

Einfluss der Klimafaktoren CO₂ und Temperatur auf die Physiologie von Gesamtorganismus sowie isolierten Geweben des Atlantischen Kabeljaus (*Gadus morhua*)

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades
- Dr. rer. nat. -

Im Fachbereich 2 Biologie/Chemie
der Universität Bremen

vorgelegt von

Cornelia Kreiss

Diplombiologin

Promotionskolloquium: 01.06.2015

1. Gutachter Prof. Dr. H.-O. Pörtner

Alfred-Wegener-Institut, Helmholtz-Zentrum für Polar- und Meeresforschung
Integrative Ökophysiologie, Am Handelshafen 12, 27570 Bremerhaven

2. Gutachter: P.D. Dr. Holger Auel

Universität Bremen, Fachbereich 2, Marine Zoologie
Leobener Str. im NW2, 28359 Bremen

“If codfish forsake us what then would we hold?
What carry to Bergen to barter for gold?”

-Peter Daas, Trumpet of Nordland, Norwegen 1735

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	III
Zusammenfassung und Summary	V
1 Einleitung	1
1.1 Wirkung des Klimawandels auf die Ozeane	1
1.1.2 Auswirkungen des Klimawandels im Lebensraum Nordsee	2
1.2 Auswirkungen des Klimawandels auf marine Fische	
1.2.1 Ozeanversauerung	3
1.2.2 Ozeanerwärmung	6
1.3 Die marine Fischkieme und ihre Rolle in der Ionenregulation	8
1.4 Der Versuchsorganismus <i>Gadus morhua</i>	11
1.5 Konzept und Fragestellung	13
2 Material und Methoden	16
2.1 Versuchstiere	16
2.2 Hälterung und Bestimmung der Meerwasserparameter	16
2.3 Ganztier-Respirationsexperimente	18
2.4 Probennahme	19
2.5 Analytik des Blutplasmas	19
2.6 Isolierte perfundierte Kieme	20
2.6.1 Akute Temperatur-Rampen	22
2.6.2 Inhibitor-Experimente	22
2.7 Enzym-Analysen	23
2.8 Statistik	25
3 Publikationen	26
Publikation I	27
<i>“Impact of long-term moderate hypercapnia and elevated temperature on the energy budget of isolated gills of Atlantic cod (<i>Gadus morhua</i>)”</i>	
Publikation II	56
<i>“Ocean warming and acidification modulate energy budget and gill ion regulatory mechanisms in Atlantic cod (<i>Gadus morhua</i>)”</i>	
Publikation III	89
<i>“Metabolic shifts in Atlantic cod (<i>Gadus morhua</i>) exposed to combined warming and acidification scenarios”</i>	

4 Diskussion	117
4.1 Auswirkungen von Ozeanversauerung und -erwärmung auf die Kieme	
4.1.1 Kiemenanatomie und Gesamtsauerstoffbedarf	117
4.1.2 Kiemenphysiologie: <i>In vivo</i> Energiebudget und ionenregulatorische Prozesse	119
4.1.3 Kiemenphysiologie: ionenregulatorische Prozesse <i>in vitro</i>	120
4.2 Auswirkungen von Ozeanversauerung und -erwärmung auf maximale Stoffwechsellenzymkapazitäten	
4.2.1 Leber	124
4.2.2 Weißer Muskel	125
4.3 Auswirkungen von Ozeanversauerung und -erwärmung auf das Ganztier	
4.3.1 Ionenkonzentrationen im Blutplasma	127
4.3.2 Tierkonditionsparameter	130
4.3.3 Verknüpfung der systemischen Ebenen und Auswirkungen auf das Ganztier	135
4.4. Zusammenfassung und Einordnung der Effekte auf den Kabeljau innerhalb des natürlichen Habitats	138
Referenzen	142
Danksagung	157
Erklärung gemäß § 6 (5) der PromO	159

Abkürzungsverzeichnis

ADP	Adenosindiphosphat
ATP	Adenosintriphosphat
ANOVA	Varianzanalyse
CA	Carbon-Anhydrase
Ca ²⁺	Kalziumion
Cl ⁻	Chloridion
CCO ₂	Plasma-Gesamt-CO ₂ -Gehalt
CO ₂	Kohlendioxid
COX	Cytochrom-c-Oxidase
CS	Citratsynthase
DIC	Gesamtmenge des gelösten anorganischen Kohlenstoffs
DIDS	4,4'-Diisothiocyano-2,2'-Stilben-Disulfonsäure
DMSO	Dimethylsulfoxid
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EIPA	5-(N-Ethyl-N-Isopropyl) Amilorid
GDH	Glutamat-Dehydrogenase
gFW	Frischgewicht in g
F ₁ F ₀ -ATPase	ATP-Synthase bestehend aus den beiden Komplexen F ₁ und F ₀
H ⁺	Proton
H ⁺ -ATPase	Protonen-ATPase
HCl	Chlorwasserstoff
HCO ₃ ⁻	Bikarbonat
HCO ₃ ⁻ -Transporter	Bikarbonat-Transporter
HADH	3-Hydroxyacyl-CoA-Dehydrogenase
HSI	Hepatosomatischer Index
K	Konditionsfaktor
K ⁺	Kaliumion
K _m	Michaelis-Menten-Konstante
KCl	Kaliumchlorid
L	Fischlänge
LDH	Laktat-Dehydrogenase
M	Molarität
Mg ²⁺	Magnesiumion
MgSO ₄	Magnesiumsulfat
M(O ₂)	Sauerstoffverbrauchsrate
MS222	3-Amino-benzoesäure-ethylester
Na ⁺	Natrium
NADH	Nicotinaminadenindinukleotid
NaHCO ₃	Natriumhydrogencarbonat
NH ₄ -Acetat	Ammoniumacetat
NHE	Natrium/Protonen-Austauscher
Na ⁺ /K ⁺ -ATPase	Natrium/Kalium-ATPase
PCO ₂	Kohlendioxidpartialdruck
PO ₂	Sauerstoffpartialdruck
pH _e	extrazellulärer pH
pH _i	intrazellulärer pH
PEPCK	Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase
PK	Pyruvatkinase
pk	Säurekonstante
Q ₁₀	Quotient, der das Verhältnis der Reaktionsgeschwindigkeit bei 10°C Temperaturdifferenz angibt
RNA-Synthese	Ribonukleinssäure-Synthese
RZB	relative Zentrifugalbeschleunigung

RBZ	Rote Blutzellen (Erythrozyten)
SMR	Rate des Standardmetabolismus
SO ₄ ²⁻	Sulfation
T _{crit}	kritische Temperatur
T _d	Denaturierungstemperatur
T _{opt}	Optimumstemperatur
T _p	Pejus Temperatur
Tris	Tris(hydroxymethyl-) aminomethan
V	Kammervolumen in l
W	Standardgewicht des Fisches in g
w	Kiemengewicht in g
αCO ₂	Kohlendioxidkapazität
αO ₂	Sauerstoffkapazität
ΔPch	Sauerstoffabnahme in der Kammer
µatm	10 ⁻⁶ atm entspricht 0,1013 Pascal

Zusammenfassung

Als Teil des fortschreitenden Klimawandels und Folge fossiler CO₂-Emissionen stellen Ozeanerwärmung und Ozeanversauerung große Herausforderungen für marine Organismen dar. Nach bisherigem Forschungsstand sind marine Fische effiziente Osmoregulatoren, die eine Säure-Base-Störung zeitnah kompensieren können, jedoch sind weder die Mechanismen dieser Kompensation noch die Langzeitauswirkungen auf den Gesamtorganismus ausreichend geklärt. Die Effekte von erhöhter Temperatur auf die Physiologie mariner Fische sind hingegen relativ gut untersucht. Temperaturanstieg führt innerhalb eines Toleranzbereichs in der Regel zu erhöhtem Grundstoffwechsel, wobei für die warme Toleranzgrenze postuliert wird, dass eine Diskrepanz zwischen Sauerstoffbedarf und Sauerstoffbereitstellung durch die limitierte Kapazität des Herz-Kreislaufsystems entsteht. Darüber hinaus könnten Temperatureinflüsse auf das Energiebudget mit der Reaktion des Organismus auf Hyperkapnie, wie veränderte Kosten der Säure-Base-Regulation, zusammenwirken.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden daher die Auswirkungen von Ozeanversauerung und -erwärmung am Beispiel des atlantischen Kabeljau (*Gadus morhua*) mit Hilfe von längerfristigen Inkubationsexperimenten untersucht. Dabei wurden die Folgen von Temperatur- und PCO₂-Änderungen sowohl unabhängig voneinander als auch in Kombination betrachtet. In Experimenten an isolierten perfundierten Kiemen wurden *in vivo* Kosten des branchialen Energiebudgets sowie des Säure-Base-relevanten Ionentransports erfasst, um entsprechende Mechanismen unter prognostizierten Versauerungsszenarien (550, 1.200, 2.200-2.500 µatm) bei Optimumtemperatur (10°C) und in Kombination mit Erwärmung (18°C) zu identifizieren. Des Weiteren wurden potentielle Auswirkungen auf das Ganztier untersucht, insbesondere auf Basalmetabolismus, Plasmaparameter und das somatische Wachstum. Die Bestimmung von maximalen Enzym-Kapazitäten der zentralen Stoffwechselwege in Leber- und Muskelgewebe dienen außerdem zur Aufklärung möglicher Anpassungsmechanismen und Limitierungen unter den verschiedenen Inkubationsbedingungen.

Die unter Hyperkapnie bei Optimumtemperatur (10°C) festgestellte Zunahme der Kiemengewebsmasse impliziert eine Remodellierung des Gewebes, die zur Abdeckung der Chloridzellen mittels Pflasterzellen führen kann, wie für andere Fische gezeigt wurde (Goss et al., 1998). Ein solcher Mechanismus bietet zudem einen Erklärungsansatz für die reduzierte *in vivo* Aktivität des Na⁺/H⁺-Austauschers unter der Voraussetzung, dass sich dieser Befund auf die apikale Isoform bezieht. Des Weiteren wurde unter Hyperkapnie (2.500 µatm) bei Optimumtemperatur eine Reduktion der *in vivo* Na⁺/K⁺-ATPase-Aktivität festgestellt, die im Gegensatz zur Induktion unter extremer Hyperkapnie (≥6.000 µatm) vorhergehender Studien steht. Während letztere für einen verstärkten Ionenregulations-

bedarf zur Kompensation des erhöhten PCO_2 spricht, deutet eine reduzierte Aktivität auf einen energetisch effizienteren Zustand hin. Die Hochregulation der Na^+/K^+ -ATPase scheint daher erst bei Überschreiten eines PCO_2 -Schwellenwerts einzusetzen.

In Kombination mit hoher Temperatur (18°C) kam es unter Hyperkapnie (2.200 μatm) zu einer starken *in vivo* Beteiligung der HCO_3^- - und Na^+/H^+ -Transporter, während in der Wärme eine generelle Steigerung des *in vivo* Netto-Sauerstoffverbrauchs und der *in vitro* Kapazität von Na^+/K^+ -ATPase beobachtet wurde. In Kombination der Faktoren scheint somit ein vermehrter H^+ -Export aus der Kiemenzelle, vermutlich durch parallel erhöhte Na^+/H^+ - und HCO_3^-/Cl^- -Austauscher sowie Na^+/HCO_3^- -Co-Transporter-Aktivität vorzuliegen, der zumindest teilweise durch die Na^+/K^+ -ATPase angetrieben wird. Innerhalb der jeweiligen Temperaturen lässt unter diesen Bedingungen der in der Summe unveränderte Gesamtsauerstoffverbrauch der Kieme auf eine höchst effektive Regulierung dieser Mechanismen schließen.

Die anteilige Ionenzusammensetzung des Plasmas war sowohl von erhöhtem PCO_2 als auch der Temperatur beeinflusst, was sich vor allem in reduzierten Na^+ - und Cl^- -Konzentrationen widerspiegelte. Während Cl^- -Ionen unter Hyperkapnie teilweise durch HCO_3^- zur Verbesserung der extrazellulären Pufferwirkung ausgetauscht wurden, könnte eine Überkompensation der Na^+/K^+ -ATPase die reduzierten Na^+ -Ionen in der Wärme erklären. Die bestehende Differenz zwischen den positiv und negativ geladenen Hauptosmolyten sowie deren Beitrag zur Osmolalität lässt auf eine Akkumulation organischer Osmolyte unter diesen Bedingungen schließen.

Im Basalmetabolismus des Gesamttiers war bei Optimumtemperatur eine leichte Abnahme mit steigendem PCO_2 zu verzeichnen, die sich im somatischen Wachstum und hepatosomatischen Index widerspiegelte. Für die Inkubationen bei 18°C wurde ein gegenläufiges Muster beobachtet. Während bei hoher Temperatur und niedrigem PCO_2 nur marginales Wachstum vorlag, führte Hyperkapnie zu einem verbesserten Wachstum, so dass die Versuchsgruppe bei 18°C und 2.200 μatm Kontrolltier-Niveau erreichte. Die wachstumsstimulierende Wirkung von Hyperkapnie in der Wärme könnte auf einer verbesserten Sauerstoffversorgung und damit erhöhten aeroben Kapazität des Gewebes beruhen. Diese Hypothese basiert auf einer vorherigen Studie, in der gezeigt werden konnte, dass eine durch Hyperkapnie induzierte Ansäuerung der Erythrozyten zu einer verstärkten Sauerstoffversorgung des roten Muskelgewebes führt (Rummer et al., 2013).

Im Einklang damit waren bei 18°C unter 2.200 μatm PCO_2 die Kapazitäten der aeroben Enzyme Citratsynthase (CS) und Cytochrom-c-Oxidase (COX) und auch der an der Oxidation freier Fettsäuren beteiligten 3-Hydroxyacyl CoA-Dehydrogenase (HADH) im weißen Muskel erhöht. Letztere scheint unter diesen Bedingungen eine wichtige Rolle für die Bereitstellung zusätzlicher Energie zu spielen, während der synchrone Anstieg der COX- und

CS-Kapazitäten auf eine erhöhte Mitochondrien-Volumendichte und erhöhte aerobe Kapazitäten schließen lässt.

Über die verschiedenen Versuchsbedingungen wurde eine synchrone Änderung der glykolytischen Enzyme Pyruvat-Kinase (PK) und Laktat-Dehydrogenase (LDH) beobachtet, was auf eine enge Kopplung der beiden für die anaerobe ATP-Synthese essentiellen Enzyme spricht. PK und vor allem LDH waren dabei unter hohem PCO_2 bei 10°C und in Tendenz auch bei 18°C reduziert. Dies deutet auf eine verminderte anaerobe Kapazität unter diesen Bedingungen hin.

Die hepatischen Stoffwechsellzyme zeigten hingegen eine überwiegend gleichgerichtete Reaktion auf die beiden Faktoren Wärme und Hyperkapnie. Für alle 18°C Tiere sowie die mittlere PCO_2 -Gruppe bei Optimumtemperatur wurden erhöhte Kapazitäten der Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase (PEPCK), HADH und COX bei gleichbleibender CS-Kapazität festgestellt. Eine in der Wärme einsetzende Restrukturierung der Energiereserven in Richtung Kohlenhydrate bzw. Glukoneogenese via PEPCK ist bereits für antarktische Fische beschrieben worden. Die Einlagerung schnell verfügbarer Kohlenhydratreserven bei drohender Hypoxämie könnte dabei als „Wärme-Abhärtung“ (warm-hardiness) dienen (Windisch et al., 2011). Dieser Mechanismus könnte somit taxaübergreifend ebenfalls bei *Gadus morhua* wirksam sein und darüber hinaus auch unter anderen Bedingungen wie Hyperkapnie von Bedeutung zu sein.

Die Oxidation freier Fettsäuren unter Hyperkapnie und in der Wärme scheint eine wichtige Rolle zu spielen und zumindest teilweise zur verstärkten ATP-Synthese beizutragen. Plasma-Ammoniumkonzentrationen und hepatische Glutamat-Dehydrogenase-Kapazitäten als Indikatoren des Protein-/Aminosäurestoffwechsels waren eng gekoppelt. Die parallele Reduktion der Parameter unter 10°C und mittlerem PCO_2 passt allerdings nicht in das Gesamtbild des Ganztierwachstums.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass *Gadus morhua* der Herausforderung von Ozeanversauerung ein breites Repertoire an Kompensationsmechanismen auf verschiedenen systemischen Ebenen entgegensetzt. Die beiden Klimafaktoren zeigen dabei zum Teil eine starke Interaktion, so dass sich die Effekte von PCO_2 mit der Temperatur teils deutlich ändern. Bei ausreichender Futter- und Sauerstoffverfügbarkeit bieten die gefundenen Mechanismen eine gute Basis zur Anpassung an die vorhergesagten PCO_2 -Konzentrationen, auch in Kombination mit der Wärme. Hohe Temperatur im Bereich des jetzigen Sommermaximums hat sich jedoch als limitierend bestätigt und wird vermutlich, vor allem bei gleichzeitig reduzierter Futterverfügbarkeit, negative Auswirkungen zeigen. Eine fortschreitende Ozeanerwärmung wird voraussichtlich die nördliche Migration von *Gadus morhua* aus seinem südlichen Verbreitungsgebiet weiter verstärken.

Summary

Ongoing climate change and the related ocean warming as well as ocean acidification caused by fossil fuel use represent a major challenge for marine organisms. According to the current state of knowledge marine fish are very efficient osmotic regulators, compensating for acid-base disturbances with fast response times. However, the details of the underlying compensation mechanisms remain to be explored, such as the long-term impact of hypercapnia on whole animal level. In contrast, effects of high temperature on the physiology of marine fishes are well-examined. In general, increasing temperature leads to elevated metabolic rates within the respective temperature tolerance range, whereas a disparity between oxygen demand and supply due to restrictions of the cardiovascular system is postulated for the warm edge of the thermal window. Further, temperature related impacts on the energy budget might interact with enhanced acid-base regulatory costs of the organism upon hypercapnia.

In the present study, effects on marine fish from ocean acidification and warming were exemplarily investigated in long-term incubation experiments on Atlantic cod (*Gadus morhua*). Thereby, elevated temperature and PCO_2 were applied each as single factor and in combination. Isolated perfused gill experiments were conducted to examine *in vivo* costs of the branchial energy budget and acid-base relevant ion transport in order to unravel respective mechanisms under PCO_2 levels predicted for the future (550, 1,200, 2,200-2,500 μatm) at optimum temperature (10°C) and in the warmth (18°C). In addition, potential effects on whole animal level such as standard metabolic rate, blood plasma parameters and somatic growth were investigated. Maximum enzyme capacities of central metabolic pathways in liver and muscle tissue were determined to explore potential further adaptation mechanisms and limitations under the various treatments.

Under hypercapnia and optimum temperature (10°C) an increase in branchial tissue mass implicated gill remodelling, which might originate from an increased apical surface area of pavement cells, reducing the area of exposed chloride cells as reported in earlier studies (Goss et al., 1998). Such a mechanism could explain the concomitantly reduced *in vivo* activity of the Na^+/H^+ -exchanger, in case, the observation refers to the apical isoform. Further, a reduction in Na^+/K^+ -ATPase (*in vivo*) was observed under hypercapnia (2,500 μatm) at optimum temperature, contrasting the induction under extreme hypercapnia, previously observed in former studies ($\geq 6000 \mu\text{atm } PCO_2$). While the latter implies enhanced ion regulation demand to compensate for hypercapnia, reduced activities indicate an energetically more efficient condition. In addition, a certain PCO_2 threshold for Na^+/K^+ -ATPase activities seems to exist before being upregulated.

Under hypercapnia (2,200 μatm) in combination with high temperature a strong response of HCO_3^- and Na^+/H^+ transporter was observed, while Na^+/K^+ -ATPase *in vivo* net O_2 -demand

and *in vitro* capacities were generally elevated in the warmth. Thus, enhanced H⁺-export out of the gills was probably supported by Na⁺/H⁺ transporter, HCO₃⁻/Cl⁻ exchanger and Na⁺/HCO₃⁻ co-transporter, at least partly driven by Na⁺/K⁺-ATPase. Stable total gill oxygen consumption rates over all PCO₂ treatments at both temperatures indicate an efficient regulation of branchial acid-base mechanisms.

Blood plasma ion composition was impacted by elevated PCO₂ and temperature, which was particularly reflected in reduced Na⁺ and Cl⁻ concentrations. Whereas under hypercapnia Cl⁻ ions were partly exchanged by HCO₃⁻, thereby enhancing the plasma buffer capacity, an overcompensation of Na⁺/K⁺-ATPase in the warmth might have led to reduced Na⁺ ions at 18°C. The identified disparity between the main cationic and anionic osmolytes suggests an additional accumulation of organic osmolytes under these conditions.

Standard metabolic rate of the whole animal decreased slightly with increasing PCO₂ at optimum temperature, similar to what was seen for somatic growth rates and hepatosomatic indices. The opposite pattern was observed at warm temperature: whereas growth rates were marginal under low PCO₂, they increased in parallel to elevated PCO₂ levels, leading to growth rates similar to control level for the 2,200 µatm PCO₂ treatment group. A growth stimulating effect of hypercapnia in the warmth may be explained by enhanced oxygen supply and thereby oxygen capacity of the tissue. This conclusion is based on previous findings, where a hypercapnia induced acidification of erythrocytes improved the oxygen provision of red muscle tissue (Rummer et al., 2013).

In accordance with these observations, enhanced enzyme capacities of the aerobic enzymes citrate synthase (CS) and cytochrome c oxidase (COX) as well as of 3-hydroxyacyl CoA-dehydrogenase, involved in the oxidation of free fatty acids, were observed in white muscle tissue under 2,200 µatm and 18°C. The latter seems to be important for the provision of additional energy under these conditions, while parallel elevation of COX and CS capacities indicates increased aerobic capacities via higher mitochondrial volume densities.

Synchronously altered enzyme capacities were also shown for the glycolytic enzymes lactate dehydrogenase (LDH) and pyruvate kinase (PK), emphasizing the close relationship between these two enzymes, being essential for anaerobic ATP-synthesis. Reduced PK and LDH capacities were observed under high PCO₂ and optimum temperature, and – to a smaller extent - for the respective 18°C treatment. These findings indicate a reduced anaerobic capacity under high PCO₂ independent of temperature.

In hepatic tissue a rather general pattern was observed for metabolic enzyme capacities in response to warming and hypercapnia. Animals of all 18°C groups as well as those of the medium PCO₂ group at 10°C showed increased capacities of phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK), HADH and COX at stable CS capacities. For Antarctic fish, a shifting of energy reserves towards carbohydrates respectively gluconeogenesis via PEPCK

in the warmth was reported before. The accumulation of easily accessible carbohydrate stores may support warm-hardiness and prepare for hypoxemic conditions (Windisch et al., 2011). Consequently, the similar pattern observed in the present study suggests that such a mechanism also occurs for temperate teleosts including *Gadus morhua*, furthermore being relevant under hypercapnic conditions.

The oxidation of free fatty acids seems to play an important role under hypercapnic conditions as well as in the warmth, contributing to enhanced ATP supply at least partly. Plasma ammonium concentrations and hepatic glutamate dehydrogenase (GDH) capacities as indicators for protein/amino acid metabolism were closely related, whereas the parallel reduction of both parameters under 10°C and medium PCO_2 does not reflect the observed pattern of whole animal somatic growth rates.

In conclusion, *Gadus morhua* possesses a wide range of compensational mechanisms on different systemic levels to cope with the challenge of ocean acidification. Both climate factors revealed a strong interacting potential as in many cases hypercapnia related effects were affected significantly at elevated temperature. Under the precondition of sufficient feed- and oxygen supply the established mechanisms represent effective options for acclimating to the predicted PCO_2 concentrations as well as to the combination of high PCO_2 and elevated temperature. However, high temperature in the range of maximum summer temperature has been confirmed as limiting factor and presumably will have negative impacts, especially in combination with reduced feed availability. Ongoing climate change is therefore expected to enforce the northward migration of *Gadus morhua* from its southernmost distribution.

1 Einleitung

1.1 Wirkung des Klimawandels auf die Ozeane

Der bisherige Forschungsstand belegt, dass durch den anthropogenen Treibhauseffekt das Klima nachhaltig beeinflusst wird. Dabei spielen vor allem zunehmende Emissionen von Kohlendioxid (CO_2) eine große Rolle. CO_2 wird bei der Verbrennung fossiler Energieträger, aber auch durch veränderte Landnutzung freigesetzt. Seit Beginn der Industrialisierung (ab 1750) hat sich die atmosphärische CO_2 -Konzentration von 278 μatm um 40% auf 390 μatm erhöht (Stand 2011). Zusammen mit anderen Treibhausgasen (z.B. Methan, Distickstoffoxid) sorgen CO_2 -Emissionen für eine Änderung der Relation von ein- und ausgehender Strahlung, welche bei positiver Strahlungsbilanz zu einer Erwärmung der Erdoberfläche führt. Die gegenwärtige positive Gesamtstrahlungsbilanz hat dabei eine globale Erwärmung von 0,85 °C über den Zeitraum von 1880 bis 2012 verursacht (Cubasch et al., 2013).

Die Ozeane als Wärme- und CO_2 -Senke absorbieren mehr als 90% der zusätzlichen Energie im Klimasystem und nehmen ungefähr ein Drittel des atmosphärischen Kohlendioxids auf (Cubasch et al., 2013; Feely, 2004). Dies hat im Mittel zu einer Erwärmung der Ozeane um 0,11°C pro Jahrzehnt von 1971 bis 2010 geführt (Abb. 1a) und hat im Fall des aufgenommenen Kohlendioxids weitreichende Folgen für die nachfolgend besprochene Karbonatchemie.

Das im Wasser gelöste CO_2 steht temperaturabhängig im Lösungsgleichgewicht mit gasförmigem CO_2 , wobei im Wasser ein Gleichgewicht für die Konzentrationen von CO_2 und Kohlensäure (H_2CO_3) besteht. Letztere dissoziiert zu Bikarbonat (HCO_3^-) und Protonen (H^+), wobei HCO_3^- pH-abhängig weiter zu Karbonat (CO_3^{2-}) und H^+ dissoziiert. Im Meerwasser liegt das heterogene Reaktionsgleichgewicht von CO_2 auf der ersten Dissoziationsstufe. Erst im stark basischen Bereich würde eine Verschiebung in Richtung Karbonat stattfinden. Der Anstieg des atmosphärischen Kohlendioxids führt über die Deprotonierung der Kohlensäure zu einer Absenkung des pH-Wertes, der sogenannten Ozeanversauerung. Dabei wird gleichzeitig die Konzentration von freiem CO_3^{2-} herabgesetzt.

Seit Beginn der Industrialisierung ist der pH im ozeanischen Oberflächenwasser um 0,1 pH-Einheiten gesunken, was einer H^+ -Ionenaktivitätssteigerung um den Faktor 1,26 entspricht (Feely et al., 2009; Orr et al., 2005). Nach aktuellen Prognosen wird bis zum Ende dieses Jahrhunderts verursacht durch einen $P\text{CO}_2$ von etwa 420 bis 940 μatm der pH voraussichtlich um weitere 0,13 (RCP Szenario 2,6) bis 0,42 Einheiten (RCP Szenario 8,5) sinken (Abb. 1b; Collins et al., 2013; Wittmann und Pörtner, 2013; Feely et al., 2010). Abhängig von den jeweiligen Szenarien wurde für das Jahr 2300 ein $P\text{CO}_2$ von bis zu 2.000 μatm vorausgesagt (Meinshauen et al., 2011; Feely et al., 2010).

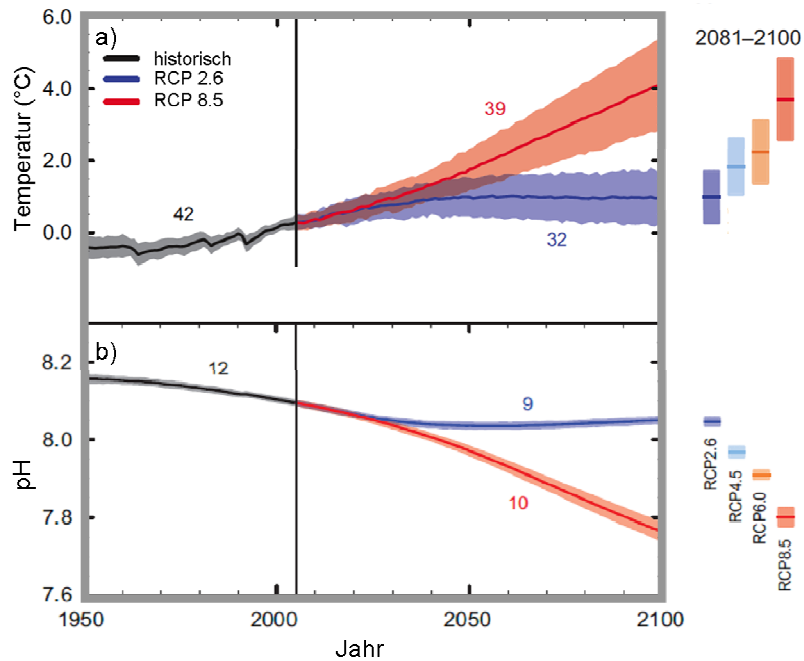


Abb. 1a und b: Mit einem Multi-Modell (CMIP5) simulierte Zeitreihen von 1950-2100 für (a) die globale Oberflächentemperatur des Ozeans sowie (b) dem global mittleren Oberflächen-pH des Ozeans. In schwarz ist die modellierte historische Evolution von Temperatur- und CO_2 -Schwankungen dargestellt, während in blau jeweils die Prognose für das (Minimal-) Szenario RCP 2.6 (RCP=Repräsentative Konzentrationspfade) und in rot die Prognose für das (Maximal-) Szenario RCP 8.5 dargestellt sind. Die jeweiligen Schattierungen kennzeichnen mögliche Abweichungen des Modells (modifiziert nach Stocker et al. 2013).

1.1.2 Auswirkungen des Klimawandels im Lebensraum Nordsee

Die oben beschriebenen Effekte der Ozeanversauerung und -erwärmung variieren regional in ihrem Ausmaß und wirken gleichzeitig mit den jeweiligen saisonalen Temperatur- und PCO_2 -Schwankungen zusammen. Die europäischen Schelfmeere erwärmen sich beispielsweise schneller als der globale Durchschnitt (Dulvy et al., 2008). In der Nordsee, einem Schelfmeer am Rand des Atlantischen Ozeans, wurde bereits eine Erwärmung der Winter-Meereshodentemperatur um $1,6^\circ\text{C}$ über einen Zeitraum von 25 Jahren festgestellt, wobei allein zwischen 1988 und 1989 eine Zunahme von 1°C gemessen wurde (Dulvy et al., 2008). Extreme Schwankungen zwischen saisonalen Minima und Maxima, die weitreichende Auswirkungen auf marine Artengemeinschaften haben könnten, sind somit auch zukünftig zu erwarten (Taboada and Anadon, 2012).

Saisonale Schwankungen werden auch im PCO_2 des Oberflächenwassers beobachtet und treten im Nordatlantik parallel zu den jahreszeitlichen Nährstoffschwankungen auf (Takahashi, 1993). Messwerte und Modelle des Oberflächen- PCO_2 für die südliche Nordsee beschreiben eine Übersättigung im Sommer und Herbst, während im Frühling aufgrund der Phytoplanktonblüte eine Untersättigung im Vergleich zum atmosphärischen PCO_2 -Gleichgewicht vorliegt (Gypens et al., 2011). Darüber hinaus variiert die CO_2 -Sättigung in küstennahen bzw. -fernen Bereichen mit dem Eintrag von Flüssen sowie horizontal in der Wassersäule aufgrund von Stratifizierung, aber auch durch bodennahe Strömungen (Artoli

et al., 2012). Es wird prognostiziert, dass die Nordsee den global vorhergesagten Durchschnitt überschreiten wird und bereits 2060 einen PCO_2 von 1.000 μatm erreichen könnte (Blackford and Gilbert, 2007). Dabei werden aufgrund der oben beschriebenen Effekte mit hoher Wahrscheinlichkeit noch höhere PCO_2 -Werte saisonal und regional differenziert auftreten.

Um die Auswirkungen der Ozeanversauerung auf biologische Prozesse und Biodiversität genauer zu untersuchen, wurde das nationale Verbundprojekt BIOACID (Biological Impacts of Ocean Acidification) mit Unterstützung des BMBF (Bundesministerium für Bildung und Forschung) ins Leben gerufen. Zusammen mit 14 deutschen Partnern widmet sich BIOACID in verschiedenen Teilprojekten dem Verständnis der Konsequenzen des Klimawandels für marine Ökosysteme und Organismen. Die hier vorliegende Arbeit ist Teil eines Projektes zur Untersuchung der Auswirkungen von Ozeanversauerung und der Interaktion mit Temperaturveränderungen auf Top-Prädatoren. Dabei werden Mechanismen, welche die Sensitivität und/oder die kompensatorische Kapazität dieser Organismen erklären können, betrachtet. Im Detail werden die physiologischen Anpassungsmechanismen von marinen Fischen aus den gemäßigten Breiten unter erhöhten PCO_2 - und Temperaturbedingungen untersucht. Dies erfolgt sowohl an isolierten Organen als auch am Ganztier.

1.2 Auswirkungen des Klimawandels auf marine Fische

1.2.1 Ozeanversauerung

Ozeanversauerung stellt eine Herausforderung für die meisten Organismen dar und wurde bisher überwiegend mit negativen Auswirkungen in Verbindung gebracht, wobei jedoch zwischen mehr und weniger toleranten Taxa unterschieden werden muss. Generell wird vermutet, dass mobile Taxa toleranter gegenüber Ozeanversauerung sind, wenn sie höhere metabolische Aktivität zeigen, den pH der Körperflüssigkeiten gut regulieren können sowie einen geringen Anteil an kalzifizierten Körperstrukturen aufweisen. Weniger aktive, sessile Arten mit stark ausgeprägtem Skelett und einer geringen pH-Regulationskapazität gelten als sensitiver (Kroeker et al., 2013; Wittmann und Pörtner, 2013; Melzner et al., 2009a). Letztere sind überwiegend Korallen, Echinodermen und Mollusken. Zu den toleranten Arten zählen Fische und Crustaceen. Darüber hinaus deckt sich diese Annahme mit Hinweisen aus den vergangenen Hoch- PCO_2 -Phasen im Paläozoikum (Pörtner, 2014; Wittmann und Pörtner, 2013), was vermuten lässt, dass Knochenfische gegenüber PCO_2 -Veränderungen robuster sind als andere Organismengruppen.

Innerhalb der Wasseratmer weisen Knochenfische die höchsten Blut- CO_2 -Konzentrationen mit etwa 2.000 bis 4.900 μatm auf (Melzner et al., 2009a; Larsen et al., 1997; Claireaux und Dutil, 1992). Dabei halten sie, wie die meisten ektothermen Organismen, ihren extrazellulären pH relativ konstant, indem sie ihre extrazelluläre HCO_3^-

Konzentration anpassen. Der HCO_3^- -Gehalt im Blut von Fischen liegt im Bereich von 5 - 10 mM und ermöglicht somit einen extrazellulären pH (pH_e) von 7,6 - 7,95. Im Gegensatz dazu weisen beispielsweise Echinodermen einen geringeren extrazellulären PCO_2 auf (etwa 1.000 - 2.000 μatm), begleitet von einem geringeren HCO_3^- -Gehalt und vergleichsweise niedrigen pH_e (Melzner et al., 2009a). In Folge einer Hyperkapnie wird somit ein Knochenfisch einen anteilig geringeren extrazellulären und damit auch intrazellulären PCO_2 -Anstieg kompensieren müssen als beispielsweise ein Vertreter der Echinodermen (Melzner et al., 2009a).

Unter hyperkapnischen Bedingungen führt erhöhter PCO_2 im Atemwasser zu einem CO_2 -Anstieg im Blut. Von da aus diffundiert CO_2 weiter in die Erythrozyten, wird mittels Carbonanhydrase hydratisiert und dissoziiert darauffolgend zu HCO_3^- und Protonen. Dabei wird HCO_3^- unter Austausch gegen Chlorid (Cl^-) ins Blutplasma transportiert (Evans et al., 1999). Kommt es durch die erhöhte CO_2 Aufnahme zu einer Absenkung des pH_e , spricht man von einer respiratorischen Azidose. Ähnliche Austauschprozesse von Säure-Base relevanten Ionen, wie zwischen intra- und extrazellulären Kompartimenten des Blutes, finden unter Hyperkapnie auch im Gewebe statt. Diese können wiederum zu einer intrazellulären Azidose führen (Heisler, 1986) (Absenkung des intrazellulären pH (pH_i)). Die pH_e -Kompensation in Folge von hyperkapnischen Bedingungen ($\geq 10.000 \mu\text{atm CO}_2$) erfolgt in der Regel innerhalb von wenigen Stunden bis Tagen (Ishimatsu, 2004; Larsen et al., 1997; Heisler et al., 1986; Toews et al., 1983), während die Kompensation des pH_i gewebeabhängig ist, generell aber schneller abläuft als die des extrazellulären Kompartiments (Larsen et al., 1997). Die natürliche Limitierung des Nettoaustauschs von HCO_3^- gegen Cl^- kann unter extremer Hyperkapnie ($>10.000 - 20.000 \mu\text{atm}$) zu unvollständiger pH-Kompensation und somit zum Tod, beispielsweise durch Herzversagen, führen (Brauner und Baker, 2009; Ishimatsu et al., 2004). Jedoch ist es angesichts der hohen Kapazität für pH-Homöostase unwahrscheinlich, dass adulte Knochenfische längerfristige intra- und/oder extrazelluläre Azidose als Folge von erhöhtem PCO_2 im Bereich zukunftsrealistischer Konzentrationen erfahren werden (Pörtner, 2011).

Die Auswirkungen von potentiell erhöhtem ATP-Bedarf der Säure-Base-Regulation und damit verbundene mögliche Verschiebungen im Energie-Budget sind hingegen schwierig abzuschätzen. Veränderte Ionenregulation als Reaktion auf hyperkapnische Bedingungen wurde bei marinen Fischen mehrfach nachgewiesen (Deigweiher et al., 2010; Melzner et al., 2009b; Deigweiher et al., 2008; Ishimatsu et al., 2005), und auch die konkreten Kosten dieser Transporter-Kandidaten sind teilweise untersucht (Pörtner et al., 2000). Die Gesamtbilanz der Ionenregulation innerhalb der Zelle oder eines Gewebes und damit die Auswirkungen auf das Ganztier sind jedoch nur schwer zu erfassen. Der Grundsauerstoffumsatz eines Tieres (definiert als in Ruhe befindlich, ungestresst und ohne

Verdauungsaktivität) beinhaltet als wesentliche Komponente neben den basalen Erhaltungskosten auch die der Ionen- und Säure-Base-Regulation. Eine Veränderung im Energie-Budget könnte die Kapazität des aeroben Stoffwechsels, definiert als Leistungsfenster zwischen Grund- und Maximalstoffwechsel, reduzieren und damit auf lange Sicht das Wachstum von Reproduktions- oder somatischem Gewebe einschränken (Pörtner und Peck, 2010; Pörtner und Farrell, 2008).

Mit wenigen Ausnahmen (z.B. Munday et al., 2009a) wurden keine signifikanten Effekte von erhöhtem PCO_2 auf den Grundstoffwechsel von Arten aus tropischen, antarktischen oder den gemäßigten Breiten beobachtet (Couturier et al., 2013; Nowicki et al., 2012; Melzner et al., 2009b; Deigweier et al., 2008; Ishimatsu et al., 2005). Die aerobe Leistungsfähigkeit betreffend existieren sehr unterschiedliche Ergebnisse: innerhalb tropischer Arten ($\sim 1.000 \mu\text{atm CO}_2$) wurden sowohl negative (Kardinalfische, Munday et al., 2009a) als auch positive Effekte (Riffbarsch, Couturier et al., 2013) gefunden, während die aerobe Leistungsfähigkeit im Atlantischen Kabeljau bei sehr viel höheren Konzentrationen (3.000 & $6.000 \mu\text{atm}$) nicht beeinträchtigt ist (Melzner et al., 2009b). Des Weiteren können Veränderungen in den Kapazitäten von Stoffwechsellzymen Hinweise auf die Verminderung des aeroben Stoffwechsels mit Verschiebung in Richtung anaerober Prozesse liefern. Dies wurde anhand von erhöhten Laktat-Dehydrogenase-Aktivitäten parallel zu reduzierter Citrat-Synthase - Aktivität im weißen Muskel und Herzmuskel bei einer Mittelmeerart (*Sparus aurata*) als Reaktion auf eine 10-tägige CO_2 -Inkubation (ca. $3.000 \mu\text{atm}$) vermutet (Michaelidis et al., 2007).

Wachstumsstudien zeigen ebenso abweichende Ergebnisse für verschiedene Fischarten bei unterschiedlichen CO_2 -Konzentrationen und geben damit keinen konkreten Hinweis auf einen generellen Effekt im Bezug auf diesen Langzeitparameter (Heuer und Grosell, 2014). Es wurde reduziertes Wachstum sowohl für Anemonenfische ($1032 \mu\text{atm CO}_2$, Miller et al., 2012) als auch konzentrationsabhängig für juvenilen Atlantischen Kabeljau beobachtet (1.000 , 3.800 , 8.500 , Moran und Støttrup, 2011). In Larven der norwegischen Kabeljau-Küsten-Population traten Gewebeschädigungen unter dem Einfluss von $3.200 \mu\text{atm CO}_2$ auf (Frommel et al., 2011), während für $PCO_2 < 2000 \mu\text{atm}$ bei vielen Arten kein Effekt auf das Wachstum festgestellt werden konnte [Dreistachliger Stichling (Jutfelt et al., 2013), Ostsee-Kabeljau (Frommel et al., 2012), Atlantischer Hering (Franke und Clemmesen, 2012), Riffbarsch (Munday et al., 2011), Königsfisch (Bignami et al., 2013)]. Dagegen wurde ein durch Hyperkapnie positiv beeinflusstes Wachstum in Larven von Clown-, Anemonenfischen (Miller et al., 2012; Munday et al., 2009b) und Wolfsbarsch (Pope et al., 2014) gefunden. Darüber hinaus wurde in einer weiteren Studie auch ein positiver Einfluss auf die Reproduktionsleistung bei Anemonenfischen unter 584 und $1032 \mu\text{atm CO}_2$ festgestellt (Miller et al., 2013).

Zur Erklärung positiver Effekte von CO₂ auf das Wachstum wurden stimulierter Appetit und eine damit erhöhte Nährstoffaufnahme, aber auch Veränderungen des Geschmacksinns vermutet (Munday et al., 2009b; Lemarie et al., 2000). Zugrundeliegende Mechanismen sind jedoch bisher unbekannt. Einen ersten Hinweis bieten aktuelle Ergebnisse am Beispiel der Regenbogenforelle, die einen verstärkten Root-Effekt unter erhöhtem PCO₂ und damit eine erhöhte O₂-Abgabe des Hämoglobins an das Gewebe (roter Muskel) beschreiben (Rummer et al., 2013).

Nachdem Arbeiten an tropischen Arten Interaktionen von Säure-Base-regulatorischen Prozessen mit der Funktion von Hirn-Neurotransmittern vermuten ließen (Munday et al., 2012; Nilsson et al., 2012; Munday et al., 2009c), beschäftigen sich viele aktuelle Studien mit der neuronalen und verhaltenssensitiven Reaktion von Fischen auf nur gering erhöhte CO₂-Konzentrationen (<2.000 µatm). Dabei wurden veränderte Sinneswahrnehmungen für das Riech-, Hör-, und Sehvermögen sowie das Lateralisierungs- und Lernverhalten festgestellt (Simpson et al., 2011; Domenici et al., 2012; Ferrari et al., 2012a&b). Solche Einschränkungen können weitreichende Auswirkungen auf die Habitatauswahl, Feindvermeidung und individuelle Fitness und somit auch auf die Populationsdynamik dieser Arten haben (Munday et al., 2012). Fischarten aus gemäßigten Breiten zeigten bisher keine olfaktorischen Beeinträchtigungen (Atlantischer Kabeljau, Jutfelt und Hedgärde, 2013), jedoch wurde eine veränderte visuelle Wahrnehmung bei Schwimmgrundellarven festgestellt (Phototaxis, Forsgren et al., 2013). Zusammenfassend lässt sich sagen, dass es keine übergreifenden Muster in Hinblick auf CO₂-Konzentrationen, Lebensstadien oder Klimazonen gibt, und es deshalb von großer Bedeutung ist, alle Bereiche abzudecken. Aktuell sollte vor allem die Priorität auf zukunftsrelevante CO₂-Konzentrationen sowie Lebenszyklus-abhängig auf relevante Inkubationszeiträume gelegt werden, wobei weitere Faktoren, die in Kombination mit Ozeanversauerung (z.B. Ozeanerwärmung) auftreten, ebenfalls berücksichtigt werden müssen.

1.2.2 Ozeanerwärmung

Der abiotische Faktor Temperatur ist grundlegend für die Ökologie und Physiologie von Fischen und anderen marinen Organismen. Die Wassertemperatur beeinflusst maßgeblich sowohl molekulare Prozesse (Diffusion, Löslichkeit und Fluidität) als auch biochemische Reaktionsraten und nimmt somit direkten Einfluss auf die Geschwindigkeit des Metabolismus (Pörtner, 2008; Neill et al., 1994). Generell lässt sich sagen, dass für marine ektotherme Organismen eine positive Relation zwischen Grundsauerstoffverbrauch und Temperatur besteht (Clarke und Fraser, 2004). Arten, die unterhalb ihres Temperatur-Optimumbereichs leben, könnten bei geringer Erwärmung sogar eine Steigerung ihres Wachstums (z.B. die antarktische Aalmutter; Brodte et al., 2006) oder der Reproduktionsleistung (Bray, 1971)

erfahren. Jedoch ist das thermische Toleranzfenster einer individuellen Art begrenzt, da mit steigender Temperatur Q_{10} -bedingt der Sauerstoffbedarf wächst, während gleichzeitig die Sauerstofflöslichkeit abnimmt und bei Temperaturerhöhung zu hypoxämischen Bedingungen in den Körperflüssigkeiten und funktionellen Limitierungen führen kann (McBryan et al., 2013; Pörtner et al., 2010; Pörtner, 2008; Fry and Heart, 1948).

Diese Limitierung der aeroben Leistungsfähigkeit eines Organismus durch unzureichende Sauerstoffversorgung (an beiden Enden des Temperaturfensters) wird durch das Konzept der Sauerstoff- und Kapazitäts-limitierten Temperaturtoleranz (oxygen and capacity limited thermal tolerance: OCLTT; Pörtner, 2010) beschrieben. Als ganzheitliches Konzept integriert es dabei die thermische Toleranz des Gesamt-Organismus mit Vorgängen auf der Gewebe-Ebene und den zugrunde liegenden biochemischen und genomischen Mechanismen. Diese bestimmen die aerobe Leistung von Zellen und Geweben und somit auch die Kapazität von Ventilations- und Zirkulationsorganen für die Bereitstellung von Sauerstoff zur Deckung von physiologischen Kosten oberhalb des Grundumsatzes (Pörtner, 2010). Der Übergang zu sogenannten Pejus-Temperaturen (T_p , pejus = schlechter werdend) beschreibt den Bereich, in dem das Überleben noch gesichert, jedoch mit zunehmenden Limitierungen von Aktivität, Reproduktionsleistung und Wachstum verbunden ist (Pörtner, 2012; Pörtner, 2010; Pörtner, 2001). Ober- bzw. unterhalb der Pejus-Bereiche wird bei einer Diskrepanz zwischen dem steigenden, vorwiegend mitochondrialen Sauerstoffbedarf und der Sauerstoffbereitstellung der Energiebedarf zunehmend durch anaeroben Stoffwechsel gedeckt, was als Erreichen der kritischen Temperatur (T_c) gekennzeichnet wird. Zudem setzen Schutz- und Reparatur-mechanismen wie beispielsweise die Exprimierung von Hitzeschockproteinen ein, um die zeitlich limitierte Temperaturtoleranz auszudehnen, bevor der thermale Stress zur Denaturierung und dem Verlust struktureller Integrität auf molekularer Ebene (T_d) und damit zum Tod führen kann (Pörtner, 2012; Pörtner, 2010; Pörtner, 2001).

Als Folge einer Temperaturveränderung im natürlichen Habitat haben Fische einerseits die Möglichkeit, in ein besser geeignetes Habitat abzuwandern oder, falls die Kapazität vorhanden ist, sich biochemisch durch molekulare Restrukturierung anzupassen. Verschiedene Anpassungsmechanismen, z.B. die Proliferation von Mitochondrien unter Zunahme der mitochondrialen Volumendichte (Guderley und St. Pierre, 2002), können dabei helfen. Die der enzymatischen Temperaturakklimatisation zu Grunde liegenden biochemischen Mechanismen beinhalten meist Restrukturierungsprozesse, die quantitative Konzentrationsänderungen bereits vorhandener Molekülvarianten sowie qualitative Veränderungen der Molekülvarianten (z.B. Isozyme) umfassen (Hochachka und Somero, 1971). Spezielle warm-, bzw. kalt- adaptierte Isozyme der Laktat-Dehydrogenase aus Lachs (*Salmo salar*) (Somero und Hochachka, 1969) und der cytosolischen Malat-Dehydrogenase

aus der Grundel (*Sphyaena sp.*) (Lin und Somero, 1995) konnten in entsprechenden Akklimationsexperimenten nachgewiesen werden. Des Weiteren scheinen solche Differenzen auch auf Populationsebene zu bestehen, wie die unterschiedlichen Expressionsmuster von aeroben Enzymen zwischen verschiedenen Kabeljau-Populationen (Barentssee- und Nordseepopulation, Lucassen et al., 2006) vermuten lassen. Manche antarktische Arten zeigen als Reaktion auf Warmakklimatisation eine reduzierte Plasma-Osmolarität, während die Aktivität der Na^+/K^+ -ATPase ansteigt (Brauer et al., 2005; Gonzalez-Cabrera et al., 1995). Diese Reduktion des Osmolaritäts-Gradienten zum Meerwasser in der Kälte dient möglicherweise der Verringerung des entsprechenden Energieaufwands für die Ionenregulation. Dieser liegt vermutlich eine Veränderung des Verhältnisses von verschiedenen Na^+/K^+ -ATPase-Untereinheiten ($\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$) zu Grunde (Morrison et al., 2006). Sofern solche Restrukturierungsmechanismen auf molekularer und Zellebene nicht ausreichen, um Temperaturveränderungen zu kompensieren, kann dies zu Einbußen auf höherer Ebene, z.B. im Wachstum (antarktische Aalmutter, Windisch et al., 2014) oder der Reproduktionsleistung (Atlantischer Lachs, Pankhurst und King, 2000) führen.

1.3 Die marine Fischkieme und ihre Rolle in der Ionenregulation

Die Kiemen der Knochenfische bestehen aus je vier Knorpelbögen, welche das Kiemengewebe, die Filamente, stabilisieren. Zur weiteren Oberflächenvergrößerung tragen die Filamente fein verzweigte Ausstülpungen, die Kiemenlamellen. Diese sind gleichmäßig über die Länge eines Filaments verteilt, wobei die entstehenden Lamellen-Zwischenräume Durchflusskanäle für das Atemwasser bilden. Im Kiemenbogen wie auch in den Filamenten verlaufen afferente Arterien, die sauerstoffarmes, und efferente Arterien, die sauerstoffreiches Blut transportieren. In den aus zwei Epithelien aufgebauten Lamellen fließt das Blut frei zwischen sogenannten Stützzellen, welche die Epithelien auseinander halten.

Filament und Lamellen sind vom Kiemenepithel umschlossen, welches einerseits die Barriere zwischen der extrazellulären Körperflüssigkeit des Fisches und dem Meerwasser bildet, andererseits aber auch dem Gas- und Ionenaustausch zwischen Blut und Meerwasser dient. Das Kiemenepithel besteht hauptsächlich aus Pflasterzellen (>90%) sowie mitochondrienreichen Chloridzellen (<10%) und zu geringeren Anteilen aus Begleit- und Schleimzellen. Die Lamellen sind weitgehend mit Pflasterzellen bedeckt. Ihnen wird eine Rolle beim Gasaustausch zugeschrieben, während die Chloridzellen mit der Osmoregulation in Zusammenhang gebracht werden und vorwiegend im Interlamellarraum (zwischen den Lamellen) sowie am unteren Ende der Filamente lokalisiert sind (Evans et al., 2005). Chloridzellen sind durch Einstülpungen der basolateralen Membran charakterisiert, die einem komplexen Röhrensystem gleichen und sich über einen Großteil des Cytosols

erstrecken, wo sie eng mit Mitochondrien assoziiert sind. Typischerweise bilden Chloridzellen apikale Einbuchtungen (Krypten), die unterhalb der Oberfläche der umgebenden Pflasterzellen verlaufen und an weitere Chloridzellen sowie Begleitzellen angrenzen. Auf diese Weise entstehen Multizellkomplexe (Evans et al., 2009).

Basolateral sind hohe Konzentrationen der Na^+/K^+ -ATPase, assoziiert mit dem $\text{Na}^+/\text{2Cl}^-/\text{K}^+$ -Cotransporter, lokalisiert (siehe auch Abb. 8, Publikation II). Durch den ATP-getriebenen gegenläufigen Transport von drei Na^+ (in das Blut) und zwei K^+ (in die Kiemenepithelzelle) über die Zellmembran entsteht ein starker elektrochemischer Gradient, welcher die Aufnahme von NaCl aus dem Blut über den $\text{Na}^+/\text{2Cl}^-/\text{K}^+$ -Cotransporter begünstigt (Evans et al., 1999). K^+ -Ionen diffundieren durch apikale und basolaterale Kaliumkanäle ins Meerwasser bzw. wieder zurück in das Blut (Claiborne et al., 2002). Während Na^+ und K^+ somit einen Kreislauf über die Zellmembran durchlaufen, akkumuliert intrazelluläres Cl^- bis es seinem Konzentrationsgradienten entsprechend über apikale Cl^- -Kanäle in das umliegende Meerwasser strömt. Das so erzeugte Ruhepotential mit positiv geladener basolateraler und negativ geladener apikaler Membranseite schafft einen elektrochemischen Na^+ -Gradienten, der Na^+ parazellulär über Kanäle zwischen Chlorid- und Begleitzelle aus dem Blut ins Meerwasser fördert (Evans et al., 2005). Des Weiteren wird Ca^{2+} durch apikale Ca^{2+} -Kanäle in der Chloridzelle aufgenommen und über eine Ca^{2+} -ATPase aktiv ins Blut transportiert.

