose von Schadstoffbelastungen in Gewässern verwendet. Außerdem macht die einfache Zucht (kurze Generationszeit, starke Vermehrungsrate, geringe Körpergröße) diese Tiere besonders attraktiv als Modell in biologischen Forschungen.

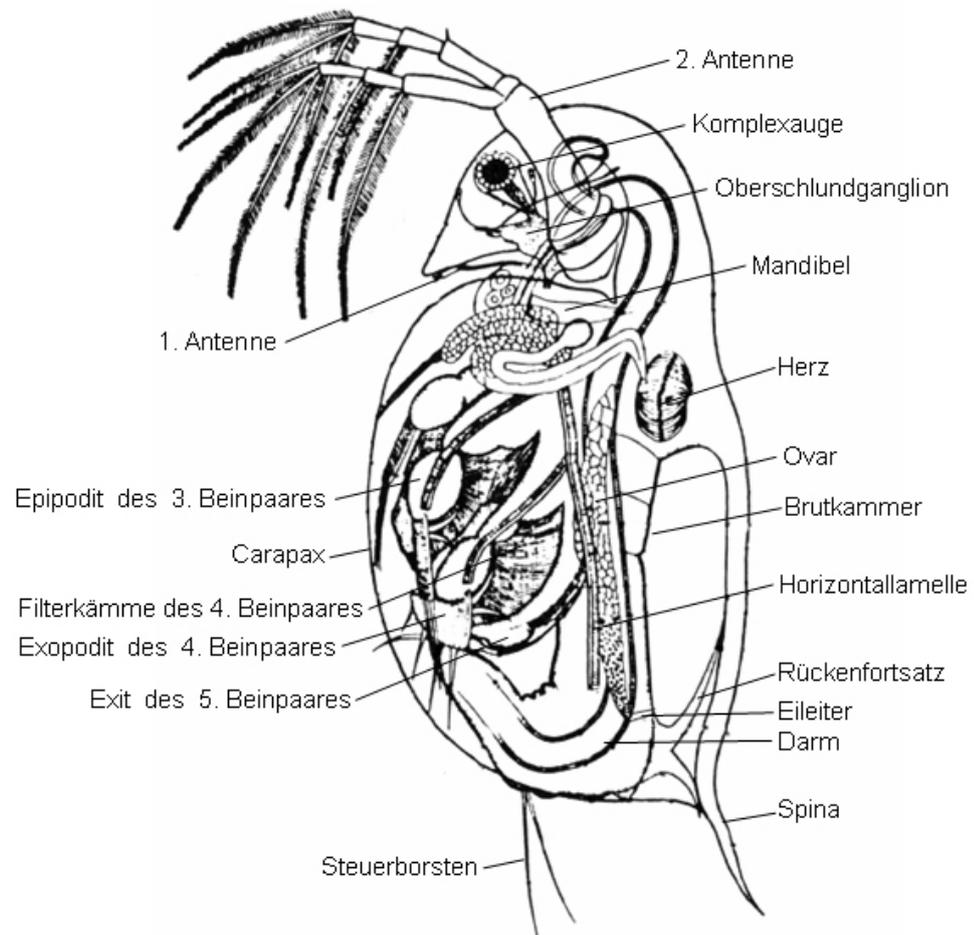


Abb. 4. *Daphnia pulex* (De Geer modifiziert nach Storch 1925 und Gruner 1993). Die Morphologie von *D. pulex* und *D. magna* ist sehr ähnlich.

1.5. Zielsetzung der Arbeit

Die vorliegende Promotionsarbeit fokussierte auf die Analyse der Thermotoleranz von ausgewählten aquatischen wirbellosen Tieren und zwar von *Chaoborus crystallinus*, *Leptodora kindtii* und *Daphnia magna*. Es wurde untersucht, welche Auswirkungen der Faktor Temperatur auf diese Tiere hat und welche Anpassungsmechanismen diese besitzen. Dazu wurden folgende Experimente durchgeführt:

- Untersuchungen auf der systemischen Ebene:
 - Mortalität an der oberen Grenze des Thermotoleranzfensters
 - Thermopräferenz in einem Temperaturgradienten
 - Schwimmaktivität bei unterschiedlichen Umgebungstemperaturen
- Untersuchungen auf der physiologischen Ebene:
 - respirometrische Messungen bei unterschiedlichen Umgebungstemperaturen
 - Erfassung der NADH-Fluoreszenz in den Tieren als Antwort auf unterschiedliche Umgebungstemperaturen
 - Messung der Herzfrequenz bei unterschiedlichen Umgebungstemperaturen
- Untersuchungen auf der biochemischen Ebene:
 - der Temperatureinfluss auf den Gehalt an Kohlenhydraten und wichtigen anaeroben Metaboliten
 - die Auswirkung der Inkubationstemperatur auf Eigenschaften des Enzyms Laktat-Dehydrogenase (LDH)
 - der Einfluss der Inkubationstemperatur auf das RNA/DNA-Verhältnis

Kenntnis der Thermotoleranz-Eigenschaften und der phänotypischen Plastizität dieser aquatischen Tierarten sollte dazu beitragen, Auswirkungen der globalen Erwärmung auf aquatische Biozönosen abzuschätzen.

2. Material und Methoden

2.1. Organismen

2.1.1. Taxonomie

Die drei verschiedenen Tierarten, die Larven der Büschelmücke *Chaoborus crystallinus*, die Glaskrebse *Leptodora kindtii* und Wasserflöhe der Art *Daphnia magna* lassen sich taxonomisch wie folgt einordnen (NCBI, 2006):

Leptodora kindtii:

Stamm:	Arthropoda
Unterstamm:	Crustacea
Klasse:	Branchiopoda
Unterklasse:	Phyllopoda
Ordnung:	Diplostraca
Unterordnung:	Cladocera Halopoda
Familie:	Leptodoridae
Gattung:	<i>Leptodora</i>
Art:	<i>Leptodora kindtii</i>

Chaoborus crystallinus:

Stamm:	Arthropoda
Überklasse:	Hexapoda
Klasse:	Insecta
Ordnung:	Diptera
Unterordnung:	Nematocera Culicomorpha
Familie:	Chaoboridae
Gattung:	<i>Chaoborus</i>
Art:	<i>Chaoborus crystallinus</i>

Daphnia magna:

Stamm:	Arthropoda
Unterstamm:	Crustacea
Klasse:	Branchiopoda
Ordnung:	Diplostraca
Unterordnung:	Cladocera
Familie:	Daphniidae
Gattung:	<i>Daphnia</i>
Art:	<i>D. magna</i>

2.1.2. Die Larven der Büschelmücke *Chaoborus crystallinus*

Die Larven der Büschelmücke *Chaoborus crystallinus* wurden in einem Teich in Münster (Nordrhein-Westfalen, Deutschland) gesammelt. Die Tiere wurden mit einem Planktonnetz (Maschenweite von 1,55 mm) gefangen und entweder sofort für Experimente verwendet oder in den Kühlraum gebracht (4 °C, Dunkelheit). Da wurden sie mehrere Wochen gehalten, bevor man sie für Versuche verwendete. Die Tiere im Kühlraum wurden in 3 L Glasgefäßen mit filtriertem Teichwasser gehältert. Die Larven wurden nicht gefüttert. Die Art der Larven wurde nach Saether, 1970, bestimmt. Für die Versuche wurden nur Larven des vierten Stadiums (Körperlänge: 9-12 mm) verwendet.

2.1.3. Der Glaskrebs *Leptodora kindtii*

Das Trinkwasserreservoir Saidenbach wurde im 1930 Jahr errichtet und liegt 439 Meter über den Meeresspiegel im Erzgebirge. Der Einzugsbereich hat eine Größe von 60,8 km². Bei maximalem Wasserstand enthält das Reservoir 22,4 Mio. m³ Wasser und hat eine Maximal- bzw. durchschnittliche Tiefe von 48 m bzw. 15 m (Horn, 2003). Seit über 25 Jahren werden alle zwei Wochen wichtige biologische (Phyto- und Zooplankton), chemische (Phosphat-, Stickstoff-, Sauerstoffgehalt etc.) und physikalische Parameter (Temperatur etc.) untersucht (Horn, 2003). Hier wurden die *Leptodora*-Fänge im August 2005, 2006 und 2007 durchgeführt. Die Wassertemperaturen an der Oberfläche der Talsperre zur Zeit der Fänge betragen 19 und 21 °C. Die

Tiere wurden mit einem Planktonnetz (Maschenweite 1,55 mm) gefangen. Die Tiere vertragen den Transport schlecht und lassen sich zudem im Labor nicht halten (Piličhova et al., 2004). Daher wurden zahlreiche Messungen und Inkubationen vor Ort in der Station Neunzehnhain der Universität Dresden durchgeführt. Die Inkubationsversuche wurden entweder für zwei Tage (12, 18 und 24 °C) in schwarzen 10 L Plastik-eimern oder für eine und drei Stunden in 2 ml Eppendorfreaktionsgefäßen und in einem Thermoblock bei 10 verschiedenen Temperaturstufen (12 – 24 °C) durchgeführt. Die Tiere wurden in filtriertem Seewasser aus der Saidenbach-Talsperre inkubiert. Während der langfristigen Inkubation (zwei Tage) wurden die Individuen der Art *Leptodora kindtii* mit kleinen ($\leq 1,0$ mm) *Daphnia* gefüttert. Die Tiere, die in der Neunzehnhain-Station bei verschiedenen Temperaturen inkubiert wurden, wurden zur weiteren Analyse eingefroren und auf Trockeneis ins Institut nach Münster gebracht. Andere Experimente (NADH-Fluoreszenzmessung, Schwimmaktivität, Thermopräferenz und Respirometrie) wurden vor Ort durchgeführt.

Für die Messungen wurden nur weibliche Tiere von etwa 11 - 14 mm Körperlänge, gemessen von dem vorderen Teil des Kopfes bis zur Basis der Furca, verwendet.

2.1.4. Kleinkrebs *Daphnia magna*

Die Tiere der Art *Daphnia magna* wurden aus der seit Jahren bestehenden instituts-eigenen Zucht entnommen. Die sich parthenogenetisch vermehrenden Tiere wurden ursprünglich vom staatlichen Umweltamt in Münster bezogen. *D. magna* wurde bei Raumtemperatur (ca. 20 °C) und normoxischen Bedingungen akklimatisiert. Die Tiere wurden in 3-L-Glasgefäßen, gefüllt mit M4-Elendt-Medium (Elendt und Bias, 1990) gezüchtet. Die standardisierte Fütterung der Population von *D. magna* erfolgte alle zwei Tage mit einer Algensuspension (Endkonzentration im Medium $> 1,3$ mg C*L⁻¹) von *Desmodesmus subspicatus* oder *Chlamydomonas reinhardtii* (Stämme aus der Sammlung des Instituts für Pflanzenphysiologie der Universität Göttingen, Deutschland). Die Tiere wurden einem kontrollierten Lichtregime mit Tag-Nachtrhythmus 16:8 h (Leuchtstoffröhre Typ: L 36 W/ 11-860, Tageslicht Lumilux, Osram, Augsburg, Deutschland) ausgesetzt.

Für die Experimente wurden die Tiere bei 10, 20, 24 und 30 °C inkubiert, um den Einfluss der Umgebungstemperatur auf den RNA- und DNA-Gehalt und die Expression bestimmter Gene zu untersuchen. Um sicher zu sein, dass der RNA und DNA-

Gehalt von *Daphnia* und nicht von Algen gemessen wird, wurden die Tiere zuerst ohne Futter im M4-Elendt-Medium und dann in einem spezifischen Ernährungsmedium mit Glukose und Pepton (1 mM und 0,1%) inkubiert. Um die Bakterienvermehrung im Ernährungsmedium zu verhindern, wurden zu diesem Medium Antibiotika (Streptomycin und Tetracyclin, Konzentration von jeweils 0,025 g/L) zugegeben.

Für die Versuche standen weibliche Tiere der Art *Daphnia magna* STRAUS zur Verfügung, deren Länge etwa 1,5-1,8 mm betrug, gemessen vom vorderen Teil des Kopfes bis zur Basis der apikalen Spina.

2.1.5. Tierinkubation

Die Tiere wurden entweder direkt aus dem Habitat oder aus Dauerkulturen genommen oder bei verschiedenen Temperaturbedingungen inkubiert, bevor sie für Experimente verwendet wurden.

Chaoborus crystallinus

Alle Inkubationen mit *Chaoborus*-Larven wurden in Glasgefäßen (250 ml) mit filtriertem Teichwasser durchgeführt. Während der Experimente wurden die Larven nicht gefüttert und in Dunkelheit gehalten. Nach unterschiedlicher Inkubationsdauer wurden Thermopräferenz, Schwimmaktivität, Sauerstoffverbrauchsrate, NADH-Fluoreszenz, Herzfrequenz, Metabolitkonzentrationen, LDH-Aktivität, RNA-, DNA-Gehalt und RNA/DNA-Verhältnis bestimmt. Die Büschelmücken-Larven wurden drei Tage lang (im Fall der Thermopräferenz drei und sieben Tage) in der Dunkelheit bei 20 °C inkubiert. Für die Metabolitbestimmung wurden die *Chaoborus*-Larven aus dem Teich genommen und in 2 ml Eppendorf-Reaktionsgefäßen (drei Tiere pro Gefäß) gefüllt mit filtriertem Teichwasser zwei Tage lang in der Dunkelheit bei 12,0; 13,3; 14,7; 16,0; 17,3; 18,6; 20,0; 21,3; 22,6; 24,0 °C inkubiert. Die erwünschte Wassertemperatur wurde mit Hilfe eines Thermoblocks erreicht. Im Fall der Laktatbestimmung wurden die Tiere zusätzlich sieben Tage lang bei 20 °C inkubiert. Für die Messungen der LDH-Aktivität wurden die *Chaoborus*-Larven aus der Dauerkultur genommen und sechs Tage lang bei 12, 18 und 24 °C inkubiert. Für die Messungen des RNA-, DNA-Gehalts und des RNA/DNA-Verhältnisses wurden die *Chaobo-*

rus-Larven aus der Dauerkultur genommen und zwei Tage lang bei 4, 10, 24 und 30 °C inkubiert.

Leptodora kindtii

Nur für Laktatbestimmung wurden die Individuen von *Leptodora kindtii* inkubiert. Für die anderen Messungen wurden die Tiere direkt aus dem Teich verwendet.

Für die Laktatbestimmung wurden die Tiere in 2 ml Eppendorf-Reaktionsgefäßen (1 Tier pro Gefäß) mit filtriertem Seewasser eine oder drei Stunden bei 12,0; 13,3; 14,7; 16,0; 17,3; 18,6; 20,0; 21,3; 22,6 oder 24,0 °C inkubiert. Die erwünschte Wassertemperatur wurde mit Hilfe eines Thermoblocks erreicht.

Daphnia magna

Mit *D. magna* wurden zahlreiche Inkubationen bei verschiedenen Temperaturen und in unterschiedlichen Zeitabschnitten durchgeführt. Die ersten Versuche wurden in M4-Elendt-Medium und später in einem spezifischen Ernährungsmedium (siehe Medien und Puffer) durchgeführt. Die Inkubationen wurden in 250 ml Glasgefäßen, abgedichtet mit einer doppelten Parafilmschicht, durchgeführt. Übertragung der Tiere ins Glasgefäß mit Medium wurde in keimfreien Bedingungen unter der sterilen Werkbank (HeraSafe, Kendro Laboratory Products, Hanau) durchgeführt. Nach den Inkubationen wurden die Tiere gewogen und in flüssigem Stickstoff eingefroren und dann entweder direkt für Experimente verwendet oder in einer Gefriertruhe bei -80 °C aufbewahrt.

2.2. Methoden

2.2.1. Frischgewichtsbestimmung

Nach der Inkubation wurde eine bestimmte Anzahl von Tieren über ein Sieb vom Medium abgetrennt, im Milli-Q-Wasser gewaschen und in die 1,5 ml Eppendorfgefäße gegeben. Das restliche Wasser wurde mit einer Pipette abgesaugt und mit einem Papiertuch absorbiert. Mit Hilfe einer Feinwaage (Sartorius BP 211 D; Sartorius AG, Göttingen, Deutschland) wurde das Frischgewicht der Tiere bestimmt.

2.2.2. Mortalität

Für die Bestimmung der Mortalität von Büschelmücken-Larven wurden die Tiere im Winter direkt aus dem Teich genommen (Wassertemperatur 3,2 °C). In einem aus Kupfer gestalteten Thermoblock mit drei Reihen von je zehn Öffnungen wurden Eppendorfgefäße mit filtriertem Teichwasser (2 ml) untergebracht. Durch ein Thermostat wurde ein Temperaturgradient von 30 bis 42 °C eingestellt (30,0 °C / 31,3 °C / 32,7 °C / 34,0 °C / 35,3 °C / 36,7 °C / 38,0 °C / 39,3 °C / 40,6 °C / 42,0 °C). Zusätzlich wurde noch ein Versuch bei 28 °C durchgeführt. In jedem Gefäß wurden jeweils zwei Larven untergebracht. Die Mortalität der Tiere wurde nach 1, 3, 6, 12, 24 und 48 Stunden Inkubation bestimmt.

Zu jedem Zeitpunkt wurde die Temperatur berechnet, bei der die Hälfte der Tiere gestorben war (LT_{50} „Letaltemperatur“). Für die Temperaturen im kritischen Bereich wurden zusätzlich die Überlebensdauer berechnet, also wann jeweils die Hälfte der Tiere gestorben war (Lt_{50} „lethal time“).

2.2.3. Thermopräferenz

Ein Temperaturgradient wurde in einem Glasbehälter (Länge = 70 cm; Breite = 8,5 cm; Höhe = 3 cm) errichtet. Der Behälter wurde durch 2 PVC-Zwischenwände (Länge = 70 cm; Höhe = 2,5 cm) in drei Spuren aufgeteilt. Die Thermopräferenz der Glaskrebse wurde ohne Zwischenwände getestet. Der Glasbehälter wurde mit filtriertem Teichwasser bis zu ca. 0,5 cm Höhe gefüllt. Der Behälter wurde auf einer Aluminium-Platte untergebracht. Das erste Ende der Aluminium-Platte wurde durch eine Heizplatte erwärmt und das zweite wurde mit Eis abgekühlt. Auf diese Weise entstand während ca. zwei Stunden ein linearer, konstanter Temperaturgradient des Mediums von 13,5 °C bis 32,4 °C. Regelmäßig (jede Stunde) wurde die Mediumstemperatur an den beiden Enden des Glasbehälters kontrolliert und das Eis ergänzt.

Die *Chaoborus*-Larven, die für den Versuch verwendet wurden, wurden entweder direkt aus der Dauerkultur genommen oder sie waren zuerst drei und sieben Tage lang bei 20 °C akklimatisiert, bevor sie zur Messung gebraucht wurden. Die Glaskrebse wurden in der Talsperre gefangen und an dem gleichen Tag zur Messung genommen. Die Wassertemperatur der Talsperre betrug 19 °C.

Nachdem der Temperaturgradient des Mediums konstant blieb, wurden die Tiere in der Mitte des Glasbehälters (ca. 23,5 °C) untergebracht. Für die Messung der Thermopräferenz wurden 15 *Chaoborus*-Larven (fünf Tiere pro Kammer) und 5 *Leptodora kindtii* genommen. Die Thermopräferenz der beiden Tierarten wurde sieben Stunden lang getestet. Um phototaktisches Verhalten der Tiere zu vermeiden, wurde das ganze Experiment in der Dunkelheit durchgeführt. Nur während der regelmäßigen Kontrolle der Tierposition wurde kurz das Rotlicht angeschaltet.

2.2.4. Schwimmaktivität

Die Schwimmaktivität von *Chaoborus crystallinus* und *Leptodora kindtii* wurde in 20 ml Reagenzgläsern mit filtriertem Teich- bzw. See-Wasser, ermittelt. Es wurden jeweils drei Tiere pro Reagenzglas eingesetzt. Die Öffnung des Reagenzglases wurde mit einer doppelten Parafilmschicht und mit Hilfe von einem Gummiband abgedichtet und horizontal in einem schwarzen, 10-L-Plastikbehälter untergebracht und von einer dünnen Wasserschicht (ca. 3 – 4 cm) bedeckt. Die Temperatur des Wassers im Plastikbehälter und mittelbar in den Reagenzgläsern wurde durch ein Wasserbad (Typ K30, Funke Medingen, Freital) temperiert. Es wurden Körperbewegungen (*Chaoborus crystallinus*) und Antennenbewegungen (*Leptodora kindtii*) in einem Abschnitt von einer Minute erfasst. Die Körperbewegungen bzw. die Antennenbewegungen wurden mit Hilfe einer Videokamera und einem PC registriert.

Für die Messungen der Schwimmaktivität wurden die *Chaoborus*-Larven entweder direkt aus der Dauerkultur (4 °C) genommen oder sie waren zuerst sieben Tage bei 20 °C akklimatisiert und dann erst zum Experiment gebraucht. Die Schwimmaktivität von *Leptodora kindtii* wurden im August 2006 und 2007 erfasst. Die Wassertemperaturen der Talsperre am Entnahmeterrain betragen 19 °C (2006) und 21 °C (2007).

Die Schwimmaktivität der Tiere wurde stufenweise von der niedrigsten (5 bzw. 12 °C) bis zur höchsten (30 °C) Messtemperatur getestet. Außerdem wurden noch zwei zusätzlichen Kontrollmessungen bei der Temperatur durchgeführt, die dem Mittelwert des Thermogradienten und der Ausgangsmesstemperatur entsprach. Vor der ersten Messung wurden die Tiere in den Reagenzgläsern ca. 20 Minuten an die Temperatur des Wassers im Plastikbehälter gewöhnt. Die Zeit der Anpassung der Tiere an die neuen Messtemperaturen betrug drei Minuten. Im Fall der Kontrollmessungen

wurden die Tiere 15 Minuten an die Umgebungstemperatur angepasst, bevor ihre Schwimmaktivität gemessen wurde. Die Schwimmaktivität wurde jeweils dreimal pro Messtemperatur getestet und Mittelwert und Standardabweichung berechnet. Aus den Mittelwerten der drei Messreihen von *Chaoborus crystallinus* und *Leptodora kindtii* wurden der Mittelwert und der Standardfehler berechnet.

2.2.5. Sauerstoffverbrauchsrate

Der Sauerstoffverbrauch wurde mit Hilfe einer thermostatisierten, geschlossenen Glaskammer mit einem Innenvolumen von 3,5 ml (H. Saur; Reutlingen) erfasst. Die Abnahme des Sauerstoffpartialdrucks wurde ständig mit einer Sauerstoffelektrode (H. Saur; Reutlingen; Deutschland) gemessen. Während der Messung erhält man ein Spannungssignal, das der Sauerstoffkonzentration in der Respirometerkammer proportional ist. Für jede Messtemperatur wurden die Elektroden mit Stickstoffdurchsprudelmtem Wasser (im Fall der Glaskrebse Natriumdithionit, $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$) (Sauerstoffsättigung: 0%) und Luft (Sättigung: 100%) kalibriert. Um Sauerstoffverbrauch von Mikroorganismen zu vermeiden, wurde autoklaviertes Medium benutzt. Zusätzlich wurde für die Luftbegasung ein bakteriendichter Filter eingesetzt. Nach der Eichung und Akklimatisation der beiden Tierarten an die Experimentalbedingungen (1,5–2 h) wurde der Sauerstoffverbrauch von *Chaoborus*-Larven und *Leptodora kindtii* in 1,5 ml luftgesättigtem Sterilmedium gemessen. Es wurde eine Luftsättigungsdifferenz ΔS (%) während eines bestimmten Zeitraums Δt (h) gemessen. Aus diesen beiden Größen konnte die Sauerstoffverbrauchsrate der Tiere berechnet werden. Der Sauerstoffverbrauch wurde in μmol Sauerstoff pro g Frischgewicht (FG) pro Stunde berechnet. Berechnung der Sauerstoffverbrauchsrate wurde mittels folgender Formel errechnet:

$$\dot{M} = M \cdot \frac{\Delta S}{100\% \cdot \Delta t}$$

wo die Größe M (μmol) die in belüftetem Wasser (100%) gelöste Sauerstoffmenge darstellt. Sie wurde aus dem Flüssigkeitsvolumen V (l), dem Löslichkeitskoeffizienten von Sauerstoff im Süßwasser α ($\mu\text{mol l}^{-1} \text{ kPa}^{-1}$) und dem Sauerstoffpartialdruck P_{O_2} (kPa) errechnet, wie folgt:

$$M = V \cdot \alpha \cdot P_{O_2}$$

Der Sauerstoffpartialdruck ergibt sich aus der Differenz von Luftdruck P_L (mbar) und Wasserdampfdruck P_W ($P = P_L - P_W$), wobei der Faktor 0,209 den fraktionellen Anteil von O_2 in der Luft darstellt:

$$P_{O_2} = 0,209 \cdot (P_L - P_W)$$

Zu diesem Versuch wurden Büschelmückenlarven direkt aus dem Teich verwendet (Wassertemperatur des Teichs: 2 °C) oder die Tiere wurden zuerst sieben Tage bei 20 °C akklimatisiert und dann erst für das Experiment eingesetzt. Zwei gleich große Tiere (9 – 12 mm) wurden in der Messkammer untergebracht. Die Glaskrebse wurden im Sommer in der Saidenbach-Talsperre gefangen (Wassertemperatur des Reservoirs: 21 °C) und am gleichen Tag zur Messung verwendet. Es wurde je ein Tier (7 – 9 mm) in der Messkammer untergebracht. Die Sauerstoffverbrauchsrate von *Chaoborus*-Larven und *Leptodora kindtii* wurde während einer 1,5 – 2 Stunden Periode gemessen. Die Sauerstoffverbrauchsrate wurde bei 10, 20 und 30 °C (Büschelmückenlarven) oder 12, 21 und 30 °C (Glaskrebse) ermittelt.

2.2.6. Berechnung der kritischen P_{O_2} -Werte für *Chaoborus*-Larven

Mit der Berechnung der kritischen P_{O_2} -Werte für *Chaoborus*-Larven bei drei unterschiedlichen Umgebungstemperaturen (für die jeweilige temperaturspezifische O_2 -Verbrauchsrate) wurde abgeschätzt, welcher Sauerstoffpartialdruck für die aerobe Versorgung der Gewebe gerade ausreicht. Die Diffusionsrechnung wurde nach der Formel $P_c = a \cdot r^2 / 4K$ durchgeführt, mit a = volumen-spezifische Sauerstoffverbrauchsrate ($\text{nmol h}^{-1} \text{mm}^3$), K = Krogh's Diffusionskonstante ($\text{nmol s}^{-1} \text{mm}^{-1} \text{kPa}^{-1}$), und r = Radius des Zylinders (μm).

2.2.7. NADH-Fluoreszenz

Die NADH-Fluoreszenzmessung von einzelnen, intakten *Chaoborus*-Larven und *Leptodora kindtii* erfolgte mittels eines Spektral-Fluorometers (Typ 650-10LC, Perkin-Elmer, Überlingen, Xenonlampe XBO 150W/1 OFR, Osram, Augsburg; mit

Netzteil: Modell HA-5A short ARC power supply, Radiation Power Systems, San Jose, CA, USA). Über einen Zeitraum von zwei Minuten wurde die Fluoreszenzintensität integriert (140 Signale). Zur Null-Justierung wurde ein Multimeter (Typ: TDM 600, TOP-CRAFT, Meister Werkzeuge, Wuppertal) verwendet. Für die Bestimmung des zellulären Redox-Status anhand der NADH-Fluoreszenz wurden die Tiere in die mit 500 ml filtriertem Teich- bzw. See-Wasser gefüllte Küvette untergebracht. (Vorversuche zur Optimierung und Einstellung der Messparameter siehe Kluge, 2007).

Die Temperatur in der Küvette wurde während der NADH-Fluoreszenzmessung in 3 °C Schritten von 12 auf 30 °C erhöht und anschließend unmittelbar wieder auf 12 °C zurückgeführt. Die Anpassungsphasen an die jeweilige Temperatur betrug vor der ersten NADH-Fluoreszenzmessung 30 Minuten und jeweils 20 Minuten (*Chaoborus*) oder 12 Minuten (*Leptodora kindtii*) für die folgenden Temperaturen. Vor der letzten Messung, bei der die Messtemperatur von 30 °C auf 12 °C zurückgeführt wurde, betrug die Inkubationszeit ebenfalls 30 Minuten. Bei jeder Messtemperatur wurden jeweils drei zweiminütige Messungen durchgeführt.

Nach der Messung jeder Temperaturstufe wurde das M4-Elendt-Medium in der Küvette durch frisches, mit Luft besprüdeltes Medium (Membran-Luftpumpe, Typ R.101, RENA) ersetzt. Der Mediumsaustausch garantierte gesättigte Sauerstoffbedingungen in der Küvette während der NADH-Messung. Die Büschelmücken-Larven wurden entweder direkt aus der Dauerkultur verwendet (Hälterungstemperatur: 4 °C) oder vor der Messung sieben Tage bei 20 °C inkubiert. Die Glaskrebse wurden am Messtag morgens aus der Talsperre entnommen und bis zur Messung in filtriertem Seewasser aufbewahrt. Die Werte wurden in Bezug zum gemittelten Messwert bei der Ausgangstemperatur (12 °C) standardisiert.

2.2.8. Herzfrequenz

Für die Messungen der Herzfrequenz wurden die *Chaoborus*-Larven entweder direkt aus der Dauerkultur (4 °C) genommen oder zuvor sieben Tage bei 20 °C akklimatisiert. Die Messungen wurden bei unterschiedlichen Umgebungstemperaturen in einer thermostatisch regulierten Tierkammer ($\pm 0,1$ °C; vgl. Paul et al., 1997) durchgeführt, die von M4-Elendt-Medium mittels einer peristaltischen Pumpe bei einer Durchflussmenge von 5 ml/min durchströmt wurde.

Das Medium wurde mit einem normokapnischen (CO₂: 0,03%) Luft-Stickstoff-Gemisch (50%) besprudelt, das mit einer Gasmischpumpe (Wösthoff, Bochum) erzeugt wurde. Die Temperatur und der Sauerstoffgehalt des Mediums wurde durch einen Temperatursensor (Durchmesser 0,3 mm, Type MT-29/1, Science Products, Hofheim) in der Kammer und durch einen verbundenen Sauerstoff- und Temperatursensor (WTW Oxi 3000; Weilheim) im Abfluss der Tierkammer gemessen. Die Tiere wurden mit ihrer dorsalen Seite durch Gewebeklebstoff an eine dünne Insektenadel in einem kleinen PVC-Würfel (siehe Pirow et al., 2001) fixiert. Nach der Gewöhnung an die experimentellen Bedingungen für 30 Minuten wurde die Herzfrequenz eine Minute lang gemessen. Die Umgebungstemperatur wurde von 6 °C bis 30 °C in Schritten von 3 °C erhöht und anschließend unmittelbar wieder auf 12 °C zurückgeführt. Bevor die Herzfrequenz bei der nächsten Temperatur gemessen wurde, wurden die Tiere jeweils 10 Minuten an die neue Bedingung gewöhnt. Vor der letzten Messung, bei der die Messtemperatur von 30 °C auf 12 °C zurückgeführt wurde, betrug die Inkubationszeit ebenfalls 30 Minuten. Bei jeder Umgebungstemperatur wurden jeweils drei Messungen durchgeführt.

2.2.9. Präparation des Rohextraktes

Für die Metabolitbestimmung wurden fünf *Chaoborus*-Larven nach Zugabe einer definierten Menge Wasser (neunzehnfaches Gewicht des Tiergewichts) bei 70 °C denaturiert und homogenisiert. So vorbereiteter Extrakt wurde in fünf Portionen aliquotiert.

Für die Messung der LDH-Aktivität wurden drei *Chaoborus*-Larven genommen. Die Tiere wurden mit Wasser in 1,5 ml Eppis mit einem Plastikpistill homogenisiert. Um Abbau durch Proteasen zu verhindern, wurden Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF) und Ethylendiamintetraacetat (EDTA) in einer Endkonzentration von jeweils 1 und 10 mM zugegeben.

Zur Bestimmung des Gesamtproteingehaltes erfolgte eine Verdünnung des Frischgewichtes von *D. magna* im Verhältnis 1:10 mit Wasser, dem die Proteasehemmer Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF) und Ethylendiamintetraacetat (EDTA) in einer Endkonzentration von jeweils 1 und 10 mM zugegeben worden waren. Die Tiere

wurden in 1,5 ml Eppis mit einem Plastikpistill homogenisiert. Anschließend wurden die Rohextrakte zentrifugiert (12.000 x g , 10 Minuten, 4 °C) und der Überstand für die Messung im Bradford-Test (Bradford, 1976) verwendet (Dreifachbestimmung).

2.2.10. Metabolitbestimmung und Analyse der Enzymaktivität

Die Bestimmung der Konzentration von Kohlenhydraten, anaeroben Metaboliten und LDH-Aktivität in *Chaoborus*-Larven und *Leptodora kindtii* erfolgte mit einem Lumineszenz-Spektrometer (LS 50 B, Perkin Elmer, Boston, USA) in einer 1,0 cm Quarz-Küvette. Die Fluoreszenzintensität wurde bei $\lambda_{\text{ex}} = 340 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 460 \text{ nm}$ (Fluoreszenzmaximum von NADH bzw. NADPH) ermittelt. Pro Probe wurden Doppelbestimmungen von Rohextrakten durchgeführt. Zuvor wurden Eichgeraden mit bekannter Konzentration von NADH und NADPH angefertigt.

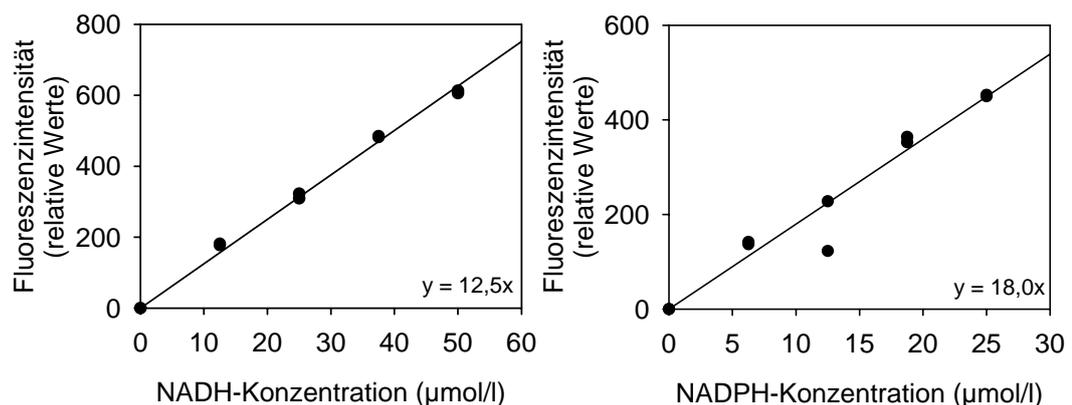
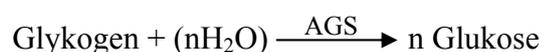


Abb. 5. Eichgeraden mit bekannten Konzentrationen von NADH und NADPH

2.2.10.1. Glykogen- und Glukose-Bestimmung im fluorimetrischen Test

Glykogen- und Glukose-Konzentration wurden nach der Methode von Kunst et al. (1984) über die NADPH-Fluoreszenzintensität ermittelt. Die Konzentrationen der beiden Kohlenhydrate wurden in zwei Teilproben bestimmt. Im ersten Aliquot wurde nur Glukose gemessen. Im zweiten Aliquot wurde Glukose erst nach Hydrolyse des Glykogens mit Amyloglucosidase (AGS) zu Glukose gemessen.

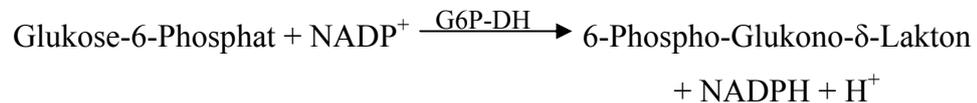


Das pH-Optimum der Amyloglucosidase liegt bei pH 4,8, deshalb wurde 1 M Acetatpuffer (pH 4,8) verwendet. Die Konzentration des Glykogens wurde aus der Differenz beider Messungen berechnet. Nach der Zugabe einer definierten Menge (1/6 des Homogenates) Acetatpuffer zu beiden Teilproben und Amyloglucosidase nur in den zweiten Ansatz wurden die Proben für 5 Stunden bei 37 °C inkubiert, zentrifugiert (14.000 bei 4 °C für 20 Minuten) und die Überstände wurden entweder sofort für die enzymatische Bestimmung verwendet oder sie wurden bei -80 °C eingefroren und bis zum Beginn des Experiments aufbewahrt.

Im enzymatischen Test auf Glukose wird dieses Kohlenhydrat durchs Enzym Hexokinase (Hk) und Adenosin-5'-triphosphat (ATP) zu Glukose-6-Phosphat (G-6-P) phosphoryliert.



Mittels des Enzyms Glukose-6-phosphat-Dehydrogenase (G-6-P-DH) wird G-6-P von Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat (NADP^+) zu Glukonat-6-Phosphat oxidiert, wobei NADP^+ zu NADPH reduziert wird. Die entstehende NADPH-Menge ist der Glukose-Menge äquivalent.



Die Reaktion wurde durch Zugabe der Enzyme Hexokinase und Glukose-6-phosphat-Dehydrogenase gestartet und für eine stunde bei Raumtemperatur (ca. 20 °C) inkubiert. Die Differenz der Fluoreszenzintensität vor und nach der Reaktion nach Abzug der Fluoreszenz des Leerwertes (Probe ohne Rohextrakt) ergab die Fluoreszenzintensität, die der entstehenden NADPH-Menge und damit Glukose-Konzentration entspricht.

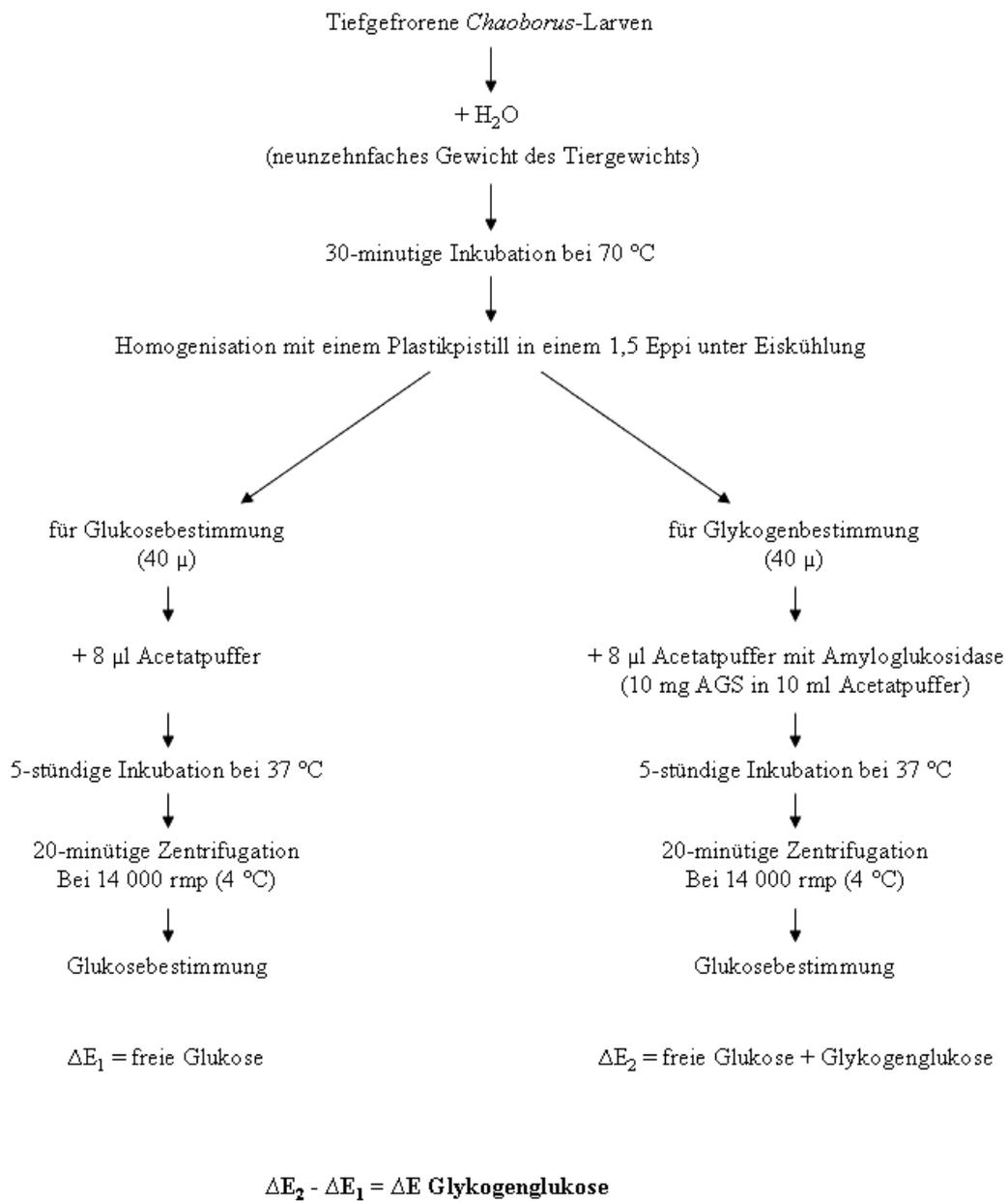


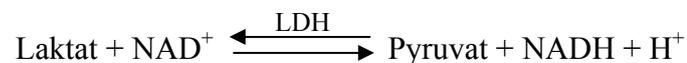
Abb. 6. Schema der Glukose- und Glykogenbestimmung im Rohextrakt der Büschelmückenlarven

Tab. 1. Testsystem zur Bestimmung Glykogen- und Glukose-Konzentration

Substanz	Konzentration der Stammlösung (mM)	Volumen (μ l)	Endkonzentration im Test (mM)
TRA/HCL-Puffer (pH 7,6) mit MgSO ₄	750	340	637,5
	10		8,5
NADP ⁺	11,5	10	0,3
ATP	81	10	2,0
Rohextrakt	–	15	–
H ₂ O	–	15	–
<u>Start:</u>			
Hexokinase	≈ 12,5 U/ ml	5	≈ 0,16 U/ ml
G6P-DH	≈ 17,6 U/ ml	5	≈ 0,22 U/ ml

2.2.10.2. Bestimmung der L-Laktat-Konzentration

Die L-Laktat-Konzentration wurde enzymatisch nach Gutmann und Wahlefeld (1974), geändert nach Engel und Jones (1978), über die NADH Fluoreszenz-Intensität bestimmt. Im enzymatischen Test wird dieser Metabolit durchs Enzym Laktatdehydrogenase in Gegenwart von Nicotinamidadenindinukleotid (NAD⁺) zum Pyruvat oxidiert, wobei NAD⁺ zum NADH reduziert wird.



Die entstehende NADH-Menge ist das Laktat-Äquivalent. Basierend auf einer Eichkurve mit bekannter NADH-Konzentration konnten die L-Laktat-Konzentration in den Proben quantifiziert werden.

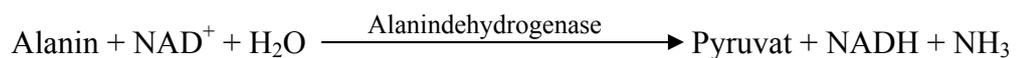
Nach Zentrifugation (12.000 g bei 4 °C für 15 Minuten) wurde der Überstand für die enzymatische Bestimmung verwendet (LDH Inkubation: 1 h, 37 °C). Die Differenz der Fluoreszenzintensität vor und nach der Reaktion nach Abzug der Fluoreszenz des Leerwertes (Probe ohne Rohextrakt) ergab die Fluoreszenzintensität, aus der die Laktat-Konzentration berechnet wurde.

Tab. 2. Testsystem zur Bestimmung L-Laktat-Konzentration

Substanz	Konzentration der Stammlösung (mM)	Volumen (μ l)	Endkonzentration im Test (mM)
Glycin/Hydrazin- Puffer (pH 9,0):		340	
Glycin	900		765
Hydrazin	750		637,5
NAD ⁺	40	10	1
Rohextrakt	–	20	–
H ₂ O (bidest)	–	20	–
<u>Start:</u>			
L-LDH	2,5 mg/ ml	10	0,06 mg/ ml

2.2.10.3. Bestimmung der L-Alanin-Konzentration

Die L-Alanin-Konzentration wurde enzymatisch nach Bergmeyer (1983) bestimmt. Alanin wird durch das Enzym Alanindehydrogenase und in Gegenwart des Co-substrats Nicotinamidadenindinukleotid (NAD⁺) zu Pyruvat oxidiert, wobei NAD⁺ zum NADH reduziert wird.



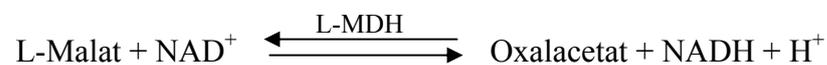
Die Dauer der ADH-Inkubation betrug eine Stunde, Inkubation und Messung erfolgten bei Raumtemperatur (ca. 20 °C).

Tab. 3. Testsystem zur Bestimmung L-Alanin-Konzentration

Substanz	Konzentration der Stammlösung (mM)	Volumen (μ l)	Endkonzentration im Test (mM)
NaHCO ₃ /Na ₂ CO ₃ -Puffer (pH 10,0)	50	520	44,8
NAD ⁺	40	20	1,4
Rohextrakt	–	20	–
<u>Start:</u> L- Alanin- dehydrogenase	≈ 10 U/ ml	20	$\approx 0,34$ U/ ml

2.2.10.4. Bestimmung der L-Malat-Konzentration

L-Malat wurde enzymatisch nach der Methode von Boehringer Mannheim/R-Biopharm (Best. Nr. 10 139 068 035) bestimmt. Im enzymatischen Test wird das Malat in Gegenwart von Nicotinamidadeninukleotid (NAD⁺) durch das Enzym L-Malatdehydrogenase (L-MDH) zum Oxalacetat oxidiert.



Das Gleichgewicht dieser Reaktion liegt auf der Seite von L-Malat. Es wird durch Abfangen des Oxalacetats mit Hilfe der nachgeschalteten Reaktion mit dem Enzym Glutamat-Oxalacetat-Transaminase (GOT) in Gegenwart von L-Glutamat auf die Seite von Oxalacetat und NADH verschoben.



Die entstehende NADH-Menge ist das Malat-Äquivalent. Basierend auf einer Eichkurve mit bekannten NADH-Konzentrationen konnten die NADH- und L-Malat-Konzentration in den Proben quantifiziert werden.

Die Messungen wurden bei Raumtemperatur (ca. 20 °C) durchgeführt und die Dauer der Inkubation mit den Enzymen betrug 10 Minuten bei 20 °C.

Tab. 4. Testsystem zur Bestimmung L-Malat-Konzentration

Substanz	Konzentration der Stammlösung (mM)	Volumen (μ l)	Endkonzentration im Test (mM)
Glycylglycin-Puffer (pH 10,0) mit L-Glutaminsäure	100	250	45
NAD ⁺	53	50	4,8
GOT	≈ 40 U/ ml	10	$\approx 0,7$ U/ ml
Rohextrakt	–	20	–
H ₂ O (bidest)	–	215	–
<u>Start:</u> L-MDH	≈ 600 U/ ml	10	$\approx 10,8$ U/ ml

2.2.10.5. Untersuchung der LDH-Aktivität

Die LDH-Aktivität wurde nach Bergmeyer et al. (1983) ermittelt. In diesem Test wird das Pyruvat durch das Enzym Laktatdehydrogenase in Gegenwart von Nicotinamidadenosindinukleotid (NADH) zum Laktat reduziert, wobei NADH zum NAD⁺ oxidiert wird.



Die Oxidation der NADH-Moleküle während der Reaktion vermindert die Fluoreszenzintensität der gemessenen Proben. Basierend auf einer Eichkurve bekannter NADH-Konzentrationen konnte die Umsatzrate des Enzyms berechnet werden. Die Homogenate wurden zentrifugiert (14.000 g bei 4 °C für 15 Minuten) und der Überstand für die Messung verwendet. Bevor die Laktatdehydrogenase-Aktivität (LDH-Aktivität) im Rohextrakt der unterschiedlich akklimatisierten Büschelmückenlarven getestet wurde, wurde zuerst das pH-Optimum des Enzyms bestimmt. Die Umsatzrate der LDH wurde in Phosphatpuffer der pH-Werte 4,3; 5,0; 6,0; 6,5; 7,0; 7,5; 8,0 und 9,0 gemessen. Als Substrat für LDH wurde Pyruvat in einer Konzentration von 5,0 mM gebraucht.

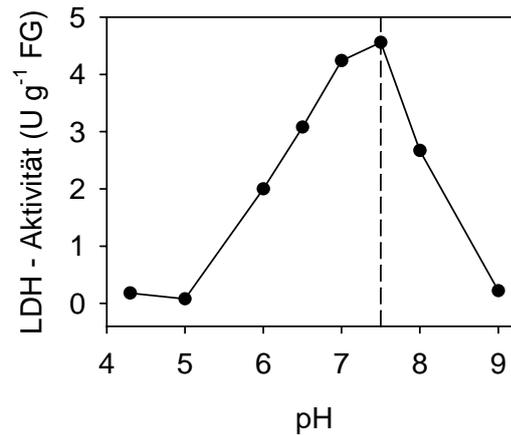


Abb. 7. pH-Optimum der LDH-Aktivität von *Chaoborus*-Larven

Der Puffer mit einem pH von 7,5 erwies sich als optimal. Es wurden Doppelbestimmungen von jeweils 3 verschiedenen Rohextrakten durchgeführt. Pyruvat wurde in unterschiedlichen Konzentrationen (0,05; 0,125; 0,25; 0,5; 1,0; 2,0; 3,0; 4,0 und 5,0 mM) als Substrat für LDH verwendet, die Konzentration des Cofaktors NADH betrug konstant 5,0 mM. Die Messungen der LDH-Aktivität wurden bei der Temperatur durchgeführt, bei der die Larven akklimatisiert wurden, d.h. bei 12, 18 und 24 °C. Das Photometer (Ultrospec 3000, Pharmacia Biotech, Freiburg) wurde durch ein angeschlossenes Wasserbad temperiert. Der Rohextrakt wurde unmittelbar vor der Messung aufgetaut und direkt in die Küvette mit der vorinkubierten Lösung untergebracht und mit einem kleinen Plastikspatel umgerührt. Die Extinktion wurde zwei Minuten lang aufgezeichnet. Die LDH-Aktivität wurde nach Berücksichtigung aller Verdünnungen in U g⁻¹ FG berechnet. K_m^{PYR} -Werte wurden mit dem so genannten Lineweaver-Burk-Plot (Cornish-Bowden, 2004) unter Verwendung einer Regressionsgerade berechnet, wo auf den Achsen die reziproke LDH-Aktivität der Reaktion und die reziproke Pyruvatkonzentration in der Küvette aufgetragen wurden. Aus dem Schnittpunkt der Regressionsgeraden mit der X-Achse konnte die Pyruvatkonzentration bestimmt werden, bei der die Umsatzrate halbmaximal ist (K_m^{PYR} -Wert).

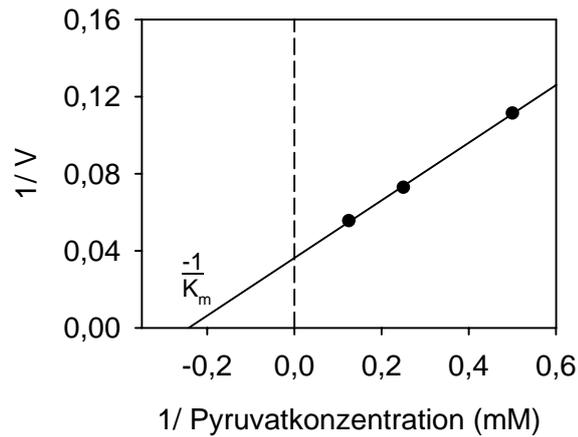


Abb. 8. Lineweaver-Burk-Plot

Diese K_m^{PYR} -Werte wurden als Parameter für die Berechnung der $V_{\text{max}}^{\text{PYR}}$ und $K_{\text{si}}^{\text{PYR}}$ gebraucht und ein nichtlinearer Fit des Programms SigmaPlot[®] Version 8.0 (Jandel Scientific, 2002) mit der folgenden Gleichung verwendet:

$$f = V_{\text{max}} * S / (K_m + S + S^2 / K_{\text{si}})$$

Tab. 5. Testsystem zur Bestimmung der LDH-Aktivität

Substanz	Konzentration der Stammlösung (mM)	Volumen (μl)	Endkonzentration im Test (mM)
Phosphat-Puffer (pH 7,5)	50	320	40
NADH	20	5	0,25
Pyruvat	2	10	0,05
	5		0,125
	10		0,25
	20		0,5
	40		1,0
	80		2,0
	120		3,0
	160		4,0
	200		5,0

Substanz	Konzentration der Stammlösung (mM)	Volumen (μ l)	Endkonzentration im Test (mM)
H ₂ O (bidest)	–	60	–
<u>Start:</u> Rohextrakt	–	5	–

2.2.11. Bestimmung des Gesamtproteingehalts nach Bradford

Diese Methode wird zur quantitativen Ermittlung der Proteinmenge einer Probe verwendet. Das Testprinzip liegt in den Eigenschaften des Farbstoffs Coomassie-Brilliant-Blau (CBB), dessen Absorptionsmaximum sich in Gegenwart von Proteinen in saurem Milieu von 465 nm nach 595 nm verschiebt. Dieser Farbstoff bindet an Proteine (kationische und hydrophobe Seitenketten, Arginin, Lysin, Histidin, Tryptophan, Tyrosin und Phenylalanin (Lottspeich, 2006) und die Extinktionszunahme kann photometrisch bei 595 nm gemessen werden. Die Bestimmung des Gesamtproteingehalts in *Daphnia magna* erfolgte mit einem Photometer (Ultrospec 3000; Pharmacia Biotech, Freiburg) und Kunststoffküvetten (Einweg Brand GmbH + Co KG, Wertheim). Zuvor wurde eine neue Eichgerade mit bekannter Konzentration von Rinder-Serum Albumin (BSA) (0; 0,10; 0,25; 0,50 und 0,75 mg/ml) erstellt. Je 20 μ l Probe wurden mit 1 ml verdünntem (1 : 7) Bradfordreagenz vermischt. Die Differenz der Extinktion vor und nach der Zugabe der Probe (Reaktionsdauer von exakt 10 Minuten bei Raumtemperatur) entsprach der Protein-Konzentration. Es wurde eine Doppelbestimmung aus drei Rohextrakten durchgeführt.

2.2.12. Quantifizierung von RNA und DNA

Die Quantifizierung von RNA und DNA wurde nach Vrede et al. (2002) und Berdallet et al. (2005) mit einem Lumineszenz-Spektrometer (LS 50 B, Perkin Elmer, Boston, USA) in einer 1,0 cm Quarz-Küvette durchgeführt. Die Fluoreszenz wurde bei $\lambda_{\text{ex}} = 480 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 526 \text{ nm}$ getestet. Als spezifischer Fluoreszenzfarbstoff wurde SYBR Green II[®] verwendet.

Für jede Akklimatisationsbedingung wurden Doppelbestimmungen aus drei Rohextrakten durchgeführt. Zuvor wurden Eichgeraden mit bekannter Konzentration von RNA und DNA angefertigt.

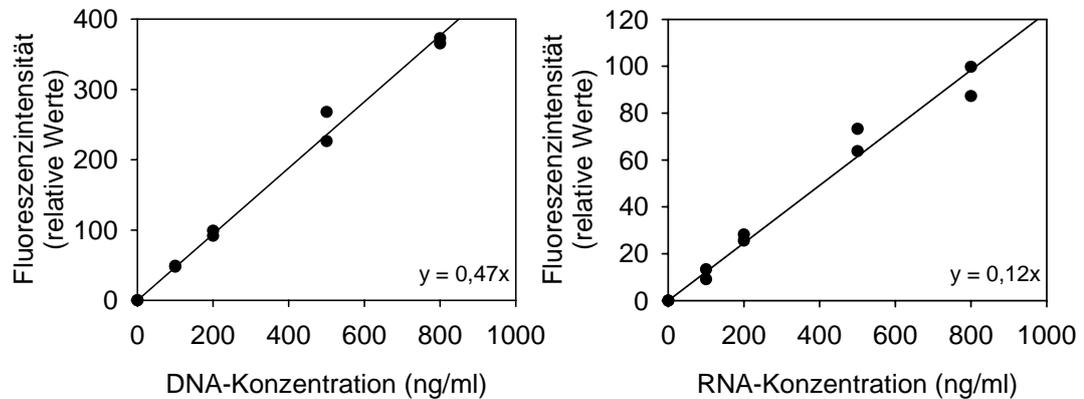


Abb. 9. Eichgeraden mit bekannten Konzentrationen von DNA und RNA

Für diese Experimente wurden jeweils ca. 15 Daphnien oder eine *Chaoborus*-Larve verwendet. Die inkubierten Tiere wurden über ein Sieb vom Medium abgetrennt, im Milli-Q-Wasser gewaschen und in 1,5 ml Eppendorfgefäßen untergebracht. Das restliche Wasser wurde mit einer Pipette abgesaugt und von einem Papiertuch absorbiert. Abschließend wurden die Tiere gewogen, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ aufbewahrt.

RNA- und DNA-Extraktion erfolgte mit TE-Puffer (10 mM Tris-HCl; 1 mM EDTA; pH 7,6; RNase- und DNase-frei). Der Puffer enthielt Triton X-100 (Endkonzentration = 0,1%) und Proteinase K (Endkonzentration = $0,1\text{ mg ml}^{-1}$).

Extraktionspuffer wurde im Volumen vom 10- (*Daphnia magna*) bis 40-fachen (*Chaoborus crystallinus*) Gewicht der Tiere in die Eppendorfgefäße gegeben und mit einem konischen Potter homogenisiert. Die Eppendorfgefäße mit dem Homogenat und einem Pistill (ca. 1,5 cm) wurden verschlossen und auf einem Schüttler (200 Upm) in der Dunkelheit für eine Stunde und bei Raumtemperatur (ca. $20\text{ }^{\circ}\text{C}$) inkubiert. Nach einer Stunde wurde das Pistill herausgenommen, die Proben durchmischt und aus jedem Eppendorfgefäß zweimal $5\text{ }\mu\text{l}$ des Homogenats entnommen und in zwei neue Eppendorfgefäße aufgeteilt. Dazu wurden jeweils $195\text{ }\mu\text{l}$ TE-Puffer und $200\text{ }\mu\text{l}$ SYBR Green II[®] (Verdünnung = 1 : 2800) zugegeben. Die Proben wurden durchmischt und auf einem Schüttler (200 Upm) in der Dunkelheit für 5 Minuten und bei Raumtemperatur gemischt. Dann wurde die Fluoreszenzintensität mit einem Lu-

mineszenz Spektrometer ($\lambda_{\text{ex}} = 480 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 526 \text{ nm}$) in einer Quarzküvette getestet. Danach wurde die Probe zurück ins Eppi gefüllt. Es wurde 25 μl RNase (Endkonzentration = 4 Kunitz U $\text{ml}^{-1} = 0,4 \text{ mg ml}^{-1}$) zugegeben, durchmischt und die Eppi in einem Heizblock dunkel für 20 Minuten bei 37 °C (optimale Temperatur für die RNase) inkubiert. Nach 20 Minuten Inkubation wurden die Proben durchmischt und ihre Fluoreszenzintensität erneut gemessen (diesmal wird nur der Komplex DNA-SYBR Green II[®] erfasst). Die Differenz der Fluoreszenzintensität vor und nach Zugabe der RNase und Abzug der Leerwerte ergaben die bereinigten Werte der RNA- und DNA- Fluoreszenzintensität.

$$\Delta F. \text{ der zweiten Messreihe} - \Delta F. \text{ der Leerwerte der zweiten Messreihe} =$$

$\Delta\text{DNA-Fluoreszenz}$

$$\Delta F. \text{ der ersten Messreihe} - \Delta F. \text{ der Leerwerte der ersten Messreihe} - \Delta\text{DNA-}$$

Fluoreszenz = **$\Delta\text{RNA-Fluoreszenz}$**

Basierend auf einer Eichkurve mit bekannten RNA- und DNA-Konzentration, konnten die Nukleinsäuren in den Proben quantifiziert werden.

Tab. 6. Testsystem zur Quantifizierung von DNA und RNA

Substanz	Konzentration der Stammlösung	Volumen (μl)	Endkonzentration im Test für RNA- und DNA-Quantifizierung
Rohextrakt aus Tieren und TE-Puffer - Tris-HCl - EDTA (pH 7,6) mit Triton X-100 und Proteinase K	10 mM 1 mM 0,1% 0,1 mg/ ml	5	0,125/ 0,12 mM 0,0125/ 0,012 mM 0,00125/ 0,0012% 0,00125/ 0,0012 mg/ml
SYBR Green II [®]	4 x	200	2 /1,9 x
DEPC-Wasser	-	195	-

<u>Start der Hydrolyse</u> von RNA: RNase	4 Kunitz U ml ⁻¹ = 0,4 mg ml ⁻¹	25	≈ 0,23 Kunitz U ml ⁻¹ ≈ 0,023 mg ml ⁻¹
---	--	----	---

2.2.13. Extraktion der genomischen Daphnien-DNA

Die molekularbiologischen Grundtechniken wurden nach Sambrook et al. (1989) durchgeführt. Die Präparation der Gesamt-DNA wurde modifiziert nach Kato et al., 2001 durchgeführt. Dabei wurden ca. 30 Tiere für die Extraktion eingesetzt. Die Daphnien wurden über ein Sieb vom Medium abgetrennt, in Milli-Q-Wasser gewaschen und in 1,5 ml Eppendorfgefäße überführt. Das restliche Wasser wurde mit einer Pipette abgesaugt und von einem Papiertuch absorbiert. Abschließend wurden die Tiere gewogen, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80 °C aufbewahrt.

Zu den aufgetauten Tieren wurde steriles Wasser zugegeben, so dass das Tiergewicht zusammen mit Wassergewicht 100 mg betrug und beides mit einem konischen Potter homogenisiert. Dann wurde einem Drittel des Tier-Volumens entsprechend DNA-Extraktionspuffer hinzu gegeben, anschließend durchmischt und die Probe abzentrifugiert. Nach 5 Minuten bei 70 °C wurde erneut homogenisiert und anschließend zentrifugiert (14.000 × g, 15 Minuten 4 °C). Der Überstand wurde abgenommen und in ein neues Eppendorfgefäß überführt. Durch Zugabe von 5 M Kalium-Acetat-Lösung (ein Viertel des Volumens des Überstands) und Inkubation für 30 Minuten auf Eis wurden die Proteine ausgefällt und abzentrifugiert (14.000 × g, 15 Minuten, 4 °C). Abschließend erfolgte eine Extraktion der DNA aus dem Überstand durch eine Phenol- und Phenol/Chloroform/Isoamyl-Fällung. Der abgenommene Überstand wurde mit Phenol im Verhältnis 1 : 1 gemischt, durchmischt und bei 14.000 × g für 15 Minuten bei 4 °C zentrifugiert. Zu dem abgenommenen Überstand wurde Phenol/Chloroform/Isoamyl, PCI (25 : 24 : 1 v/v) im Verhältnis 1 : 1 zugegeben und danach erfolgte eine Zentrifugation (14.000 × g, 15 Minuten, 4 °C). Abschließend fand die Isopropanol-Fällung des Überstands mit 0,8 Vol. Isopropanol statt. Dann wurden die Proben für 30 Minuten bei -20 °C inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation (14.000 × g, 15 Minuten 4 °C) wurde der Überstand verworfen und das Pellet zweimal gewaschen, d.h. mit 500 µl eiskaltem 70%igen Ethanol überschichtet und bei 12.000 × g für 5 Minuten bei 4 °C zentrifugiert. Danach wurde der Überstand

verworfen und das weiß erscheinende Pellet wurde auf dem Heizblock bei 37 °C getrocknet. Das Pellet wurde in 40 µl DNA-Puffer (10 mM Tris-HCl, pH 8,1 mM EDTA) aufgenommen und bei -80 °C gelagert. Zur Bestimmung der Konzentration wurde 1 µl der DNA mit sterilem Wasser (1 : 80) verdünnt und im Photometer die Extinktion wurde bei $\lambda = 260$ nm gemessen.

2.2.14. Extraktion der gesamten Daphnien-RNA mit RNAiso[®]

Für die Präparation der Gesamt-RNA wurden 30 Tiere eingesetzt. Die Daphnien wurden über ein Sieb vom Medium abgetrennt, in Milli-Q-Wasser gewaschen und in 1,5 ml Eppendorfgefäße untergebracht. Das restliche Wasser wurde mit einer Pipette abgesaugt und von einem Papiertuch absorbiert. Abschließend wurden die Tiere gewogen, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80 °C aufbewahrt.

Die aufgetauten Tiere wurden in 1 ml RNAiso[®] resuspendiert. Die Proben wurden 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und ca. alle 2 Minuten kräftig durchmischt. Dann wurde 200 µl Chloroform zugegeben und 15 Sekunden kräftig geschüttelt. Danach erfolgte 3-minütige Inkubation bei Raumtemperatur. Nach der Inkubation wurden die Proben bei $12.000 \times g$ für 15 Minuten und bei 4 °C zentrifugiert. Die wässrige Phase, die ca. 60% des eingesetzten Volumens RNAiso[®] ausmachte, enthielt die RNA und wurde abschließend in ein neues Eppendorfgefäß überführt und daraus die RNA mit Isopropanol gefällt.

Präzipitation, Waschen und Lösen:

RNA (wässrige Phase) wurde mit 0,5 ml Isopropanol gemischt und 10 Minuten bei -20 °C gefällt. Nach der Inkubation wurden die Proben bei $12.000 \times g$ für 10 Minuten bei 4 °C zentrifugiert. Dann wurde Überstand abgenommen und das Pellet mit 1 ml eiskaltem 75% Ethanol_{DEPC} (mit DEPC-H₂O angesetzt) für 10 Minuten bei -20 °C gewaschen. Danach erfolgte eine Zentrifugation bei $7.500 \times g$ für 5 Minuten bei 4 °C. Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen und das Pellet wurde auf dem Heizblock bei 37 °C getrocknet bis es langsam „unsichtbar“ wurde. Man musste dabei sehr aufpassen und das Pellet nicht zu lange trocknen, sonst hätte es sich nicht mehr gelöst. Das trockene Pellet wurde in 40 µl sterilem Wasser (zweimal autoklaviert) aufgenommen und bei -80 °C gelagert. Zur Bestimmung der Konzentration wurde 1 µl der RNA mit sterilem Wasser (1 : 80) verdünnt und mit Hilfe eines Photometers getestet.

2.2.15. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Bevor die extrahierte DNA für semiquantitative PCR verwendet wurde, wurden die Proben auf das Frischgewicht der Tiere normiert. Die PCR für bestimmte Gene wurde dreimal mit drei getrennt extrahierten DNA-Templates jeder Inkubationstemperatur gemacht. Die PCR wurde für die Gene von Hämoglobin, Hsp70, rDNA und Actin durchgeführt.

Für die Polymerase-Kettenreaktion wurde ein Standard-Protokoll (Invitrogen) eingesetzt. Je nachdem welche Primer verwendet wurden, wurde das Protokoll modifiziert. Die Annealing-Temperatur wurde 1 - 2 °C unter der Schmelztemperatur gewählt. Bei der Einstellung der Elongationszeit wurden pro 1 kb des amplifizierten Produkts 45 Sekunden eingestellt. Ein einfacher Ansatz (50 µl) enthielt:

100-200 ng g⁻¹ FG Template
5,0 µl 10x Se genetic PCR-Puffer
1,0 µl dNTP-Gemisch (je 10 mM dATP, dCTP, dGTP und dTTP)
1,0 µl *downstream*-Primer (10 µM)
1,0 µl *upstream*-Primer (10 µM)
0,2 µl Se genetic Taq DNA-Polymerase
steriles H₂O ad 50µl

Die PCR-Bedingungen wurden im Thermocycler wie folgt programmiert:

94 °C 2 Minuten
94 °C 20 s
50-65 °C 20 s (je nach Primer 24-36 Zyklen)
72 °C 30 s
72 °C 10 Minuten

Für die Klonierung der Gene Actin, Hsp70, Hämoglobin und 18S rDNA wurden folgende Primer ausgewählt:

act-4_up 790 : 5'-AAAAGGAAATCACCGCCCTT-3'

act-4_lo 790 : 5'-TGAAAACGTCAAGAGAGACG-3'

Hsp70_up : 5'-GTGCAGTCAGACATGAAACATTGGCC-3'

Hsp70_lo : 5'-GATACATCAAAGGTACCGCCACC-3'

HbDb_for : 5'-GACTGTGACTACCACTGTCA-3'

HbDb_rev : 5'-CCACCGAATTGCTCGAACAT-3'

Dm18SrDNA-F : 5'-ACCGCCGCAAGACGAACAACAG-3'

Dm18SrDNA-R : 5'-AGCCGAAACCCCGAACACCAAC-3'

Für diese Reaktionen wurden das Triple Master© Enzymgemisch verwendet. Die Amplifikation erfolgte nach den Angaben des Herstellers. Die Annealing-Temperaturen betragen: 51 °C für Actin, Hsp70 und Hämoglobin und 65 °C für 18S rDNA und die Elongationszeit für alle Ansätze 2 Minuten. Anzahl der Zyklen für die jeweiligen Gene betrug: 36 (Actin), 33 (Hsp70), 31 (Hämoglobin) und 24 (rDNA).

2.2.16. Elektrophorese von DNA auf Agarosegelen

Für die Herstellung eines 1,5%igen Gels wurden 0,6 g Agarose in 40 ml 1×TAE-Puffer in der Mikrowelle aufgeköcht, bis die Lösung schlierenfrei war. Nach Abkühlen unter 60 °C wurden 4 µl Ethidiumbromid-Lösung (10 mg/ml H₂O) hinzugegeben. Die noch flüssige Agarose wurde dann in den zuvor mit Ethanol gereinigten und mit einem Kamm bestückten Gelschlitten gegossen. Eventuell auftretende Luftblasen wurden mit einer Pipettenspitze entfernt. Nach dem Erkalten des Gels wurde der Gelschlitten in die zuvor mit Ethanol gesäuberte Elektrophoresekammer eingesetzt und mit 1×TAE-Puffer überschichtet. In der Regel wurden 20 µl Proben einschließlich 2 µl des DNA-Probenpuffer vorbereitet und der Elektrophoreselauf bei 100 V für 40 Minuten durchgeführt. Die Agarosegele wurden unter UV-Licht fotografiert. Als Maß für die Quantifizierung diente die Helligkeit der Banden (Graustufenmittel) über das Computerprogramm Adobe® Photoshop® 9.0.

2.2.17. Elektrophorese von RNA auf Agarosegelen

500 mg Agarose und 4 ml 10x MOPS-Puffer wurden in 29,5 ml Aqua bidest. aufgeköcht. Nach Abkühlung auf ca. 60 °C wurde 6,5 ml 37% Formaldehyd zugegeben und durch Schwenken gemischt. Die noch flüssige Agarose wurde dann in den mit Ethanol gereinigten und mit einem Kamm bestückten Gelschlitten gegossen und eventuell auftretende Luftblasen mit einer Pipettenspitze entfernt. Nach einer ca. 20-minütigen Polymerisationszeit wurde das Gel samt Schlitten in eine zuvor mit Ethanol gesäuberte Elektrophoresekammer überführt und mit 1x RNA-Laufpuffer

überschichtet. Jedes RNA-Pellet (3 μ l) wurde in 6 μ l RNA-Puffer gelöst. Die RNA wurde anschließend für 10 Minuten bei 65 °C denaturiert und danach auf Eis abgekühlt. Der Elektrophoreselauf wurde in der Regel bei 100 V für 80 Minuten durchgeführt. Die Agarosegele wurden auf dem UV-Tisch betrachtet und fotografiert. Als Maß für die Quantifizierung diente die Helligkeit der Banden (Graustufenmittel) über das Computerprogramm Adobe® Photoshop®9.0. Die Ergebnisse wurden auf das Frischgewicht der Tiere normiert.

2.2.18. Fluoreszenzfärbung von *Daphnia magna*

Für die Fluoreszenzfärbung in vollständigen Tieren („whole mount“) wurden ca. 15 *Daphnia magna* Individuen verwendet. Die Daphnien wurden über ein Sieb vom Medium abgetrennt, in Milli-Q-Wasser gewaschen und in 1,5 ml Eppendorfgläser untergebracht. Das restliche Wasser wurde mit einer Pipette abgesaugt und von einem Papiertuch absorbiert. Abschließend wurden die Tiere gewogen und in flüssigem Stickstoff eingefroren.

Dehydrierung:

Die Tiere wurden sich in Eppendorfgläsern mit 1 ml eiskaltem Aceton überschichtet und über Nacht bei -20 °C stehen gelassen.

Rehydrierung:

Am nächsten Tag wurde das Aceton abgenommen und die Tiere in 90, 60 und 30% eiskaltem Ethanol überschichtet und auf Eis für ca. 10 Minuten stehen gelassen. Dann wurde der 30%ige Ethanol abgenommen und die Daphnien zusätzlich mit einem Papiertuch getrocknet.

Färbung:

Danach wurden die Tiere mit 200 μ l Hoechst-Lösung (10 μ g/ml) und in Dunkelheit bei 4 °C in einem Kühlschrank für ca. zwei Stunden inkubiert, um die Bindung des Farbstoffs zu ermöglichen. Nach zwei Stunden wurden die Daphnien in sterilem Wasser gewaschen und für die Präparation verwendet.

Aus so gefärbten *Daphnia magna* wurden unter einer Stereolupe mit Hilfe von zwei Pinzetten Antennen und Epipodite herauspräpariert und auf einem Objektträger untergebracht. Die Präparate wurden mit einem Deckglas zugedeckt und unter dem Fluoreszenzmikroskop betrachtet und mit Hilfe einer Digitalkamera (Digitalkamera EOS 350 D Canon, Japan) aufgenommen.

2.2.19. Mikroskopie und Dokumentation

Als Mikroskop wurde ein Axiovert100 (Zeiss, Oberkochen) mit Ausstattung für fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen und für *Nomarski-DIC* Mikroskopie verwendet. Das Mikroskop ist zudem mit einer Digitalkamera (Digitalkamera EOS 350 D für Farbfotos Canon, Japan) ausgestattet. Es wurden Plan-Neofluar-Objektive mit hoher Lichtdurchlässigkeit verwendet. Für die Dokumentation der Fluoreszenzfärbungen wurden das 5×, 10×, 20× und 40×-Objektiv verwendet. Die Bildbearbeitung (z.B. Auswertung der Größe und Lumineszenzintensität der Zellkerne) erfolgte über Adobe® Photoshop® 9.0.

3. Ergebnisse

Messungen auf der systemischen, physiologischen, biochemischen und molekularbiologischen Ebene bei *Chaoborus crystallinus*, *Leptodora kindtii* und *Daphnia magna* bei unterschiedlichen Umgebungstemperaturen ermöglichen eine Abschätzung der Thermotoleranz dieser aquatischen Organismen.

3.1. *Chaoborus crystallinus*

3.1.1. Mortalität

Bei *Chaoborus crystallinus* wurde die Überlebensrate am thermischen Limit untersucht. Die Bestimmung der LT_{50} (Letaltemperatur) dient der Charakterisierung der letalen Grenzen des Thermotoleranzfensters. Die Mortalität (Abb. 10 A, B.) von im Winter gefangenen *Chaoborus*-Larven (Wassertemperatur des Teichs = 3 °C) stieg mit der Umgebungstemperatur. Der LT_{50} -Wert verlief umgekehrt proportional zur Inkubationszeit und lag zwischen 31,9 und 34,4 °C bei einer Hitzeexposition von 48 h bzw. 1h.

Die Überlebensdauer (Lt_{50} , „lethal time“) sank bei höherer Umgebungstemperatur (Abb. 10 C, D). Temperaturen oberhalb von 32 °C führten über kurz oder lang zum Tod.