Die Lokalisierung weiterer für die Kieme identifizierter Ionenporter wurde meist nur anhand weniger Arten untersucht. Es wird jedoch davon ausgegangen, dass apikale Na^+/H^+ -Austauscher (NHE3 und wahrscheinlich NHE2) bei marinen Knochenfischen ebenfalls in den Chloridzellen lokalisiert sind (Claiborne et al., 2002; (*Myoxocephalus octodecemspinosus*) Catches et al., 2006) sowie ein basolateraler $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ -Cotransporter (NBC1) (Heuer und Grosell, 2014). Die Chloridzellen-Lokalisation von Anionen-Austauschern ($\text{HCO}_3^-/\text{Cl}^-$ -Austauscher) konnte bisher nur in Süßwasserfischen nachgewiesen werden (Killifisch, Zadunaisky et al., 1995; Zebrafisch, Lee et al., 2011). Unabhängig von ihrer Zell-Zuordnung sind darüber hinaus noch weitere apikale $\text{HCO}_3^-/\text{Cl}^-$ Transporter (AE6, A3, A4, A6, Tseng et al., 2013; Esbaugh et al., 2012; Piermarini et al., 2002) sowie ein zusätzlicher apikaler Na^+/H^+ -Austauscher (NHE3) bekannt. Auf der basolateralen Membranseite von Kiemenepithelzellen wird außerdem die H^+ -ATPase vermutet, was sich jedoch bisher nur auf den Nachweis in einer marinen Knochenfischart (*Myoxocephalus octodecemspinosus*, Catches et al., 2006) stützt.

Neben osmoregulatorischen Aufgaben dienen diese Transporter auch der Säure-Base-Regulation, z.B. unter hyperkapnischen Bedingungen (Evans et al., 1999). Ein potentieller Regulationsmechanismus während einer respiratorischen Azidose unter erhöhtem CO_2 könnte folgende Schritte aufweisen:

Überschüssiges CO_2 diffundiert in die Chlorid-Zellen und wird umgehend von der cytosolischen Carbon-Anhydrase hydratisiert und dissoziiert weiter in H^+ und HCO_3^- Ionen. Um der zellulären Ansäuerung entgegenzuwirken, werden Protonen mittels Na^+/H^+ -Austauscher aus der Kieme heraustransportiert, während HCO_3^- ins Plasma abgegeben wird ($\text{HCO}_3^-/\text{Cl}^-$ oder $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ Transporter). Zur Aufrechterhaltung der Elektroneutralität im Plasma wird typischerweise Cl^- , vermutlich über apikale Cl^- -Kanäle, nach außen abgegeben (Heuer und Grosell, 2014; Melzner et al., 2009a; Deigweiher et al., 2008; Perry und Gilmour, 2006). Die Regulation könnte jedoch auch sehr viel komplexer ablaufen und eine größere Anzahl von Transportern und Kanälen des Kiemenepithels umfassen (Melzner et al., 2009a).

In den bisherigen Hyperkapnie-Studien wurde häufig der Fokus auf die Kapazität der Na^+/K^+ -ATPase gelegt, da diese den Hauptenergieverbraucher der Ionen-Austauschprozesse in der Kieme darstellt und als Indikator für die allgemeine Ionen- und Säure-Base Regulation gilt. Dabei wurden unter CO_2 -Konzentrationen von $>6.000 \mu\text{atm}$ erhöhte RNA-Expression, Proteinabundanz, maximale *in vitro* Enzymaktivität, aber auch *in vivo* Kapazität der Na^+/K^+ -ATPase sowohl nach kurzzeitiger ($\leq 72 \text{ h}$: Hayashi et al. 2013; Deigweiher et al., 2010) als auch langzeitiger Hyperkapnie festgestellt (42 Tage- 1 Jahr: Deigweiher et al., 2008; Melzner et al., 2009b). Diese könnte zusätzlichen Bedarf der Kieme an NaCl -Exkretion in Folge einer erhöhten Na^+ - und Cl^- -Aufnahme im Verdauungstrakt oder eines potentiell erhöhten Bedarfs an Na^+/H^+ -, $\text{HCO}_3^-/\text{Cl}^-$ - und $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ -Transport für die Säure-Base-Regulation decken (Heuer und Grosell, 2014). Andere Studien stellten eine Reduktion der Na^+/K^+ -ATPase unter Hyperkapnie fest, so wie am Beispiel vom Krötenfisch ($1.900 \mu\text{atm}$, 24 h) (Esbaugh et al., 2012) und Junglachsen ($20.000 \mu\text{atm}$, 4 Tage) (Seidelin et al., 2001) gefunden. Wie auch bei den oben beschriebenen Beobachtungen unter erhöhtem PCO_2 ist es bislang auch im Falle der Na^+/K^+ -ATPase unklar, ob diese Befunde artspezifisch, konzentrationsabhängig oder aber durch den Inkubationszeitraum begründet sind.

Abgesehen von spezifisch veränderten Transporterkinetiken oder deren Abundanzen, kann die Chloridzelle in ihrer Anzahl und Morphologie und damit auch ihrer Ionenregulatorischen Funktion anpassen werden, wenn schwierige Umweltbedingungen wie beispielsweise veränderte Salinität oder der Kontakt zu toxischen Substanzen vorherrschen (akut und Langzeit bis 35 Tage: Devaraj et al., 2014; Kaneko et al., 2008; Avella et al. 1993; Pratap und Wendelaar Bonga, 1993). Ein solches Anpassungsverhalten könnte auch unter Hyperkapnie zum Tragen kommen. Eine andere Form von Remodellierung des Kiemengewebes wurde bei Pflasterzellen gefunden, die dafür bekannt sind, unter verschiedenen Umwelteinflüssen auf- oder abgebaut zu werden, um mehr oder weniger Respirationsfläche und entsprechende Transporter zu bilden (Nilsson, 2007). So wurde unter hyperkapnischen Bedingungen die Abdeckung der Chloridzellen, und damit der apikal

liegenden Transporter, durch Pflasterzellen beobachtet (Goss et al., 1998). Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Kieme ein für die Osmo- und Ionenregulation der Knochenfische entscheidendes und im hohen Maße anpassungsfähiges Organ darstellt. Zusätzliche Studien werden benötigt, um die Anpassungsmechanismen mariner Fische für Szenarien der Ozeanversauerung und des Temperaturanstiegs, wie auch für kombinierte Szenarien, weiter zu beschreiben und um deren metabolische Kosten abzuschätzen.

1.4 Der Versuchsorganismus *Gadus morhua*

Der Atlantische Kabeljau (*Gadus morhua*) (Abb. 2) ist seit mehr als 500 Jahren eine der wichtigsten kommerziell genutzten Fischarten des Nordatlantiks (Hutchings und Reynolds, 2004).

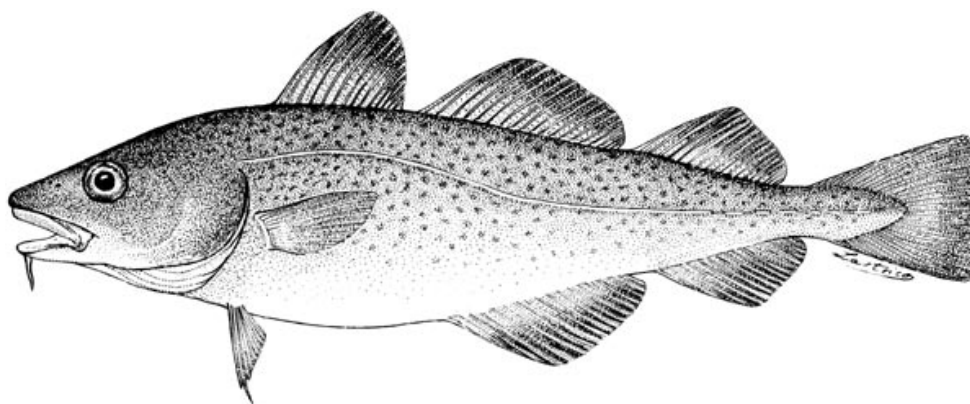


Abb. 2: Lateralansicht eines Atlantischen Kabeljaus, *Gadus morhua* (Linnaeus 1758) (www.fao.org).

Er kommt im Nordostatlantik von der Biskaya bis zum Arktischen Meer, einschließlich Nord- und Ostsee, sowie der Barentssee und um Island vor, aber auch entlang der Ost- und Nordküste Nordamerikas und vor den grönländischen Küsten (Drinkwater, 2005; Planque und Fredou, 1999). Dabei werden mehrere Populationen unterschieden (Abb. 3). Die Bestände sind vor allem aufgrund intensiver Fischerei drastisch in den späten 1980er und frühen 1990er Jahren eingebrochen. Im Vergleich zu den frühen 1960ern sind über die Hälfte aller Kabeljau-Populationen um mehr als 80% zurückgegangen, manche sogar um bis zu 99,9% (Nordamerika) (Hutchings und Reynolds, 2004). Gleichzeitig wird vermutet, dass der Klimawandel zumindest als zusätzlicher Faktor zu der heutigen Einstufung als „gefährdete Fischart“ (IUCN, Rote Liste) beigetragen hat (Righton et al., 2010; Planque und Fredou, 1999). Unter anderem aufgrund des Bestandseinbruchs sowie des kommerziellen Interesses wurde der Kabeljau so intensiv untersucht wie kaum eine andere Fischart (Brander, 1997).

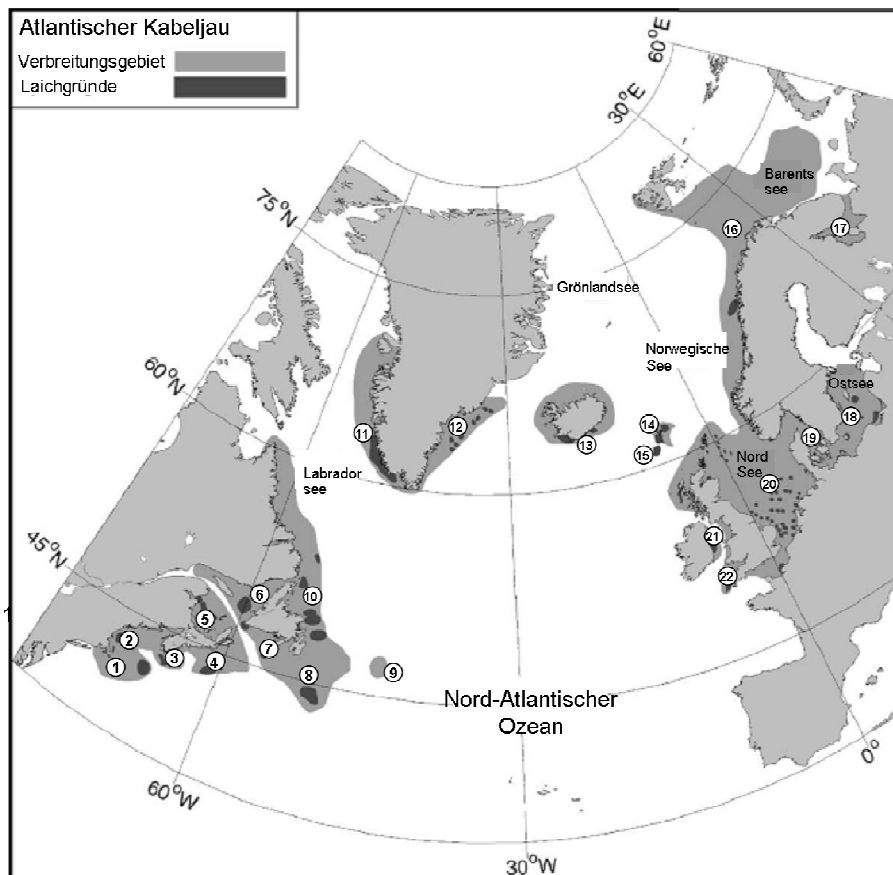


Abb. 3: Geographische Verbreitung, sowie Laichgründe des Atlantischen Kabeljaus mit Unterteilung in die verschiedenen Populationen: 1=Georges Bank; 2=Golf von Maine, 3=westliches Schottland Schelf, 4=östliches Schottland Schelf, 5=südlicher St.-Lorenz-Golf, 6=nördlicher St.-Lorenz-Golf, 7=Süd-Neufundland, 8=Grand Bank, 9=Flemish Cap, 10=nördliches Neufundland/südliches Labrador, 11=West-Grönland, 12=Ost-Grönland, 13= Island, 14=Faroe Plateau, 15=Faroe Bank, 16=Nordost-Arktis, 17=Weißes Meer, 18=Ostsee, 19=Kattegat, 20=Nordsee-West-Schottland, 21=Irische See, 22=Keltische See. (modifiziert nach Drinkwater et al. 2005).

Anhand von Daten elektronischer Markierungen weiß man, dass der Atlantische Kabeljau in einem maximalen Temperaturbereich von -1.5°C bis zu ca. 19°C vorkommt, während die Durchschnittstemperatur für die Nordsee-Populationen bei ca. 10°C liegen und die genannten Extreme nur selten auftreten (Righton et al., 2010). Die sehr niedrigen Temperaturen betreffen hauptsächlich nördlichere Populationen (Island, Barentssee), während die Maximaltemperaturen vor allem in der südlichen Nordsee auftreten und damit die dortige Population betreffen (Abb. 3).

Abgesehen vom jahreszeitlichen Temperaturgradienten ist der Kabeljau auch starken tageszeitlichen Schwankungen ausgesetzt, wobei nachweislich im natürlichen Lebensraum Differenzen von bis zu 13°C toleriert werden (Righton et al., 2010). Das thermische Wachstumsoptimum ist negativ mit zunehmendem Alter bzw. der Größe korreliert (Brander, 2003; Jobling, 1988) und liegt zwischen $6,1^{\circ}\text{C}$ (5 kg Tiere) und $17,6^{\circ}\text{C}$ (2 g Tiere) (Björnsson und Steinarsson, 2002). Eine mögliche Voraussetzung für diese breite Temperaturtoleranz verschiedener Populationen könnte unter anderem im Polymorphismus der Hämoglobin-Genotypen liegen, die abhängig von der Akklimationstemperatur mehr anodische (wärmere

Temperatur) oder kathodische (kältere Temperatur) Hämoglobin-Komponenten enthalten (Brix et al., 2004; Nielsen et al., 2003). Trotz dieser Toleranz beeinflusst eine veränderte Lebensraumtemperatur viele Prozesse, die negative Folgen bewirken können. Mit steigender Temperatur setzt die Geschlechtsreife früher ein (Drinkwater et al., 2005), und die Entwicklung der Eier ist beschleunigt (Page and Frank, 1989), jedoch weisen Eier und Larven eine geringere Größe (Miller et al., 1995) und die Jungfische später einen geringeren Rekrutierungserfolg auf (Clark et al., 2003).

Akute Erwärmungsexperimente an kanülierten Fischen zeigten einen deutlichen Abfall in venösem PO_2 sowie einsetzende Herzrhythmusstörungen bei über $16^\circ C$ (Lannig et al., 2004). Am warmen Ende des Temperaturtoleranzfensters wurde außerdem ein vermindertes Wachstum im Zusammenhang mit reduzierter Nahrungsaufnahme beobachtet (McKenzie, 1934, 1938), während in natürlichem Habitat die Tiere versuchen, solchen Extremen auf Dauer auszuweichen. Dabei zeigten vor allem Populationen an der südlichen Verbreitungsgrenze nordwärts gerichtete Migrationen als Reaktion auf Langzeiterwärmung des Wassers (Perry et al., 2005; Johannessen et al., 2004). Ozeanversauerung als weiterer Klimafaktor ergab bisher weniger klare Effekte im Bezug auf die Physiologie und Ökologie des Atlantischen Kabeljaus (siehe Abschnitt 1.2.1). Abgesehen von direkten Auswirkungen können auch Veränderungen auf der Ökosystemebene, wie beispielsweise eine veränderte Artzusammensetzung aufgrund von Verschiebungen in der Nährstoffverfügbarkeit und Primärproduktion, weitreichende Folgen für Fisch-Populationen haben (Fabry et al., 2008). Hinzu kommen interaktive Effekte zwischen der veränderten Meerwasser- CO_2 -Chemie und Faktoren wie Temperatur, Hypoxie oder Eutrophierung, die schwer vorhersehbare und möglicherweise kumulative Effekte verursachen könnten.

1.5 Konzept und Fragestellung

Angesichts der prognostizierten Veränderungen von CO_2 -Gehalt und Temperatur im Ozean (Collins et al., 2013; Wittmann und Pörtner, 2013; Meinshausen et al., 2011; Feely et al., 2009) soll diese Arbeit im Rahmen des Großforschungsprojektes BIOACID zur weiteren Klärung von Auswirkungen zukunftsrelevanter Änderungen dieser beiden Faktoren auf marine Fische beitragen.

Bisherige Studien wurden meist über kurze Zeiträume (wenige Tage bis 2 Wochen) oder unter hohen CO_2 -Konzentrationen sowie mit Hinblick auf nur einen der beiden Faktoren durchgeführt. Eine Einschätzung mit ökologischer Relevanz lässt sich daraus nur schwer ableiten, da gerade Folgen auf der Ganztierebene oft erst nach längerfristigen Zeiträumen sichtbar werden. Darüber hinaus gelten Organismen an der Grenze ihres Temperaturtoleranzfensters als besonders empfindlich (Pörtner, 2012). In der vorliegenden Arbeit wurden daher die Versuchsorganismen verschiedenen CO_2 -Konzentrationen über

einen mittleren Inkubationszeitraum (4-10 Wochen) sowie in Kombination mit einer Temperatur am warmen Ende ihres Toleranzfensters ausgesetzt. Dafür wurde der Atlantische Kabeljau (*Gadus morhua*) stellvertretend für andere marine Knochenfische aus den gemäßigten Breiten ausgewählt.

Wie bereits beschrieben (siehe 1.3), stellt die Ionenregulatorische Funktion der Kieme einen wichtigen Schlüsselmechanismus bei der Kompensation von Säure-Base-Störungen dar (Evans et al., 2005). Letztere ist jedoch unter dem Einfluss veränderter Klimafaktoren noch nicht ausreichend untersucht (Melzner et al., 2009a). Bestehende Studien konzentrierten sich meist auf *in vitro* Parameter, wie enzymatische Messungen und Genexpressions-Muster der entsprechenden Ionen-Transporter, was Interpretationen auf das Energiebudget des Gewebes und des Ganztiers stark einschränkt. Des Weiteren können Anpassungen auf biochemischer Ebene erheblich zur Kompensation von Umweltstörungen beitragen. Solche Anpassungen sind ebenfalls im Bezug auf die Ozeanversauerung kaum untersucht.

In der vorliegenden, funktionalen Studie wurden daher Ionenregulationsmechanismen der Kieme betrachtet, die für das Säure-Base-Gleichgewicht und dessen Wiederherstellung unter Hyperkapnie in Frage kommen. Dieser *in vivo* Ansatz wurde mit Hilfe eines isolierten Kiemenmodells unter dem Einsatz von Ionen-transporter-spezifischen Inhibitoren realisiert. Parallel dazu wurden *in vitro* Messungen von relevanten Enzymen im Kiemengewebe durchgeführt. Zum weiteren Verständnis der Auswirkungen kompensatorischer Mechanismen auf die metabolische und funktionale Leistungsfähigkeit von anderen Geweben und auf das Ganztier, wurden die Kapazitäten zentraler Stoffwechsellenzyme in weißem Muskel- und in Lebergewebe, wie auch metabolische Raten und das Wachstum des Ganztiers sowie entsprechende Konditionsparameter bestimmt.

Die konkreten Fragestellungen waren dabei folgende:

1. Welche ionenregulatorischen Mechanismen tragen unter den gewählten CO_2 -Konzentrationen und an der warmen Grenze des Temperaturfensters zur Säure-Base Kompensation bei, und wie wirken sich diese auf das Energiebudget der Kieme sowie des Ganztiers aus?
2. Wie wirken sich erhöhter PCO_2 und/oder erhöhte Temperatur auf die zentralen Energiestoffwechselwege aus, und wie sind diese Prozesse mit der Fitness des Ganztiers verknüpft?
3. Welche Konsequenzen lassen sich aus diesen Ergebnissen für den Atlantischen Kabeljau, aber auch für vergleichbare Arten aus den gemäßigten Breiten ableiten?

2 Material und Methoden

Im folgenden Abschnitt werden die Methoden der vorliegenden Arbeit zusammenfassend dargestellt, weitere Details können den Publikationen (Abschnitt 3) entnommen werden.

2.1 Versuchstiere

Juvenile Kabeljau dieser Studie stammten aus zwei verschiedenen Regionen, jedoch ist eine klare Populationszuordnung aufgrund fehlender Informationen zur genetischen Struktur nicht möglich. Für das erste Inkubationsexperiment wurden im Sommer 2011 Tiere beider Geschlechts in der Deutschen Bucht nahe Helgoland (südliche Nordsee) mit einem Schleppnetz (Dorschsack) gefangen und mit dem Forschungsschiff „Uthörn“ zum Alfred-Wegener-Institut in Bremerhaven transportiert. Fische (beider Geschlechts) aus dem Kattegat/Skagerrak wurden für das zweite Inkubationsexperiment im Februar/März 2012 mittels Reusen im Gullmarsfjord (Schweden) gefangen und vom Fischer direkt zum Sven Lovén Institut in Kristineberg, Schweden gebracht. Tiere beider Experimente wurden vor Beginn der Inkubationen 2-3 Wochen im rezirkulierenden System (Helgolandtiere) bzw. Durchflusssystem (Schwedentiere) bei 10°C und einem 12:12 Tag:Nacht-Rhythmus gehalten.

2.2 Hälterung und Bestimmung der Meerwasserparameter

Inkubation 1 (Helgolandtiere): Über einen Inkubationszeitraum von 8-10 Wochen wurden jeweils 6-16 Fische in rezirkulierenden Systemen (Abb. 4a) mit natürlichem Meerwasser in Temperaturkontrollräumen bei 10°C und 18°C gehalten. Hyperkapnische Bedingungen wurden bei beiden Temperaturen auf 2.500 $\mu\text{atm } \text{PCO}_2$ mit einer definierten Luft/ CO_2 -Mischung mittels eines automatischen Massendurchflussreglers (HTK Hamburg, Deutschland) eingestellt, während die Becken der Kontrollfische mit Pressluft begast wurden. Die Fütterung mit einer Mischung aus gefrorenen Garnelen (*Crangon crangon*) und Muscheln (*Cardiidae*) mit Pellet-Futter (Biomar Inicio, Dänemark) erfolgte zweimal wöchentlich. Tiere der 18°C-Gruppe unter niedrigem PCO_2 entwickelten während der Hälterung eine schwere bakterielle Infektion und mussten daher von weiteren Experimenten ausgeschlossen werden.

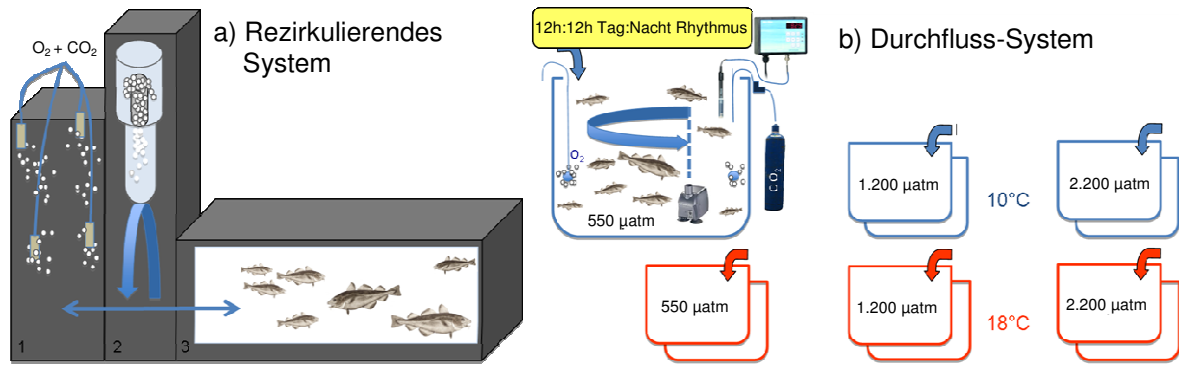


Abb. 4a=Rezirkulierendes Aquariensystem (2.500 l), wie für die Inkubation der Helgolandtiere genutzt. Der linke Begasungsturm (1) mit absenkbaren Sprudelsteinen ist an ein Gas-Mischsystem angeschlossen und dient zur Einstellung exakter PCO_2 -Bedingungen und steht im Austausch mit dem Halterungsbecken (3), dessen Wasser über den Proteinabschäumer (2) wieder zurück in den Begasungsturm-Becken-Kreislauf gepumpt wird (Fa: Karl von Keitz).

Abb. 4b=Aufbau der Durchflusssysteme wie für die Inkubation der Schwedentiere eingesetzt. Je Halterungsbedingung (550, 1.200, 2.200 μatm CO_2) wurden zwei der 1.200 Liter Becken mit einer Durchmischungspumpe, einem Sprudelstein zur Pressluft-Begasung sowie einem CO_2 -Begasungssystem, (computergestütztes Feedback-pH-System) ausgerüstet, das an eine mit Sprudelstein ausgestattete CO_2 -Gasflasche gekoppelt war (Aqua Medic).

Inkubation 2 (Schwedentiere): Vor Inkubationsbeginn wurden die Fische unter Anästhesie (3-Amino-benzoesäure-ethylester (MS222), 0,2g/l) individuell markiert (Visible Implant Elastomer, Northwest Marine Technology, USA), und es wurden die Länge und das Gewicht bestimmt. Gruppen von je 8-10 Fischen wurden in 1.200 l-Durchflusstanks mit natürlichem Fjordwasser in Temperaturkontrollräumen bei 10°C und 18°C eingesetzt. In je zwei Replikaten wurden zwei CO_2 -Konzentrationen (1.200, 2.200 μatm) mittels computergestütztem pH-Feedback-System (Aqua Medic GmbH, Deutschland) eingestellt, welches den pH (NBS Skala) durch Zugabe von gasförmigem CO_2 reguliert ($\pm 0,02$ pH-Einheiten) (Abb. 4b). Zusätzlich wurden die CO_2 -Tanks wie auch die Kontrolltanks mit Pressluft begast und mit einer Pumpe (40 l/min, Eheim, Deutschland) zur besseren Wasserdurchmischung ausgestattet. Jeder Tank verfügte über einen separaten Wasserzufluss, der auf eine Durchflussrate von 3 l/min eingestellt war. Die Fütterung mit gefrorenen Garnelen und Muscheln (*Mytilus edulis*) erfolgte dreimal die Woche *ad libitum*.

Die Bestimmung der Meerwasserparameter pH, Temperatur, Salinität, Gesamtmenge des gelösten anorganischen Kohlenstoff (DIC), sowie die Gesamtalkalinität für die 2. Inkubation, erfolgte wöchentlich. Zur Bestimmung des DIC wurde eine Meerwasserprobe in eine gasdichte Glasflasche ohne Luftüberstand überführt und zeitnah mit einem DIC-Autoanalyser bestimmt (SFA QuAAtro 800 TM, SEAL, Wisconsin, USA). Der pH sowie die Temperatur wurden mit einem pH-Meter (Profi Line pH3310, WTW GmbH, Weilheim, Deutschland) nach NIST-Standard (National Institute of Standards and Technology) gemessen und mittels Dickson Standard auf die Gesamtskala (Total Scale) korrigiert. Gesamtalkalinität wurde photometrisch mit einer Genauigkeit von 10 $\mu\text{mol/kg}^{-1}$ Meerwasser

gemäß Sarazin et al. (1999) bestimmt. PCO_2 -Werte wurden mit Hilfe des CO_2 -sys Programms (Lewis und Wallace, 1998) unter Berücksichtigung der Konstanten nach Mehrbach et al. (1973) und Korrektur nach Dickson und Millero (1987) berechnet. Tabelle 1 listet alle untersuchten Parameter der beiden Inkubationen inklusive der Parallelstudie von K. Michael auf, welche nachfolgend methodisch beschrieben werden.

Tabelle 1: Übersicht aller Versuchsbedingungen und gemessenen Parameter der beiden Inkubationen, die dieser Arbeit zu Grunde liegen. HSI= hepatosomatischer Index, K= Konditionsfaktor, SMR= Rate des Standardmetabolismus, COX = Cytochrom-c-Oxidase, CS= Citratsynthase, HADH=3-HydroxyacylcoA-Dehydrogenase, PEPCK= Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase, GDH= Glutamat-Dehydrogenase, PK= Pyruvatkinase, LDH= Laktat-Dehydrogenase.

	Inkubation 1 (Helgolandtiere)	Inkubation 2 (Schwedentiere)
Inkubationsdauer	8-10 Wochen	4 Wochen
Versuchsbedingungen	10°C 500 μ atm 10°C +18°C 2.500 μ atm	10°C+18°C 550 μ atm 10°C+18°C 1.200 μ atm 10°C+18°C 2.200 μ atm
Ganztierparameter	HSI, K	Wachstum, HSI, K, SMR
Blutparameter	-	Ionenkonzentrationen, Osmolalität
Kiemenrespiration	Temperaturrampen Proteinbiosynthese RNA Synthese Na ⁺ /K ⁺ -ATPase	Na ⁺ /K ⁺ -ATPase H ⁺ -ATPase HCO ₃ ⁻ -Transporter Na ⁺ /H ⁺ -Austauscher
Enzyme: Kieme	F ₁ F ₀ -ATPase Na ⁺ /K ⁺ -ATPase H ⁺ -ATPase	Michael et. al eingereicht Michael et. al eingereicht Michael et. al eingereicht
Leber	COX, CS, HADH, PEPCK, GDH	COX, CS, HADH, PEPCK, GDH
Muskel	COX, CS, HADH, PK, LDH	COX, CS, HADH, PK, LDH

2.3 Ganztier-Respirationsexperimente

Die Rate des Standardmetabolismus (SMR) (MO_2 min) wurde für je 12 Fische aller Versuchsbedingungen der 2. Inkubation (Schwedentiere) anhand von intermittierender Durchfluss-Respirometrie bestimmt. Vor Versuchsbeginn wurden die Fische 48 Stunden nicht mehr gefüttert und dann einzeln in zylindrische maßangefertigte Acryl-Respirometer mit 3 l Fassungsvermögen eingesetzt, ausgestattet mit einer Zirkulationspumpe (Eheim GmbH & Co., Deizisau, Deutschland) sowie Sauerstoffoptoden (Firesting, Pyroscience, Aachen, Deutschland). Letztere waren über einen Sauerstofftransmitter (FireSting O₂) mit einem Messcomputer verbunden, der mit Hilfe der „Pyro Oxygen Logger“ Software (Firesting, Pyroscience, Aachen, Deutschland) die Sauerstoffverbrauchsraten aufzeichnete. Nach Einsetzen wurde die Ruhe-Respiration der Fische für 48 Stunden in Intervallen von jeweils 20minütigen Respirationmessungen mit darauffolgenden 10minütigen Spülphasen gemessen; die Sauerstoffsättigung der Kammern betrug dabei immer über 80%. Die niedrigsten 10% der gemessenen MO_2 -Werte wurden dabei im Mittel als SMR gewertet, berechnet als Sauerstoffverbrauchsraten pro g Frischgewicht und Stunde: $M(O_2)=[\mu\text{mol}(O_2)\cdot\text{gFW}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}]$. Während der Respirationmessungen erstickten zwei Fische in Folge eines Pumpenfehlers, der den Durchfluss zum Erliegen brachte. Die Ganztier- und

Kiemenrespirations-Raten der verbleibenden Fische in diesem Tank waren signifikant reduziert gegenüber denen des Replikat-Tanks. Da nicht ausgeschlossen werden konnte, dass die Fische als Reaktion auf die eintretende Hypoxie chemische Alarm-Signale (Lebedeva et al., 1994) oder Catecholamine (Butler et al., 1989) exkretierten, welche den Stoffwechsel auch der anderen Fische beeinflusst haben könnten, wurden diese Daten von der nachfolgenden Analyse ausgeschlossen.

2.4 Probennahme

Vor der Probennahme blieben die Versuchstiere 48 Stunden ungefüttert. Die Fische wurden mit MS222 (0,2 g/l) anästhetisiert, im Fall der Schwedentiere anhand ihrer Markierung identifiziert und hinsichtlich Länge und Gewicht vermessen. Blutproben wurden aus der ventralen Vene für die spätere Analyse der Osmolarität und Ionenzusammensetzung genommen. Direkt nach Durchtrennen der Wirbelsäule zwischen Kopf und Rumpf wurden die Kiemen für die Präparation des isolierten Kiemenmodells entnommen (Abschnitt 2.5) sowie für Gewebeproben der Filamente zum Zweck späterer Enzymanalysen. Die Leber wurde nach Entnahme gewogen, um prozentual am Ganztiergewicht den hepatosomatischen Index (HSI) zu berechnen, während Unterproben in Stickstoff schockgefroren wurden. Nach Entnahme aller Organe wurde das Standardgewicht (W) erfasst. Unter Berücksichtigung der Fischlänge (L) konnte somit der Konditionsfaktor (K) nach $K=100(W/L^3)$ bestimmt werden. Nachfolgend wurden Muskelproben entnommen, die ebenso wie die der Kieme und Leber direkt nach der Entnahme in flüssigem Stickstoff schockgefroren und für spätere Enzymbestimmungen bei -80 °C aufbewahrt wurden.

2.5 Analytik des Blutplasmas

Zur Bestimmung der Osmolalität und Ionenzusammensetzung des Blutplasmas (2. Inkubationsexperiment) wurde das entnommene Blut für 10 Minuten bei 1.000 g und 4°C zentrifugiert. Die Osmolalität wurde mit Hilfe eines Dampfdruck-Membran-Osmometers (Wescor Inc., Utah, USA) bestimmt. Die Analyse der quantitativen Ionenzusammensetzung erfolgte chromatographisch. Die Kationen-Konzentrationen (Ca^{2+} , Na^+ , Mg^{2+} , K^+) wurden mit einem Ionenchromatographie-System (Dionex-ICS 2000, CA, USA) bei 40°C mit einer IonPac-CS-16-Säule erfasst; als Eluent diente Methansulfonsäure ($30 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$) mit einer Flussrate von $0,36 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$. Kalibrierung mit einem Kationen-Standard (Dionex, Six Cation Standard, CA, USA) erlaubte die Berechnung der Konzentrationen. Die Ammoniumkonzentration des Plasmas, die mittels Ionenchromatographie nicht zutreffend erfasst werden konnte, wurde enzymatisch über Glutamat-Dehydrogenase mit dem Ammonium-Assay-Kit (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland) auf dem unten beschriebenen Mikroplattenlesegerät (Abschnitt 2.5) bestimmt.

Die Plasma-Anionen (Cl^- , SO_4^{2-}) wurden über eine IonPac-AS11HC-Säule mit Kaliumhydroxid ($30 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$, Flussrate $0,30 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$) als Eluent aufgetrennt. Als Referenz für die Anionenkonzentrationen wurde ein Anionen-Standard (Dionex, Five Anion Standard, CA, USA) eingesetzt. Alle Ionenkonzentrationen sind in $\text{mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ dargestellt. Zusätzlich wurde der Plasma-Gesamt- CO_2 -Gehalt (CCO_2) bei zwei Versuchsgruppen des 2. Inkubationsexperiments (10°C $1.200 \mu\text{atm CO}_2$; 18°C $2.200 \mu\text{atm CO}_2$) mit einem Blutgas-Analysegerät (Corning 965, CIBA, Corning Diagnostics, UK) bestimmt.

2.6 Isolierte perfundierte Kieme

Direkt nach Entnahme der Kiemenbögen wurden diese mit heparinhaltiger Ringerlösung gespült und mit einigen Modifikationen der Methode von Deigweiher et al. (2010) entsprechend präpariert. Dabei wurde ein Polyethylenschlauch (Durchmesser innen: $0,28 \text{ mm}$, außen: $0,61 \text{ mm}$), welcher vorherig halbseitig auf Kiemenlänge eingeschnitten wurde, in das efferente Kiemengefäß eingeführt und beiderseits mit Perma-Hand-Seide (Ethicon Inc., Johnson und Johnson, Somerville, USA) und Gewebekleber fixiert (Histoacryl Blau, Braun, Melsungen, Deutschland). Die Ringerlösung wurde gemäß Holmgren und Nilsson (1974) mit Ausnahme der NaHCO_3 -Konzentration angesetzt. Letztere wurde entsprechend der verschiedenen CO_2 - und Temperaturbedingungen nach Heisler (1984, 1986) und Pörtner et al. (2010) ermittelt (siehe Publikation I für Details).

Mit der Annahme, dass der extrazelluläre PCO_2 bei Fischen parallel zum umgebenden PCO_2 ansteigt (McKenzie et al. 2003), wurde der PCO_2 der Ringer-Lösung aus einer linearen Funktion anhand von Literaturwerten (Larsen et al., 1997) berechnet und mittels eines Pressluft- CO_2 -Gemisches justiert. Das Meerwasser, als externes Respirationmedium, wurde ebenfalls mit einem Gasgemisch auf den jeweiligen PCO_2 der Inkubationsbedingungen eingestellt. Die Perfusion der isolierten Kiemenbögen mit Ringerlösung erfolgte über die efferent eingeführten Schläuche mittels einer Peristaltikpumpe (Reglo Digital MS-4-8, Ismatec GmbH, Wertheim-Mondfeld, Deutschland) ($0,2 \text{ ml/min}$). Präparierte Kiemen wurden maximal zwei Stunden in begastem Meerwasser auf Eis perfundiert, bevor sie für Respirationsexperimente genutzt wurden. Der Aufbau des Respirationsexperiments (Abb. 5a-b) entsprach dem von Deigweiher et al. (2010) mit geringfügigen Modifizierungen.

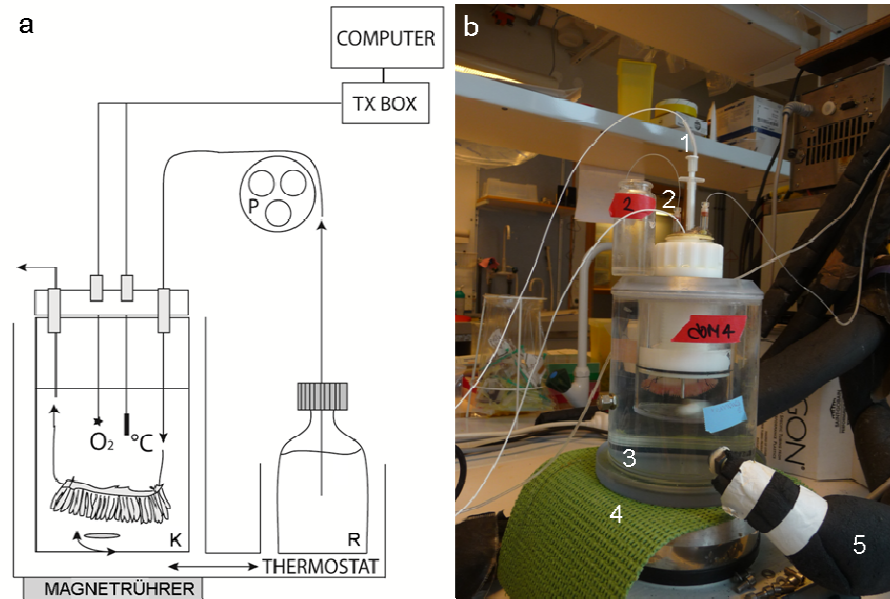


Abb. 5 a-b: Aufbau des Kiemenrespirationsexperiments als Schema (a) und während eines Experiments (b): a= Darstellung der isolierten Kieme in der mittels Thermostat gekühlten, Meerwasser-befüllten Kammer (K), die mit Ringer-Lösung (R) über eine Peristaltikpumpe (P) perfundiert wird; ein Magnetrührer sorgt für eine konstante Wasserdurchmischung. In die Kammer eingeführte Sauerstoff- (O_2) und Temperatursensoren ($^{\circ}C$) sind über eine TX-Box (Transmitter) mit dem Messcomputer verbunden. b= Messkammer während des Respirationsexperiments, 1= Sauerstoffoptode, 2=Temperatursensor, 3=Kammer, 4=Magnetrührer, 5=Versorgungsschlauch des Thermostats.

Die doppelwandige, über einen Thermostat (Lauda GmbH, Lauda-Königshofen, Deutschland) temperierte Respirationenkammer ($10^{\circ}C$ bzw. $18^{\circ}C$) wurde mit 80 ml filtriertem ($0,2 \mu m$) Meerwasser und den Inkubationsbedingungen entsprechend eingestelltem PCO_2 (über Gasgemisch, siehe oben) gefüllt. Die Ringerlösung wurde in einer gasdichten Glasflasche (Schott, Duran, Wertheim, Deutschland) im Wasserreservoir des Thermostats temperiert. Mittels einer Sauerstoff-Mikro-Optode (Presens, Regensburg, Deutschland) und dem angeschlossenen Sauerstofftransmitter (Microx TX3, Presens, Regensburg, Deutschland) wurde der im externen Medium herrschende Sauerstoffpartialdruck bestimmt. Die Kammer-Temperatur wurde über einen Temperatursensor erfasst. Beide Sensoren wurden über entsprechende Bohrungen im Kammerdeckel eingeführt. Die Einführungsöffnungen wurden luftdicht mit Zahnwachs verschlossen. Deren Aufzeichnungen wurden während des Experiments mit Hilfe der „Oxyview“ Software (Presens, Regensburg, Deutschland) in Echtzeit mitverfolgt. Der Perfusionsdruck wurde dem *in vivo* Blutdruck entsprechend auf 3 kPa eingestellt (Platzack et al., 1993; Pettersson und Nilsson, 1980; Wahlquist und Nilsson, 1977) und in regelmäßigen Intervallen mit Hilfe eines Drucksensors (MLT 0699, AD instruments GmbH, Spechbach, Deutschland) überprüft.

Die Vitalität der isolierten Kiemen-Präparationen wurde durch konstante Respirationsraten über eine Zeitspanne von 6 Stunden sowie der nicht erhöhten Konzentration an anaeroben Stoffwechselendprodukten mittels 1H -NMR nachgewiesen.

Die Kiemensauerstoffverbrauchsrate wurden wie folgt berechnet:

$$M(O_2) = (\alpha(O_2) * \Delta Pch * V) * w^{-1}$$

$M(O_2)$, die Sauerstoffverbrauchsrate [$\mu\text{mol}(O_2) \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$], folgte aus: $\alpha(O_2)$ = der Sauerstoffkapazität des Wassers [$\mu\text{mol}(O_2) \cdot \text{kPa}^{-1}$] bei der entsprechenden Salinität und Temperatur nach Boutilier et al. (1984), ΔPch = der Sauerstoffabnahme in der Kammer über die Zeit [$\text{kPa} \cdot \text{h}^{-1}$], V = dem Kammervolumen (l) und w = dem Frischgewicht der Kieme (g). Mittelwert \pm Standardabweichung der prozentualen Hemmung, sowie des Netto-Sauerstoffverbrauchs [($M(O_2)$ Kieme-Kontroll) - ($M(O_2)$ Kieme Hemmstoff)] pro Versuchsbedingung sind nachfolgend dargestellt.

2.6.1 Akute Temperatur-Rampen

Experimente zur akuten Temperaturtoleranz der isolierten Kieme wurden durch schrittweise Erwärmung während der Sauerstoffverbrauchsmessungen durchgeführt. Dabei wurde halbstündig von 10°C ausgehend die Temperatur in Schritten von 2-4°C erhöht, bis ein Maximum von 22°C erreicht wurde.

2.6.2 Inhibitor-Experimente

Zur Erfassung potentiell veränderter Kosten von *in vivo* Komponenten des Kiemen-Energie-Budgets sowie von Ionen-Regulations-Transportern unter erhöhtem PCO_2 und/oder Temperatur wurde die Rest-Respiration dieser Prozesse nach deren Hemmung gemessen. Folgende Prozesse wurden mittels spezifischer Inhibitoren untersucht:

- Protein-Biosynthese mit Cycloheximid (5 mM; Deigweiher et al., 2010)
- RNA-Synthese mit Actinomycin D (4 μM ; Deigweiher et al., 2010)
- Na^+/K^+ -ATPase mit Ouabain (5 mM; Mark et al., 2005; Krumschnabel et al., 1994)
- H^+ -ATPase mit Bafilomycin A1 (0,1 μM ; Morgan und Iwama, 1999, Pörtner et al., 2000)
- Na^+/H^+ -Austauscher mit 5-(N-Ethyl-N-Isopropyl) Amilorid (EIPA) (80 μM ; Wu et al., 2010)
- HCO_3^- -Transporter mit 4,4'-Diisothiocyano-2,2'-Stilben-Disulfonsäure (DIDS) (1 mM; Duraton et al., 1997; Parks et al., 2007)

Alle Hemmstoffe wurden in Dimethylsulfoxid (DMSO) gelöst, was zu einer DMSO-Endkonzentration von unter 1% im Experiment führte. Diese Konzentration hatte in vorherigen Experimenten keinen Einfluss auf die Kiemenrespiration gezeigt. Die Chemikalien

wurden von Applichem (Darmstadt, Deutschland) oder Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland) bezogen.

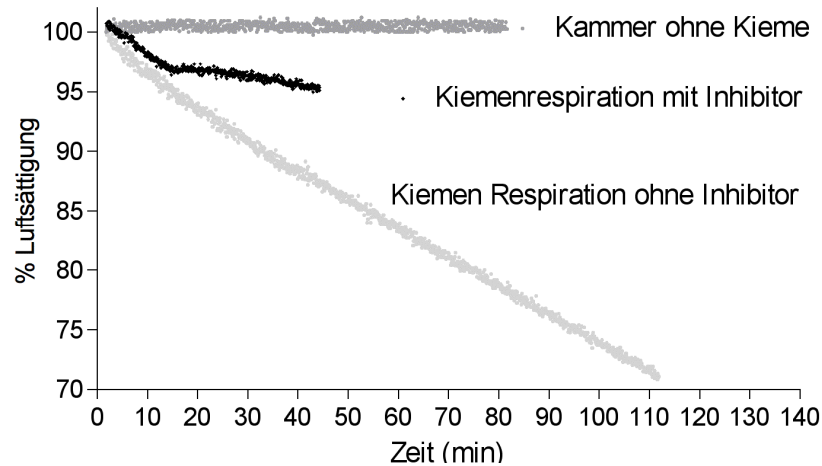


Abb. 6: Sauerstoffsättigung (% Luftsättigung) in der Respirationkammer: ohne Kieme (dunkelgrau), mit Kieme im Kontrollexperiment ohne Inhibitor (hellgrau), sowie nach Zugabe eines Inhibitors (schwarz), in diesem Fall Ouabain, dessen Hemmung der Na^+/K^+ -ATPase mit einer zeitlichen Verzögerung von etwa 15 min eintritt.

Vor Zugabe des Inhibitors in das Respirationsmedium wurde je Kiemenbogen eine Kontrollmessung durchgeführt, die zur anteiligen Berechnung der Restatmung aus dem Inhibitorerperiment diente (Abb. 6). Die Hemmung durch Ouabain erfolgte erst nach ca. 15 Minuten, während die Wirkung der anderen Hemmstoffe schneller einsetzte. Kontroll- und Inhibitor-Respirationsexperimente wurden daher jeweils über einen Messzeitraum von 45 Minuten erfasst. Im Anschluss wurden nach Entfernen des Schlauches und dessen Fixierung (Perma-Hand-Seide und Histoacryl-Kleber) die Kiemen vorsichtig trocken getupft, und deren Gesamtgewicht wurde direkt sowie nach Entfernen des Knorpelbogens bestimmt.

2.7 Enzym-Analysen

Tiefgefrorene (-80°C) Gewebeproben wurden mit dem jeweiligen Extraktionspuffer in einem Verhältnis von $10\ \mu\text{l}$ pro $1\ \text{mg}$ Gewebe in einem Homogenisator (Precellys 24, Bertin Technologies, Frankreich) unter Stickstoff-Kühlung bei einer Drehzahl von $5.000\cdot\text{min}^{-1}$ in dreifacher Wiederholung $15\ \text{s}$ lang homogenisiert. Um Zelltrümmer zu entfernen, wurden die Homogenate anschließend $10\ \text{Minuten}$ bei $1.000\ \text{g}$ und 4°C zentrifugiert; der Überstand wurde als Rohextrakt für die Enzymanalysen verwendet. Alle enzymatischen Messungen wurden in einem Mikroplattenleser (PowerWave HT Biotek, Bad Friedrichshall, Deutschland) bei jeweils 10°C und 18°C mit Hilfe eines speziell angefertigten, temperierbaren Mikroplattenhalters aus Aluminium (siehe Weiss et al., 2012) durchgeführt. Bei einem Gesamtvolumen von $200\ \mu\text{l}$ wurden jeweils enzymespezifische Puffer zusammen mit Cofaktoren und eventuell Hilfssubstraten in die Mikrotiterplatte pipettiert. Nach einem Vorlauf, der als Steigungskontrolle diente, wurden Homogenat und/oder Substrat zugegeben (Hauptlauf), um die Reaktion zu initiieren. Enzymspezifische Laufpuffer, Substrate sowie die

zugehörigen Wellenlängen sind im Methodenteil von Publikation II detailliert beschrieben. Die nachfolgende Auflistung beschränkt sich daher auf die Nennung der gewebespezifisch untersuchten Enzyme. Alle Protokolle wurden für die Analyse auf dem Mikroplattenlesegerät modifiziert:

Kiemengewebe:

- Na⁺/K⁺-ATPase (siehe Deigweier et al., 2008)
- F₁F₀-ATPase
- H⁺-ATPase

Lebergewebe:

- Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase (PEPCK; 340 nm) modifiziert nach Aas-Hansen et al. (2005)
- Glutamat-Dehydrogenase (GDH, 340 nm) modifiziert nach Sanchez-Muros et al. (1998)
- 3-Hydroxyacyl-CoA-Dehydrogenase (HADH, 340 nm) modifiziert nach McClelland et al. (2005)
- Citratsynthase (CS, 412 nm) modifiziert nach Sidell et al. (1987)
- Cytochrome-c-Oxidase (COX, 550 nm) modifiziert nach Moyes et al. (1997)

Muskelgewebe:

- COX, CS und HADH siehe Leber
- Pyruvatkinase (PK, 340 nm) modifiziert nach Driedzic and Almeida-Val (1996)
- Laktat-Dehydrogenase modifiziert nach Kornberg (1955)

Maximale Enzymkapazitäten wurden auf g Frischgewicht oder auf die Proteinkonzentration der Extrakte bezogen. Letztere wurde nach Bradford (1976) für die Mikrotiterplatte modifiziert. Als Standard wurde lyophilisiertes Rinderserumalbumin (BioRad, München, Deutschland) verwendet. Die Enzymkapazität für die im Kiemengewebe gemessenen ATPasen wurde als in Mikromol konsumiertes ATP pro g Frischgewicht und Stunde mit dem Extinktionsfaktor von NADH, $\epsilon=6,31 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ berechnet; die der Stoffwechsellzyme in Leber und Muskelgewebe wurden als Mikromol pro Stunde und g Frischgewicht, wie auch pro mg Protein unter Berücksichtigung der entsprechenden Extinktionskoeffizienten angegeben: NADH (340 nm) $\epsilon=6,31 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, Thionitrobenzoesäure (412 nm) $\epsilon=13,6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, Ferri-Cytochrom $\epsilon=19,1 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

2.8 Statistik

Um den Einfluss von CO₂ und/oder Temperatur auf die untersuchten Parameter zu erfassen, wurde eine umfassende Datenanalyse mittels SigmaPlot (12.0) sowie Graphpad InStat (3&4) vorgenommen. Die drei Versuchsbedingungen (niedriger PCO₂ 10°C, hoher PCO₂ 10°C & 18°C) der ersten Inkubation wurden dabei mittels einfaktorieller Varianzanalyse (ANOVA) und nachfolgendem Post-Hoc-Test verglichen, falls die Daten einer Normalverteilung entsprachen sowie Varianzhomogenität aufwiesen. Dies war bei den *in vivo*-Kiemenrespirationsexperimenten der Fall, während die Kontrollrespiration der Kiemen sowie die Enzymkapazitäten mittels nicht-parametrischer Kruskal-Wallis-Tests und entsprechender Post-Hoc-Tests (Dunn's Test) auf Unterschiede untersucht wurden. Im Fall der F₁F₀-ATPase bei 10°C war der Dunn's-Test nicht aussagekräftig genug (Teststärke zu gering), weshalb alternativ ein Mann-Whitney-Test mit nachfolgenden multiplen t-Tests, korrigiert nach Bonferroni, angewandt wurde. Die Respirationsraten der Temperatur-Rampen-Experimente wurden über Kovarianzanalyse (ANCOVA) miteinander verglichen, während die ATPasen auf Basis der *in vitro* Enzymmessungen mittels Pearson-Korrelationen aufeinander bezogen wurden.

Für die statistische Auswertung des zweiten Inkubationsexperiments mit sechs Versuchsbedingungen (niedriger, mittlerer und hoher PCO₂ bei jeweils 10°C und 18°C) und jeweils zwei Tanks pro Versuchsbedingung wurden zunächst parameterspezifische t-Tests zwischen den Replikat-Tanks durchgeführt. Unterschieden sich diese nicht, wurde bei Erfüllung der Voraussetzungen (Normalverteilung, Varianzhomogenität) durch zweifaktorielle ANOVA und nachfolgenden Post-hoc-Test der Einfluss der Faktoren Temperatur und PCO₂ untersucht, der auch die Wasserparameter umfasste. Im gegenteiligen Fall wurde eine einfaktorielle ANOVA bzw. ein nicht-parametrischer Kruskal-Wallis-Test mit nachfolgendem Post-Hoc-Test durchgeführt. Zusätzlich erfolgten multiple t-Tests zwischen den beiden Akklimationstemperaturen, welche nach Holm-Bonferroni korrigiert wurden. Einzig für den Datensatz der Plasma-Ionen wurde vorherig ein Nalimov-Test zur Identifizierung von Ausreißern auf einem Konfidenzintervall von 99% durchgeführt. Q₁₀-Werte für den Netto-Sauerstoffbedarf der *in vivo* Aktivitäten der Ionentransporter wurden auf Basis der jeweiligen Mittelwerte berechnet. Für alle Parameter wurde ein Signifikanzniveau von p<0.05 festgelegt.

3 Publikationen

Liste der Publikationen und Erklärung zur Eigenleistung

Publikation I

Kreiss, C.M., Michael, K., Bock, C., Lucassen, M., Pörtner, H.-O. (2015). Impact of long-term moderate hypercapnia and elevated temperature on the energy budget of isolated gills of Atlantic cod (*Gadus morhua*). (Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology 182:102-112).

Das Konzept wurde zusammen mit den Co-Autoren erarbeitet. Die Tierhaltung und Probennahme wurde in Zusammenarbeit mit dem ersten Co-Autor durchgeführt, die Experimente wurden von mir (perfundierte Kieme) oder in Zusammenarbeit mit dem zweiten und dritten Co-Autor durchgeführt. Das Manuskript wurde von mir geschrieben und zusammen mit allen Co-Autoren revidiert.

Publikation II

Kreiss, C.M., Michael, K., Lucassen, M., Jutfelt, F., Motyka, R., Dupont, S., Pörtner, H.-O. Ocean warming and acidification modulate energy budget and gill ion regulatory mechanisms in Atlantic cod (*Gadus morhua*). (Unter Revision bei Journal of Comparative Physiology B: Biochemical Systems, and Environmental Physiology)

Das Konzept der Studie wurde von mir in Zusammenarbeit mit dem ersten und zweiten und letztem Co-Autor erarbeitet. Die Tierhaltung und Probennahme wurde in Zusammenarbeit mit dem ersten Co-Autor durchgeführt. Die Experimente und Analysen wurden von mir (perfundierte Kieme, Osmolalität) oder in Zusammenarbeit mit dem ersten, dritten und vierten Co-Autor durchgeführt. Das Manuskript wurde von mir geschrieben und mit Hilfe aller Co-Autoren revidiert.

Publikation III

Kreiss, C.M., Michael, K., Pörtner, H.-O., Lucassen, M. Metabolic shifts in Atlantic cod (*Gadus morhua*) acclimated to warming and acidification. (Vorgesehen für eine Einreichung bei Journal of Experimental Biology).

Das Konzept der Studie wurde von mir in Zusammenarbeit mit den beiden letzten Co-Autoren erarbeitet. Die Tierhaltung und Probennahme wurde zusammen mit dem ersten Co-Autor durchgeführt, die Analysen wurden von mir oder in Zusammenarbeit mit dem ersten Co-Autor durchgeführt. Das Manuskript wurde von mir geschrieben und mit Hilfe aller Co-Autoren revidiert.

Publikation I

Impact of long-term moderate hypercapnia and elevated temperature on the energy budget of isolated gills of Atlantic cod (*Gadus morhua*)

Cornelia M. Kreiss¹, Katharina Michael¹, Christian Bock¹, Magnus Lucassen¹ and Hans-O. Pörtner¹

¹Alfred Wegener Institute, Helmholtz Center for Marine and Polar Research, Integrative Ecophysiology, Am Handelshafen 12, D-27570 Bremerhaven, Germany

*Corresponding author:

Cornelia M. Kreiss

Cornelia.Kreiss@awi.de

Abstract

Effects of severe hypercapnia have been extensively studied in marine fishes, while the knowledge on the impacts of moderately elevated CO₂ levels and their combination with warming is scarce. Here we investigate ion regulation mechanisms and energy budget in gills from Atlantic cod acclimated long-term to elevated PCO₂ levels (2,500 µatm) and temperature (18°C). Isolated perfused gill preparations were established to determine gill thermal plasticity during acute exposures (10-22°C) and *in vivo* costs of Na⁺/K⁺-ATPase activity and of protein and RNA synthesis. Maximum enzyme capacities of F₁F₀-ATPase, H⁺-ATPase and Na⁺/K⁺-ATPase were measured *in vitro* in crude gill homogenates.

After whole animal acclimation to elevated PCO₂ and/or warming, branchial oxygen consumption responded more strongly to acute temperature change. The fractions of gill respiration allocated to protein and RNA synthesis remained unchanged. In gills of fish CO₂-exposed at both temperatures, energy turnover associated with Na⁺/K⁺-ATPase activity was reduced by 30 percent below rates of the control group. This contrasted *in vitro* capacities of Na⁺/K⁺-ATPase, which remained unchanged under elevated CO₂ at 10°C, and earlier studies which had found a strong upregulation under more severe hypercapnia. F₁F₀-ATPase capacities increased in hypercapnic gills at both temperatures, whereas Na⁺/K⁺-ATPase and H⁺-ATPase capacities only increased in response to elevated CO₂ and warming indicating the absence of thermal compensation under CO₂. We conclude that *in vivo* ion-regulatory energy demand is lowered under moderately elevated CO₂ levels despite the stronger thermal response of total gill respiration and the upregulation of F₁F₀-ATPase. This effect is maintained at elevated temperature.

Keywords: F₁F₀-ATPase, *Gadus morhua*, ¹H-NMR spectroscopy, H⁺-ATPase, ocean acidification, isolated gill respiration, Na⁺/K⁺-ATPase

1. Introduction

Compared to pre-industrial times, ocean acidification has already led to a decrease of ocean surface pH by 0.1 units. At the current rate of atmospheric CO₂ emission, models project an additional pH drop by 0.3 to 0.5 units by the year 2100 and 2300, respectively, consistent with a *PCO*₂ of 1,000 and then 2,000 µatm (Meinshausen et al., 2011; Caldeira and Wickett, 2005, 2003). Even higher CO₂ concentrations may be reached in coastal habitats (Melzner et al., 2013; Gruber et al., 2012). In addition, animals exposed to ocean acidification also experience ocean warming (Pörtner, 2008). Water breathers have relatively low *PCO*₂ values in their body fluids so that environmental hypercapnia leads to a strong increase in *PCO*₂ as CO₂ is rapidly taken up, causing an acidosis in blood and possibly, tissues (Heisler, 1993). However, fish may react less sensitive to these disturbances than e.g. invertebrates, due to compensation of the acidosis by efficient ion and pH regulation, which takes place mainly in the gills. The response of the branchial ion regulatory machinery to ambient hypercapnia leads to the net uptake of bicarbonate, often accompanied by an equimolar loss of Cl⁻, as well as the excretion of excess proton quantities (Heisler, 1993). Dependent on species and habitat conditions, specific membrane proteins, comprising Na⁺/H⁺ exchangers, V-type H⁺ ATPase, Cl⁻/HCO₃⁻ exchanger and Na⁺/HCO₃⁻ co-transporters are involved in these processes (Melzner et al., 2009; Deigweier et al., 2008; Perry and Gilmour, 2006; Claiborne et al., 2002). Acid-base regulation is energetically costly, as adjusting the ATP dependent transport of acid-base equivalents modulates tissue oxygen demand either directly (as in case of H⁺-ATPase) or indirectly, via Na⁺/K⁺-ATPase (Pörtner et al., 2000). For example in isolated cutthroat trout gills, these processes comprise 37% of total tissue respiration, determined from the combined inhibition of the rates of Na⁺/K⁺-ATPase and H⁺-ATPase (Morgan and Iwama, 1999).

Various studies in fish focused on the regulation of branchial Na⁺/K⁺-ATPase capacities under changing environmental factors such as salinity (Hawkings et al., 2004; Romao et al., 2001; Morgan and Iwama, 1999; Stagg and Shuttleworth, 1982), temperature (Guynn et al., 2002; Gonzalez-Cabrera et al., 1995; Jürss et al., 1987, Stuenkel and Hillyard, 1980) and ambient hypercapnia (Esbaugh et al., 2012, Melzner et al., 2009; Deigweier et al., 2008; Ishimatsu et al., 2005). A linear relationship between gill Na⁺/K⁺-ATPase activity and increasing environmental salinity was found in many teleost species (Arjona et al., 2007; Marshall, 2002; De Renzis and Bornancin, 1984), while the responses to hypercapnia at constant salinity may be more complex. Exposure to severe environmental hypercapnia (6,000-50,000 µatm) caused increased Na⁺/K⁺-ATPase capacities in most cases (Melzner et al., 2009; Deigweier et al., 2008; Ishimatsu et al., 2005), while the few studies dealing with moderate hypercapnia (1,000-3,000 µatm) revealed stable or decreasing Na⁺/K⁺-ATPase capacities (Esbaugh et al., 2012; Melzner et al., 2009). Branchial H⁺-ATPase in marine fish

has been investigated to a lesser extent than Na^+/K^+ -ATPase. Existing studies indicate its involvement in acid-base regulation, although its specific role and localization are not yet clear (Catches et al., 2006; Tresguerres et al., 2005; Claiborne et al., 2002; Seidelin et al., 2001).

Deigweiher et al. (2010) used isolated gill perfusion experiments as developed by Lyndon (1994) and Morgan and Iwama (1999) to examine the impact of acute severe hypercapnia (10,000 μatm) on energy turnover associated with Na^+/K^+ -ATPase activity, as well as protein and RNA synthesis in two Antarctic Notothenioids *Gobionotothen gibberifrons* and *Notothenia coriiceps*. While total gill oxygen consumption remained unaffected, shifts in energy allocation became visible as all investigated processes increased significantly under acute hypercapnia in *G. gibberifrons*, except for RNA synthesis in *N. coriiceps*. The estimated fractional costs of branchial osmoregulation account for up to 10% of whole animal ATP turnover (Deigweiher et al., 2010; Boeuf and Payan, 2001; Gibbs and Somero, 1990; McCormick, 1989). Enhanced branchial costs due to the rising energy demand of acid-base regulation under hypercapnic conditions might limit other energy consuming processes, including those at whole animal level, e.g. growth and reproduction.

Little is known about the long-term effects of ambient hypercapnia including PCO_2 levels predicted by emission and ocean acidification scenarios as well as of their effects when combined with elevated temperature. Therefore, we adapted the isolated perfused gill preparation (Deigweiher et al., 2010) to cod gills (*Gadus morhua*) in order to study the *in vivo* costs of specific branchial processes and their responses to ocean acidification and warming in this commercially important species. Atlantic cod from the southern North Sea were incubated under elevated PCO_2 levels (2,500 μatm PCO_2 for 8-10 weeks at 10°C), close to their optimum temperature for growth (Pörtner et al., 2001). We hypothesized that due to thermal constraints on functional capacity of the whole organism the sensitivity of the fish to elevated PCO_2 levels might increase at the edges of the species' thermal window. Therefore, whole animal constraints may occur in association with the sensitivity of specific tissues like the gills which have a key role in ion and pH homeostasis and claim 7-10 % of whole animal energy turnover (Boeuf and Payan, 2001). In order to test this hypothesis, we exposed animals long-term to 18°C with and without elevated CO_2 (2,500 μatm). 18°C was chosen as it is well in the range of maximum summer values for Atlantic cod (Righton et al., 2010; Neat and Righton, 2007).

To assess thermal plasticity of the tissue model we conducted gill respiration experiments under acute stepwise warming from 10 to 22°C. The fractions in energy budget allocated to Na^+/K^+ -ATPase, protein synthesis and RNA synthesis were investigated in gills from control and CO_2 exposed animals. Additionally, *in vitro* maximum enzyme capacities of both, ATP producing F_1F_0 -ATPase and ATP demanding Na^+/K^+ -ATPase and H^+ -ATPase

were determined in crude gill homogenates to compare these rates with their actual *in vivo* use and to assess the effect of potential acclimation processes.

2. Material and Methods

Handling and killing of the fish were conducted in compliance with the German legislation and in line with the recommendations of the American Veterinary Medical Association (AVMA). The work was approved by German authority (Freie Hansestadt Bremen, reference number 522-27-11/02-00 (93)).

2.1 Experimental animals

Atlantic cod *Gadus morhua*, L. of mixed gender, aged 1-3 years (determined after Hawkins et al., 1985) (length: 20-33cm) were caught in the German Bight near Helgoland (southern North Sea) in summer 2011. The fish were maintained in groups of max. 6 in aerated 500 l watertanks within a recirculating system with filtered natural seawater from the North Sea at 12.2 ± 0.67 °C and 31.9 ± 0.4 psu for 2-3 weeks post-transfer. Prior to experimentation fish were acclimated for 8-10 weeks to 10°C and 18°C using recirculating systems (2,500 l) in temperature control rooms under a 12:12 day:night cycle before experimentation (Tab. 1). Control animals were maintained in aerated natural seawater, while CO₂ exposed specimens (2,500 µatm) were incubated under gas mixtures provided by a gas mixing system (HTK, Hamburg, Germany). Animals at 18°C and control PCO₂ developed a severe infection and had to be excluded from further experimentation. Fish were fed two times a week with a mix of frozen food (shrimps and blue mussels) and pellet food (Biomar Inicio, Aarhus, Denmark). Animals were starved for 48 h prior to experiments/preparation. Water chemistry was controlled twice a week by measuring pH and temperature (WTW portable pH meter Profi line pH 3310, NIST Scale corrected to total scale via Dickson standards), total dissolved inorganic carbon (DIC) (Seal Analysis SFA QuAAtro; 800 TM) and salinity (WTW conductivity meter Cond 1970i). PCO₂ values were calculated on the basis of DIC and pH_{NBS} using the CO₂SYS program developed by Lewis and Wallace, 1998 (Tab. 1).

Table 1 Water parameters during animal incubation and different treatments.

Parameter	10°C control	10°C CO ₂	18°C CO ₂
Temperature	11.6 ± 0.25	9.45 ± 2.16	17.48 ± 0.6
PCO ₂ [µatm]	< 500	2,477 ± 434	2,446 ± 518
pH (NBS scale)	8.04 ± 0.03	7.46 ± 0.09	7.60 ± 0.05
pH (total scale)	-	7.26 ± 0.06	7.32 ± 0.09
Salinity [PSU]	31.8 ± 0.36	32.8 ± 0.6	33.76 ± 0.8
DIC [µmol/l]	-	2,029 ± 176	2,500 ± 185

2.2 Isolated perfused gill respiration

Fish were anaesthetised with MS222 (3-Aminobenzoic Ethyl Ester, Applichem, Darmstadt; Germany) in a concentration of 0.2 g/l and killed by cutting their spine. The gill arches were dissected quickly and immediately placed in ice-cold saline. Only the first three arches were used for the experiments. Gill arches were cleared of blood by flushing the efferent blood vessel with heparin containing saline (5,000 U/l) using a syringe. The isolated gill arches were prepared following the procedure of Deigweiher et al. (2010) with some modifications. Polyethylene tubing (inner diameter 0.28 mm, outer diameter 0.61mm, Portex Ltd., Smiths Industries Medical Systems, Kent, UK) was inserted into the efferent blood vessel. To improve perfusion a slot cut into the tubing by using a razor blade matched the respective gill length. The tubing was fixed to both sides of the gill arch with permanent hand silk suture (Ethicon Inc., Johnson & Johnson, Somerville, New Jersey, USA). Sealing of the suture and gill ends with Histoacryl blue glue (Braun Melsungen AG, Germany) was employed to prevent leakage. The saline was prepared according to Holmgren and Nilsson (1974) with defined levels of NaHCO_3 . These were set to concentrations calculated for the different CO_2 concentrations and temperature after Heisler (1984, 1986), evaluating pK'_{app} and $\alpha(\text{CO}_2)$ as described in the guide to best practices for ocean acidification research and data reporting (Pörtner et al., 2010) using the following constants:

M (Molarity) = $0.3516 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ (according to saline)

t = incubation temperature

I (ionic strength) = 0.16 (Urist, 1963)

Na^+ = $146 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ (according to saline concentration)

pH = 7.95 for 10°C ; 7.8 for 18°C (Larsen et al., 1997; Rahn and Baumgardener, 1972)

$$[\text{HCO}_3^-] = (10^{\text{pH}-\text{pK}'}) * \alpha(\text{CO}_2) * \text{PCO}_2$$

Assuming that blood PCO_2 in fish increases in parallel to ambient PCO_2 (McKenzie et al., 2003), PCO_2 values were adopted from a linear function derived from data by Larsen et al. (1997). As a result a Ringer solution containing $11.50 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ bicarbonate was applied to gills from normocapnic fish at 10°C , $16.18 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ to hypercapnic fish at 10°C and $10.00 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ to animals acclimated at high temperature and hypercapnia.

pH of the Ringer solution was equilibrated with pressurized air/ CO_2 mixtures resulting in pH values of 7.95 ± 0.05 at 10°C and 7.87 ± 0.07 at 18°C . Seawater used in respiration measurements (external bath) was also equilibrated with gas mixtures resulting in the respective pH values (control at 10°C : 8.09 ± 0.06 , elevated PCO_2 at 10°C : 7.52 ± 0.02 , elevated PCO_2 at 18°C : 7.55 ± 0.03)

2.3 Gill respiration experiments

Isolated gill arches were perfused with a pulsatile flow of saline (flow rate: 0.2 ml/min) with PE tubings being connected to a peristaltic pump (Reglo Digital MS-4-8, Ismatec Laboratoriumstechnik GmbH, Wertheim-Mondfeld, Germany). Gills were transiently (max. 2 hours) stored in ice-cold aerated seawater until used in respiration measurements. The respiratory setup was modified after Deigweiher et al. (2010). An 80 ml volume of 0.2 µm filtered and aerated seawater was filled into the chamber with a PCO_2 set to *in vivo* blood PCO_2 values measured during whole animal exposures (Tab. 1), using the gas mixing system (HTK, Hamburg, Germany). The respiration chamber was thermostatted to 10°C and 18°C, respectively, by use of a RP 845 thermostat (Lauda GmbH, Lauda-Koenigshofen, Germany) connected to a cooling jacket placed around the chamber. Oxygen partial pressure in the chamber volume was measured with an oxygen micro-optode (needle type, 140 µm, PreSens, Regensburg, Germany) inserted into the chamber through a hole in the lid, and recorded by use of an oxygen meter (Microx TX3 for needle type, PreSens, Regensburg, Germany). Preliminary experiments found no PO_2 -change in the efferent perfusate (data not shown), therefore tissue oxygen consumption was exclusively mirrored in the oxygen uptake from the external medium.

In addition to the oxygen micro-optode a temperature sensor was also inserted into the chamber. The software oxyview provided by PreSens (Regensburg, Germany) was used for online monitoring and recording of oxygen levels and their correction for shifting temperature. Perfusion pressure was set to around 3 kPa according to Platzack et al. (1993), Petterson and Nilsson (1980), Wahlquist and Nilsson (1977) and controlled at regular intervals by use of a pressure transducer (MLT 0699, AD instruments GmbH, Spechbach, Germany).

The viability of isolated gill preparations was verified through respiration rates that remained constant for more than 6 h. In addition, the potential increase of anaerobic end products (like succinate and lactate) was analysed from high-resolution 1H -NMR-spectra of perchloric acid extracts (pH set to 7.0) recorded in snap-frozen gill tissues (as described in Le Belle et al., 2002 and Lannig et al., 2010). Metabolite concentrations (in µM relative to an internal concentration standard) of tissue extracted directly after dissection of the animal were compared with those of tissue extracted after 6 h of perfusion (for each group n=2-4).

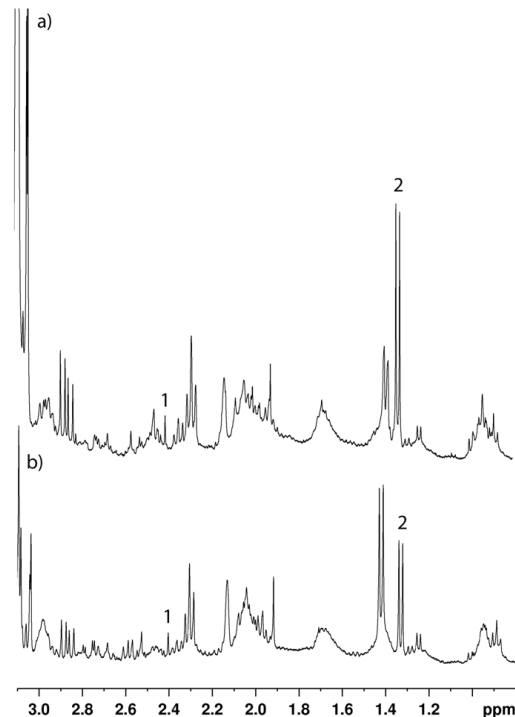


Fig. 1: Representative *in vitro* $^1\text{H-NMR}$ spectra of perchloric acid extract from cod gills in response to perfusion experiments. $^1\text{H-NMR}$ spectra of pre-experimental gill tissue (a) and experimental tissue after 6h of perfusion (b) were analysed for potential increase of anaerobic endproducts: 1) succinate and 2) lactate. Metabolite concentrations relative to standard in two samples of pre-experimental gill tissue were 0.4; 0.4 μM succinate and 5.3; 6.0 μM lactate, whereas for two pooled samples of experimental tissue after 6h of perfusion 0.3; 0.4 μM succinate and 4.4; 2.8 μM lactate was determined.

2.4 Acute temperature ramp experiments

To investigate the thermal range and functional responses in isolated gills of differently treated fish, we conducted warming experiments covering 5 temperature steps. Oxygen consumption of the isolated perfused gills was measured starting at 10°C followed by temperature increments of 2-4°C/30 min until reaching a maximum temperature of 22°C.

2.5 Gill energy budget

To investigate potential *in vivo* changes in the energy budget components of the gills, their contribution to maintenance metabolism were determined from changing respiration rates of perfused gills after the application of specific inhibitors: Na^+/K^+ -ATPase via ouabain, protein synthesis via cycloheximide and RNA synthesis via actinomycin D. The inhibitors (obtained from Applichem, Darmstadt, Germany or Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Germany) were dissolved in DMSO achieving a final DMSO concentration in the respiration volume (80 ml) of less than 1%. Control experiments using 1% DMSO showed no effect on respiration (data not shown). Final concentrations of inhibitors were as follows: ouabain (5 mM) (Mark et al., 2005, Krumschnabel et al., 1994) actinomycin (4 μM) (Deigweiher et al., 2010) and

cycloheximide (5 mM) (Deigweiher et al., 2010). Each gill arch was used as its own control prior to application of each individual inhibitor to the respiratory medium. Recordings of oxygen partial pressure in the chamber volume under control conditions and after the application of inhibitors were conducted for a period of 45 min each. After experimentation tubing was removed and gill arches were blotted dry and the fresh weights determined.

2.6 Enzyme assays

Gill tissue samples for enzyme determination were taken directly after killing the fish and were subsequently frozen in liquid nitrogen. Frozen samples were homogenized in 10 µl extraction buffer (50 mM imidazole/HCl (pH7.4), 250 mM sucrose, 5 mM Na₂-EDTA (Disodium ethylenediaminetetraacetic acid), 0.1% desoxycholic acid) per 1 mg wet tissue in a tissue homogenizer (Precellys 24, Bertin Technologies, France) at 5,000 rpm and 4°C, 3 times for 15 s. Homogenates were centrifuged for 10 min at 1,000 g and 4°C to remove cell debris. The supernatant was used as crude extract. Na⁺/K⁺-ATPase activity was measured in gill crude extracts following the method by Deigweiher et al. (2008) in a coupled enzyme assay. The assay was adapted to a micro-plate reader format using a thermostatted aluminium block as described in Weiss et al. (2012) for controlled temperature conditions (10°C and 18°C). F₁F₀-ATPase activity (n=7) and H⁺-ATPase activity (n=4-7) were determined as a fraction of total ATPase activity by the addition of 60 µM oligomycin for inhibiting F₁F₀-ATPase and 16 µM bafilomycin A1 for the inhibition of H⁺-ATPase, respectively. Lower replicate numbers in case of H⁺-ATPase are due to assay failures caused by limited tissue availability. Enzyme capacity was calculated as micromoles of consumed ATP per gram tissue fresh weight per hour using an extinction coefficient for NADH of ε=6.31 mM⁻¹*cm⁻¹. For an estimation of total protein content the extractable proteins were determined in the crude extract according to Bradford (1976).

2.7 Data analysis and statistics

Gill oxygen consumption was calculated as follows:

$$M(O_2) = (\alpha(O_2) * \Delta Pch * V) * w^{-1}$$

where M(O₂) is the oxygen consumption rate [µmol (O₂)*g⁻¹*h⁻¹]; α(O₂) is the oxygen capacity of the water [µmol (O₂)*l⁻¹ kPa⁻¹] at the respective salinity and temperature adopted from Boutilier et al. (1984), ΔPch is the oxygen decrease in the chamber over time in [kPa*h⁻¹], V the chamber volume (l) and w is the fresh weight of the gill (g).

Means ± standard deviations were derived from percent inhibition values in each group.

Statistical analyses were performed using Graphpad InStat 3 and Sigma plot 12.0. Kruskal-Wallis tests with a Dunn's post-hoc test were performed for enzyme capacities and means of total gill respiration rates without inhibitors, as tests for homogeneity of variance failed on these data sets. In the case of F_1F_0 -ATPase capacities at 10°C assay temperature, we conducted Mann-Whitney tests with multiple t-test correction after Bonferroni, as the Dunn's test had not enough power to detect significant differences here. One-way ANOVAs with subsequent Tukey multiple comparison tests were conducted for *in vivo* gill experiments with inhibitors and for total protein content of gill tissue. Slopes of the temperature ramp experiment were compared by use of ANCOVA. A significance level of $p < 0.05$ was adopted for all data. Correlations between ATPase capacities were conducted on the basis of Pearson product-moment correlation.

3. Results

In the following, differences between gill parameters of fish incubated at 10°C under normocapnic and hypercapnic conditions are qualified as CO₂ effects, while those between 10°C and 18°C, both under hypercapnia, are interpreted as temperature effects. Combined effects describe disparities between branchial parameters of fish exposed to 10°C under control CO₂ levels and those at 18°C and elevated CO₂ levels.

3.1 Viability of isolated perfused gills

Viability of the gill arches was indicated by reproducible control respiration rates and their stability over 6 h (data not shown). Experiments with inhibitors showed an immediate effect of actinomycin and cycloheximide, while inhibition by ouabain developed over approx. 15 min (data not shown). Analysis of ¹H-NMR spectra showed no significant accumulation of lactate and succinate in gill arches perfused for 6 h compared to those dissected directly from the fish (Fig. 1).

3.2 Acute temperature ramp experiments

While respiration rates between 10°C and 22°C varied significantly among gills from the hypercapnic and the combined treatment, no significant differences between mean respiration rates of gills from control, warming- and CO₂-exposed fishes were observed at any specific assay temperature (Figs. 2a-c). Oxygen consumption of isolated gill arches from control fish (Fig. 2a) rose steadily from $7.37 \pm 1.85 \mu\text{mol O}_2 \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$ at 10°C to $11.58 \pm 5.27 \mu\text{mol O}_2 \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$ at 22°C following a linear function ($R^2 = 0.9778$). In contrast, mean oxygen consumption rates in the two CO₂ treatments were consistently higher at 10°C than at 12°C (Fig. 2b-c). This pattern was most pronounced in gills from the CO₂ treatment group at 18°C, mirrored in equal mean respiration rates at assay temperatures of 10°C and 18°C

($11.19 \pm 4.74 \mu\text{mol O}_2 \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$), above the rates seen at 12°C ($6.93 \pm 2.73 \mu\text{mol O}_2 \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$). The linear temperature dependence of gill respiration rates covered the full range of assay temperatures in normocapnic fish acclimated to 10°C . Gills from hypercapnic animals at 10°C showed a linear change in respiration between 12°C and 22°C . In gills from hypercapnic animals at 18°C this slope was linear only between 12°C and 18°C , the rate levelled off between 18°C and 22°C (Fig. 2a-c). Within this limited thermal range (12°C - 18°C) slopes did not differ significantly between treatments (Fig. 2a-c).

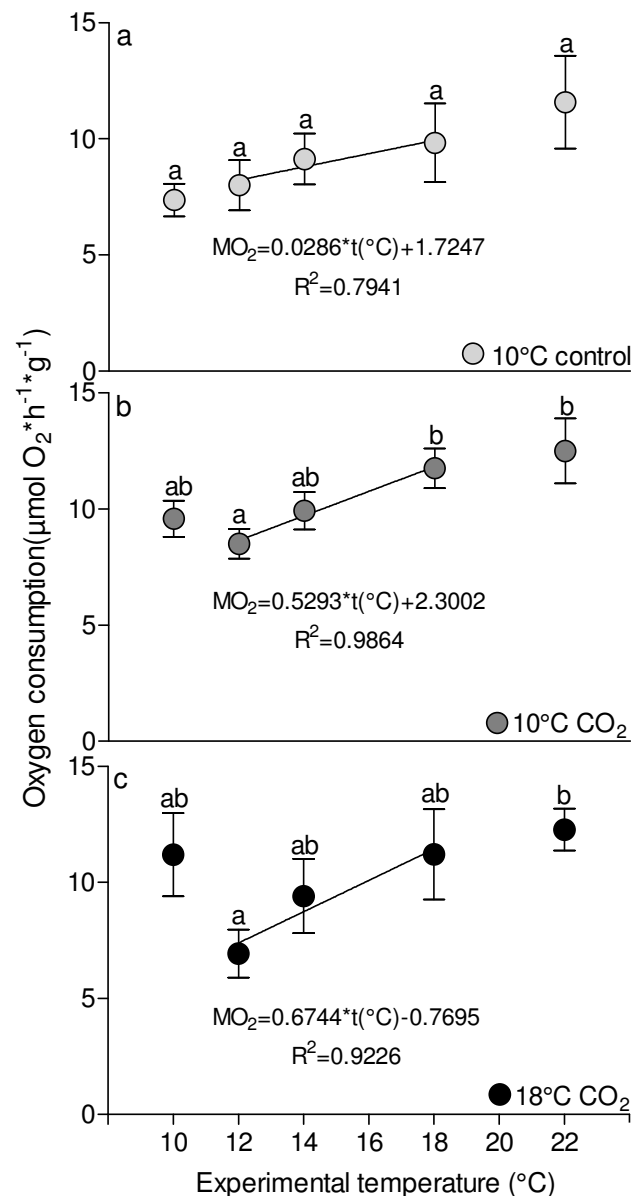


Fig. 2a-c: Temperature plasticity of total gill respiration rates of long-term incubated cod to elevated PCO_2 (10°C , 18°C). Gills from fish under control conditions (a), and under elevated CO_2 at 10°C (b) and at 18°C (c) were determined over a temperature ramp from 10°C to 22°C . $n = 7$ per treatment, all values given as means \pm standard error of the mean. Slopes were calculated for gill respiration rates between 12°C and 18°C . Different letters indicate significantly different respiration rates between experimental temperatures.

3.3 In vivo gill energy budget under hypercapnia and elevated temperature

Total gill oxygen consumption rates at the respective acclimation temperature of the fish, taken from temperature ramp experiments and the control measurements of energy budget are summarized in figure 3a. Gills from fish acclimated to 18°C and hypercapnia consumed significantly more oxygen per minute when assayed at 18°C than those from fish acclimated to 10°C and assayed at 10°C, independent of CO₂ conditions ($p < 0.0001$). The largest fraction of oxygen consumed in gills from control fish at 10°C was allocated to Na⁺/K⁺-ATPase activity (44.8%), followed by protein synthesis (29.4%) and RNA synthesis (14.7%) (Fig. 3b). The fraction of oxygen consumption allocated to protein synthesis (28.0-31.6%) and RNA synthesis (11.9-14.0%) was similar in isolated gills from all treatments. Instead, ouabain sensitive fractions of total respiration (Na⁺/K⁺-ATPase) were about one third lower under elevated CO₂ at both control and elevated temperatures than in the normocapnic control (Fig. 3b).

Net O₂ demand of protein synthesis, RNA synthesis and Na⁺/K⁺-ATPase activity was calculated as the difference in respiration rates between untreated gills and after applying the respective inhibitor (Fig. 3a). Under hypercapnia net O₂-demand followed a similar pattern as seen for the percent changes in oxygen consumption. Na⁺/K⁺-ATPase dependent net respiration at 10°C was reduced about 2-fold in gills from CO₂ exposed fish at 10°C compared to those from control fish ($p = 0.058$) (Fig. 3a), while the other two processes remained quite stable. In fish acclimated to 18°C and high CO₂ warming caused net O₂ demand of all processes to increase compared to those in hypercapnia treated animals at 10°C (Na⁺/K⁺-ATPase $p = 0.031$; protein synthesis $p = 0.028$; RNA-synthesis $p = 0.017$; Fig. 3a). In case of RNA and protein synthesis, respiration rates also exceeded rates of control gills at 10°C, while Na⁺/K⁺-ATPase dependent respiration was comparable to that of the normocapnic gills at 10°C leading to decreased fractional costs of Na⁺/K⁺-ATPase under hypercapnia, while the fractions of the other two processes remained high and similar (Fig. 3b).

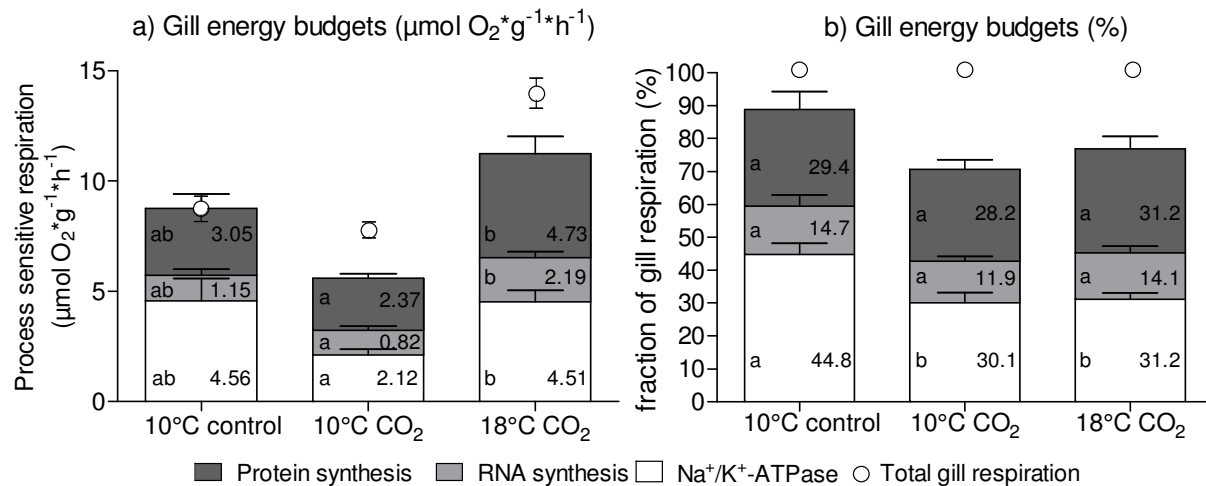


Fig. 3a-b: Cod gill energy budgets compiled from respiration experiments with specific inhibitors.

Absolute O_2 -demand (a) and fractional costs (b) allocated to protein synthesis, RNA synthesis and Na^+/K^+ -ATPase activity were determined in isolated perfused gills from fish incubated long-term under control conditions (10°C), and elevated CO_2 (10°C and 18°C). Total gill respiration ($\mu\text{mol O}_2 \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$) at the respective acclimation temperature (empty dots) are included to indicate to what extent the summed O_2 -demand of all investigated processes match gill respiration rates. $n = 6-9$ per process and treatment, all values given as means \pm standard error of the mean. Different letters indicate significant differences between treatments.

3.4 *In vitro* capacities of Na^+/K^+ -ATPase, H^+ -ATPase and $\text{F}_1\text{F}_0\text{ATPase}$

Total ATPase activity assayed in gill homogenates from control fish at 10°C was $177 \pm 37 \mu\text{mol ATP} \cdot \text{gFW}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$. Under control conditions at 10°C $\text{F}_1\text{F}_0\text{-ATPase}$ (ATP synthesizing) showed maximal capacities of $78.3 \pm 20.4 \mu\text{mol ATP} \cdot \text{gFW}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$, which was comparable to the sum of ATP consuming ATPases (Na^+/K^+ -ATPase: $63.2 \pm 20.3 \mu\text{mol ATP} \cdot \text{gFW}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ and H^+ -ATPase: $23.0 \pm 12.2 \mu\text{mol ATP} \cdot \text{gFW}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$). The functional capacities of $\text{F}_1\text{F}_0\text{-ATPase}$ increased significantly for hypercapnic treatments at both assay temperatures ($p = 0.003$) (10°C CO_2 : 10°C assay: $p = 0.046$, 18°C assay: $p = 0.003$ and 18°C CO_2 : $p = 0.015$) (Fig. 4a). Capacities of Na^+/K^+ -ATPase and H^+ -ATPase remained unchanged under CO_2 in all treatments at the respective assay temperatures, while all investigated ATPases showed elevated capacities when assayed at higher temperature (18°C) than those at 10°C ($p < 0.001$). Considering gill enzyme capacities at the fish's *in vivo* acclimation temperature, capacities of all three processes were higher in gills from hypercapnic animals at 18°C compared to the two other treatments ($p < 0.001$): capacities of Na^+/K^+ -ATPase increased about 2.3-fold, $\text{F}_1\text{F}_0\text{-ATPase}$ about 3-fold and H^+ -ATPase around 4-fold above control rates (10°C, normocapnia) (Fig. 4a-c).

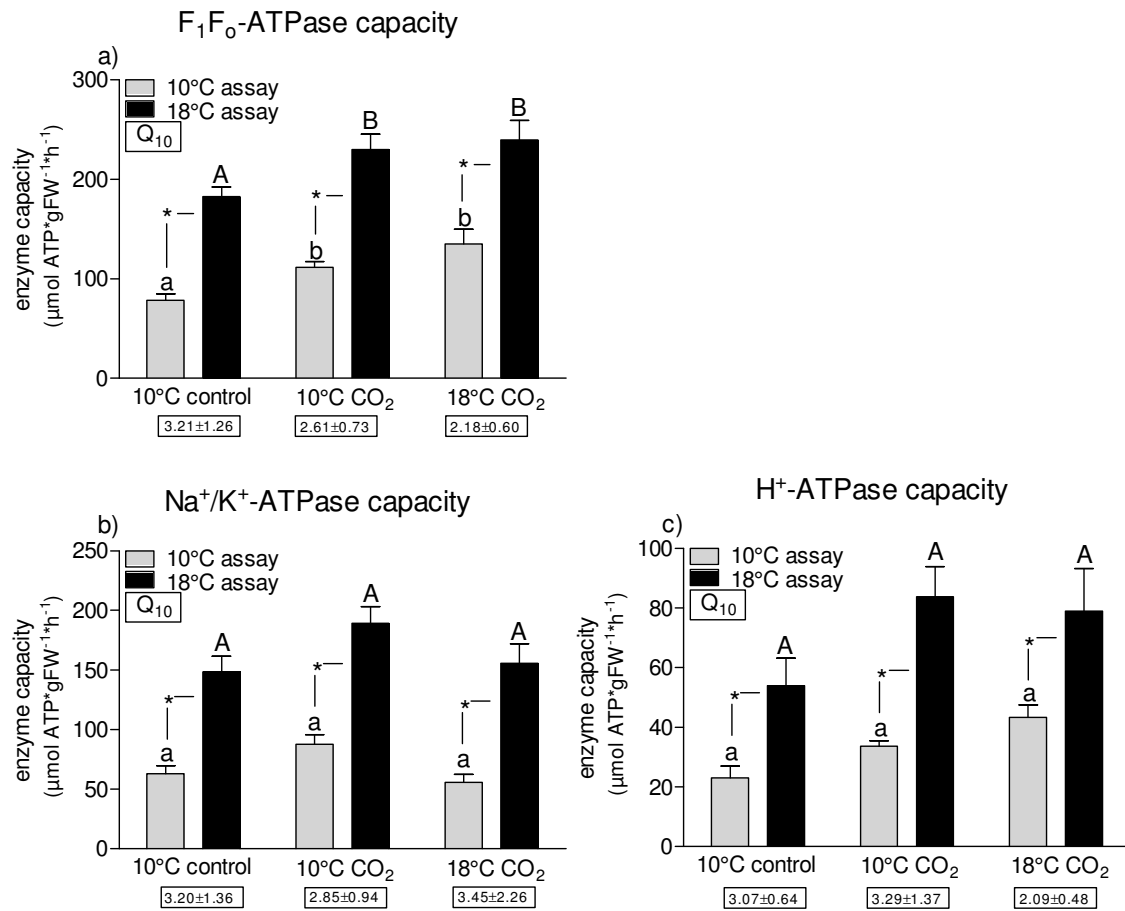


Fig. 4a-c: Capacities of branchial ATPases. F₁F₀-ATPase (a), Na⁺/K⁺-ATPase (b) and H⁺-ATPase (c) (μmol ATP·gFW⁻¹·h⁻¹) capacities were determined in crude gill homogenates of fish incubated long-term under control conditions (10°C), and elevated CO₂ (10°C and 18°C), determined at assay temperatures of 10°C and 18°C. n=4-7 per treatment, values are mean percent fractions of total ATPase ± standard error of the mean. Q₁₀ values ± standard deviations represent temperature dependences between 10°C and 18°C. Different letters indicate significantly different enzyme capacities between treatments, while asterisks indicate significant differences between assay temperatures within one treatment.

The Q₁₀ values assayed between 10°C and 18°C were significantly reduced for F₁F₀-ATPase of CO₂ treated fish at 18°C compared to controls (p=0.0331) (Fig. 4a-c). This pattern was quite similar for Q₁₀ values of H⁺-ATPase (p=0.0547), but absent in the case of Na⁺/K⁺-ATPase capacities. When correlating the capacity of both Na⁺/K⁺-ATPase and H⁺-ATPase with that of the F₁F₀-ATPase (Figs. 5a-b), both displayed a positive correlation in control (10°C) and hypercapnia treated fish (Fig. 5a-b). The correlation of Na⁺/K⁺-ATPase and F₁F₀-ATPase disappeared in the warmth under high CO₂, but remained stable in case of H⁺-ATPase and F₁F₀-ATPase. Total extractable protein content in homogenized gill tissue remained constant in gills of hypercapnia treated fish (10°C, control: 55.4±9.12 mg·g FW⁻¹, 10°C, CO₂: 61.59±10.51 mg·g FW⁻¹). In contrast, gills from the combined treatment had protein contents (65.89±5.49) above those of control gills at 10°C (p=0.0371).

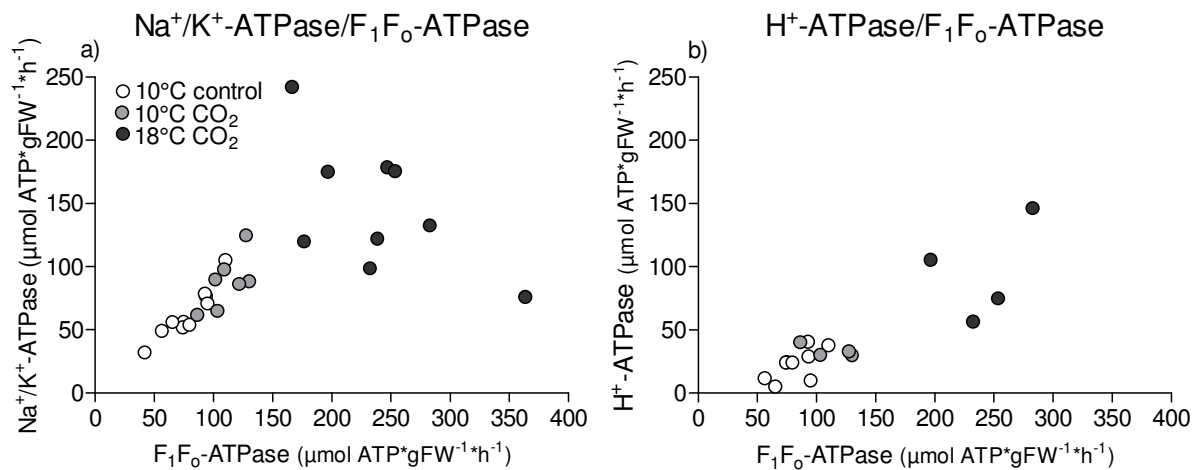


Fig. 5a-b: Correlations between gill ATPase capacities. F₁F₀-ATPase capacity was correlated with Na⁺/K⁺-ATPase (a) and H⁺-ATPase capacity (b) (μmol ATP*gFW⁻¹*h⁻¹) in gills from long-term incubated fish under control conditions, and under elevated CO₂ at 10°C and at 18°C, determined in tissue homogenates. Positive correlation with F₁F₀-ATPase was found for Na⁺/K⁺-ATPase (Pearson $r=0.565$, $p=0.026$) and H⁺-ATPase (Pearson $r=0.8782$, $p<0.0001$). $n=4-7$ per treatment, values are mean percent fractions of total ATPase ± standard error of the mean.

4. Discussion

In this study we aimed to identify shifts in gill energy budget and ion transport mechanisms in Atlantic cod *Gadus morhua* under long-term increased PCO_2 levels and temperature. Experiments focused on changes in the oxygen demand of Na⁺/K⁺-ATPase, protein synthesis and RNA synthesis in isolated perfused gills, determined from inhibitor sensitive respiration rates. These data, which may reflect the use of these particular processes in the intact tissue *in vivo*, were compared to *in vitro* maximum enzyme capacities of F₁F₀-ATPase, H⁺-ATPase and Na⁺/K⁺-ATPase determined in gill homogenates.

4.1 Respiration

Gill respiration experiments in the present study were designed to mimic natural conditions. The composition of perfusate saline (ionic composition, osmolarity and PO_2) was adjusted to the respective levels in cod, while external seawater was saturated with oxygen. The stability of the isolated cod gill preparation was similar to that of isolated perfused gills of polar fishes, confirming the general applicability of the techniques (Deigweiher et al., 2010). Analyses of ¹H-NMR spectra revealed no significant increases in anaerobic end product levels (succinate and lactate, respectively) isolated perfused gills compared to freshly excised gills (Fig. 1), indicating that they did not encounter hypoxia or ischemia during the experiments (Kato et al., 1994; van Waarde et al., 1983) (Fig. 1). Oxygen consumption rates of gills from control fish at 10°C ($8.72 \pm 2.98 \mu\text{mol O}_2 \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$) were well in the range published previously for

marine teleosts (e.g. $2.96 \mu\text{mol O}_2 \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$ at 0°C in *N. coriiceps*, Deigweiher et al., 2010 and $12.06 \mu\text{mol O}_2 \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$ at 10°C in *Platichthys flesus*, Lyndon, 1994). The comparison of gill oxygen consumption rates with those from a former study in isolated perfused cod gills (Johansen and Pettersson, 1981: $4.25 \mu\text{mol O}_2 \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$ at 15°C) revealed twofold higher rates in the present study. The authors of the former study claimed to measure the standard metabolism of the gill, as they used a perfusate that was isoosmotic to the external medium and identical in PO_2 . We propose that the higher respiration rates determined in the present study may be due to transepithelial transport induced by the applied ion and osmotic gradients and thus more closely reflect *in vivo* oxygen demand of the gill. This confirms the previous conjecture by Johansen and Pettersson (1981).

In the study by Deigweiher et al. (2010) inhibitors were added to the perfusion medium, while in the present experiments we applied inhibitors via the external medium. We compared effects of internal versus external applications of an inhibitor to isolated gills of *N. coriiceps*. External ouabain application ($n=6$, 28 % reduction in oxygen demand via inhibition of Na^+/K^+ -ATPase, unpublished data) led to a 5% higher rate of Na^+/K^+ -ATPase than internal application (23.1 % inhibition, Deigweiher et al., 2010). Thus, the inhibitor blocked the target protein more efficiently, when applied from the apical site, despite the basolateral location of Na^+/K^+ -ATPase. In addition, energy budget fractions allocated to protein synthesis and RNA synthesis found in the present study are well in line with literature data for various fish cell types and tissues. This indicates that internal and external inhibitor applications yield comparable results. External application, however, is more reproducible with respect to the inhibitor concentrations applied as the inhibitor is directly and evenly distributed, independent of perfusion rate.

When employing inhibitors of specific energy consuming processes, methodological constraints have to be considered. Generally, inhibitors may have side effects on other metabolic processes, bearing the risk to overestimate the fraction of the process of interest. For example, inhibiting RNA/DNA synthesis will also impact translation due to a lack of new mRNA transcripts. However, even if exact values of *in vivo* fractional costs of the respective processes could not be obtained, the relative shifts observed should reflect relevant changes in the energy budget.

4.2 Acute temperature ramp experiments

Observations during acute warming experiments (10 to 22°C) have to be interpreted in relation to the upper critical temperature T_c of North Sea cod *in vivo*, which has not yet been clearly identified. According to plasma cortisol levels (Pérez-Casanova et al., 2008a, 2000b), venous PO_2 (Lannig et al., 2004), onset of anaerobic metabolism and drop in pH_i (Sartoris et al., 2003), as well as cardiovascular performance, T_c is supposedly found between 16°C and

18°C under acute warming (Lannig et al., 2004). Higher critical values would be expected in well-perfused isolated organs. Within the temperature ramp from 10 to 22°C, no plateauing or decrease of MO_2 was seen in isolated gills at high temperatures with and without CO_2 . However, thermal responsiveness (i.e. the steepness of the response curve) seems to be modified by hypercapnia and be more pronounced after acclimation to the combined treatment visible in a stronger, significant elevation of respiration rates in this group assayed at 18°C and 22°C compared to those at 12°C, respectively (Fig. 2a-c).

Sartoris et al. (2003) found arterial PO_2 as well as arterial O_2 uptake in the Atlantic cod gill not to be limiting during warming (10-19°C) (North Sea population). In contrast, venous values declined at temperatures above 10°C and circulatory capacity was constrained at >16°C indicated by cardiac arrhythmia in cannulated specimens during short-term exposures (Lannig et al., 2004). The finding of an isolated tissue being less sensitive to extreme temperatures than whole animal supports the concept of a whole organism to molecular hierarchy of thermal limitation, stating that sensitivity is highest at the organismic level, while tolerance increases at lower levels of complexity (e.g. isolated gill tissue) (Pörtner, 2002). Gill respiration rates of the group acclimated to hypercapnia at 18°C were generally higher when assayed at 10°C ($p < 0,06$) and at 18°C ($p < 0,09$) than those of normocapnic gills at 10°C (Fig. 2a-c), suggesting a higher ATP-demand in response to hypercapnia in the warmth. In line with increased oxygen demand induced by acclimation to hypercapnia in the warmth, capacities of F_1F_0 -ATPase were increased by about 25% which was also reflected in significantly lower acute Q_{10} values ($p = 0.0187$) of this enzyme than under control conditions (normocapnia, 10°C). Minimal respiration rates in gills from both CO_2 treatments were observed at 12 °C. In contrast, gills from control fish acclimated to 10°C did not reveal such a minimum in O_2 -consumption and their acute O_2 consumption rates at 12°C were slightly elevated above those at 10°C as expected from warming (Fig. 2a).

While the mechanisms causing a temperature dependent minimum in O_2 demand under elevated CO_2 remain obscure, the minimum may relate to the preferred temperature and thermal optimum of cod. Clark and Green (1991) found that the preferred temperature (T_{pref}) of juvenile Atlantic cod (3 years) correlates with seasonal changes of environmental temperature. In their study, T_{pref} was approx. 12°C in October for fish previously maintained at 10°C. In the present study fish were also held at 10°C prior to incubation and experiments were also carried out in October/November; the minimum gill O_2 -consumption was observed at 10-12°C, i.e. at the thermal preferendum. Together with the known growth optimum of North Sea cod (approx. 80-400 g FW) at 10-12°C (Björnsson et al., 2007; Pörtner et al., 2001), this supports the assumption of a fish's seasonal thermal optimum where the animal performs most efficiently at minimum maintenance costs. Such a thermal optimum mirrored in minimized overall cellular energy demand was also seen in isolated normocapnic

hepatocytes of the Antarctic eelpout, *Pachycara brachycephalum* (Mark et al., 2005). The question remains open how the thermal optimum can be explained. An energetic optimum in hypercapnia acclimated cod gills at 12°C is indicated by minimum branchial ion regulatory costs, e.g. minimum branchial Na⁺/K⁺-ATPase fractions, under hypercapnia. A link between minimum costs of branchial Na⁺-K⁺-ATPase activity and maximum rates of whole animal growth was reported for turbot reared at optimum temperature and salinity (Imsland et al., 2003). We conclude, that the thermal optimum of branchial metabolic rates is close to that of the whole animal.

4.3 *In vivo* gill energy budget under hypercapnia and elevated temperature levels

Gill maintenance metabolism and *in vivo* oxygen consumption allocated to Na⁺/K⁺-ATPase, protein and RNA synthesis, were investigated under hypercapnia and elevated temperature to identify potential changes in the main constituents of the branchial energy budget. Metabolic rate of gills acclimated to and measured at 10°C did not change upon exposure to elevated PCO₂ of 2,500 µatm (Fig. 3a), similar to findings by Deigweiher et al. (2010) in Antarctic fish gills under extreme CO₂ concentrations. In contrast, gills from fish acclimated to 18°C and 2,500 µatm CO₂ exhibited significantly elevated respiration rates, paralleled by the enhanced net O₂-demand of protein and RNA synthesis rates. *In vitro* capacities of Na⁺/K⁺-ATPase, H⁺-ATPase and F₁F₀-ATPase were increased under these acclimation conditions i.e. they exhibit no downregulation during warm acclimation (see below), but rather keep capacities high. When Q₁₀ is interpreted to mirror the respective shifts in activation energy, reduced Q₁₀ values of F₁F₀-ATPase (significant) and H⁺-ATPase (non-significant) in relation to unchanged Q₁₀ of Na⁺/K⁺-ATPase, may indicate a shift towards higher capacities of ATP formation in relation to consumption.

Among energy consuming processes in the cod gill, Na⁺/K⁺-ATPase was most costly followed by protein synthesis and RNA synthesis. Such ranking corresponds to findings in isolated gills (Deigweiher et al., 2010) and isolated hepatocytes (Mark et al., 2005) from Antarctic fishes. Mean fractions of gill respiration attributed to protein synthesis (24.41 %) and RNA synthesis (17.8 %) in cod were similar to those in gills from other fish (Deigweiher et al., 2010) and in mammalian cells (Casey et al., 2002), but consistently lower than in fish hepatocytes (Mark et al., 2005; Langenbuch and Pörtner, 2003; Krumschnabel et al., 1994). The latter might be explained by high protein synthesis rates in liver, which are considered to be the highest among all fish tissues (Carter and Houlihan, 2001). The mean fractions of energy demand by gill Na⁺/K⁺-ATPase under control conditions in cod were 42.82 ± 7.49 %, while in isolated gills from Antarctic fish costs of Na⁺/K⁺-ATPase were considerably lower, about 11.8 % and 23.1 % for two different species of Notothenioidei (Deigweiher et al., 2010). Antarctic fish are generally thought to have reduced Na⁺/K⁺-ATPase capacities due to

cold adaptation, with the result of higher serum osmolarities (O'Grady and De Vries, 1982). Warm acclimation of Antarctic fish caused a reduction of serum osmolarity to levels similar to temperate fish, accompanied by increased Na^+/K^+ -ATPase capacities (Brauer et al., 2005; Guynn et al., 2002; Gonzalez-Cabrera et al., 1995). This indicates energy efficiency being strongly influenced by adaptation to various habitat temperatures.