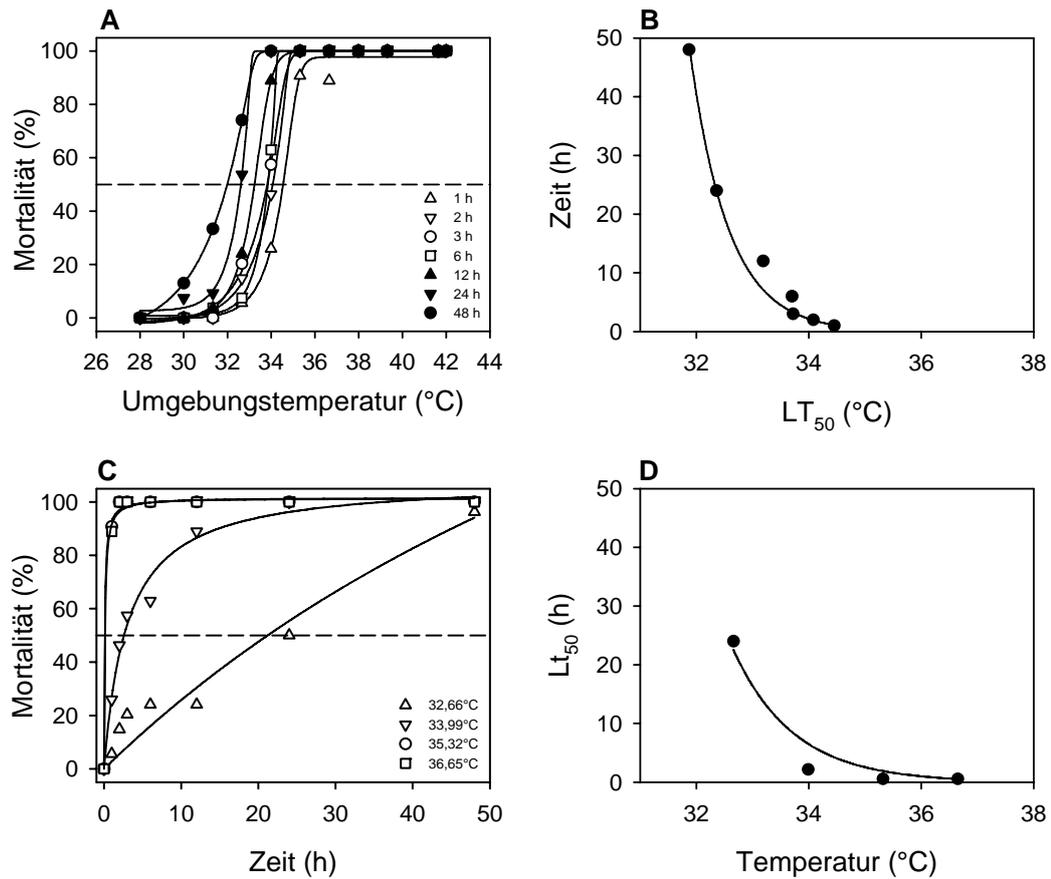


Abb. 10. Mortalität von *Chaoborus crystallinus* als Funktion der Temperatur und Zeit. Die Tiere wurden 1 – 48 Stunden warm inkubiert und nach dieser Inkubation wurde ihre Mortalität ermittelt. (A) Mortalität von *Chaoborus crystallinus* als Funktion der Temperatur. (B) LT_{50} (lethal temperature) bei verschiedenen Inkubationszeiten (Daten aus Abb. 10 A) (C) Mortalität von *Chaoborus crystallinus* als Funktion der Zeit. (D) Lt_{50} (lethal time) bei verschiedenen Umgebungstemperaturen (Daten aus Abb. 10 C). Alle Datenpunkte sind Mittelwerte aus 6 Versuchen ($n = 6$).

3.1.2. Thermopräferenz

Im Temperaturgradienten (0 – 28,4 °C) des Wassers im Glasbehälter bewegten sich die Larven zuerst in Richtung wärmerer Temperaturen (Abb. 11), um dann meist wieder kältere Temperaturen zu präferieren. Nach sieben Stunden betrug die bevorzugten Temperaturen der zuvor bei 20 °C gehälterten Larven $19,7 \pm 3,1$ °C (3 Tage 20 °C Akklimatisation) und $18,0 \pm 3,0$ °C (7 Tage 20 °C Akklimatisation). Die dauerhaft kalt gehälterten Larven suchten im Versuchsverlauf kälteres Wasser auf und sammelten sich nach einer Dauer von 7 h bei $15 \pm 1,4$ °C.

3.1.3. Schwimmaktivität

Die Schwimmaktivität wurde bei unterschiedlich akklimatisierten *Chaoborus*-Larven gemessen (Abb. 11). Die für diese Versuche verwendeten Tiere wurden mehrere Wochen bei 4 °C gehältert und ein Teil dann sieben Tage bei 20 °C akklimatisiert. Die Schwimmaktivität der *Chaoborus*-Larven wurde in 3 °C-Schritten von 12 °C bis 30 °C gemessen. Anschließend wurde die Temperatur unmittelbar wieder auf 21 °C und 12 °C zurückgeführt und die Schwimmaktivität erneut gemessen. Mit steigender Umgebungstemperatur nahm die Schwimmaktivität zu. Dies wurde besonders deutlich bei Temperaturen oberhalb von 20-25 °C (Abb. 11).

Die Schwimmaktivität der eine Woche lang bei 20 °C akklimatisierten Tiere war bei höheren Umgebungstemperaturen weniger stark als bei den dauerhaft kalt gehälterten Larven (Abb. 11).

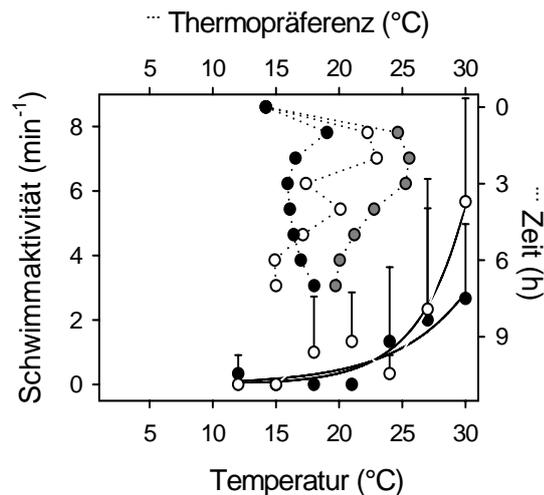


Abb. 11. Thermopräferenz und Schwimmaktivität von *Chaoborus crystallinus* als Funktion der Umgebungstemperatur. Die weißen Kreise symbolisieren dauerhafte Akklimatisation bei 4 °C; die grauen Kreise symbolisieren drei Tage Akklimatisation bei 20 °C; die schwarzen Kreise symbolisieren sieben Tage Akklimatisation bei 20 °C. Die Ergebnisse sind als Mittelwert (Thermopräferenz; n = 15 Tiere pro Akklimatisationsbedingung) und als Mittelwert \pm SE (Schwimmaktivität; n = 3 Tiere pro Akklimatisationsbedingung) dargestellt.

3.1.4. Sauerstoffverbrauchsrate

Der Sauerstoffverbrauch der kalt akklimatisierten Tiere (2 °C) stieg mit zunehmender Umgebungstemperatur von 5,3 bis 19,7 $\mu\text{mol O}_2 \text{ h}^{-1} \text{ g}^{-1}$ FG an (Abb. 12 A). Die

aerobe Stoffwechselrate der warm akklimatisierten Tiere (20 °C) stieg mit zunehmender Umgebungstemperatur weniger stark von 3,1 auf 5,2 $\mu\text{mol O}_2 \text{ h}^{-1} \text{ g}^{-1} \text{ FG}$ (Abb. 12 A). Bei einer Erhöhung der Umgebungstemperatur um 10 °C verdoppelte sich der O_2 -Verbrauch kalt akklimatisierter Tiere in etwa ($Q_{10} = 1,8$ und 2,1). Der Anstieg beiden warm akklimatisierten Tieren war geringer ($Q_{10} = 1,1$ und 1,7). Die Temperaturabhängigkeit des O_2 -Verbrauchs war also für kalt akklimatisierte Tiere deutlich stärker ausgeprägt als bei warm akklimatisierten Individuen.

3.1.5. P_{CO_2}

Der kritische Sauerstoffpartialdruck (P_{CO_2}), der erforderlich ist, um via Diffusion Sauerstoff ins Gewebesinnere des Zylinderkörpers von *Chaoborus*-Larven bei drei verschiedenen Umgebungstemperaturen zu transportieren, wurde anhand der Ergebnisse zur Sauerstoffverbrauchsrate ermittelt. Die kritischen Sauerstoffpartialdrücke für die im Winter gefangenen Larven bei 10, 20 und 30 °C Umgebungstemperatur betrugen 5,3, 11,3 und 15,1 kPa (Abb. 12 B). Die kritischen Sauerstoffpartialdrücke für die sieben Tage lang bei 20 °C akklimatisierten Tiere bei den gleichen Umgebungstemperaturen lagen mit 3,1, 4,2 und 4,0 kPa (Abb. 12 B) deutlich darunter. In allen Fällen wurde der kritische Partialdruck vom P_{CO_2} im normoxischen Medium (20,7 kPa) deutlich überschritten.

3.1.6. NADH-Signal

Die Intensität des NADH-Fluoreszenzsignals der Tiere während der Messung bei unterschiedlichen Umgebungstemperaturen war weitgehend konstant. Nur das NADH-Signal der Tiere aus der Dauerkultur bei 2 °C war etwas höher bei 30 °C Umgebungstemperatur im Vergleich zu den anderen Werten (Abb. 12 C).

3.1.7. Herzfrequenz

Die Herzfrequenz der beiden unterschiedlich akklimatisierten Tiergruppen stieg in etwa proportional mit steigender Umgebungstemperatur (bis 27 °C). Bei 30 °C sank die Herzfrequenz der *Chaoborus*-Larven wieder (Abb. 12 D). Dabei lagen die Werte der warm akklimatisierten Tiere immer oberhalb der kalt akklimatisierten Tiere.

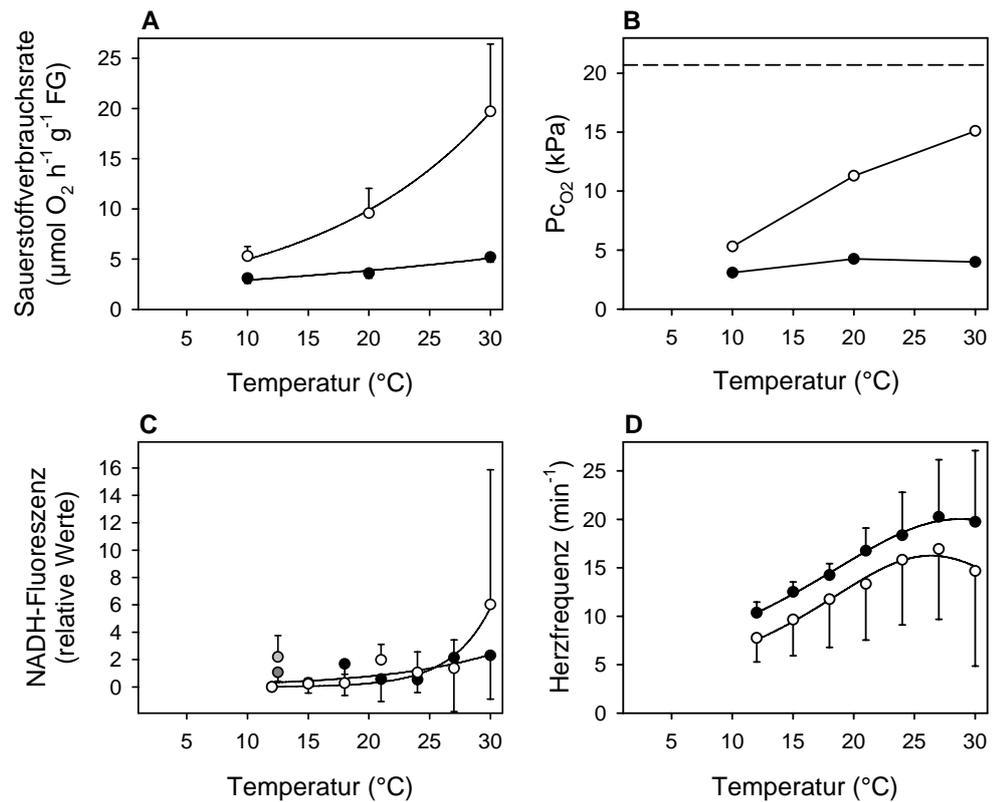


Abb. 12. (A) Sauerstoffverbrauchsrate von *Chaoborus crystallinus* bei unterschiedlichen Umgebungstemperaturen. (B) Kritische P_{O_2} -Werte für *Chaoborus crystallinus* bei unterschiedlichen Umgebungstemperaturen: Für die jeweilige temperaturspezifische O_2 -Verbrauchsrate (Abb. 12 A) wurde berechnet, welcher Sauerstoffpartialdruck für die aerobe Versorgung der Gewebe gerade ausreicht. (C) NADH-Fluoreszenz in *Chaoborus crystallinus* bei unterschiedlichen Umgebungstemperaturen. (D) Herzfrequenz von *Chaoborus crystallinus* bei unterschiedlichen Umgebungstemperaturen. Die weißen Kreise symbolisieren dauerhafte Akklimatisation bei 4 °C; die schwarzen Kreise symbolisieren dauerhafte Akklimatisation bei 20 °C; die hellgrauen Kreise symbolisieren Kontrollmessungen bei 12 °C nach einer Messung bei 30 °C im Fall von 4 °C akklimatisierten Tieren; die dunkelgrauen Kreise symbolisieren Kontrollmessungen bei 12 °C nach einer Messung bei 30 °C im Fall von 20 °C akklimatisierten Tieren. Die Ergebnisse sind als Mittelwert \pm SD (Sauerstoffverbrauchsrate bzw. P_{cO_2} ; $n = 3$ Tiere pro Akklimatisationsbedingung) und Mittelwert \pm SE (NADH-Fluoreszenz bzw. Herzfrequenz; $n = 3$ Tiere pro Akklimatisationsbedingung) dargestellt.

3.1.8. Konzentration von Kohlenhydraten und anaeroben Metaboliten

3.1.8.1. Kohlenhydrate

Zwei Tage Inkubation bei unterschiedlichen Temperaturen (12 – 24 °C) verursachte keinen klaren Effekt in der Konzentration der Kohlenhydrate (Abb. 13). Die Gluko-

sewerte der getesteten Tiere variierten zwischen $0,34 \pm 0,22$ ($21,3 \text{ }^\circ\text{C}$) und $0,67 \pm 0,29$ ($16,0 \text{ }^\circ\text{C}$) $\mu\text{mol g}^{-1}$ FG. Die Glykogenkonzentrationen schwankten zwischen $9,9 \pm 1,6$ ($21,3 \text{ }^\circ\text{C}$) $\mu\text{mol g}^{-1}$ FG und $12,5 \pm 1,6$ ($24,0 \text{ }^\circ\text{C}$) $\mu\text{mol g}^{-1}$ FG.

3.1.8.2. Anaerobe Metabolite

Im Fall der aus dem Teich genommenen Larven schwankte die L-Laktatkonzentration zwischen $1,9 \pm 0,3$ ($16,0 \text{ }^\circ\text{C}$) und $3,8 \pm 1,9$ ($13,3 \text{ }^\circ\text{C}$) $\mu\text{mol g}^{-1}$ FG. Auch eine einwöchige Inkubation bei $20 \text{ }^\circ\text{C}$ verursachte keine klare Veränderung der L-Laktatkonzentration in diesen Tieren. Die Konzentration dieses Metaboliten variierte dann zwischen $1,3 \pm 0,2$ ($21,3 \text{ }^\circ\text{C}$) und $2,3 \pm 1,2$ ($22,6 \text{ }^\circ\text{C}$) $\mu\text{mol g}^{-1}$ FG (Abb.13).

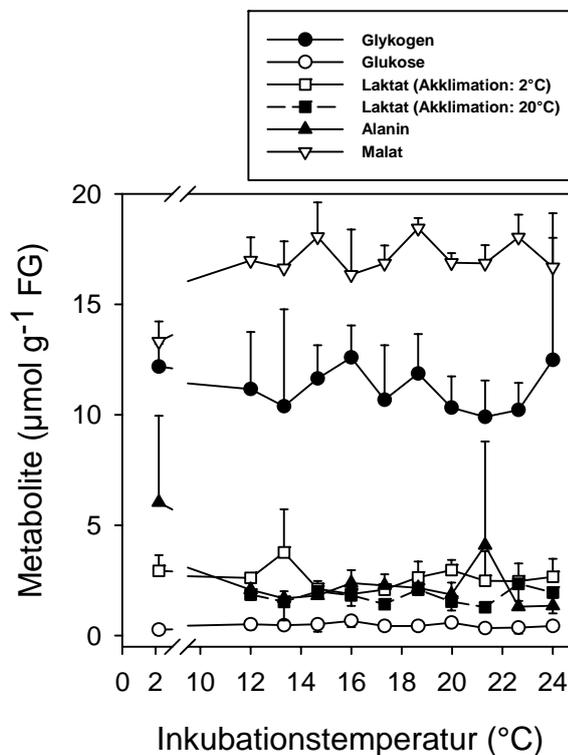


Abb. 13. Metabolitkonzentrationen von *Chaoborus crystallinus* als Funktion der Temperatur nach zwei Tagen Inkubation bei unterschiedlichen Temperaturen. Alle Ergebnisse sind als Mittelwert \pm SD ($n = 3$ Tiere pro Inkubationstemperatur) dargestellt.

Die L-Alaninkonzentration der $2 \text{ }^\circ\text{C}$ akklimatisierten Tiere betrug $6,0 \pm 3,9 \mu\text{mol g}^{-1}$ FG und erwies sich als etwas höher als die L-Alaninkonzentration der höheren Temperaturen ausgesetzten Tiere (Abb. 13). Die Werte der 2 Tage inkubierten Tiere variierten zwischen $1,3 \pm 0,3$ ($22,6 \text{ }^\circ\text{C}$) und $2,4 \pm 0,6$ ($16,0 \text{ }^\circ\text{C}$) $\mu\text{mol g}^{-1}$ FG.

Die L-Malatkonzentration in den 2 °C akklimatisierten Tieren zeigte etwas niedrigere Werte als die Werte der inkubierten Tiere (Abb. 13) und betrug $13,3 \pm 0,9 \mu\text{mol g}^{-1} \text{FG}$. Die L-Malatkonzentration der inkubierten Tiere variierte zwischen $16,3 \pm 2,0 \mu\text{mol g}^{-1} \text{FG}$ ($16,0 \text{ °C}$) und $18,4 \pm 0,5 \mu\text{mol g}^{-1} \text{FG}$ ($18,6 \text{ °C}$).

3.1.9. LDH-Aktivität

Die Aktivität der Laktat-Dehydrogenase (LDH) zeigte eine Abhängigkeit von der Akklimatisations- und Umgebungstemperatur (Abb. 14 A, B). Die *Chaoborus*-Larven wurden sechs Tage bei drei verschiedenen Temperaturen, nämlich bei 12, 18 und 24 °C akklimatisiert. Die Messungen der LDH-Aktivität von *Chaoborus*-Larven wurden bei ihrer Akklimatisationstemperatur durchgeführt. Die $V_{\text{max}}^{\text{PYR}}$ Werte von LDH stiegen bei höherer Messtemperatur leicht an (Abb. 14 A, B). Die Q_{10} -Werte lagen bei 0,88 (12 – 18 °C) und 1,69 (18 – 24 °C). Die Werte von $K_{\text{m}}^{\text{PYR}}$ lagen im Bereich von 0,46 bis 0,63 mM Pyr und wurden von der Messtemperatur nur geringfügig beeinflusst (Abb. 14 B).

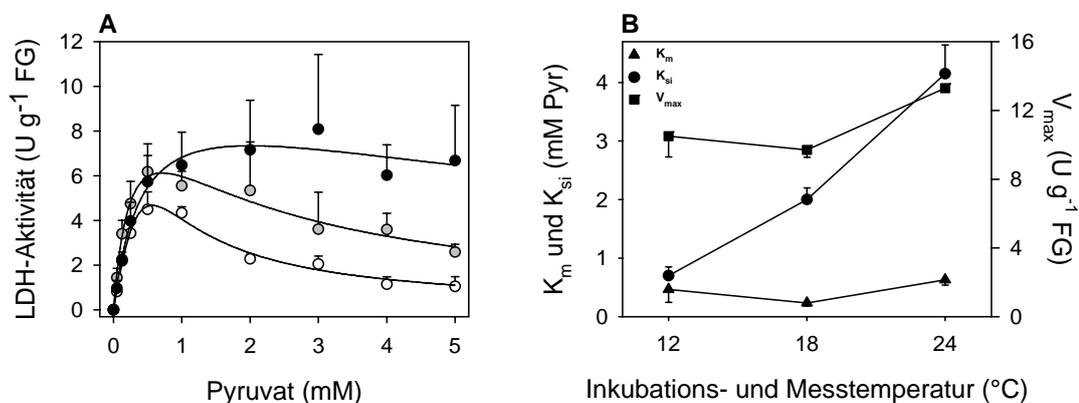


Abb. 14. (A) LDH-Aktivität von *Chaoborus crystallinus* als Funktion der Temperatur. Die Messungen der LDH-Aktivität wurden bei der Umgebungstemperatur, bei der die Tiere akklimatisiert wurden, durchgeführt. Die weißen Kreise symbolisieren Akklimatisation bei 12 °C; die grauen Kreise symbolisieren Akklimatisation bei 18 °C; die schwarzen Kreise symbolisieren Akklimatisation bei 24 °C. (B) Affinität ($K_{\text{m}}^{\text{PYR}}$), Inhibition ($K_{\text{si}}^{\text{PYR}}$) und maximale Geschwindigkeit ($V_{\text{max}}^{\text{PYR}}$) von LDH der *Chaoborus*-Larven als Funktion der Temperatur. Alle Ergebnisse sind als Mittelwert \pm SD ($n = 3$ Tiere pro Akklimatisationsbedingung) dargestellt.

Die K_{si}^{PYR} -Werte stiegen mit erhöhter Temperatur von 0,7 auf 4,15 mM Pyr an (Abb. 14 B). Es konnte also beträchtliche Substrat-Hemmung bei kalten, aber nicht bei hohen Temperaturen beobachtet werden.

3.1.10. RNA-, DNA-Gehalt und RNA/DNA-Verhältnis in *Chaoborus crystallinus*

Die für diese Versuche verwendeten *Chaoborus*-Larven wurden aus einer 4 °C Kultur genommen und zwei Tage lang bei 4, 10, 20, 24 und 30 °C inkubiert. Die Inkubation erfolgte in der Dunkelheit. Die Larven wurden nicht gefüttert. Der RNA-Gehalt dieser Insekten war während der zweitägigen Inkubation bei 10 °C im Vergleich zu den Kontrolltieren deutlich höher, während bei den anderen Inkubationstemperaturen die Werte niedriger waren (Abb. 15 A).

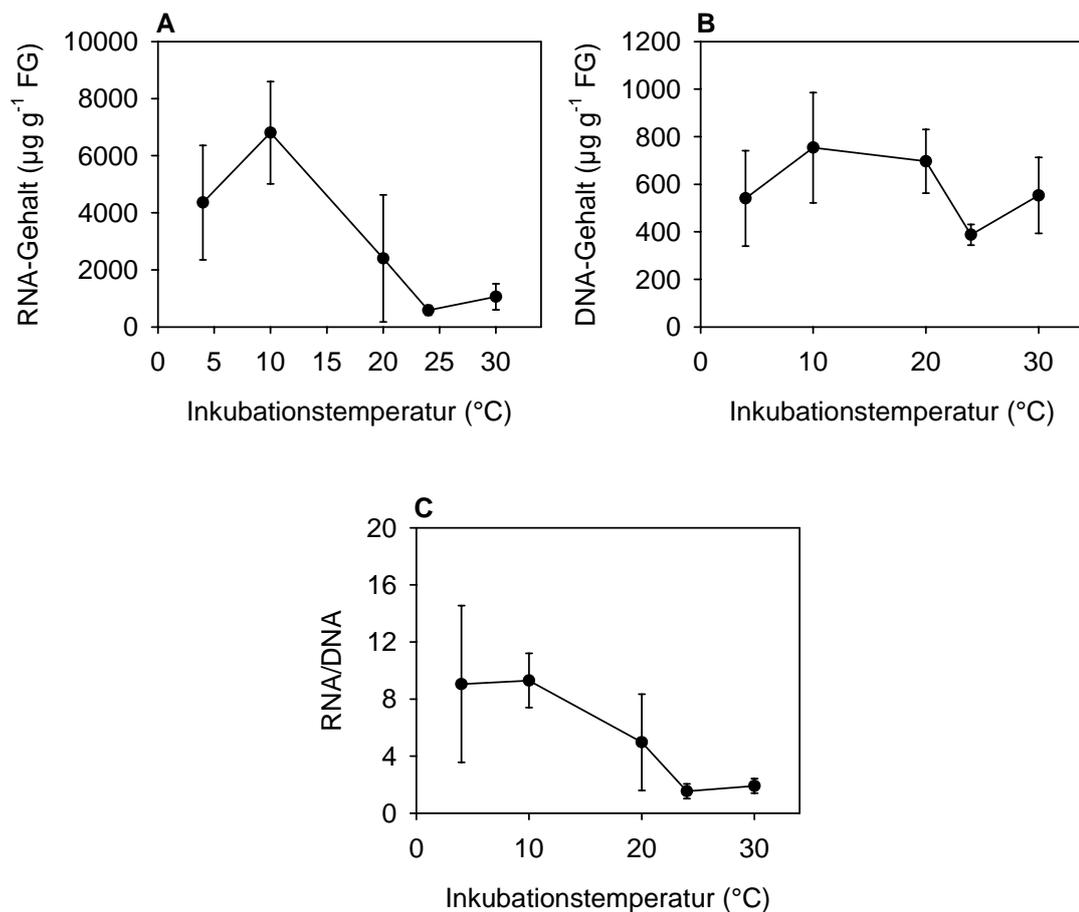


Abb. 15. (A) RNA-Gehalt, (B) DNA-Gehalt und (C) RNA/DNA-Verhältnis in *Chaoborus crystallinus*. Die Tiere wurden 48 Stunden bei 4, 10, 20, 24 und 30 °C ohne Nahrung inkubiert. Alle Ergebnisse sind als Mittelwert \pm SD (n = 6) dargestellt.

Die Werte des DNA-Gehalts schwankten innerhalb eines konstanten Niveaus (Abb. 15 B). Das RNA/DNA-Verhältnis der 4 und 10 °C inkubierten Tiere warin etwa gleich, bei den höheren Inkubationstemperaturen (20, 24 und 30 °C) waren die Werte deutlich niedriger (Abb. 15 C).

3.2. *Leptodora kindtii*

3.2.1. Thermopräferenz

Die Thermopräferenz wurde bei frisch gefangenen *Leptodora kindtii* (Wassertemperatur der Talsperre = 19 °C) über Nacht in der Dunkelheit getestet. Die Glaskrebse wurden in der Mitte eines mit filtriertem Seewasser gefüllten Glasbehälters (siehe Material und Methoden) gebracht, wo die Wassertemperatur 22,9 °C betrug. In dem von 13,5 - 32,4 °C reichenden Temperaturgradienten des Wassers im Glasbehälter bewegten sich die Tiere während der ersten Stunde in Richtung zu kälteren Temperaturen, d.h. $17,0 \pm 2,0$ °C (Abb. 16). In den nächsten Stunden der Messung bevorzugten die Glaskrebse wärmere Temperaturbereiche und erreichten nach der dritten Stunde der Messung Temperaturen von $23,1 \pm 2,4$ °C. Danach schwammen die Tiere wieder in Richtung der niedrigeren Temperaturen und bis Ende des Tests blieben sie auf relativ konstantem Niveau (20,3 °C).

3.2.2. Schwimmaktivität

Die Messung der Schwimmaktivität wurde zweimal, d.h. im Sommer 2006 und 2007 durchgeführt. Die Temperaturen des Seewassers zum Zeitpunkt des Tests waren 19 °C (2006) und 21 °C (2007). Beide Messungen zeigten eine starke Abhängigkeit der Schwimmaktivität der Glaskrebse von der Temperatur (Abb. 16). Die Schwimmaktivität von *Leptodora kindtii* im Jahr 2006 stieg langsam mit steigender Umgebungstemperatur bis ca. 24,0 °C, wo ihr Maximum erreicht war. Danach sank die Schwimmaktivität der Glaskrebse mit weiter steigender Umgebungstemperatur (Abb. 16). Bei Tieren aus dem Jahr 2007 war die Schwimmaktivität im Bereich der Umgebungstemperaturen von 5 bis 20 °C konstant niedrig. Erst ab 23,0 °C begann sich die Schwimmaktivität der Glaskrebse zu erhöhen und erreichte das Maximum

bei ca. 25,2 °C. Bei einer Umgebungstemperatur höher als 25,2 °C sank die Schwimmaktivität wieder (Abb. 16).

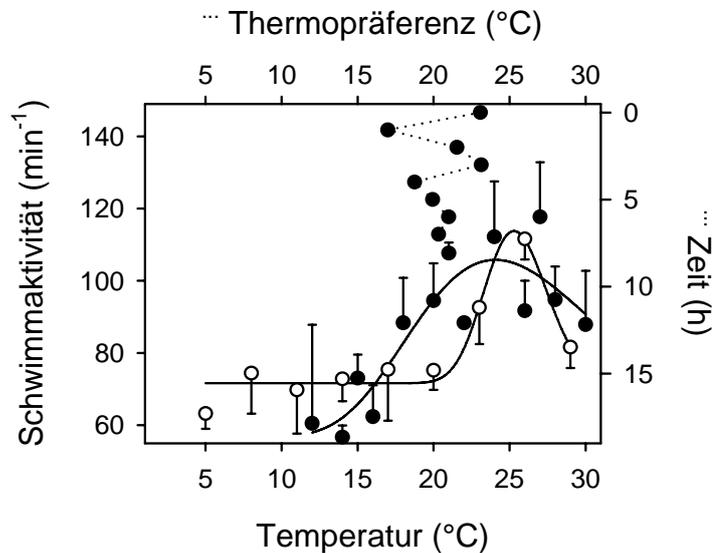


Abb. 16. Thermopräferenz und Schwimmaktivität von *Leptodora kindti* als Funktion der Temperatur. Die schwarzen Kreise symbolisieren Tiere aus 2006; die weißen Kreise symbolisieren Tiere aus 2007. Die Ergebnisse sind als Mittelwert \pm SD (Thermopräferenz; $n = 5$ Tiere) und Mittelwert \pm SE (Schwimmaktivität; $n = 3$ Tiere) dargestellt.

3.2.3. Sauerstoffverbrauchsrate

Für die Messung der Sauerstoffverbrauchsrate wurden frisch gefangene *Leptodora kindtii* verwendet. Die Wassertemperatur der Talsperre am Tag, an dem die Tiere gefangen wurden, betrug 21 °C. Die Messung der Sauerstoffverbrauchsrate wurde bei 3 verschiedenen Temperaturen, nämlich bei 12, 21 und 30 °C durchgeführt. Die Sauerstoffverbrauchsrate erhöhte sich mit steigender Umgebungstemperatur (Abb. 17 A). Bei den genannten Temperaturen verbrauchten die Glaskrebse $16,7 \pm 4,1$, $18,0 \pm 4,2$, und $25,4 \pm 6,5 \mu\text{mol O}_2 \text{ h}^{-1} \text{ g}^{-1} \text{ FG}$ (Abb. 17 A). Die Q_{10} -Werte der Sauerstoffverbrauchsrate (12 – 21 °C, 21 – 30 °C) waren 1,1 und 1,4.

3.2.4. Berechnung der kritischen Po_2 -Werte für *Leptodora kindtii*

Der kritische Sauerstoffpartialdruck (P_{CO_2}), der erforderlich ist, um via Diffusion Sauerstoff ins innere Gewebe des Körpers von *Leptodora kindtii*, der als Zylinder

angenommen wurde, zu bringen, wurde bei 3 verschiedenen Umgebungstemperaturen anhand der Sauerstoffverbrauchsrate ermittelt. Die kritischen Sauerstoffpartialdrücke für die Glaskrebse bei 12, 21 und 30 °C betrugen 16,6, 21,3, und 19,5 kPa. Im Fall der Sauerstoffverbrauchsrate bei 21 °C überschreitet der normoxische Sauerstoffpartialdruck im Wasser nur geringfügig den P_{CO_2} (Abb. 17 B).

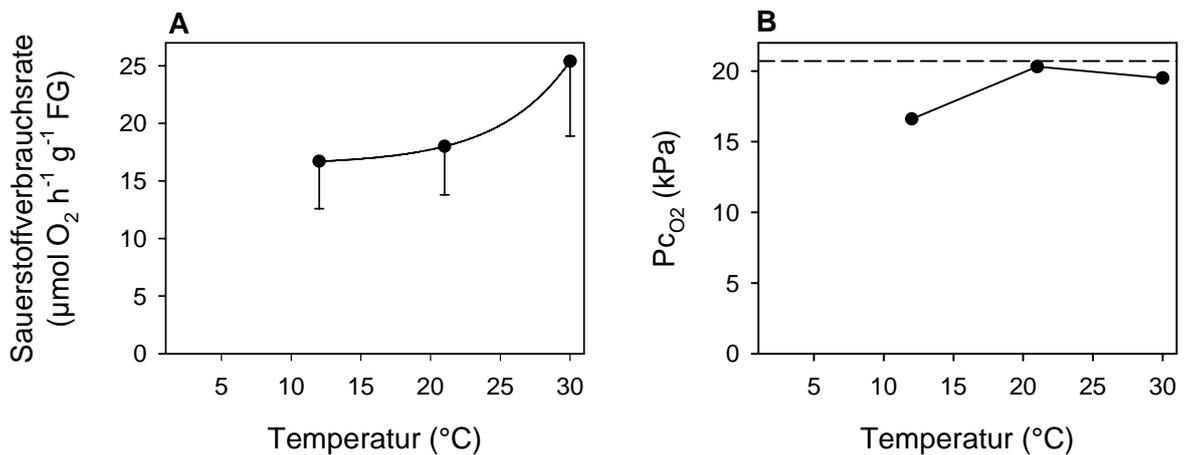


Abb. 17. (A) Sauerstoffverbrauchsrate von *Leptodora kindtii* bei unterschiedlichen Umgebungstemperaturen. (B) P_{CO_2} -Werte für *Leptodora kindtii* bei unterschiedlichen Umgebungstemperaturen: Für die jeweilige temperaturspezifische O_2 -Verbrauchsrate (Abb. 17 A) wurde berechnet, welcher Sauerstoffpartialdruck für die aerobe Versorgung der inneren Gewebe gerade ausreicht. Die Ergebnisse sind als Mittelwert \pm SD ($n = 3$ Tiere) dargestellt.

3.2.5. L-Laktatkonzentration

Weiterhin wurden L-Laktatkonzentrationen in *Leptodora kindtii*, die in der Talsperre gefangen und danach einer Wärme-Inkubation für eine oder drei Stunden ausgesetzt waren, bestimmt. Die Wassertemperatur der Talsperre am Tag, an dem die Tiere gefangen wurden, betrug 19 °C. Die Tiere wurden bei Temperaturen zwischen 12 bis 24 °C inkubiert. Die L-Laktatkonzentrationen blieben auf einem niedrigen, konstanten Niveau (Abb. 18). Nach einer Stunde Wärme-Inkubation variierte die L-Laktatkonzentration zwischen $0,6 \pm 0,2$ (12,0 °C) und $1,5 \pm 0,8$ (21,3 °C) $\mu\text{mol g}^{-1}$ FG. Nach drei Stunden Wärme-Inkubation schwankte sie zwischen $0,6 \pm 0,4$ (20,0 °C) und $2,1 \pm 1,9$ (13,3 °C) $\mu\text{mol g}^{-1}$ FG. Ähnlich wie im Fall der *Chaoborus*-Larven gab es keine Abhängigkeit der Laktatkonzentration von der Inkubationstemperatur im Temperaturbereich von 12 bis 24 °C.

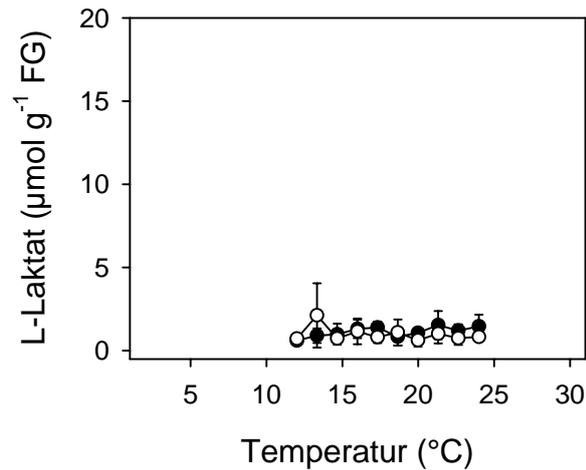


Abb. 18. L-Laktatkonzentration als Funktion der Temperatur nach 1 bzw. 3 Stunden Inkubation bei unterschiedlichen Temperaturen. Die schwarzen Kreise symbolisieren einstündige Inkubation; die weißen Kreise symbolisieren dreistündige Inkubation. Alle Ergebnisse sind als Mittelwert \pm SD dargestellt ($n = 3$ Tiere pro Inkubationstemperatur).

3.3. *Daphnia magna*

3.3.1. RNA-, DNA-Gehalt und RNA/DNA-Verhältnis in *Daphnia magna*

3.3.1.1. RNA-, DNA-Gehalt und RNA/DNA-Verhältnis als Funktion der Körpergröße der Tiere und der Hälterungstemperatur

Die für diesen Versuch verwendeten Tiere waren ein oder zwei Millimeter groß und wurden bei 10 und 20 °C gehältert. Die ein Millimeter großen Tiere hatten einen höheren Gehalt von beiden Nukleinsäuren als die zwei Millimeter großen Tiere (Abb. 19 A, B). Dies betraf beide Akklimierungsgruppen. Der RNA-Gehalt von 1 mm großen Tieren betrug $2009 \pm 408 \mu\text{g g}^{-1}$ FG (10 °C) und $1982 \pm 814 \mu\text{g g}^{-1}$ FG (20 °C), und von 2 mm großen Tieren $535 \pm 91,8 \mu\text{g g}^{-1}$ FG (10 °C) und $607 \pm 253 \mu\text{g g}^{-1}$ FG (20 °C). Der DNA-Gehalt von 1 mm großen Daphnien lag bei $229 \pm 38,4 \mu\text{g g}^{-1}$ FG (10 °C) und $207 \pm 22,9 \mu\text{g g}^{-1}$ FG (20 °C). Die Werte des DNA-Gehalts von 2 mm großen Daphnien waren deutlich niedriger und betragen $30,4 \pm 6,8 \mu\text{g g}^{-1}$ FG (10 °C) und $19,5 \pm 9,8 \mu\text{g g}^{-1}$ FG (20 °C). Das RNA/DNA-Verhältnis war in 2 mm großen Tieren wesentlich höher als in 1 mm großen Tieren, besonders bei 20 °C gehälterten Tieren (Abb. 19 C). Die Werte des RNA/DNA-Verhältnisses in 1 mm großen *Daphnia magna* waren weitgehend konstant und lagen bei $8,8 \pm 1,3$ (10 °C) und $9,4 \pm 3,0$

(20 °C). Das RNA/DNA-Verhältnis in 2 mm großen Daphnien betrug $17,8 \pm 1,7$ (10 °C) und $32,0 \pm 4,6$ (20 °C).

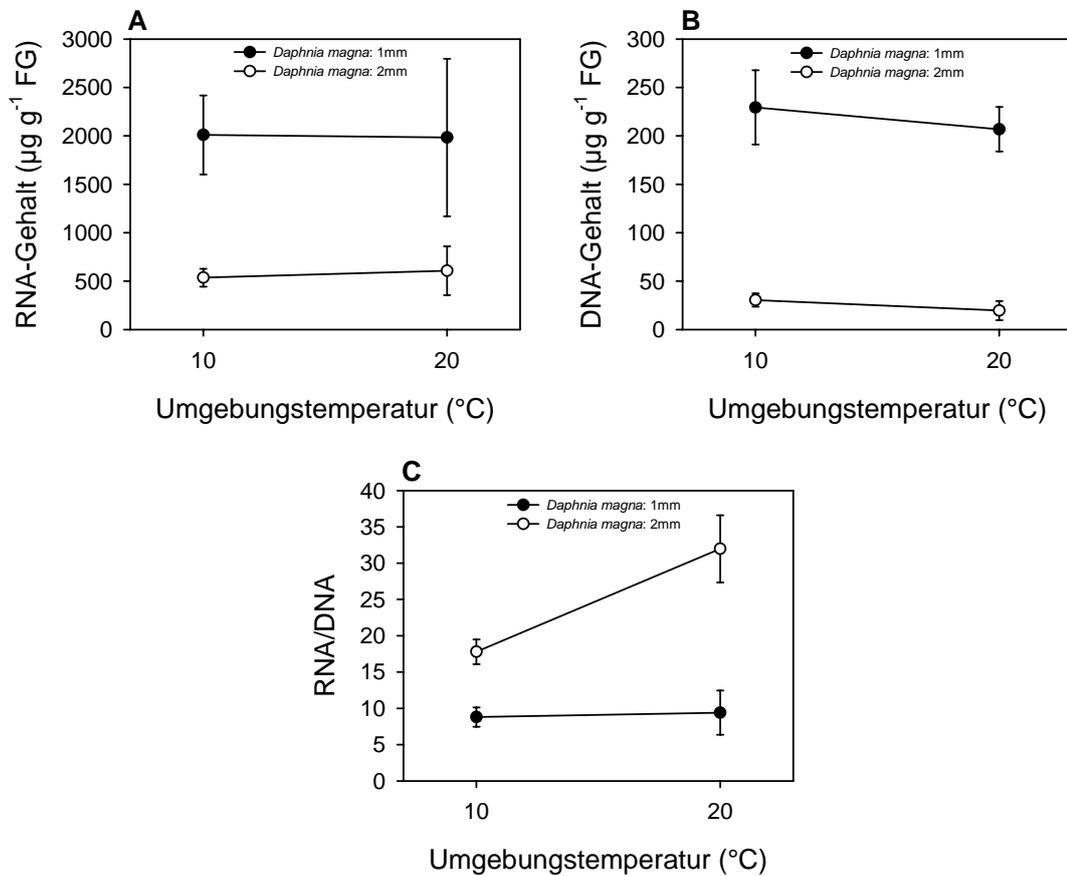


Abb. 19. (A) RNA-Gehalt, (B) DNA-Gehalt und (C) RNA/DNA-Verhältnis in 1 und 2 mm großen *Daphnia magna*. Die Tiere wurden bei 10 und 20 °C gehältert. Alle Ergebnisse sind als Mittelwert \pm SD ($n = 3$ Tiere pro Größengruppe und Akklimatisationsbedingung) dargestellt.

3.3.1.2. RNA-, DNA-Gehalt und RNA/DNA-Verhältnis in 20 °C akklimatisierten *Daphnia magna* als Funktion der Temperatur nach 2-tägiger Inkubation

Für dieses Experiment wurden 1,5 - 1,8 mm große Daphnien aus der 20 °C Dauerkultur verwendet. Die Tiere wurden fünf Stunden in M4-Elendt-Medium bei ihrer Hälterungstemperatur vorinkubiert und dann 48 Stunden bei 10, 20, 24 und 30 °C inkubiert. Während der Inkubation wurden die Daphnien nicht gefüttert. Der Versuch wurde zweimal wiederholt.

Der RNA-Gehalt bei der ersten Messreihe blieb unverändert bei Inkubationstemperaturen von 10 und 20 °C. Bei 24 °C stieg die RNA-Konzentration, bei 30 °C wurde

ein Abfall der Konzentration gemessen (Abb. 20 A). Der RNA-Gehalt bei der zweiten Messreihe blieb bei allen Inkubationstemperaturen nahezu konstant (Abb. 20 A). Der DNA-Gehalt bei der ersten Messreihe änderte sich während der Inkubation kaum. Allerdings war bei 24 °C ein leichter Abfall und bei 30 °C wiederum ein Anstieg der DNA-Konzentration zu sehen (Abb. 20 B). Der DNA-Gehalt bei der zweiten Messreihe blieb, ähnlich wie bei der ersten Messreihe, auf konstantem Niveau bei 10 und 20 °C. Ähnlich sank auch der DNA-Gehalt bei 24 °C und stieg bei 30 °C (Abb. 20 B).

Die Schwankungen im DNA-Gehalt fanden ihre Widerspiegelung im RNA/DNA-Verhältnis. Bei beiden Messreihen änderte sich das RNA/DNA-Verhältnis bei 10 und 20 °C kaum. Bei 24 °C der ersten und zweiten Messreihe stiegen die Werte des RNA/DNA-Verhältnisses an und bei 30 °C waren die Werte wieder niedriger (Abb. 20 C).

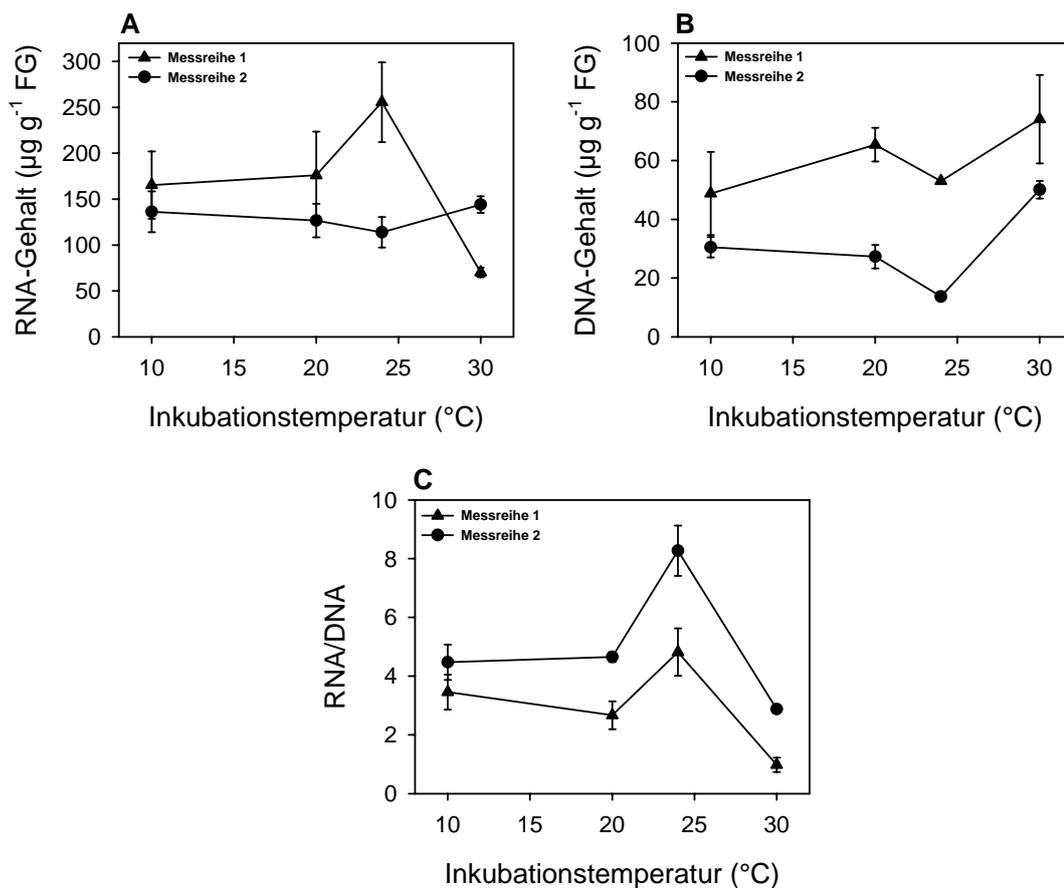


Abb. 20. (A) RNA-Gehalt, (B) DNA-Gehalt und (C) RNA/DNA-Verhältnis in *Daphnia magna*. Die 1,5 - 1,8 mm großen Tiere aus 20 °C Dauerkultur wurden 48 Stunden bei unterschiedlichen Umgebungstemperaturen ohne Nahrung inkubiert. Alle Ergebnisse sind als Mittelwert \pm SD ($n = 3$ Tiere pro Messreihe und Inkubationstemperatur) von zwei Messreihen dargestellt.

3.3.1.3. RNA-, DNA-Gehalt und RNA/DNA-Verhältnis in 10 °C akklimatisierten *Daphnia magna* als Funktion der Inkubationszeit

Für dieses Experiment wurden 1,5 - 1,8 mm große Daphnien aus der 10 °C Dauerkultur verwendet. Die Tiere wurden fünf Stunden bei der Hälterungstemperatur vorinkubiert und dann bei 10, 20 und 30 °C für 0 (Kontrolle), 12, 24, 36, 48 und 60 Stunden inkubiert. Während der Inkubation wurden die Daphnien nicht gefüttert. Der Versuch zeigte, dass sich der RNA-Gehalt bis zur 48-ten Stunde der Inkubation stufenweise erhöhte. Bei der 60-ten Stunde der Messung nahm der RNA-Gehalt wieder ab (Abb. 21 A). Die DNA-Menge während der Inkubation zeigte generell einen Anstieg bis zur 36-ten Stunde der Messung. Danach, d.h. in der 48-ten Stunde der Messung, sank der DNA-Gehalt wieder (Abb. 21 B).

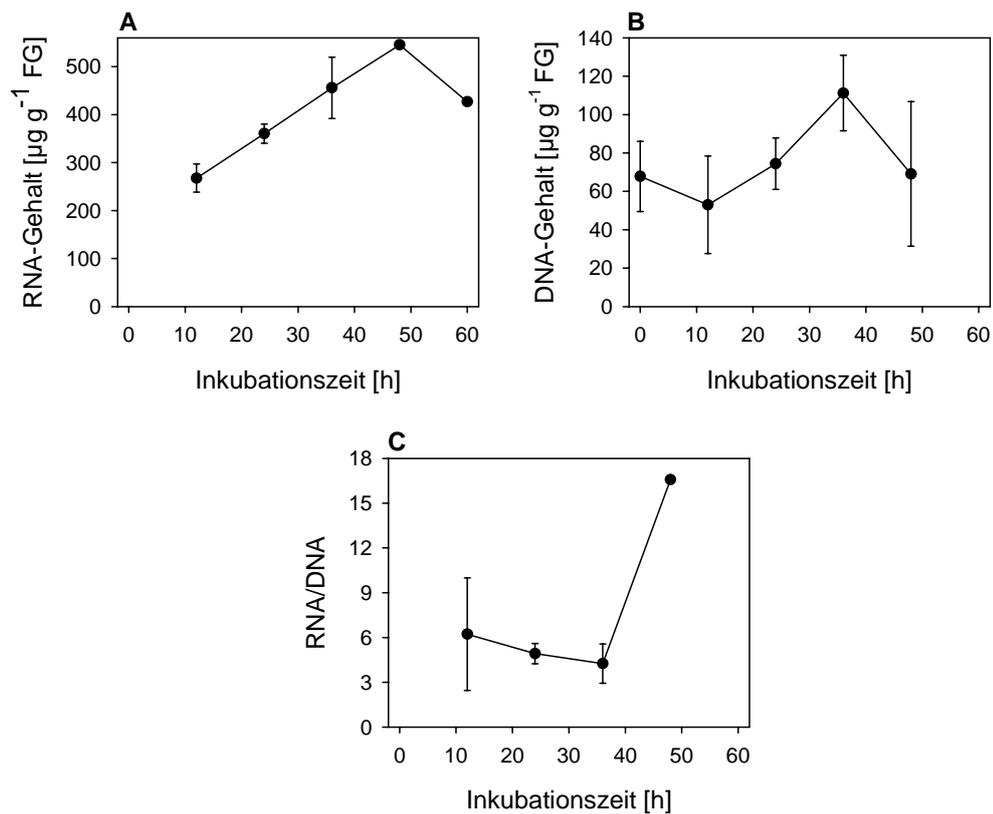


Abb. 21. (A) RNA-Gehalt, (B) DNA-Gehalt und (C) RNA/DNA-Verhältnis in *Daphnia magna*. Die 1,5 - 1,8 mm großen Tiere aus 10 °C Dauerkultur wurden 0, 12, 24, 36, 48 und 60 Stunden bei 30 °C ohne Nahrung inkubiert. Alle Ergebnisse sind als Mittelwert \pm SD ($n = 3$ Tiere pro Inkubationszeit und Inkubationstemperatur) dargestellt.

Demzufolge änderte sich das RNA/DNA-Verhältnis während der Inkubation kaum, außer dem Messpunkt nach der 48-sten Stunde des Versuchs, wo dieser Wert im Vergleich zu den anderen deutlich höher war (Abb. 21 C). Wegen hoher Sterblichkeit der Tiere konnte dieser Versuch nicht vollständig durchgeführt werden.

3.3.1.4. RNA-, DNA-Gehalt und RNA/DNA-Verhältnis in 10 °C akklimatisierten *Daphnia magna* als Funktion der Inkubationstemperatur

Die für diesen Versuch verwendeten Daphnien waren 1,5 - 1,8 mm groß und wurden aus der 10 °C Dauerkultur genommen. Die Tiere wurden fünf Stunden in M4-Elendt-Medium bei ihrer Hälterungstemperatur vorinkubiert und dann 48 Stunden bei 10, 20, 24, und 30 °C inkubiert. Während der Inkubation wurden die Daphnien nicht gefüttert.

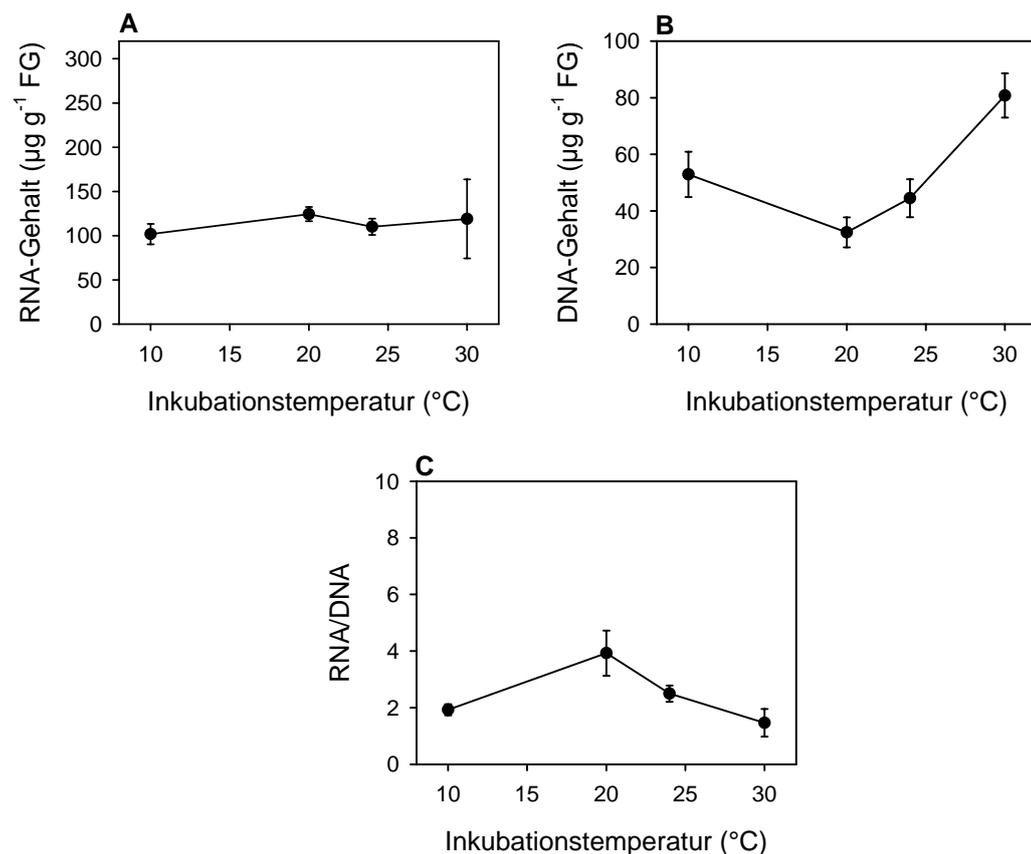


Abb. 22. (A) RNA-Gehalt, (B) DNA-Gehalt und (C) RNA/DNA-Verhältnis in *Daphnia magna*. Die 1,5 - 1,8 mm großen Tiere aus 10 °C Dauerkultur wurden 48 Stunden bei 10, 20, 24, und 30 °C ohne Nahrung inkubiert. Alle Ergebnisse sind als Mittelwert \pm SD ($n = 3$ Tiere pro Inkubationstemperatur) dargestellt.

Dieser Versuch zeigte wiederum, dass der RNA-Gehalt während der Inkubation konstant blieb (Abb. 22 A). Der DNA-Gehalt änderte sich jedoch stark (Abb. 22 B). Nach 48 Stunden Inkubation bei 10 °C lag die DNA-Konzentration bei $52,9 \pm 8,0 \mu\text{g g}^{-1}$ FG, war bei 20 °C kleiner, stieg wieder langsam bei 24 °C und erreichte ihren höchsten Wert bei 30 °C (Abb. 22 B). Die veränderte DNA-Konzentration hatte deutliche Auswirkungen auf das RNA/DNA-Verhältnis (Abb. 22 C).

3.3.2. Bestimmung des Nukleinsäure-Gehalts in *Daphnia magna* als Funktion der Inkubationstemperatur nach einer bestimmten Zeit in einem spezifischen Ernährungsmedium

Um den Stressfaktor Hunger auszuschließen, wurde dem M4-Elendt-Medium Glukose und Pepton zugefügt. Die Zugabe von Algen wurde vermieden, um Verfälschungen der RNA- und DNA-Messungen zu vermeiden.

3.3.2.1. DNA-Gehalt in *Daphnia magna* als Funktion der Inkubationstemperatur

Die 1,5 - 1,8 mm großen Daphnien wurden aus der 20 °C Dauerkultur genommen. Sie wurden zuerst fünf Stunden in M4-Elendt-Medium bei ihrer Hälterungstemperatur vorinkubiert und dann 48 Stunden bei 10, 20, und 30°C im spezifischen Ernährungsmedium inkubiert.

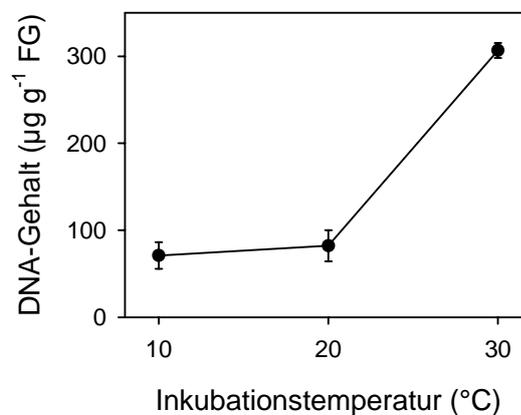


Abb. 23. DNA-Gehalt in *Daphnia magna*. Die 1,5 - 1,8 mm großen Tiere aus 20 °C Dauerkultur wurden 48 Stunden bei 10, 20, und 30 °C in einem spezifischen Ernährungsmedium inkubiert. Alle Ergebnisse sind als Mittelwert \pm SD ($n = 3$ Tiere pro Inkubationstemperatur) dargestellt.

Es zeigte sich, dass der DNA-Gehalt nach 48 Stunden Inkubation bei 10 und 20 °C auf ziemlich konstantem, niedrigem Niveau blieb und bei 30 °C deutlich erhöht war (Abb. 22).

3.3.2.2. RNA-, DNA-Gehalt und RNA/DNA-Verhältnis in *Daphnia magna* als Funktion der Temperatur nach Inkubation bei verschiedenen Temperaturen und nach Rückkehr zur Hälterungstemperatur

Dieses Experiment sollte zeigen, ob sich neben dem DNA-Gehalt auch der RNA-Gehalt während der Inkubation bei verschiedenen Temperaturen im Ernährungsmedium ändert. Darüber hinaus sollte geprüft werden, ob sich der Nukleinsäure-Gehalt der inkubierten Tiere ändert, wenn man sie direkt nach der Inkubation für weitere 48 Stunden bei ihrer Hälterungstemperatur hält.

Daphnien aus der 20 °C Dauerkultur wurden zuerst fünf Stunden in M4-Elendt-Medium bei ihrer Hälterungstemperatur vorinkubiert und dann 48 Stunden bei 10, 20, und 30°C im Ernährungsmedium inkubiert. Ein Teil der so inkubierten Tiere wurde für die Bestimmung des RNA- und DNA-Gehalts verwendet und die anderen Daphnien wurden dann für weitere 48 Stunden wieder bei ihrer Hälterungstemperatur inkubiert.

Es zeigte sich, dass nach 48 Stunden Inkubation bei 30 °C sowohl die RNA- als auch DNA-Konzentration stieg und 788 ± 136 (RNA) und $133 \pm 10,5$ (DNA) $\mu\text{g g}^{-1}$ FG erreichte (Abb. 24 A, B). Die Konzentrationen von RNA und DNA bei den anderen Inkubationstemperaturen waren hingegen ähnlich und betragen für RNA, $230 \pm 21,0$ (10 °C) und $235 \pm 28,9$ (20 °C) $\mu\text{g g}^{-1}$ FG (Abb. 24 B) und für DNA, $29,8 \pm 11,3$ (10 °C) und $26,0 \pm 9,1$ (20 °C) $\mu\text{g g}^{-1}$ FG (Abb. 24 A). Nach der Inkubation bei verschiedenen Temperaturen wurden einige Tiere wieder bei der Hälterungstemperatur von 20 °C inkubiert. Dabei kam es im Fall der vorherigen 30 °C Inkubation zu einer hohen Sterblichkeit der Daphnien, so dass hier nur in einer Probe RNA und DNA bestimmt werden konnte. Trotzdem zeigte sich, dass sowohl RNA- als auch DNA-Gehalt aller verschieden inkubierten Tiere auf niedrigem Niveau waren (Abb. 24 A, B). Das RNA/DNA-Verhältnis zeigte keine wesentlichen Unterschiede (Abb. 24 C).

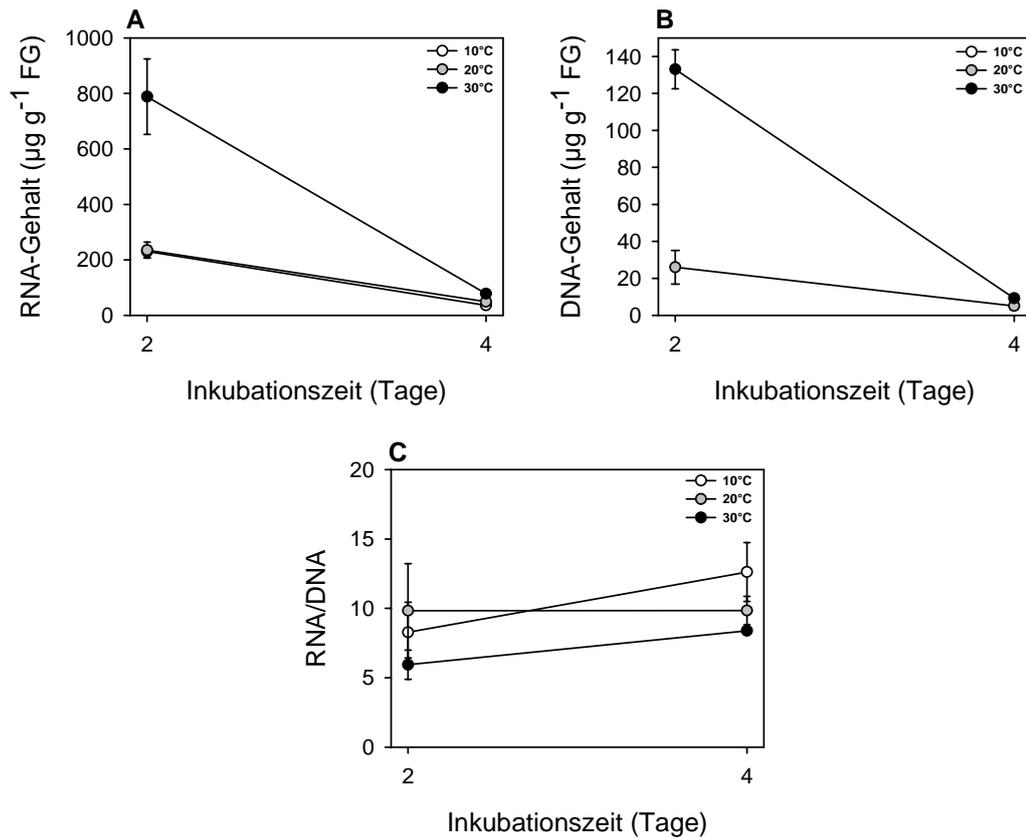


Abb. 24. (A) RNA-Gehalt, (B) DNA-Gehalt und (C) RNA/DNA-Verhältnis in *Daphnia magna*. Die 1,5 - 1,8 mm großen Tiere aus 20 °C Dauerkultur wurden zwei Tage bei 10, 20, und 30 °C in einem spezifischen Ernährungsmedium inkubiert. Danach wurden sie weitere zwei Tage bei ihrer Hälterungstemperatur (20 °C) inkubiert. Alle Ergebnisse (außer den Werten der Inkubation: 30 → 20 °C) sind als Mittelwert ± SD (n = 3 Tiere pro Inkubationszeit und Inkubationstemperatur; im Falle der Inkubation 30 → 20 °C: n = 1) dargestellt.

3.3.2.3. RNA-, DNA-Gehalt und RNA/DNA-Verhältnis in *Daphnia magna* als Funktion der Temperatur nach einer zwei- und dreitägigen Inkubation bei verschiedenen Temperaturen und nach Rückkehr zur Hälterungstemperatur

1,5 - 1,8 mm große Daphnien aus der 20 °C Dauerkultur wurden zuerst fünf Stunden in M4-Elendt-Medium bei ihrer Hälterungstemperatur vorinkubiert und dann 48 Stunden bei 10, 20, und 30°C im Ernährungsmedium inkubiert. Ein Drittel der so inkubierten Tiere wurde direkt für Bestimmung des RNA- und DNA-Gehalts verwendet. Ein Drittel wurde für weitere 24 Stunden bei den gleichen Temperaturen inkubiert und der dritte Teil der Daphnien wurde zu ihrer Hälterungstemperatur zurückgebracht und bei dieser Temperatur 48 Stunden inkubiert. Der RNA-Gehalt der Kontrolltiere betrug $204 \pm 28,5 \mu\text{g g}^{-1} \text{FG}$. Nach den ersten zwei Tagen Inkubation

war die RNA-Konzentration bei kalter und mittlerer Temperatur etwas niedriger (10 °C: $135 \pm 22,6$; 20 °C: $99,3 \pm 3,4 \mu\text{g g}^{-1}$ FG), bei hoher Temperatur aber deutlich höher (30 °C: $745 \pm 59,3 \mu\text{g g}^{-1}$ FG) (Abb. 25 A). Die weitere Inkubation bei den gleichen Temperaturen (24 Stunden) zeigte wenig Änderung. Die Werte nach insgesamt 3 Tagen Inkubation lagen bei $106 \pm 9,2$ (10 °C), $202 \pm 35,9$ (20 °C), und $700 \pm 37,5$ (30 °C) $\mu\text{g g}^{-1}$ FG. Die Messung des RNA-Gehalts in Daphnien, die nach einer Inkubation von zwei Tagen bei verschiedener Temperatur zurück zu ihrer Hälterungstemperatur gebracht wurden, bestätigte, dass die erhöhte RNA-Konzentration bei 30 °C reversibel ist, wenn man die Tiere zu ihrer Hälterungstemperatur zurückbringt (Abb. 25 A).

Die Änderung des DNA-Gehalts während der Inkubation verlief ähnlich wie im Fall des RNA-Gehalts (Abb. 25 B). Die DNA-Konzentration der Kontrolltiere betrug $23,5 \pm 1,6 \mu\text{g g}^{-1}$ FG. Nach der Inkubation von zwei Tagen bei 10, 20, und 30 °C lagen die Werte bei $29,7 \pm 8,5$, $28,5 \pm 5,1$, und $163 \pm 23,9 \mu\text{g g}^{-1}$ FG. Weitere Inkubation bei den gleichen Temperaturen für die nächsten 24 Stunden verursachte keine wesentlichen Änderungen im DNA-Gehalt von *Daphnia magna* (Abb. 25 B). Somit war wiederum bei 30°C ein deutlicher Anstieg der Nukleinsäurekonzentration feststellbar. Die Änderung des DNA-Gehalts in Tieren, die zwei Tage lang bei drei unterschiedlichen Temperaturen (10, 20 und 30 °C) und danach zwei Tage bei ihrer Hälterungstemperatur inkubiert wurden, zeigte Ähnlichkeiten zum RNA-Gehalt. Die DNA-Konzentration der Tiere nach Rückkehr von 30 °C auf 20 °C sank auf $57,1 \pm 11,6 \mu\text{g g}^{-1}$ FG ab, während die DNA-Konzentration der anderen Tiergruppen (10 → 20 °C und 20 → 20 °C) auf weitgehend konstantem Niveau blieb ($22,1 \pm 1,6$ und $22,2 \pm 4,9 \mu\text{g g}^{-1}$ FG) (Abb. 25 B).

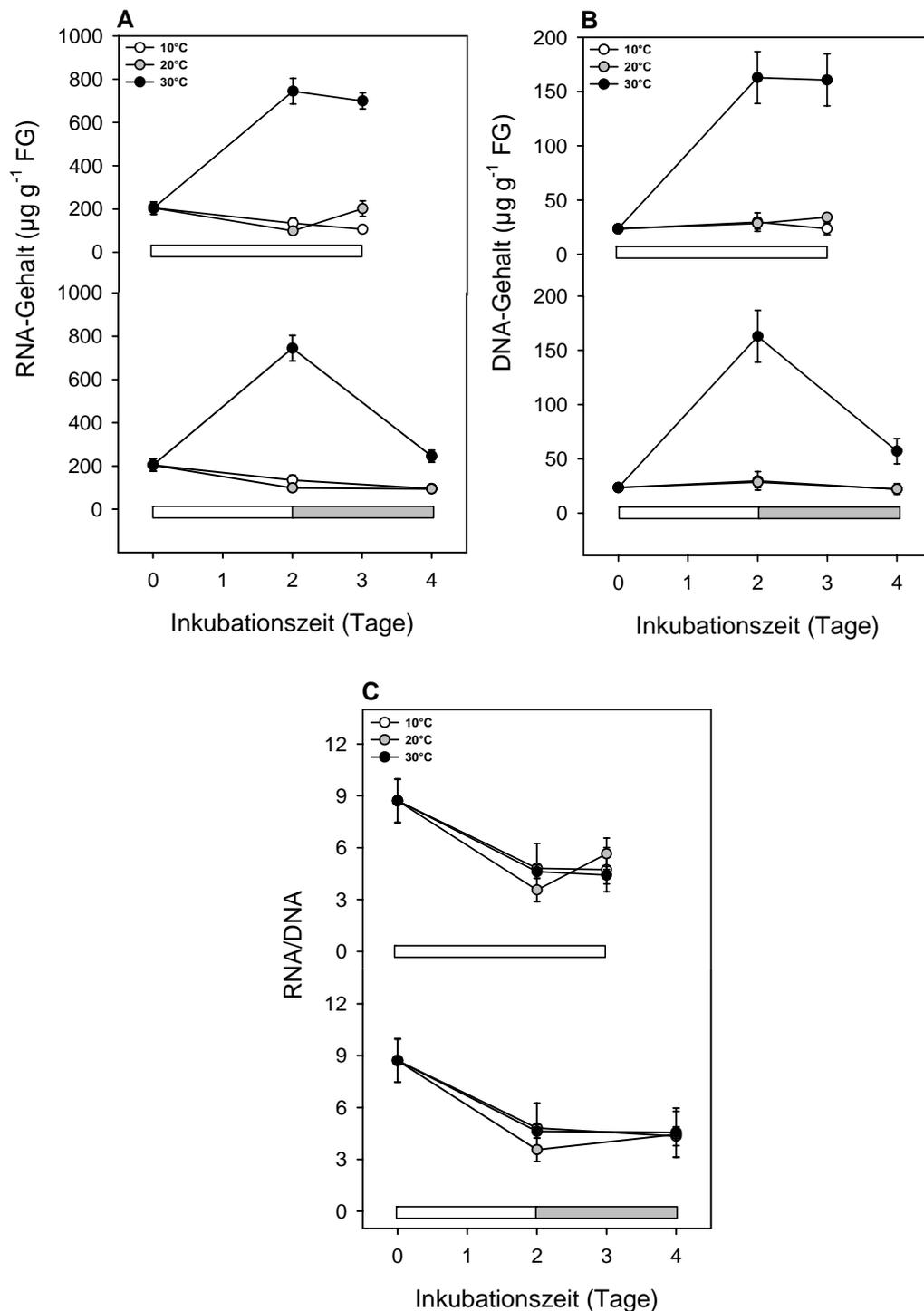


Abb. 25. (A) RNA-Gehalt, (B) DNA-Gehalt und (C) RNA/DNA-Verhältnis in *Daphnia magna*. Die 1,5 - 1,8 mm großen Tiere aus 20 °C Dauerkultur wurden 48 Stunden bei 10, 20, und 30 °C in einem spezifischen Ernährungsmedium inkubiert. Danach wurden sie entweder weiter bei den gleichen Temperaturen für die nächsten 24 Stunden oder bei ihrer Halterungstemperatur für 48 Stunden inkubiert. Die weißen Balken symbolisieren die zwei- oder dreitägige Inkubation bei 10, 20, und 30 °C; die grauen Balken symbolisieren Rückkehr zur Halterungstemperatur (20 °C) und Inkubation für weitere zwei Tage. Alle Ergebnisse sind als Mittelwert \pm SD ($n = 6$ Tiere pro Inkubationszeit und Inkubationstemperatur) dargestellt.

Die Berechnung des RNA/DNA-Verhältnisses ergab den höchsten Wert in den Kontrolltieren ($8,7 \pm 1,2$) und geringere Werte bei allen Inkubationen (Abb. 25 C). Nach zwei Tagen Inkubation bei 10, 20, und 30 °C lagen die Werte bei $4,8 \pm 1,4$, $3,6 \pm 0,7$, und $4,6 \pm 0,4 \mu\text{g g}^{-1}$ FG und veränderten sich während einer weiteren Inkubation von 24 h bei diesen Temperaturen nicht. Auch in den Daphnien, die nach zweitägiger Inkubation zurück zur Hälterungstemperatur gebracht wurden, änderte sich das RNA/DNA-Verhältnis nicht weiter (Abb. 25 C).

Folglich führte eine zwei- oder dreitägige Inkubation bei 30 °C zu einer Erhöhung der Konzentration von beiden Nukleinsäuren. Rückkehr zur Hälterungstemperatur (20 °C) für weitere zwei Tage ergab, dass diese Veränderung reversibel ist.

3.3.2.4. Proteinkonzentration und Frischgewicht von *Daphnia magna* als Funktion der Temperatur nach einer zwei- und dreitägigen Inkubation bei verschiedenen Temperaturen und nach Rückkehr zur Hälterungstemperatur

1,5 - 1,8 mm große Daphnien aus der 20 °C Dauerkultur wurden zuerst fünf Stunden in M4-Elendt-Medium bei ihrer Hälterungstemperatur vorinkubiert und dann 48 Stunden bei 10, 20, und 30°C im Ernährungsmedium inkubiert. Ein Drittel der so inkubierten Tiere wurde direkt für die Bestimmung von Proteinkonzentration und Frischgewicht verwendet. Ein Drittel wurde für weitere 24 Stunden bei den gleichen Temperaturen inkubiert und der dritte Teil der Daphnien wurde zu ihrer Hälterungstemperatur zurückgebracht und 48 Stunden inkubiert. Anhand der Proteinbestimmung konnte festgestellt werden, dass sich der Proteingehalt in allen, unterschiedlich inkubierten Tiergruppen kaum änderte (Abb. 26 A). Die Proteinkonzentration der Kontrolltiere betrug $7,1 \pm 0,7 \text{ mg g}^{-1}$ FG und blieb während der Inkubation auf weitgehend konstantem Niveau. Die Werte des Proteingehalts nach der Inkubation bei 10, 20, und 30 °C über zwei Tage lagen bei $6,6 \pm 0,4$, $6,2 \pm 0,8$, und $7,1 \pm 1,5 \text{ mg g}^{-1}$ FG, und die Werte nach drei Tagen Inkubation unterschieden sich davon nicht viel. Ähnlich lagen die Werte im Fall der Tiere, die nach zweitägiger Inkubation bei 10, 20, und 30 °C für weitere zwei Tage bei der Hälterungstemperatur inkubiert wurden.

Im Falle des Frischgewichts aller Tiergruppen war die Situation ähnlich, d.h. es konnte keine wesentliche Änderung des Tiergewichts während der Inkubation beobachtet werden (Abb. 26 B). Das Frischgewicht eines Einzeltiers von *Daphnia*

magna lag bei $0,38 \pm 0,7$ mg (Kontrolltiere). Die zwei- oder dreitägige Inkubation bei 10, 20, und 30 °C hatte keine Auswirkung auf den Proteingehalt (Abb. 26 A). Nach zwei Tagen Inkubation lagen die Werte bei $0,46 \pm 0,12$, $0,42 \pm 0,10$, und $0,43 \pm 0,09$ mg und nach drei Tagen wich das Frischgewicht davon nicht viel ab. Ein ähnlich geringer Effekt, d.h. keine deutliche Änderungen des Frischgewichts, wurde in den Daphnien beobachtet, die nach zweitägiger Inkubation bei 10, 20, und 30 °C für weitere zwei Tage bei ihrer Hälterungstemperatur inkubiert wurden (Abb. 26 B). Infolgedessen hatte der erhöhte RNA- und DNA-Gehalt in der 30 °C inkubierten Tieren keinen Zusammenhang mit einem steigenden Proteingehalt der identisch inkubierten Daphnien. Die Messung des Frischgewichts aller inkubierten Tiergruppen schloss weiterhin aus, dass die während der Inkubation auftretende Erhöhung der Nukleinsäurekonzentration mit Änderungen des Körpergewichts von *D. magna* zusammenhängt.