In the present study, the percent fractions of total respiration allocated to protein synthesis and RNA synthesis were sustained in gills of warm and CO_2 incubated cod, while the Na^+/K^+ -ATPase fraction was reduced by CO_2 acclimation regardless of temperature. Despite reduced percent fractions of Na^+/K^+ -ATPase and stable fractions of protein synthesis and RNA synthesis in oxygen demand, respiration was increased at high temperature (Fig. 3b). The question arises, which processes are stimulated and compensate for the lower O_2 demand of Na^+/K^+ ATPase. Candidates are non-mitochondrial oxidative processes, mitochondrial proton leakage, other ATPases and gluconeogenesis (Deigweiher et al., 2010; Clarke and Fraser, 2004). Enhanced proton leakage rates have been proposed as a constraint during warm exposure in ectothermal animals and are modulated during thermal acclimation of mitochondrial function (Clarke and Pörtner, 2010; Mark et al., 2006; Pörtner et al., 2005).

Protein synthesis, its net O_2 demand and its fraction in total gill respiration remained constant under elevated PCO_2 at 10°C . Even in long-term starved Atlantic salmon on their migration into fresh water, gill protein synthesis rates were maintained (Martin et al., 1993). This indicates that rates of branchial protein synthesis are defended against various environmental changes. In contrast, net O_2 demand of protein synthesis was elevated in gills under high PCO_2 at 18°C compared to branchial tissue of the other two incubation groups. This was also mirrored in the amount of total protein extractable from the gill tissue which was larger than under normocapnia at 10°C . Thus, the elevated synthesis rates determined in our isolated tissue model are in line with long-term restructuring of the entire tissue.

While Na^+/K^+ -ATPase activities in isolated gills were variable and reduced by about 30% under CO_2 at both temperatures its maximum capacity *in vitro* was maintained at 10°C and rose at 18°C regardless of CO_2 levels. Branchial Na^+/K^+ -ATPase capacity may mirror the concentration of the enzyme protein, independent of its use *in vivo*. In earlier studies an increased Na^+/K^+ -ATPase capacity after cold acclimation was found in pupfish, rainbow trout, perch and Atlantic cod (Packer and Garvin, 1998; Staurnes et al., 1994; Jürss et al., 1987; Stuenkel and Hillyard 1980). In contrast, Na^+/K^+ -ATPase capacity increased at warmer temperatures in different Antarctic fish species (Brauer et al., 2005; Guynn et al., 2002; Staurnes et al., 1994), turbot (Imsland et al., 2003) and carp (Metz et al., 2003). The present findings of *in vivo* rates being down-regulated under CO_2 while capacities are only correlated with temperature, do not indicate a compensatory down-regulation of Na^+/K^+ -ATPase use in

the warmth, but only under elevated CO₂ concentrations. Further study of branchial Na⁺/K⁺-ATPase capacities in warm acclimated cod under normocapnia are needed to support this observation.

Table 2: Percent changes of branchial Na⁺/K⁺-ATPase (NAK) abundance and use (determined from fractional respiration) as well as capacity (maximum activity) in marine fish at different levels of elevated PCO₂ quantified by means of mRNA expression, protein abundance, homogenate assays of enzymatic activity. Arrows indicate the direction of change.

PCO ₂ (µatm) treatment	Species	Method for branchial Na ⁺ /K ⁺ -ATPase	~ Change NAK	Reference
high levels				
10 000 (acute)	<i>N. corriceps</i> <i>G. gibberifrons</i>	Fractional respiration: isolated gills	↑30-100%	Deigweiher et al., 2010
10 000 (day 4-42) (day 2-42) (day 2-42)	<i>Z. viviparus</i>	mRNA expression Protein abundance Enzyme capacity	↑~200% ↑25-35% ↑ ≤ 60 %	Deigweiher et al., 2008
10 000&50 000	<i>P. olivaceous</i>	Enzyme capacity	↑	Ishimatsu et al., 2005 & unpublished data in Ishimatsu et al., 2005
6000 (1 year)	<i>G. morhua</i>	Protein abundance Enzyme capacity	↑120% ↑100%	Melzner et al., 2009
medium levels				
3000 (4 months)	<i>G. morhua</i>	Protein abundance Enzyme capacity	→ →	Melzner et al., 2009
2500 (2 months)	<i>G. morhua</i>	Enzyme capacity	→	Present study
3000 (acute)	<i>G. morhua</i>	Fractional respiration: isolated gill cells	↓55%	Stapp et al., (unpublished data)
2500 (2 months)	<i>G. morhua</i>	Fractional respiration: isolated gills Enzyme capacity	↓30% →	Present study
1900 (24h)	<i>O. beta</i>	Enzyme capacity	↓-65%	Esbaugh et al.,
1900 (72h)		Enzyme capacity	→	2012

Few studies have focused on responses of Na⁺/K⁺-ATPase to hypercapnic conditions in fish and most of them used rather high CO₂ levels. Table 2 summarizes changes in branchial Na⁺/K⁺-ATPase capacity or rather its mRNA expression, protein abundance, enzymatic activity and/or fractional respiration in marine fish after whole animal or tissue incubation under different levels of PCO₂. Changes were normalised to approximate percent differences from controls. All data indicate an enhanced oxygen demand of Na⁺/K⁺-ATPase under high CO₂ levels (6,000-50,000 µatm), for acute as well as long-term incubations (Deigweiher et al., 2010; Melzner et al., 2009; Deigweiher et al., 2008; Ishimatsu et al., 2005), possibly due to enhanced acid-base regulation that might trigger the upregulation of Na⁺/K⁺-ATPase (Deigweiher et al., 2008).

The present study and related measurements in isolated cod gill cells indicate that this effect on Na^+/K^+ -ATPase is CO_2 -dose dependent. Under PCO_2 levels of 3,000 μatm isolated gill cells showed a rate reduction by more than 50% below control values in fractional respiration attributable to Na^+/K^+ -ATPase (Stapp et al., unpublished data). Esbaugh et al. (2012) found decreased Na^+/K^+ -ATPase capacities in gill tissue of *Opsanus beta* after 24 h of exposure to 1,900 μatm CO_2 , which returned to control levels after 72 h of exposure. The reduction of Na^+/K^+ -ATPase activity after a short incubation period might only be transient reflecting fluctuations in mRNA, protein abundance and associated enzyme capacity as for example seen for Na^+/K^+ -ATPase and Na^+/H^+ exchanger of the common eelpout during the time course of hypercapnic exposure (Deigweiher et al., 2008). Unchanged branchial Na^+/K^+ -ATPase abundance and capacity in cod after long-term incubation at 3,000 μatm (Melzner et al., 2009) suggest that the concentrations of enzyme components of the ion regulatory system remain unchanged at lower PCO_2 levels. In the present study, modulation of Na^+/K^+ -ATPase and the use of dependent transporters led to a 30% reduction in the use of *in vivo* Na^+/K^+ -ATPase, at unchanged expression of Na^+/K^+ -ATPase capacities after 8-10 weeks under moderately elevated CO_2 levels of 2,500 μatm . The fact that no down-regulation (e.g. reduction of functional capacities) occurred at high temperatures indicates that Na^+/K^+ -ATPase content also remained unchanged. Altogether, these findings suggest that a certain PCO_2 threshold exists, beyond which Na^+/K^+ -ATPase becomes up-regulated in cod gills. Moderately elevated PCO_2 even cause a decreased use of this ATPase. In fact, the PCO_2 conditions applied may indicate control more than stressed conditions with the range of 2,000-4,500 μatm being close to *in vivo* levels in fish blood (Melzner et al., 2009; Larsen et al., 1997; Claireaux and Dutil, 1992). In light of this discussion the reason for a decreased percent contribution of Na^+/K^+ -ATPase to *in vivo* oxygen demand at intermediate CO_2 levels remains unclear, except that ion leakage may be reduced and energy economy emphasized under such moderate levels of hypercapnia.

4.4 Energy dependent ion and acid-base regulation

The predominant localisation of Na^+/K^+ -ATPase in mitochondria-rich cells of teleost gills (Evans et al., 2005) and its high fractional costs *in vivo* (see above) led us to determine *in vitro* ATPase capacities and estimate the interdependence of ATP-producing and -consuming ATPases under the effect of long-term exposure to hypercapnia and combined hypercapnia and temperature changes. All investigated branchial ATPases including F_1F_0 -ATPase capacities increased significantly in fish reared under hypercapnia at 18°C and assayed at 18°C, indicating a coordinated change in the capacities of ATP production and consumption. Consequently, gill oxygen consumption from warm acclimated fishes was elevated. Effects of thermal acclimation on branchial F_1F_0 -ATPase or H^+ -ATPase capacities

have rarely been studied. In *Gillichthys mirabilis*, acclimated to 7 and 26°C, H⁺-ATPase capacities measured at 25°C were identical (Kültz and Somero, 1995). Similarly, H⁺-ATPase capacities from cod acclimated to 10 or 18°C and compared at a common assay temperature of 18°C were the same and thus, not modified by acclimation.

H⁺-ATPase is energetically less advantageous than electroneutral Na⁺/H⁺-exchange, which raises doubt about whether it contributes significantly to acid excretion in marine fish (Tresguerres et al., 2005). Direct evidence for the involvement of H⁺-ATPase in acid-base regulation under long-term hypercapnia could not be provided in the present study. However, under elevated CO₂ treatment and at 18°C changes in F₁F₀-ATPase capacities were correlated with those of H⁺-ATPase more than with Na⁺/K⁺-ATPase capacities indicating enhanced involvement of H⁺-ATPase under these conditions. A more detailed picture of processes contributing to ATP turnover under elevated CO₂ remains to be developed.

Summary and Conclusions

Acclimation to elevated *PCO*₂ levels, as expected under conditions of future ocean acidification, at 10°C for 8-10 weeks did not affect total energy demand of the cod gill. Protein synthesis and RNA-synthesis remained unaffected by elevated *PCO*₂. However, the percent fraction of Na⁺/K⁺-ATPase related oxygen consumption decreased under hypercapnia, indicating that the *in vivo* contribution of Na⁺/K⁺-ATPase to energy demand was reduced at intermediate *PCO*₂ levels. Enzyme capacities remained unchanged but were then underexploited. This contradicts earlier findings under more severe hypercapnia, where both *in vivo* demand and enzyme capacities of Na⁺/K⁺-ATPase were upregulated, suggesting a stimulation of ion regulation and emphasizing the importance of measuring both, *in vivo* use and *in vitro* capacity. As total gill oxygen consumption was unchanged the processes compensating for the reduced use of Na⁺/K⁺-ATPase remain to be identified. In fish acclimated to warming under elevated *PCO*₂, higher gill respiration rates at increased protein and RNA synthesis rates were paralleled by increased F₁F₀-ATPase, H⁺-ATPase and less so, Na⁺/K⁺-ATPase capacities as well as protein contents. The mechanisms causing the distinct temperature dependent minimum in gill O₂ demand under elevated CO₂ and acute temperature exposure remain to be established. This thermal optimum and the reduced involvement of Na⁺/K⁺-ATPase activity under moderate hypercapnia *in vivo* suggest that CO₂ levels close to the range of *in vivo* values support cost savings and a high efficiency of cellular energy turnover, which may benefit whole animal performance.

Acknowledgements

The authors would like to thank Nils Koschnick, Melanie Schiffer and Lars Harms and the crew of Uthörn for their help in the collection of fish, Silvia Hardenberg and Guido Krieten for

their help in fish maintenance in Bremerhaven, as well as Sebastian Berger and Laura Stapp for their support in the preparation of fish tissues. Nils Koschnick and Karim Zanaty conducted the enzyme capacity measurements, which is gratefully acknowledged. This work contributes to the Bundesministerium für Forschung und Bildung funded project “Biological Impacts of Ocean Acidification” (BIOACID) and is part of the “Polar regions and coasts in a changing earth system” (PACES) research programme of the Alfred-Wegener-Institute for Polar and Marine Research.

References

- Arjona F.J.**, Vargas-Chacott L. Ruiz-Jarabo I., del Rio M.P.M., Mancera J.M. (2007). Osmoregulatory response of Senegalese sole (*Solea senegalensis*) to changes in environmental salinity. *Comp. Biochem. Physiol. A* 148, 413-421.
- Bateman, J.B.**, Keys, A., 1933. Respiration of isolated gill tissue of the eel. *J. Physiol.* 77(3), 271-286.
- Björnsson, B.**, Steinarsson, A., Árnason, T., 2007. Growth model for Atlantic cod (*Gadus morhua*): Effects of temperature and body weight on growth rate. *Aquacult* 271, 216-266.
- Boeuf, G.**, Payan, P., 2001. How should salinity influence fish growth? *Comp. Biochem. Physiol. C. Toxicol. Pharmacol.* 130(4), 411-423.
- Boutilier, R.G.**, Heming, T.A., Iwama, G.K., 1984. Appendix: Physicochemical parameters for use in fish respiratory physiology. In: Hoar, W.S.; Randall, D.J., (eds.), *Fish Physiology* 10. Academic, San Diego, pp. 203-230.
- Bradford, M.M.**, 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72, 248-254.
- Brauer, P.R.**, Sanmann, J.N., Petzel, D.H., 2005. Effects of warm acclimation on Na⁺/K⁺-ATPase alpha-subunit expression in chloride cells of Antarctic fish. *Anat. Rec. A* 285, 600-609.
- Caldeira, K.**, Wickett, M.E., 2005. Ocean model predictions of chemistry changes from carbon dioxide emissions to the atmosphere and oceans. *G. Geophys. Res.* 110(C9), DOI: 10.1029/2004JC002671.
- Caldeira, K.**, Wickett, M.E., 2003. Anthropogenic carbon and ocean pH. *Nature* 425, 365.
- Carter, C.G.**, Houlihan, G.F., 2001. Protein synthesis. In: Walsh, P.J., Mommsen, T.P. (eds.), *Nitrogen excretion*, vol. 19. *Fish physiology*, Academic, New York, pp. 31-75.
- Casey, T.M.**, Pakay, J.L., Guppy, M., Arthur, P.G., 2002. Hypoxia causes downregulation of protein and RNA synthesis in noncontracting mammalian cardiomyocytes. *Circ. Res.* 90(7), 777-783.

- Catches, J.S.**, Burns, J.M., Edwards, S.L., Claiborne, J.B., 2006. Na⁺/H⁺ antiporter, V-H⁺-ATPase and Na⁺/K⁺-ATPase immunolocalization in a marine teleost (*Myoxocephalus octodecemspinosus*). J. Exp. Biol. 204, 3251-3259.
- Claiborne, J.B.**, Edwards, S.L., Morrison-Shetlar, A.I., 2002. Acid-base regulation in fishes: Cellular and molecular mechanisms. J. Exp. Zool. 293, 302-319.
- Claireaux, G.**, Dutil, J.-D., 1992. Physiological response of the Atlantic cod (*Gadus morhua*) to hypoxia on various environmental salinities. J. Exp. Biol. 163, 97-118.
- Clarke, A.**, Pörtner, H.O., 2010. Temperature, metabolic power and the evolution of endothermy. Biol. Rev. doi:10.1111/j.1469-185X.2010.00122.x.
- Clarke, A.**, Fraser, K.P.P., 2004. Why does metabolism scale with temperature? Funct. Ecol. 10:243-251.
- Clark, D.S.**, Green, J.M., 1991. Seasonal variation in temperature preference of juvenile Atlantic cod (*Gadus morhua*), with evidence supporting an energetic basis for their diel vertical migration. Can. J. Zool. 69, 1302-1307.
- Deigweier, K.**, Hirse, T., Bock, C., Lucassen, M., Pörtner, H.-O., 2010. Hypercapnia induced shifts in gill energy budgets of Antarctic notothenoids. J. Comp. Physiol. B 180, 347-359.
- Deigweier, K.**, Koschnick, N., Pörtner, H.-O., Lucassen, M., 2008. Acclimation of ion regulatory capacities in gills of marine fish under environmental hypercapnia. Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol. 295(5), R1660-R1670.
- De Renzis, G.**, Bornancin, M., 1984. Ion transport and gill ATPases. In: Hoar W.S., Randall D.J. (Eds.). Fish Physiology, Academic, San Diego, vol. 10, pp. 65-104.
- Esbaugh, A.J.**, Heuer, R., Grosell, M., 2012. Impacts of ocean acidification on respiratory gas exchange and acid-base balance in a marine teleost, *Opsanus beta*. J. Comp. Physiol. B 182, 921-934.
- Evans, D.H.**, Piermaini, P.M., Choe, K.P., 2005. The multifunctional fish gill: dominant site of gas exchange, osmoregulation, acid-base regulation and excretion of nitrogenous waste. Physiol. Rev. 85, 97-177.
- Gibbs, A.**, Somero, G.N., 1990. Na⁺/K⁺-adenosine triphosphatase activities in gills of marine teleost fishes: Changes with depth, size and locomotory activity level. Mar. Biol. 106(3), 315-321.
- Gonzalez-Cabrera, P.J.**, Dowd, F., Pedibhotla, V.K., Rosario, R., Stanley-Samuelson, D., Petzel, D., 1995. Enhanced hypo-osmoregulation induced by warm-acclimation in Antarctic fish is mediated by increased gill and kidney Na⁺/K⁺-ATPase activities. J. Exp. Biol. 198, 2279-2291.
- Gruber, N.**, Hauri, C., Lachkar, Z., Loher, D., Frölicher, T.L., Plattner, G.K., 2012. Rapid progression of ocean acidification in the Californian current system. Science 337, 220.

- Guynn, S.R.**, Scofield, M.A., Petzel, D.H., 2002. Identification of mRNA and protein expression of the Na⁺/K⁺-ATPase α 1-, α 2- and α 3-subunit isoforms in Antarctic and New Zealand nototheniid fishes. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 273, 15-32.
- Hawkings, G.S.**, Galvez, F., Goss, G.G., 2004. Seawater acclimation causes independent alterations in Na⁺/K⁺- and H⁺-ATPase activity in isolated mitochondria-rich cell subtypes of the rainbow trout gill. *J. Exp. Biol.* 207, 905-912.
- Hawkins, A.D.**, Soofiani, N.M., Smith, G.W., 1985. Growth and feeding of juvenile cod. *ICES J. Cons.* 42(1), 11-32.
- Heisler, N.**, 1993. Acid-base regulation. In: Evans D.H. (Ed.) *The Physiology of Fishes*, CRC Press Inc, Boca Raton, pp. 343-377.
- Heisler, N.**, 1986. Buffering and transmembrane ion transfer processes. In: Heisler, N (Ed.), *Acid-base regulation in animals*, Elsevier, Amsterdam, pp 3-47.
- Heisler, N.**, 1984. Acid-base regulation in fishes. In: Hoar W.S. and Randall D.J. (Eds.), *Fish Physiology*, vol. 10, Academic, New York, pp. 315-401.
- Holmgren, S.**, Nilsson, S., 1974. Drug effects on Isolated Artery Strips from two teleosts, *Gadus morhua* and *Salmo gairdneri*. *Act. Physiol. Scand.* 90, 431-437.
- Imsland, A.K.**, Gunnarsson, S., Foss, A., Stefansson, S.O., 2003. Gill Na⁺, K⁺-ATPase activity, plasma chloride and osmolality in juvenile turbot (*Scophthalmus maximus*) reared at different temperatures and salinities. *Aquac.* 218, 671-683.
- Ishimatsu, A.**, Hayashi, M., Lee, K.S., Kikkawa, T., Kita, J., 2005. Physiological effects of fishes in a high-CO₂ world. *J. Geophys. Res.* 110, 10.1029/2004JC002564.
- Johansen, K.** and Pettersson, K., 1981. Gill O₂ consumption in a teleost fish, *Gadus morhua*. *Respir. Physiol.* 44(3), 277-284.
- Jürss, K.**, Bittorf, T.H., Voekler, T.H., Wacke, R., 1987. Effects of temperature, food deprivation and salinity on growth, RNA/DNA ratio and certain enzyme activities in rainbow trout (*Salmo gairdneri* Richardson). *Comp. Biochem. Physiol. B* 87, 241-253.
- Kato, K.**, Matsubara, T., Sakamoto, N., 1994. Correlation between myocardial blood flow and tissue succinate during acute ischemia. *Nagoya Med. Sci.* 57, 43-50.
- Krumschnabel, G.**, Malle, S., Schwarzbaum, P.J., Wieser, W., 1994. Glycolytic function in goldfish hepatocytes at different temperatures: relevance for Na⁺ pump activity and protein synthesis. *J. Exp. Biol.* 192, 285-290.
- Krumschnabel, G.**, Wieser, W., 1994. Inhibition of the sodium pump does not cause a stoichiometric decrease of ATP-production in energy limited fish hepatocytes. *Experientia* 50, 483-485.
- Kültz, D.**, Somero, G.N., 1995. Osmotic and thermal effects on in situ ATPase activity in permeabilized gill epithelial cells of the fish *Gillichthys mirabilis*. *J. Exp. Biol.* 198, 1883-1894.

- Langenbuch, M.**, Pörtner, H.-O., 2003. Energy budget of hepatocytes from Antarctic fish (*Pachycara brachycephalum* and *Lepidonotothen kempfi*) as a function of ambient CO₂: pH dependent limitations of cellular protein biosynthesis? J. Exp. Biol. 206, 3895-3903.
- Lannig, G.**, Eilers, S., Pörtner, H.-O., Sokolova, I.M., Bock, C., 2010. Impact of ocean acidification on energy metabolism of oyster *Crassostrea gigas*- changes in metabolic pathways and thermal response. Mar. Drugs 8, 2318-2339.
- Lannig, G.**, Bock, C., Sartoris, F., Pörtner, H.-O., 2004. Oxygen limitation of thermal tolerance in cod, *Gadus morhua* L., studied by magnetic resonance imaging and online-venous oxygen monitoring. Am. J. Physiol. Regul. Integr. Physiol. Comp. 287, R902-910.
- Larsen, B.K.**, Pörtner, H.-O., Jensen, F.B., 1997. Extra-and intracellular acid-base balance and ionic regulation in cod (*Gadus morhua*) during combined and isolated exposures to hypercapnia and copper. Mar. Biol. 128, 337-346.
- Le Belle, J.E.**, Harris, N.G., Williams, S.R., Bhakoo, K.K., 2002. A comparison of cell and tissue extraction techniques using high-resolution ¹H-NMR spectroscopy. NMR Biomed. 15(1), 37-44.
- Lyndon, A.R.**, 1994. A method for measuring oxygen consumption in isolated perfused gills. J. Fish Biol. 44(4), 707-715.
- Mark, F.C.**, Hirse, T., Pörtner, H.-O., 2005. Thermal sensitivity of cellular energy budgets in some Antarctic fish hepatocytes. Polar Biol. 28, 805-814.
- Mark, F.C.**, Lucassen, M., Pörtner, H.O., 2006. Thermal sensitivity of uncoupling protein expression in polar and temperate fish. Comp. Biochem. Physiol. D, 365-374.
- McCormick, S.D.**, Moyes, C.D., Ballantyne, J.S., 1989. Influence of salinity on the energetics of gill and kidney of Atlantic salmon (*Salmo salar*). Fish Physiol. Biochem. 6(4), 243-254.
- McKenzie, D.J.**, Piccolella, M., Dalla Valle, A.Z., Taylor, E.W., Bolis, C.L., Steffensen, J.F., 2003. Tolerance of chronic hypercapnia by the European eel *Anguilla anguilla*. J. Exp. Biol. 206, 1717-1726.
- Marshall, W.S.**, 2002. Na⁺, Cl⁻, Ca²⁺ and Zn²⁺ transport by fish gills: retrospective review and prospective synthesis. J. Exp. Zoo. 293, 264-283.
- Martin, N.B.**, Houlihan, D.F., Talbot, C., Palmer, R.M., 1993. Protein metabolism during sexual maturation in female Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) Fish Physiol. Biochem. 12, 131-141.
- Meinshausen, M.**, Smith, S.J., Calvin, K., Daniel, J.S., Kainuma, M.L.T., Lamarque, J.-F., Matsumoto, K., Montzka, S.A., Raper, S.C.B., Riahi, K., Thomson, A., Velders, G.J.M., van Vuuren, D.P.P., 2011. The RCP greenhouse gas concentrations and their extensions from 1765 to 2300. Clim. Chang. 109, 213-241.

- Metz, J.R.**, van den Burg, E.H., Wendelaar Bonga, S.E., Flik, G., 2003. Regulation of branchial Na^+/K^+ -ATPase in common carp *Cyprinus carpio* L. acclimated to different temperatures. *J. Exp. Biol.* 206, 2273-2280.
- Melzner, F.**, Thomsen, J., Koeve, W., Oschlies, A., Gutowska, M.A., Bange, H.W., Hansen, H.P., Körtzinger, A., 2013. Future ocean acidification will be amplified by hypoxia in coastal habitats. *Mar. Biol.* 160, 1875-1888.
- Melzner, F.**, Göbel, S., Langenbuch, M., Gutowska, M.A., Pörtner, H.-O., Lucassen, M., 2009. Swimming performance in Atlantic Cod (*Gadus morhua*) following long-term (4-12 months) acclimation to elevated seawater PCO_2 . *Aquat. Toxicol.* 92, 30-37.
- Morgan, J.D.**, Iwama, G.K., 1999. Energy cost of NaCl transport in isolated gills of cutthroat trout. *Am. J. Physiol.* 277(3), R631-R639.
- Neat, F.**, Righton, D., 2007. Warm water occupancy by North Sea cod. *Proc. R. Soc. London B*, 274, 789-798.
- O'Grady, S.M.**, DeVries, A.L., 1982. Osmotic and ionic regulation in polar fishes. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 57, 219-228.
- Packer, R.K.**, Garvin, J.L., 1998. Seasonal differences in activity of perch (*Perca flavescens*) gill Na^+/K^+ -ATPase. *Comp. Biochem. Physiol. B* 120, 777-783.
- Pérez-Casanova, J.C.**, Afonso, L.O.B., Johnson, S.C., Currie, S., Gamperl, A.K., 2008a. The stress and metabolic response of juvenile Atlantic cod *Gadus morhua* L. to an acute thermal challenge. *J. Fish. Biol.* 72, 899-916.
- Pérez-Casanova, J.C.**, Rise, M.L., Dixon, B., Afonso, L.O.B., Hall, J.R., Johnson, S.C., Gamperl, A.K., 2008b. The immune and stress responses of Atlantic cod to long-term increases in water temperature. *Fish Shellfish Immunol.* 24, 600-609.
- Perry, S.F.**, Gilmour, K.M., 2006. Acid-base balance and CO_2 excretion in fish: Unanswered questions and emerging models. *Respir. Physiol. Neurobiol.* 154, 199-215.
- Petterson, K.**, Nilsson, S., 1980. Drug induced Changes in Cardio-Vascular Parameters in the Atlantic Cod, *Gadus morhua*. *J. Comp. Physiol.* 137, 131-138.
- Platzack, B.**, Axelsson, M., Nilsson, S., 1993. The Renin-Angiotensin system in blood pressure control during exercise in the cod *Gadus morhua*. *J. Exp. Biol.* 180, 253-262.
- Pörtner, H.-O.**, Bickmeyer, U., Bleich, M., Bock, C., Brownlee, C., Melzner, F., Michaelidis, B., Sartoris, F.-J., Storch, D., 2010. Studies of acid-base status and regulation. In: Riesebell, U., Fabry, V.J., Hansson, L., Gattuso, J.-P. (Eds.), Guide to best practices for ocean acidification research and data reporting, Publications office of the European Union, Luxembourg, pp. 137-166.
- Pörtner, H.-O.**, 2008. Ecosystem effects of ocean acidification in times of ocean warming: a physiologist's view. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 373, 203-217.

- Pörtner H.O.**, Lucassen M., Storch D., 2005. Metabolic biochemistry: its role in thermal tolerance and in the capacities of physiological and ecological function. In: Hoar, W.S., Randall, D.R., Farrell, A.P. (Eds.) (Guest Eds.: A.P. Farrell and J. F. Steffensen) The Physiology of Polar Fishes, vol. 22. Fish Physiology, Elsevier, San Diego, pp. 79-154.
- Pörtner, H.-O.**, 2002. Climate change and temperature dependent biogeography: systemic to molecular hierarchies of thermal tolerance in animals. *Comp. Biochem. Physiol. A* 132, 739-761.
- Pörtner, H.-O.**, Berdal, B., Blust, R., Brix, O., Colosimo, 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., Zakhartsev, 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.**, Bock, C., Reipschläger, A., 2000. Modulation of the cost of pH_i regulation during metabolic depression: A ³¹P-NMR study in invertebrate (*Sipunculus nudus*) isolated muscle. *J. Exp. Biol.* 203, 2417-2428.
- Rahn, H.**, Baumgardener, F.W., 1972. Temperature and acid-base regulation in fish. *Respir. Physiol.* 14, 171-182.
- Righton, D.A.**, Andersen, K.H., Neat, F., Thorsteinsson, V., Steingrund, P., Svedäng, H., Michalsen, K., Hinrichsen, H.-H., Bendall, V., Neuenfeldt, S., Wright, P., Jonsson, P., Huse, G., van der Kooij, J., Mosegaard, H., Hüsey, K., Metcalfe, J., 2010. Thermal niche of Atlantic cod *Gadus morhua*: limits, tolerance and optima. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 420, 1-13.
- Romao, S.**, Freire, C.A., Fanta, E., 2001. Ionic regulation and Na⁺-K⁺-ATPase activity in gills and kidney of the Antarctic agglomerular cod icefish exposed to dilute sea water. *J. Fish Biol.* 59, 463-468.
- Sartoris, F.J.**, Bock, C., Serendero, I., Lannig, G., Pörtner, H.-O. 2003. Temperature-dependent changes in energy metabolism, intracellular pH and blood oxygen tension in the Atlantic cod. *J. Fish Biol.* 62, 1239-1253.
- Seidelin, M.**, Brauner, C.J., Jensen, F.B., Madsen, S.S., 2001. Vacuolar-Type H⁺-ATPase and Na⁺, K⁺-ATPase expression in gills of Atlantic Salmon (*Salmo salar*) during isolated and combined exposure to hyperoxia and hypercapnia in fresh water. *Zool. Soc. Jpn.* 18(9), 1199-1205.
- Stagg, R.M.**, Shuttleworth, T.J., 1982. Na⁺/K⁺-ATPase, quabain binding and quabain-sensitive oxygen consumption in gills from *Plachthys flesus* adapted to seawater and freshwater. *J. Comp. Physiol.* 147, 93-99.

- Staurnes, M.**, Rainuzzo, J.R., Sigholt, T., Jorgensen, L., 1994. Acclimation of Atlantic cod (*Gadus morhua*) to cold water; stress response, osmoregulation, gill lipid composition and gill Na⁺-K⁺-ATPase activity. *Comp. Biochem. Physiol. A* 109, 413-421.
- Stuenkel, E.L.**, Hillyard, S.D., 1980. Effects of temperature and salinity on gill Na⁺-K⁺-ATPase activity in the pupfish, *Cyprinodon salinus*. *Comp. Biochem. Physiol. A* 67, 179-183.
- Tresguerres, M.**, Katoh, F., Fenton, H. Jasinska, E., Goss, G.G., 2005. Regulation of branchial V-H⁺-ATPase, Na⁺/K⁺-ATPase and NHE2 in response to acid and base infusions in the Pacific spiny dogfish (*Squalus acanthias*). *J. Exp. Biol.* 208, 345-354.
- Urist, M.R.**, 1963. The regulation of calcium and other ions in the serum of hagfish and lampreys. *Ann. Ny. Acad. Sci.* 109, 294-311.
- Van Waarde, A.**, van den Thillart, G., Kesbeke, F., 1983. Anaerobic energy metabolism of the European eel, *Anguilla Anguilla L.* *J. Comp. Physiol.* 149, 469-475.
- Wahlquist, I.** and Nilsson, S., 1977. The role of sympathetic fibers and circulating catecholamines in controlling the blood pressure and heart rate in the cod *Gadus morhua*. *Comp. Biochem. Physiol. C* 57, 65-67.
- Weiss, M.**, Heilmayer, O., Brey, T., Lucassen, M. and Pörtner, H.-O., 2012. Physiological capacity of *Cancer setosus* larvae- adaptation to El Nino Southern Oscillation conditions. *J. Exp. Biol.* 413, 100-105.

Publikation II

Ocean warming and acidification modulate energy budget and gill ion regulatory mechanisms in Atlantic cod (*Gadus morhua*)

Kreiss, C.M.^{1*}, Michael, K.¹, Lucassen, M.¹, Jutfelt, F.^{2,3}, Motyka, R.², Dupont, S.³, Pörtner, H.-O¹.

¹Alfred Wegener Institute, Helmholtz Center for Marine and Polar Research, Integrative Ecophysiology, Am Handelshafen 12, D-27570 Bremerhaven, Germany

² Department of Biological and Environmental Sciences, University of Gothenburg, PO Box 463, Gothenburg, SE-405 30, Sweden

³ The Sven Lovén Centre for Marine Sciences, Kristineberg 566, Fiskebäckskil Se-451 78, Sweden

*Corresponding author:

Cornelia M. Kreiss

Cornelia.Kreiss@awi.de

Abstract

Ocean warming and acidification are threatening marine ecosystems. In marine animal species acidification is thought to enhance ion regulatory costs and thereby baseline energy demand, while elevated temperature also increases baseline metabolic rate. Here we investigated standard metabolic rates (SMR) and plasma parameters of Atlantic cod (*Gadus morhua*) after 3-4 weeks of exposure to ambient and future PCO_2 levels (550 μatm , 1,200 μatm and 2,200 μatm) and at two temperatures (10°C, 18°C). *In vivo* branchial ion regulatory costs were studied in isolated, perfused gill preparations. Animals reared at 18°C responded to $\geq 1,200 \mu\text{atm}$ CO_2 by elevating SMR above those of the 10°C groups. Isolated gills at 10°C and elevated PCO_2 ($\geq 1,200 \mu\text{atm}$) displayed increased soft tissue mass, in parallel to increased gill oxygen demand, as a fraction of whole animal energy budget. Altered gill size was not found at 18°C, whereas a shift in ion regulation mechanisms towards higher use of Na^+/H^+ -exchanger and HCO_3^- transport was observed at high PCO_2 (2,200 μatm) and 18°C, paralleled by higher Na^+/K^+ -ATPase activities. This shift did not effect total gill energy consumption leaving whole animal energy budget unaffected. Higher Na^+/K^+ -ATPase activities in the warmth might compensate for enhanced branchial permeability and led to the reduced plasma Na^+ and/or Cl^- concentrations and slightly lowered osmolalities seen at 18°C and 550 or 2,200 μatm CO_2 . Overall, the gill as a key ion regulation organ seems to be highly effective in supporting the resilience of cod to effects of ocean warming and acidification.

Key words: Na^+/K^+ -ATPase, H^+ -ATPase, HCO_3^- transporter, Na^+/H^+ -exchanger, standard metabolic rate, osmolality

1 Introduction

Anthropogenic climate change has profound impacts on marine ecosystems as the oceans become warmer and are acidified by the uptake of atmospheric carbon dioxide (Pörtner et al., 2014). Depending on emission scenario atmospheric PCO_2 levels are projected to reach between 420 μatm and 940 μatm until the year 2100, consistent with an average decrease in surface ocean pH by 0.13 to 0.42 units. Most of the ocean will continue to warm although rates vary regionally and differ highly between emission scenarios (Collins et al. 2013). Initial studies projected that highly mobile organisms such as marine fishes are excellent osmotic and acid-base regulators and therefore better able to cope with acidification than e.g. more inactive invertebrates with lower ion regulation capacity. Recent behavioral studies, mainly of coral reef fish larvae have challenged this view and suggested that these fish are very sensitive when ambient CO_2 increases (e.g. Simpson et al. 2011; Munday et al. 2012; Nilsson et al. 2012; Forsgren et al. 2013). Behavioral effects on sensitive fish species set in at rather low concentrations ($<850 \mu\text{atm } CO_2$), however, the long-term persistence of these phenomena remains to be explored (Wittmann and Pörtner 2013). Atlantic cod appears more resilient to behavioral disturbances at CO_2 levels below 1,000 μatm (Jutfelt and Hedgärde 2013) and up to 4,200 μatm (Maneja et al. 2013). In juvenile cod aerobic swimming performance was unaffected by exposure to high PCO_2 (3,000 & 6,000 μatm) at close to optimum temperatures (Melzner et al. 2009). Larval stages may be more sensitive. Severe tissue damage was reported for a fraction of the larval offspring of Norwegian coastal cod (Frommel et al. 2011), whereas early larval stages from Baltic cod seemed to be more robust under elevated PCO_2 (up to 3,200 μatm) (Frommel et al. 2013). However, Atlantic cod was also shown to avoid hypercapnic water, indicating that elevated PCO_2 may cause stress (Jutfelt and Hedgärde 2013).

More is known about the sensitivity of fish including Atlantic cod to temperature changes (for review see Pörtner et al. 2008; Pörtner and Peck 2010). In cod, the thermal range and associated growth performance characterize populations in a latitudinal cline. The thermal window of performance is wide in juvenile fishes and shrinks with increasing body size, especially due to a weight dependent shift in thermal optima and upper thermal limits to cooler temperatures (Pörtner et al. 2008). The warm induced decline in performance indicates thermal limitation and has been attributed to the onset of a mismatch between oxygen supply capacity and costs on the one hand and oxygen demand on the other hand, at so-called pejus temperatures. In a study on eelpout (*Zoarces viviparus*) pejus limits were identified to parallel the onset of ecological effect, a loss in field abundance due to warming extremes (Pörtner and Knust 2007). When studied in cannulated young adult cod (mean weight: 847g) progressive warming beyond a putative critical limit of 16°C caused a sharp drop in venous PO_2 (P_{VO_2}), in parallel to the onset of cardiac arrhythmia (Lannig et al. 2004;

it should be noted that cannulation may enhance circulatory cost and cause a downward shift of these limits). As cardiac activity did not compensate for reduced P_{VO_2} in the warmth, reduced oxygen supply to tissues and thus decreased aerobic scope of the whole organism beyond pejus limits was proposed as the first level of thermal limitation (Lannig et al. 2004; Pörtner et al. 2004). Such a decrease in aerobic scope might explain a decrease in growth rates beyond temperatures of 12°C (80-400g FW; Fischer 2003; Björnsson et al. 2007).

Recent work in several taxa including fish showed that tolerance to warming extremes is reduced under elevated CO_2 levels, indicating a narrowing of species-specific thermal windows (Wittmann and Pörtner 2013). Water breathers exposed to elevated PCO_2 in seawater need to re-establish acid-base equilibria through proton equivalent ion exchange. In marine fish ion regulation mainly takes place in the gills causing a net uptake of bicarbonate within 20-30 min, varying with the extent of acid-base disturbance (Evans et al. 2005). Membrane proteins, including Na^+/H^+ -exchangers, V-type H^+ -ATPase, HCO_3^- -transporters and Na^+/HCO_3^- co-transporters contribute to these processes and have associated energetic costs (Claiborne et al. 2002; Perry and Gilmour 2006; Deigweiher et al. 2008; Melzner et al. 2009). Many studies have focused on the identification and location of the proteins involved in acid-base regulation applying immunological and molecular techniques, while knowledge of *in vivo* usage of specific transporter and associated metabolic costs is scarce. In branchial tissue Na^+/K^+ -ATPase is generally thought to be the key transporter driving most energy dependent ion transport processes including those related to acid-base regulation (Deigweiher et al. 2008). An upregulation of this important transporter protein, determined via analyses of activity in isolated gills or of enzyme capacity in crude gill homogenates in cod, notothenioids, and eelpout gills was observed under CO_2 concentrations of $>6,000 \mu atm$; ranging from acute exposure to up to one year of acclimation (Deigweiher et al. 2008, Melzner et al. 2009; Deigweiher et al. 2010). In contrast, cod acclimated long-term to moderately elevated PCO_2 ($2,500 \mu atm$) revealed reduced branchial energy turnover *in vivo* at unchanged *in vitro* Na^+/K^+ -ATPase capacity (Kreiss et al. 2015).

To identify the mechanisms underlying observations in cod we conducted a follow-up experiment with transporter specific inhibitors in order to identify essential mechanisms of acid-base regulation. We exposed Atlantic cod from the Kattegat/Skagerrak to different levels of PCO_2 and temperature for 4 weeks. Atlantic cod is expected to experience strong anthropogenic climate change (Drinkwater 2005), as its habitat on the European Shelf is estimated to undergo one of the highest rates of change in seasonal temperature maxima and minima (Taboada and Anadon 2012). The North Sea region might also exceed the globally predicted average of acidification and reach $1,000 \mu atm CO_2$ already around the year 2060 (Blackford and Gilbert 2007). In our experiments we used 10°C as the optimum temperature, close to average habitat temperature and the maximum growth temperature of

young adults of this species (Pörtner et al. 2008). For the high temperature treatment we chose 18°C as this is well in the range of maximum summer values experienced by Atlantic cod (Neat and Righton 2007; Righton et al. 2010). PCO_2 levels were selected to cover present and future natural variability at the study site: 550 μatm was chosen as a low value, 1,200 μatm as a medium and 2,200 μatm as a high CO_2 partial pressure. Seawater PCO_2 in the Atlantic in general is characterized by a seasonal cycle with surface waters being oversaturated during winter, summer and autumn, while being undersaturated during spring (Takahashi et al. 1993; Gypens et al. 2011). PCO_2 also increases in parallel to seasonal temperature. We hypothesize that the combination of elevated temperature and PCO_2 will affect the energy demand at whole animal level, as a consequence of shifts in ion regulation and associated energy (re)allocation. We also hypothesize that changes in branchial Na^+/K^+ -ATPase usage under high PCO_2 and/or temperature will reflect altered activities of other ion transporters and lead to altered plasma ionic status.

2 Material and Methods

Experiments using live animals were approved according to ethical commission Dnr.: 23-2012, Sweden's Ethical Committee on Animal Experiments.

2.1 Experimental animals

Atlantic cod *Gadus morhua* of mixed gender (200.52±95.4g FW) were caught in fish traps in the Gullmarfjord around the Sven Lovén Centre for Marine Sciences - Kristineberg (Fiskebäckskil, Sweden) in February/March 2012 (permission: Dnr.: 3157-11). At the Marine Station the fish were held for 2-3 weeks in 1,200 l tanks with natural flowing seawater at 10°C. For the experiments fish were tagged individually (permission Dnr.: 88-2012) (Visible Implant Elastomer, Northwest Marine Technology Inc. Washington, USA) while anaesthetized with MS-222 (3-aminobenzoic ethyl ester, Applichem, Darmstadt; Germany) at a concentration of 0.2 g/l. Afterwards animals were exposed for 4 weeks to 10.3°C ± 0.2°C and 18.1°C ± 0.2°C at 553± 78 $\mu\text{atm } CO_2$, 1470 ± 460 $\mu\text{atm } CO_2$ and 2228 ± 312 $\mu\text{atm } CO_2$ (Tab. 1). These values encompassed the range of interannual PCO_2 fluctuations reported for the Gullmarsfjord from ~ 500 to 1000 μatm , paralleled by pH oscillations of about 0.15 between 10°C (more alkaline) and 18°C (more acidified, Swedish Oceanographic Data Centre (SODC), pH data recorded in the Gullmarsfjord from 1921 to 1989, recalculated by S. Dupont). 8-10 fish were incubated per 1,200 l tank, with two replicate tanks per treatment. Fish in the high temperature treatment were directly exposed to 18°C without gradual warming. CO_2 -partial pressures of 1,200 and 2,200 μatm equivalent to pH 7.7 and 7.5 were maintained by a computerized feedback system (Aqua Medic GmbH, Bissendorf, Germany), which regulates pH (NBS scale) by addition of gaseous CO_2 to the seawater tank (+/- 0,02

pH units). Fish reared at low PCO_2 were maintained in aerated natural seawater. To ensure a consistent mixture of the water mass pumps with a power of 40 l/min (Eheim GmbH, Deizisau, Germany) were inserted in the tanks. The cod were fed three times a week until satiation with frozen shrimps and blue mussels and were maintained under a 12:12 day: night cycle. Animals were starved for 48 h prior to preparation and experiments. Water chemistry was controlled twice a week by measuring pH and temperature (portable pH meter Profi line pH 3310, WTW GmbH, Weilheim, Germany, NIST Scale corrected to total scale via Dickson standards). Total alkalinity was measured photometrically with an accuracy of 10 $\mu\text{mol}/\text{kg}^{-1}$ seawater according to Sarazin et al. (1999). For total dissolved inorganic carbon (DIC) an autoanalyser (SFA QuAAtro 800 TM, SEAL, Wisconsin, USA) was used; salinity was measured with a conductivity meter (Cond 1970i, WTW GmbH, Weilheim, Germany). PCO_2 values were calculated using the $CO_2\text{sys}$ programme (constants of Mehrbach et al. 1973; refitted by Dickson and Millero (1987) developed by Lewis and Wallace 1998 (Tab. 1)).

2.2 Oxygen consumption of whole fish

Standard metabolic rate ($MO_{2\text{min}}$) of Atlantic cod was measured by intermittent-flow respirometry of individual fish (6 measured in parallel) starting after 3 weeks of experimental exposure of 12 fish per treatment (including six fish from each replicate tank). The fish were starved for 48 hours in their exposure tanks before placing them into the respirometer, a custom-built sealed three-liter horizontal cylindrical acrylic respirometer with a circulation pump (5 l/min) (Eheim GmbH & Co., Deizisau Germany), equipped with an in-line robust 3 mm oxygen optode (FireSting, Pyroscience, Aachen, Germany). The optode was connected to the optical oxygen meter (FireSting O_2) which in turn was connected to a PC running the Pyro Oxygen Logger (FireSting Pyroscience, Aachen, Germany). The fish were kept undisturbed in the respirometer for 48 hours with continuous 20-minute measurements followed by 10 minutes of flushing, controlled by a timer. The O_2 saturation in the respirometers was always above 80%. The mean of the lowest 10% of recorded MO_2 values is presented as standard metabolic rate, calculated as $M(O_2) = [\mu\text{mol}(O_2) \cdot \text{gFW}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}]$. During respirometry of fish at 18°C and low PCO_2 , 2 fish died from asphyxiation due to water pump failure interrupting the flow. Whole animal as well as gill oxygen consumption rates of the remaining fish from the same tank were significantly reduced compared to the replicate tank. As we cannot preclude that the fish released chemical alarm signals in response to hypoxia (Lebedeva et al. 1994) or excreted catecholamines (Butler et al. 1989), which might induce decreased metabolism (Wahlqvist and Nilsson 1977), we excluded the respective data from further analyses. In later studies, all fish subjected to respiration protocols displayed parameters such as blood ion concentration and osmolality or those investigated in isolated gill experiments identical to those not exposed to respirometry.

2.3 Animals and isolated gill preparation

Fish were anaesthetised with 0.2 g/l MS222 and identified by the tag. Blood samples were taken from the ventral vein for later analysis of osmolality and ionic composition. Subsequent to killing the animals by cutting their spine, gill arches were quickly dissected. The first two arches from each side of five fish (10 per treatment and replicate) were used for experiments and immediately placed in ice-cold saline. They were cleared from blood by use of a syringe flushing the efferent blood vessel with saline containing heparin (5000 U/l). The preparation of isolated gill arches was conducted after Deigweiher et al. (2010) with modifications described by Kreiss et al. 2015. The perfusion saline was prepared according to Holmgren and Nilsson (1974) with the exception of HCO_3^- , which was calculated after Heisler (1984; 1986) according to Kreiss et al. 2015 (10°C, 550 μatm : 11.50 mmol; 10°C, 1,200 μatm CO_2 : 14.00 mmol; 10°C, 2,200 μatm CO_2 : 16.18 mmol; 18°C, 550 μatm : 7.11 mmol; 18°C, 1,200 μatm CO_2 : 8.63 mmol; 18°C 2,200 μatm CO_2 : 10.00 mmol).

The pH of the Ringer solution was adjusted by a computerized feedback system using gaseous CO_2 (Aqua medic GmbH Bissendorf, Germany) to 7.95 ± 0.05 for treatments at 10°C and to 7.88 ± 0.07 for treatments at 18°C. Seawater for respiration measurements was equilibrated with a membrane pump (Schemel & Goetz & Co KG, Offenbach, Germany) and reached pH = 8.09 ± 0.06 at 10°C and low PCO_2 and pH = 8.09 ± 0.06 at 18°C and low PCO_2 . Equilibration with defined gas mixtures (AGA gas AB, Sweden) led to pH values matching the desired levels of PCO_2 (10°C, medium (1,200 μatm): 7.74 ± 0.01 ; 10°C, high (2,200 μatm): 7.52 ± 0.02 ; 18°C, medium: 7.75 ± 0.01 ; 18°C, high: 7.55 ± 0.03).

2.4 Energy budget of branchial ion transporters

Gill respiration was analysed according to Deigweiher et al. 2010 modified after Kreiss et al. (2015). In brief, the oxygen uptake of isolated perfused gill arches from the respiratory medium (seawater with incubation equivalent CO_2 levels) was measured in thermostated (10°C or 18°C) chambers, by use of oxygen micro-optodes (needle type, 140 μm , PreSens, Regensburg, Germany). Fractional respiratory costs of branchial ion transporters were investigated via inhibitors for Na^+/K^+ -ATPase (ouabain), H^+ -ATPase (bafilomycin A1), Na^+/H^+ -exchanger ([5-(N-ethyl-N-isopropyl) amiloride] (EIPA)) and HCO_3^- -transporter (4,4'-Diisothiocyano-2,2'-stilbenedisulfonic acid (DIDS)). Transport inhibitors (obtained from Applichem, Darmstadt, Germany or Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Germany) were dissolved in DMSO at a final DMSO concentration of less than 1%, which had no effect on respiration in control experiments (data not shown). Final concentrations of inhibitors were in the range of literature values: ouabain 5mM (Krumschnabel and Wieser 1994; Mark et al. 2005) bafilomycin A1 0.1 μM (Morgan and Iwama 1999; Pörtner et al. 2000), EIPA (80 μM) (Wu et

al. 2010 (100 μM) and DIDS 1mM (Duraton et al. 1997; Parks et al. 2007). Each gill arch was used as its own control prior to application of one inhibitor. Control and inhibitor experiments were conducted for a period of 45 min each while recording oxygen consumption. After experimentation the gill arches were separated from tubing, blotted dry, for determining their total weight and soft tissue weight without cartilaginous arch. For each of the six treatments and for each inhibitor a set of ten gill arches from ten individual fish (five per replicate tank) was measured. Oxygen consumption rates were normalized to soft tissue weight (without the cartilaginous arch) as $M(\text{O}_2) = [\mu\text{mol}(\text{O}_2) \cdot \text{gFW}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}]$.

2.5 Osmolality and ion composition

Blood was centrifuged for 10 min at 1,000 g and 4°C. Osmolality was measured in the resultant plasma with a Vapour Pressure Osmometer (Wescor Inc., Utah, USA). Ion composition was determined chromatographically. Na^+ concentration was analyzed amongst other cations by use of an Ion Chromatography System (DIONEX-ICS 2000, CA, USA) at 40°C including an IonPac CS 16 column, with methane sulfonic acid (30 mmol l^{-1}) as eluent at 0.36 ml min^{-1} flow rate. Cation concentrations were calculated according to a cation standard (Dionex, Six Cation Standard, CA, USA). Anions were separated on an Ion Pac AS11HC column with potassium hydroxide (30 $\text{mmol} \cdot \text{l}^{-1}$, flow rate 0.30 $\text{ml} \cdot \text{min}^{-1}$) as an eluent. Dionex Five Anion Standard was used as a reference to calculate anion concentrations. All ion concentrations are presented as mmol l^{-1} . Plasma total CO_2 (CCO_2) of two treatment groups (10°C, medium CO_2 ; 18°C, high CO_2) was determined with a carbon dioxide analyser (Corning 965, CIBA, Corning diagnostics, UK).

2.6 Data analysis and statistics

Statistical analysis was performed using Sigma plot 12.0 and Graphpad Prism 4. Seawater chemistry was tested for differences between PCO_2 , temperature and replicate tanks performing repeated measures two-way ANOVAs with subsequent Sidak's multiple comparison tests (Tab. 2a). All data are depicted as means \pm standard error. Outliers at a 99 % confidence level were identified using Nalimov's test and removed from the plasma data set. Means of plasma ion concentrations, SMR, net O_2 demands of isolated perfused gills and of HCO_3^- -transporter were compared using two-way ANOVAs with subsequent Tukey multiple comparison tests (Tab. 2b). Osmolality, net O_2 demand determined in the remaining isolated gill inhibitor experiments (of Na^+/K^+ -ATPase, Na^+/H^+ -exchanger, H^+ -ATPase) as well as the fractional weight of gill soft tissue were not normally distributed and therefore compared via one-way ANOVAs or Kruskal-Wallis non-parametric ANOVAs per temperature (Tab. 2c). To test for differences between CO_2 concentrations within these datasets subsequent unpaired t-tests with Holm-Bonferroni correction were used. Gill total respiration

as the fraction of standard metabolic rate of whole fish (%) were compared within treatments at 10°C performing an one-way ANOVA, while Holm-Bonferroni corrected unpaired t-tests were conducted to detect differences between all treatments. Differences between remaining treatments were also tested via unpaired t-tests except for the two low PCO_2 groups where only means of gill and whole animal respiration could be compared for low PCO_2 fish at 18°C, due to low n numbers at 18°C. A significance level of $p < 0.05$ was adopted for all data. Q_{10} values were calculated for the mean net oxygen demand of the four transporters investigated in the groups exposed to 10°C and 18°C and the respective PCO_2 levels. Unfortunately, fish from the two tanks at 18°C and low PCO_2 could not be clearly assigned to their original tank as these were accidentally mixed after respiration experiments. For the remaining groups we performed t-tests to detect potential differences between replicates. Except for the standard metabolic rates of the two groups at low PCO_2 and 18°C (see above) no differences in any of the tested parameters were detected between fish groups from replicate tanks.

3 Results

3.1 Seawater chemistry and mortality

Seawater chemistry and temperatures of the 12 tanks are summarized in table 1. PCO_2 and temperature differed significantly ($p < 0.0001$) between tanks according to experimental conditions (Tab. 2a). Statistical interactions found for PCO_2 replicates are explained by differences between data measured at 10°C and 18°C. In general, PCO_2 values calculated for 18°C were above those found at 10°C (Tab. 1). This was especially pronounced for the low and medium PCO_2 groups (Tab. 2a), however, the difference of approximately 100 μatm was considered negligible from a physiological view. Tank replicates did not differ between any treatment neither for temperature nor for PCO_2 levels (Tab. 2a). For PCO_2 treatments at 10°C and 18°C replicates were maximally ± 0.5 degrees different ($p < 0.0001$). This difference might be explained by a slight temperature gradient within the rooms and was considered minor.

Total mortality during incubation was 8.2% (9 fish), however, almost half of the casualties (4 fish) were found at 18°C and low PCO_2 , while other losses were evenly distributed between exposure groups. Furthermore, 2 fish died of asphyxiation (see above) and one animal died from the consequences of jumping out of the tank, leaving us with a total of 99 fish.

Table 1 Water parameters of different treatments during animal incubation with two replicates each (1 and 2).