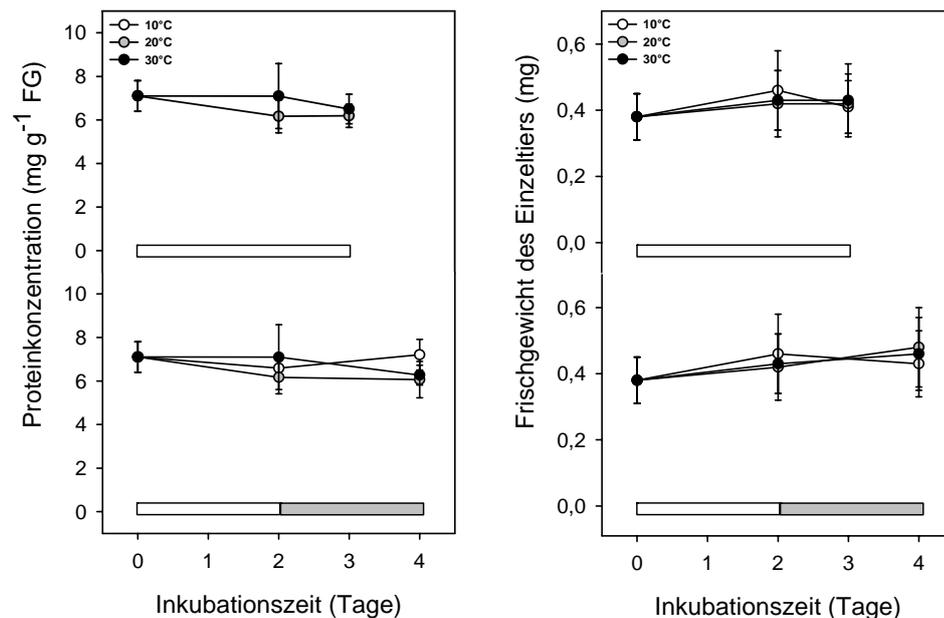
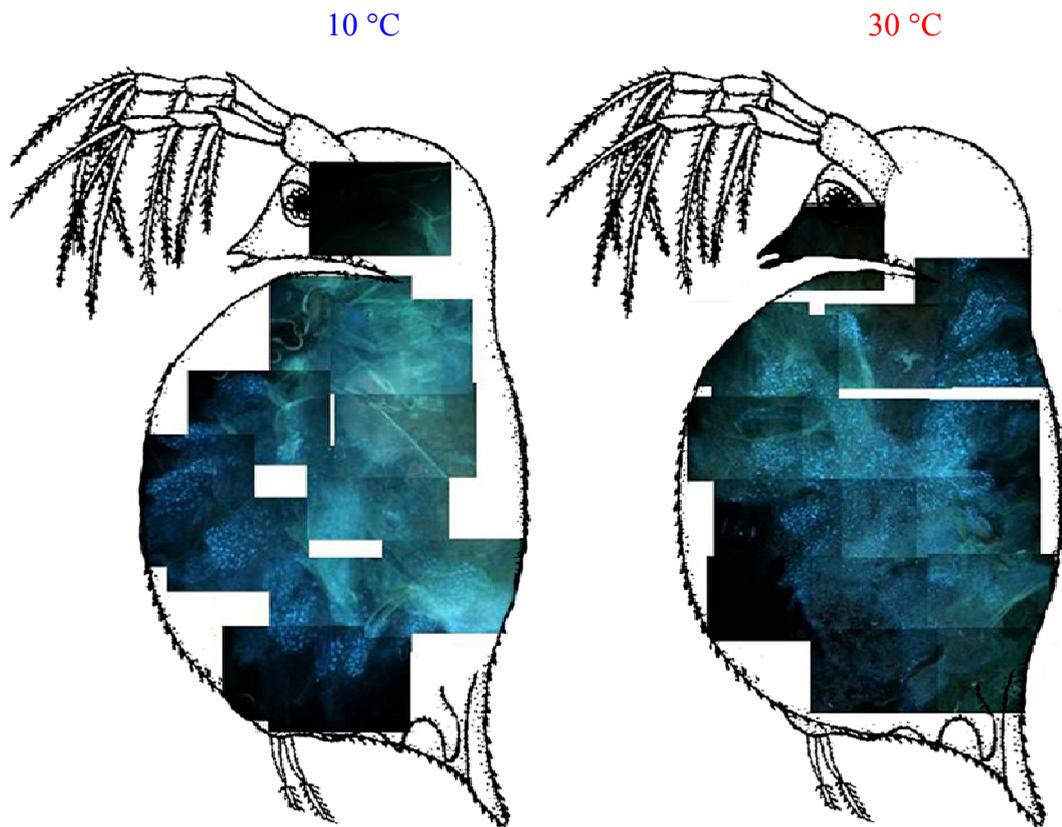


Abb. 26. (A) Proteinkonzentration und (B) Frischgewicht von *Daphnia magna*. Die gleich großen Tiere aus 20 °C Dauerkultur wurden 48 Stunden bei 10, 20, und 30 °C in einem spezifischen Ernährungsmedium inkubiert. Direkt danach wurden sie entweder weiter bei den gleichen Temperaturen für die nächsten 24 Stunden oder bei ihrer Hälterungstemperatur (20 °C) für 48 Stunden inkubiert. Die weißen Balken symbolisieren die zwei- oder dreitägige Inkubation bei 10, 20, und 30 °C; die grauen Balken symbolisieren Rückkehr zur Hälterungstemperatur (20 °C) und Inkubation für weitere zwei Tage. Alle Ergebnisse sind als Mittelwert \pm SD ($n = 6$ Tiere pro Inkubationszeit und Inkubationstemperatur) dargestellt.

3.3.3. Quantitative Analyse der DNA-Fluoreszenz

Zwei Körperteile von *Daphnia magna*, Epipoditen (das vierte Paar) und Antennen (das zweite, distale Segment des oberen Astes) (Abb. 27 B) wurden für die bildgebende Erfassung des DNA-Gehalts verwendet.

A)



B)

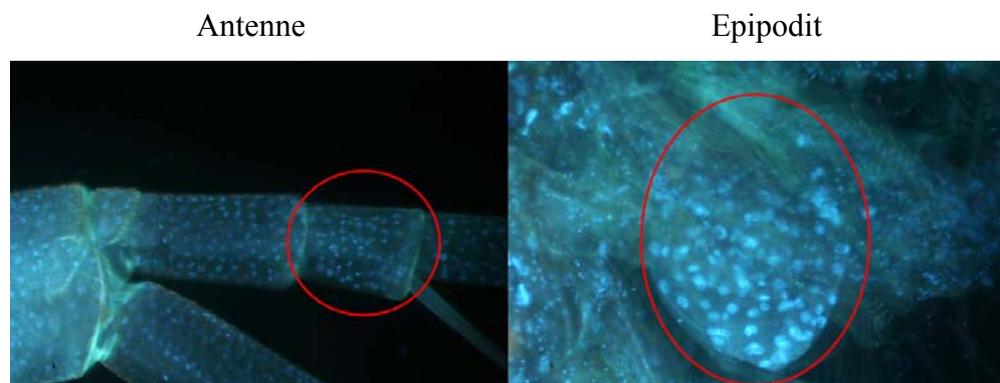


Abb. 27. Fluoreszenzfärbung der Zellkerne von *Daphnia magna*. (A) Fluoreszenzbilder von 10 und 30 °C inkubierten Daphnien ermöglichen die Bestimmung der Lage angefarbter Kerne im Tier.

(B) Fluoreszenzbilder von Antenne und Epipodit der Daphnien ermöglichen den Vergleich der angefärbten Strukturen.

Für die Bildauswertung wurden drei Parameter in Betracht gezogen: die Anzahl der Kerne (Antenne), die Fläche sowie die Fluoreszenzintensität der Zellkerne. Diese Auswertung erfolgte mit dem Computerprogramm Adobe® Photoshop®9.0. Es wurden jeweils acht Antennen-Segmente und sieben Epipoditen von Daphnien jeder Inkubationstemperatur ausgewertet. Es zeigte sich, dass die Zahl der Zellkerne im zweiten Segment der Antenne bei 30 °C deutlich höher war als bei 10 °C akklimatisierten Tieren (Abb. 28 A). Die Fluoreszenzintensität sowohl von Epipoditen als auch von Antennen war intensiver in 30 °C als in 10 °C akklimatisierten Tieren (Abb. 28 B, C). Die Auswertung der Zellkernflächen zeigte, dass die Zellkerne in den Epipoditen der 30 °C inkubierten Tiere größer als in den 10 °C inkubierten Daphnien waren (Abb. 28 D). Im Fall der Zellkernflächen in den Antennen zeigte sich, dass die Zellkerne der 30 °C inkubierten Tiere etwas kleiner als die der 10 °C Daphnien waren (Abb. 28 E).

Die Multiplikation von Fluoreszenzintensität x Zellkernfläche ergab, dass der DNA-Gehalt der Epipoditen von 30 °C akklimatisierten Tieren deutlich höher war als von 10 °C akklimatisierten Tieren (Abb. 28 F). Im Fall der Antennen waren die Werte in 30 °C Daphnien auch höher, jedoch war der Unterschied statistisch nicht signifikant (Abb. 28 G).

Die Auswertung der Fluoreszenzbilder ergab, dass die Erhöhung des DNA-Gehalts in 30 °C inkubierten Daphnien Folge einer erhöhten Zellkernanzahl, einer stärkeren Zellkern-Fluoreszenzintensität bzw. einer höheren Zellkerngröße sein kann.

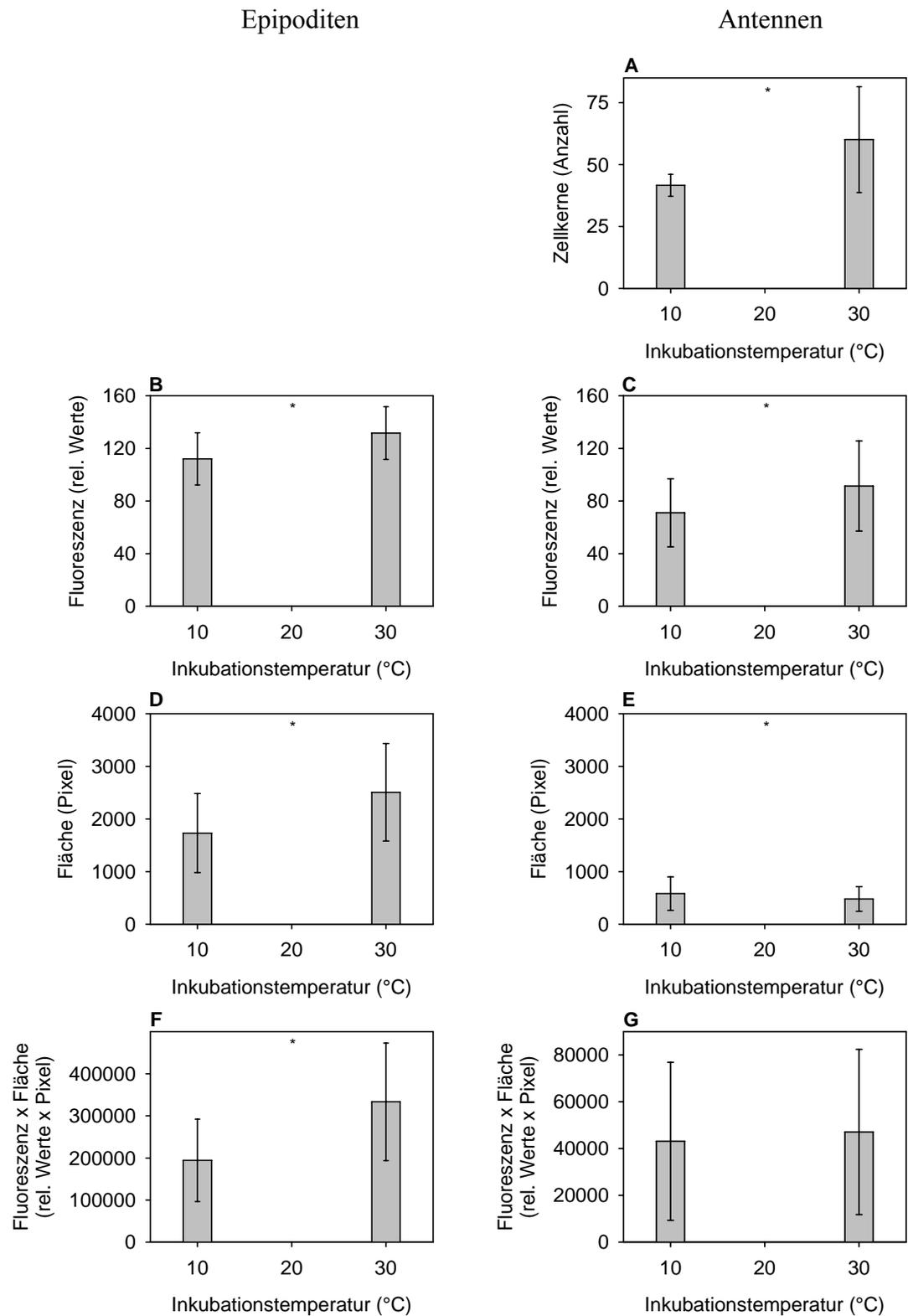


Abb. 28. Auswertung der Fluoreszenzbilder von Epipoditen und Antennen der Daphnien. Die 1,5 - 1,8 mm großen Tiere wurden 48 Stunden bei 10 und 30 °C in einem spezifischen Ernährungsmedium inkubiert. (A) Anzahl der Zellkerne in den Antennen. (B) Fluoreszenzintensität der Zellkerne in den Epipoditen. (C) Fluoreszenzintensität der Zellkerne in den Antennen. (D) Fläche der Zellkerne in den Epipoditen. (E) Fläche der Zellkerne in den Antennen. (F) Fluoreszenzintensität x Fläche der Zellker-

ne in den Epipoditen. (G) Fluoreszenzintensität x Fläche der Zellkerne in den Antennen. Alle Ergebnisse sind als Mittelwert \pm SD (n = 7 Epipoditen; n = 8 Antennen) dargestellt. Das Sternchen symbolisiert signifikante Unterschiede.

Die mit dem Fluoreszenzfarbstoff gefärbten Zellkerne der unterschiedlich inkubierten Daphnien wurden auch unter einem Konfokalmikroskop beobachtet. Eine genaue Strukturauflösung der Zellkerne gelang aber nicht (Abb. 29).

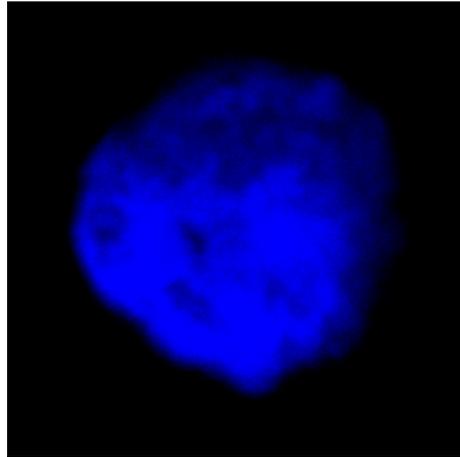


Abb. 29. Zellkern von *Daphnia magna* (Epipoditbereich) nach zweitägiger Inkubation bei 30 °C. Die Fluoreszenzaufnahme wurde unter einem Konfokalmikroskop (Vergrößerung: \times 63, Wasserimmersion) gemacht.

3.3.4. Semiquantitative PCR für die Gene von Hämoglobin, Hsp70, rDNA und Actin bei *Daphnia magna*

Grundsätzlich zeigte das Verhältnis der Graustufenmittel der *HbDb*-, *Hsp70*- und *Dm18SrDNA*-Banden zu den *act-4*-Banden keine klaren Unterschiede zwischen 10 und 30 °C inkubierten Tieren (Abb. 30). Zwar war das rDNA/Actin-Verhältnis in 30 °C inkubierten Tieren etwas höher als in 10 °C akklimatisierten Daphnien (Abb. 30), jedoch war dieser Unterschied statistisch nicht signifikant.

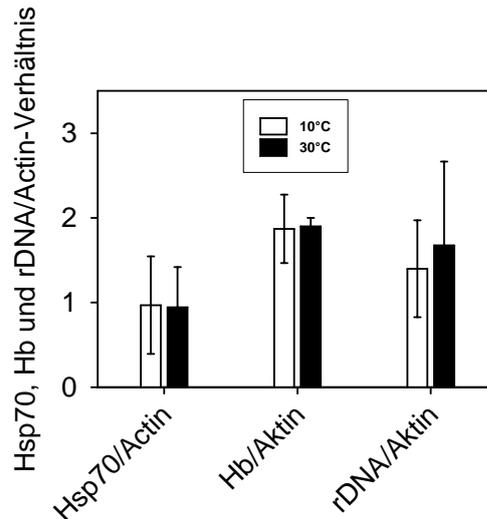


Abb. 30. Das Verhältnis der Graustufenmittel der *HbDb*-, *Hsp70*- und *Dm18SrDNA*-Banden zu den *act-4*-Banden als Resultat einer semiquantitativen PCR. Die Amplifikate wurden auf einem Agarosegel getrennt und mittels Ethidiumbromid nachgewiesen, die Helligkeit der Banden wurde ermittelt und das Verhältnis der Graustufenmittel berechnet. Die dafür verwendeten Daphnien wurden 48 Stunden bei 10 und 30 °C in einem spezifischen Ernährungsmedium inkubiert. Alle Ergebnisse sind als Mittelwert \pm SD dargestellt (n = 9 Experimente für Hsp70/Actin; rDNA/Actin und n = 3 Experimente für Hb/Actin).

3.3.5. rRNA-Elektrophorese bei *Daphnia magna*

Die Daphnien für die RNA-Extraktion und rRNA-Elektrophorese wurden aus der 20 °C Dauerkultur genommen und zwei Tage lang bei 10 und 30 °C im Ernährungsmedium inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Tiere eingefroren und die RNA extrahiert. Nach der Extraktion wurde die RNA auf einem Agarosegel getrennt und mittels Ethidiumbromid-Färbung nachgewiesen. Nach der Auswertung und Normierung des Graustufenmittels der Banden ergab sich, dass die Werte von 28 S rRNA als auch von 18 S rRNA in 30 °C akklimatisierten Daphnien höher als in 10 °C inkubierten Daphnien waren (Abb. 31 A, B). Es ergab sich jedoch kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden unterschiedlich akklimatisierten Tiergruppen.

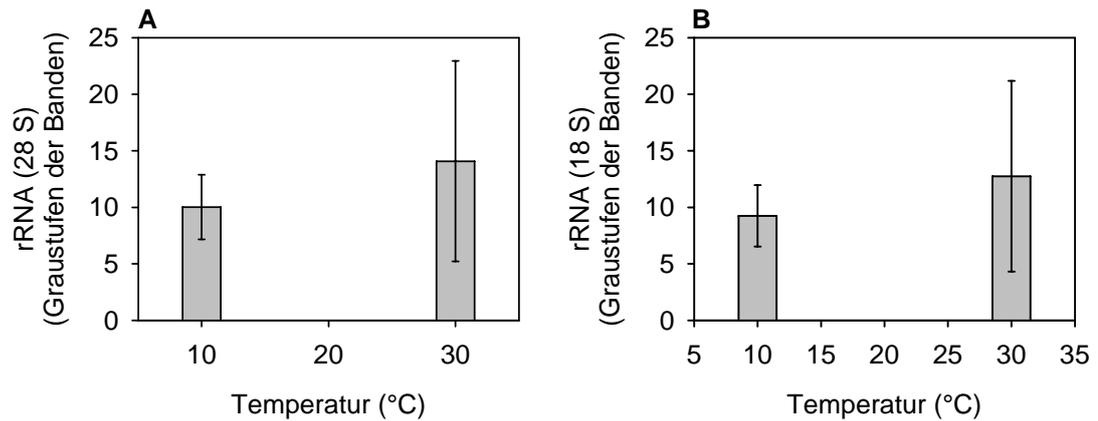


Abb. 31. Das Graustufenmittel der Banden von zwei rRNA-Untereinheiten (28 S und 18 S). Die vorher isolierten RNA-Fragmente wurden auf einem Agarosegel getrennt und mittels Ethidiumbromid-Färbung nachgewiesen, die Helligkeit der Banden wurde ermittelt und auf das Frischgewicht der Tiere normiert. Dazu verwendete Daphnien wurden 48 Stunden bei 10 und 30 °C in einem spezifischen Ernährungsmedium inkubiert. (A) Das Graustufenmittel der Banden der rRNA-Untereinheit 28 S. (B) Das Graustufenmittel der Banden der rRNA-Untereinheit 18 S. Alle Ergebnisse sind als Mittelwert \pm SD ($n = 9$ Experimente) dargestellt.

4. Diskussion

4.1. Untersuchungen zur Thermotoleranz von *Chaoborus crystallinus*-Larven und *Leptodora kindtii*

4.1.1. Mortalität

Die Temperatur ist einer der wichtigsten abiotischen Faktoren, die das Wachstum, den Stoffwechsel und das Überleben von Wirbellosen beeinflussen. Der Rückgriff auf Anaerobiose ermöglicht dem Organismus nur für eine kurze Zeit das Überleben in den Pessimum-Bereichen des Thermotoleranzfensters (Paul et al., 2004). Die Überschreitung dieser Grenzen oder eine verlängerte Exposition bei Kälte oder Hitze führen zum Tod (u.a. Schwerdtfeger, 1977; Pörtner et al., 2001, 2002; Hochachka und Somero, 2002). Die Mortalität hängt von der Höhe der Temperatur sowie der Dauer der Hitzeexposition ab (Zeis et al., 2004). Die Bestimmung der LT_{50} (Letaltemperatur) dient der Charakterisierung der Letalgrenzen des Thermotoleranzfensters.

Die Untersuchungen zur Überlebensrate am oberen Ende der Thermotoleranz zeigten, dass die Mortalität der *Chaoborus*-Larven von der Temperatur und der Dauer der Hitzeeinwirkung abhängt (Abb. 10 A, B). Obwohl die verwendeten Tiere im Winter (Wassertemperatur des Teichs: 3 °C) gefangen wurden, zeigte die LT_{50} relativ hohe Werte. Je nachdem, wie lange die Larven der Hitze ausgesetzt waren, lagen diese Werte zwischen 34,4 - 31,6 °C (1. und 48. Stunde der Inkubation). Vergleichbare Ergebnisse lieferte die Bestimmung der Lt_{50} (Letalzeit) als Funktion der Umgebungstemperatur, die mit steigender Umgebungstemperatur eine Abnahme der Überlebensdauer ergab (Abb. 10 C, D). Im Allgemeinen erhöht sich mit steigender Akklimatisationstemperatur auch schrittweise die Letaltemperatur (Heiman & Knight, 1972). Eine Vorinkubation bei wärmeren Temperaturen könnte möglicherweise die kritischen Grenzen noch weiter erhöhen. Wenn die Akklimatisationstemperatur von 10 °C auf 20 °C gesteigert wurde, erhöhte sich die 24-stündige Letaltemperatur um 1,9 °C bei *Gammarus fasciatus*, 1,3 °C bei *Asellus intermedius* und um 0,5 °C bei *Gammarus pseudolimnaeus* (Sprague, 1963). Auch bei *D. magna* hängt die Hitzetoleranz von der thermischen Akklimatisation ab (Paul et al., 2004). Eine Erhöhung der Akklimatisationstemperatur um 10 °C führt zu einem Anstieg der LT_{50} um etwa

2 °C, wenn die Mortalität bei 0 und 1 h nach Hitzeexposition gemessen wird (Zeis et al., 2004; MacIsaac et al., 1985). Auch die saisonale Akklimatisierung scheint eine wichtige Rolle für die Lage der LT_{50} zu spielen, wie sich auch im Falle von *Leptodora kindtii* zeigt: Im Herbst sind die oberen und unteren Letalgrenzen zu niedrigeren Temperaturen als im Sommer verschoben (Garton et al., 1990). Die LT_{50} (12 stündige Hitzeexposition) von im Herbst und Sommer gefangenen Glaskrebsen betragen 24,7 und 28,0 °C (Garton et al., 1990). Die LT_{50} von im Sommer gefangenen *Leptodora* war um über 3 °C höher. Die LT_{50} von im Winter gefangenen *Chaoborus*-Larven nach gleich langer Hitzeexposition (12 h) lag mit 33,2 °C über diesem Wert. Diese Art zeigt also eine erhöhte Letalgrenze in der Wärme.

Warm akklimatisierte Tiere besitzen also einen besseren Hitzeschutz, wofür größere Mengen an Hitze-Schock-Proteinen verantwortlich sein könnten (Feder und Hofmann, 1999). In der Tat wurde eine verstärkte Expression von Hsp 70 in 20 °C akklimatisierten *D. magna*, die für 4 Stunden 34 °C ausgesetzt wurden, beschrieben (Bond et al., 1993). Der Anstieg der Mortalität bei *Chaoborus*-Larven unter Hitzeinfluss ist wahrscheinlich auf eine Behinderung der Enzymaktivität und/oder auf Schäden im Makromolekülbereich (Proteine, Biomembranen) zurückzuführen. Physiologische Prozesse sind jedoch bereits in den suboptimalen Pejus-Bereichen behindert (Pörtner, 2001 und 2002). Insgesamt scheint der Vorteil der thermischen Akklimation bei der Hitze-Toleranz jedoch von geringerer Bedeutung zu sein (Paul et al., 2004).

4.1.2. Thermopräferenz

Thermopräferenz ist ein Verhaltensparameter, der zur Bestimmung der Lage des thermischen Toleranzfensters verwendet werden kann. Ektotherme Tiere wie *Chaoborus crystalinus* und *Leptodora kindtii* sind dadurch gekennzeichnet, dass ihre Körpertemperatur vollständig von der Umgebungstemperatur abhängt. In der Natur suchen ektotherme Tiere, sofern sie die Wahl haben, eine Temperatur auf, bei der alle physiologischen und biochemischen Prozesse optimal ablaufen können. Thermische Akklimatisierung oder Akklimation ändert das Präferenzverhalten innerhalb eines Temperaturgradienten (Wiggins und Frappell, 2000). Darüber hinaus führt Akklimatisation an Kälte zu stärker ausgeprägtem stenothermen Verhalten als Akklimatisation an Wärme (Lamkemeyer et al., 2003). Die bevorzugte Temperatur von *D. magna* in einem thermalen Gradienten steigt mit der Akklimatisationstemperatur, wobei die

mittlere Präferenztemperatur im Bereich der Akklimatisationstemperatur ($12,5 \pm 0,7$ °C bei 10 °C; $18,4 \pm 1,9$ °C bei 20 °C) oder darunter ($21,6 \pm 0,2$ °C bei 30 °C) liegt (Lamkemeyer et al., 2003).

Die *Chaoborus*-Larven wurden in der Mitte des für das Experiment verwendeten Glasbehälters (siehe 2.2.3.) bei ca. 14,2 °C eingebracht. Im Laufe der Messung bevorzugten die 4 °C akklimatisierten Larven eine höhere Temperatur als 14,2 °C. Nach sieben Stunden lag die Präferenztemperatur mit 15 °C aber nur leicht oberhalb der Starttemperatur.

Die *Chaoborus*-Larven, die drei oder sieben Tage bei 20 °C akklimatisiert wurden, bevorzugten ebenfalls höhere Temperaturen. Sie bewegten sich dabei langsam in Richtung ihrer Akklimatisationstemperatur und erreichten nach sieben Stunden Präferenztemperaturen von 18 bzw. 19,7 °C.

Die nach sieben Stunden erreichte Präferenztemperatur war also von der Akklimatisationsbedingungen abhängig: 15 °C bei 4 °C akklimatisierten Tieren, 18 - 19,7 °C bei 20 °C akklimatisierten Tieren.

Die für die Thermopräferenzmessung verwendeten Glaskrebse wurden in der Mitte des Glasbehälters bei ca. 22,9 °C untergebracht. Bei Abschluß der Tests (nach sieben Stunden) lag die Präferenztemperatur in einem ähnlichen Bereich ($20,3 \pm 2,9$ °C).

Die *Chaoborus*-Larven zeigten also nach sieben Stunden Präferenztemperaturen, die niedriger lagen als die von *Leptodora kindti*. Zumindest bei *Chaoborus* ist ein Einfluß der Akklimatisationstemperatur zu sehen. In wie weit bei *Leptodora kindti* eine an sich höhere Präferenztemperatur vorliegt, oder Akklimatisierungstemperatur der Talsperre entscheidend war, ist nicht eindeutig entscheidbar.

4.1.3. Schwimmaktivität

Schwimmaktivität ist eine leicht bestimmbare Variable, die zur Bewertung der Wirkung von Umweltfaktoren auf *D. magna* verwendet werden kann (Zeis et al., 2004). Die Temperatur hat starke Auswirkungen auf die Schwimmaktivität, daher kann dieser Messparameter zur Bestimmung der optimalen Temperaturbedingungen herangezogen werden (Zeis et al., 2004). Die Larven der Büschelmücke sind Lauerräuber. Mit Hilfe von zu "Schwimmbblasen" umgebildeten Tracheen stehen sie regungslos und horizontal im Wasser. Sie erkennen die Beute im Vorbeischwimmen durch Mechanorezeptoren und schlagen plötzlich zu, um sie mit ihren Mundgliedmassen zu

ergreifen (Lampert und Sommer, 1993). Als Lauerräuber ist der Stoffwechsel von *Chaoborus* extrem energiesparend (Wissel et al., 2003). Tatsächlich zeigen diese Larven eine geringe Bewegungsaktivität; manchmal ändern sie jedoch ihre Position, was im Zusammenhang mit der Umgebungstemperatur zu stehen scheint. Das Bewegungsverhalten dieser Tiere ist allerdings ganz anderes als das von Daphnien: Im Gegensatz zu Daphnien zeigen *Chaoborus*-Larven ein unregelmäßiges Aktivitätsmuster, was sich deutlich in einer hohen Standardabweichung bei der Schwimmaktivität (Abb.11) widerspiegelt.

Glaskrebse wiederum haben ein ganz anderes Schwimmverhalten als *Chaoborus*-Larven und in der Regel auch eine deutlich höhere Schwimmaktivität. Mit Hilfe des großen zweiten Antennenpaares rudern sie im Wassermilieu und suchen aktiv nach ihrer Beute (Browman et al., 1989).

Die Messung der Schwimmaktivität von *Chaoborus*-Larven zeigte, dass Tiere der beiden unterschiedlich akklimatisierten Gruppen zwischen 12 und 24 °C durch eine ähnlich niedrige Aktivität charakterisiert waren. Eine etwas höhere Schwimmaktivität zeigten die Tiere bei 27 und 30 °C (Abb. 11). Die höhere Schwimmaktivität vor allem bei 27 und 30 °C spiegelt vermutlich die höhere Stoffwechselrate der Tiere bei diesen Temperaturen wider. Zusätzlich hat eine erhöhte Schwimmaktivität den Vorteil frisches, sauerstoffreiches Wasser an die Körperoberfläche heranzuführen, welche die Gasaustauschfläche der Tiere darstellt, um den erhöhten Sauerstoffbedarf in der Wärme zu decken. Möglicherweise steht die erhöhte Schwimmaktivität der *Chaoborus*-Larven auch im Bezug zum steigenden Ernährungsbedarf bei höheren Temperaturen, um die gestiegene Metabolismus und die Wachstumsrate anzutreiben. Es könnte sein, dass der Ernährungsbedarf der Büschelmücken-Larven bei hohen Temperaturen so groß ist, dass sie ihr Bewegungsverhalten ändern und nicht mehr nur bewegungslos auf Beute warten.

Temperaturakklimatisierte *D. magna* zeigten maximale Schwimmaktivität in der Nähe ihrer Akklimatisationstemperatur (Paul et al., 2004). Die Aktivitätskurve der Daphnien konnte unidirektional durch Akklimatisation verschoben werden. Die *Chaoborus*-Larven wurden bei 4 und 20 °C akklimatisiert, jedoch schien die Akklimatisation keine deutliche Auswirkung auf die Schwimmaktivität zu haben. Es war nur eine etwas höhere Aktivität bei den 4 °C akklimatisierten Tieren im Vergleich zu den 20 °C akklimatisierten Tieren bei der Umgebungstemperatur von 30 °C feststellbar.

Zeis et al. (2004) wiesen nach, dass warm akklimatisierte *D. magna* eher eine niedrigere Temperatur als die Temperatur ihrer maximalen Schwimmaktivität favorisieren, kalt akklimatisierte *D. magna* bevorzugen dagegen die Temperatur, die ihrer maximalen Schwimmaktivität entspricht. Im Fall der warm akklimatisierten *Chaoborus*-Larven (20 °C) war die Präferenztemperatur deutlich niedriger als die Temperatur der maximalen Schwimmaktivität (18 - 19,7 °C vs. 30 °C). Kalt akklimatisierte *Chaoborus*-Larven (4 °C) zeigten eine Präferenztemperatur von 15 °C, während das Maximum ihrer Schwimmaktivität ebenfalls bei 30 °C lag. Die erhöhte Schwimmaktivität der *Chaoborus*-Larven bei hohen Temperaturen ist also eher ein Anzeichen dafür, dass sich die Tiere außerhalb ihres physiologischen Optimums befinden.

Leptodora kindtii besitzt fünf Paar Thorakopoden. Die Thorakopoden dienen vermutlich nicht der Ventilation, sondern bilden zusammen mit dem Thorax einen "Ernährungskorb" (Browman et al., 1989; Herzig & Auer, 1990). Für die Fortbewegung sind die zweiten Antennen als große kräftige Ruderorgane ausgebildet (Browman et al., 1989). Die Schwimmaktivität der Glaskrebse nahm mit steigender Umgebungstemperatur zu und erreichte ein Maximum bei 27 °C (2006) oder 26 °C (2007) (Abb. 16). Auch hier ist die Schwimmaktivität zuerst einmal mit der in der Wärme steigenden Stoffwechselrate verknüpft. Herzig & Auer (1990) wiesen auch darauf hin, dass die Raubrate von *L. kindtii* einen Bezug zur Umgebungstemperatur hat. Die höchste Raubrate beobachteten sie zwischen 19 und 20 °C (Herzig & Auer, 1990), Mordukhai-Boltowskaya (1958) wiederum zwischen 20 und 25 °C. Weiterhin gilt auch hier, dass die Präferenztemperatur (20,3 °C) niedriger lag, als die Temperatur der maximalen Schwimmaktivität (24 bzw. 25,2 °C).

Zusammenfassend lässt sich also sagen, dass bei beiden Arten die Präferenztemperatur deutlich unter der Temperatur für maximale Schwimmaktivität lag und dass *Leptodora kindtii* mit der Temperatur für das Maximum der Schwimmaktivität vermutlich näher am physiologischen Optimum lag als die *Chaoborus*-Larven

4.1.4. Sauerstoffbedarf

In aquatischen Habitaten ist gelöster Sauerstoff als kritischer Faktor bekannt, der einen Einfluss auf die Populationsstruktur und die Verteilung der Arten hat (Hutchinson, 1967). Bei erhöhten Temperaturen treffen die steigende metabolische Rate und der steigende Sauerstoffbedarf der aquatischen Ektothermen auf eine reduzierte Sau-

erstoffverfügbarkeit, da die Sauerstofflöslichkeit im Wasser verringert ist. Wenn die Tiere nicht in der Lage sind, die Sauerstoffversorgung durch konvektiven Transport ausreichend zu verstärken, um den Sauerstoffbedarf komplett abzudecken, muss diese Kluft durch anaeroben Stoffwechsel überbrückt werden (Pörtner et al., 2001, 2002). Ein Mißverhältnis zwischen der konvektiven Sauerstoffversorgung und dem Energiebedarf wird auch bei niedrigen Temperaturen als Begrenzung der thermischen Toleranz angenommen. Obwohl der Sauerstoffbedarf in der Kälte sinkt, kann der Energiestoffwechsel wegen des eintretenden Stillstands in der Ventilation und Perfusion nicht ausreichend mit Sauerstoff versorgt werden (Pörtner, 2002). Eine durch kalte und warme Temperaturen begrenzte Ventilations- und Zirkulationsleistung wurde beispielsweise bei der Seespinne *Maja squinado* als Ursache für eine unzureichende Sauerstoffversorgung und damit auch für eine limitierte thermische Toleranz beschrieben (Frederich and Pörtner, 2000).

Die respirometrischen Messungen an *Chaoborus*-Larven bei unterschiedlichen Umgebungstemperaturen zeigten eine sehr geringe Sauerstoffverbrauchsrate der Tiere (Abb. 12 A). Der Sauerstoffverbrauch von 2 °C akklimatisierten *Chaoborus*-Larven bei 10, 20, und 30°C betrug 5,3, 9,6 und 19,7 $\mu\text{mol O}_2 \text{ h}^{-1} \text{ g}^{-1} \text{ FG}$. Bei 20 °C akklimatisierten Larven waren die Werte sogar noch niedriger und lagen bei 3,1, 3,6 und 5,2 $\mu\text{mol O}_2 \text{ h}^{-1} \text{ g}^{-1} \text{ FG}$. Der Sauerstoffverbrauch von *D. magna*, beispielsweise, stieg exponentiell mit der Umgebungstemperatur an (Paul et al., 2004) und betrug unter normoxischen Bedingungen für die Temperaturen 10, 20 und 30 °C etwa 12,5, 16,7 – 25,0 und 54,2 $\mu\text{mol O}_2 \text{ h}^{-1} \text{ g}^{-1} \text{ FG}$ (die Originaldaten, die in $\mu\text{mol O}_2 \text{ h}^{-1} \text{ g}^{-1} \text{ TG}$ angegeben wurden, wurden in $\mu\text{mol O}_2 \text{ h}^{-1} \text{ g}^{-1} \text{ FG}$ nach Kobayashi (1983) umgerechnet; siehe Paul et al., 1997, Lamkemeyer et al. 2003). Je nachdem bei welcher Temperatur die respirometrischen Messungen durchgeführt wurden, war also die Sauerstoffverbrauchsrate von 2 und 20 °C akklimatisierten *Chaoborus*-Larven um einen Faktor 1,7 – 2,7 und 4,0 – 10,4 geringer als die von *D. magna*. Auch im Vergleich zu anderen Daphnia-Arten ist die Sauerstoffverbrauchsrate der Büschelmückenlarven sehr gering (Pinkhaus et al. 2007).

Jäger und Waltz (2002) berichteten, dass die Larven von *Chaoborus flavicans* in der Lage sind ihren Metabolismus auf eine sehr geringe Sauerstoffsättigung in der Umgebung einzustellen. Oberhalb des kritischen Wertes von 15 % Sauerstoffsättigung blieb die Sauerstoffverbrauchsrate konstant und zeigte keine Abhängigkeit von der Sauerstoffsättigung. Bei einer Sauerstoffsättigung von 5 % sank die Sauerstoff-

verbrauchsrate nur um 15 % des maximalen Verbrauchs (Jäger und Walz, 2002). Nur bei sehr niedrigen Sauerstoffsättigungswerten, nach Jäger und Waltz (2002) unter 15 % für *C. flavicans*, müssen die Larven auf den weniger effizienten anaeroben Weg umschalten. Auch der Sauerstoffverbrauch von *Chaoborus punctipennis* scheint nicht direkt mit der Konzentration des im Medium gelösten Sauerstoffs zusammenzuhängen (Barker und Wilhm, 1982).

Akklimatisation scheint aber eine wichtige Rolle für die Sauerstoffverbrauchsrate der *Chaoborus*-Larven zu spielen. Bei identischer Messtemperatur verbrauchten die 2 °C akklimatisierten Larven deutlich mehr Sauerstoff als die 20 °C akklimatisierten Tiere (Abb. 12 A). Dies hängt wahrscheinlich mit der Mitochondriendichte zusammen. Akklimatisation an Kälte führt zu einem Anstieg der mitochondrialen Dichte und damit auch der aeroben Kapazität (St-Pierre et al., 1998; Guderley 1998), Hitze sorgt hingegen dafür, dass dieser Prozess umgekehrt wird (Pörtner et al., 2001). Die Berechnung der kritischen P_{O_2} -Werte für *Chaoborus crystallinus*-Larven bei drei unterschiedlichen Umgebungstemperaturen (Abb. 12 B) zeigt, dass der Sauerstoffpartialdruck in normoxischem Medium immer ausreicht, die jeweilige temperaturspezifische O_2 -Verbrauchsrate durch Diffusion über die Körperoberfläche der Tiere zu decken und die aerobe Versorgung der Gewebe zu gewährleisten. Dies bedeutet vor allem, dass hier keine temperaturspezifische Limitierung der Sauerstoffversorgung vorliegt, und dass im Fall einer ausreichenden diffusiven O_2 -Versorgung die Voraussetzungen für das Modell der sauerstofflimitierten Thermotoleranz (Pörtner 2001, 2002) nicht erfüllt sind.

Die Messung des Sauerstoffverbrauchs von *Leptodora kindtii*, die bei 12, 21 und 30 °C durchgeführt wurde, ergab 16,7, 18,0 und 25,4 $\mu\text{mol } O_2 \text{ h}^{-1} \text{ g}^{-1} \text{ FG}$ (Abb. 17 A). Diese Werte sind deutlich höher als bei *Chaoborus crystallinus*-Larven, und ähnlicher dem Sauerstoffverbrauch anderer aquatischer Wirbelloser wie z.B. Daphnien. In der Literatur gibt es keine Berichte über Atmungsorgane bei *Leptodora kindtii*, jedoch zeigte die Berechnung der kritischen P_{O_2} -Werte, dass Sauerstoffdiffusion durch den Carapax bei den drei untersuchten Umgebungstemperaturen gerade ausreicht, um die Gewebe mit ausreichend Sauerstoff zu versorgen (Abb. 17 B). Allerdings waren die Werte des kritischen Sauerstoffpartialdrucks viel höher als bei *Chaoborus*-Larven und lagen dem normoxischen Sauerstoffpartialdruck im Medium sehr nah.

Die Q_{10} -Werte lagen bei beiden Tierarten meist unterhalb von 2. Die Sauerstoffverbrauchsrate sowohl von *Chaoborus crystallinus*-Larven als auch von *Leptodora kindtii* weist also eine recht geringe Temperaturabhängigkeit auf.

4.1.5. NADH-Fluoreszenz

Das NADH-Fluoreszenzsignal gibt Aufschluss über den Redox-Status der Mitochondrien. Wenn der Sauerstoffbedarf das Sauerstoffangebot übertrifft, werden die mitochondriale Elektronentransportrate und oxidative Phosphorylierungsrate reduziert, was wiederum für eine erhöhte NADH-Fluoreszenz sorgt. Ein Anstieg der NADH-Fluoreszenz bei hohen Temperaturen ist ein Indikator für einen temperaturinduzierten Sauerstoffmangel in den Geweben (Hypoxie) und für die damit verbundene Verschiebung des Redox-Status zu Gunsten des NADH (Paul & Schneckenburger, 1996; Pinkhaus et al., 2007). Im Zusammenhang damit wird die mitochondriale Atmungskette durch den fehlenden Sauerstoff als Elektronenakzeptor gestoppt, die NADH-Bindestellen von NADH-Dehydrogenasen werden mit NADH abgesättigt und das freie mitochondriale NADH akkumuliert (Paul & Schneckenburger, 1996). Nach der Van't Hoff'schen Regel, werden bei niedrigen Temperaturen biochemische Reaktionen sowie die Stoffwechselrate und damit auch die oxidative Phosphorylierungsrate verlangsamt. Das NADH wird länger an den NADH-Bindungsstellen gebunden, das freie mitochondriale NADH wird angehäuft und bei photometrischer Messung gibt die NADH-Fluoreszenz ein stärkeres Signal.

Die Messung des NADH-Fluoreszenzsignals dient der Bestimmung des Grades des aeroben bzw. anaeroben Stoffwechsels in *Chaoborus crystallinus* und *Leptodora kindtii* bei unterschiedlichen Umgebungstemperaturen. Die Messung der NADH-Fluoreszenzintensität in *Chaoborus*-Larven wurde im Temperaturgradienten zwischen 12–30 °C durchgeführt. Im Bereich von 12–27 °C stellte sich die NADH-Fluoreszenzintensität in 4 °C akklimatisierten Larven relativ stabil dar. Bei 30 °C lag das NADH-Fluoreszenzsignal etwas höher, was als Hinweis auf beginnende anaerobe Prozesse interpretiert werden kann. Das NADH-Fluoreszenzsignal in 20 °C akklimatisierten *Chaoborus*-Larven variierte leicht im ganzen Temperaturbereich, aber im Wesentlichen blieb die NADH-Fluoreszenzintensität konstant (Abb. 12 C). Dies lässt die Vermutung zu, dass die Tiere im gemessenen Temperaturbereich in der Lage sind, den Sauerstoffbedarf ihrer Gewebe abzudecken. Zwar deutet die erhöhte NADH-Fluoreszenzintensität in 4 °C akklimatisierten *Chaoborus*-Larven bei 30 °C

auf eine Verschiebung des Redox-Status zu Gunsten des NADH hin, allerdings ist der Standardfehler dabei sehr hoch, was im Zusammenhang mit der erhöhten Schwimmaktivität der Tiere bei dieser Temperatur stehen kann. Wie vorherige Messungen der Schwimmaktivität von *Chaoborus*-Larven zeigten (siehe 4.1.3.), nimmt die Bewegungsaktivität der Büschelmückenlarven bei 30 °C stark zu. Die verstärkte Schwimmaktivität von *Chaoborus* bei 30 °C könnte einen Einfluss auf die erhöhte NADH-Fluoreszenzintensität, aber auch auf die Messgenauigkeit haben. Wie die respirometrischen Messungen und die Berechnung der kritischen P_{O_2} -Werte zeigten (siehe 4.1.4.), ist die Sauerstoffversorgung der unterschiedlich akklimatisierten *Chaoborus*-Larven bei allen Messtemperaturen, auch bei 30 °C, gut. Es kommt nicht zur Akkumulation von mitochondrialem NADH, und das NADH-Fluoreszenzsignal ändert sich nicht.

Anders stellte sich die NADH-Fluoreszenzintensität in *Leptodora kindtii* dar (Abb. 33) (Kluge, 2007). Das NADH-Fluoreszenzsignal in diesen Tieren änderte sich bei jeder gemessenen Temperatur. Ähnlich wie bei den *Chaoborus*-Larven wurde die Messung im Temperaturbereich zwischen 12–30 °C durchgeführt. Das NADH-Fluoreszenzsignal sank mit steigender Temperatur bis zum Minimum bei 27 °C. Überschritt die Messtemperatur diesen Wert, stieg das NADH-Fluoreszenzsignal wieder an (Abb. 33). Dies ist ein Hinweis darauf, dass die Glaskrebse oberhalb von 27 °C nicht in der Lage sind, die Sauerstoffversorgung in den Geweben aufrechtzuerhalten. Die Messungen der Sauerstoffverbrauchsrate und der berechnete kritische P_{O_2} zeigten, dass *L. kindtii* auch bei 30 °C, wenn auch knapp, eine ausreichende Sauerstoffversorgung zu besitzen scheint. Allerdings schließt das nicht aus, dass die Temperatur von 27 °C das thermische Optimum darstellt, bei der nicht nur die oxidative Phosphorylierungsrate, sondern auch die Schwimmaktivität (siehe 4.1.3) der Glaskrebse das höchste Niveau erreicht.

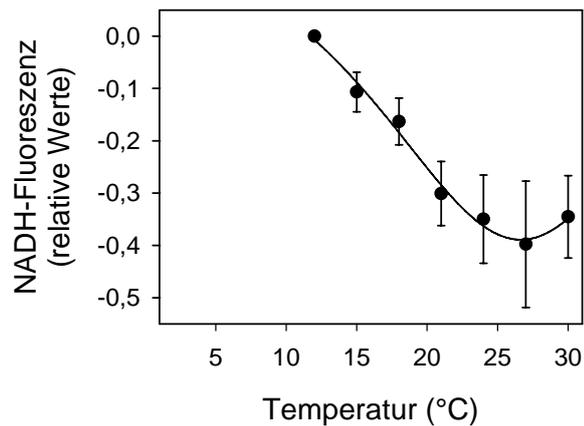


Abb. 33. NADH-Fluoreszenz in *Leptodora kindtii* bei unterschiedlichen Umgebungstemperaturen (Kluge, 2007). Die Ergebnisse sind als Mittelwert \pm SE (NADH-Fluoreszenz; $n = 3$ Tiere) dargestellt.

4.1.6. Herzfrequenz

Chaoborus-Larven besitzen ein dorsales Herz in der Form eines langen, dünnen Schlauches. Die Tiere haben offenbar kein Hämoglobin und andere Atmungsproteine. Darüber hinaus ist die Sauerstoffverbrauchsrate der Büschelmückenlarven so niedrig, dass Diffusion des Sauerstoffs durch die Kutikula völlig ausreicht. Wahrscheinlich spielt das Herz von *Chaoborus*-Larven nur eine Rolle beim Transport von Metaboliten, Ionen und Nährstoffen.

Die Herzfrequenz der *Chaoborus*-Larven zeigte eine starke Temperaturabhängigkeit. Im Allgemeinen war die Herzfrequenz niedrig und betrug für die 2 und 20 °C akklimatisierten Tieren bei 12 °C 7,7 und 10,3 Schläge \cdot min⁻¹ und erreichte ein Maximum bei 27 °C, wo Werte von 16,9 und 20,2 Schläge \cdot min⁻¹ gemessen wurden. Bei 30 °C sank die Herzfrequenz der beiden unterschiedlich akklimatisierten Tiere.

Die Herzfrequenz der 20 °C akklimatisierten *Chaoborus*-Larven war bei allen getesteten Umgebungstemperaturen höher als bei 4 °C akklimatisierten Tieren. Es ist schwer zu erklären, warum die Herzfrequenz der warm-akklimatisierten Tiere im Vergleich zu kalt-akklimatisierten Larven höher war. Vielleicht war die Akklimationsdauer nicht genügend lang, um eine vollständige Akklimatisation zu erzielen. Thermische Akklimatisation kann z.B. bei *Daphnia* bis zu zwei Wochen dauern (Zeis et al., 2004) und es ist nicht ausgeschlossen, dass *Chaoborus*-Larven für eine komplette Akklimatisation zumindest zwei Wochen brauchen und nicht nur eine Woche, wie es im Fall der 20 °C akklimatisierten Larven war.

4.1.7. Metabolite

Ein Missverhältnis zwischen Sauerstoffangebot und Sauerstoffbedarf führt zu anaerobem Stoffwechsel. Deshalb kann die untere und obere kritische Temperatur des Thermotoleranzfensters, die den Beginn der Pessima charakterisieren, auch durch einen Anstieg anaerober Metabolite charakterisiert werden (Pörtner, 2002).

In *Chaoborus*-Larven wurde während Anaerobiose ein Anstieg der Konzentration von Laktat, Alanin und Succinat und ein Sinken von Glykogen und Malat nachgewiesen (Englisch et al., 1981).

In dieser Arbeit wurde die Konzentration von Glukose, Glykogen, Laktat, Alanin und Malat in *Chaoborus*-Larven und in *Leptodora kindtii* (nur Laktat-Bestimmung) gemessen. Die für diese Versuche verwendeten Tiere wurden verschiedenen Temperaturen zwischen 12 und 24 °C ausgesetzt.

Die Glukose-Konzentration in den *Chaoborus*-Larven war nach Inkubation in der Wärme vergleichbar mit den 2 °C akklimatisierten Kontrolltieren (Abb. 13). Auch in *Chaoborus*-Larven, die 24 Stunden bei Anoxie inkubiert wurden, wurde kein Unterschied in der Glukose-Konzentration vor und nach der Inkubation gefunden (Englisch et al., 1981).

Hingegen sank die Glykogen-Konzentration in *Chaoborus*-Larven nach 24 Stunden anoxischer Inkubation im Vergleich zu Kontrolltieren um etwa 50 % (Englisch et al., 1981). Eine 48-stündige Inkubation in der Wärme führte jedoch zu keiner wesentlichen Veränderung der Glykogen-Konzentration in Büschelmückenlarven (Abb. 13), was darauf hinweist, dass in der Wärme keine Anaerobiose auftritt.

Auch hinsichtlich der L-Laktatkonzentration ergaben sich keine Veränderungen im Vergleich zwischen 2 °C und höheren Temperaturen (12 - 24 °C) bei 2 °C und 20 °C akklimatisierten *Chaoborus*-Larven.

Auch in *L. kindtii* konnte in der Wärme (12 - 24 °C) keine L-Laktat-Produktion induziert werden (Abb. 18).

Da nach sechs Stunden anoxischer Inkubation von *Chaoborus*-Larven ein Anstieg der Laktat-Konzentration um das Zweifache und nach 24 Stunden um mehr als das Fünffache berichtet wurde (Englisch et al., 1981), scheint erhöhte Temperatur keine Anaerobiose in *Chaoborus crystallinus* zu verursachen.

Neben Laktat ist Alanin ein alternatives Endprodukt des anaeroben Stoffwechsels von *Chaoborus*-Larven. Die Messungen in der Wärme (12 - 24 °C) zeigten eher einen Abfall der Alanin-Konzentration (Abb. 13).

In einer Studie (Englisch et al., 1981) zur Anaerobiose bei *Chaoborus*-Larven wurde ein deutlich schnellerer Anstieg von Alanin im Vergleich zu Laktat berichtet. Die Alanin-Konzentration stieg um den Faktor 5,5 in den ersten sechs Stunden anoxischer Inkubation und um den Faktor 10 nach 24 Stunden anoxischer Inkubation im Vergleich zu Kontrolltieren (Englisch et al., 1981). Das Ausbleiben eines Alanin-Anstiegs in der Wärme weist ebenfalls auf ein Fehlen anaerober Energiegewinnung hin.

Chaoborus-Larven verwenden Malat als Energiequelle (Jäger und Walz, 2002). Es ist in diesen Tieren in einer Konzentration vorhanden, die sogar die Glykogen-Konzentration überschreitet (Englisch et al., 1981). Die Ergebnisse von Englisch et al. (1982) zeigen, dass die Malat-Konzentration von *Chaoborus*-Larven während der ersten 12 Stunden unter anoxischen Bedingungen rasch und danach etwas langsamer sinkt. Die Malat-Konzentration der getesteten Tiere in der Wärme (12 - 24 °C) war sogar ein wenig höher als bei 2 °C (Abb. 13). Infolgedessen gab es auch hier keinen Hinweis auf wärme-induzierte Anaerobiose.

Auch im Fall von *Leptodora kindtii* gab es keinen Hinweis auf wärme-induzierte Laktatbildung (Abb. 18). Innerhalb des untersuchten Temperaturfensters scheinen auch hier die Grenzen der Thermotoleranz noch nicht erreicht zu sein.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass bei einer Inkubation zwischen 12 - 24 °C Sauerstoffmangel und Anaerobiose sowohl bei *Chaoborus*-Larven als auch bei *Leptodora kindtii* nicht auftritt.

4.1.8. Laktatdehydrogenase (LDH)

Der Temperatureinfluss auf die metabolische Rate kann durch veränderte strukturelle und funktionelle Eigenschaften von Stoffwechsel-Enzymen kompensiert werden. Die Laktatdehydrogenase (LDH) ist ein Enzym der anaeroben Glykolyse, das die reversible Umwandlung von Pyruvat zu Laktat mit Hilfe von NADH oder NAD⁺ als Kofaktoren katalysiert. Die LDH-Aktivität und die funktionellen Eigenschaften dieses Enzyms spiegeln die anaerobe Leistungsfähigkeit für die Energieerzeugung wider und sind damit ein Maß der Beständigkeit gegen Sauerstoff-Mangel während Hypo-

xie oder thermischem Stress (Zakhartsev et al., 2004). Die Parameter, welche die funktionellen Eigenschaften der LDH charakterisieren, sind die maximale Reaktionsgeschwindigkeit (V_{\max}^{PYR}), Enzymaffinität (Michaelis-Menten Konstante, K_m^{PYR}) und Enzymhemmung durch das Substrat (Inhibierungskonstante; K_{si}^{PYR}). Ektothermische Reaktionen beschleunigen mit steigender Temperatur, was auch die Reaktionsgeschwindigkeit-Temperatur-Regel (RGT) nach van't Hoff bestimmt (Penzlin, 1996). Dieser Grundsatz gilt auch für die LDH-Aktivität. Die geringere Reaktionsgeschwindigkeit bei niedrigen Temperaturen hängt mit der Abnahme der kinetischen Energie der Moleküle zusammen. Die Konformationsänderungen der A₄-LDH sind die Parameter der Katalyse, welche die Geschwindigkeit der Reaktion bestimmen, und um diese Konformationsänderungen zu vollziehen, ist bei tiefen Temperaturen weniger thermische Energie verfügbar (Dunn et al., 1991). Die Enzymaktivität wurde für jede Akklimatisationstemperatur bei genau derselben Messtemperatur bestimmt, um die Aktivität unter physiologisch relevanten Bedingungen zu ermitteln. Aus diesem Grund wird bei veränderten funktionellen Eigenschaften hier nicht zwischen physikalischen Effekten (Aktivitätssteigerung mit der Temperatur) und Akklimatisationseffekten, die sich durch eine veränderte Zusammensetzung des Enzympools ergibt, unterschieden. Auffällig ist, dass bei geringen Pyruvatkonzentrationen die Aktivität bei allen untersuchten Temperaturen ähnlich war. In diesem steilen Anstieg der Kurve kann eine geringe Steigerung der anfallenden Pyruvatmenge zu stark erhöhtem Umsatz führen. Die größten Unterschiede in der Aktivität bei den untersuchten Temperaturen ergaben sich vor allem bei hoher Pyruvatkonzentration. Hier wirkte sich zusätzlich zum rein physikalischen Effekt die verstärkte Hemmung unter kalten Bedingungen aus (Abb. 14 A); der geringe K_{si} -Wert verhindert die Laktatbildung bei Pyruvatkonzentrationen oberhalb von 2 mM beträchtlich. Der Bereich optimaler Umsatzraten liegt für alle untersuchten Akklimatisations- und Messtemperaturen im Bereich einer Pyruvatkonzentration von 1 mM.

Die aus der V_{\max}^{PYR} berechneten Q_{10} -Werte variierten zwischen 0,88 (12 – 18 °C) und 1,69 (18 – 24 °C). Q_{10} -Werte in der Nähe von zwei oder etwas höher werden häufig beobachtet, wenn thermische Auswirkungen innerhalb des „physiologischen“ Bereichs der Körpertemperaturen bestimmter Arten getestet werden. Außerhalb dieses Bereichs können die Q_{10} -Werte von Werten nahe zwei stark abweichen (Hochachka und Somero, 2002). Die geringen Q_{10} -Werte bei *Chaoborus* bedeuten eine geringe Temperaturabhängigkeit der LDH - Eigenschaften, zumindest bei tempera-

turakklimatisierten Tieren. Auf diese Weise bleiben die Enzymeigenschaften V_{\max} und K_m im optimalen Bereich. Für *Chaoborus*-Larven, die vertikale Migrationen durchführen, ist diese Temperaturkompensation der funktionellen Eigenschaften möglicherweise besonders wichtig.

Die Inhibierungskonstante K_{si} charakterisiert eine Grenze in der Substratkonzentration, unterhalb derer die LDH mit maximaler Kapazität arbeiten kann. Es ist gut dokumentiert, dass die LDH der meisten Ektothermen eine Substrathemmung aufweist (Zakhartsev et al., 2004). Diese Hemmung findet unter dem Einfluss des Substrats Pyruvat statt, das mit dem Cofaktor (NAD⁺) am Enzym bindet und ein kovalentes Addukt bildet. Das kovalente Addukt wiederum bindet eng an das aktive Zentrum des Enzyms (Hewitt et al., 1999). Der Bereich zwischen K_m^{PYR} und K_{si}^{PYR} kennzeichnet die Zone des anaeroben Stoffwechsels (Hochachka und Somero, 2002). Die Hemmung der LDH fiel mit zunehmender Temperatur (Abb. 14 B). Auch Zakhartsev et al. (2004) berichtet eine Abnahme der Hemmung der LDH im Dorsch mit steigender Messtemperatur. Bei höheren Temperaturen, wo der Energiebedarf steigt und weniger gelöster Sauerstoff im Medium vorhanden ist, eröffnet die reduzierte Substrathemmung prinzipiell eine Möglichkeit, eine erhöhte Energienachfrage über Anaerobiose zu gewährleisten.

4.1.9. Einfluss der Umgebungstemperatur auf RNA-, DNA-Gehalt und RNA/DNA-Verhältnis

Als Maß für die Fitness der Tiere kann neben dem reproduktiven Wachstum auch das Körperwachstum verwendet werden (u.a. Lampert und Trubetskova, 1996). Es wurde nachgewiesen, dass der RNA-Gehalt, normiert entweder auf das Trockengewicht oder auf die DNA-Menge (RNA/DNA-Verhältnis), mit der Wachstumsrate sowohl in Bakterien (Koch, 1970) als auch in Eukaryoten wie Algen (Dortch et al., 1983), Wirbellosen (Saiz et al., 1998), und Fisch-Larven (Folkvord et al., 1996) korreliert. Letzteres setzt aber voraus, dass die DNA-Menge konstant ist, während die RNA-Menge mit der metabolischen Nachfrage variiert (Buckley und Szmant, 2004). Das RNA/DNA-Verhältnis ist wie die Wachstumsrate temperaturabhängig (Saiz et al., 1998) und kann als nützliche Größe zur Beurteilung der Wachstumsrate des Zooplanktons verwendet werden (Vrede et al., 2002). Das RNA/DNA-Verhältnis von *Daphnia galeata* beispielsweise reagiert auch schnell auf Veränderungen in der Nah-

rungsqualität, was auf eine schnelle Veränderung in der rRNA-Menge hindeutet (Vrede et al., 2002). Im kleinen Copepoden *Acartia grani* wurde eine schnelle Antwort (24 h) des RNA/DNA-Verhältnisses auf Veränderungen in der Nahrungsmenge beobachtet (Saiz et al., 1998). Diese schnelle Reaktion in der RNA-Menge lässt sich so erklären, dass die Proteinsynthese eher durch die Ribosomen-Anzahl als durch eine veränderte Ribosomen-Effizienz reguliert wird (Nomura et al., 1984). Darüber hinaus kann auch das Entwicklungsstadium eines Tieres Einfluß auf die Relation zwischen RNA/DNA-Verhältnis und Wachstumsrate nehmen (Caldarone et al., 2006).

Die Messung des RNA-Gehalts bei 4 °C akklimatisierten *Chaoborus*-Larven nach der Inkubation bei unterschiedlichen Umgebungstemperaturen zeigte temperaturabhängige Änderungen (Abb. 15 A). Die RNA-Konzentration war bei 10 °C inkubierten Tieren am höchsten. Der DNA-Gehalt war hier während all dieser Inkubationen mehr oder weniger konstant (Abb. 15 B). Die Berechnung des RNA/DNA-Verhältnisses zeigte, dass die Werte bei 4 und 10 °C inkubierten Tieren am höchsten waren (Abb. 15 C).

Die Larven des hier verwendeten vierten Stadiums wachsen allerdings nicht mehr, und ihre nächste Entwicklungsetappe ist die Verpuppung. Bei der Verpuppung wird die Proteinsynthese verstärkt. Dies könnte die erhöhte RNA-Konzentration und das hohe RNA/DNA-Verhältnis in den bei ihrer Akklimatisierungstemperatur inkubierten Tieren (4 und 10 °C) miterklären.

4.1.10. Thermotoleranz von *Chaoborus crystallinus* und *Leptodora kindtii*: Fazit

Aus den Ergebnissen der Präferenzexperimente lässt sich ein Optimum des Thermotoleranzfensters der *Chaoborus*-Larven im Bereich von 15 bis 20 °C ableiten. Die letale Grenze der Thermotoleranz lag bei 32 bis 34 °C. Die sehr geringe Schwimmaktivität stieg erst bei 25 – 30 °C an, obwohl zumindest für kalt-akklimatisierte Tiere der Anstieg der NADH-Fluoreszenz bei 30 °C auf ein Überschreiten der kritischen Temperatur und ein Einsetzen von anaerobem Metabolismus hinwies. Auch das Absinken der Herzfrequenz der kaltakklimatisierten Tiere bei 30 °C wies darauf hin, dass die kritische Obergrenze des Thermotoleranzfensters erreicht wurde. Der sehr geringe Sauerstoffverbrauch der *Chaoborus*-Larven bewirkte, dass das zur Versorgung notwendige Sauerstoffangebot (P_{CO_2}) durch den Sauerstoffpartialdruck des Me-

diums immer gewährleistet bzw. weit überschritten wurde. Die Tiere zeigten einen deutlichen Akklimatisationseffekt: Die Stoffwechselrate d.h. der Sauerstoffverbrauch wurde bei warmen Temperaturen herabgesetzt, so dass in den warm akklimatisierten Tieren auch bei 30 °C Umgebungstemperatur die kritischen Temperaturgrenzen nicht überschritten wurden (siehe NADH-Fluoreszenz, Herzfrequenz). Die Abnahme der RNA-Konzentration und des RNA/DNA-Verhältnisses oberhalb von 20 °C könnte bei den kalt akklimatisierten Tieren ebenfalls auf ein Überschreiten des Optimums hindeuten.

Das Thermotoleranzfenster von *Chaoborus crystallinus*-Larven scheint daher relativ breit (eurytherm) und plastisch verschiebbar zu sein und kaum durch Sauerstoffbegrenzung beeinflusst zu werden. Die *Chaoborus*-Larven kommen bei jeder Mess-temperatur offenbar gut mit rein diffusiver Sauerstoffversorgung zurecht. Da die Sauerstoffversorgung also nicht limitierend ist, finden sich bei *Chaoborus*-Larven keine direkten Beziehungen zwischen Thermotoleranz und Sauerstoffversorgung bzw. anaerobem Stoffwechsel, und ein Anstieg in der Mortalität der Tiere in der Wärme muss auf andere Prozesse zurückgeführt werden. Dennoch hat die Temperatur einen Einfluss auf die Entwicklungszeit (z.B. Ratte, 1984; Sweeney et al., 1986) und geographische Verteilung dieser aquatischen Insektenlarve (Vannote & Sweeney, 1980; Borkent, 1981). Beispielsweise verzögern niedrige Temperaturen das Erreichen nach folgenden Larvalstadien und die Verpuppung von *Chaoborus* (Ouimet, 2001). Obwohl die *Chaoborus*-Larven also eine sehr hohe Thermotoleranz aufweisen, besitzen sie doch einen optimalen Temperaturbereich, in dem ihre physiologischen und biochemischen Prozesse am besten ablaufen.

Im Vergleich zu den *Chaoborus*-Larven erwies sich das Thermotoleranzfenster von *Leptodora kindtii* als relativ schmal (stenotherm). Ein Optimum der Schwimmaktivität bei 25 °C und eine Präferenztemperatur von ca. 20 °C zeigen, dass das Optimum physiologischer Leistungsfähigkeit etwas höher liegt als bei *Chaoborus*-Larven (15-20 °C). Bei 27 °C war hier auch ein Minimum der NADH-Fluoreszenz erreicht und erst bei 30 °C deutete ein leichter Anstieg des Signals auf anaerobe Energiegewinnung hin. *Leptodora* ist eine typische Sommerart. Den Großteil ihres Lebens verbringen sie als Dauereier (Andrew und Herzig, 1984). Die Thermopräferenz von *Leptodora kindtii* lag nahe ihrer Akklimatisationstemperatur. Die respirometrischen Messungen zeigten einen deutlich höheren Sauerstoffverbrauch (etwa fünf Mal so hoch) als die der *Chaoborus*-Larven. Die Berechnung des P_{CO_2} ergab, dass der Sau-

erstoffbedarf der Tiere durch das Angebot im Medium gerade gedeckt werden kann. Die Daten aus den Messungen der NADH-Fluoreszenz und der Schwimmaktivität legen ein Temperaturoptimum von 25 - 27 °C bei dieser Art nahe.

Die Ergebnisse stehen im Einklang mit Befunden von Garton et al. (1990), dass *Leptodora* tolerant gegenüber höheren Temperaturen (20 - 30 °C) und wenig tolerant gegenüber kalten Temperaturen ist. Die höchsten Abundanzen von *Leptodora* werden in der Talsperre Saidenbach (2006 und 2007) in den wärmsten Monaten mit Wassertemperaturen von 20 bis 24 °C erreicht (Daten von W. Horn & L. Paul).

Leptodora kindtii scheint auf eine Art der Strategie mit hoher Sommerabundanz und der Produktion von Dauereiern im Frühherbst und weniger auf physiologische Anpassungsmechanismen in der Kälte zu setzen. Die Büschelmückenlarven dagegen bilden keine Dauerstadien und sie sind darauf angewiesen sich das ganze Jahr an ständig wechselnde saisonale und durch vertikale Migration verursachte Änderungen der Umgebungstemperaturen anzupassen.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die eher stenotherme Art *Leptodora kindtii* durch temperaturunempfindliche Dauerstadien suboptimale Temperaturverhältnisse übersteht und nur während des kurzen Saisonabschnitts der für sie optimalen Temperaturen in großen Mengen auftritt, während die eher eurythermen *Chaoborus*-Larven durch starke Unabhängigkeit ihrer physiologischen Leistungsfähigkeit von der Temperatur alle saisonal verschiedenen Bedingungen als Larven überstehen können.

4.2. Temperaturinduzierende Änderungen der RNA- und DNA-Menge in *Daphnia magna*

4.2.1. RNA-, DNA-Gehalt und RNA/DNA-Verhältnis in *Daphnia magna*

Ähnlich wie im Fall der *Chaoborus*-Larven sollten die Messungen des RNA-, DNA-Gehalts und RNA/DNA-Verhältnisses in *Daphnia magna* zeigen, ob diese Messparameter als Maß für die Fitness bei verschiedenen Inkubationstemperaturen verwendet werden können.

4.2.1.1. RNA-, DNA-Gehalt und RNA/DNA-Verhältnis als Funktion der Körpergröße der Tiere und der Hälterungstemperatur

Als erstes wurde untersucht, welchen Zusammenhang der RNA-, DNA-Gehalt und das RNA/DNA-Verhältnis mit der Körpergröße der Daphnien und der Hälterungstemperatur haben. Die Bestimmung des RNA-, DNA- Gehalts zeigte, dass die Nukleinsäure-Konzentration pro Gramm Frischgewicht viel höher in 1 mm großen Daphnien als in den 2 mm großen Tieren ist (Abb. 19 A, B). Die Werte des RNA/DNA-Verhältnisses waren jedoch bei den 2 mm großen Daphnien, besonders bei 20 °C gehälterten Tieren, größer (Abb. 19 C). Wenn ein großes RNA/DNA-Verhältnis ein Indikator für Wachstum ist, würden die Ergebnisse auf ein höheres Wachstum in den 2 mm großen Daphnien hinweisen. Hirst und Sheader (1997) berichteten, dass das gewichtsspezifische Wachstum von juvenilen Copepoden mit zunehmendem Körpergewicht abnimmt. Das gemessene RNA/DNA-Verhältnis der Daphnien würde von diesem Ergebnis abweichen. Andererseits wurde in Larven der japanischen Sardelle so wie in *D. magna* ein erhöhtes RNA/DNA-Verhältnis mit zunehmender Größe beobachtet (Chiu und Huang, 1998). Im Fall der Daphnien könnten Phasen hoher Proteinproduktion im Zusammenhang mit Häutungen stehen, denn die Phase des Häutungszyklus kann die metabolische Rate und biochemische Zusammensetzung (Skinner et al., 1985) einschließlich des Nukleinsäure-Gehalts (Anger und Hirche, 1990; Juinio et al., 1992) erheblich beeinflussen. Gorokhova und Kyle (2002) berichteten, dass juvenile Daphnien in verschiedenen Häutungsphasen einen ähnlichen Verlauf zeigen mit einem deutlichen Anstieg des DNA-Gehalts gleich nach der Häutung und relativ konstanten Werten während des restlichen Zeitraums bis zur nächsten Häutungsphase.

4.2.1.2. RNA-, DNA-Gehalt und RNA/DNA-Verhältnis als Funktion der Inkubationstemperatur und Inkubationszeit

Da die Wachstumsrate eng mit der Proteinsynthese-Rate verbunden ist und da rRNA den größten Anteil an der RNA ausmacht, kann eine RNA-Änderung mit der Veränderung der Wachstumsrate zusammenhängen (Elser et al., 1996). Im Laufe der Protein-Synthese, die vermehrt während des Wachstums und der Differenzierung stattfindet, ist das RNA/DNA-Verhältnis größer als in der Zeit, wenn die Protein-Produktion

gering ist (Buckley und Szmant, 2004). Voraussetzung ist aber, dass der DNA-Gehalt dabei konstant bleibt (Buckley und Szmant, 2004). Obwohl eine erhöhte Proteinsynthese eventuell auch auf Stressreaktionen hinweisen könnte, werden hohe Werte des RNA/DNA-Verhältnisses in der Regel mit erhöhter Protein-Produktion für Wachstum und Reproduktion in Verbindung gebracht. Höhere Werte des RNA/DNA-Verhältnisses werden dann erreicht, wenn für diese Prozesse günstige Bedingungen vorliegen (Dahlhoff & Menge, 1996; Dahlhoff et al., 2001). Das Wachstum von *Daphnia* ist in der Regel durch Verfügbarkeit und Qualität der Nahrung und zusätzlich durch abiotische Faktoren, wie die Temperatur, bestimmt (Weider et al., 2004).

Untersuchungen zum RNA-, DNA-Gehalt und RNA/DNA-Verhältnis in *D. magna* als Antwort auf unterschiedliche Inkubationstemperaturen sollten klären, ob das RNA/DNA-Verhältnis ein angemessener Indikator für die Bestimmung der Fitness dieser Tiere ist.

Die Bestimmung des Nukleinsäure-Gehalts von 20 °C akklimatisierten Daphnien nach zweitägiger Inkubation bei 10, 20, 24 und 30 °C ergab überraschende Befunde. Die RNA-Menge änderte sich erst bei 24 und 30 °C in einer ersten Messreihe und blieb während der ganzen Inkubation auf konstantem Niveau im Fall einer zweiten Messreihe (Abb. 20 A). Dafür variierte aber die DNA-Menge bei jeder Inkubationstemperatur der beiden Messreihen und stieg bei hoher Temperatur (30 °C) auf Maxima an (Abb. 20 B). Die DNA-Änderungen beeinflussten das RNA/DNA-Verhältnis in *D. magna*; dieses erreichte seinen höchsten Wert jeweils bei 24 °C und fiel dann bei 30 °C auf den niedrigsten Wert ab (Abb. 20 C). Das Auftreten eines Maximums im RNA/DNA-Verhältnis könnte ein Temperaturoptimum bei 24 °C anzeigen, allerdings ist unklar, warum die DNA-Konzentration nicht konstant blieb, sondern sich während der Inkubation änderte.

Zusätzliche Versuche mit *D. magna* aus 10 °C Dauerkultur bei 10, 20 und 30 °C für verschiedene Inkubationszeiten (12, 24, 36, 48 und 60 Stunden) sollten zeigen, wie schnell und zu welchem Zeitpunkt der Inkubation die DNA-Änderungen auftreten. Es stellte sich heraus, dass sich der Gehalt der beiden Nukleinsäuren während Inkubation erhöhte, wobei DNA nach 36 und RNA nach 48 Stunden der Messung ihre höchsten Konzentrationen darstellten. Danach nahmen die Gehalte der beiden Nukleinsäuren wieder ab (Abb. 21 A, B). Dadurch ergab sich der höchste Wert des RNA/DNA-Verhältnisses nach 48 Stunden (Abb. 21 C). Wahrscheinlich sanken die

Konzentrationen von DNA und RNA wegen des Mangels an Nahrung während der letzten Stunden der Messung. Dies kann auch den Grund für die beträchtliche Sterblichkeit der Daphnien während der Inkubation darstellen.

Dann wurde ein Versuch gemacht, bei dem die 10 °C akklimatisierten *D. magna*, genauso wie vorher die 20 °C akklimatisierten Daphnien, 48 Stunden bei 10, 20, 24 und 30 °C inkubiert wurden und der Nukleinsäure-Gehalt in diesen Tieren danach bestimmt wurde.

Auch hier blieb der RNA-Gehalt, ähnlich wie im Fall der 20 °C akklimatisierten Daphnien (zweite Messreihe), während der ganzen Inkubation konstant (Abb. 22 A). Dafür variierte aber wieder der DNA-Gehalt in den Daphnien bei jeder Inkubationstemperatur (Abb. 22 B). Es ergab sich also eine ähnliche Situation wie bei den 20°C akklimatisierten Tieren (siehe Abb. 20 A, B) mit dem Unterschied, dass ein DNA-Minimum in den 10 °C akklimatisierten Daphnien nach 48 Stunden bei 20 °C (Abb. 22 B) und bei den 20 °C akklimatisierten Tieren bei 24 °C (Abb. 20 B) zu beobachten war. Dies beeinflusste das RNA/DNA-Verhältnis, dessen höchste Werte bei konstantem RNA-Gehalt folglich auch bei 20 und 24 °C lagen (Abb. 22 C und 20 C).

Während der Inkubation wurden die Daphnien nicht gefüttert und möglicherweise beeinflusste der zusätzliche Stressfaktor Hunger die unerwarteten Variationen des DNA-Gehalts. Mehrere Studien deuten darauf hin, dass Nahrungs-Qualität und -Quantität das RNA/DNA-Verhältnis und die Wachstumsrate beeinflussen (z.B. Saiz et al., 1998; Wagner et al., 1998). So reagiert der Copepode *Acartia grani* schnell (innerhalb von 24 h) auf Änderungen der Nahrungs-Menge (Saiz et al., 1998) und *Daphnia galeata* auf Änderungen der Nahrungs-Qualität (Vrede et al., 2002) mit einem veränderten RNA/DNA-Verhältnis. Um eine zusätzliche Wirkung des Stressfaktors Hunger zu minimieren, wurde für die nächsten Inkubationen ein spezifisches Ernährungsmedium (siehe 7.4.) verwendet. Die Bestimmung des RNA- und DNA-Gehalts in *Daphnia magna* nach der Inkubation in einem solchem Medium sollte die Auswirkung der Inkubationstemperatur im Wesentlichen unabhängig von Ernährungsfaktoren widerspiegeln.