Parameter	low tank 1	low tank 2	medium tank 1	medium tank 2	high tank 1	high tank 2
Temperature	10.6 ± 0.2	10.4 ± 0.2	10.3 ± 0.1	10.1 ± 0.1	10.3 ± 0.2	10.1 ± 0.1
PCO ₂ [µatm]	504.36±54.52	488.51±52.42	1151.00±120.78	1111.84±75.67	2184.54±338.4	2131.62±317.7
pH (NBS scale)	8.13 ± 0.03	8.13 ± 0.03	7.76 ± 0.02	7.74 ± 0.03	7.50 ± 0.06	7.50 ± 0.03
pH (total scale)	7.97 ± 0.04	7.98 ± 0.04	7.65 ± 0.02	7.63 ± 0.04	7.37 ± 0.06	7.38 ± 0.04
Salinity [PSU]	32.6 ± 0.3	32.6 ± 0.2	32.6 ± 0.5	32.5 ± 0.5	32.6 ± 0.2	32.6 ± 0.2
DIC [µmol/L]	2325.5±65.6	2297.1±42.9	2363.9±31.4	2373.6±66.2	2495.0±90.0	2325.5±65.6
Alkalinity	2326.4± 68.9	2337.0±44.9	2330.2±34.5	2327.8±24.2	2329.6±28.8	2327.4± 29.8
Temperature	17.9 ± 0.2	18.0 ± 0.1	18.2 ± 0.1	18.1 ± 0.1	18.2 ± 0.2	18.2 ± 0.1
PCO ₂ [µatm]	595.94±59.75	623.08±50.30	1278.01±80.16	1305.32±82.96	2366.74± 340.3	2214.85± 229.4
pH (NBS scale)	8.04 ± 0.05	8.02 ± 0.01	7.77 ± 0.02	7.76 ± 0.02	7.50 ± 0.06	7.53 ± 0.05
pH (total scale)	7.91 ± 0.03	7.89 ± 0.03	7.61 ± 0.02	7.60 ± 0.02	7.36 ± 0.06	7.39 ± 0.04
Salinity [PSU]	32.0 ± 1.2	32.0 ± 1.0	32.6 ± 0.3	32.6 ± 0.3	32.0 ± 1.1	32.1 ± 1.0
DIC [µmol/L]	2296.5±58.5	2279.4±44.9	2338.7±4.1	2364.5±66.2	2370.7±62.4	2390.2±81.2
Alkalinity	2326.0 ± 41.4	2315.0 ± 32.7	2326.0 ± 28.0	2334.0 ± 30.0	2324.7 ± 38.8	2326.6 ± 38.9

Table 2a Results of repeated measures two-way ANOVAs performed to investigate potential differences between acclimation conditions (PCO₂; temperature levels) and replicate tanks within and between these treatments (low PCO₂=550 µatm; medium PCO₂ =1,200 µatm and high PCO₂ = 2,200 µatm at 10°C; 18°C). Significant differences are presented in bold.

Variable	PCO ₂ effect			Temperature effect			Replicate effect			Interaction		
	F	dF	P	F	dF	P	F	dF	P	F	dF	P
PCO ₂	1446	2	<0.0001	-	-	-	6.208	3	0.007	2.241	6	0.045
Temperature	-	-	-	39.060	1	<0.0001	0.4647	1	0.4970	0.0064	1	0.6951
Low PCO ₂	-	-	-	34.61	1	<0.0001	0.0864	1	0.7709	1.251	1	0.2729
Medium PCO ₂	-	-	-	26.29	1	<0.0001	0.0008	1	0.9765	0.7693	1	0.3879
High PCO ₂	-	-	-	1.593	1	0.5697	1.067	1	0.3105	0.5697	1	0.3309
10°C	307.8	2	<0.0001	-	-	-	0.2700	1	0.6115	0.0385	2	0.9623
18°C	352.9	2	<0.0001	-	-	-	0.462	1	0.5078	1.838	2	0.1778

Table 2b Results of two-way ANOVAs performed to investigate potential differences of SMR, plasma ion concentration s and gill oxygen consumption between differently exposed fish groups (low $PCO_2=550 \mu\text{atm}$; medium $PCO_2 =1,200 \mu\text{atm}$ and high $PCO_2 = 2,200 \mu\text{atm}$ at 10°C ; 18°C). Significant differences are presented in bold.

Variable	PCO_2 effect			Temperature effect			Interaction		
	<i>F</i>	<i>dF</i>	<i>P</i>	<i>F</i>	<i>dF</i>	<i>P</i>	<i>F</i>	<i>dF</i>	<i>P</i>
SMR	0.0931	2	0.911	16.36	1	0.0002	2.383	2	0.1025
Plasma Na^+	0.318	2	0.729	19.298	1	<0.001	6.535	2	0.003
Plasma Cl^-	3.803	2	0.027	3.642	1	0.060	9.024	2	<0.001
Gill MO_2	0.9367	2	0.393	89.33	1	<0.0001	0.1381	2	0.8711
HCO_3^- - transporter	7.871	2	0.001	4.297	1	0.043	2.287	2	0.112

Table 2c Results of one-way ANOVAs respectively Kruskal-Wallis one-way ANOVAs performed to investigate potential differences of osmolality and ion transporter net O_2 demand from isolated gill experiments between differently exposed fish groups (low $PCO_2=550 \mu\text{atm}$; medium $PCO_2 =1,200 \mu\text{atm}$ and high $PCO_2 = 2,200 \mu\text{atm}$) at 10°C respectively 18°C . H-Value instead of F-value is given when non-parametric Kruskal-Wallis test was performed. Significant differences are presented in bold.

Variable	10°C			18°C		
	<i>F</i>	<i>dF</i>	<i>P</i>	<i>F</i>	<i>dF</i>	<i>P</i>
Osmolality	0.02401	2	0.9763	6.775	2	0.0032
Na^+/K^+ -ATPase	0.878	2	0.428	H=1.355	2	0.508
H^+ -ATPase	0.347	2	0.710	0.592	2	0.560
Na^+/H^+ -exchanger	4.025	2	0.030	6.064	2	0.007
% gill filament weight	H=14.96	2	<0.001	H=1.561	2	0.458

3.2 Oxygen consumption of whole animals

Mean standard metabolic rates related to body mass were in the same range for fish reared at low PCO_2 and both incubation temperatures (10°C : $2.31 \pm 0.64 \mu\text{mol } O_2 \cdot \text{gFW}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$; 18°C : $2.67 \pm 0.04 \mu\text{mol } O_2 \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{gFW}^{-1}$) (Fig. 1).

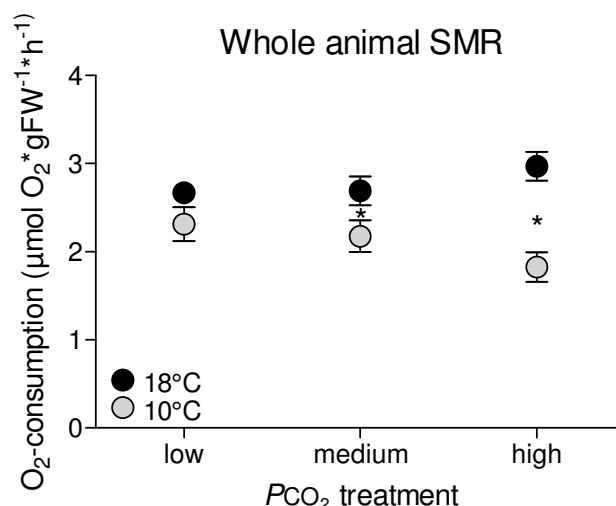


Fig. 1 Standard metabolic rate ($\mu\text{mol } O_2 \cdot \text{gFW}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$) of cod 4 weeks exposed to low $PCO_2 =550 \mu\text{atm}$ (L), medium $PCO_2=1,200 \mu\text{atm}$ (M) and high $PCO_2= 2,200 \mu\text{atm}$ (H) at 10°C (grey circles) and at 18°C (black circles). $n= 4-12$ per treatment. Symbols indicate significant differences between temperature groups ($p < 0.05$).

Increasing CO_2 levels influenced metabolic rate differently depending on incubation temperature (Fig. 1). Significant differences between groups at the two temperatures were

observed at either medium or high PCO_2 when the fish reared at 18°C displayed a higher SMR than those acclimated to 10°C ($p=0.043$ at medium PCO_2 ; $p<0.0001$ at high PCO_2).

3.3 Plasma osmolality and ion concentrations

Plasma osmolality (Fig. 2) was independent of CO_2 in cod reared long-term at 10°C (optimum temperature, total mean 354.53 ± 31.52 $mmol\cdot kg^{-1}$).

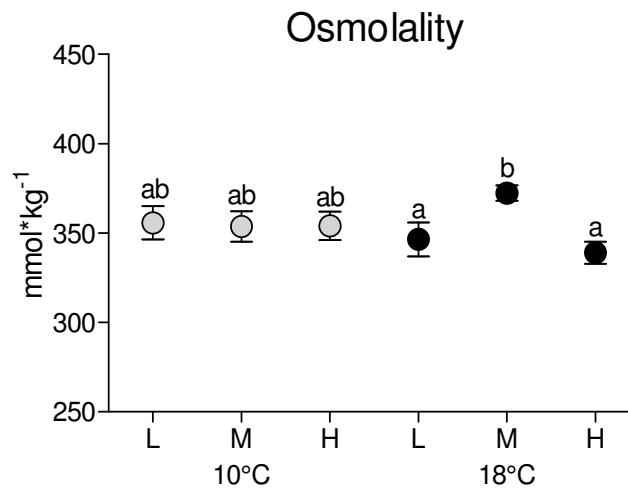


Fig. 2 Plasma osmolality ($mmol\cdot kg^{-1}$) of cod 4 weeks exposed to low $PCO_2=550$ μatm (L), medium $PCO_2=1,200$ μatm (M) and high $PCO_2= 2,200$ μatm (H) at 10°C (grey circles) and at 18°C (black circles). $n= 18-20$ per treatment. Different letters indicate significant differences between treatment groups ($p<0.05$).

It was significantly lower in cod at 18°C under low and high CO_2 compared to fish reared at 18°C and medium PCO_2 ($p<0.05$). No statistical temperature effect was detected between fish reared at 10°C and 18°C. Plasma ion concentrations (Fig. 3a-b) at low PCO_2 and 10°C were in the range of 188 ± 16 $mmol$ for Na^+ , and 175 ± 21 $mmol$ for Cl^- . For fish at 10°C, both ions were found at ~ 10% lower concentrations at medium PCO_2 than under low PCO_2 ($p=0.057$ Na^+ , $p=0.025$ Cl^-). At 10°C and high PCO_2 Cl^- concentrations fell below values of animals at low PCO_2 (15%; $p=0.004$); whereas Na^+ plasma levels were only marginally reduced (3%).

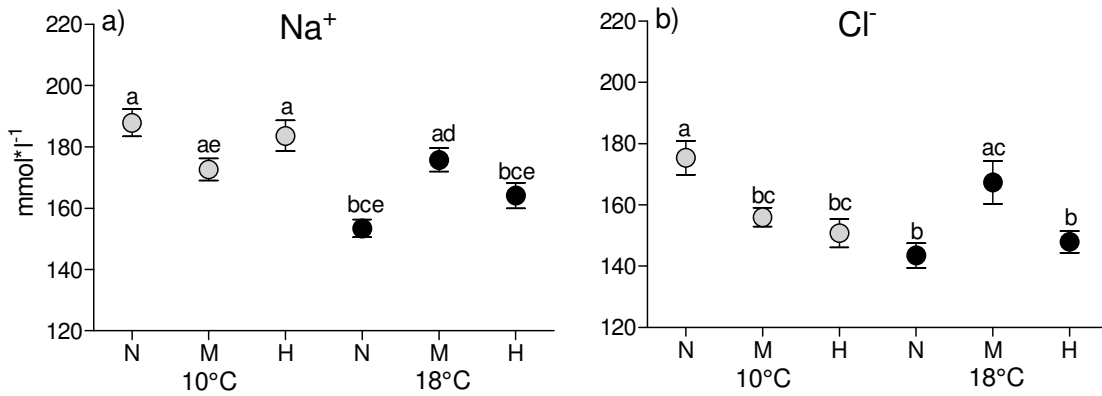


Fig. 3a-b Blood plasma Na⁺ and Cl⁻ concentrations (mmol l⁻¹) in plasma of cod 4 weeks exposed to low PCO_2 =550 μ atm (L), medium PCO_2 =1,200 μ atm (M) and high PCO_2 = 2,200 μ atm (H) at 10°C (grey circles) and at 18°C (black circles). n= 18-20 per treatment. Different letters indicate significant differences between treatment groups ($p < 0.05$).

Warming to 18°C under low PCO_2 led to a ~20% reduction in the concentrations of both ions ($p=0.012$, Fig. 3a-b). At 18°C and medium PCO_2 Na⁺ and Cl⁻ concentrations were less distinct from the group at 10°C and low PCO_2 . This pattern was not observed at high PCO_2 and 18°C such that plasma ion levels at 18°C were reduced in fish under low and high CO_2 levels compared to medium PCO_2 (Na⁺: low PCO_2 $p=0.002$, high PCO_2 $p=0.004$; Cl⁻: low PCO_2 $p=0.002$, high PCO_2 $p=0.006$) (Fig. 3a-b). For animals from all treatments mean plasma Na⁺ concentration exceeded that of Cl⁻ by 14-31 mmol positive charges (Fig. 4). Plasma bicarbonate levels calculated from total CO_2 , determined for groups at 10°C and medium PCO_2 , and at 18°C and high PCO_2 , were in the range of expected HCO_3^- values for these treatments (11.0 ± 0.7 mmol HCO_3^- ; respectively 9.8 ± 1.7 mmol HCO_3^-) (Fig. 4).

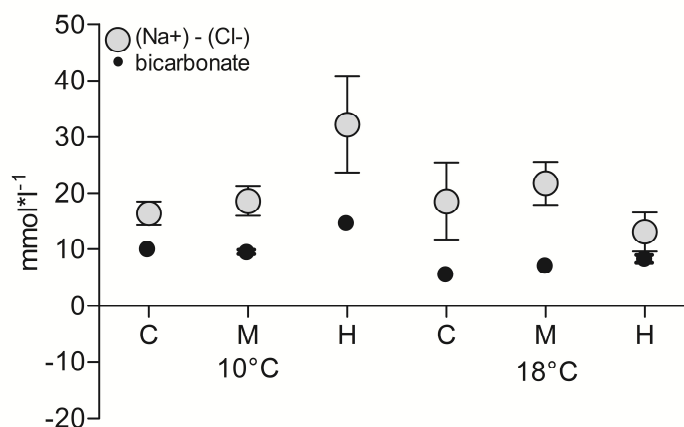


Fig. 4 Concentration difference of plasma Na⁺ and Cl⁻ (grey dots) including plasma bicarbonate levels (black dots) measured (10°C medium CO_2 and 18°C high CO_2 group) or calculated after Heisler (1984, 1986) according to Kreiss et al. (2015) (10°C low, 10°C high CO_2 , 18°C low and 18°C medium CO_2 group). Blood plasma parameters derive from cod long-term incubated under low PCO_2 (550 μ atm) (C), at medium (1,200 μ atm) (M) and high (2,200 μ atm) (H) PCO_2 , at 10°C and at 18°C. n= 18-20 per treatment.

3.4 Gill fresh weight

Mean gill fresh weight determined per single arch after gill respiration experiments was CO₂ dependent at 10°C. Soft gill tissue and thereby also total gill weight increased in fish at 10°C and medium or high PCO₂ (p<0.05) compared to the group at 10°C and low PCO₂ (Tab. 3). This pattern was also mirrored in the fraction of gill soft tissue weight (related to whole animal weight) and thereby independent of an allometric effect (Tab. 3). At high temperature no CO₂ effect was observed. Weights of total gill and gill soft tissue for the three groups at 18°C were in the range of those from low PCO₂ fish at 10°C, being significantly lower than the size-increased gills in fish at 10°C and medium or high PCO₂ treatments.

Table 3 Weight of total gill respectively gill soft tissue without cartilaginous arch, as well as fractional soft tissue weight related to whole animal weight of the differently exposed groups (L = low PCO₂, M= medium PCO₂ and H = high PCO₂) given as means +/- standard deviation, n=40 per treatment for total gill and soft tissue weight, n=3-8 for fractional (%) gill weight.

weight (g)	10°C low	10°C medium	10°C high	18°C low	18°C medium	18°C high
Gill arch	0.52±0.15 a	0.65±0.25 bc	0.69±0.25 b	0.56±0.25 ac	0.57±0.21 ac	0.52±0.20 a
Gill soft tissue	0.28±0.08 a	0.36±0.13 bc	0.38±0.15 b	0.26±0.13 a	0.29±0.11 ac	0.26±0.12 a
% weight	0.13±0.07 a	0.27±0.22 b	0.18±0.11 bc	0.17±0.14 ab	0.12±0.04 a	0.16±0.10 ab

3.5 Gill respiration and energy budget of ion regulation transporters

Mean oxygen consumption related to gill soft tissue was 10.8 μmol O₂*gFW⁻¹*h⁻¹ at 10°C and low PCO₂, whereas gills from fish reared at 10°C and medium PCO₂ PCO₂ displayed respiration rates about 15% lower than those at low PCO₂ (p=0.013) (Fig. 5). Gill oxygen consumption rates at high PCO₂ and 10°C were found between those at the other PCO₂ levels, but did not differ significantly from those. Fish acclimated to 18°C had higher branchial respiration rates than those reared at 10°C (p<0.001) (Fig. 5), following a Q₁₀ of 1.8±0.07. Gill oxygen consumption rates at the three PCO₂ levels and 18°C were not statistically different. Again, respiration rates were lowest at medium PCO₂ as observed before at 10°C (p=0.057, Fig. 5).

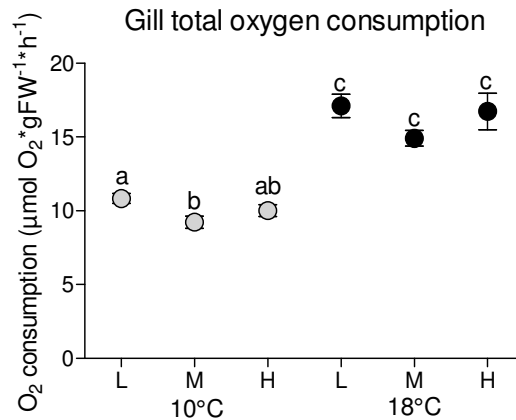


Fig. 5 Gill total oxygen consumption ($\mu\text{mol O}_2 \cdot \text{gFW}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$) of cod 4 weeks exposed to low $\text{PCO}_2 = 550 \mu\text{atm}$ (L), medium $\text{PCO}_2 = 1,200 \mu\text{atm}$ (M) and high $\text{PCO}_2 = 2,200 \mu\text{atm}$ (H) at 10°C (grey circles) and at 18°C (black circles). $n = 40$ per treatment. Different letters indicate significant differences between treatment groups ($p < 0.05$).

Net O_2 demand of ion transporters, calculated as the difference between respiration rates of untreated and inhibitor-exposed gills, is presented in figure 6a-d; fractional costs in percent of total gill respiration are listed in table 4.

The inhibition of Na^+/H^+ -exchanger (EIPA) and HCO_3^- -transporter (DIDS) occasionally led to respiration rates above controls, especially at medium PCO_2 and 10°C , indicating a compensatory increase in the activity of other transporters (Fig. 6c-d). For the transporters investigated, the largest fraction of branchial energy was claimed by Na^+/K^+ -ATPase, at 3.3 ± 1.1 and $5.4 \pm 1.7 \mu\text{mol O}_2 \cdot \text{gFW}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ at 10 and 18°C , respectively (Fig. 6a), equivalent to 30% of total gill respiration at low PCO_2 conditions. This fraction remained independent of temperature at medium CO_2 concentrations, however, a significantly elevated Na^+/K^+ -ATPase fraction (38.80%) was observed at 18°C and high PCO_2 , larger than at high PCO_2 and 10°C (21.5%) ($p = 0.022$) (Tab. 4).

Table 4: Cod gill fractional costs (%) of Na^+/K^+ -ATPase, H^+ -ATPase, HCO_3^- -transporter and Na^+/H^+ -exchanger in the different exposed groups (L = low PCO_2 , M = medium PCO_2 and H = high PCO_2) given as means \pm standard deviation. Different letters indicate significant differences in fractional costs of processes between treatments ($p < 0.05$), $n = 8$ per treatment.

%	10°C low	10°C medium	10°C high	18°C low	18°C medium	18°C high
Na^+/K^+ -ATPase	29.95 ± 5.64 ab	28.60 ± 10.99 ab	21.53 ± 18.77 b	29.95 ± 8.53 ab	30.65 ± 14.83 ab	38.8 ± 11.04 ac
H^+ -ATPase	10.37 ± 10.45	6.23 ± 21.89	8.70 ± 7.66	14.81 ± 8.84	11.25 ± 19.16	11.18 ± 9.21
HCO_3^- -transporter	3.68 ± 12.84 ab	1.79 ± 20.81 ab	11.33 ± 17.59 ab	4.93 ± 10.47 ac	3.59 ± 11.25 ad	23.57 ± 12.21 b
Na^+/H^+ -exchanger	11.37 ± 9.59 ab	-3.48 ± 17.06 ab	10.64 ± 7.80 ab	3.67 ± 12.43 ac	7.47 ± 14.19 ad	19.28 ± 8.46 b

Oxygen demand by H^+ -ATPase ($1.35 \pm 1.30 \mu\text{mol O}_2 \cdot \text{gFW}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$) and Na^+/H^+ -exchanger ($1.36 \pm 1.21 \mu\text{mol O}_2 \cdot \text{gFW}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$) at low PCO_2 and 10°C both comprised about 11% of total gill respiration.

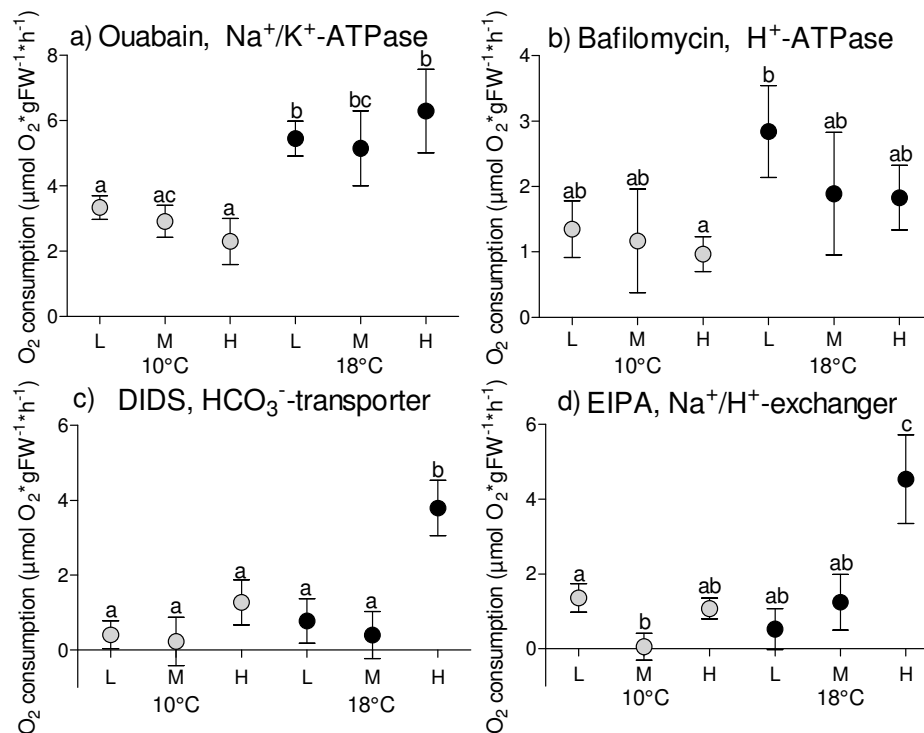


Fig. 6a-d Net O₂ demand of cod gill Na⁺/K⁺-ATPase (a), H⁺-ATPase (b), HCO₃⁻-transporter (c) and Na⁺/H⁺-exchanger (d) ($\mu\text{mol O}_2 \cdot \text{gFW}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$) of cod 4 weeks exposed to low $\text{PCO}_2 = 550 \mu\text{atm}$ (L), medium $\text{PCO}_2 = 1,200 \mu\text{atm}$ (M) and high $\text{PCO}_2 = 2,200 \mu\text{atm}$ (H) at 10°C (grey circles) and at 18°C (black circles), given as means with standard error of the mean. Letters indicate significant differences in net O₂ demand of processes between treatment groups ($p < 0.05$), $n=10$ per treatment.

HCO_3^- -transporter consumed about $3.7 \pm 12.8\%$ ($0.4 \pm 1.2 \mu\text{mol O}_2 \cdot \text{gFW}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$) (Fig. 6b-d, Tab. 4). At 18°C net O₂ demand of Na^+/K^+ -ATPase was elevated above rates seen in gills at 10°C ($p < 0.05$), except when comparing the two medium PCO_2 treatments which differed less ($p = 0.098$). O₂-demand of H^+ -ATPase was also elevated at high temperature, but this effect became statistically significant only between gills at high PCO_2 and 10°C and those at low PCO_2 and 18°C ($p = 0.023$). CO_2 dependent shifts in the usage of ion transporters were observed for Na^+/H^+ -exchanger at both temperatures and for HCO_3^- transport at 18°C . Na^+/H^+ -exchanger was reduced in terms of oxygen demand at medium PCO_2 and 10°C below rates at low PCO_2 ($p = 0.017$) and rose at high PCO_2 and 18°C compared to gills of all other treatments (18°C low PCO_2 7.6-fold, $p = 0.017$; 18°C medium PCO_2 2.6 fold, $p = 0.025$; 10°C low PCO_2 2.3-fold, $p = 0.016$; 10°C medium PCO_2 82.8-fold $p = 0.001$, 10°C high PCO_2 4.2-fold, $p = 0.008$). Mean absolute oxygen demand of HCO_3^- transport was 8-fold higher at high PCO_2 and 18°C than at medium PCO_2 and 18°C ($p = 0.002$) and at low PCO_2 conditions

and 10°C ($p=0.0006$), whereas oxygen demand of HCO_3^- transport was increased 4 -fold at high PCO_2 and 18°C compared to low PCO_2 gills at 18°C ($p=0.007$) (Fig. 6c).

In gills at 18°C compared to those at 10°C and the same level of PCO_2 warming led to a strong PCO_2 effect as indicated by elevated net O_2 demand and an increase in the respective Q_{10} values (Fig. 6a-d, Tab. 5). Three of the four transporters investigated had a significantly higher net O_2 -demand at high PCO_2 : Na^+/K^+ -ATPase, ($p=0.013$), Na^+/H^+ -exchanger, ($p=0.008$), HCO_3^- -transporter, ($p=0.016$). The related Q_{10} values for transporter activity between 10 and 18°C under high PCO_2 ranged between 2.6 and 5.8 (Tab. 5).

Table 5: Q_{10} values calculated for the mean net oxygen demand of the four transporters investigated between 10°C and 18°C groups at the respective PCO_2 levels.

Q_{10}	Low PCO_2	Medium PCO_2	High PCO_2
Na^+/K^+ -ATPase	1.78	2.05	3.78
H^+ -ATPase	1.93	1.80	2.58
HCO_3^- -transporter	0.88	0.65	3.18
Na^+/H^+ -exchanger	0.32	29.68	5.81

4 Discussion

Atlantic cod raised under various levels of PCO_2 and temperature responded by adjustments in branchial ion regulation and associated costs with implications for whole animal oxygen demand, osmolality, and Na^+ and Cl^- concentrations in the plasma.

4.1 Whole animal respiration

Whole animal standard metabolic rate (SMR) reflects basic maintenance costs including the cost of ion and acid-base regulation in gills. SMR of cod (mean weight 193.34 ± 62.4 g) at 10°C and low PCO_2 ($2.3 \pm 0.6 \mu\text{mol O}_2 \cdot \text{gFW}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ or $74.0 \pm 20.6 \text{ mg O}_2 \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$) compare well with values published for 200 g Atlantic cod reared at 10°C, ranging from 55-121 $\text{mg O}_2 \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ (Schurman and Steffensen 1997). At 10°C SMR remained unaffected by elevated ambient PCO_2 , in line with earlier findings in temperate, Antarctic as well as tropical species (Ishimatsu et al. 2005; Deigweier et al. 2008; Melzner et al. 2009; Nowicki et al. 2012). Some tropical species, however, showed elevated SMR in response to PCO_2 around 1,000 μatm (e.g., Munday et al. 2009). In the present study, cod SMR was compensated for the effect of long-term warming leading to similar rates at 10 and 18°C in animals at low PCO_2 ($2.67 \pm 0.04 \mu\text{mol O}_2 \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{gFW}^{-1}$ or $85.38 \pm 1.3 \text{ mg O}_2 \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$). Oxygen consumption rates were similar to those in Atlantic cod from Øresund, near to our study location, after thermal acclimation for several months to 10°C and 15°C (Schurman and Steffensen 1997). Wild southern North Sea cod were observed to remain at temperatures $>16^\circ\text{C}$ for several weeks in their natural habitat (Righton et al. 2010). Such compensation for changing temperatures is in line with earlier findings that cod can undergo thermal acclimation and thereby endure warm periods. However, Atlantic cod from Scotlands' west coast exposed to the same

acclimation conditions as in the present study (10°C and 18°C for 4 weeks) displayed a 70% increase in routine metabolic rates during long-term warm exposure (Soofiani and Hawkins 1982), indicating that thermal acclimatization capacity differs between cod populations (cf. Pörtner et al. 2008).

However, despite the down-regulation of SMR during warm acclimation, branchial respiration rates were enhanced at 18°C (all treatments) indicating a shift in energy budget (see above) and possibly constraining residual aerobic scope (cf. Pörtner et al. 2010). Elevated PCO_2 was hypothesized to constrain an organism's response to thermal stress (Pörtner 2008). Such a synergistic effect of elevated PCO_2 and temperature was later found in studies of resting metabolic rates of cold (*Pagothenia borchgrevinki*) and warm stenothermal species (anemonefish *Amphiprion melanopus*) (Miller et al. 2012; Enzor et al. 2013) and across other organism taxa (for review see Pörtner, 2012). Nonetheless, growth increased with rising levels of PCO_2 at 18°C to rates found in fish at low PCO_2 and 10°C (Kreiss et al. in prep). At first sight this suggests that exposure to 18°C in combination with hypercapnia may not yet be thermally limiting. However, other performances such as behaviors or spontaneous activity may be constrained instead causing enhanced energy efficiency and thereby enhanced growth (Pörtner et al. 2010). In fact, cod at low PCO_2 and 18°C only marginally gained weight and displayed the highest mortality rate (Kreiss et al. in prep.), possibly due to high levels of awareness and spontaneous activity. A careful analysis of various components of aerobic energy budget and their trade-offs under elevated CO_2 levels is thus warranted.

Increasing PCO_2 levels even caused diverging patterns in SMR at the two acclimation temperatures. SMR at 18°C under medium and high PCO_2 was higher than in fish reared under the same PCO_2 levels at 10°C (Fig. 1). Elevated PCO_2 might offset compensation for the effect of warming, for example if PCO_2 enhances food conversion efficiency stimulating growth and associated costs in fish fed to satiation. Accordingly, the mechanisms involved in thermal compensation and those increasing cost under elevated CO_2 are likely not the same. Presently, projection of the combined effects of warming and acidification, as occurring in summer in the cod's natural habitat, is difficult. However, if natural food availability is high PCO_2 may support efficient energy use and thereby enhanced growth performance in the warmth.

4.2 Gill maintenance costs

Oxygen consumption rates of gills isolated from fish reared at low PCO_2 and 10°C ($5.81 \pm 1.19 \mu\text{atm O}_2 \cdot \text{gFW}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$) (Fig. 1) were in the range found in previous studies (Lyndon 1994; Deigweier et al. 2010), but 50% lower ($p < 0.0001$) than those reported for Southern North Sea cod gills in a former study (Kreiss et al. 2015). Lower total gill oxygen demand might be

attributed to seasonal changes or population differences. The experiments of the present study were conducted in April/Mai, whereas the former study took place in the fall. Seasonal fluctuations in gill respiration rates of cod incubated for 8 weeks at 10°C and low PCO_2 were observed when comparing rates obtained in the fall with those measured in winter, the latter being 30% higher at the same experimental temperature (10°C) (unpublished data Kreiss et al.).

Relating the weight and metabolic costs of soft gill tissue to the respective values of the whole fish (Fig. 7a&b) reveals an interesting pattern. The fraction of soft gill tissue was significantly elevated in hypercapnic (medium and high PCO_2) fish at 10°C compared to fish reared at low PCO_2 and 10°C (2-fold at medium PCO_2 , 1.4 fold at high PCO_2 ; $p < 0.001$) (Fig. 7a).

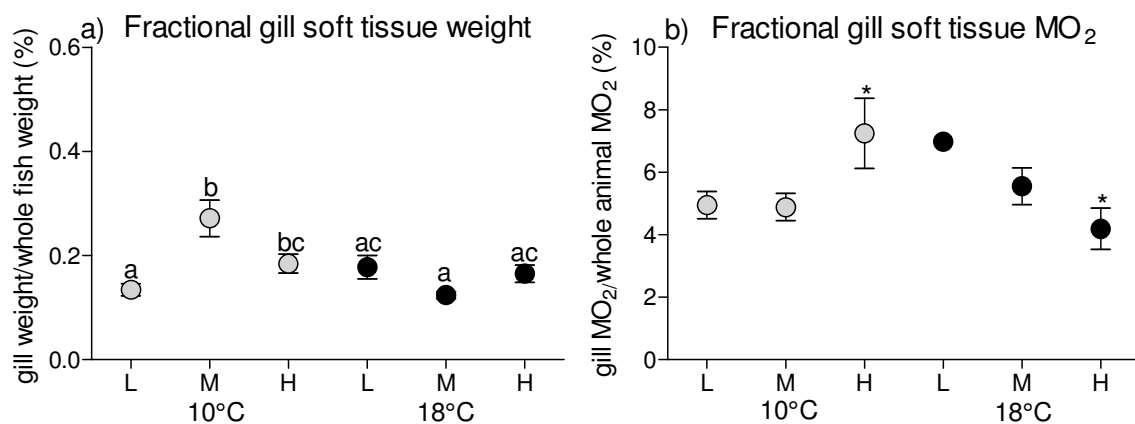


Fig. 7a-b Gill total respiration (a) and weight (b) as the fraction of standard metabolic rate respectively weight of whole animal 4 weeks exposed to low $PCO_2=550 \mu\text{atm}$ (L), medium $PCO_2=1,200 \mu\text{atm}$ (M) and high $PCO_2=2,200 \mu\text{atm}$ (H) at 10°C (grey circles) and at 18°C (black circles). $n=4-8$ per treatment, for 18°C low PCO_2 a mean relation was calculated. Letters indicate significant differences in net O_2 demand of processes between treatment groups ($p < 0.05$) (a); symbols indicate significant differences between treatments (b) as not all groups could be tested against each other ($p < 0.05$).

Such an increase in gill soft tissue mass in relation to whole animal weight may indicate branchial remodeling, a mechanism contributed to altered gill mass, which was reported earlier for freshwater fish in response to various environmental factors (Goss et al. 1998; Nilsson et al. 2007; Ong et al. 2007; Mitrovic and Perry 2009). A potentially higher total oxygen demand of these larger gill arches is likely to impact whole animal energy budget. Under low and medium PCO_2 at 10°C the fractional oxygen consumption of gills accounted for approx. 5% of whole animal oxygen demand at rest, while this fraction increased with falling whole animal rates at high PCO_2 reaching $> 7\%$ ($p=0.056$) (Fig. 7b). For fish reared at 18°C increasing PCO_2 caused the fraction to decline with rising whole animal rates from about 7% at low PCO_2 to $\sim 4\%$ at high PCO_2 . Taking into account that gill MO_2 per g soft tissue was maintained at high PCO_2 and 10°C (Fig. 5), we can postulate that branchial

oxygen demand was increased due to the increase in tissue weight under this treatment (Fig. 7a) implying that the oxygen demand of other tissues/processes was reduced. The situation for fish reared at 18°C was different as gill oxygen consumption was more or less stable in the three PCO_2 groups at 18°C (Fig. 7a). With increasing PCO_2 tissues other than the gill would thus have demanded more oxygen, also indicated by the increase in growth rate.

4.3 Plasma osmolality and ion concentrations

At 10°C plasma osmolality was in the range of values reported earlier for cod and independent of ambient CO_2 (Larsen et al. 1997; Herbert and Steffensen 2005). However, while osmolality remained constant at 10°C, the concentration of Cl^- was reduced in fish under $\geq 1,200 \mu atm CO_2$ at 10°C. At this temperature plasma Na^+ concentrations were only slightly reduced at medium PCO_2 ($p=0.057$) but not at high PCO_2 . This indicates that osmolality was balanced by other anions, and concomitantly raises the question which transport processes are responsible for the unequal reduction in Na^+ and Cl^- plasma concentrations. Plasma bicarbonate levels, determined in fish at 10°C and medium PCO_2 compensated for the excess of positively charged Na^+ over Cl^- up to a difference of ~ 6 mmol (Fig. 4), supporting earlier findings that HCO_3^-/Cl^- exchange takes place under hypercapnia (Larsen et al. 2007). However, despite bicarbonate accumulation plasma Na^+ concentrations at 10°C and high CO_2 were still in excess of these anions by about 16 mmol (Fig. 4). This “uncompensated” excess of positive ions as well as the decline in osmolality observed at low and high PCO_2 groups at 18°C may indicate the accumulation of further osmolytes. Osmolality in teleost blood is thought to be maintained via inorganic osmolytes (Yancey 2001). However, a recent study on Senegalese sole reported increased plasma concentrations of amino acids such as taurine, glutamate, GABA and glycine in response to warm acclimation (Costas et al. 2012). Organic osmolytes may contribute to extracellular osmotic pressure and furthermore have important functions such as antioxidants (taurine), neurotransmitters (glutamate, GABA), or stabilizers of proteins (e.g. sugar phosphates) and/or as metabolic substrates (all) (Yancey 2005, Li et al. 2008). Organic replacing inorganic osmolytes might therefore explain the observed reduction in Na^+ and Cl^- levels at elevated PCO_2 at 10°C (marginally significant) and, high temperatures. Such shift to organic osmolytes could be beneficial if elevated PCO_2 causes e.g., oxidative stress by increasing the production of reactive oxygen species as well as in response to high temperature that may enhance the need for protein stabilizing osmolytes. This explanation must remain speculative at present.

Warming close to maximum summer temperatures (18°C) combined with hypercapnic conditions led to a different response in plasma osmolality and ion concentrations. All parameters showed non-linear “hump-backed-curves”, with reduced ion concentrations and

slightly lowered osmolality in animals at 18°C under low and high PCO_2 , while plasma parameters of animals at medium CO_2 and 18°C were significantly higher (Fig. 2 & 3a-b). The shape of these curves remains unexplained. Medium CO_2 levels and 18°C are experienced by cod in warm summers and are associated with enhanced growth and elevated energy efficiency (see above) possibly supported by the relative decrease in NaCl secretion rates in the gills.

The reduction of ion concentrations and the slightly lowered osmolality of fish at 18°C and low and high PCO_2 reflects altered gill ion transporter activities indicated by enhanced fractions in oxygen demand. Net O_2 demand of Na^+/K^+ -ATPase and less so of H^+ -ATPase increased (Fig. 6a-b). Thermally uncompensated (i.e. stimulated) *in vivo* activities of Na^+/K^+ -ATPase and increased maximum transporter capacities (Na^+/K^+ -ATPase and H^+ -ATPase) were also observed in our former study (Kreiss et al. 2015) implying that Na^+/K^+ -ATPase might overcompensate for enhanced branchial permeability in the warmth. Together with the slightly reduced osmolality caused by the loss in ion concentration (Na^+ and Cl^-) in warm acclimated fish at low and at high PCO_2 this indicates enhanced NaCl excretion against the inward gradient. Enhanced hypo-osmoregulation was reported before for Antarctic fish during warm acclimation (Gonzalez-Cabrera et al. 1995; Brauer et al. 2005). We assume that elevated transport capacities (Q_{10} effect) cause decreased osmolality despite higher leakage rates according to higher membrane fluidity. Thereby organic osmolytes may again play a role in replacing inorganic osmolytes such as Na^+ and Cl^- for the reasons mentioned above, but this compensation seems less effective for fish incubated at 18°C under low and high PCO_2 than observed in hypercapnic fish at 10°C.

The increased oxygen demand of tissues other than the gill in relation to whole animal respiration rates as proposed above for hypercapnic treatments at high temperature, could include various possibilities. As the altered plasma ion concentration does not match the observed usage of branchial ion transport for all treatment groups (see below), further ion regulatory organs, such as kidney and the gastrointestinal tract might be involved in NaCl absorption using the same transporter types as found in branchial epithelia (Na^+/K^+ -ATPase, $Na^+/K^+/2Cl^-$ cotransporter). Anion including HCO_3^- exchange (e.g., Cl^- and Na^+ dependent HCO_3^- exchanger) are also known to play an important role in the intestine and might cause altered plasma Na^+ and Cl^- concentrations not explained by branchial processes (Marshall and Grosell 2005). For European flounder reduced plasma osmolality was observed in response to experimentally enhanced intestinal bicarbonate excretion demonstrating that such alterations in the intestine can significantly impact whole animal osmolality status (Wilson et al. 2002). In addition, tissues active in amino acid metabolism and/or building up energy reserves such as the liver might also cause higher O_2 -demand under combined ocean warming and acidification. Nonetheless, the present data emphasize that the oxygen

demand and functioning of the gill seems to be maintained regardless of elevated PCO_2 , confirming the role of this organ in responding to fluctuating environmental factors.

4.4 Gill ion regulation mechanisms in vivo

The fractions of Na^+/K^+ -ATPase, H^+ -ATPase, Na^+/H^+ -exchanger and HCO_3^- -transporter in oxygen consumption comprise the activities of all isoforms of the respective transporter families. Current knowledge of the localisation of identified ion transporters in fish gills is summarized in figure 8. Na^+/K^+ -ATPase (all isoforms) is located basolaterally (Evans et al. 1982). A basolateral location was also suggested for H^+ -ATPase in immunolocalization studies on dogfish (*Squalus acanthias*) and longhorn sculpin *Myoxocephalus octodecimspinosus* (Tresguerres et al. 2005; Catches et al. 2006). Several isoforms were described for Na^+/H^+ -exchange (Edwards et al. 2005; Deigweiher et al. 2008; Rimoldi et al. 2009) and HCO_3^- transport (Piermarini et al. 2002; Esbaugh et al. 2012; Tseng et al. 2013) located either apically or basolaterally.

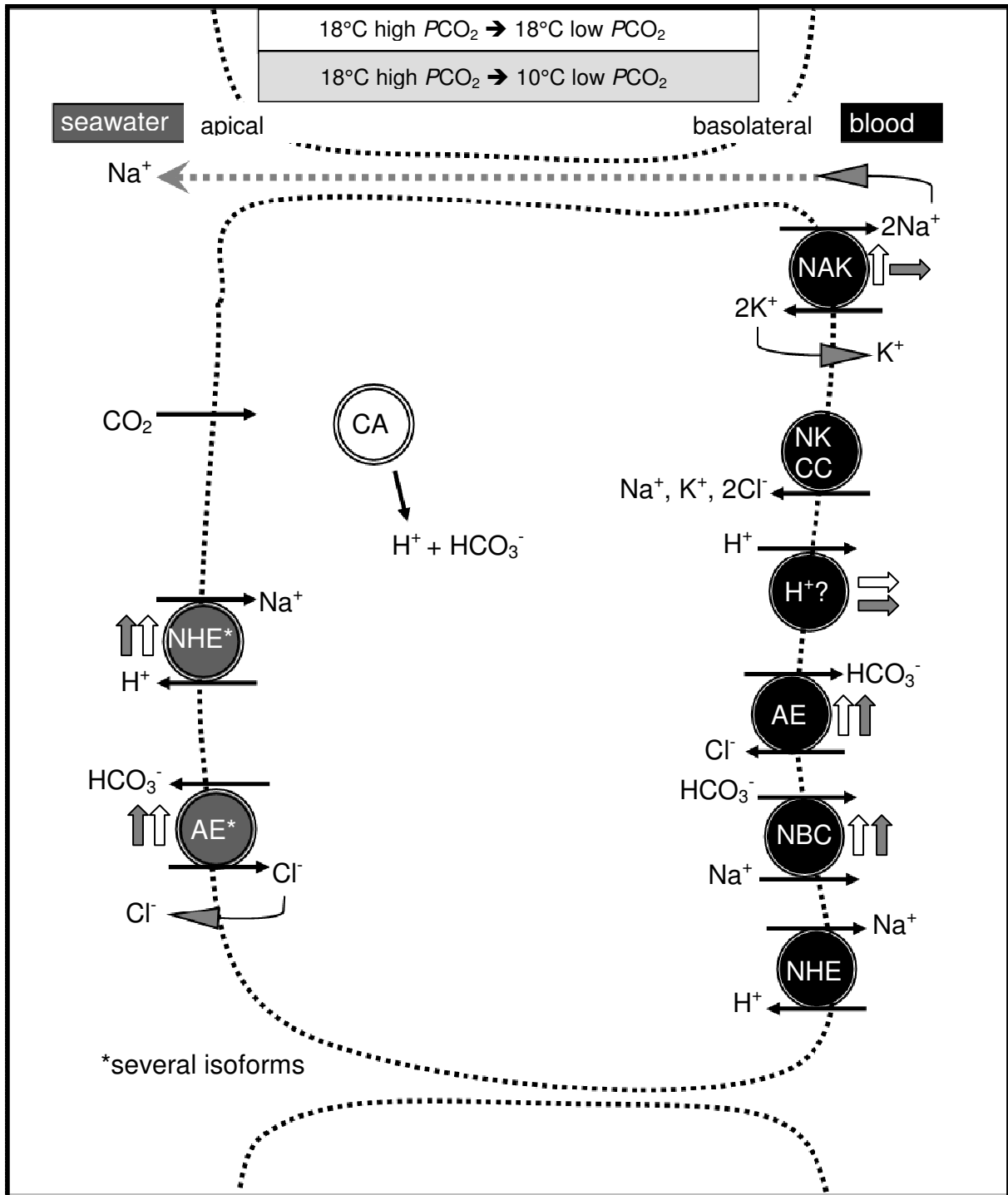


Fig. 8 Branchial model of acid-base transporters including Na^+/H^+ -exchanger (NHE), Na^+/K^+ -ATPase (NAK), H^+ -ATPase (H^+), anion exchanger HCO_3^-/Cl^- -exchanger (AE), Na^+/HCO_3^- -cotransporter (NBC) and $Na^+/K^+/2Cl^-$ -cotransporter (NKCC). Altered (upward arrow = enhanced transporter usage) or stable usage (horizontal arrow) of ion transporter net O_2 demand under high PCO_2 (2,200 μatm) and temperature is given in relation to the situation under low PCO_2 (550 μatm) at 10°C (grey arrows) and in relation to fish incubated under low PCO_2 (550 μatm) at 18°C (clear arrows). Due to the the sum signal of HCO_3^- -transporter, several transporter of the HCO_3^- family have to be considered to be involved in altered ion transporter net O_2 demand, see discussion in section 4.4.

Under all conditions O_2 demand of Na^+/K^+ -ATPase comprised about 30% of total gill demand and thereby the highest fraction among the transporters investigated, followed by H^+ -ATPase and Na^+/H^+ -exchanger (approx. 11% each) and HCO_3^- -transport (approx. 3%). This is in line with fractions of Na^+/K^+ -ATPase and H^+ -ATPase in oxygen demand of cutthroat trout gill, which accounted for 37% of total gill oxygen consumption (Morgan and Iwama 1999). Further studies examining fractions of oxygen allocation in isolated gills *in vivo* from marine fish found Na^+/K^+ -ATPase to represent between 11.8 % and 23.1% of total gill respiration in two species of Notothenioidei (Deigweiher et al. 2010), whereas for cod a fraction found earlier was about 43 % (Kreiss et al. 2015). The larger fractions found in the former study (Kreiss et al. 2015) might again be explained by seasonal variation, as observed for other fish species (e.g. in yellow perch *Perca flavescens*, Packer et al. 1998). Differences between populations might involve various ion transporter activities and thereby total gill oxygen demand.

Transporter capacities in excess of their *in vivo* usage (activities) were already observed in our previous study (Kreiss et al. 2015). Adjustments in gill ion regulation capacity of zoarcid fish responding to long-term exposure under high PCO_2 involve increased mRNA levels and protein abundance of basolateral Na^+/HCO_3^- cotransporter and Na^+/K^+ -ATPase, while those of anion exchanger (HCO_3^-/Cl^- transporter) and Na^+/H^+ -exchanger remained at control levels (Deigweiher et al. 2008). In the present study, *in vivo* oxygen demand of these transporters at optimum temperature (10°C) indicates a different pattern: The summed oxygen demand by HCO_3^- -transporters as well as Na^+/H^+ -exchangers indicates small responses to both hypercapnia levels applied. A slight enhancement of HCO_3^- -transporter activity occurred at high PCO_2 level and the net O_2 demand of Na^+/H^+ -exchanger seen at the three PCO_2 levels indicated minimum activity at medium but elevated activity under high PCO_2 conditions. This indicates at least some involvement of both transporter types depending on the hypercapnia levels applied. Thereby, the interdependencies in the involvement of different transporters need to be considered, as in case of DIDS application to gills at 10°C. DIDS caused a stimulation of oxygen consumption, possibly due to a shift to other, more costly transporters, which compensated for inhibited HCO_3^- -transport. Such a response has been observed before in isolated tissue of a marine worm (*Sipunculus nudus*) (Pörtner et al. 2000).

Na^+/K^+ -ATPase activity decreased somewhat at high PCO_2 , however, maximum Na^+/K^+ -ATPase capacities of gill tissue from experimental animals of the present study were unaffected by CO_2 (Michael et al. 2014 unpublished data). These results are in line with earlier observations (Melzner et al. 2009; Esbaugh et al. 2012) and our previous study (Kreiss et al. 2015) where under PCO_2 levels $\leq 3000 \mu\text{atm}$, branchial Na^+/K^+ -ATPase capacities remained unchanged or were reduced, contrasting the upregulation observed

under high $PCO_2 \geq 6000 \mu\text{atm}$ (Deigweiher et al. 2008; 2010; Melzner et al. 2009). The pathways eliciting these differences remain to be explored. H^+ -ATPase activity and its net O_2 demand remained rather stable across CO_2 treatments, indicating that the *in vivo* costs of proton excretion are not altered in the cod gill at optimum temperature after 4 weeks of exposure. In contrast maximum H^+ -ATPase capacities were reduced under elevated PCO_2 levels at 10°C (Michael et al. 2014, unpublished data) in line with findings in salmon under hypercapnia (Seidelin et al. 2001). Downregulation of this basolateral pump causes an increase in branchial H^+ -excretion. Taken together no clear restructuring in ion transport was observed after 4 weeks of acclimation to 1,200 and 2,200 $\mu\text{atm } CO_2$ at 10°C . Stronger responses at optimum temperatures result at higher CO_2 levels (Deigweiher et al. 2008).

However, gill remodelling and the increase in gill soft tissue under medium and high PCO_2 at 10°C may affect ion transporter usage. Freshwater fish, exposed to acute severe hypercapnia ($\sim 2\% CO_2$), displayed an increased branchial apical surface area of pavement cells, which reduced the surface area of exposed chloride cells and thereby modified the exchange rate of the apical HCO_3^-/Cl^- exchanger (Goss et al. 1998). The authors concluded that this mechanism reduces base-excretion and thus compensated for acidosis. In the present study, such a modulation of the physical exposure of chloride cells could have altered the exchange rate of apical HCO_3^-/Cl^- and Na^+/H^+ -exchanger, which are both thought to be located in chloride cells (Claiborne 2002). Thereby, the activity of basolateral Na^+/K^+ -ATPase, which acts as a driving force for Na^+/H^+ -exchanger, might also be affected. Taken together, such a mechanism could explain the slightly lowered net O_2 demand of Na^+/K^+ -ATPase as well as the lowered branchial Na^+/H^+ -ATPase and HCO_3^- -transporter rates at 10°C and elevated PCO_2 (1,200 and 2,200 μatm) compared to low PCO_2 conditions. For further insight into gill remodeling mechanisms and their impact on branchial acid-base compensation in hypercapnia exposed cod, the histological investigation of apical gill epithelia would be useful.

At 18°C and elevated PCO_2 , Na^+/H^+ -exchanger and HCO_3^- transporter both displayed elevated O_2 and energy demand compared to the respective rates at 10°C . Na^+/H^+ -exchanger showed increased net O_2 demand at both elevated PCO_2 levels, whereas HCO_3^- -transport only did at high PCO_2 . Isoforms of Na^+/H^+ -exchanger and HCO_3^- -transporter are localized either apically or basolaterally (Fig. 8). Three isoforms of Na^+/H^+ -exchangers (NHEs) are involved in fish acid-base regulation, NHE1 on the basolateral and NHE2 and NHE3 on the apical side. Various transporters are involved in HCO_3^- -transport; the most important in terms of acid-base regulation might be the apical and basolateral HCO_3^-/Cl^- exchangers, called anion exchanger (AEs) and a Na^+/HCO_3^- co-transporter on the basolateral side (NBC1). At 18°C , NHE costs were elevated in response to both hypercapnia treatments above those at low PCO_2 , indicating an upregulation of apical NHEs and

enhanced acid excretion. In general, acid excretion in marine fish gills is thought to involve the thermodynamically favourable apical Na^+/H^+ -exchanger more than the costly H^+ -ATPase (Claiborne et al. 1999; Tresguerres et al. 2005). A predominant role for apical Na^+/H^+ -exchange in acid-base regulation was also found in gills of fresh and seawater adapted mummichogs (*Fundulus heteroclitus*) under acute, more severe hypercapnia (10,000 μatm) (Edwards et al. 2005), as well as during acid infusion (Claiborne et al. 1999).

In contrast, mRNA of the basolateral isoform of Na^+/H^+ -exchanger was downregulated under short-term hypercapnia (1 hour -4 days; Deigweiher et al. 2008; Rimoldi et al. 2009), but not under long-term hypercapnia (Deigweiher et al. 2008). In the present study, *in vivo* costs of both Na^+/H^+ -exchanger and HCO_3^- -transport were enhanced under high CO_2 levels. This pattern might involve a higher usage and expression of $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ -cotransporter NBC1 as observed before in gill tissues of eelpout (*Zoarces viviparus*) acclimated for 6 weeks to 10,000 μatm CO_2 (Deigweiher et al. 2008).

The pattern of branchial acid-base regulation in cod after 4 weeks of hypercapnia might become clearer when considering all transporters collectively. By maintaining intracellular Na^+ at low levels, Na^+/K^+ -ATPase provides the driving force for Na^+/H^+ -exchange (Claiborne et al. 2008). Enhanced use of Na^+/H^+ -exchange under hypercapnia at 18°C was paralleled by a generally elevated net O_2 demand of Na^+/K^+ -ATPase at high temperature. In addition, due to hydration and dissociation of the incoming CO_2 , a build-up of cellular bicarbonate may occur until reaching a high level when bicarbonate increase might be balanced by basolateral $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ co-transport, in turn driving Na^+ excretion into the plasma. In contrast, the potential upregulation of $\text{HCO}_3^-/\text{Cl}^-$ -exchanger in parallel to Na^+/H^+ -exchanger would lead to an accumulation of Cl^- in the cell, probably reducing $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ -cotransporter activity and concomitantly, causing Na^+ -influx into the cell (Fig. 8). Independent of the particular mechanism, either $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ -cotransporter or $\text{HCO}_3^-/\text{Cl}^-$ -exchanger, in parallel to Na^+/H^+ -exchanger may play a dominant role in cod acid-base regulation under moderate hypercapnia in the warmth.

The observed stimulation of ion transporters at elevated PCO_2 and 18°C did not result in alterations of total gill oxygen consumption rates compared to low PCO_2 at 18°C. Stable total gill oxygen consumption despite shifted usage of ion transporter was observed before in Antarctic fish at 10,000 μatm CO_2 (Deigweiher et al. 2010). We therefore expect that cod gills also compensate for re-arrangements in ion exchange under elevated CO_2 and temperature.

Conclusions and Perspectives

Whole animal standard metabolic rates of Atlantic cod incubated for 3 weeks were independent of temperature (10°C, 18°C). These results confirm previous findings that Southern cod populations can acclimate and compensate for temperature, within limits

marginally reached at 18°C. With respect to the different CO₂ concentrations applied (550, 1,200, 2,200 µatm) these data also provide evidence that near-term projected future PCO₂ levels per se will have a small effect on SMR. Due to the changes in whole animal SMR between medium and high PCO₂ groups of the two temperatures studied, we observed increasing fractions of gill in whole organism oxygen demand towards high PCO₂ at 10°C but decreasing fractions under rising PCO₂ at 18°C. This reflects increased overall gill oxygen consumption at 10°C and high PCO₂ whereas gills in fish at 18°C displayed rather stable branchial oxygen demand that was not involved in fluctuations of cod energy turnover under CO₂. A parallel study determined growth rates in the same experimental animals (Kreiss et al. in prep.) and found that fish hardly gained mass or even lost weight when reared at 18°C and low PCO₂ but displayed improved growth at medium and higher CO₂ levels in parallel to elevated SMR. Balancing cost efficiency and somatic energy budget may thus be more important to enable higher growth rates at 18°C than the oxygen demand of the gills. Our observations even suggest synergistic effects of elevated temperature and PCO₂ in terms of facilitating improved growth and stimulated energy turnover at 18°C. This indicates that 18°C is not yet limiting to the fish with scope remaining for rearrangements in energy budget which possibly involve improved food uptake, energy efficiency and growth at the expense of spontaneous activity. In parallel, our data provide evidence of increased demand for branchial ion regulation through Na⁺/H⁺-exchange and HCO₃⁻-transport at 18°C and high PCO₂ leading to an associated reduction in inorganic plasma osmolytes via stimulated Na⁺/K⁺-ATPase and a shift in plasma ionic balance; the latter effect was also observed at low PCO₂ and 18°C. At 10°C and under high PCO₂ no increase in usage of investigated transporters was observed. Net O₂ demand of Na⁺/H⁺-exchanger was even reduced under medium PCO₂ and a slight decrease of net Na⁺/K⁺-ATPase O₂ demand was found under high PCO₂ at optimum temperature. This might be attributed to altered gill morphology with a potential surface reduction of chloride cells that would lead to decreased ion exchange rates of related transporters (Na⁺/K⁺-ATPase, Na⁺/H⁺-exchanger, HCO₃⁻-transporter). To what extent these changes contribute to shifts in somatic energy turnover and budget, remains to be explored. Overall, Atlantic cod appear quite tolerant to elevated CO₂ levels and variable temperatures, which may come with its demersal lifestyle and preadaptations to fluctuating CO₂ levels and fluctuating temperatures in shallow water habitats.

Acknowledgements

The authors would like to thank Bengt Lundve for his support and assistance in obtaining experimental animals and arranging the experimental facilities as well as Lars Ljungqvist for valuable technical support. Lena Jakob and Caroline Otten are highly acknowledged for their assistance in plasma ion analysis. This work contributes to the Bundesministerium für

Forschung und Bildung funded project “Biological Impacts of Ocean Acidification” (BIOACID) and is part of the “Polar regions and coasts in a changing earth system” (PACES) research programme of the Alfred-Wegener-Institute for Polar and Marine Research.

References

- Björnsson B**, Steinarsson A, Árnason T (2007) Growth model for Atlantic cod (*Gadus morhua*): Effects of temperature and body weight on growth rate. *Aquacult* 271: 216-266
- Blackford JC**, Gilbert FJ (2007) pH variability and CO₂ induced acidification in the North Sea *J Marine Syst* 64: 229-241
- Butler PJ**, Axelsson M, Ehrenström F, Metcalfe JD, Nilsson S, (1989) Circulating catecholamines and swimming performance in the Atlantic cod, *Gadus morhua*. *J Exp Biol* 141: 377-387
- Brauer PR**, Sanmann JN, Petzel DH, (2005) Effects of warm acclimation on Na⁺, K⁺-ATPase α -subunit expression in chloride cells of Antarctic fish. *Anat Rec A*: 285A:600-609
- Catches JS**, Burns JM, Edwards SL, Claiborne JB (2006). Na⁺/H⁺ antiporter, V-H⁺-ATPase and Na⁺/K⁺-ATPase immunolocalization in a marine teleost (*Myoxocephalus octodecemspinosus*). *J Exp Biol* 204: 3251-3259
- Claiborne JB**, Blackston CR, Choe KP, Dawson DC, Harris SP, Mackenzie LA, Morrison-Shetlar AI (1999). A mechanism for branchial acid excretion in marine fish: identification of multiple Na⁺/H⁺ antiporter (NHE) isoforms in gills of two seawater fish. *J Exp Biol* 202:315-324
- Claiborne JB**, Edwards SL, Morrison-Shetlar AI (2002). Acid-Base Regulation in Fishes: Cellular and Molecular Mechanisms. *J Exp Biol* 293:302-319
- Claiborne JB**, Choe KP, Morrison-Shetlar AI, Weakley JC, Havird, J, Freiji, A, Evans DH, Edwards SL (2008) Molecular detection and immunological localization of gill Na⁺/H⁺exchanger (NHE2) in the dogfish (*Squalus acanthias*). *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 294: R1092-R1102
- Collins M**, Knutti R, Arblaster J, Dufresne JL, Fichefet T, Friedlingstein P, Gao X, Gutowski WJ, Johns T, Krinner G, Shongwe M, Tebaldi C, Weaver AJ, Wehner M (2013) The Physical Science Basis. Contribution of Working Group I to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel of Climate Change [Stocker TF, Qin D, Plattner GK, Tignor M, Allen SK, Boschung J, Nauels A, Xia Y, Bex V, Midgley PM (eds.)]. Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom and New York, NY, USA.
- Costas B**, Aragão C, Ruiz-Jarabao I, Vargas-Chacoff L, Arjona FJ, Mancera JM, Dinis MT, Conceição LEC (2012) Different environmental temperatures affect amino acid

- metabolism in the eurytherm teleost Senegalese sole (*Solea senegalensis* Kaup, 1985) as indicated by changes in plasma metabolites. *Amino acids* 43:327-335
- Deigweier K**, Koschnick N, Pörtner HO, Lucassen M (2008) Acclimation of ion regulatory capacities in gills of marine fish under environmental hypercapnia. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 295: R1660-R1670
- Deigweier K**, Hirse T, Bock C, Lucassen M, Pörtner HO, (2010) Hypercapnia induced shifts in gill energy budgets of Antarctic notothenioids. *J Comp Physiol* 180B: 347-359
- Dickson, AG**, Millero FJ (1987) A comparison of the equilibrium constants for the dissociation of carbonic acid in seawater media. *Deep-Sea Res* 34:1733-1743
- Drinkwater KF**, (2005) The response of Atlantic cod (*Gadus morhua*) to future climate change. *ICES J Mar Sci* 62:1327-1337
- Duraton C**, Tauc M, Avella M, Poujeol P (1997) Chloride channels in primary cultures of seawater fish (*Dicentrarchus labrax*) gill. *Cell physiology* 273: C874-C882
- Edwards SL**, Wall BP, Morrison-Shetlar A, Sligh S, Weakley JC, Claiborne JB (2005) The effect of environmental hypercapnia and salinity on the expression of NHE-like isoforms in the gills of a euryhaline fish (*Fundulus heteroclitus*). *J Exp Zool* 303A(6): 464-475
- Enzor LA**, Zippay ML, Place SP (2013). High latitude fish in a high CO₂ world: Synergistic effects of elevated temperature and carbon dioxide on the metabolic rates of Antarctic notothenioids. *Comp Biochem Physiol* 164A:154-161
- Esbaugh AJ**, Heuer R, Grosell M (2012) Impacts of ocean acidification on respiratory gas exchange and acid-base balance in a marine teleost, *Opsanus beta*. *J Comp Physiol* 182B:921-934
- Evans DH**, Claiborne JB, Farmer L, Mallery C, Krasny EJ (1982) Fish gill ionic transport: methods and models. *Biol Bull* 163: 108-130
- Evans DH**, Piermarini PM, Choe KP (2005) The multifunctional fish gill: dominant site of gas exchange, osmoregulation, acid-base regulation and excretion of nitrogenous waste. *Physiol Rev* 85: 97-177
- Fischer T** (2003) The effects of climate induced temperature changes on cod (*Gadus morhua* L.): Linking ecological and physiological investigations. *Dissertation Rep Pol Mar Res*: 454
- Forsgren E**, Dupont S, Jutfelt F, Amundesen T (2013) Elevated CO₂ affects embryonic development and larval phototaxis in a temperate marine fish. *Ecol Evol* 3(11): 3637-3646
- Frommel AY**, Maneja R, Lowe D, Malzahn AM, Geffen AJ, Folkvord A, Piatkowski U, Reusch TBH, Clemmesen C (2011). Severe tissue damage in Atlantic cod larvae under increasing ocean acidification. *Nat Clim Chang* DOI.10.1038/NCLIMATE1324

- Frommel AY**, Schubert A, Piatkowski U, Clemmesen C (2013) Egg and early larval stages of Baltic cod, *Gadus morhua*, are robust to high levels of ocean acidification. *Mar Biol* 160:1825-1834
- Gonzalez-Cabrera PJ**, Dowd F, Pedibhotla VK, Rosario R, Stanley-Samuelson D, Petzel D (1995) Enhanced hypo-osmoregulation induced by warm-acclimation in Antarctic fish is mediated by increased gill and kidney Na⁺/K⁺-ATPase activities. *J Exp Biol* 198:2279-2291
- Goss GG**, Perry SF, Fryer JN, Laurent P (1998) Gill morphology and acid-base regulation in freshwater fishes. *Comp Biochem Physiol* 119A: 107-115
- Gypens N**, Lacroix G, Lancelot C, Borges AV (2011) Seasonal and inter-annual variability of air-sea CO₂ fluxes and seawater carbonate chemistry in the Southern North Sea. *Prog Oceanogr* 88:59-77
- Heisler N** (1993) Acid-base regulation. In: Evans DH (ed) *The Physiology of Fishes*, CRC Press Inc, Boca Raton, pp. 343-377
- Heisler N** (1986) Buffering and transmembrane ion transfer processes. In: Heisler N (ed), *Acid-base regulation in animals*, Elsevier Biomedical Press, Amsterdam, pp 3-47
- Herbert NA**, Steffensen JF (2005) The response of Atlantic cod, *Gadus morhua*, to progressive hypoxia: fish swimming speed and physiological stress. *Mar Biol* 147: 1403-1412
- Holmgren S**, Nilsson S (1974) Drug effects on Isolated Artery Strips from two teleosts, *Gadus morhua* and *Salmo gairdneri*. *Acta Physiol Scand* 90:431-437
- Ishimatsu A**, Hayashi M, Lee KS (2005) Physiological effects on fishes in a high-CO₂ world. *J Geophys. Res.* 110: C09S09 doi:10.1029/2004JC002564
- Jutfelt F**, Hedgärde M (2013) Atlantic cod actively avoid CO₂ and predator odour, even after long-term CO₂ exposure. *Front Zool* 10:81
- Kreiss, CM**, Michael, K, Bock, C, Lucassen, M, Pörtner, H-O (2015) Impact of long-term hypercapnia on the energy budget of isolated gills of Atlantic cod (*Gadus morhua*). *Comp Biochem Physiol* 182A: 102-112
- Krumschnabel G**, Wieser W (1994) Inhibition of the sodium pump does not cause a stoichiometric decrease of ATP-production in energy limited fish hepatocytes. *Experientia* 50: 483-485
- Lannig G**, Bock C, Sartoris F, Pörtner HO (2004) Oxygen limitation of thermal tolerance in cod, *Gadus morhua* L., studied by magnetic resonance imaging and online-venous oxygen monitoring. *Am J Physiol Regul Integr Physiol Comp* 287: R902-910
- Larsen BK**, Pörtner HO, Jensen FB (1997) Extra- and intracellular acid-base balance and ionic regulation in cod (*Gadus morhua*) during combined and isolated exposures to hypercapnia and copper. *Mar. Biol.* 128: 337-346

- Lebedeva NY**, Vosilene MZY, Golovkina TV (1994) Aspects of stress in rainbow trout, *Salmo gairdneri*, release of chemical alarm signals. J Ichthyol 33:66-74
- Lewis E**, Wallace D (1998) Program developed for CO₂ system calculations. In ORNL/CDIAC-105a. Oak Ridge, Tennessee: Carbon Dioxide Information Analysis Center, Oak Ridge National Laboratory, U.S. Department of Energy
- Li P**, Mai P, Truhenski J, Wu G (2008) New developments in fish amino acid nutrition: towards functional and environmentally oriented aquafeeds. Amino Acids: DOI 10.1007/s00726-008-0171-1
- Lyndon AR** (1994) A method for measuring oxygen consumption in isolated perfused gills. J. Fish Biol. 44(4):707-715
- Maneja RH**, Frommel AY, Browman HL, Clemmesen C, Geffen AJ, Folkvord A, Piatkowski U, Durif CMF, Bjelland R, Skiftesvik AB (2013) The swimming kinematics of larval Atlantic cod *Gadus morhua* L., are resilient to elevated seawater pCO₂. Mar Biol 160:1963-1972
- Miller GM**, Watson SA, Donelson JM, McCormick MI, Munday PL (2012) Parental environment mediates impacts of increased carbon dioxide on a coral reef fish. Nature Clim Chang 2:858-861
- Mark FC**, Hirse T, Pörtner HO (2005) Thermal sensitivity of cellular energy budgets in some Antarctic fish hepatocytes. Polar Biol. 28:805-814
- Marshall WS**, Grosell M (2005) Ion transport, osmolytes and acid-base balance. In: The physiology of fishes, third edition. Evans DH, Claiborne JB (eds) CRC Press Taylor and Francis Group, USA. pp. 177-229
- Mehrbach C**, Culbertson CH, Hawley JE, Pytkowicz RM (1973) Measurement of the apparent dissociation constants of carbonic acid in seawater at atmospheric pressure. Limnol Oceanogr 18:897-907
- Melzner F**, Göbel S, Langenbuch M, Gutowska MA, Pörtner H.O., Lucassen M. (2009) Swimming performance in Atlantic Cod (*Gadus morhua*) following long-term (4-12 months) acclimation to elevated seawater PCO₂. Aquat Toxicol 92:30-37
- Mitrovic D**, Perry SF (2009) The effects of thermally induced gill remodelling on ionocyte distribution and branchial chloride fluxes in goldfish (*Carassius auratus*). J Exp Biol 212: 843-852
- Morgan JD**, Iwama GK (1999) Energy cost of NaCl transport in isolated gills of cutthroat trout. Am. J Physiol Regul Integr Comp Physiol 277:R631-R639
- Munday PL**, McCormick, MI, Nilsson E (2012) Impact of global warming and rising Co₂ levels on coral reef fishes: what hope for the future? J Exp Biol 215:3865-3873
- Neat, F**, Righton D (2007) Warm water occupancy by North Sea cod. Proc R Soc B. 274: 789-798

- Nilsson G** (2007) Gill remodelling – a new fashion or an ancient secret? *J Exp Biol* 210: 2403-2409
- Nilsson GE**, Dixon DL, Domenici P, McCormick MI, Sørensen C, Watson SW, Munday PL (2012) Near future carbon dioxide levels alter fish behaviour by interfering with neurotransmitter function. *Nat Clim Chang* DOI:101038/NCLIMATEE1352
- Nowicki JP**, Miller GM, Munday PL (2012) Interactive effects of elevated temperature and CO₂ on foraging behaviour of juvenile coral reef fish. *J Exp Biol* 412: 46-51
- Ong KJ**, Stevens ED, Wright PA (2007). Gill morphology of the mangrove killifish (*Kryptolebias marmoratus*) is plastic and changes in response to terrestrial air exposure. *J Exp Biol* 210: 1109-1115
- Packer RK**, Garvin JL (1998) Seasonal differences in activity of perch (*Perca flavescens*) gill Na⁺/K⁺-ATPase. *Comp Biochem Physiol* 120B: 777-783
- Parks SK**, Tresguerres M, Goss GG (2007) Interactions between Na⁺ channels and Na⁺-HCO₃⁻-cotransporters in the freshwater fish gill MR cell: a model for transepithelial Na⁺ uptake. *Am J Physiol Cell Physiol* 292: 935-944
- Perry SF**, Gilmour KM (2006) Acid-base balance and CO₂ excretion in fish: Unanswered questions and emerging models. *Respir Physiol Neurobiol* 154:199-215
- Piermarini PM**, Verlander JW, Royaux IE, Evans DH (2002) Pendrin immunoreactivity in the gill epithelium of a euryhaline elasmobranch. *Am J Physiol Integr Comp Physiol* 283:R983-R992
- Pörtner H-O**, Bock C, Reipschläger A (2000). Modulation of the cost of pHi regulation during metabolic depression: a ³¹P-NMR study in invertebrate (*Sipunculus nudus*) isolated muscle. *J Exp Biol* 203: 2417-2428
- Pörtner H-O**, Mark FC, Bock C (2004) Oxygen limited thermal tolerance in fish? Answers by nuclear magnetic resonance techniques. *Respir Physiol Neuro* 141:243-260
- Pörtner H-O**, Knust R (2007) Climate change affects marine fishes through the oxygen limitation of thermal tolerance. *Science* 315: 95
- Pörtner H-O** (2008) Ecosystem effects of ocean acidification in times of ocean warming: a physiologist's view. *Mar Ecol Prog Ser* 373:203-217
- Pörtner H-O**, Bock C, Knust R, Lannig G, Lucassen M, Mark FC, Sartoris FJ (2008) Cod and climate in a latitudinal cline: physiological analyses of climate effects in marine fishes. *Clim Res* 37:253-270
- Pörtner H-O**, Peck MA (2010) Climate change effects on fishes and fisheries: towards a cause-and-effect understanding. *J Fish Biol* 77: 1745-1779
- Pörtner HO**, Schulte PM, Wood CM, Schiemer F (2010). Niche dimensions and limits in fishes: An integrative view. Illustrating the role of physiology in understanding ecological realities. *Physiol Biochem Zool* 83: 808–826

- Pörtner, H-O** (2012). Integrating climate-related stressor effects on marine organisms: unifying principles linking molecule to ecosystem-level changes. *Mar Ecol Prog Ser* 470: 273-290
- Pörtner HO**, Karl DM, Boyd PW, Cheung WL, Lluich-Cota SE, Nojiri Y, Schmidt DN, Zavialov PO (2014) Ocean systems. In: *Climate Change 2014: Impacts, Adaptation, and Vulnerability. Part A: Global and Sectoral Aspects. Contribution of Working Group II to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change* [Field CB, Barros VR, Dokken DJ, Mach KJ, Mastrandrea MD, Bilir TE, Chatterjee M, Ebi KL, Estrada YO, Genova RC, Girma B, Kissel ES, Levy AN, MacCracken S, Mastrandrea PR, White LL (eds)]. Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom and New York, NY, USA
- Righton DA**, Andersen KH, Neat F, Thorsteinsson V, Steingrund P, Svedäng H, Michalsen K, Hinrichsen HH, Bendall V, Neuenfeldt S, Wright P, Jonsson P, Huse G, van der Kooij J, Mosegaard H, Hüsey K, Metcalfe J (2010) Thermal niche of Atlantic cod *Gadus morhua*: limits, tolerance and optima. *Mar Ecol Prog Ser* 420: 1-13
- Rimoldi S**, Terova G, Brambilla F, Bernardini G, Gornati R, Saroglia M (2009) Molecular characterization and expression analysis of Na⁺/H⁺ exchanger (NHE)-1 and c-Fos genes in sea bass (*Dicentrarchus labrax*, L) exposed to acute and hypercapnia. *J Exp Biol Ecol* 375:32-40
- Sarazin G**, Michard G, Prevot F (1999) A rapid and accurate spectroscopic method for alkalinity measurements in sea water samples. *Water Res* 33:290-294
- Schurmann H**, Steffensen JF (1997) Effects of temperature, hypoxia and activity on the metabolism of juvenile Atlantic cod. *J Fish Biol* 50(6):1166-1180
- Seidelin M**, Brauner CJ, Jensen FB, Madsen SS (2001) Vacuolar-type H⁺-ATPase and Na⁺, K⁺-ATPase expression in gills of Atlantic salmon (*Salmo salar*) during isolated and combined exposure to hyperoxia and hypercapnia in fresh water. *Zool Sci* 18:1199-1205
- Simpson SD**, Munday PL, Wittenrich ML, Manassa R, Dixon DL, Gagliano M, Yan HY (2011) Ocean acidification erodes crucial auditory behaviour in a marine fish. *Biol Lett* doi:10.1098/rsbl.2011.0293
- Soofiani NM**, Hawkins AD (1982) Energetic costs at different levels of feeding juvenile cod, *Gadus morhua* L. *J Fish Biol* 21(5): 577-592
- Taboada, FG**, Anadón R (2012) Patterns of change in sea surface temperature in the North Atlantic during the last three decades: beyond mean trends. *Clima Chang* 115:419-431
- Takahashi T** (1993) Seasonal variation of CO₂ and nutrients in the high-latitude surface oceans: a comparative study. *Glob Biogeochem Cyc* 7(4):843-878

- Tresguerres, M**, Katoh F, Fenton H, Jasinska E, Goss GG (2005) Regulation of branchial V-H⁺-ATPase, Na⁺/K⁺-ATPase and NHE2 in response to acid and base infusions in the Pacific spiny dogfish (*Squalus acanthias*). J Exp Biol 208: 345-354
- Tseng YC**, Hu MY, Stumpp M, Lin LY, Melzner F, Hwang PP (2013) Comp Biochem Physiol A 165:119-130
- Wahlqvist I**, Nilsson S (1977) The role of sympathetic fibres and circulating catecholamines in controlling the blood pressure and heart rate in the cod, *Gadus morhua*. Comp Biochem Physiol 57C: 65-67
- Wilson RW**, Wilson JM, Grosell M (2002) Intestinal bicarbonate secretion by marine teleost fish – why and how? BBA Biomem 1566 (1-2):182-193
- Wittmann AC**, Pörtner HO (2013) Sensitivities of animal taxa to ocean acidification. Nature Clim Chang: DOI:10.1038/NCLIMATE1982
- Wu SC**, Horng JL, Liu ST, Hwang PP, Wen ZH, Lin CS, Lin LY (2010) Ammonium-dependent sodium uptake in mitochondrium-rich cells of medaka (*Oryzias latipes*) larvae. Am J Physiol Cell Physiol: 289(2):237-250
- Yancey, PH** (2001) Organic compounds as osmolytes. In: Fish physiology nitrogen excretion. Wright PA, Anderson PM (eds) pp 309-335
- Yancey PH** (2005). Organic osmolytes, metabolic and counteracting cytoprotectants in high osmolarity and other stresses. J Exp Biol 208: 2819-2830

Publikation III

Metabolic shifts in Atlantic cod (*Gadus morhua*) exposed to combined warming and acidification scenarios

Cornelia M. Kreiss¹, Katharina Michael¹, Hans-O. Pörtner¹ and Magnus Lucassen¹

¹Alfred Wegener Institute, Helmholtz Center for Marine and Polar Research, Integrative Ecophysiology, Am Handelshafen 12, D-27570 Bremerhaven, Germany

*Corresponding author:

Cornelia M. Kreiss

Cornelia.Kreiss@awi.de

Abstract

Oceanic acidification and warming are projected to cause major impacts on marine ecosystems. Fish, as a prominent group of marine organisms, are generally thought to cope better with these changes than other taxa. However, the impact on long-term processes like growth and the underlying metabolic processes are insufficiently explored. Here, we exposed Atlantic cod (*Gadus morhua*) for four weeks to different levels of PCO_2 (550 μ atm as control, 1200 μ atm and 2200 μ atm) at optimum (10°C) and summer maximum temperature levels (18°C), respectively. We related findings on animal fitness and growth performance to enzyme capacities from key metabolic pathways in liver and muscle tissue. Decreasing growth in animals incubated at 10°C and high PCO_2 was paralleled by reduced hepatic GDH capacities and plasma ammonia concentrations as well as decreased LDH capacities at high PCO_2 . At 18°C and low PCO_2 , growth rates were significantly reduced compared to the respective 10°C group, indicating thermal limitation. However, growth rates, muscle protein content and animal condition at 18°C rose with increasing PCO_2 supported by enhanced mitochondrial key functions (citrate synthase, cytochrome c oxidase (COX)) and 3-hydroxyacyl-coA dehydrogenase (HADH) capacity. LDH capacities however fell for the high PCO_2 group in the warmth. Overall, adjustments in white muscle under acidification may have assisted to overcome the constraints of warm temperature, stimulating enhanced aerobic and decreased anaerobic metabolic capacities. Liver enzyme capacities mostly responded to warming; the increase of phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK) capacity was particularly strong indicating increased storage and use of carbohydrates in the warmth. This strategy might prepare for hypoxemic conditions representing “warm-hardiness” as proposed for Antarctic fish. Further, elevated capacities of HADH and COX in parallel to PEPCK seem to exhibit a general regulation pattern of cod liver tissue coping with unfavourable conditions (altered PCO_2 and °C) by enhanced fatty acid use fueling ATP synthesis.

Key words: fish, phosphoenolpyruvate carboxykinase, lactate dehydrogenase, cytochrome c oxidase, citrate synthase, glutamate dehydrogenase, pyruvate kinase, ammonia, growth, hypercapnia, temperature

1 Introduction

Oceanic uptake of anthropogenic carbon dioxide leads to decreasing seawater pH, while global warming leads to rising ocean temperatures. By 2100 atmospheric PCO_2 levels are expected to reach between 420 μatm and 940 μatm , paralleled by continued warming (Collins et al. 2013). Both abiotic factors have the potential to affect marine organisms and the combined action of these factors may exacerbate expected impacts. Hypercapnia is known to cause acid-base disturbances that might require an energetic investment reducing the scope for long-term processes such as growth or reproduction. Thus, hypercapnia may be harmful at population or species level (Pörtner et al. 2004). As a key enzyme, Na^+/K^+ -ATPase is driving most energy dependent ion transport processes. When being upregulated during hypercapnia, this enzyme has the potential to shift energy partitioning at the whole animal level. Upregulation was reported under severe hypercapnia ($\geq 6000 \mu\text{atm}$) in gill tissue of several fish species (Atlantic cod, marbled and humped rockcod, eelpout, bastard halibut) (Ishimatsu et al. 2005; Deigweiher et al. 2008; Melzner 2009, Deigweiher et al. 2010). Under moderately elevated PCO_2 levels ($\leq 3000 \mu\text{atm}$) no upregulation occurred (Melzner et al. 2009; Esbaugh et al. 2012; Kreiss et al. 2015). However, at increased temperature (18°C) and $2200 \mu\text{atm}$ CO_2 Na^+/K^+ -ATPase activities were elevated in parallel to enhanced Na^+/H^+ -exchanger and HCO_3^- -transporter activities (Kreiss et al. in revision). These changes in enzyme capacities did not affect metabolic rate of gill tissue or whole animal (Melzner et al. 2009, Deigweiher et al. 2010; Kreiss et al. in revision). Thus it remains to be explored if rearrangements in energy budget occur at constant metabolic rate.

Temperature is a crucial abiotic factor setting the pace of metabolism by controlling molecular dynamics (diffusibility, solubility, fluidity) and biochemical reaction rates (Neill et al. 1994, Pörtner 2008). A positive relationship between resting metabolic rates and temperature is common, driven by the kinetic stimulation of performances (Clarke and Fraser, 2004, Pörtner 2008). However, such stimulation is only possible within the limited thermal window of individual species. Following the concept of oxygen and capacity limited thermal tolerance (OCLTT) increasing temperature causes a mismatch between oxygen supply and demand leading to hypoxemia in body fluids, in parallel to functional limitations in ventilation and circulation at continuously increasing oxygen demand beyond limiting threshold temperatures (Pörtner 2008, McBryan et al. 2013). It has been hypothesized that OCLTT and thermal window parameters may be constrained by rising CO_2 levels (Pörtner, 2010, 2012).

In a series of studies we investigated the combined effects of warming and elevated CO_2 on Atlantic cod (*Gadus morhua*). The size of some Atlantic cod populations has declined severely (Hutchings and Reynolds, 2004) due to overfishing, but environmental factors may also have contributed to the drop in cod stocks (Planque and Fredou, 1999) and caused a northward shift of the geographical distribution of the species (Perry et al. 2005, cf. Pörtner et

al. 2008). Here we investigate the potentially synergistic effects of warming and acidification on Atlantic cod, with a focus on metabolic enzymes and pathways underpinning changes in physiological performances.

Growth is an important proxy for physiological performance and suitable to detect small-scale environmental influences, as it integrates all impacts on medium timescales and at the whole animal level. Growth studies in aquaculture did not indicate an universal effect of increasing CO₂ levels on growth of cod. Here, elevated CO₂ levels, up to approx. 4500 µatm (13 mg·l⁻¹), develop in parallel to higher fish densities (Björnsson and Ólafsdóttir 2006) or with high degrees of water reuse (Foss et al. 2006). However, a study designed to investigate impacts of long-term hypercapnia on juvenile cod resulted in reduced weight gain, lower condition factor and growth rate with increasing CO₂ levels (1,000, 3,800 and 8,500 µatm) (Moran and Støttrup 2011).

The thermal limits of cod somatic growth shift with thermal acclimation and depend on age and size, respectively (Jobling, 1988; Brander et al. 2003; ~6°C (5kg fish), ~18°C (2g fish)). For juveniles of the size class used in our study (200 ±95 gFW), 10°C-12°C represents the optimum temperature range, leading to maximum weight gain (Björnsson et al. 2007, Björnsson and Steinarsson 2002, Pörtner et al. 2001). Cod are known to use a major part of their aerobic energy to cover the costs of growth, protein synthesis accounting for 42% of the O₂ consumption in fish fed *ad libitum* (Houlihan et al. 1988). Liver as a key metabolic organ and muscle as the largest fraction of body mass provide an important contribution to overall protein accretion and energy budget. Besides protein build-up, the capacity of muscle glycolytic enzymes, as well as those for amino acid metabolism in liver, were found to correlate positively with growth rate in cod. In contrast, this was not observed for mitochondrial enzymes (cytochrome c oxidase (COX), citrate synthase (CS), 3-hydroxyacyl-coA dehydrogenase (HADH)) in the two tissues (Pelletier et al. 1994).

In response to temperature changes, higher mitochondrial capacities in muscle and a relative increase in matrix over membrane function in liver mitochondria were found in response to cold acclimation in temperate eelpout and cod (Lucassen et al. 2003, 2006). Warm acclimation in Antarctic fish caused hepatic metabolic reorganization with a shift from lipid to carbohydrate metabolism (Windisch et al. 2011). Carbohydrates are capable of sustaining energy metabolism under anaerobic conditions whereas lipids are not. Thus, the shift in the use of energy fuels from lipid to carbohydrate was defined as warm hardiness, as increased storage and use of carbohydrates in the warmth prepare for hypoxemic conditions, which become more likely at these temperature extremes (Windisch et al. 2011).

Elevated PCO₂ (10 days, ~ 3,000 µatm) was reported to cause a shift from aerobic to anaerobic pathways in fishes. This was indicated by an increase in lactate dehydrogenase (LDH) and a drop in CS capacities in muscle tissue of a Mediterranean fish (Michaelides et

al. 2007). In Antarctic fish (*Notothenia rossii*) long-term CO₂ exposure (~ 2,000 µatm ~ 1 month) at control and warm (7°C) temperature led to reduced liver mitochondrial capacities (COX). It was presumed that changes in mitochondrial densities or an inhibited TCA-cycle mediated altered COX capacities (Strobel et al. 2012). The authors proposed that the hypercapnia induced increase in HCO₃⁻ levels inside of mitochondria competitively inhibits the TCA-cycle and leads to lowered mitochondrial respiratory capacities and ATP supply (Walsh et al. 1988, Strobel et al. 2013).

The combination of the two drivers temperature and P_{CO2} can exert additive, synergistic, multiplicative or antagonistic influences (Crain et al. 2008). The resulting effects may be negative, neutral or even positive compared to control conditions or effects of individual drivers. In the present study, we aimed to investigate the response of aerobic, glycolytic as well as pathways concerning lipid, amino acid and carbohydrate metabolism in Atlantic cod after exposure to hypercapnia, warming and to the combination of both factors. Furthermore, we aimed to clarify what influence potential shifts in these pathways may have on animal performance. Therefore, we incubated Atlantic cod for four weeks under three CO₂ conditions: 550 µatm as control levels at sampling site, 1,200 and 2,200 µatm as prospected for the next 100 up to 300 years (Meinshausen et al. 2011; Collins et al. 2013) and two temperatures (10°C: representing optimal growth temperature, 18°C: summer maximum temperature). We assessed growth performance and systemic parameters in relation to metabolic capacities in liver and muscle of specific key enzymes. Maximum activities of the mitochondrial enzymes CS and COX were used as proxies for aerobic capacities in both tissues. Further, the capacities of mitochondrial glutamate dehydrogenase (GDH) and HADH indicated amino acid metabolism of the liver and lipid catabolism in both tissues, respectively. As the citric acid cycle represents the integrating hub for lipids, amino acids and carbohydrates, maximum capacities of citrate synthase were used to normalize the contribution of different pathways. Furthermore, hepatic phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK) capacities were investigated to examine the impact of ocean acidification and elevated temperature on carbohydrate anabolism. The capacities of the glycolytic enzymes pyruvate kinase (PK) and LDH were used as indicators for the use of anaerobic metabolism in muscle tissue.

2 Material and Methods

This research was conducted according to ethical commission Dnr.: 3157-11, 23-2012 and 88-2012 approved by the Sweden's Ethical Committee on Animal Experiment.

2.1 Experimental animals

Atlantic cod *Gadus morhua* were caught in February/March 2012 in the Gullmarsfjord (Kattegat) around Kristineberg Marine Station, Sweden. For the experiments fish were individually tagged (Visible Implant Elastomer, Northwest Marine Technology Inc. Washington, USA) and measured in weight and length while anaesthetized with MS-222 (3-aminobenzoic ethyl ester, Applichem, Darmstadt; Germany) at a concentration of 0.2 g/l. Afterwards the fish were acclimated for 4 weeks to $10.3^{\circ}\text{C} \pm 0.2^{\circ}\text{C}$ or $18.1^{\circ}\text{C} \pm 0.2^{\circ}\text{C}$ and at $552.97 \pm 78.1 \mu\text{atm CO}_2$, $1469.93 \pm 459.93 \mu\text{atm CO}_2$ and $2227.95 \pm 312.33 \mu\text{atm CO}_2$ at each of those temperatures. 8-9 fish per 1,200 l flow-through system were incubated with natural seawater and two replicates per treatment. For more details of animal incubation conditions see Kreiss et al. (in revision).

2.2 Animal condition parameters and tissue sampling

Fish were anaesthetised with 0.2 g/l MS222, identified by the tag and measured in length and weight for growth data in percentage of pre-incubation. Blood samples were taken from the ventral vein. Fish were killed by cutting their spine. Liver was dissected and weighed for the determination of the hepatosomatic index (HSI), calculating the ratio of liver to body weight. Condition factor (K) was determined as a measure of health using standard weight according to: $K=100(W/L^3)$ with W= standard weight (g) and L= length in cm. Liver and white muscle samples were frozen in liquid nitrogen directly after dissection.

2.3 Enzyme assays

Frozen samples of liver and white muscle tissue were homogenized in extraction buffer (20 mM tris HCl buffer (pH 7.5) containing 1mM EDTA and 0.1 % Triton X 100) with a ratio of 10 μl buffer per 1 mg wet tissue using a tissue homogenizer (Precellys 24, Bertin Technologies, France). Sample tubes contained 1.4 mm ceramic beads (Precellys 24, Bertin Technologies, France) and were treated with 5,000 rpm at 4°C , 3 times for 15 s. In order to remove cell debris, homogenates were centrifuged for 10 min at 1,000 g and 4°C . The supernatant was used as crude extract. Maximal activities of phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK), glutamate dehydrogenase (GDH), 3-hydroxyacylCoA dehydrogenase (HADH), citrate synthase (CS) and cytochrome-c-oxidase (COX) were measured in liver tissue. Pyruvate kinase (PK), lactate dehydrogenase (LDH), HADH, CS and COX were determined in muscle tissue. All enzyme assays were performed with a micro-plate reader (PowerWave HT, Biotek, Bad Friedrichshall, Germany) at both acclimation temperatures of 10°C and 18°C for all groups using a thermostatted aluminium block to control temperature conditions as described in Weiss et al. (2012). Reactions took place in a final volume of 200 μl . After mixing of enzyme-specific buffers, cofactors and crude extracts in the respective wells, the

reaction was started after equilibration by adding the respective substrate. Background activities without extracts and substrate were subtracted to calculate specific enzyme activities. Conditions for enzyme assays including wavelength were as follows (chemicals were obtained from Applichem, Darmstadt, Germany or Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Germany): **PEPCK**, 340 nm, modified after Aas-Hansen et al. 2005: 20 mM NaHCO₃, 1 mM MnCl₂, 1 mM phosphoenolpyruvate, 0.2 mM guanosin diphosphate, 2.5 µg/ml antimycin A and excess malate dehydrogenase reaction was initiated with 0.12 mM NADH; **GDH**, 340 nm, modified after Sanchez-Muros et al. 1998: 40 mM phosphate buffer (pH 7.4), 100 mM NH₄ acetate, 0.2 mM NADH and; reaction was initiated with 5 mM α-keto glutarate; **HADH**, 340 nm, modified after Mc Clelland et al. 2005: 50 mM imidazole buffer, 0.15 mM NADH, 2.5 µg/ml antimycin A; reaction was initiated with 0.1 mM aceto acetyl-CoA; **CS**, 412 nm, modified after Sidell et al. (1987): 75 mM Tris-HCl buffer (pH 8.0), 0.35 mM 5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid), 0.4 mM acetyl-CoA and 0.5 mM; reaction was initiated with oxal acetate; **COX**, 550 nm, modified after Moyes et al. (1997): 20 mM Tris-HCl buffer (pH 7.8) with 0.05 % Tween; reaction was initiated with 50 µM reduced cytochrome c; **PK**, 340 nm, modified after Driedzic and Almeida-Val (1996): 80 mM Tris/HCl, pH 8.0, 80 mM KCl, 5 mM MgSO₄, 5mM ADP, 0.2 mM NADH; reaction was initiated with 1 mM phosphoenolpyruvate as substrate; **LDH**, 340 nm, modified after Kornberg (1955): 80 mM Tris/HCl, pH 8.0, 80 mM KCl, 5 mM MgSO₄, 1mM NADH, reaction was initiated with 0.5 mM pyruvate.

Maximum enzyme capacities were related to g fresh weight and the protein concentration in the extracts. The latter was measured according to Bradford (1976) adapted for a micro-plate reader and using lyophilized bovine serum albumin as standard (Bio-Rad, Munich, Germany). Enzyme capacity was calculated as micromoles per hour and g fresh weight respectively mg protein using the respective extinction coefficient (NADH $\epsilon(340 \text{ nm}) = 6.31 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, thionitrobenzoic acid $\epsilon(412 \text{ nm}) = 13.6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, ferricytochrome c $\epsilon(550 \text{ nm}) = 19.1 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Ammonium was determined enzymatically in cleared blood plasma using glutamate dehydrogenase in an Ammonium Assay Kit (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Germany). The test was adopted to micro plate reader and a final volume of 200 µl, a calibration curve with ammonium chloride between 0.07 and 0.6 mM was used for calculations. Statistical analyses were performed using Sigmaplot 12 and Graphpad Prism 4 adopting a significance level of $p < 0.05$ for all data. If data conformed to variance homogeneity and normality distribution two way ANOVAs with subsequent Tukey multiple comparison tests were conducted. If these preconditions failed, temperature related one way ANOVAs were performed instead, with consecutive multiple t-tests using Bonferroni-Holm p-value correction. To test for correlation between standard metabolic rate and growth rate as well as between specific enzyme capacities and condition parameters Spearman correlation was performed.

3 Results

3.1 Animal condition and growth

Condition factors (K) and hepatosomatic indices (HSI) are presented in figure 1a-b. The condition factor as an indicator of the nutritional status was significantly decreased at 18°C and low PCO_2 compared to all treatments at 10°C ($p < 0.05$) (Fig. 1a). No CO_2 dependent differences were detected for both incubation temperatures. The ratio of liver to body weight (HSI) indicates the energy reserve status of a fish. HSI was significantly elevated for fish reared at high temperature and high CO_2 levels compared to fish at high CO_2 and 10°C ($p < 0.05$, Fig. 1b).

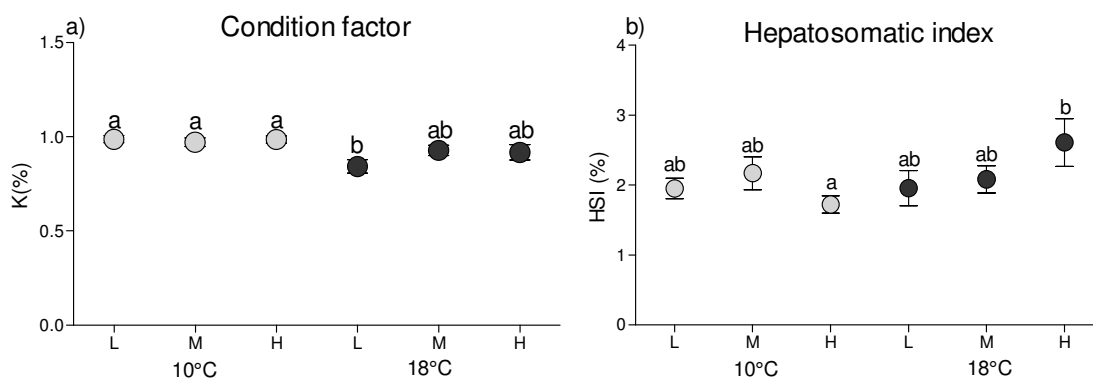


Fig. 1a-b: Hepatosomatic index (%) (a), condition factor (%) (b) of fish 4 weeks incubated to L= low PCO_2 , 550 μ atm, M=medium PCO_2 , 1,200 μ atm, H= high PCO_2 , 2,200 μ atm at 10°C (grey circles) and at 18°C (black circles). $n = 18-20$ per treatment. Different letters indicate significant differences between CO_2 treatments within an acclimation temperature, symbols indicate significant differences between temperature groups ($p < 0.05$).

Growth rate per day was in the range of 0.81-0.87% at 10°C and low and medium PCO_2 , but slightly lower in fish reared at 10°C and high PCO_2 (0.59%) (Fig. 2). At low PCO_2 growth was negatively affected by temperature ($p < 0.0001$, Fig. 2). A fraction of fish at 18°C and low PCO_2 even lost weight compared to pre-incubation conditions (mean: $0.15 \pm 0.65\%$ per day). The combination of high temperature with elevated PCO_2 compensated for the reduced growth rate. At 18°C, growth rates were positively correlated with increasing PCO_2 ($p = 0.005$), leading to significantly higher weight gains at high CO_2 levels and 18°C ($p = 0.01$).

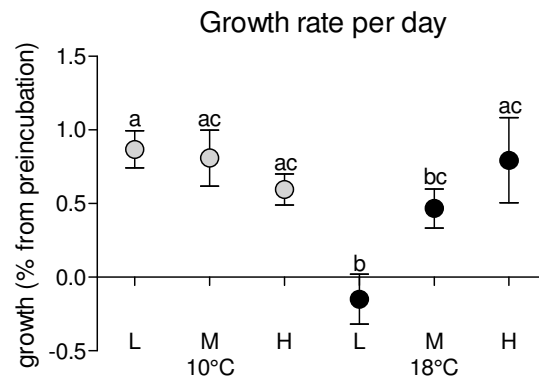


Fig. 2: Growth rate per day in percent of pre-incubation weight of fish incubated for 4 weeks to L= low PCO_2 , 550 μatm , M=medium PCO_2 , 1,200 μatm , and H= high PCO_2 , 2,200 μatm at 10°C (grey circles) and at 18°C (black circles). n= 18-20 per treatment. Different letters indicate significant differences between CO_2 treatments at the same acclimation temperature, asterisks indicate significant differences between temperatures ($p < 0.05$).

Protein content per g tissue varied in a tissue dependent manner with PCO_2 or temperature (Fig. 3a-b). Total protein content in liver extracts increased at medium PCO_2 at both temperatures ($p=0.01$), and similarly at high PCO_2 ($p= 0.007$) and 10°C as well as 18°C ($p=0.023$) when compared to contents for control fish (10°C and low PCO_2). Conversely, protein content of muscle tissue was highest at 10°C and low PCO_2 , and fell slightly with rising PCO_2 . At 18°C, total protein content of muscle tissue extracts was significantly reduced for all PCO_2 levels ($p=0.004$ Fig. 3b) compared to control fish.

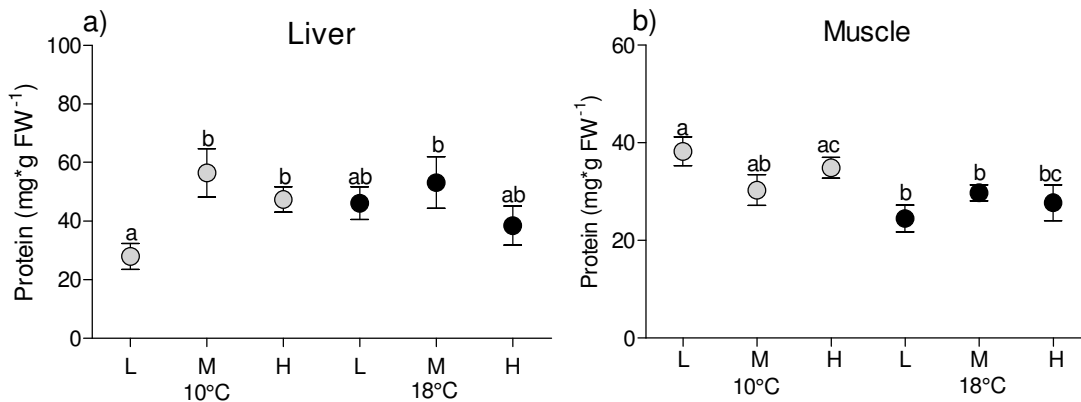


Fig. 3a -b: Total extractable protein content ($\text{mg}\cdot\text{gFW}^{-1}$) of homogenized liver (a) and muscle tissue (b) of the groups exposed to L= low PCO_2 , 550 μatm , M=medium PCO_2 , 1200 μatm , and H= high PCO_2 , 2200 μatm at 10°C (grey circles) and at 18°C (black circles). Different letters indicate significant differences at $p < 0.05$, n= 18-20 per treatment.

3.2 Enzyme capacities

Representative enzyme capacities of key processes in liver and white muscle were investigated to detect functional shifts in metabolism of the respective tissue.

Capacities of the enzymes are given both in relation to tissue or animal fresh weight (Fig. 4-7) and to the entire protein content (proteome) of a tissue (Tab. 1). In order to detect shifts in metabolic pathways relative to each other, citrate synthase capacities were used as a common denominator for the other enzymes, as citrate synthase represents the TCA cycle, which as a central hub balances oxidative and biosynthetic pathways (Tab. 2).

3.2.1 Aerobic enzyme capacities (citrate synthase, cytochrome c oxidase)

Changes in the capacities of citrate synthase (CS) and cytochrome c oxidase (COX) differed between the two tissues. Furthermore, these enzyme capacities were generally higher in liver tissue except for medium PCO_2 at 10°C and high PCO_2 at 18°C when capacities in muscle rose to levels as high as in liver (Fig. 4-7). Hepatic COX capacities related to tissue protein were identical in all treatments, independent of PCO_2 and temperature, at an overall mean capacity of $0.15 \pm 0.88 \text{ U} \cdot \text{mg protein}^{-1}$ (Tab. 1a). COX capacities related to fresh weight increased significantly with rising PCO_2 and temperature compared to the low PCO_2 group at 10°C (Fig. 4a).

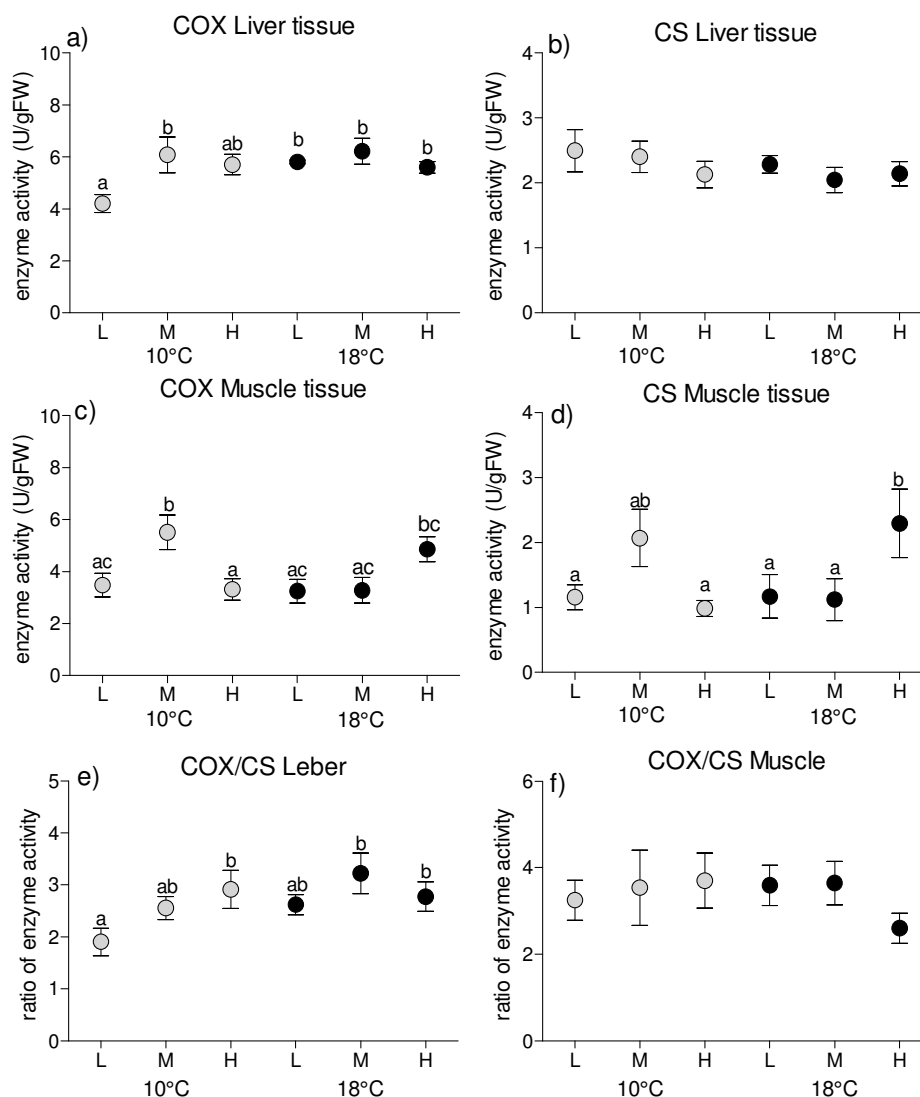


Fig. 4 a-f: Liver and muscle cytochrome c oxidase (COX) and citrate synthase (CS) capacities per g freshweight ($\text{U} \cdot \text{gFW}^{-1}$) as well as their respective ratios: L= low PCO_2 , 550 μatm , M=medium PCO_2 , 1200 μatm , H= high PCO_2 , 2200 μatm at 10°C (grey circles) and at 18°C (black circles). Different letters indicate significantly different enzyme capacities at $p < 0.05$ and $n=8$.

Protein-related CS capacities in liver tissue ($0.13 \pm 0.12 \text{ U} \cdot \text{mg protein}^{-1}$ at low PCO_2 and 10°C) were significantly reduced under elevated PCO_2 ($p=0.001$) as well as under elevated temperature ($p=0.004$) and in combination with medium PCO_2 ($p=0.014$). In relation to fresh weight this effect was only marginal (Tab. 1a, Fig. 4b). The resulting COX/CS ratio increased

continuously with increasing PCO_2 for the fish at 10°C ($R^2=0.918$). About 50% higher ratios were observed in fish reared at 18°C. This increase was significant at medium PCO_2 compared to low PCO_2 at 10°C ($p=0.015$).

In muscle tissue COX and CS capacities related to protein content and fresh weight increased in parallel from low to medium PCO_2 at 10°C and from low to high PCO_2 at 18°C (Tab. 1, Fig. 4c-d). Comparable capacities for both temperatures at low PCO_2 indicate almost perfect thermal compensation. This similarity is mirrored in constant COX/CS ratios in all treatments (Fig. 4f).

Table 1 Means \pm standard deviation of muscle and liver enzyme capacities in the different exposed groups (L = low PCO_2 , M= medium PCO_2 and H = high PCO_2) referred to mg protein. Different letters indicate significant differences between treatments, $p < 0.05$, $n = 8$.