4.2.1.3. Nukleinsäure-Gehalt und RNA/DNA-Verhältnis als Funktion der Temperatur nach Inkubation im spezifischen Ernährungsmedium

Im ersten Versuch bei der Verwendung von Ernährungsmedium wurden die 20 °C akklimatisierten Daphnien 48 Stunden bei 10, 20 und 30 °C inkubiert. Nach der Inkubation wurde diesmal nur der DNA-Gehalt bestimmt, um festzustellen, ob eine ausreichende Ernährung eine konstante DNA-Konzentration gewährleistet. Es stellte sich heraus, dass der DNA-Gehalt in *Daphnia magna* nach 48-stündiger Inkubation bei 10 und 20 °C konstant blieb, aber bei 30 °C, trotz der Verwendung vom Ernährungsmedium, um ca. einen Faktor 3 im Vergleich zu den Kontrolltieren erhöht war (Abb. 23).

Eine zweite Versuchsreihe bestätigte die Ergebnisse. Außer dem DNA-Gehalt wurde dabei auch der RNA-Gehalt bestimmt. Darüber hinaus wurden die Tiere nach 48-stündiger Inkubation bei 10, 20 und 30 °C zurück zur Hälterungstemperatur gebracht (20 °C) und weitere 48 Stunden inkubiert. Die abschließende Inkubation bei der Akklimatisationstemperatur der Tiere sollte zeigen, ob die Erhöhung des DNA-Gehalts ein reversibler Prozess ist. Es zeigte sich, dass die zweitägige Inkubation im Ernährungsmedium bei 30 °C sowohl eine Erhöhung der DNA- als auch der RNA-Menge bewirkt (Abb. 24 A, B). Die DNA- und RNA-Mengen in den zwei Tage lang bei 10 und 20 °C inkubierten Daphnien waren ähnlich und waren um ca. einen Faktor 5 und 3,4 kleiner als die Menge der beiden Nukleinsäuren in den 30 °C inkubierten Tieren. Dieser Befund weist darauf hin, dass während der 30 °C Inkubation Mechanismen aktiviert werden, die eine deutliche Erhöhung der DNA- und RNA-Menge verursachen.

Die Reversibilität des Anstiegs der DNA- und RNA-Menge bei 30 °C zeigte die anschließende Inkubation bei der Akklimatisationstemperatur von 20 °C (Abb. 24 A, B). Zur erneuten Überprüfung des DNA-Anstiegs und seiner Reversibilität wurde eine weitere Messreihe durchgeführt. Es zeigte sich, wie im Fall des vorherigen Experiments, dass eine zweitägige Inkubation bei 30 °C eine deutliche Erhöhung des Gehalts an beiden Nukleinsäuren bewirkt (Abb. 25 A, B). Während der zweitägigen Inkubation bei 10 und 20 °C veränderte sich die DNA- und RNA-Konzentration kaum im Vergleich zu den Kontrolltieren. Eine Inkubation der Tiergruppen für einen weiteren Tag (insgesamt: drei Tage) bei gleicher Temperatur, d.h. bei 10, 20 und 30 °C, verursachte keine wesentlichen, zusätzlichen Änderungen der Nukleinsäure-

Konzentrationen. Die Rückkehr der Tiergruppen nach der zweitägigen Inkubation zu ihrer Akklimatisations-temperatur verursachte keine Veränderungen im DNA- und RNA-Gehalt in den Tiergruppen, die vorher zwei Tage lang bei 10 und 20 °C inkubiert wurden, und aber einen raschen Abfall der DNA- und RNA-Menge in den Tieren, die nach der zweitägigen Inkubation bei 30 °C zu ihrer Hälterungstemperatur gebracht wurden.

Zusammenfassend weisen die quantitativen, fluorometrischen DNA- und RNA-Messungen in unterschiedlich inkubierten Daphnien auf einen starken Einfluss hoher Temperatur (30 °C) innerhalb einer kurzen Zeitspanne (zwei Tage) auf die Erhöhung beider Nukleinsäure-Konzentrationen bei konstantem Frischgewicht und Proteingehalt hin. Dreitägige Inkubation bei dieser Temperatur (30 °C) zeigte konstante Konzentrationen auf erhöhtem Niveau. Die Rückkehr der Tiere nach der 30 °C Inkubation auf 20 °C bewirkte den Rückgang des Nukleinsäure-Gehalts bis auf einen den Kontrolltieren vergleichbaren Wert. Die Tiergruppen, die den anderen Temperaturen (10 und 20 °C) ausgesetzt wurden, zeigten nahezu konstante DNA- und RNA-Konzentrationen während der ganzen Inkubation.

Die anhand dieser Ergebnisse berechneten RNA/DNA-Verhältnisse deuten auf keine wesentlichen Unterschiede zwischen den Inkubationsgruppen und einen klaren Abfall dieser Größe um beinahe den Faktor 3 im Vergleich zu den Kontrolltieren hin (Abb. 25 C). Überraschend sind die geringen Differenzen des RNA/DNA-Verhältnisses zwischen den unterschiedlich inkubierten Daphnien und die großen Unterschiede zum RNA/DNA-Verhältnis der Kontrolltiere. Es ist nicht ausgeschlossen, dass diese Änderung im Zusammenhang mit der Nahrungsänderung steht. Das Ernährungsmedium enthält zwar alle wichtigen Nahrungsstoffe, aber die Daphnien waren während der Hälterung an die aus Algen bestehende Nahrung gewöhnt. Das veränderte Ernährungsmedium könnte die Ursache für die Abnahme der Werte des RNA/DNA-Verhältnisses in den inkubierten *D. magna* darstellen.

Weitere Experimente basierend auf Fluoreszenzmikroskopie bzw. der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) wurden dann mit unterschiedlich inkubierten Daphnien durchgeführt, um den gemessenen Anstieg der DNA-Menge bei 30 °C weiter zu überprüfen.

4.2.2. Quantitative Analyse der DNA anhand der Fluoreszenzbilder

Es wurde nun eine DNA-spezifische Fluoreszenzfärbung in unterschiedlich inkubierten Daphnien (Abb. 27 A, B) an Ganztierpräparaten („whole-mount“) durchgeführt. Zellkerne mit erhöhtem DNA-Gehalt würden im Vergleich zu den anderen Zellkernen intensiver fluoreszieren und/oder eine größere Fluoreszenzfläche aufweisen. Wenn also in 30 °C akklimatisierten Daphnien mehr DNA vorhanden ist, war zu erwarten, dass die Zellkerne dieser Tiere in bestimmten Bereichen ihres Körpers intensiver fluoreszieren bzw. größer sein würden. Der hohe Nukleinsäure-Gehalt könnte alternativ als Folge einer erhöhten Zellkernanzahl hervorgerufen werden.

Die in den Epipoditen bestimmten Parameter als Maß für die DNA-Menge (Fluoreszenzintensität, Zellkernfläche und Fluoreszenzintensität x Zellkernfläche) deuteten alle darauf hin, dass in den 30 °C inkubierten Daphnien größere Zellkerne vorliegen (Abb. 27 B, D und F).

Im Fall der ausgewerteten Antennensegmente war der Befund etwas anders. Bei den 30 °C inkubierten Daphnien war die Fluoreszenzintensität auch höher, aber die Zellkernfläche geringer. Weiterhin wurden hier aber auch mehr Zellkerne festgestellt (Abb. 27 A, C, F und G).

4.2.3. Einfluss der Temperatur auf Genexpression und rRNA-Gehalt

Die Expression der meisten Gene zeigt in der Regel eine positive Korrelation mit der Erhöhung des Ploidie-Grades (Comai, 2005). Mit Hilfe der PCR wurden bestimmte Gene der *Daphnia magna*-DNA untersucht, um Hinweise auf Genamplifikation zu erhalten. Verwendet wurden dabei drei Gene, nämlich Hsp70, Hämoglobin und 18SrDNA.

Wenn die Temperatur von 30 °C ein Stressfaktor für *Daphnia magna* wäre, so könnte es sein, dass eines der HSP-Gene (Hsp70) amplifiziert vorliegt. Die Ergebnisse bestätigten dies jedoch nicht. Es gab keinen signifikanten Unterschied in der Menge des Hsp70-Gens bei 10 °C und 30 °C inkubierten Daphnien (Abb. 30). Ähnlich war kein Unterschied im Amplifizierungsgrad des Hb-Gens bei 10 °C und 30 °C inkubierten Daphnien festzustellen (Abb. 30). Nur im Fall der 18SrDNA war ein tendenzieller Anstieg der DNA-Menge bei den 30 °C inkubierten Daphnien im Vergleich

zu den 10 °C inkubierten Tieren zu sehen (Abb. 30). Eine ähnliche Tendenz war auch im Fall der 18S und 28SrRNA-Banden zu sehen (Abb. 31 A, B).

Weitere PCR-Experimente zur Klärung der Frage einer Genamplifikation sind aber notwendig, um ein abschließendes Urteil zu fällen.

4.2.4. Diskussion der Befunde

Eine mögliche Ursache des Anstiegs der DNA-Menge könnte das Vorliegen einer größeren Zahl von DNA-Kopien im Zellkern sein. Zum Beispiel variiert in Oozyten die ribosomale DNA-Amplifikation von Spezies zu Spezies, und in *Xenopus* kann sie sogar um über 1000-mal vervielfacht werden (Brown und Dawid, 1968; Perkowska et al., 1968). Erhöhte Amplifikationsniveaus wurden in Oozyten einiger Arten von Weichtieren (Kidder, 1976) und in Pavianen und Menschen (Wolgemuth et al., 1979) nachgewiesen, wo sich die Menge der ribosomalen Gene um den Faktor 2 bis 5 erhöhen kann. Diese Erhöhung der Kopienzahl von Genen oder ganzer Chromosomen (Polyploidie) würde den DNA-Gehalt der Einzelzellen erhöhen und damit zu erhöhtem DNA-Gehalt bei konstanter Zellzahl führen.

Eine andere Erklärung für die Erhöhung des Nukleinsäure-Gehalts in 30 °C inkubierten Daphnien wäre die Entstehung von Polyploidie in bestimmten Geweben dieser Tiere. Das Vorkommen von Polyploidie (Endopolyploidie) ist bei Daphnien allgemein bekannt (z.B. Beaton & Hebert, 1988, 1989). Es gibt auch Berichte darüber, dass hohe Temperatur Polyploidie-Bildung induzieren kann, wie man es unter anderem in Maiswurzeln beobachtete (Randolph, 1932). Es ist also möglich, dass diese genetischen Mechanismen (Genamplifikation, Polyploidie) während der 30 °C Inkubation auftraten und die Erhöhung des DNA-Gehalts und in Folge des RNA-Gehalts verursachten.

Polyploidie, die Existenz von Chromosomen in mehreren Kopien, ist weit verbreitet in Eukaryoten und spielt eine wichtige physiologische, entwicklungsbiologische oder strukturelle Rolle (Nag1, 1978; Brodsky and Uryvaeva, 1985). Die in Daphnien beobachtete Art der somatischen Polyploidie stellt Endopolyploidie dar (Sterba, 1956, 1957). Endopolyploidie ist ein gut bekanntes Phänomen, das zur Erhöhung des DNA-Gehalts in somatischen Zellen ohne anschließende mitotische Teilung führt. In Daphnien zum Beispiel befindet sich fast die Hälfte der DNA in einem endopolyploidischen Zustand mit unterschiedlichem Ploidiegrad, der in Geweben von 2 bis

2048C variiert (Beaton und Hebert, 1989). In *Daphnia* befinden sich die meisten Polyploidie-Zellen in den Epipoditen, im Bereich des Carapaxes, Rostrums und Labrums (Beaton & Hebert, 1994, 1999).

Endopolyploide verursacht auch morphologische Effekte; so gibt es einen Zusammenhang zwischen dem Endopolyploidie-Vorkommen und der Bildung verschiedener räuber-induzierter Kopfmorphologien in *Daphnia* (Beaton und Hebert, 1997). Ihre unter dem Thorax-Carapax liegende Epidermis ist aus Tausenden sich aktiv teilenden diploiden und ein paar Dutzend polyploiden Zellen zusammengesetzt. Die räumliche Verteilung der Polyploidie-Zellen deckt sich mit den Regionen der aktiven Zellteilung, aber ihre Rolle in diesem Gewebe ist noch nicht bekannt (Beaton und Hebert, 1994).

Polyploidie kann auch phänotypische Auswirkungen haben, die einen Anstieg der Zellgröße und des Zellkerninhalts verursachen (Zhang und King, 1993; Soltis und Soltis, 2000). Im Zusammenhang damit können große DNA-Mengen die Zellteilung durch mehrere Prozesse, wie z.B. die Verlängerung der Replikation (S-Phase), verzögern. Veränderungen im DNA-Gehalt können auch indirekte Auswirkungen auf andere Phasen des Zellzyklus (vor allem G1) haben (Wyngaard and Gregory, 2001). Das Ploidie-Niveau kann weiterhin ein wichtiger Faktor bei Variationen der Körpergröße und Wachstumsrate sein, die innerhalb oder zwischen Populationen beobachtet werden können (Walsh und Zhang, 1992).

Was könnte der Grund dafür sein, dass die 30 °C inkubierten Daphnien eventuell ein höheres Polyploidie-Niveau als die 10 °C inkubierten Daphnien haben? Einer der wichtigsten Faktoren, der die Polyploidisierung in vielen Organismen verursacht, ist die Temperatur. Es wurde in vielen Arbeiten (z.B. Adamowicz et al., 2002; Randolph, 1932) berichtet, dass die Entstehung von Polyploidie sowohl durch niedrige, als auch hohe Temperaturen induziert werden kann. Populationen der in arktischen Seen vorhandenen Arten von *Daphnia* und *Bosmina* sind typische Polyploide, während die Vertreter der gemäßigten Klimazonen durch Diploidie charakterisiert sind (Beaton und Hebert, 1988). Auch bei Pflanzen ist temperaturabhängige Polyploidie bekannt. Sakamura (1920) berichtete über eine erhöhte Häufigkeit von Tetraploid-Zellen in Wurzelspitzen von Erbsen, die mit Wasser einer Temperatur von 40 °C behandelt wurden. Ähnliche Ergebnisse wurden in Wurzelspitzen von Gurken und Mais beobachtet (Koshuchow, 1928). Im Falle des Mais sind höhere Temperaturen sogar wirksamer als niedrige zur Erzeugung von Tetraploiden (Randolph, 1932).

Durch Kälte- und Hitze-Schock verursachte Polyploidie wurde auch bei Tieren (z.B. in Fischen und Amphibien) festgestellt (Swarup, 1959).

Infolgedessen könnte auch bei *Daphnia magna* eine Temperatur von 30 °C Polyploidisierung hervorrufen. Welche Rolle könnte eine erhöhte temperaturabhängige Polyploidisierung bei Daphnien spielen?

Polyploide Zellen in Geweben sind meist in Prozesse der Sekretion oder Biosynthese involviert (Nagl, 1978; Brodsky & Uryvaeva, 1985). Über die physiologischen Folgen somatischer Polyploidie ist aber eher wenig bekannt (Beaton & Hebert, 1999). In *Daphnia* haben die meisten Gewebe mit polyploiden Zellkernen keine sekretorische Funktion (Beaton und Hebert, 1989). Die Gattung *Daphnia* ist dafür bekannt, dass sie über beträchtliche phänotypische Plastizität und genetische Variabilität verfügt (Weider, 1987; Ebert, 1993). Ein Teil dieser Plastizität könnte auf Endopolyploidie zurückgeführt werden (Korpelainen et al., 1997). Die Veränderungen im DNA-Gehalt, sowohl im Vergleich zwischen als auch innerhalb der Individuen, haben tief greifende Auswirkungen auf viele phänotypischen Eigenschaften, die direkt mit der Fitness zusammenhängen (Gregory und Hebert, 1999).

Darüber hinaus zeichnen sich Polyploide durch genetische Attribute wie zum Beispiel differentielle Genexpression (Galitski et al., 1999), oder Gen-Diversifikation (Adams et al., 2003; Otto, 2003) aus. Diese Eigenschaften führen zu einer schnelleren Anpassung oder breiteren ökologischen Toleranz (D'Souza et al., 2005).

Zhang und King (1993) berichteten über eine positive Beziehung zwischen Polyploidie und Resistenz gegen Umweltstress in *Artemia parthenogenetica*. Bei einer kurzen Exposition gegenüber Kälte- und Hitze-Schocks hatten die polyploiden *Artemia* höhere Überlebensraten als die diploiden Arten. Polyploide Tiere konnten, im Gegensatz zu diploiden, 30-minütige Hitze-Schocks von 41 °C ertragen, die Entwicklung bis zum Ende bringen und in die Reproduktionsphase gehen (Zhang und King, 1993).

Eine induzierte Polyploidisierung könnte auch bei der Temperaturanpassung der 30 °C inkubierten *Daphnia magna* im Zusammenhang mit der Proteinsynthese stehen. Eine Erhöhung der Proteinsynthese könnte in diesem Fall mehrere Gründe haben.

Vielleicht werden bei 30 °C Proteine in *Daphnia magna* stärker denaturiert, die mittelbar durch Polyploidie und unmittelbar durch höhere Proteinsyntheseraten ergänzt

werden. Eine andere Erklärung wäre, dass spezifische Proteine, die für das Überleben bei 30 °C wichtig sind, stärker exprimiert werden.

Die zeitlichen Aspekte eines Übergangs zur Polyploidie wurden bisher noch nicht beschrieben (Beaton und Hebert, 1999). Unsere Messungen der DNA-Konzentration in den 30 °C inkubierten *Daphna magna* verdeutlichen, dass die Menge dieser Nukleinsäure ihr Maximum schon nach zwei Tagen Inkubation erreicht. Eine weitere eintägige Inkubation bei der gleichen Temperatur verursachte keinen zusätzlichen Anstieg des DNA-Gehalts.

Es gibt aber außer Polyploidisierung noch einen anderen möglichen Grund, der die Erhöhung des mit dem Fluorometer und dem Fluoreszenzmikroskop gemessenen Fluoreszenz-Signals und somit den Anstieg der DNA-Menge in den 30 °C inkubierten Daphnien erklären könnte, und zwar eine - auch nach allen Färbeprozeduren (SYBR Green II bzw. Hoechst) noch erhaltene und nachweisbare - Chromatin-Reorganisation („chromatin remodeling“).

Im eukaryotischen Zellkern ist genetische Information in einem stark konservierten Strukturpolymer (Chromatin) organisiert, das entscheidende Funktionen des Genoms unterstützt und steuert. Die Chromatin-Struktur unterliegt dynamischen Veränderungen während genetischer Prozesse. Diese umfassen notwendige strukturelle Reorganisationen, die während der DNA-Replikation und Entwicklung des Zellzyklus stattfinden, räumlich und zeitlich koordinierte Genexpressionen sowie DNA-Reparatur und -Rekombination (Fischle et al., 2003). Die fundamentale, sich wiederholende Einheit des Chromatins ist das Nucleosom, das aus 146 DNA-Basenpaaren besteht, die wiederum um den Oktamer-Kern von Histon-Proteinen - H2A, H2B, H3 und H4 gewickelt sind (Fischle et al., 2003). Die Grundlage der Chromatin-Reorganisation ist eine Veränderung in der Wechselwirkung von DNA und Histonen und zwar in Abhängigkeit von ATP-Spaltungen. Das Resultat ist ein Gleiten oder Verschieben von Nucleosomen, so dass Sequenzen auf der DNA zugänglich werden, zum Beispiel für die Bindung von Transkriptionsfaktoren (Karp, 2005; Knippers, 2006; Johnson und Barton, 2007). Besonders wichtige Prozesse in der Chromatin-Reorganisation sind Histon-Modifikationen durch enzymatische Acetylierung oder Deacetylierung von Lysin-Resten, die Interaktionen von DNA und Histonen modulieren und mit der Aktivierung (Acetylierung) oder Deaktivierung (Deacetylierung) der Transkription korrelieren (Arnholdt-Schmitt A., 2004; Lewin et al., 2006). Man kennt bis zu sechs Chromatin-Remodeling-Komplexe („remodeler“). Alle besitzen eine Untereinheit

mit der Funktion einer ATPase, aber sie unterscheiden sich durch zusätzliche Proteine, entsprechend ihren speziellen Aufgaben bei der Einleitung der Transkription, beim Fortschreiten der RNA-Polymerase-Aktivität oder beim Chromatin-Zusammenbau (Knippers, 2006). Neben Acetylierung können auch die Methylierung, Phosphorylierung, Ubiquitylierung und Poly-ADP-Ribosylierung mit Transkription interferieren (Berger, 2002; Arnholdt-Schmitt A., 2004; Johnson und Barton, 2007). Darüber hinaus können RNA-Polymerasen selbst als bedeutende Chromatin-Remodeling-Maschinen angesehen werden. Bei ihrem Weg entlang der Chromatinfasern werden ständig Kontakte zwischen den Histon-Oktameren und DNA gelöst (Knippers, 2006). Nucleosomen brechen auseinander und fallen sogar, meist nur vorübergehend, von der DNA ab. Generell aber gilt, dass transkribiertes Chromatin weniger Nucleosomen enthält als nichttranskribiertes Chromatin (Knippers, 2006).

Somit könnte es sein, dass die deutlich stärkere DNA-Fluoreszenzintensität bei den 30 °C inkubierten Daphnien nicht durch einen erhöhten Nukleinsäure-Gehalt, sondern durch Chromatin-Reorganisation verursacht wurde. Möglicherweise hätte der Fluoreszenzfarbstoff (SYBR Green II bzw. Hoechst) in einer reorganisierten, lockeren Form des Chromatins mehr Möglichkeiten, um mit den DNA-Strängen zu interkalieren, was im Endeffekt ein erhöhtes Fluoreszenz-Signal verursachen würde. Möglicherweise könnte das aufspiralisierte Chromatin selbst einen Effekt stärkerer Fluoreszenzintensität im Vergleich zum kompakten, nicht reorganisierten Chromatin ergeben. Histon-Acetylierung ist reversibel und wird durch Deacetylase reguliert (Rahman, 2003). Das könnte erklären, warum die erhöhte DNA-Fluoreszenzintensität bei den 30 °C inkubierten Daphnien schnell (innerhalb von zwei Tagen) sinkt, wenn man die Tiere zur Hälterungstemperatur zurückbringt (Abb. 25 B).

Was könnte aber der Grund dafür sein, dass die angesprochene Chromatin-Reorganisation in *Daphnia magna* bei 30 °C verstärkt würde? Beispielsweise steht die Lockerung der Chromatin-Struktur oder das „Puffing“ (Aufspiralisierung der transkribierten Bereiche in Polytänchromosomen) in den Speicheldrüsen der Larven von *Drosophila* im Zusammenhang mit stressinduzierter Gen-Aktivierung. Diese Puffs dienen der "Öffnung" der Chromatin-Struktur, um eine Transkription durch die Schaffung einer Matrize für die Bindung des Transkriptionsfaktors zu ermöglichen (Tulin und Spradling, 2003). Oxidativer Stress und proinflammatorische Mediatoren können die nukleäre Histon-Acetylierung/ Deacetylierung ändern (Rahman, 2003). Chromatin-Reorganisation und die Enzym-Komplexe, die das Chromatin umstrukturi-

rieren, sind bei vielen stressbedingten Veränderungen in der Genexpression wichtig. Es ist bisher aber kaum bekannt, wie diese Enzyme bei hypoxie-induzierten Veränderungen in der Genexpression wirken (Johnson und Barton, 2007). Stark hypoxische und anoxische Zellen aktivieren anaerobe Glykolyse zur Produktion von ATP, wobei Pyruvat zu Laktat umgewandelt wird. Ein niedriger zellulärer Acetyl-CoA-Gehalt unter Hypoxie würde zu einer globalen Abnahme von Histon-Acetylierungen führen (Koukourakis et al., 2005; Costa et al., 2005) und damit die Chromatinstruktur verdichten. Dies würde dagegen sprechen, dass im Fall der 30 °C inkubierten Daphnien hypoxische Bedingungen zu Aufweitungen der DNA-Struktur führen. Andere Stressfaktoren und bestimmte Gen-Gruppen, wie z.B. Gene für Hitzeschockproteine (Hsp70), könnten aber in *Daphnia magna* bei 30 °C aktiviert werden. Die Rolle, die Chromatin-Reorganisation in der Antwort auf Hitzestress spielt und beispielsweise zur erhöhten Transkription von Hitzeschockproteinen (Hsp70) führt, ist bereits gut bekannt und charakterisiert (Johnson und Barton, 2007). Offensichtlich ist die Änderung der Chromatin-Struktur ein integraler Bestandteil der zellulären Reaktion auf Stress (Johnson und Barton, 2007). Um genauer zu untersuchen, ob und welche dieser Mechanismen beteiligt sind, und welche konkreten Gene durch eine mögliche Chromatin-Reorganisation bei der 30 °C Inkubation in *Daphnia magna* aktiviert bzw. deaktiviert werden, sind weitere Forschungen notwendig.

Zusammenfassend kann der tatsächlich oder scheinbar erhöhte DNA-Gehalt in *Daphnia magna* bei einer 30 °C Inkubation entweder als temperaturinduzierte Polyploidisierung oder als Folge einer temperaturinduzierten Chromatin-Reorganisation interpretiert werden. Welcher der beiden Mechanismen vorliegt und wie die Thermotoleranz der Tiere davon beeinflusst wird, ist noch nicht geklärt. Die hohe Dynamik der Veränderungen im DNA-Gehalt (Zunahme und Abnahme innerhalb von wenigen Tagen) spricht aber dafür, dass es sich eher um eine Chromatin-Reorganisation als um eine Polyploidisierung handelt. Weiterhin lieferte die PCR-Analyse für eine Reihe von Genen (*HbDb*-, *Hsp70*- und *Dm18SrDNA*) keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den 10 und 30 °C inkubierten Daphnien (Abb. 30), was auch gegen Genamplifikation oder Polyploidisierung spricht.

4.2.5. Nukleinsäurekonzentrationen als Fitness-Parameter bei *Daphnia*: Fazit

Der Gehalt an RNA und DNA sowie das Verhältnis beider Mengen kann im Prinzip Aufschluss über die Fitness der Tiere im Zusammenhang mit Proteinsynthese- und Wachstums-Prozessen geben. Die vorliegenden Untersuchungen zeigten aber, dass neben dem RNA-Gehalt auch der DNA-Gehalt bei 30 °C inkubierten *D. magna* im Vergleich zu 10 °C und 20 °C inkubierten Tieren auf den etwa dreifachen Wert ansteigt. Dies bedeutet, dass das mit Standardverfahren gemessene RNA/DNA-Verhältnis von weiteren Faktoren beeinflusst wird und nicht nur Körperwachstum und Fitness widerspiegelt.

Die beobachtete DNA-Zunahme in der Wärme bei unverändertem Frischgewicht und Proteingehalt der Tiere ist ein umkehrbarer Prozess, wenn die Tiere zurück zu ihrer Hälterungstemperatur transferiert werden. Der Anstieg der DNA-Menge in 30 °C inkubierten Daphnien weist auf eine temperaturinduzierte Polyploidisierung oder Chromatin-Reorganisation in bestimmten Geweben bzw. in ganzen Tieren hin. Untersuchungen zur Lokalisation der DNA-Zunahme in *Daphnia magna* bestätigten, dass sowohl die Größe der Kerne als auch ihre Fluoreszenzintensität bei 30 °C zunahm. Eine bei einer Umgebungstemperatur von 30 °C induzierte Polyploidie der Zellkerne oder eine Chromatin-Reorganisation bei *Daphnia magna* könnte die Syntheserate wichtiger Enzyme erhöhen und damit im Zusammenhang mit der hohen Thermotoleranz dieser Art stehen.

5. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden Untersuchungen zu den Mechanismen der Anpassung an unterschiedliche Temperaturbedingungen bei Zooplanktonorganismen durchgeführt. Die räuberischen Büschelmückenlarven *Chaoborus crystallinus* und die Glaskrebse *Leptodora kindtii* wiesen unterschiedliche Thermotoleranzfenster auf. Die Bestimmung der Thermotoleranzfenster erfolgte über die Messung der temperaturabhängigen Mortalität, der Schwimmaktivität und der Temperaturpräferenz sowie der Erfassung des Sauerstoffverbrauchs und -transports, der NADH Fluoreszenz, der Messung anaerober Metabolite, der Kohlenhydratspeicher und der Nukleinsäurekonzentrationen.

Der relativ breite (eurytherme) Toleranzbereich von *C. crystallinus* weist ein Maximum im Bereich von 15 – 20 °C auf und erreicht bei Temperaturen von 30 °C die kritische Obergrenze. Bewegungsaktivität und Sauerstoffverbrauch des Lauerjägers *Chaoborus* sind sehr gering. Die Stoffwechsel- und Perfusionsleistung weist deutliche Akklimatisationseffekte auf. Die Thermotoleranz der Tiere scheint aber nicht sauerstofflimitiert zu sein.

Das Thermotoleranzfenster von *Leptodora kindtii* ist dagegen schmaler (stenotherm). Ein Optimum der Schwimmaktivität sowie ein Minimum der NADH-Fluoreszenz bei 27 °C und Präferenztemperaturen von 21 – 23 °C zeigen, dass das Optimum physiologischer Leistungsfähigkeit höher liegt als bei *Chaoborus*-Larven (15 - 20 °C). Der höhere Sauerstoffverbrauch der Tiere kann bei Temperaturen von 20 – 25 °C gerade noch vom Angebot des Mediums gedeckt werden; der kritische Sauerstoffpartialdruck (P_{cO_2}) liegt bei 16 bis 21 kPa.

Fluorometrische Untersuchungen zum RNA- und DNA-Gehalt und RNA/DNA-Verhältnis in *Daphnia magna* zeigten temperaturabhängige Veränderungen in der Konzentration beider Nukleinsäuren (RNA und DNA). Bei 30 °C Inkubation war der RNA- und DNA-Gehalt um den Faktor 3 größer als bei 10 und 20 °C Inkubation. Der Anstieg der RNA- und DNA-Mengen erfolgte innerhalb von 2 Tagen. Eine weitere eintägige Inkubation bei 30 °C verursachte keinen erneuten Anstieg der Nukleinsäuremengen. Der Prozess war reversibel: Nach der Rückkehr in das Ausgangsmedium (20 °C) wurde der erhöhte RNA- und DNA-Gehalt innerhalb von zwei Tagen wieder abgebaut. Diese Befunde, als auch fluoreszenzmikroskopische Untersuchun-

gen, die u.a. eine erhöhte Fluoreszenzintensität und ein größeres Volumen der Zellkerne ergaben, können entweder mit einem erhöhten Ploidiegrad der Zellkerne oder mit einer Chromatin-Reorganisation in Zusammenhang gebracht werden, wobei letzteres eine größere Wahrscheinlichkeit besitzt. Eine durch Inkubation bei 30 °C induzierte Chromatin-Reorganisation oder Polyploidie der Zellkerne von *Daphnia magna* könnte die Syntheserate wichtiger Enzyme erhöhen und damit im Zusammenhang mit der hohen Thermotoleranz dieser Art stehen.

6. Literatur

Abrusán G. (2003). Morphological variation of the predatory cladoceran *Leptodora kindtii* in relation to prey characteristics. *Oecologia* 134: 278-283

Adamowicz SJ., Gregory TR., Marinone MC., Hebert PDN. (2002). New insights into the distribution of polyploid *Daphnia*: the Holarctic revisited and Argentina explored. *Molecular Ecology*, 11, 1209–1217.

Adams KL., Cronn R., Percifield R., Wendel JF. (2003). Genes duplicated by polyploidy show unequal contributions to the transcriptome and organ-specific reciprocal silencing. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 100: 4649–4654.

Andrew TE. and Herzig A. (1984). The respiration rate of the resting eggs of *Leptodora kindtii* (Focke 1844) and *Bythotrephes longimanus* Leydig 1860 (Crustacea, Cladocera) at environmentally encountered temperatures. *Oecologia (Berlin)* 64:241-244.

Anger K. and Hirche H. (1990). Nucleic acids and growth of larval and early juvenile spider crab, *Hyas araneus*. *Mar. Biol.*, 105, 403–411.

Arcifa MS. (2000). Feeding habits of Chaoboridae larvae in a tropical Brazilian reservoir. *Revista Brasileira de Biologia*, 60(4):591-597

Arnholdt-Schmitt A. (2004). Stress-Induced Cell Reprogramming. A Role for Global Genome Regulation? *Plant Physiology* 136:2579-2586

Barker DM. and Wilhm J. (1982). Osmoregulation in *Chironomus tentans* (Fabr.), *Chironomus riparius* Meigen and *Chaoborus punctipennis* (Say). *Comparative Biochemistry and Physiology* 72A (4), 719– 724.

Beaton MJ. and Hebert PDN. (1988). Geographical parthenogenesis and polypoidy in *Daphnia pulex*. *American Naturalist*, 132, 837–845.

Beaton MJ. and Hebert PDN. (1989). Miniature genomes and endopolyploidy in cladoceran crustaceans. *Genome* 32: 1048–1053.

Beaton MJ. and Hebert PDN. (1994) Patterns of DNA synthesis and mitotic activity during the intermoult of *Daphnia*. *J. Exp. Zool.*, 268, 400–409.

Beaton MJ. and Hebert PDN. (1997). The cellular basis of divergent head morphologies in *Daphnia*. *Limnol. Oceanogr.* 42: 346–356.

Beaton MJ. and Hebert PDN. (1999). Shifts in postembryonic somatic ploidy levels in *Daphnia pulex*. *Hydrobiologia*, 394, 29–39.

Berdalet E., Roldán C., Olivar M. P., Lysnes K. (2005a). Quantifying RNA and DNA in planktonic organisms with SYBR Green II and nucleases. Part A. Optimisation of the assay. *Sci. Mar.* 69(1):1-16

Berdalet E., Roldán C., Olivar M. P. (2005b). Quantifying RNA and DNA in planktonic organisms with SYBR Green II and nucleases. Part B. Quantification in natural samples. *Sci. Mar.* 69(1): 17-30

Berg DJ. and Garton DW. (1988). Seasonal Abundance of the Exotic Predatory Cladocerans, *Bythotrephes cederstroemi*, in Western Lake Erie. *J. Great Lakes Res.* 14 (4):479-488

Berger SL. (2002). Histone modifications in transcriptional regulation. *Current Opinion in Genetics & Development*, Volume 12, Number 2, pp. 142-148(7)

Bergmeyer HU., Grassl M. & Walter H-E. (1983) in *Methods of Enzymatic Analysis*, 3rd Ed, Vol. 2, pp. 232-233, VCH, Weinheim, W. Germany-Deerfield Beach, FL

Boeing WJ., Leech DM., Williamson CE., Cooke S. and Torres L. (2003). Damaging UV radiation and invertebrate predation: conflicting selective pressures for zooplankton vertical distribution in the water column of low DOC lakes. *Oecologia*, 138: 603-612

Bond JA., Gonzalez CRM. and Bradley BP. (1993). Agedependent expression of proteins in the cladoceran *Daphnia magna* under normal and heat-stress conditions. *Comp. Biochem. Physiol. B*, 106: 913–917.

Borkent A. (1979). Systematics and bionomics of the species of the subgenus *Scha-donophasma* Dyar and Shannon (*Chaoborus*, Chaoboridae, Diptera). *Quaestiones Entomologicae*, 15, 122-255.

Bradford MM. (1976). A rapid and sensitive method for the quantification of micro-gram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72: 248-254.

Branstrator DK. and Lehman JT. (1991). Invertebrate predation in Lake Michigan – regulation of *Bosmina longirostris* by *Leptodora kindtii*. – *Limnol. Oceanogr.* 36: 483–495

Brodsky VY. and Uryvayeva IV. (1985). Genome multiplication in growth and development. *Biology of polyploid and polytene cells*. Cambridge.

Brown DD. and Dawid IB. (1968). Specific gene amplification in oocytes. *Science* 169, 272-280.

Browman HI., Kruse S. and O'Brien WJ. (1989). Foraging behavior of the predaceous cladoceran, *Leptodora kindtii*, and escape responses of their prey. *J. Plankton Res.* 11, 1075–1088.

Buckley BA. and Szmant AM. (2004). RNA/DNA ratios as indicators of metabolic activity in four species of scleractinian corals. *Mar Ecol Prog Ser* 282: 143-149

Büns M. and Ratte HT. (1991). The combined effects of temperature and food consumption on body weight, egg production and developmental time in *Chaoborus crystallinus* De Geer (Diptera: Chaoboridae). *Oecologia*: 88: 470-476

Caldarone EM., Clemmesen CM., Berdalet E., Miller TJ., Fokvord A., Holt GJ., Olivar MP. and Suthers IM. (2006). Intercalibration of four spectrofluorometric protocols for measuring RNA/DNA ratios in larval and juvenile fish. *Limnology and Oceanography:Methods* 4: 153-163.

Chang KH. and Hanazato T. (2004). Predation impact of *Leptodora kindtii* on population dynamics and morphology of *Bosmina fatalis* and *B. longirostris* in mesocosms. *Freshwater Biology*, Vol. 49, 253-264

Chiu TS. and Huang JB. (1998). An Observation on the RNA/DNA Ratio of Individual Japanese Anchovy Larva from Four Hydrographic Regions in the Northeastern Waters of Taiwan. *Proc. Natl. Sci. Council. ROC(B)*. Vol. 23, No. 2, 1999. pp. 69-73

Colbourne JK., Hebert PDN., Taylor DJ. (1997). Evolutionary origins of phenotypic diversity in *Daphnia*. In: *Molecular Evolution and Adaptive Radiation* (Ed. by Givnish, T. J. & Sytsma, K. J.). Cambridge University Press, Cambridge, 163-188:

Comai L. (2005). The advantages and disadvantages of being polyploid. *Nat Rev Genet.*; 6:836–846.

Cornish-Bowden A. (2004) *Fundamentals of Enzyme Kinetics* (3rd edn.), Portland Press, London

Costa M., Davidson TL., Chen H., Ke Q., Zhang P., Yan Y., Huang C., Kluz T. (2005). Nickel carcinogenesis: Epigenetics and hypoxia signaling. *Mutat Res*; 592:79–88.

D'Souza T., Storhas M. and Michiels K. (2005). The effect of ploidy level on fitness in parthenogenetic flatworms. *Biological Journal of the Linnean Society* , 2005, 85 , 191–198.

Dahlhoff EP. and Menge BA. (1996). Influence of phytoplankton concentration and wave exposure on the ecophysiology of *Mytilus californianus*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 144, 97–107.

Dahlhoff EP., Buckley BA., Menge BA. (2001). Physiology of the rocky intertidal predator *Nucella ostrina* along an environmental stress gradient. *Ecology* 82:2816–2829

Dortch Q., Robberts TL., Clayton JR. and Ahmed SI. (1983). RNA/DNA ratios and DNA concentrations as indicators of growth rate and biomass in planktonic marine organisms. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 13, 61–71.

Dunn CR., Wilks HM., Halsall DJ., Atkinson T., Clarke AR., Muirhead H. and Holbrook JJ. (1991). Design and synthesis of new enzymes based on the lactate-dehydrogenase framework. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B* 322, 177-184.

Ebert D. (1993). The trade-off between offspring size and number in *Daphnia magna*: the influence of genetic, environmental and maternal effects. *Arch. Hydrobiol. Suppl.* 90: 453–473

Elendt BP., Bias WR. (1990). Trace nutrient deficiency in *Daphnia magna* cultured in standard medium for toxicity testing: effects of the optimization of culture conditions on the life history parameters of *Daphnia magna*. *Water Res.* 24: 1157– 1167.