Enzyme capacity (U*protein ⁻¹)					
Muscle tissue	CS	COX	HADH	LDH	PK
10°C L	0.03 \pm 0.01 ac	0.09 \pm 0.02 a	0.002 \pm 0.010 a	2.15 \pm 0.66 a	1.20 \pm 0.24 ad
10°C M	0.07 \pm 0.05 bc	0.19 \pm 0.09 bc	0.005 \pm 0.002 b	2.51 \pm 0.58 a	1.68 \pm 0.41 bc
10°C H	0.03 \pm 0.01 a	0.10 \pm 0.05 a	0.003 \pm 0.001 ac	1.43 \pm 0.61 b	1.33 \pm 0.43 ab
18°C L	0.05 \pm 0.06 ab	0.14 \pm 0.09 abc	0.008 \pm 0.007 ab	3.10 \pm 1.09 a	2.17 \pm 1.66 abc
18°C M	0.03 \pm 0.02 ab	0.11 \pm 0.04 ab	0.004 \pm 0.001 bc	3.34 \pm 1.89 ab	1.91 \pm 0.30 cd
18°C H	0.09 \pm 0.06 bc	0.20 \pm 0.08 c	0.009 \pm 0.007 b	2.01 \pm 1.87 ab	2.49 \pm 1.99 cd
Liver tissue	CS	COX	HADH	GDH	PEPCK
10°C L	0.13 \pm 0.13 a	0.14 \pm 0.06	0.02 \pm 0.05	0.16 \pm 0.06 a	0.09 \pm 0.02 a
10°C M	0.05 \pm 0.02 b	0.12 \pm 0.04	0.01 \pm 0.005	0.08 \pm 0.03 b	0.09 \pm 0.04 ab
10°C H	0.05 \pm 0.01 b	0.13 \pm 0.03	0.01 \pm 0.005	0.08 \pm 0.05 b	0.07 \pm 0.02 abc
18°C L	0.05 \pm 0.03 bc	0.14 \pm 0.04	0.02 \pm 0.02	0.11 \pm 0.03 ab	0.18 \pm 0.06 bcd
18°C M	0.05 \pm 0.03 ab	0.15 \pm 0.09	0.03 \pm 0.02	0.12 \pm 0.07 ab	0.21 \pm 0.24 cde
18°C H	0.07 \pm 0.04 ab	0.21 \pm 0.17	0.03 \pm 0.02	0.18 \pm 0.16 ab	0.28 \pm 0.21 d

3.2.2 3-Hydroxyacyl CoA dehydrogenase (HADH)

HADH capacities, lower in muscle than liver tissue, increased significantly in the warmth (Fig. 5a-b). Especially in liver, capacities were strongly elevated at high temperature ($p=0.0001$). This increase was slightly reduced by elevated PCO_2 in the warmth (Tab. 1a, Fig. 5a). Thus, the HADH/CS ratio increased significantly with temperature, but was unaffected by PCO_2 (Fig. 5c). Higher muscle tissue HADH capacities (related to protein content and fresh weight, Tab. 1, Fig. 5b) were observed at medium PCO_2 and 10°C ($p=0.017$) as well as at high PCO_2 at 18°C ($p=0.025$) compared to control animals at 10°C and low PCO_2 . An increment became visible at high PCO_2 and high temperature when compared to 10°C ($p=0.028$), whereas thermal compensation took place at low and medium PCO_2 . HADH/CS ratios were constant at 10°C. Elevated HADH/CS ratios were observed in the warmth at low PCO_2 ($p= .0103$), while attenuated with rising PCO_2 (Fig. 5d).

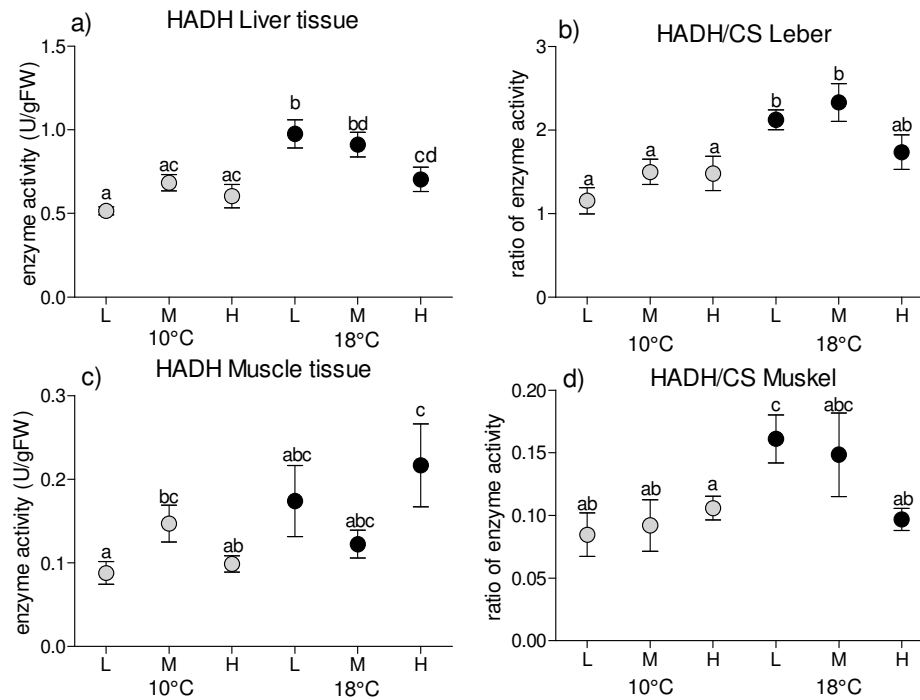


Fig. 5a-d: Liver and muscle 3-hydroxyacylcoA dehydrogenase (HADH) capacities per g freshweight ($\text{U} \cdot \text{gFW}^{-1}$) as well as their ratio with citrate synthase (CS) capacities: L= low PCO_2 , 550 μatm , M=medium PCO_2 , 1,200 μatm , H= high PCO_2 , 2,200 μatm at 10°C (grey circles) and at 18°C (black circles). Different letters indicate significantly different enzyme capacities at $p < 0.05$ and $n=8$.

3.2.3 Glycolytic enzymes (pyruvate kinase and lactate dehydrogenase)

At 10°C and high PCO_2 muscle lactate dehydrogenase (LDH) capacities were significantly reduced compared to the control animals when referring to both protein content and fresh weight (freshweight: $p=0.0013$; protein: $p=0.0387$; Tab. 1, Fig. 6b). Capacities of protein-related PK were elevated at 10°C and medium PCO_2 ($p=0.047$). In addition, temperature-dependent, elevated capacities were observed for the respective PCO_2 at 18°C ($p=0.0367$) (Tab. 1). Thermal compensation was observed for capacities of both glycolytic enzymes related to protein content as well as tissue fresh mass under low PCO_2 . Capacities of protein-related PK were elevated at 10°C and medium PCO_2 ($p=0.047$), temperature-dependent increases in capacities were observed for the respective PCO_2 at 18°C ($p=0.0367$) (Tab. 1). LDH capacities displayed the same trend observed at 10°C to decrease at high PCO_2 compared to 18°C at low PCO_2 . This resulted in a significant effect of PCO_2 on the LDH/CS ratio, which was most pronounced at 18°C and high PCO_2 compared to all other groups ($p < 0.038$) except for medium PCO_2 at 10°C (Fig. 6d). The ratio of PK/CS was mainly determined by altered CS capacities and elevated at medium PCO_2 in the warmth compared to the respective 10°C group.

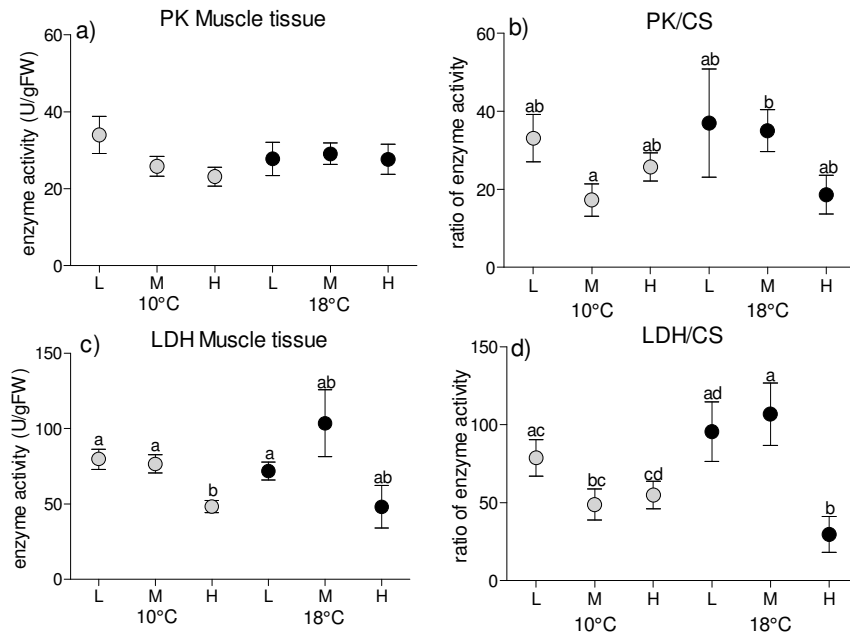


Fig. 6a-d: Muscle pyruvate kinase (PK) and lactate dehydrogenase (LDH) capacities per g freshweight ($\text{U} \cdot \text{gFW}^{-1}$) as well as their ratio with citrate synthase (CS) capacities: L= low PCO_2 , 550 μatm , M=medium PCO_2 , 1,200 μatm , H= high PCO_2 , 2,200 μatm at 10°C (grey circles) and at 18°C (black circles). Different letters indicate significantly different enzyme capacities at $p < 0.05$ and $n=8$.

3.2.4 Phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK)

Hepatic PEPCK capacities increased strongly in the warmth for all PCO_2 levels related to both protein content and fresh weight. PCO_2 affected PEPCK capacities solely at medium levels and 10°C, when the respective capacities per g fresh weight rose above those at low and high PCO_2 (low: $p=0.017$, high: $p=0.025$) (Fig. 7a). Similarly, the PEPCK/CS ratio increased strongly at high temperature ($p < 0.001$), and at medium and high PCO_2 compared to control animals ($p=0.017$) (Tab. 1, Fig. 7b). In contrast to the other enzymes investigated, PEPCK displayed a high Q_{10} above 3 in all treatments except at 18°C and medium PCO_2 (1.90 ± 0.95) (data not shown).

3.2.5 Glutamate dehydrogenase (GDH)

Reduced protein-related capacities at medium and high PCO_2 were found for GDH in liver at 10°C (medium: $p=0.007$; high: $p=0.012$) (Tab. 1a). This effect was smaller when related to fresh weight, as decreased capacities were only observed at high compared to low PCO_2 at 10°C ($p=0.072$) (Fig. 7c). Furthermore, capacities (both per protein content and fresh weight) were increased in the warmth at high PCO_2 compared to high PCO_2 at 10°C. At 18°C PCO_2 did not affect GDH capacities and interaction of temperature and PCO_2 became visible by comparing activities of the high PCO_2 treatments (freshweight: $p=0.034$). As GDH and CS capacities were affected similarly by CO_2 and temperature, the ratio of these two enzymes was identical for all treatments (Fig. 7d).

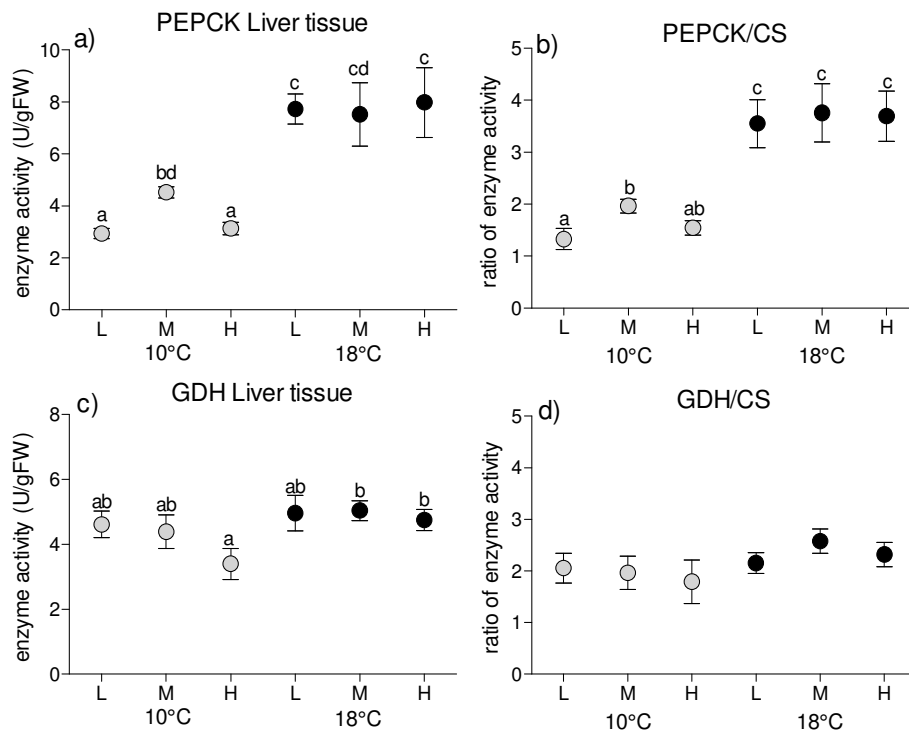


Fig. 7a-d: Liver phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK) and glutamate dehydrogenase (GDH) capacities per g freshweight ($\text{U} \cdot \text{gFW}^{-1}$) as well as their ratio with citrate synthase (CS) capacities: L= low PCO_2 , 550 μatm , M=medium PCO_2 , 1,200 μatm , H= high PCO_2 , 2,200 μatm at 10°C (grey circles) and at 18°C (black circles). Different letters indicate significantly different enzyme capacities at $p < 0.05$ and $n=8$.

3.4 Plasma Ammonium

Plasma ammonium concentrations at control conditions were $0.49 \pm 0.16 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ (Fig. 8). Two-Way ANOVA revealed a significant decline under elevated PCO_2 ($p=0.028$) and no effect of temperature on plasma ammonium levels. At 10°C plasma ammonium fell with increasing PCO_2 ($p=0.0219$), as ammonium levels decreased by 27.5% (medium PCO_2) and 28.4% (high PCO_2) compared to the low PCO_2 level. The respective changes within the 18°C treatments remained insignificant.

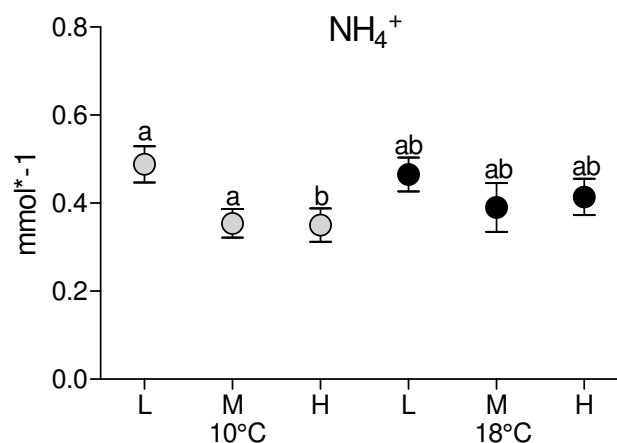


Fig. 8: Plasma ammonia concentrations ($\text{mmol} \cdot \text{l}^{-1}$) of fish exposed to L= low PCO_2 , 550 μatm , M=medium PCO_2 , 1,200 μatm , and H= high PCO_2 , 2,200 μatm at 10°C (grey circles) and at 18°C (black circles). Different letters indicate significant differences at $p < 0.05$, $n= 18-20$ per treatment.

4 Discussion

In this study we aimed to identify effects of projected ocean acidification and warming on whole animal performance of Atlantic cod in terms of growth, condition factor and HSI, whereas metabolic pathways in muscle and liver tissue were investigated to detect shifts in aerobic, glycolytic, as well as carbohydrate, lipid and amino acid metabolism, which may be able to explain the whole animal effects.

4.1 Characteristics of control animals

Animal condition data provide basic information about whole animal well-being, while energy status and investment may be derived from somatic growth rates. Before discussing the effect of ocean acidification and warm temperatures, our “control treatment”, has to be validated by comparison to earlier studies.

Condition factor (K-factor) at low PCO_2 (0.98 ± 0.07) was similar to values for Atlantic cod reported in previous studies (Fühlbert 2009, Lannig et al. 2003, Black and Love 1986). Growth per day at $10^\circ C$ and low PCO_2 of 0.87 ± 0.52 % $\cdot day^{-1}$ was in line with cod growth rates for fish of equal size described by Björnsson et al. (2007) (~ 1% per day). In addition to growth rates and the weight-length relationship mirrored by the K-factor, liver size provides an important index, being the major storage tissue that supplies energy in the form of lipids during all major life-history events (Kirsch et al. 1998). The hepatosomatic index (HSI) of 1.95 ± 0.56 found here was at the low end of observed HSI values between 2 and 6% for cod, (Jobling, 1988). As the experiments were carried out in April-May, a low cod HSI in spring might result from the exploitation of liver reserves in winter (Schwalme and Chouinard 1999, Eliassen 1982). Further, liver size and fat content varies with the fat content of the diet (Dos Santos et al. 1993). Therefore, the obvious priority of investment into body mass rather than lipid storage might also be promoted by the protein based diet (mussels and shrimps) fed during our experiments.

The metabolic enzyme capacities investigated provide insight into the condition and metabolic state of muscle and liver tissue. Cytochrome c oxidase (COX), citrate synthase (CS), pyruvate kinase (PK), glutamate dehydrogenase (GDH) and phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK) capacities ($U \cdot gFW$) from control animals were in the range of values reported earlier for liver and/or white muscle tissue in Atlantic cod, measured at $10^\circ C$ (Zammit and Newsholme 1979, Mommsen 1986, Pelletier et al. 1993, Pelletier et al. 1994, Lucassen et al. 2006, Vijayan et al. 2006). In contrast, LDH capacities were approximately half of the values reported for cod (Pelletier et al. 1994, Couture et al. 1998, Martinez et al. 2003). Muscle LDH capacities, indicating anaerobic swimming performance, correlate with the mass and length of fish and small fish possess higher capacities of aerobic and lower capacities of anaerobic metabolism than larger specimens (Jordan et al. 2005). As fish in the

present work were considerably smaller than those from other studies, this might explain the lower LDH values in our study.

Capacities of HADH were also low for both liver (0.51 ± 0.006 U*gFW) and muscle (0.09 ± 0.035 U*gFW) when compared to previous studies (Pelletier et al. 1993; 1994). Capacities of HADH as a key enzyme in lipid catabolism increased in response to starvation (Morales et al. 2004) and correlated negatively with growth rates (Pelletier et al. 1994). Low lipid deposition within both tissues may also explain low HADH capacities. The low liver HADH capacities found here are therefore in line with the good condition value and indicate a good feeding status of our control fish. Together, condition factor and growth rates as well as metabolic enzyme capacities indicate a good condition of the control group after 4 weeks of incubation, while the HSI values implied that liver lipid reserves were rather low, probably due to seasonality and diet composition. Therefore, we assume that for our experimental animals and the early season, the condition factor is a better predictor of growth rate than liver indices under temperature as single factor (correlation K/growth $p=0.002$).

4.2 Effect of hypercapnia and warming on animal condition and growth rates

All animal condition parameters examined were not significantly affected by elevated CO_2 in fish incubated at 10°C and low PCO_2 . In contrast at 18°C and low PCO_2 , fish had approx. 25% smaller condition factors than those at control conditions ($p=0.001$), paralleled by significantly reduced growth rates and a slightly decreased HSI (approx. by 10%) as well as reduced protein content of muscle tissue. Such a pattern was observed during early starvation in cod when liver lipids and the glycogens of liver and white muscle are mobilised simultaneously, even if liver lipids are exhausted first (Black and Love, 1985). Increased energy demand at high, close to limiting temperature, may exceed food consumption/conversion. Also, food intake might be reduced to save energy allocated to digestion (SDA). Together, reduced growth rates and condition in the warmth match with earlier observations of temperature-dependent constraints on growth performance and physiological fitness in that species (Pörtner et al. 2001; 2008).

Our data clearly indicate that elevated PCO_2 assisted to overcome the negative effect of warming on growth at a close to limiting thermal extreme. Condition increased by about 10% for medium and high PCO_2 compared to 18°C low PCO_2 conditions, while growth rates were positively correlated with increasing PCO_2 levels at 18°C ($p=0.005$) (Fig. 2). This suggests that elevated temperature and CO_2 act antagonistically on cod. High PCO_2 positively affected weight and thereby shifting the upper growth limit from 15 - 18°C for the respective size class (Pörtner et al. 2008), towards warmer temperatures. Data from a parallel study of the same experimental animals (Kreiss et al. in revision) suggest a positive correlation between metabolic rate and weight gain ($p=0.045$). This argues against a role of depression of

maintenance costs or enhanced energy efficiency benefiting growth under elevated PCO_2 . A similar pattern was observed in a study on anemonefish (*Amphiprion melanopus*) (Nowicki et al. 2012). Accordingly, the combined exposure to high temperature and PCO_2 (960 μatm) resulted in elevated food consumption and enhanced foraging behaviour compared to fish, reared at high temperature only. Increased growth rates were also reported for larval orange clownfish under elevated PCO_2 of around 1,000 μatm (Munday et al. 2009). European sea bass, long-term exposed at approx. 4,000 μatm for 63 days displayed elevated growth and increased food ingestion rates (both around 8% higher compared to controls) (Lemarié et al. 2000). In contrast, reduced growth rates under elevated CO_2 were reported for larval fish (Baumann et al. 2011, Miller et al. 2012) and juvenile cod (3800 & 8500 μtm , Moran and Støttrup, 2010), whereas most fish species did not reveal altered growth rates under CO_2 levels less than 2000 μatm (Heuer and Grosell, 2014). In the present study no positive correlation was found between growth rates and rising PCO_2 levels at 10°C, arguing for specific trade-offs and constraints at high temperature. Food conversion efficiency increases with rising temperature (Buentello et al. 2000, Handeland et al. 2008). However, maximum food conversion efficiency is thought to be found slightly below optimum growth temperature (Imslund et al. 2005), which would be around 10-12°C for the cod of the present study and therefore too low to suggest simple CO_2 -stimulated nutrient uptake at 18°C. As many digestive enzymes are quite pH sensitive, elevated ambient PCO_2 may stimulate the activity of digestive enzymes thereby promoting nutrient uptake and enabling elevated growth at least at high temperatures.

Furthermore, enhanced growth rates in the warmth might be attributed to enhanced oxygen supply to the muscle tissue. A recent study (Rummer et al. 2013) provided evidence, that in teleosts possessing Hb displaying a Root effect and plasma accessible carbonic anhydrase, oxygen delivery to tissues, can be significantly enhanced under hypercapnia. Thereby, a 50% increase in oxygen delivery was observed following a 20 min exposure of rainbow trout to 15000 μatm CO_2 . Although CO_2 levels applied in the present study were much lower, increased O_2 delivery to tissues may have occurred during exposure of cod to long-term hypercapnia of >1200 μatm , possibly rebalancing reduced oxygen supply capacity in the warmth. This might enable increased growth rates under the combination of high temperature and PCO_2 , when compared to the factor temperature alone. At optimum temperature, where no oxygen limitation to tissues occurs, this mechanism might not take effect. Reduced LDH activities, independent of whole animal weight, as observed at high PCO_2 and at both temperatures, support the assumption of elevated aerobic metabolic capacity at the expense of anaerobic capacity under hypercapnia.

Taken together, our results indicate that 18°C is not yet limiting for juvenile cod (200 \pm 95 gFW) when acting in concert with elevated ambient CO_2 levels (\geq 1200 μatm). Clearly, more

research is needed to elucidate the CO₂ effect found at warm temperatures. However, in the natural habitat, this may only take effect if food availability is sufficient. As a first step, metabolic enzyme activities in muscle and liver tissue as well as ammonia plasma concentration profiles may support a broader understanding of the mechanisms underlying improved animal condition under elevated PCO₂ in the warmth.

4.2 Enzyme capacity patterns as indicators for whole animal status

4.2.1 Aerobic metabolism

Enzyme capacities of CS and COX were used as proxies for aerobic capacity. These enzymes underwent tissue-specific regulation. Hepatic CS capacities remained unchanged during all treatments, indicating thermal compensation, while COX capacities increased under elevated CO₂ and/or temperature (Fig. 4a). In all treatments this pattern led to COX/CS ratios elevated above those in control fish. Comparing the groups at low PCO₂ at 10°C and 18°C we observed the same temperature-dependent pattern as shown previously in liver of cod and other fish when investigating enzyme capacities at 4°C and 10°C. COX/CS ratios were lower in liver tissue of fish reared at 10°C, indicating a relative increase in matrix (CS) over membrane functions (COX) in liver mitochondria during cooling (Lannig et al., 2003, Lucassen et al. 2003; 2006, Windisch et al. 2011). However, regulation patterns between 4°C and 10°C differ from those between 10°C and 18°C. In the colder range (on the cold side of the thermal window), COX capacity remained constant and CS capacity increased during cooling, whereas on the warm side of the thermal window COX capacity was lower in the cold and CS unchanged, leading to a small decrease in the ratio of both enzymes. This emphasizes the need to clearly define where in the thermal window these changes have been investigated. Metabolic implications remain to be identified.

In muscle tissue CS and COX capacities changed in parallel in all treatment groups ($p < 0.0001$), which was also apparent in stable COX/CS ratios for all fish groups (Tab. 2). Such a pattern indicates a fixed ratio of matrix to cristae enzymes in muscle tissue as observed before in cod white muscle during a cold acclimation/adaptation experiment (Lucassen et al. 2006) and for red and white muscle of trout and striped bass (Battersby and Moyes 1998, Eggington and Sidell 1989). Parallel shifts indicate changes in mitochondrial volume density at unchanged key functional properties of the muscle mitochondria (Battersby and Moyes 1998, Lucassen et al. 2006). The resulting rise in both enzyme capacities at medium (but not high) PCO₂ and 10°C, as well as high (but not medium) PCO₂ and 18°C indicates pre-adaptation to rising energy demands. CS and COX capacities were not enhanced for those fish with low or reduced growth rates (10°C, high PCO₂; 18°C low PCO₂). We therefore hypothesize that an enhanced scope for somatic growth is supported by elevated aerobic capacity, possibly to compensate for the effect of elevated CO₂.

HADH capacities in muscle tissue were elevated under the same conditions as described before for CS (and COX) (10°C, medium PCO_2 & 18°C, high PCO_2). In addition there was a trend for muscle HADH to be elevated in response to warming at low PCO_2 . In liver, HADH capacities also increased in the warmth in parallel to COX capacities. In general, fuel shifting towards higher use of free fatty acids was indicated in both tissues at high temperature and low PCO_2 , as HADH capacities increased, at stable CS capacities resulting in elevated HADH/CS capacities. This effect was dampened by rising PCO_2 . Thus, enhanced oxidation of fatty acids might fuel the TCA cycle with acetyl-CoA and support enhanced aerobic capacity.

In liver tissue, the most pronounced shifts during treatments were observed for PEPCK, which plays a key role in gluconeogenesis. Increasing PEPCK capacities at elevated temperature were observed before in several studies of temperate as well as Antarctic fish species and indicate an activation of gluconeogenesis upon warm acclimation (Windisch et al. 2011, Leonardo et al. 2013). Together with enhanced expression of glycolysis this mechanism may prepare the organism for warming-induced hypoxia and was defined as warm-hardiness (Windisch et al. 2011). After 4 weeks at 18°C PEPCK capacities were strongly elevated above control levels (Tab. 1, Fig. 7a) possibly reflecting enhanced expression above thermally stimulated values. The high PEPCK Q_{10} values, determined between 10°C and 18°C assay temperatures for liver tissue of both acclimation experiments, reflect an acute thermal sensitivity of the existing enzyme (Q_{10} : 2.81- 3.71). Thus, the observed long-term increments of PEPCK capacities under control PCO_2 conditions may be mostly attributed to uncompensated surplus capacities due to the large Q_{10} effect. In addition to gluconeogenesis, PEPCK is involved in further cataplerotic (citrate cycle intermediate removing) processes like e.g. glyceroneogenesis (Yang et al. 2009). During fasting glyceroneogenesis is an important pathway for the hepatic synthesis of triglycerides (Owen et al. 2002), but as starvation is only conceivable at 18°C and low PCO_2 starvation is unlikely to explain the overall response. Independent of the metabolic pathway, PEPCK competes with CS for the same substrate oxalacetate. Rising PEPCK to CS ratios, as observed in the present study, therefore would indicate a reorganisation of high energy stores to glucose respectively glycogen. The latter is suitable to fuel energy metabolism under potentially anaerobic conditions, if warming continues. Thus, this process termed warm-hardiness, may in general be involved in warm acclimation of marine fish.

4.2.2 Anaerobic metabolism

Capacities of glycolytic lactate dehydrogenase (LDH) and pyruvate kinase (PK) correlated with each other over all treatments ($p=0.0106$). The data are in line with earlier findings of correlated capacities of these two important enzymes of anaerobic ATP supply during

feeding and fasting (Yang and Somero 1993). Scaling of LDH and PK capacities with growth was reported before (Yang and Somero 1993, Pelletier et al. 1995). In the present study, this correlation was solely observed for muscle tissue of fish reared at 10° and low PCO_2 (LDH: $p=0.0335$; PK: $p=0.0078$). As this relation was absent for fish reared at 18°C and low PCO_2 as well as at high PCO_2 and both temperatures (10°C and 18°C), the simple correlation changes at high temperature and high PCO_2 . LDH decreased under elevated PCO_2 at 10°C ($p=0.0013$) with a similar pattern for the same PCO_2 level at 18°C ($p=0.064$). In contrast a study on Mediterranean fish exposed to even higher CO_2 levels (pH 7.3, 10 days) (Michaelidis et al. 2007), reported elevated LDH activity paralleled by a drop in CS activity. These findings emphasize that the CO_2 reponse is not linear as also seen in fish at 10°C and medium as well as high PCO_2 . During warming at high PCO_2 a parallel increase in COX indicates that an increase in aerobic occurs at the expense of anaerobic capacity. Otherwise, the general reason for reduced anaerobic capacities remains obscure, since the effect became visible even in fish with similar condition factor and HSI.

4.2.3 Amino acid metabolism

Most ammonium production occurs in the liver during transamination and subsequent deamination of excess amino acids (Van Waarde 1983, Wilkie 1997) involving GDH. According to protein-related capacities amino acid deamination via GDH was reduced at high PCO_2 and 10°C but stimulated in the warmth. Accordingly, plasma ammonium concentrations were lower within the 10°C acclimation group at medium and at high PCO_2 .

Only amino acids in excess of those required for protein synthesis and possibly, growth are converted to ammonium (Randall and Wright, 1987). Plasma ammonium levels are fluctuating on very short time-scales, dependent on e.g. feeding state and activity level and represent only a “snapshot” of the actual situation. In contrast, GDH capacities represent acclimation over days and weeks, while growth rates would integrate all effects. Ammonium excretion as a proxy of production may correlate with feed intake (Lied and Braaten, 1984), while GDH capacities correlated with growth rates in cod (Pelletier et al. 1994). Therefore, reduced food intake, amino acid absorption and growth might also lead to lower GDH activity and ammonia production. In the present study, altered protein content in liver tissue (Fig. 3a-b) indicates modified net protein synthesis rates, but does not correlate with growth rates which showed no statistical difference between treatments at 10°C, while significantly reduced at 18°C and low PCO_2 . Here stable ammonium levels indicate, that nutrient uptake and protein turnover were still balanced, but energy requirements for positive growth were not met. The unrelated changes in parameters limit the conclusions that can be drawn from GDH and ammonium levels.

Conclusions

Our experiments have demonstrated that CO₂ impacts on metabolic regulation vary depending on ambient temperature. In the center of the thermal range, CO₂ increasingly depresses growth. Close to upper thermal limits warming induced constraints depress growth but CO₂ alleviates this effect. Animals with strongly reduced growth rates in the warmth mobilize reserves indicated by enhanced hepatic COX and HADH capacities in liver as well as slightly increased HADH conditions in muscle tissue. Tissue protein content does not parallel the changes in growth. At both temperatures in both tissues CO₂ elicits an increase in aerobic enzyme (COX, paralleled by CS in muscle) and thus mitochondrial capacity, and possibly lowered LDH capacities. This response is transient at 10°C and sets in later at 18°C. It appears that a depressing effect of CO₂ sets in more strongly at 10°C but is reduced at warmer temperatures. This mild depression at 18°C and the CO₂-induced stimulation of mitochondrial capacity may support the CO₂ induced increase in growth in the warmth. Oxygen delivery to muscle tissue may be enhanced under hypercapnia and contribute to stimulated growth. Elevated aerobic capacity under high *PCO*₂ would also be in line with the observed under these conditions.

The CO₂ induced stimulation of aerobic metabolism at both temperatures in liver is paralleled by an increase in HSI (transient at 10°C). The increase in liver PEPCK and decline in HADH capacities and the associated build-up of glycogen stores (which needs more space than lipids due to the higher hydration level) may support the increase in HSI and enhance warm-hardiness and the associated capacity of anaerobic metabolism. We conclude that this adjustment might be widespread in marine teleosts. Reduced growth at 10°C and high *PCO*₂ were paralleled by reduced GDH capacities and slightly decreased oxygen consumption rates.

As a corollary cod can tolerate 18°C under normocapnia only during brief exposures but tolerance is improved under elevated CO₂ levels which even enables positive growth when supported by optimised food supply. This response to elevated CO₂ is unexpected in light of findings in other species showing enhanced sensitivity to high temperatures under hypercapnia. The adaptive nature of this effect is unclear and may reflect preadaptation to elevated CO₂ levels linked to the demersal lifestyle of the cod.

Acknowledgements

Bengt Lundve is highly acknowledged for his support and assistance in obtaining experimental animals and arranging the experimental facilities as well as Lars Ljungqvist for valuable technical support. The authors would like to thank Nils Koschnick as well as Karim Zanaty for providing very good assistance with the enzyme measurements. This work is part of the “Polar regions and coasts in a changing earth system” (PACES) research programme

of the Alfred-Wegener-Institute for Polar and Marine Research and contributes to the Bundesministerium für Forschung und Bildung funded project “Biological Impacts of Ocean Acidification” (BIOACID).

References

- Aas-Hansen, Ø.**, Vijayan, M.M., Johnsen, H.K., Cameron, C., Jørgensen, E.H., 2005. Resmoltification in wild, anadromous Arctic char (*Salvelinus alpinus*): a survey of osmoregulatory, metabolic, and endocrine changes preceding annual seawater migration.
- Battersby, B.J.**, Moyes, C., 1998. Influence of acclimation temperature on mitochondrial DNA, RNA, and enzymes in skeletal muscle. *Am. Physiol. Reg. Integr. Comp. Physiol.* 44 (3) 905-912.
- Baumann, H.**, Talmage, S.C., Gobler, C.J., 2011. Reduced early life growth and survival in a fish in direct response to increased carbon dioxide. *Nature Clim. Change* 2: DOI:10.1038/NCLIMATE1291.
- Björnsson, B.**, Ólafsdóttir, S.R. 2006. Effects of water quality and stocking density on growth performance of juvenile cod (*Gadus morhua* L.). *ICES J. Mar. Sci.* 63: 326-334.
- Björnsson, B.**, Steinarsson, A., 2001. The food-unlimited growth rate of Atlantic cod (*Gadus morhua*). *Can. J. Aquat. Sci.* 59: 494-502.
- Björnsson, B.**, Steinarsson, A., Árnason, T., 2007. Growth model for Atlantic cod (*Gadus morhua*): Effects of temperature and body weight on growth rate. *Aquacult.* 271, 216-266
- Black D.**, Love R.M., 1986. The sequential mobilisation and restoration of energy reserves in tissues of Atlantic cod during starvation and refeeding. *J. Comp. Physiol.* 156B: 469-479.
- Bradford, M.M.**, 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analyt. Biochem.* 72: 248-254.
- Brander, K.**, 2003. What kind of fish stocks do we need and what kind of information will help us to make better predictions? *Sci. Mar.* 67: 21-33.
- Buentello, J.A.**, Gatlin, D.M., Neill, W.H., 2000. Effects of water temperature and dissolved oxygen on daily feed consumption, feed utilization and growth of channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *Aquacult.* 182: 339-352.
- Clarke, A.**, Fraser, K.P.P., 2004. Why does metabolism scale with temperature? *Func. Ecol.* 18: 243-251.
- Collins, M.**, Knutti, R., Arblaster, J., Dufresne, J.-L., Fichefet, T., Friedlingstein, P., Gao, X., Gutowski, W.J., Johns, T., Krinner, G., Shongwe, M., Tebaldi, C., Weaver, A.J., Wehner, M., 2013: The Physical Science Basis. Contribution of Working Group I to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel of Climate Change [Stocker, T.F.,

- Qin, D., Plattner, G.-K., Tignor, M., Allen, S.K., Boschung, J., Nauels, A., Xia, Y., Bex, V., Midgley, P.M. (eds.]. Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom and New York, NY, USA.
- Couture, P.**, Dutil, J.-D., Guderley, H., 1998. Biochemical correlates of growth and condition in juvenile Atlantic cod (*Gadus morhua*) from Newfoundland. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 55:1591-1598.
- Crain, C.M.**, Kroeker, K., Halpern, B.S., 2008. Interactive and cumulative effects of multiple human stressors in marine systems. *Ecol. Lett.* 11: 1304-1315.
- Deigweier K.**, Koschnick N., Pörtner H.-O., Lucassen, M., 2008. Acclimation of ion regulatory capacities in gills of marine fish under environmental hypercapnia. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 295: R1660-R1670.
- Deigweier K.**, Hirse T., Bock C., Lucassen M., Pörtner H.O., 2010. Hypercapnia induced shifts in gill energy budgets of Antarctic notothenioids. *J. Comp. Physiol. B* 180: 347-359.
- Dos Santos, J.**, Burkow, I.C., Jobling, M., 1993. Patterns of growth and lipid deposition in cod (*Gadus morhua* L.) fed natural prey and fish-based feeds. *Aquacult.* 110: 173-189.
- Driedzic, W.R.**, De Almeida-Val, V.M.F., 1996. Enzymes of Cardiac energy metabolism in Amazonian teleosts and the fresh-water stingray (*Potamotrygon hystrix*). *J. Exp. Zool.* 274:327-333.
- Eggington, S.**, Sidell, B.D., 1989. Thermal acclimation induces adaptive changes in subcellular structure of fish skeletal muscle. *Am. J. Physiol.* 256: R1-R9.
- Eliassen J.E.**, 1982. Seasonal variations in biochemical composition and energy content of liver, gonad and muscle of mature and immature cod, *Gadus morhua* (L.) from Balsfjorden, northern Norway. *J Fish Biol* 20: 707-716.
- Esbaugh, A.J.**, Heuer, R., Grosell, M., 2012. Impacts of ocean acidification on respiratory gas exchange and acid-base balance in a marine teleost, *Opsanus beta*. *J. Comp. Physiol. B* 182, 921-934.
- Foss, A.**, Kristensen, T., Åtland, Å., Hustveit, H., Hovland, H., Øfsti, A., Imsland, A.K., 2006. Effects of water reuse and stocking density on water quality, blood physiology and growth rate of juvenile cod (*Gadus morhua*). *Aquacult.* 256: 255-263.
- Fühlbert M.**, Moran D., Jarlbæk, H., Støttrup, J.G., 2009. Growth of juvenile Atlantic cod *Gadus morhua* in land-based recirculation systems: Effects of feeding regime, photoperiod and diet. *Aquacult* 292:225-231.
- Handeland, S.O.**, Imsland, A.K., Stefansson, S.O., 2008. The effect of temperature and fish size on growth, feed intake, food conversion efficiency and stomach evacuation rate of Atlantic salmon post-smolts. *Aquacult.* 283: 36-42.
- Heuer, R.**, Grossell, M., 2014. Physiological impacts of elevated carbon dioxide and ocean acidification on fish. *Am. J. Regul. Comp. Physiol.* doi:10.1152/ajpregu.00064.2014

- Houlihan, D.F.**, Hall, S.J., Gray, C., Noble, B.S., 1988. Growth rates and protein turnover in Atlantic cod, *Gadus morhua*. Can. J. Fish. Aquat. Sci. 45: 961-964.
- Hutchings, J.A.**, Reynolda, J.D., 2004. Marine fish population collapses: consequences for recovery and extinction risk. Biosci. 54(4): 297-309.
- Imsland, A.K.**, Foss, A., Folkvord, A., Stefansson, S.O., Jonassen, T.M., 2005. The interrelation between temperature regimes and fish size in juvenile Atlantic cod (*Gadus morhua*): effects on growth and feed conversion efficiency. Fish Physiol. Biochem. 31:347-361.
- Ishimatsu, A.**, Hayashi, M., Lee, K.-S., Kikkawa, T., 2005. Physiological effects on fishes in a high-CO₂ world. J. Geophys. Res. 110: doi:10.1029/2004JC002564.
- Jobling, M.**, 1988. A review of the physiological and nutritional energetics of cod, *Gadus morhua* L., with particular reference to growth under farmed conditions. Aquacult 70: 1-19.
- Jordan, A.D.**, Steinhausen, M.F., Herbert, N.A., Grisdale-Helland, B., Helland, S.J., Steffensen, J.F., 2005. Mar. Biol. 1:411-416.
- Kirsch, P.E.**, Iverson, S.A., Bowen, W.D., Kerr, S.R., Ackman, R.G., 1998. Dietary effects on the fatty acid signature of whole Atlantic cod (*Gadus morhua*). Can J. Fish. Sci. 55: 1378-1386.
- Kornberg, A.**, 1955. Lactic dehydrogenase of muscle: Pyruvate + DPNH↔Lactate + DPN. Methods Enzymol 1: 441-443.
- Kreiss, C.M.**, Michael, K., Bock, C., Lucassen, M., Pörtner, H.-O. 2015. Impact of long-term hypercapnia on the energy budget of isolated gills of Atlantic cod (*Gadus morhua*). Comp. Biochem. Physiol. 182A: 102-112.
- Lannig, G.**, Eckerle, L., Serendero, L., Sartoris, F.-J., Fischer, T., Knust, R., Johansen, T., Pörtner, H.O., 2003. Temperature adaptation in eurythermal cod (*Gadus morhua*) a comparison of mitochondrial enzyme capacities in boreal and Arctic populations. Mar. Biol. 142: 589-599.
- Larsen, B.K.**, Pörtner, H.-O., Jensen, F.B., 1997. Extra-and intracellular acid-base balance and ionic regulation in cod (*Gadus morhua*) during combined and isolated exposures to hypercapnia and copper. Mar. Biol. 128, 337-346.
- Leonardo, J.M.**, Scarlato, N.A., Ojeda, F.P., 2013. Gluconeogenic pathway does not display metabolic cold adaptation in liver of Antarctic notothenoid fish. Pol. Biol. 36: 661-671.
- Lied, E.**, Braaten, B., 1984. The effect of feeding and starving, and different ratios of protein energy to total energy in the feed on the excretion of ammonia in Atlantic cod (*Gadus morhua*). Comp. Biochem. Physiol. 76A(1): 49-52.
- Lemarié G.**, Dutto G., Le Roux A., Lemoalle J., Maxime V., Person-Le Ruyet J., 2000. Long term effects of pH and carbon dioxide on growth and feed efficiency in European

seabass. In: responsible aquaculture in the new millennium, Conference AQUA 2000, Nice, France, May 2-6 2000. European Aquaculture Society Special Publication 28, p484 (Abstract).

- Lebedeva N.Ye.**, Vosilene M.Z. Ye., Golovkina T.V., 1994. Aspects of stress in rainbow trout, *Salmo gairdneri*, release of chemical alarm signals. *J. Ichthyol.* 33:66-74.
- Lucassen, M.**, Schmidt, A., Eckerle, L.G., Pörtner, H.-O., 2003. Mitochondrial proliferation in the permanent vs. temporary cold: enzyme activities and RNA levels in Antarctic and temperate zoarcid fish. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 285: R1410-R1420.
- Lucassen, M.**, Koschnick, N., Eckerle, L.G., Pörtner, H.O., 2006. Mitochondrial mechanisms of cold adaptation in cod (*Gadus morhua* L.) populations from different climatic zones. *J. Exp. Biol.* 209: 2462-2471.
- Martinez, M.**, Guderley, H., Dutil, J.-D., Winger, P.D., He, P., Walsh, S.J., 2003. Condition, prolonged swimming performance and muscle metabolic capacities of cod *Gadus morhua*. *J. Exp. Biol.* 206: 503-511.
- McBryan, T.L.**, Anttila, K., Healy, T.M., Schulte, P.M., 2013. Response to temperature and hypoxia as interacting stressors in fish: implications for adaptation to environmental change. *Integr. Comp. Biol.* 53(4): 648-659.
- Meinshausen, M.**, Smith, S.J., Calvin, K., Daniel, J.S., Kainuma, L.T., Lamarque, J.-F., Matsumoto, K., Montzka, S.A., Raper, S.C.B., Riahi, K., Thomson, A., Velders, G.J.M., van Vuuren, D.P.P., 2011. The RCP greenhouse gas concentrations and their extensions from 1765 to 2300. *Clim. Chang.* 109: 213-241.
- Melzner, F.**, Göbel, S., Langenbuch, M., Gutowska, M.A., Pörtner, H.O., Lucassen, M., 2009. Swimming performance in Atlantic cod (*Gadus morhua*) following long-term (4-12 months) acclimation to elevated seawater PCO_2 . *Aquat. Toxicol.* 92:30-37.
- Michaelidis, B.**, Spring, A., Pörtner, H.O., 2007. Effects of long-term acclimation to environmental hypercapnia on extracellular acid-base status and metabolic capacity in Mediterranean fish *Sparus aurata*. *Mar. Biol.* 150: 1417-1429.
- Miller, G.M.**, Watson, S.A., Denelson, J.M., McCormick, M.I., Munday, P.L., 2012. Parental environment mediates impacts of increased carbon dioxide on a coral reef fish. *Nature Clim. Change* 2: 858-861.
- Mommsen, T.P.**, 1986. Comparative gluconeogenesis in hepatocytes from salmonid fishes. *Can. J. Zool.* 64: 1110-1115.
- Morales, A.E.**, Perez-Jiménez, Hidalgo, M.C.; Abellán, E., Cardenete, G., 2004. *Comp. Biochem. Physiol. C.* 139: 153-161.
- Moran D.**, Støttrup J.G., 2011. The effect of carbon dioxide on growth of juvenile Atlantic cod *Gadus morhua* L. *Aq. Tox.* 102: 24-30.

- Moyes, C.D.**, Mathieu-Costello, O.A., Tsuchiya, N., Filburn, C., Hansford, R.G., 1997. Mitochondrial biogenesis during cellular differentiation. *Am. J. Physiol.* 272:C1345-C1351.
- Munday, P.L.**, Donelson, J. M., Dixon, D.L., Endo, G.G.K., 2009. Effects of ocean acidification on the early life history of a tropical marine fish. *Proc. R. Soc. B.* 22: 276 (1671): 3275-3283.
- Neill, W.H.**, J.M. Miller, H.W. van der Veer, and K. O. Winemiller, 1994. Ecophysiology of marine fish recruitment: a conceptual framework for understanding interannual variability. *Neth. J. Sea Res.* 32(2):135-152.
- Nowicki J.P.**, Miller G.M., Munday P.L., 2012. Interactive effects of elevated temperature and CO₂ on foraging behaviour of juvenile coral reef fish. *J. Exp. Biol.* 412: 46-51.
- Owen, O.E.**, Kalhan, S.C., Hanson, R.W., 2002. The key role of anaplerosis and cataplerosis for citric acid cycle function. *J.Biol. Chem.* 277:30409-30412.
- Pelletier, D.**, Blier, P.U., Dutil, J.-D., Guderley, H., 1995. How should enzyme activities be used in fish growth studies? *J. Exp. Biol.* 198: 1493-1497.
- Pelletier, D.**, Dutil, J.-D., Blier, P., Guderley, H., 1994. Relation between growth rate and metabolic organization of white muscle, liver and digestive tract in cod, *Gadus morhua*. *J Comp. Physiol. B.* 164: 179-190.
- Pelletier, D.**, Guderley, H., Dutil, J.-D., 1993. Does aerobic capacity of fish muscle change with growth rates. *Fish Physiol. Biochem.* 12: 83-93.
- Perry, A.L.**, Low, P.L., Ellis, J.R., Reynolds, J.D., 2005. Climate change and distribution shifts in marine fishes. *Science* 308: 1912-1915.
- Planque, B.**, Fredou, T., 1999. Temperature and the recruitment of Atlantic cod (*Gadus morhua*). *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 56:2069-2077.
- Pörtner, H.-O.**, 2012. Integrating climate-related stressor effects on marine organisms: unifying principles linking molecule to ecosystem-level changes. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 470: 273-290.
- Pörtner, H.-O.**, Peck M., 2010. Climate change effects on fishes and fisheries: towards a cause-and-effect understanding. *J Fish Biol.* 77:1745-1779
- Pörtner, H.-O.**, 2008. Ecosystem effects of ocean acidification in times of ocean warming: a physiologist's view. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 373:203-217.
- Pörtner, H.-O.**, Langenbuch, M., Reipschläger, A., 2004. Biological impacts of elevated ocean CO₂ concentrations: lessons from animal physiology and earth history. *J. Ocean.* 60: 705-718.
- Pörtner, H.-O.**, Berdal, B., Blust, R., Brix, O., Colosimo, 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., Zakhartsev, 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.
- Randall, D.J.**, Wright, P.A., 1987. Ammonia distribution and excretion in fish. Fish Physiol and Biochem. 3 (3): 107-120.
- Rummer, J.L.**, 2013. Root effect hemoglobin may have evolved to enhance general tissue oxygen delivery. Science 340: 1327-1327.
- Sanchez-Muros, M.J.**, Rejon, G., Salguero, G., de la Higuera, M., Lupianez, J.A., 1998. Long-term nutritional effects on the primary liver and kidney metabolism in rainbow trout. Adaptive response to nutritional effects on the primary liver and kidney metabolism in rainbow trout. Adaptive response to starvation and a high-protein, carbohydrate-free diets on glutamate dehydrogenase and alanine amino transferase kinetics. Biochem. Cell Biol. 30:55-63.
- Schwalme K.**, Chouinard G.A., 1999. Seasonal dynamics in feeding, organ weights and reproductive maturation in Atlantic cod (*Gadus morhua*) in the southern Gulf of St. Lawrence. ICES J Mar Sci 56: 303-319.
- Sidell, B.D.**, Driedzic, W.R., Stowe, D.B., Johnston, I.A., 1987. Biochemical correlations of power development and metabolic fuel preference in fish hearts. Physiol. Zool. 60(2):221-232.
- Strobel, A.**, Bennecke, S., Leo, E., Mintenbeck, K., Pörtner, H.O., Mark, F., 2012. Metabolic shifts in the Antarctic fish *Notothenia rossii* in response to temperature and PCO_2 . Front Zool. 9:28. doi:10.1186/1742-9994-9-28.
- Strobel, A.**, Leo, E., Pörtner, H.-O., Marc, F.C., 2013. Elevated temperature and PCO_2 shift metabolic pathways in differentially oxidative tissues of *Notothenia rossii*. Comp. Biochem. Physiol. Biochem. Mol. Biol. 166B(1): 48-57.
- Van Waarde, A.**, van den Thillart, G., Kesbeke, F., 1983. Anaerobic energy metabolism of the European eel, *Anguilla Anguilla* L. J. Comp. Physiol. 149, 469-475.
- Walsh, P.J.**, Mommsen, T.P., Moon, T., Perry, S., 1988. Effects of acid-base variables on in vitro hepatic metabolism in rainbow trout. J. Exp. Biol. 135:231-241.
- Weiss, M.**, Heilmayer, O., Brey, T., Lucassen, M. and Pörtner, H.-O., 2012. Physiological capacity of *Cancer setosus* larvae- adaptation to El Nino Southern Oscillation conditions. J. Exp. Biol. 413, 100-105.
- Wilkie, M.**, 1997. Mechanisms of ammonia excretion across fish gills. Comp. Biochem. Physiol. 118A (1):39-50.
- Windisch, H.S.**, Kathöver, R., Pörtner, H.O., Frickenhaus, S., Lucassen, M., 2011. Thermal acclimation in Antarctic fish: transcriptomic profiling of metabolic pathways. Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol. 301: R1453-R1466.

- Wittmann, A.C.**, Pörtner, H.-O. 2013. Sensitivities of animal taxa to ocean acidification. Nature Clim. Change, DOI:10.1038/NCLIMATE1982.
- Yang, T.-H.**, Somero, G.N., 1993. Effects of feeding and food deprivation on oxygen consumption, muscle protein concentration and activities of energy metabolism enzymes in muscle and brain of shallow-living (*Scorpaena guttata*) and deep-living (*Sebastolobus alascanus*) scorpanid fishes. J. Exp. Biol. 181: 213-232.
- Yang, J.**, Kalhan, S.C., Hanson, R.W., 2009. What is the metabolic role of Phosphoenolpyruvate Carboxykinase? J. Biol. Chem. 284: 27025-27029.
- Zammit, V.**, Newsholme, E.A., 1979. Activities of enzymes of fat and ketone-body metabolism and effects of starvation on blood concentrations of glucose and fat fuels in teleost and elasmobranch fish. Biochem. J. 184: 313-322.

4 Diskussion

Die vorliegende Studie befasst sich mit dem Einfluss der Ozeanerwärmung und -versauerung auf die Physiologie einzelner Organe sowie des Ganztiers des Atlantischen Kabeljau *Gadus morhua*. Dabei wurde zunächst der Fokus auf die Ionenregulatorischen Mechanismen der Kieme als Grundlage für die Kompensation von Säure-Base-Störungen gelegt. Darüber hinaus gaben Untersuchungen der Aktivität zentraler Stoffwechsellzyme in Leber- und Muskelgewebe einen Einblick in den Energiestatus sowie die Anpassungsfähigkeit des Energie- und Reservestoffwechsels des Kabeljaus. In Kombination mit den Ganztierparametern ergibt sich so ein umfassendes Bild, welches für den Bereich der Versuchsbedingungen die Auswirkungen von prognostizierten Ozeanversauerungs- und Erwärmungsszenarien auf marine Knochenfische einschätzen lässt. Die in den Publikationen (I-III) dargestellten Ergebnisse werden nachfolgend mit zusätzlichen relevanten Daten der ersten und zweiten Inkubationsstudie, sowie des Parallelprojekts (K. Michael), im Rahmen der eingangs gestellten Fragen als auch im übergreifenden Kontext diskutiert. Dabei soll vor allem eine Verknüpfung zwischen den verschiedenen Ebenen vom Gewebe zum Ganztier stattfinden.