Elser JJ., Dobberfuhl D., MacKay NA. and Schampel JH. (1996). Organism size, life history and N : P stoichiometry: towards a unified view of cellular and ecosystem processes. *BioScience* 46, 674–684.

Engel PC. and Jones JB. (1978). Causes and elimination of erratic blanks in enzymatic metabolite assays involving the use of NAD⁺ in alkaline hydrazine buffers: Improved conditions for the assay of L-glutamate, L-lactate and other metabolites. *Anal. Biochem.* 88, 475-484.

Englich H., Opalka B. und Zebe E. (1981). The anaerobic metabolism of the larvae of the midge *Chaoborus crystallinus*. *Insect. Biochem.* 12(2), 149-155.

Feder ME., Hofmann GE. (1999). Heat-shock proteins, molecular chaperones and the stress response: Evolutionary and ecological physiology. *Annu. Rev. Physiol.* 61,243–282.

Fischle W., Wang W. and Allis CD. (2003). Histone and chromatin cross-talk. *Current Opinion in Cell Biology* 15, 172-183

Flößner D. (1972). Krebstiere, Crustacea: Kiemen- und Blattfüßer, Branchiopoda; Fischläuse, Branchiura. In *Die Tierwelt Deutschlands* (ed. M. Dahl and F. Peus), part 60. Jena: Gustav Fischer.

Folkvord A., Ystanes L. and Johannessen A. (1996). RNA: DNA ratios and growth of herring (*Clupea harengus*) larvae reared in mesocosms. *Mar. Biol.* 126: 591–602.

Frederich M. and Pörtner HO. (2000). Oxygen limitation of thermal tolerance defined by cardiac and ventilatory performance in the spider crab, *Maja squinado*. *Am. J. Physiol.* 279, R1531–R1538.

Galitski T., Saldanha AJ., Styles CA., Lander ES., Fink GR. (1999). Ploidy regulation of gene expression. *Science* 285:251–54

Garton DW., Berg DJ. and Fletcher RJ. (1990). Thermal tolerances of the predatory cladocerans *Bythotrephes cederstroemi* and *Leptodora kindtii*: relationship to seasonal abundance in western Lake Erie. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 47: 731-738.

Giebelhausen B. and Lampert W. (2001). Temperature reaction norms of *Daphnia magna*: the effect of food concentration. *Freshwater Biology* 46, 281–289.

Gorokhova E. and Kyle M. (2002). Analysis of nucleic acids in *Daphnia*: development of methods and ontogenetic variations in RNA–DNA content. *J. Plankton Res.* 24, 511–522.

Gregory TR. and Hebert PDN. (1999). The Modulation of DNA Content: Proximate Causes and Ultimate Consequences. *Genome Res.* 1999 9: 317-324

Gruner HE. (Hrsg.) (1993). Lehrbuch der speziellen Zoologie. Bd. I: Wirbellose Tiere, 4. Teil: Arthropoda. Gustav Fischer Verlag, Jena, Stuttgart, New York.

Guderley H. (1998). Temperature and growth rates as modulators of the metabolic capacities of fish muscle. In Cold Ocean Physiology (ed. HO. Pörtner and R. Playle), pp. 58–87. Cambridge: Cambridge University Press.

Gutmann I. und Wahlefeld AW. (1974): L-(+)-Laktat: Bestimmung mit Laktat-Dehydrogenase und NAD. In: HU Bergmeyer, Ed.: Methoden der enzymatischen Analyse. Verlag Chemie Weinheim. Vol 2 pp. 1510-1514.

Heiman DR. and Knight AW. (1972). Upper-Lethal-Temperature Relations of the Nymphs of the Stonefly *Paragnetia media*, *Hydrobiologia* 39, 479–493.

Herzig A. (1994). Predator-prey relationships within the pelagic community of Neusiedler See. *Hydrobiologia* 276: 81–96.

Herzig A. (1995). *Leptodora kindtii*: efficient predator and preferred prey item in Neusiedler See, Austria. *Hydrobiologia* 307: 273– 282.

Herzig A. and Auer B (1990). The feeding behaviour of *Leptodora kindtii* and its impact on the zooplankton community of Neusiedler See (Austria). *Hydrobiologia* 198:107–117

Hewitt CO., Eszes CM., Sessions RB., Moreton KM., Dafforn TR., Takei J., Dempsey CE., Clarke AR. and Holbrook JJ. (1999). A general method for relieving substrate inhibition in lactate dehydrogenases. *Protein Eng.* 12, 491-496.

Hirst AG. and Shearer M. (1997). Are in situ weight-specific growth rates body size independent in marine planktonic copepods? A re-analysis of the global syntheses and a new empirical model. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 154: 155–165.

Hochachka PW. and Somero GN. (2002). Biochemical adaptation. Oxford University Press, Oxford, New York.

Horn H. (2003) The relative importance of climate and nutrients in controlling phytoplankton growth in the Saldenbach Reservoir. *Hydrobiologia* 504: 159–166.

Hutchinson GE. (1967). A treatise on limnology. V. 2. Wiley.

Jäger IS. and Walz N. (2002). *Chaoborus flavicans* (Diptera) is an oxy-regulator. *Arch. Hydrobiol* 5(3): 401-411

Jäger IS. and Walz N. (2003). Unusual allometry between respiration rate and body size in *Chaoborus species*. *Journal of Plankton Research*, Volume 25, Number 3: 255-260

Johnson AB., Barton MC. (2007). Hypoxia-induced and stress-specific changes in chromatin structure and function. *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*. Volume 618, Issues 1-2, Pages 149-162

Juinio MA., Cobb JS., Bengtson D. and Johnson M. (1992) Changes in nucleic acids over the molt cycle in relation to food availability and to temperature in *Homarus americanus* postlarvae. *Mar. Biol.*, 114, 1–10.

Karp GC. (2005). *Molekulare Zellbiologie*. Springer, Berlin; Auflage: 1

Kato K., Tokishita S., Mandokoro Y., Kimura S., Ohta T., Kobayashi M., Yamagata H. (2001). Two-domain hemoglobin gene of the water flea *Moina macrocopa*: duplication in the ancestral Cladocera, diversification, and loss of a bridge intron. *Gene*. 273(1), 41-50.

Kidder GM. (1976). The ribosomal RNA cistrons in clam gametes. *Dev. Biol.* 49: 132-142

Kluge K. (2007) Untersuchungen zur temperaturabhängigen Fitness aquatischer Organismen. Diplomarbeit, Universität Münster.

Knippers R. (2006). Molekulare Genetik. Thieme, Stuttgart; Auflage: 9., kompl. überarb. A

Kobayashi M. (1983). Estimation of the haemolymph volume in *Daphnia magna* by haemoglobin determination. Comparative Biochemistry and Physiology A, 76, 803–805.

Koch LA. (1970). Overall controls on the biosynthesis of ribosomes in growing bacteria. J. Theor. Biol. 28: 203–231.

Korpelainen H., Ketola M. and Hietala J. (1997). Somatic polyploidy examined by flow cytometry in *Daphnia*. J. Plankton Res., 19, 2031–2040.

Koshuchow ZA. (1928). Zeitschr. für Erforschung der Nutzpflanzen, 10, 140-148.

Koukourakis MI., Giatromanolaki A., Sivridis E., Gatter KC., Harris AL. (2005). Pyruvate dehydrogenase and pyruvate dehydrogenase kinase expression in non small cell lung cancer and tumor-associated stroma. Neoplasia; 7:1–6.

Lamkemeyer T., Zeis B. and Paul RJ. (2003). Temperature acclimation influences temperature-related behaviour as well as oxygen transport physiology and biochemistry in the water flea *Daphnia magna*. Can J Zool 81:237–249.

Lampert W. and Sommer U. (1993). Limnoökologie, Georg Thieme Verlag Stuttgart New York

Lampert W. and Trubetskova I. (1996). Juvenile growth rate as a measure of fitness in *Daphnia*. Funct. Ecol. 10: 631–635.

Lewin L., Cassimeris L., Lingappa VR. and Plopper G. (2006). Cells. Jones and Bartlett Publishers, Inc; 1 edition

Liljendahl-Nurminen A., Horppila J., Eloranta P., Malinen T., Uusitalo L. (2002). The seasonal dynamics and distribution of *Chaoborus flavicans* larvae in adjacent

lake basins of different morphometry and degree of eutrophication. *Freshwater Biology*, 47: 1283-1295

Lottspeich F., Engels JW. (Hrsg.) (2006) *Bioanalytik* 2. Aufl., München, Elsevier Spektrum Akad. Verl.

MacIsaac HJ., Hebert PDN. and Schwartz SS. (1985). Inter- and intraspecific variation in acute thermal tolerance of *Daphnia*. *Physiol. Zool.* 58: 350–355.

Manca M. and Comoli P. (1995). Seasonal changes in size of the feeding basket of *Leptodora kindtii* (Focke) in Lago Maggiore as related to variations in prey size selection. *Limno. Oceanogr.* 40(4): 834-838.

Mitchell SE. and Lampert W. (2000). Temperature adaptation in a geographically widespread zooplankter, *Daphnia magna*. *J. Evol. Biol.* 13:371–382.

Mordukhai-Boltowskaya ED. (1958) . Preliminary notes on the feeding of the carnivorous cladocerans *Leptodora* and *Bythotrephes* . *Dokl. Akad. Nauk. SSSR. Biol. Sci. Sect.* 122:828-830.

Nagl W. (1978). Endopolyploidy and polyteny in differentiation and evolution. North Holland.

Nomura M., Gourse R. and Baughman G. (1984). Regulation of the synthesis of ribosomes and ribosomal components. *Annu. Revi. Biochem.* 53: 75–117.

Otto SP. (2003). In polyploids, one plus one does not equal two. *Trends in Ecology and Evolution* 18: 431–433.

Ouimet C. (2001). Implications of *Chaoborus* pupation and ecdysis in cold water. *Freshwater Biology*, 46: 1169-1177

Pagano M., Koffi MA., Cecchi P., Corbin D., Champalbert G. and Saint-Jean L. (2003). An experimental study of the effects of nutrient supply and *Chaoborus* pre-

ation on zooplankton communities of a shallow tropical reservoir (Lake Brobo, Côte d'Ivoire). *Freshwater Biology*, 48: 1379-1395

Paul RJ., Colmorgen M., Hüller S., Tyroller F., Zinkler D. (1997). Circulation and respiratory control in millimetre-sized animals (*Daphnia magna*, *Folsomia candida*) studied by optical methods. *J. Comp. Physiol.* 167, 399-408

Paul RJ., Zeis B., Lamkemeyer T., Seidl M., Pirow R. (2004) Control of oxygen transport in the microcrustacean *Daphnia*: regulation of haemoglobin expression as central mechanism of adaptation to different oxygen and temperature conditions. *Acta Physiol Scand.* 182: 259-75. Review

Paul RJ., Schneckenburger H. (1996). Oxygen concentration and the oxidation-reduction state of yeast: determination of free/bound NADH and flavins by time-resolved spectroscopy. *Naturwissenschaften* 83: 32–35

Pennak, RW. (1978). *Freshwater Invertebrates of the United States*. John Wiley & Sons, Inc. New York, NY. 803 p.

Penzlin H. (1996). *Lehrbuch der Tierphysiologie*. Spektrum Akademischer Verlag/Gustav Fischer, Heidelberg; 6. Auflage

Perkowska E., Macgregor HC., Birnstiel ML. (1968). Gene amplification in the oocyte nucleus of mutant and wild-type *Xenopus laevis*. *Nature (Lond.)* 217, 649-650.

Persaud AD. and Yan ND. (2001). Accounting for spatial variability in the design of sampling programmes for *Chaoborus* larvae. *Journal of Plankton Research*, Volume 23, Number 3: 279-285

Pilichova R., Weber A. and Gosser B. (2004). *Leptodora kindtii* survival in the laboratory. *Aquatic Ecology* 38:537-546

Pinkhaus O., Schwerin S., Pirow R., Zeis B., Buchen I., Gigengack U., Koch ., Horn W., Paul RJ. (2007). Temporal environmental change, clonal physiology and the

genetic structure of a *Daphnia* assemblage (*D. galeata-hyalina* hybrid species complex). *Freshwater Biol* 52: 1537-1554

Pirow R., Wollinger F. and Paul R.J. (1999a) Importance of the feeding current for oxygen uptake in the water flea *Daphnia magna*. *Journal of Experimental Biology*, 202, 553-562.

Pörtner H.O., Berdal B., Blust R., Brix O., Colosima A., De Wachter B., Giuliani A., Johansen T., Fischer T., Knust R., Lannig G., Naevdal G., Nedenes A., Nyhammer G., Sartoris F.J., Serendero I., Sirabella P., Thorkildsen S. and Zakhartsev M. (2001). Climate induced temperature effects on growth performance, fecundity and recruitment in marine fish: developing a hypothesis for cause and effect relationships in Atlantic cod (*Gadus morhua*) and common eelpout (*Zoarces viviparus*) *Cont. Shelf Res.* 21: 1975–1997.

Pörtner H.O. (2002). Climate variations and the physiological basis of temperature dependent biogeography: systemic to molecular hierarchy of thermal tolerance in animals. *Comp. Biochem. Physiol. A*, 132: 739–761.

Prosser C.L. (1973). Temperature. In *Comparative animal physiology*. 3rd ed. Edited by C.L. Prosser. W.B. Saunders Co., Philadelphia, London, and Toronto. pp. 362-429.

Rahman I. (2002). Oxidative Stress, Chromatin Remodeling and Gene Transcription in Inflammation and Chronic Lung Diseases. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, Vol. 36, No. 1, pp. 95-109

Randolph L.F. (1932). Some effects of high temperature on polyploidy and other variations in Maize. *Proc Natl Acad Sci U S A.*; 18(3): 222–229.

Ratte H.T. (1984). Temperature and insect development. In: *Environmental Physiology and Biochemistry of Insects* (Ed. K.H. Hoffman), pp. 33-65. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg.

Saether OA. (1970). Nearctic and palearctic *Chaoborus* (Diptera: Chaoboridae). Bulletin of the Fisheries Research Board of Canada, 174, 57.

Saiz E., Calbet A., Fara A. and Berdalet E. (1998) RNA content of copepods as a tool for determining adult growth rates in the field. *Limnol. Oceanogr.*, 43, 465–470.

Sakamura TJ. (1920). Coll. Imp. Univ. Tokyo, 39, pp. 221.

Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York. 1989.

Schönfeld C. (1957). Histophysilogische Untersuchungen zur Verdauungstätigkeit der Mückenlarve *Chaoborus* (Corethra). *Zool. Jb, Abt. Allg. Zool. Physiol.* 67: 337 - 364

Schwerdtfeger F. (1977). Ökologie der Tiere: Autökologie. Paul Parey, Hamburg, Berlin.

Skinner DM., Graham DE., Holland CA., Mykles DL., Soumoff C. and Yamaoka LH. (1985) Control of molting in Crustacea. In Wenner, A. M. (ed.) Factors in Adult Growth. A.A. Balkema, Rotterdam, pp. 3–14.

Smyly WJP. (1980). Food and feeding of aquatic larvae of the midge *Chaoborus flavicans* (Meigen) (Diptera: Chaoboridae) in the laboratory. *Hydrobiologia* 70: 179-188

Soltis PS. and Soltis DE. (2000). The role of genetic and genomic attributes in the success of polyploids. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 97:7051–7057.

Sprague JB. (1963). Resistance of four freshwater crustaceans to lethal high temperature and low oxygen. *07. Fish. Res. Bd. Canada* 20 (2): 387-415.

- Sterba G. (1956). Zytologische Untersuchungen an grosskernigen Fettzellen von *Daphnia pulex* unter besonderer Berücksichtigung des Mitochondrien-Formwechsels. *Z. Zellforsch.*, 44,456-487.
- Sterba G. (1957). Die Riesenzellen der Daphnien-Oberlippe. *Z. Zellforsch.*, 47,198-213.
- Storch O. (1925). Cladocera, Wasserflöhe. In: Schulze, P. (Hrsg.): *Biologie der Tiere Deutschlands*. Verlag Gebrüder Borntraeger, Berlin.
- Storch V. and Welsch U. (2002) *Kükenthal - Leitfaden für das zoologische Praktikum 24.*, neubearb. Aufl., Heidelberg; Berlin: Spektrum, Akad. Verl.
- St-Pierre J., Charest PM. and Guderley H. (1998). Relative contribution of quantitative and qualitative changes in mitochondria to metabolic compensation during seasonal acclimatisation of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *J. Exp. Biol.* 201, 2961–2970
- Swarup H. (1959). Effect of triploidy on the body size, general organization and cellular structure in *Gasterosteus aculeatus* L. *f. Genet.*, 56, 143-55
- Sweeney BW., Vannote RL. & Dodds PJ. (1986) The relative importance of temperature and diet to larval development and adult size of the winter stonefly, *Soyedina carolinensis* (Plecoptera: Nemouridae). *Freshwater Biology*, 16, 39-48.
- Tulin A., Spradling A. (2003). Chromatin loosening by poly(ADP)-ribose polymerase (PARP) at *Drosophila* puff loci. *Science*; 299:560–562.
- Van de Meutter F., Stoks R. and de Meester L. (2005). Spatial avoidance of littoral and pelagic invertebrate predators by *Daphnia*. *Oecologia* 142: 489-499
- Vannote RL. and Sweeney BW. (1980). Geographic analysis of thermal equilibria: a conceptual model for evaluating the effect of natural and modified thermal regimes on aquatic insect communities. *American Naturalist*, 115, 667-695.

Vijverberg J. and Koelewijn HP. (2004). Effect of temperature on development and growth of the raptorial cladoceran *Leptodora kindtii* under laboratory conditions *Freshwater Biology* 49: 1415-1422.

Vijverberg J., Koelewijn HP. and Van Densen WLT. (2005). Effects of predation and food on the population dynamics of the raptorial cladoceran *Leptodora kindtii*. *Limnology and Oceanography* 50:455-464

Vrede, T., Persson J. and Aronsen G. (2002). The influence of food quality (P :C ratio) on RNA:DNA ratio and somatic growth rate of *Daphnia*. *Limnol. Oceanogr.* 47: 487–494.

Wagner A. and Benndorf J. (2007). Climate-driven warming during spring destabilises a *Daphnia* population: a mechanistic food-web approach. *Oecologia* 151: 351-364.

Wagner M., Durbin E. and Buckley L. (1998). RNA:DNA ratios as indicators of nutritional condition in the copepod *Calanus finmarchicus*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 162, 173–181.

Walsh E., Zhang L. (1992). Polyploidy and body size variation in a natural rotifer *Euchlanis dilatata* population. *J Evol Biol* 5 : 345-353

Weider LJ. (1987). Life history variation among low-arctic clones of obligately parthenogenetic *Daphnia pulex*: a diploid-polyploid complex. *Oecologia* 73 : 251-256

Weider LJ., Glenn KL., Kyle M. and Elser JJ. (2004). Associations among ribosomal (r)DNA intergenic spacer length variation, growth rate, and C:N:P stoichiometry in the genus *Daphnia*. *Limnol. Oceanogr.* 49:1417–23

Weisse T. (2006). Freshwater ciliates as ecophysiological model organisms - lessons from *Daphnia*, major achievements, and future perspectives. *Arch. Hydrobiol.* 167: 371-402

Weserberg-Lund C. (1943). Biologie der Süßwasserinsekten Kap. Corethridae. Verlag J. Springer Berlin, Wien: 25:405-423.

Westheide W. & Rieger R. (1996). Spezielle Zoologie Teil 1: Einzeller und Wirbellose Tiere. Gustav Fischer Verlag Stuttgart.

Wiggins PR. and Frappell PB. (2000). The influence of Haemoglobin on Behavioural Thermoregulation and Oxygen Consumption in *Daphnia carinata*. *Physiological and Biochemical Zoology* 73: 153-160.

Wissel B., Yan ND. and Ramcharan CW. (2003). Predation and refugia: implications for *Chaoborus* abundance and species composition. *Freshwater Biology* , 48: 1421–1431

Wolgemuth DJ., Jagiello GM. and Henderson AS. (1979). Quantitation of Ribosomal RNA Genes in Fetal Human Oocyte Nuclei Using rRNA:DNA Hybridization In Situ: Evidence for Increased Multiplicity. *Expt. Cell Res.* 118, 181-190.

Wyngaard GA. and Gregory R. (2001). Temporal control of DNA replication and the adaptive value of chromatin diminution in copepods. *Molecular and Developmental Evolution – The Journal of Experimental Zoology*, 291:310–316

Xie P., Iwakuma T. and Fujii K. (1998). Studies on the biology of *Chaoborus flavicans* (Meigen) (Diptera: Chaoboridae) in a fish-free eutrophic pond, Japan. *Hydrobiologia* 368: 83-90.

Zakhartsev M., Johansen T., Pörtner HO. and Blust R. (2004). Effects of temperature acclimation on lactate dehydrogenase of cod (*Gadus morhua*): genetic, kinetic and thermodynamic aspects.

Zeis B., Maurer J., Pinkhaus O., Bongartz E., Paul RJ. (2004). A swimming activity assay shows that the thermal tolerance of *Daphnia magna* is influenced by temperature acclimation. *Can J Zool* 82, 1605-1613

Zhang L. and King CE. (1993). Life history divergence of sympatric diploid and polyploid populations of brine shrimp *Artemia parthenogenetica*. *Oecologia* (Berlin) 93: 117–183.

7. Anhang

7.1. Verwendete Abkürzungen

a	Volumen-spezifische Sauerstoffverbrauchsrate ($\text{nmol h}^{-1} \text{mm}^3$)
Abb.	Abbildung
ADP	Adenosindiphosphat
AGS	Amyloglucosidase
ATP	Adenosintriphosphat
BSA	Rinderserumalbumin
<i>C. crystallinus</i>	<i>Chaoborus crystallinus</i>
<i>D. galeata</i>	<i>Daphnia galeata</i>
<i>D. magna</i>	<i>Daphnia magna</i>
<i>D. pulex</i>	<i>Daphnia pulex</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuclease
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
<i>et al.</i>	et alii
FG	Frischgewicht
G-6-P	Glukose-6-Phosphat
G-6-P-DH	Glukose-6-phosphat-Dehydrogenase
GOT	Glutamat-Oxalacetat-Transaminase
h	Stunde
Hb	Hämoglobin
K	Krogh's Diffusionskonstante ($\text{nmol s}^{-1} \text{mm}^{-1} \text{kPa}^{-1}$)
K_m	Michalelis-Menten Konstante
kPa	Kilopascal
K_{si}	Inhibierungskonstante
l	Liter
<i>L. kindtii</i>	<i>Leptodora kindtii</i>
LDH	Laktat-Dehydrogenase
L-MDH	L-Malatdehydrogenase
Lt_{50}	lethal time (50%)
LT50	Letaltemperatur (50%)

μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
M	molar (mol/l)
mg	Milligramm
min	Minute
mm	Millimeter
mM	millimolar (millimol/l)
MOPS	Morpholinopropansulfonsäure
mV	Millivolt
n	Anzahl der Wiederholungen des Versuchs
NAD^+	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinucleotid
$\text{NADH}+\text{H}^+$	Reduzierte Form des Nicotinsäureamid-Adenin-Dinucleotid
NADP^+	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat
$\text{NADPH} + \text{H}^+$	Reduzierte Form des Nicotinsäureamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphats
ng	Nanogramm
nM	nanomolar (nanomol/l)
O_2	Sauerstoff
P_{CO_2}	kritischer Sauerstoffpartialdruck
PCR	Polymerasekettenreaktion
P_L	Luftdruck (mbar)
P_{O_2}	Sauerstoffpartialdruck
P_w	Wasserdampfdruck (mbar)
PYR	Pyruvat
r	Radius des Zylinders (μm)
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuclease A
rpm	rotations per minute
rRNA	ribosomale RNA
Tab.	Tabelle
T_c	kritische Temperatur
T_p	Pejus-Temperatur
U	Unit (Enzymaktivität, $\mu\text{mol/Minute}$)
UV	ultraviolett

v/v	Volumen/Volumen
V bzw. Vol.	Volumen
V_{\max}	maximale Geschwindigkeit
α	Löslichkeitskoeffizienten von Sauerstoff im Süßwasser ($\mu\text{mol l}^{-1}$ kPa^{-1})
ΔS	Luftsättigungsdifferenz (%)
Δt	Zeit der Messung

7.2. Chemikalien und Fertiglösungen

Aceton	AppliChem, Darmstadt
Adenosintriphosphat (ATP)	Boehringer Mannheim/R-Biopharm
Agarose	Roth, Karlsruhe
Adenosintriphosphat (ATP)	Merck, Darmstadt
Bromphenolblau	Sigma, Deisenhofen
CaCl_2	Merck, Darmstadt
Chloroform	Serva, Heidelberg
Coomassie Brilliant Blau G250 (CBB G 250)	Sigma, Deisenhofen
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Fermentas, St. Leon-Roth
dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)	Merck, Darmstadt
EDTA (Ethylendiamintetraacetat)	Merck, Darmstadt
Ethanol absolut p.a.	Serva, Heidelberg
Ethidiumbromid	Merck, Darmstadt
Formaldehyd p.a., mind. 37%	Roth, Karlsruhe
GeneRuler™100bp DNA Ladder Plus	Fermentas, St. Leon-Roth
Glukose	Roth, Karlsruhe
Hoechst 33342, FluoroPure™	Invitrogen, Karlsruhe
Isopropanol	Merck, Darmstadt
K_2HPO_4	Merck, Darmstadt
KH_2PO_4	Merck, Darmstadt
L-Alanin	AppliChem, Darmstadt
L-Laktat	Sigma, Deisenhofen
L-Malat	Boehringer Mannheim/R-Biopharm

Leuchtstoffröhre Typ: L 36 W/ 11-860, Tageslicht Lumilux	Osram, Augsburg
MgSO ₄ · 7H ₂ O	Roth, Karlsruhe
MOPS (3-N-Morpholinopropansulfonsäure)	Sigma, Deisenhofen
Natriumbicarbonat	AppliChem, Darmstadt
Natriumcarbonat	AppliChem, Darmstadt
Natriumdihydrogenphosphat	AppliChem, Darmstadt
Natriumhydrogenphosphat	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Nicotinamidadenindinukleotid (NAD ⁺)	Roche Diagnostics (Mannheim)
Nicotinamidadenindinukleotid (NADH)	Roche Diagnostics (Mannheim)
Nicotinamidadenindinukleotidphosphat (NADP ⁺)	Roche Diagnostics (Mannheim)
Ortho-Phosphorsäure 85%	AppliChem, Darmstadt
Pepton aus Soja	Sigma, Deisenhofen
Phenol/Chloroform/Isopropanol (25:24:1 v/v)	Merck, Darmstadt
Phenylmethansulfonylfluorid (PMSF)	Sigma, Deisenhofen
Pyruvat	Sigma, Deisenhofen
Segenetic-PCR-Puffer (10×)	Segenetic, Borken
Streptomycin Sulfate	Sigma, St. Louis
SYBR Green II [®] RNA gel stain	Invitrogen, Karlsruhe
Tetracycline Hydrochloride	Sigma, St. Louis
TRIS (Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan)	Roth, Karlsruhe
Triton X-100	Serva, Heidelberg
TRIzol [®] -Reagens	Gibco BRL, Eggenstein
Xylencyanol	Merck, Darmstadt

7.3. Enzyme und Proteine

Amyloglukosidase	Sigma, Deisenhofen
BSA (Albumin-Fraktion V)	AppliChem, Darmstadt
Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase	Sigma, Deisenhofen
Glutamat-Oxalacetat-Transaminase (GOT)	Boehringer Mannheim/R-Biopharm

Hexokinase	Sigma, Deisenhofen
L-Alanindehydrogenase	Sigma, Deisenhofen
L-Laktatdehydrogenase	Sigma, Deisenhofen
L-Malatdehydrogenase	Boehringer Mannheim/R-Biopharm
Ribonuclease A, DNase-frei	Sigma, München
Taq-Polymerase	Segetic, Borken

7.4. Medien und Puffer

Acetat-Puffer	(1 M, pH 4,8)
Bradfordreagenz	100 mg CBB G 250 in 50 ml 95% Ethanol (rein) lösen, 100 ml 85% Phosphorsäure hinzugeben, mit H ₂ O auf 250 ml auffüllen
DEPC-H ₂ O	0,1 % Diethylpyrocarbonat (DEPC), 2-3 Stunden stehen lassen, autoklavieren
DNA-Probenpuffer (10×)	0,4% Bromphenolblau, 50 % Glycerin in TBS
EDTA (0,5 M pH 8,0)	18,61 g/100 ml ad 70 ml H ₂ O, pH 8,0 einstellen. Ad 100 ml H ₂ O, autoklavieren
Ernährungsmedium	Glukose (1 mM) und Pepton (0,1%) im M4-Elendt-Medium; Streptomycin (0,025 g/L) und Tetracycline (0,025 g/L)
Glycylglycin-Puffer mit Glutaminsäure	Endkonzentration von Glutaminsäure = 0,1 mM ml ⁻¹ , pH 10; Boehringer Mannheim/R-Biopharm
Glycine-Hydrazine-Puffer (pH 9,0)	0,9 M/l Glycine; 0,75 M/l Hydrazine
Kaliumphosphatpuffer (1 M, pH 7,5)	32,4 ml 1M K ₂ HPO ₄ ; 7,6 ml 1M KH ₂ PO ₄
Lysepuffer (2 x)	200 mM NaCl, 200 mM Tris-HCl pH 8,5, 100 mM EDTA pH 7,4; 2 % SDS, 2 % β- Mercaptoethanol, 200 µg/ml Proteinase K
M4-Elendt-Medium	(siehe 7.4.1.)

MOPS-Puffer (pH 7,0)	0,2 M MOPS; 50 mM NaAcetat (3 H ₂ O); 10 mM EDTA
Natriumcarbonat-Puffer (50 mM, pH 10,0)	50 mM Natriumbicarbonat-Lösung (NaHCO ₃) und 50 mM Natriumcarbonat- Lösung (Na ₂ CO ₃)
Phosphate-Puffer (pH 7,5)	2 M Natriumdihydrogenphosphat und 2 M Dinatriumhydrogenphosphat
PMSF- Stammlösung (100 mM)	17,4 mg PMSF ad 1 ml Ethanol
RNA-Probenpuffer (10 x):	0,4 % Bromphenolblau, 0,4 % Xylency- anol, 2 µl/ml EDTA-Lösung (0,5 M, pH 8), 50 % Glycerin
Segetic-PCR-Puffer (10×)	Segetic, Borken
Triethanolamin (TRA)/HCl-Puffer (pH 7,6)	(750 mM)
TE (Tris-EDTA) (pH 7,6)	10 mM Tris · Cl (pH 7,4); 1 mM EDTA (pH 8,0)
Tris-Acetat-EDTA-Puffer (TAE, 50×)	242 g/l Tris-HCl, ad 500 ml H ₂ O, 100 ml 0,5 M EDTA (pH 8,0), 57,1 ml konz. Essigsäure, ad 1 l H ₂ O

7.4.1. Medium für Daphnienzucht (M4-Medium nach Elendt & Bias 1990)

Lösung	Substanz	Endkonzentration
CaCl ₂ -Lösung	CaCl ₂ ·2 H ₂ O	2,000 mM
MgSO ₄ -Lösung	MgSO ₄ ·7 H ₂ O	0,500 mM
KCl-Lösung	KCl	0,078 mM
NaHCO ₃ -Lösung	NaHCO ₃	0,771 mM
Kationenlösung	MnCl ₂ ·4 H ₂ O	1,820 µM
	LiCl	7,220 µM
	RbCl	0,587 µM
	SrCl ₂ ·6 H ₂ O	0,570 µM
	CuCl ₂ ·2 H ₂ O	0,098 µM

Anionenlösung	ZnCl ₂	0,095 µM
	CoCl ₂ ·6 H ₂ O	0,042 µM
	NaNO ₃	3,220 µM
	H ₃ BO ₃	4,630 µM
	NaBr	0,155 µM
	Na ₂ MoO ₄ ·2 H ₂ O	0,260 µM
	KJ	0,0196 µM
	Na ₂ SeO ₃ ·5 H ₂ O	0,0127 µM
Silikat-Lösung	NH ₄ VO ₃	0,005 µM
	Na ₂ SiO ₃	0,035 mM
Eisen-/EDTA-Lösung	Na ₂ EDTA·2 H ₂ O	6,720 µM
	FeSO ₄ ·3 H ₂ O	3,580 µM
Phosphatlösung	KH ₂ PO ₄	1,050 µM
	K ₂ HPO ₄	1,060 µM
Vitaminlösung	Vit. B ₁ ·HCl (Thiaminhydrochlorid)	0,317 µM
	Vit B ₁₂ (Cyanocobalamin)	0,00074 µM
	Vit. H (Biotin)	0,0031 µM

7.5. Geräte und Verbrauchsmaterialien

Autoklav, Varioklav Tischsterilisator 250 T	H+P Labortechnik GmbH, Dülmen
Computer Euro][plus + externes Diskettenlaufwerk	Apple
Deckgläser	Roth, Karlsruhe
Geldokumentationsanlage	Bio Photonics, Ann Arbor, MI, USA
Digitalkamera EOS 350 D für Farbfotos	Canon, Japan
Digitalkamera für Gelfotos, BP-M1C	Bio Photonics, Ann Arbor, MI, USA
Elektrophoresekammer, Sub-Cell	BioRad, München
GT MINI	
Eppendorf Centrifuge 5417R	Eppendorf, Hamburg
Eppendorfreaktionsgefäße ("Eppis")	Eppendorf, Hamburg

Gasmischpumpe	Wösthoff, Bochum
Gefrierschrank (-80 °C)	New Brunswick Scientific GmbH, Nürtingen
Gefrierschränke (-20 °C)	Liebherr-International AG, Bulle, Schweiz
Glaskammer (Innenvolumen 3,5 ml)	H. Saur; Reutlingen
Heizblock	Bachofer, Reutlingen
Klimaanlage Zuchtraum	Walter Roller GmbH & Co., Gerlingen
Kühlschränke	Liebherr-International AG, Bulle, Schweiz
Konfokalmikroskop	Leica Microsystems, Deutschland
Kunststoffküvetten	Einweg Brand GmbH + Co KG, Wertheim
Luminescence Spektrometer LS 50 B	Perkin Elmer, Boston, USA
Membran-Luftpumpe Typ R.101	RENA
Milli-Q-Plus-Reinstwasseranlage	Millipore, Schwabach
Mikroskop Zeiss Axiovert100	Zeiss, Oberkochen
Monitor Typ wv-5340	Panasonic
Multimeter TDM 600	TOP-CRAFT, Meister Werkzeuge, Wuppertal
Netzteil, EPS 6000	Pharmacia Biotech, Freiburg
Netzteil: Modell HA-5A short ARC power supply	Radiation Power Systems, San Jose, CA, USA
Netzteil Typ PS-150	Monacor
Parafilm [®]	Pechiney Plastic Packaging, USA
Photometer, Ultrospec 3000	Pharmacia Biotech, Freiburg
Pipetten	Eppendorf, Hamburg
Pipettenspitzen	Greiner Bio-One GmbH, Solingen
Po2-Feldelektrode, Sauerstoffmessgerät	WTW, Weilheim
Oximeter OXI 340 mit Sauerstoffelektro- de Cellox 325	
Plan-Neofluar-Objektive	Zeiss, Oberkochen
Potter Pellet Pestle Motor	Kimble Kontes, New Jersey, USA
Quarzküvette Typ 101 QS, 10*10 mm;	Hellma, Müllheim

3500 µl Volumen	
Reaktionsgefäße	Eppendorf, Hamburg
Sauerstoffelektrode	H. Saur; Reutlingen
Sauerstoff- und Temperatur-Elektrode (WTW Oxi 340)	WTW Wissenschaftlich-Technische Werkstätten GmbH, Weilheim
Sauerstoff- und Temperatur-Sensor	WTW Oxi 3000; Weilheim
Schüttler KS 250 basic	IKA Labortechnik, Staufen
SigmaPlot 9	SYSTAT Software GmbH
Spektral-Fluorometer Typ 650-10LC	Perkin-Elmer, Überlingen
Stereolupe, Leica MZ 125	Leica, Heerbrugg, Schweiz
Sterile Werkbank, HeraSafe	Kendro Laboratory Products, Hanau
Temperatursensor Durchmesser 0,3 mm, Type MT-29/1	Science Products, Hofheim
Thermocycler, T Personal/Uni	Biometra, Göttingen
UV-Tisch	Herolab, Wiesloch
Vortex-Genie	Bender Hohbein, Zürich, Schweiz
Waage (Sartorius BL 150 S)	Sartorius AG, Göttingen
Waage (Sartorius BP 211 D)	Sartorius AG, Göttingen
Wasserbad Typ K30	Funke Medingen, Freital
Xenonlampe XBO 150W/1 OFR	Osram, Augsburg

Danksagung

Ich bedanke mich bei Herrn Prof. Dr. R.J. Paul für die Betreuung meiner Doktorarbeit sowie für die zahlreichen guten Ideen.

Frau Prof. Dr. E. I. Meyer möchte ich für die Übernahme des Zweitgutachtens danken.

Frau Dr. Bettina Zeis danke ich für die vielseitigen Anregungen, Tipps und dafür, dass sie mir immer bei allen Problemen hilfreich zur Seite stand.

Ich bedanke mich bei allen Mitarbeitern des Instituts für Zoophysiology für das gute Arbeitsklima und ihre Hilfsbereitschaft.

Ich bedanke mich bei der KAAD-Stiftung, die mir das Promotionsstudium in Deutschland ermöglicht hat.

Mein besonderer Dank gilt meiner Frau Magda, meinen Eltern, meiner ganzen Familie und meinen Freunden für ihre immerwährende Unterstützung.

Lebenslauf

Marcin Prokopiak

geboren am 08.02.1978 in Dębno, Polen

Familienstand: verheiratet

Name des Vaters: Jerzy Prokopiak

Name der Mutter, geb.: Zofia Prokopiak (Duma)

Schulbildung: Grundschule: von 1985 bis 1993 in Dębno

Gymnasium: von 1993 bis 1997 in Szczecin

Hochschulreife (Abitur): am 03.06.1997 in Szczecin

Studium: Biologie

Universität Szczecin von 1997 bis 2002

Promotionsstudiengang: das biologische Promotionsstudium an der
Westfälischen Wilhelms-Universität in Münster

Prüfungen: Diplom im Fach Biologie am 07.01.2003
an der Universität Szczecin

Tätigkeiten: wiss. Hilfskraft von Januar 2008 bis März 2008
wiss. Mitarbeiter von April 2008 bis Juli 2008
Westfälische Wilhelms-Universität
Institut für Zoophysiologie
Münster

Beginn der Dissertation: Januar 2005, Institut für Zoophysiologie,
Betreuer: Prof. Dr. Rüdiger J. Paul