4.1 Auswirkungen von Ozeanversauerung und -erwärmung auf die Kieme

4.1.1 Kiemenanatomie und Gesamtsauerstoffbedarf

In beiden Inkubationen zeigten die Versuchstiere eine Zunahme der Kiemenfrischgewebsmasse unter erhöhtem PCO_2 bei 10°C Inkubationstemperatur. Unter mittlerem PCO_2 (1.200 μatm) verdoppelte sich der Anteil des Kiemengewebes bezogen auf die Ganztiermasse (Schwedentiere, Publikation II), während unter hohem PCO_2 (2.200-2.500 μatm) eine ca. 30%ige Zunahme der Kiemenmasse im Vergleich zur niedrigen PCO_2 -Gruppe beobachtet wurde (Schwedentiere: Publikation II, Helgolandtiere: Abb. 7). Dabei nahm der Sauerstoffverbrauch der Kiemen bei der mittleren CO_2 -Konzentration pro g Kiemengewebe ab, während er beim hohen PCO_2 jeweils stabil blieb, was zu einem entsprechend erhöhten Anteil am Gesamttier-Sauerstoffverbrauch unter 2.200 μatm bei 10°C führte. Für die 18°C-Gruppen wurde keine Veränderung der Kiemengewebsmasse festgestellt.

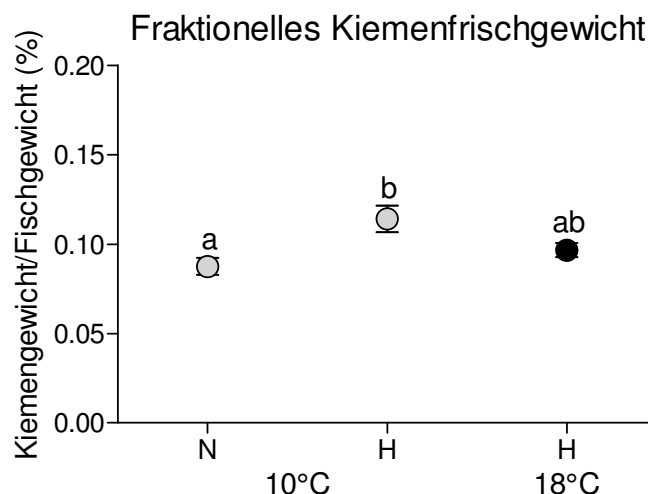


Abb. 7: **Kiemenfrischgewicht als Fraktion des Fischgewichts (%)** von 8-10 Wochen inkubierten Kabeljau aus der südlichen Nordsee (Helgoland) unter niedrigem $N= 500 \mu\text{atm}$ und hohem PCO_2 $H=2.500 \mu\text{atm}$ bei 10°C (grau) und 18°C (schwarz). Unterschiedliche Buchstaben markieren signifikante Unterschiede ($p<0,05$); $n= 25-32$ pro Versuchsbedingung.

Die beobachtete Zunahme des Filamentfrischgewichts bei der 10°C -Gruppe könnte auf eine Remodellierung des Kiemen Gewebes, beispielsweise einen verstärkten interlamellaren Zellaufbau, eine Vergrößerung der Respirationsoberfläche über Verlängerung der Filamente aber auch eine das Epithelium bedeckende Mukusschicht, zurückzuführen sein (Matey et al., 2008). Solche plastischen Anpassungsmechanismen sind bisher in Zusammenhang mit der Regulierung des Ionen-, Wasser- oder Gasaustauschs beschrieben worden (Matey et al., 2008; Nilsson, 2007; Sollid et al., 2005). In Süßwasserfischen wurde unter Hyperkapnie ($\sim 2\% \text{CO}_2$) die Abdeckung von Chloridzellen mittels Pflasterzellen beobachtet und als Mechanismus zur Verminderung der Basenexkretion zur Kompensation der extrazellulären Azidose interpretiert (Goss et al., 1998). Dagegen wird unter erhöhter Temperatur eine möglichst große Respirationsoberfläche angestrebt (Sollid et al., 2005), so dass ein interlamellarer Zellaufbau oder die Ausbildung einer barriereartigen Mukusschicht, welche die Diffusion beeinträchtigen können, kontraproduktiv wären.

Unter akuter Temperaturerhöhung in $2-4^\circ\text{C}$ -Schritten von 10°C auf 22°C (Helgolandtiere, Publikation I) wurde unabhängig von den Inkubationsbedingungen (niedriger PCO_2 10°C , hoher PCO_2 bei 10°C und 18°C) keine Temperaturlimitierung der isolierten perfundierten Kieme auf der warmen Seite festgestellt. Kiemen der hyperkapnischen Gruppe zeigten besonders in Kombination mit hoher Hälterungstemperatur eine stärkere Temperatursensitivität im Vergleich zu den Kontrolltieren (niedriger PCO_2 bei 10°C). Dies äußerte sich in steiler ansteigenden Sauerstoffverbrauchsraten, vor allem bei 18°C und 22°C verglichen zu den minimalen Raten bei 12°C (Publikation I). Gleichzeitig deuten minimale Sauerstoffverbrauchsraten bei akuter Messtemperatur von 12°C , die ausschließlich für beide Hyperkapnie-Gruppen (10°C & 18°C) gefunden wurden, auf einen energetisch effizienteren

Zustand unter erhöhtem PCO_2 im Vergleich zu Kontrollbedingungen hin. Dieser wird ebenfalls nachfolgend im Kontext der untersuchten Kiemenprozesse sowie der Ganztierparameter diskutiert.

4.1.2 Kiemenphysiologie: *In vivo* Energiebudget und ionenregulatorische Prozesse

Die *in vivo* Kosten verschiedener Prozesse wurden am isolierten perfundierten Kiemenmodell über die Rest-Respiration nach deren Hemmung mit spezifischen Inhibitoren erfasst (Publikation I und II). Ein veränderter Netto-Sauerstoffverbrauch einzelner Prozesse zeigt dabei CO_2 - bzw. Temperatur-gesteuerte Mechanismen auf. Bei gleichzeitiger anteiliger Veränderung des Gesamtsauerstoffverbrauchs der Kieme als Summe aller Prozesse kann auch der Einfluss solcher Mechanismen auf das Energiebudget des Ganztiers abgeleitet werden. Nach einem Inkubationszeitraum von 8-10 Wochen wurde keine Veränderung im O_2 -Bedarf der Protein-Biosynthese und RNA-Synthese unter dem Einfluss von $2.500 \mu\text{atm}$ CO_2 im Seewasser festgestellt (Helgolandtiere, Publikation I). Die Kombination von Hyperkapnie und hoher Temperatur (18°C) zeigte einen Temperatureffekt mit erhöhten Netto-Kosten aller drei untersuchten Prozesse (Proteinbiosynthese, RNA-Synthese, Na^+/K^+ -ATPase) im Vergleich zu Hyperkapnie bei Optimumtemperatur. In beiden Hyperkapnie-Gruppen (10°C & 18°C) wurde jedoch eine 30%ige Reduzierung der fraktionellen Na^+/K^+ -ATPase-Kosten beobachtet. Dieses Ergebnis steht im Gegensatz zu vorherigen Studien, die unter sehr hohen CO_2 -Konzentrationen ($\geq 6.000 \mu\text{atm}$) eine Hoch-Regulation des Transportenzym feststellten, welche sich in veränderter RNA-Expression, Proteinmenge, Enzymkapazität oder den zugehörigen *in vivo* Sauerstofffraktionen zeigte (Deigweiher et al., 2010; Melzner et al., 2009b; Deigweiher et al., 2008; Ishimatsu al., 2005). Ein positiver linearer Bezug zwischen Na^+/K^+ -ATPase-Aktivität und CO_2 -Konzentration erscheint hier widerlegt. Während die Hoch-Regulation einem verstärkten Ionenregulations-Bedarf zur Kompensation des erhöhten PCO_2 zugeschrieben wurde, spricht ein verminderter Bedarf an Na^+/K^+ -ATPase-Aktivität für einen energetisch effizienteren Zustand unter der bestehenden CO_2 -Konzentration von $2.500 \mu\text{atm}$.

Reduzierte Kosten der Na^+/K^+ -ATPase unter erhöhtem PCO_2 -Bedingungen von $2.500 \mu\text{atm}$ könnten auch für die oben beschriebenen niedrigen Sauerstoffverbrauchsraten hyperkapnischer Kiemen bei 12°C Messtemperatur (4.1.1) verantwortlich sein. Diese sind möglicherweise bei 12°C , der Wachstums-Optimumtemperatur des subadulten Kabeljaus, minimal (Björnsson et al. 2007; Pörtner et al. 2001). Stabile Protein- und RNA-Syntheseraten unter erhöhtem CO_2 unterstützen die Hypothese, dass kein stressbedingt erhöhter Proteinumsatz besteht. Allerdings wurden die Raten unter den kombinierten Inkubationsbedingungen nicht Temperatur-kompensiert, was als Mechanismus für die Kompensation der erhöhten metabolischen Raten des Kiemengewebes gedeutet wird.

Die in der zweiten Studie (Schwedentiere, Publikation II) untersuchten Transporter ergänzen das bisherige Bild der Kiemenantwort unter Hyperkapnie und erhöhter Temperatur. *In vivo* Kosten der Na^+/K^+ -ATPase zeigten ebenfalls eine ca. 30%ige Reduktion bei hohem (2.200 μatm) CO_2 und 10°C Inkubationstemperatur im Vergleich zu der niedrigsten CO_2 -Gruppe. In Kombination mit erhöhter Temperatur (18°C) wurde jedoch eine erhöhte Aktivität der Na^+/K^+ -ATPase im Gegensatz zu dem Ergebnis der ersten Inkubationsstudie (Helgoländertiere, Publikation I) gefunden. Variationen zwischen den beiden Studien in der Hälterungsdauer (8-10 bzw. 4 Wochen), der Jahreszeit (Herbst bzw. Frühling), aber auch populationsspezifische Unterschiede (südliche Nordsee bzw. Kattegat/Skagerrak) mögen zu der unterschiedlichen Antwort beigetragen haben. Eine erhöhte Na^+/K^+ -ATPase-Aktivität wurde ebenfalls für die unter 18°C inkubierten Schwedentiere beobachtet, findet sich angedeutet aber auch für die H^+ -ATPase-Aktivität unter diesen Bedingungen. Bei Optimumtemperatur von 10°C wurde lediglich unter mittlerer CO_2 -Konzentration (1.200 μatm) eine Verschiebung der untersuchten Ionentransporteraktivitäten beobachtet, die sich in reduzierter Aktivität des Na^+/H^+ -Austauschers äußerte. Diese könnte mit der oben beschriebenen Zunahme der Kiemengewebsmasse und einem damit verbundenen Zellaufbau zusammenhängen. Falls ein solcher Aufbau von Pflasterzellen mit reduzierter Exponierung der Chloridzellen einhergeht (Goss et al., 1998), wäre eine Abdeckung und verminderte Aktivität des apikal lokalisierten Na^+/H^+ -Austauscher denkbar.

Parallel zur gesteigerten Na^+/K^+ -ATPase-Aktivität zeigten die Kiemen der Versuchsgruppe bei hohem PCO_2 (2.200 μatm) unter 18°C auch eine vielfach erhöhte Aktivität der HCO_3^- - und Na^+/H^+ -Transporter, sichtbar im Zuwachs des Netto-Sauerstoffverbrauchs. Die verstärkte Aktivität dieser Transporterfamilien lassen vermuten, dass zusammen mit dem apikalen Na^+/H^+ -Austauscher, der für einen Protonenexport aus der Kiemenzelle sorgt, auch ein basolateraler $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ -Transporter oder apikale/basolaterale $\text{HCO}_3^-/\text{Cl}^-$ -Austauscher an der Säure-Base-Regulierung unter 18°C und 2.200 μatm beteiligt sind. Der veränderte Netto-Sauerstoffbedarf der beschriebenen Ionentransporter, vermittelt über Na^+/K^+ -ATPase, hatte unter hohem PCO_2 bei 18°C keine Auswirkungen auf den Gesamtsauerstoffverbrauch der Kieme und daraus folgend auf das Ganztier. Dies lässt auf eine höchst effektive Regulierung der Kieme als Schlüsselorgan zur Säure-Base-Kompensation schließen.

4.1.3 Kiemenphysiologie: ionenregulatorische Prozesse *in vitro*

Parallel zu den *in vivo* Kosten verschiedener Ionentransporter wurden die maximalen Enzymkapazitäten der ATP-bereitstellenden F_1F_0 -ATPase sowie der ATP verbrauchenden Transportenzyme Na^+/K^+ -ATPase und H^+ -ATPase *in vitro* im Kiemengewebe gemessen. Für die zweite Inkubationsstudie (Schwedentiere) erfolgte dies im Rahmen des Parallelprojekts

(K. Michael, eingereichtes Manuskript). In beiden Inkubationsexperimenten wurden temperaturabhängige erhöhte F_1/F_0 -ATPase- und Na^+/K^+ -ATPase-Kapazitäten festgestellt. Für alle Versuchsgruppen, mit Ausnahme des kombinierten Ansatzes der Helgolandinkubation (18°C , $2.500 \mu\text{atm CO}_2$), zeigten die maximalen Kapazitäten dieser beiden Enzyme eine positive Korrelation (Publikation I, Michael et al., in Prep). Dies spricht für eine am Bedarf orientierte Einstellung der Kapazität der ATP-Bereitstellung. Darüber hinaus wurde bei beiden Inkubationsexperimenten kein PCO_2 -Effekt auf die Na^+/K^+ -ATPase-Kapazität *in vitro* gefunden. H^+ -ATPase-Kapazitäten waren für die Helgolandtiere (Publikation I) bei 10°C unabhängig vom PCO_2 , aber erhöht unter 18°C und $2.500 \mu\text{atm CO}_2$. Dagegen wurde für beide 10°C -Hyperkapnie-Gruppen des Schwedenexperiments eine Reduktion der H^+ -ATPase sichtbar, die unter erhöhter Temperatur jedoch kompensiert war (Michael et al., in Prep.).

Eine positive Korrelation zwischen F_1F_0 -ATPase und H^+ -ATPase wurde für alle 10°C -Gruppen sowie die kombinierten Versuchsbedingungen (18°C , $2.500 \mu\text{atm}$) des Helgolandexperimentes festgestellt. Damit wird erneut die enge Verknüpfung zwischen ATP-Synthese und -Bedarf verdeutlicht, jedoch ist diese im Bezug auf die H^+ -ATPase hauptsächlich im optimalen Temperaturbereich gegeben. Die Abschwächung dieser Korrelation bei 18°C könnte mit der abweichenden Regulation der Na^+/K^+ -ATPase zusammenhängen, deren erhöhte Kapazitäten unter niedrigem und mittlerem PCO_2 die parallel erhöhten F_1F_0 -ATPase Kapazitäten und deren Entkopplung von der H^+ -ATPase erklären. Generell waren die *in vitro* 10°C -Kontroll-Enzymkapazitäten der Schwedentiere gegenüber denen der Helgolandtiere erhöht. Dies war mit dreifach bzw. zweifach erhöhten Kapazitäten für H^+ -ATPase und Na^+/K^+ -ATPase besonders ausgeprägt. Die *in vivo* Anteile der Na^+/K^+ -ATPase am Gesamtsauerstoffverbrauch waren jedoch bei den Helgolandtieren (Okt.-Nov., Publikation I) ca. 10% höher als bei den Schwedentieren (Mai, Publikation II) (siehe auch Abb. 8 a&b), was für eine höhere Ausnutzung der maximalen Enzymkapazitäten spricht.

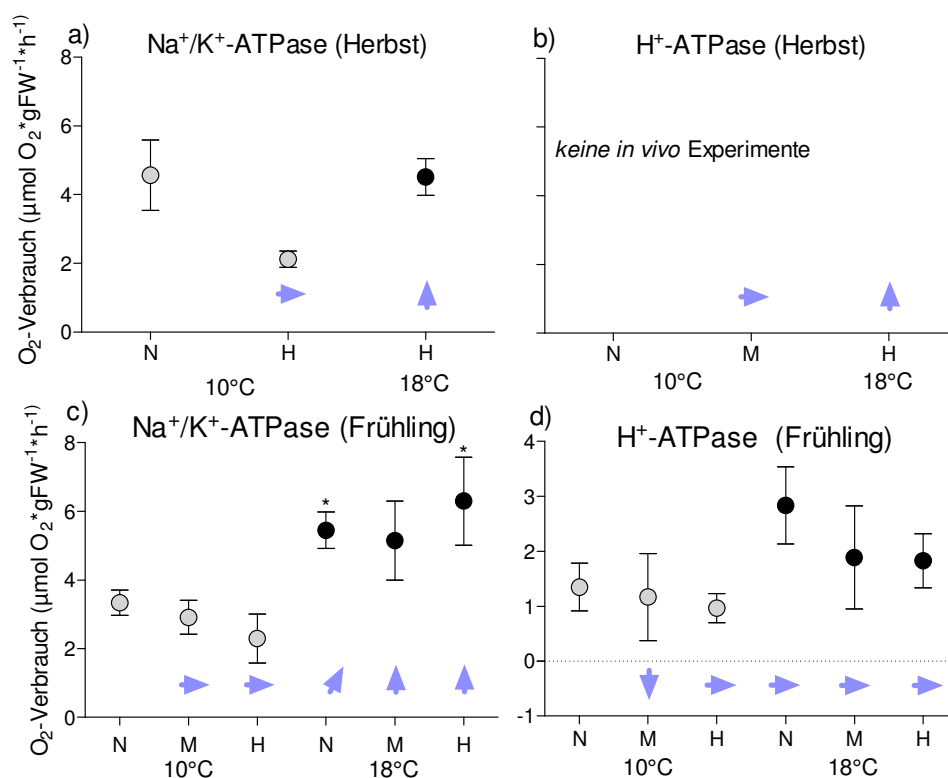


Abb. 8a-d: Darstellung der *in vivo* Nettosauerstoffverbrauchsdaten der Na^+/K^+ -ATPase und H^+ -ATPase beider Inkubationsexperimente, sowie der dazugehörigen *in vitro* Kapazitäten, angezeigt als signifikante Änderung ($p < 0,05$) jeweils zur 10°C Kontroll-Gruppe: *In vivo*-Messungen stammen aus perfundierten isolierten Kiemen, *in vitro*-Messungen aus Kiemenrohrextrakten von 4-8 Wochen inkubierten Kabeljau unter niedrigem ($N=550 \mu\text{atm}$), mittlerem ($M=1.200 \mu\text{atm}$) und hohem PCO_2 ($H= 2.200-2.500 \mu\text{atm}$) bei 10°C (grau) und 18°C (schwarz) jeweils im Herbst (a&b, Helgolandexperiment) und im Frühling (c&d, Schwedenexperiment). Signifikante Unterschiede der *in vivo* Fraktionen zur Kontroll-Gruppe sind mit * markiert. Die Pfeilrichtungen zeigen gleichbleibende (waagrecht Pfeil), signifikant reduzierte (Pfeil nach unten) oder signifikant erhöhte (Pfeil nach oben) *in vitro* Enzymkapazitäten relativ zur 10°C Kontroll-Gruppe an; ein Trend wird durch einen schrägen Pfeil angedeutet. *In vitro*-Daten des Schwedenexperiments stammen von K. Michael.

Generell können neben populationsspezifischen Eigenarten, wie beispielsweise eine entsprechend variierende Anzahl von Chloridzellen (Scott et al., 2004), auch saisonale Effekte eine Rolle für die Unterschiede zwischen den beiden Inkubationsexperimenten gespielt haben. Saisonale Variationen physiologischer Parameter basieren bei marinen ektothermen Arten meist auf Änderungen der Umgebungstemperatur und den damit verbundenen Auswirkungen auf den Stoffwechsel (Despotovic et al., 2012; Leiniö and Lethonen, 2005). In der vorliegenden Studie wurden bei beiden Inkubationsexperimenten vergleichbare Bedingungen durch konstante Umgebungstemperaturen im Bereich der Optimumtemperatur (10°C) geschaffen, jedoch schließt dies einen saisonalen Einfluss nicht aus. Temperatur-Präferenz-Experimente am Atlantischen Kabeljau konnten zeigen, dass Tiere, die über viele Wochen bei 10°C gehalten wurden, die gleichen saisonalen Temperaturen bevorzugten wie solche, die jeweils bei zum Habitat äquivalenten Wassertemperaturen gehalten wurden (Clarke und Green, 1991). Auf Basis dieser Annahme würde die Präferenztemperatur der Tiere des ersten Inkubationsexperiments (Helgolandtiere) im Herbst im Bereich der Kontrollhalterungstemperatur liegen, während zum Zeitpunkt des zweiten Experiments (Schwedentiere) im Frühling eine niedrigere Präferenztemperatur (ca. 5 Grad) zu erwarten

wäre. Die oben diskutierten Unterschiede für die Na^+/K^+ -ATPase und H^+ -ATPase (s. 4.1.3) können somit auch durch unterschiedliche saisonale Präferenztemperaturbereiche erklärt werden. Ein saisonal reduzierter K_m für ATP wie er für Wintertiere des Flussbarsches im Vergleich zu Sommertieren beschrieben wurde (Packer und Garvin, 1998), kann zu den Unterschieden zwischen den Experimenten beigetragen haben. Ebenso könnten auch saisonal oder populationsspezifische Ausgangskapazitäten der H^+ -ATPase einen Einfluss auf die variierende PCO_2 -Sensitivität der maximalen Enzymkapazität ausüben. Diese wird bei einer bereits niedrigeren H^+ -ATPase-Ausgangskapazität (Helgolandtiere) unter CO_2 möglicherweise nicht weiter reduziert (Abb. 8b & d), im Gegensatz zu den höheren Kapazitäten der Schwedentiere. Vergleicht man CO_2 - und temperaturabhängige Verschiebungen der *in vitro* Kapazitäten mit denen der *in vivo* Enzymfraktionen wird deutlich, dass Änderungen auf beiden Ebenen nur teilweise parallel zueinander verlaufen. So wurde für die Versuchstiere des Schwedenexperiments eine Synchronität in der Variation von *in vitro* Kapazitäten und der *in vivo* Na^+/K^+ -ATPase-Aktivität festgestellt (Abb. 8b), während dies für die Na^+/K^+ -ATPase (Abb. 8a) sowie für die H^+ -ATPase (Abb. 8c) bei den Helgolandtieren nicht gegeben war. Die jeweils unter 2.500 μatm reduzierten *in vivo* Na^+/K^+ -ATPase-Fractionen der Helgolandtiere waren bei 10°C von unveränderten und bei 18°C von erhöhten maximalen *in vitro* Enzymkapazitäten begleitet (Publikation I). Dies lässt darauf schließen, dass die maximalen, eventuell für veränderte Umweltbedingungen bereitgestellten, *in vitro* Kapazitäten *in vivo* nicht voll ausgenutzt wurden.

Im Vergleich dazu gingen PCO_2 -unabhängige *in vivo* H^+ -ATPase-Fractionen (Publikation II) bei Optimumtemperatur mit reduzierten *in vitro* Enzymkapazitäten bei mittlerem PCO_2 einher (Michael et al., eingereicht). In ähnlicher Weise führte kurzzeitige Hyperkapnie zu einer reduzierten Expression der H^+ -ATPase B-Untereinheit beim Atlantischem Lachs (Seidelin et al. 2001; 20.000 μatm) beziehungsweise der H^+ -ATPase 70kDa A-Untereinheit bei der Regenbogenforelle (Lin et al., 1994, 20.000 μatm). Sowohl unter kurz- als auch langzeitiger Hyperkapnie scheint eine Umstrukturierung der H^+ -ATPase-Einheiten von Bedeutung zu sein, während diese jedoch in der vorliegenden Studie keinen signifikanten Effekt auf den *in vivo* Nettosauerstoffverbrauch des Enzyms hatte (Abb. 8d) und auch nicht für die *in vitro* Kapazitäten der Helgolandtiere bei Optimumtemperatur gefunden wurde (Abb. 8b). Diese Ergebnisse verdeutlichen die Notwendigkeit zur Bestimmung beider Parameter. Der regulatorische Aufwand und mögliche Differenzierungen zwischen Populationen und Saisoneffekten, die getrennt oder zusammen betrachtet für die Reaktivität der Art auf künftige Klimaänderungen relevant sein können, bleiben ohne diese Daten verborgen.

4.2 Auswirkungen von Ozeanversauerung und -erwärmung auf maximale Stoffwechsellenzymkapazitäten

4.2.1 Leber

Die Leber als zentrales Stoffwechselorgan zeigte für beide veränderte Umweltfaktoren ein generelles Reaktionsmuster. Bezogen auf den geweberlevanten Parameter Frischgewicht wurden für mittleren erhöhten PCO_2 bei 10°C sowie alle 18°C-Gruppen erhöhte Kapazitäten der Cytochrom-c-Oxidase (COX), der 3-HydroxyacylCoA-Dehydrogenase (HADH) wie auch der Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase (PEPCK) nachgewiesen (Schwedentiere, Publikation III). Ein Anstieg der PEPCK-Kapazität wurde auch für beide PCO_2 -Gruppen im ersten Inkubationsexperiment (Helgolandtiere) beobachtet, während COX-Kapazitäten reduziert waren (Tabelle 2a). Die Kapazitäten der Citratsynthase (CS) waren über alle Versuchsbedingungen beider Inkubationen stabil. Für die Glutamat-Dehydrogenase (GDH) wurde bei der 18°C Gruppe unter hohem PCO_2 in der Schwedeninkubation eine erhöhte Kapazität beobachtet (Publikation III), jedoch wiederum der entgegengesetzte Effekt für die Helgolandtiere festgestellt.

Die Gesamtsicht der Befunde ergibt als Hypothese, dass Änderungen der Umweltfaktoren vor allem den Kohlenhydratstoffwechsel via PEPCK und Glukoneogenese beeinflussen und zu geringerem Anteil für die Mobilisierung freier Fettsäuren via HADH unter hoher Temperatur und Hyperkapnie bei Optimumtemperatur von Bedeutung sind. Zusätzlich sprechen erhöhte Enzymverhältnisse von PEPCK/CS und HADH/CS für eine Restrukturierung der Energiereserven, was auf eine sogenannte „warm-hardiness“ (Wärme-Abhärtung) hinweist. Dieser Mechanismus könnte als Anpassung an eine anhaltende Wärmeperiode und damit einhergehende häufigere hypoxämische Bedingungen dienen, wie bereits bei antarktischen Fischen unter Warmakklimatation erstmals beschrieben (Windisch et al., 2011). Eine universelle Anpassung von Enzymkapazitäten in Folge von Warmakklimatation bei marinen Knochenfischen wäre somit denkbar.

Der Gesamtproteingehalt der extrahierbaren Proteine des Lebergewebes war unter erhöhtem PCO_2 bei 10°C sowie für die mittlere PCO_2 -Gruppe der 18°C Fische erhöht. Dies deutet auf eine Modifizierung des Proteinstoffwechsels hin, da gleichzeitig keine Veränderung im HSI, der eine Einlagerung von Speicherstoffen impliziert, vorlag. Bezogen auf die Enzymkapazitäten pro mg Protein führen Verschiebungen im Leberproteom daher zu einem anderen Bild als der Frischgewichtsbezug. Daraus folgend waren die GDH-Kapazitäten in Bezug auf das Leberproteom unter erhöhtem PCO_2 bei 10°C reduziert. Parallel dazu nahm auch die Ammoniumkonzentration im Plasma ab, was die direkte Verknüpfung zu der Ammonium assimilierenden/bzw. dissimilierenden GDH unterstreicht. Da die Freisetzung von Ammonium im Zuge der Transaminierung und Desaminierung

überschüssiger Aminosäuren der Proteinsynthese stattfindet, deutet eine Abnahme der Plasma-Ammoniumkonzentration bzw. der GDH-Kapazität auf verstärkte Proteinsynthese hin, die sich für die 10°C-Gruppen auch im Proteingehalt des Lebergewebes widerspiegelte.

4.2.2 Weißer Muskel

Die Untersuchung der Stoffwechselprozesse im weißen Muskelgewebe zeigte charakteristische Abweichungen gegenüber den oben beschriebenen Ergebnissen für das Lebergewebe. Die aeroben Markerenzyme CS und COX waren in Bezug auf Frischgewicht und Proteingehalt jeweils in ihren Kapazitäten bei mittlerem PCO_2 und 10°C sowie bei 18°C für die hohe CO_2 -Konzentration erhöht, während eine vollständige Temperaturkompensation unter niedrigem PCO_2 erreicht wurde. Jene Synchronität impliziert ein festes Verhältnis zwischen der mitochondrialen Matrix und den Cristae der Mitochondrien des Muskelgewebes. Gleichzeitig spricht dies für eine erhöhte mitochondriale Volumendichte, die den hohen Energiebedarf des weißen Muskels unter den jeweiligen Bedingungen abdecken kann. Dieser Mechanismus wurde bereits in einem Kälte-Akklimationsexperiment im weißen Muskel des Kabeljaus (Lucassen et al., 2006), aber auch in rotem und weißem Muskel bei Forelle und Streifenbarsch gefunden (Battersby und Moyes, 1998; Egginton und Sidell, 1989). HADH-Kapazitäten waren parallel zu den aeroben Enzymen erhöht und zeigten darüber hinaus leicht erhöhte Kapazitäten bei niedrigem PCO_2 und 18°C. Die Oxidation von freien Fettsäuren spielte somit auch im Muskelgewebe unter Hyperkapnie und in der Wärme eine wichtige Rolle für die Bereitstellung zusätzlicher Energie.

Temperatur und CO_2 zeigten Einfluss auf die proteinbezogenen Pyruvatkinase (PK) Kapazitäten, welche unter mittlerem PCO_2 bei 10°C sowie für beide hyperkapnischen Gruppen bei 18°C erhöht waren, während für auf das Frischgewicht bezogene Enzymkapazitäten keine signifikanten Unterschiede gefunden wurden. Jedoch korrelierten letztere mit den Kapazitäten der Laktat-Dehydrogenase (LDH). Die LDH-Kapazität war unter hohem PCO_2 bei 10°C und in Tendenz auch bei 18°C unabhängig vom Bezug auf Frischgewicht oder Proteingehalt reduziert. Dieses Ergebnis bestätigt das Zusammenspiel der beiden für die anaerobe ATP-Synthese essentiellen Enzyme unter anspruchsvollen Bedingungen, wie beispielsweise bei schnellen intensiven Schwimmbewegungen. Gleichzeitig könnten die reduzierten LDH- und damit anaeroben Kapazitäten unter hohem PCO_2 daraufhin deuten, dass die aerobe Kapazität im weißen Muskelgewebe ausreichend war und kein zusätzlicher anaerober Stoffwechsel bereit gestellt werden musste. Jedoch geht die Reduktion der anaeroben Kapazität mit einer Einbuße der Flucht- und Beutefangkapazität einher, was im Gegensatz zur experimentellen Hälterung im natürlichen Lebensraum eine Einschränkung darstellen würde. Eine Korrelation zwischen PK, LDH und Wachstum wie bereits in vorherigen Studien beobachtet (Pelletier et al., 1993, 1994; Clarke

et al., 1992) konnte nur bei Optimumtemperatur und niedrigem PCO_2 festgestellt werden. Dieser Zusammenhang zwischen Wachstum und glykolytischer Kapazität, wobei Wachstum als bestimmender Faktor gilt (Pelletier et al., 1994), scheint unter den Anforderungen von erhöhtem PCO_2 und vor allem in der Wärme abzunehmen (Publikation III).

Die Tiere des Helgolandexperiments zeigten hingegen erhöhte LDH-Kapazitäten unter hohem PCO_2 bei 18°C (Tab. 2a), im Einklang mit einer früheren Hyperkapnie-Studie an Meerbrassen (10 Tage, pH 7,3, Michaelidis et al., 2007). Dies weist auf einen erhöhten Anteil an anaerobem Stoffwechsel in beiden Studien hin. LDH wird in der Ökotoxikologie als Biomarker für Stoffwechselstörungen unter Schadstoffexponierung genutzt, wobei sowohl gesteigerte als auch reduzierte Kapazitäten beobachtet und als oxidativer Stress beziehungsweise eine Beeinträchtigung der Leistungsfähigkeit eingestuft wurden (Koenig und Solé, 2014; Moreira et al., 2010; Vieira et al., 2008). Hyperkapnie könnte eine ähnliche Auswirkung haben, jedoch bleiben der oder die Co-Faktoren, die jeweils zu erhöhten oder reduzierten LDH Kapazitäten unter erhöhtem PCO_2 führen, zu klären.

Während die CO_2 -Konzentration in allen drei Experimenten vergleichbar war, unterschieden sich die Studien in der Nahrungsverfügbarkeit und hinsichtlich der Dauer, wobei letztere nicht mit der Änderung der LDH-Kapazitäten korreliert. Im Schwedenexperiment wurde dreimal wöchentlich bis zur Sättigung gefüttert, während die Helgolandtiere nur zweimal wöchentlich rationierte Portionen erhielten und in der Meerbrasseninkubation (Michaelidis et al., 2007) gar keine Fütterung stattfand. Unter normokapnischen Bedingungen korrelieren LDH-Kapazitäten positiv mit der Nahrungsverfügbarkeit (Yang und Somero, 1993), jedoch bleibt ein möglicherweise veränderter Zusammenhang unter dem Einfluss von Hyperkapnie zu untersuchen.

4.3 Auswirkungen von Ozeanversauerung und -erwärmung auf das Ganztier

4.3.1 Ionenkonzentrationen im Blutplasma

Veränderungen in den Plasma-Ionenkonzentrationen waren sowohl PCO_2 - als auch temperaturabhängig (Publikation II). Dabei wurde für die beiden Hauptosmolyte Chlorid (Cl^-) und Natrium (Na^+) jeweils unter erhöhtem PCO_2 ein Konzentrationsrückgang beobachtet, wobei Na^+ nur bei 1.200 μatm , Cl^- jedoch für beide hyperkapnische Gruppen (1.200 und 2.200 μatm) niedrigere Konzentrationen aufwies. In der Wärme ergaben sich ebenfalls verringerte Na^+ - und Cl^- -Konzentrationen, mit Ausnahme der mittleren PCO_2 -Gruppe, die gegenüber den Gruppen mit hohem und niedrigem PCO_2 bei 18°C erhöhte Osmolytkonzentrationen aufwies (Publikation II). Calcium-, Kalium- und Magnesiumionen zeigten keine Konzentrationsänderung unter erhöhtem PCO_2 als Einzelfaktor (Abb. 9 a-d) und bestätigten damit die Ergebnisse vorheriger Studien unter sehr viel höheren PCO_2 -Konzentrationen (Larsen et al., 1997; Toews et al., 1983).

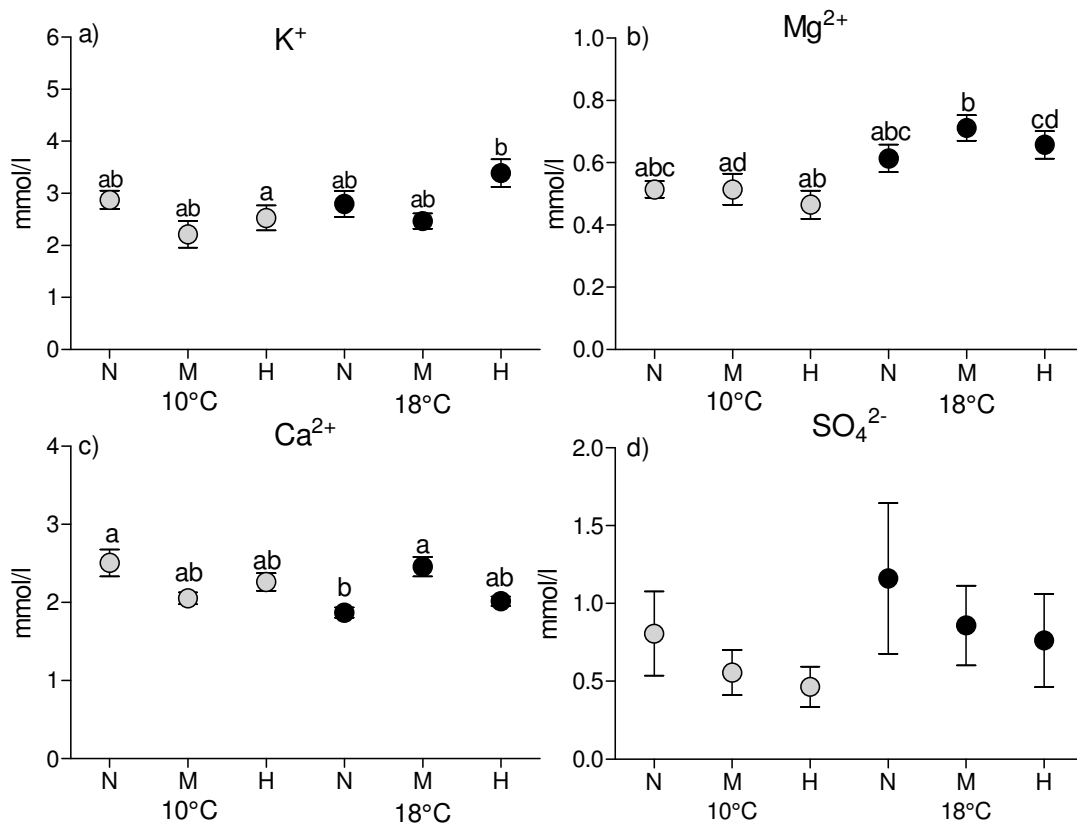


Abb. 9 a-d: Konzentration von Kalium (K⁺) (a), Magnesium (Mg²⁺) (b), Calcium (Ca²⁺) und Sulfat (SO₄²⁻) (mmol·l⁻¹) im Blutplasma von 4 Wochen inkubierten Kabeljau unter niedrigem (N=550 µatm), mittlerem (M=1.200 µatm) und hohem PCO₂ (H= 2.200 µatm) bei 10°C (grau) und 18°C (schwarz). Unterschiedliche Buchstaben markieren signifikante Unterschiede zwischen Versuchsgruppen (p<0,05), n= 18-20 je Versuchsbedingung. Daten stammen aus der 2. Inkubation, die gemeinsam erhoben und im Rahmen des Parallelprojekts (K. Michael) veröffentlicht werden.

Im Gegensatz dazu waren Kalium- und Magnesiumkonzentrationen in der Wärme bei mittlerem bzw. hohem PCO₂ erhöht. Für Sulfat wurde kein signifikanter Unterschied zwischen den verschiedenen Versuchsgruppen gefunden (Abb. 9 a-b, d). Die Osmolalität war dagegen unter allen PCO₂-Bedingungen bei Optimumtemperatur (10°C) stabil, während innerhalb der 18°C-Gruppen der bereits für die Konzentrationen von Cl⁻, Na⁺ und Ca²⁺ festgestellte Anstieg bei mittlerem PCO₂ in gleicher Weise beobachtet wurde (Publikation II). Die unter erhöhtem PCO₂ bei 10°C reduzierten Na⁺- und vor allem Cl⁻-Konzentrationen müssen demnach durch andere Osmolyte ausgeglichen worden sein. Dabei spielt, wie in einer früheren Hyperkapniestudie an Kabeljau gezeigt wurde, HCO₃⁻ mit seiner Pufferwirkung eine wichtige Rolle (Larsen et al., 1997). Die berechneten (Publikation I und II) wie auch die für zwei der Versuchsgruppen analytisch bestimmten HCO₃⁻-Konzentrationen (Publikation II) erklären jedoch nicht die vollständige Kompensation der Differenz zwischen Gesamtosmolalität und den gemessenen Konzentrationen der Hauptosmolyte. Bei einer Temperaturstudie an Plattfischen (*Solea senegalensis*) konnte nachgewiesen werden, dass in der Wärme verstärkt Aminosäuren und Aminosäuremetabolite wie Glutamat, GABA, Glycin und Taurin zur Aufrechterhaltung des extrazellulären osmotischen Drucks akkumuliert wurden (Costas

et al., 2012). Diese organischen Osmolyte könnten unter Hyperkapnie wichtige Funktionen beispielsweise als Antioxidantien, Neurotransmitter oder bei der Protein-Stabilisierung einnehmen (Yancey et al., 2012; Li et al., 2008) und daher gegen anorganische Osmolyte ausgetauscht werden. Der zugrunde liegende Mechanismus bleibt jedoch zu klären.

Der Vergleich von Plasma-Ionenkonzentrationen mit den *in vivo* Ionentransportaktivitäten der Kieme (Abb. 10 a&b) macht deutlich, dass die Abnahme der Na^+ -Konzentrationen bei Warmakklimatation mit einer gesteigerten Aktivität der Na^+/K^+ -ATPase und teilweise auch des Na^+/H^+ -Austauschers einherging. Eine verstärkte Hypo-Osmoregulation wurde bereits bei warm akklimierten antarktischen Fischen (Brauer et al. 2005; Gonzalez-Cabrera et al., 1995) beschrieben und auf gesteigerte Transporterkapazitäten mit erhöhter NaCl -Exkretion zurückgeführt. Dieser Mechanismus deutet auf eine Überkompensation der erhöhten Membran-Permeabilität in der Wärme hin, welche durch eine Verschiebung der Isoformen realisiert werden könnte. Ein Kandidat hierfür wäre die $\alpha 1$ -Untereinheit, die eine vergleichbar stark ausgeprägte Na^+ -Bindungsaffinität aufweist und deren erhöhte Expression zuvor bei warm akklimierten antarktischen Fischen festgestellt wurde (Brauer et al., 2005).

Vergleicht man die Cl^- -Plasmakonzentrationen mit dem Nettosauerstoffverbrauch der Gesamtheit der HCO_3^- -Transporter in der Kieme ergibt sich wahrscheinlich aufgrund der Aufsummierung von $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ als auch $\text{HCO}_3^-/\text{Cl}^-$ Transporter ein weniger klares Bild (Abb. 10c). Einzig für die Versuchsgruppe unter hohem PCO_2 bei 18°C zeigt sich eine hohe Transporter-Nutzung parallel zu den niedrigen Cl^- -Konzentrationen die dem bereits beschriebenen Austausch von Cl^- gegen HCO_3^- unter Hyperkapnie entsprechen könnte.

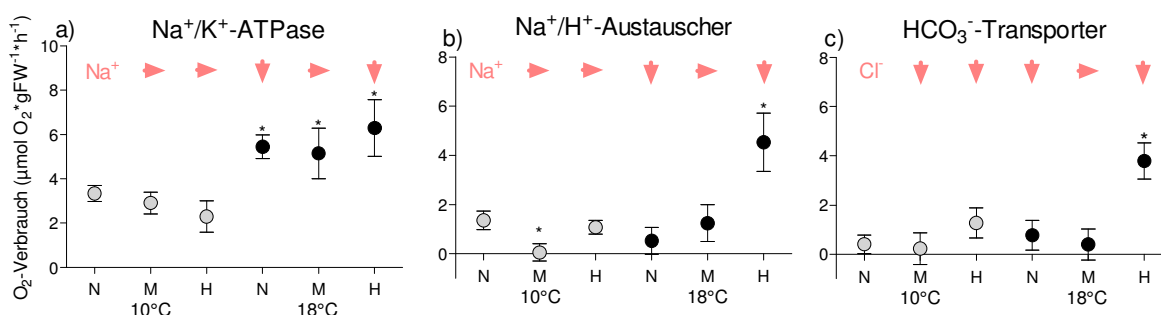


Abb. 10 a-c: Dargestellung des *in vivo* Nettosauerstoffverbrauchs von Na^+/K^+ -ATPase (a), Na^+/H^+ -Austauscher (b) und HCO_3^- -Transporter (c) sowie der dazugehörigen Na^+ - und Cl^- -Plasmakonzentrationen, angezeigt als signifikante Änderung ($p < 0,05$) jeweils zur 10°C Kontroll-Gruppe: *In vivo*-Messungen stammen aus perfundierten isolierten Kiemen, Ionendaten aus chromatographisch bestimmten Konzentrationen im Blutplasma von 4 Wochen inkubierten Kabeljau unter niedrigem (N=550 μatm), mittlerem (M=1.200 μatm) und hohem PCO_2 (H= 2.200 μatm) bei 10°C (grau) und 18°C (schwarz). Signifikante Unterschiede der *in vivo* Fraktionen zur Kontroll-Gruppe sind mit * markiert. Die Pfeilrichtungen zeigen relativ zur 10°C -Kontrollgruppe gleichbleibende (waagerechter Pfeil), signifikant reduzierte (Pfeil nach unten) oder signifikant erhöhte (Pfeil nach oben) Plasmaionenkonzentrationen an.

Parallel zu den maximalen Na^+ und Cl^- Konzentrationen bei jeweils mittlerem PCO_2 gegenüber reduzierten Konzentrationen bei niedrigem und hohem PCO_2 bei 18°C wurde ein ähnliches Muster für die Ca^{2+} - und Mg^{2+} -Konzentrationen beobachtet (Abb. 9b&c). Somit liegt

die Vermutung nahe, dass ein generelles Prinzip, wie beispielsweise veränderte Meerwasseraufnahme bzw. Ionenexkretion oder Veränderung des Blutvolumens diesen Ergebnissen zu Grunde liegt. Letztere wurde bisher nur in geringem Umfang bei einwöchiger Warmakklimation von Süßwasserfischen festgestellt (Nikinmaa et al., 1981), während eine Metaanalyse der Erythrozytenvolumina bei Körpertemperatur von Vertebraten inklusive 20 Fischarten generell einen exponentiellen Anstieg des Erythrozytenvolumens mit steigender Temperatur beschreibt (Gillooly und Zenil-Ferguson, 2014). Im Zusammenhang mit der diskutierten Remodellierung des Kiemengewebes (Abschnitt 4.1.1) würde eine reduzierte Diffusionsdistanz über die Kiemenlamellen bei hypoosmotischen marinen Fischen primär zu Wasserverlust und daraus folgend zu erhöhter Trinkrate und Ionenexkretion führen. Dies würde jedoch nur bei überkompensierter Ionenexkretion reduzierte Plasma-Ionenkonzentrationen verursachen.

Die temperaturbedingt erhöhten Kaliumkonzentrationen bei hohem PCO_2 sind auf eine Interaktion der beiden Parameter zurückzuführen, da beide Faktoren einzeln sowohl in der vorliegenden Arbeit als auch in vorherigen Studien (Jonassen et al., 1999; Larsen et al., 1997) keinen Effekt zeigten. Der Grund für diesen Befund kann hier nicht abschließend geklärt werden. Erhöhte Plasma-Kaliumkonzentrationen wurden im Plasma von Fischen bislang unter Hitzeschock (Vanlandeghem et al., 2010) und nach Handhabungsstress (Soivio und Oikari, 1976) gefunden. Die Warmakklimierung in der vorliegenden Studie kann jedoch weder mit einem Hitzeschockexperiment gleichgesetzt werden, noch gab es einen offensichtlichen Unterschied in der Handhabung der unterschiedlichen Versuchsgruppen. Eine erhöhte Zellmembran-Permeabilität, die für Oberflächen-Epithelien unter dem Einfluss von Stressoren, wie z.B. Schadstoffen, beschrieben wurde (Wendelaar Bonga, 1997), bietet einen weiteren Erklärungsansatz für die temperaturbedingt erhöhten Kalium-Konzentrationen unter Hyperkapnie. Die Auswirkung der veränderten Ionenkonzentrationen sowie eines möglichen Austausches der anorganischen Ionen gegen kompatible organische Osmolyten für das Energiebudget des Ganztiers bleibt jedoch zu untersuchen.

4.3.2 Tierkonditionsparameter

Der Standardmetabolismus der Schwedentiere war bei 18°C und Normokapnie ähnlich hoch wie bei 10°C, d.h. temperaturkompensiert, während mit steigendem PCO_2 die metabolischen Raten der 10°C-Tiere leicht ab- und die der 18°C-Tiere zunahm, was zu einem signifikanten Temperatureffekt bei $>1.200 \mu\text{atm CO}_2$ führte (Publikation II). Ein Temperatur- und PCO_2 -kompensierter Grundstoffwechsel wurde bereits in früheren Studien am Beispiel des Kabeljaus (Melzner et al., 2009b; Schurman und Steffensen, 1997), aber auch bei anderen Fischarten gefunden (Nowicki et al., 2012; Deigweiher et al., 2008; Ishimatsu et al., 2005). Die Interaktion zwischen erhöhtem PCO_2 und Temperatur deutet auf unterschiedliche

Mechanismen bei 10°C und 18°C hin. Eine Interaktion der Faktoren spiegelt sich ebenfalls in den Wachstumsdaten wieder. Die Wachstumsexperimente zeigten unter steigendem PCO_2 einen leichten Negativtrend bei 10°C, während bei hoher Temperatur nur noch eine marginale Gewichtszunahme stattfand. Diese stieg jedoch in Kombination mit zunehmender Hyperkapnie wieder an und lag somit für die Gruppe unter hohem PCO_2 im Bereich der Kontroll-Tiere (10°C, 550 $\mu\text{atm CO}_2$), (Publikation II). Parallel zum stagnierenden Wachstum bei 18°C und niedrigem PCO_2 war der Konditionsfaktor signifikant gegenüber der entsprechenden 10°C-Tiergruppe reduziert, während er für die anderen Versuchsbedingungen auf Kontrollniveau (niedriger PCO_2 , 10°C) lag. Die Helgolandtiere, deren Wachstumsraten nicht erfasst wurden, zeigten für die kombinierten Hälterungsbedingungen (18°C, 2.500 μatm) einen reduzierten Konditionsfaktor gegenüber den anderen beiden Tiergruppen (Abb. 11a), was ein reduziertes Wachstum unter diesen Bedingungen impliziert. Darüber hinaus lässt die im Vergleich zu den 10°C Tieren mehr als doppelt so hohe Mortalitätsrate dieser Gruppe (25%) auf eine Schwächung der Tiere unter hohem PCO_2 bei 18°C schließen.

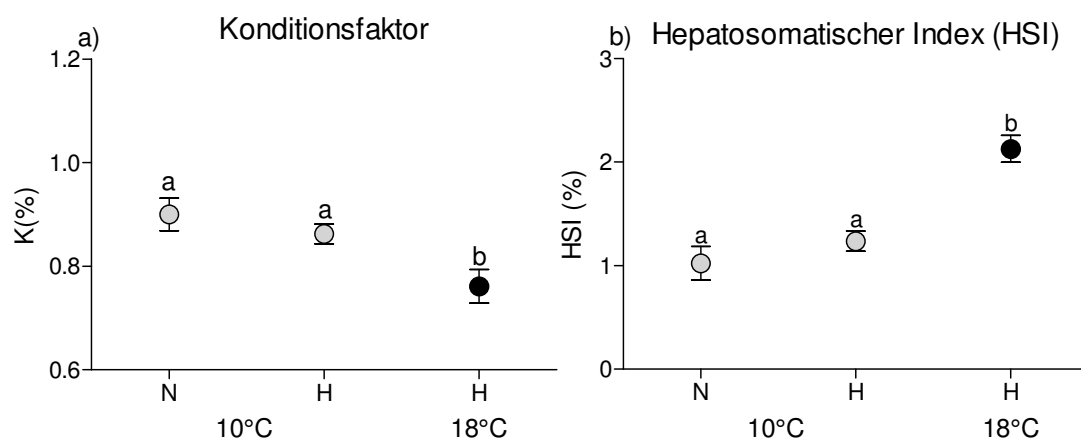


Abb.11 a-b: Konditionsfaktor (%) (a) und Hepatosomatischer Index (%) (b) von 8-10 Wochen inkubierten Fischen unter niedrigem (N=500 μatm) und hohem PCO_2 (H=2.500 μatm) bei 10°C (grau) und 18°C (schwarz). Unterschiedliche Buchstaben markieren signifikante Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen ($p < 0,05$), $n = 5-16$.

Abgesehen von den über verschiedene Versuchsbedingungen vermeintlich unterschiedlichen Entwicklungen der Kondition von Helgoland- und Schwedentieren, stellt sich zunächst die Frage nach dem Mechanismus, der zur positiven Korrelation zwischen steigendem PCO_2 und Wachstumsraten bei hoher Temperatur führte (Schwedentiere). Eine Studie zum Blutfluss im Darm zeigte, dass während der Verdauungsphase bereits geringfügige Aktivitäten („struggles“) die Unterbrechung des Blutflusses und somit des Verdauungsvorgangs verursachten (Farrell et al., 2001). Dies kann eine verzögerte Verdauung sowie eine schlechtere Nährstoffaufnahme zur Folge haben. Sollte Hyperkapnie einen positiven Einfluss auf eine geringfügige Aktivitätssteigerung unter 18°C nehmen,

könnte das Wachstum begünstigt werden. Eine aktuelle Studie, die sich mit dem Roteffekt und der Sauerstoffkapazität des Blutes unter Hyperkapnie (15.000 μatm) beschäftigt, konnte zeigen, dass es vermutlich im Zusammenspiel mit der im Blutplasma der Muskelkapillaren verfügbaren Carbo-Anhydrase (CA) zu einer Ansäuerung der Erythrozyten (RBZ) kommt. Daraus resultierte eine ca. 100%ige Erhöhung der Sauerstoffversorgung des roten Muskelgewebes (Regenbogenforelle; Rummer et al. 2013; Rummer und Brauner 2011). Dieser Mechanismus könnte auch für den Kabeljau relevant sein, wie die parallele Ansäuerung von RZB zum pH_e im Bereich von 7,5 bis 8,4 zeigt (Berenbrink und Bridges, 1994). Eine durch Hyperkapnie stimulierte Sauerstoffversorgung des Muskelgewebes könnte in der vorliegenden Studie der reduzierten Sauerstofflöslichkeit bei 18°C entgegengewirkt haben und somit die beobachteten Wachstumsraten in der Wärme erklären. Da bei 10°C keine Einschränkung in der Sauerstoffversorgung zu erwarten ist, würde dieser Effekt nur in der Wärme zum Tragen kommen. Gleichzeitig weisen die reduzierten muskulären Laktat-Dehydrogenase-Kapazitäten, und damit anaerobe Kapazitäten, unter hohem PCO_2 (Schwedentiere 2.200 μatm) darauf hin, dass die aerobe Kapazität unter Hyperkapnie ausreichend war. Die bei 18°C synchron zu den Wachstumsraten ansteigenden Ganztier-Sauerstoffverbrauchsraten sprechen ebenfalls dafür, dass zusätzliche Energie eventuell auch im Zusammenhang mit stimulierter Nahrungsaufnahme, in somatisches Wachstum investiert wird.

Im Vergleich dazu zeigten die Helgolandtiere, deren niedriger Konditionsfaktor unter 18°C und 2.500 $\mu\text{atm CO}_2$ auf reduziertes Wachstum hindeutet, erhöhte LDH-Kapazitäten. Dieser Frischgewichts-bezogene Anstieg deutet auf ein stagnierendes somatisches Wachstum bzw. einen erhöhten Proteinkatabolismus hin. Die aeroben Kapazitäten zur Erhaltung der Grundfunktion (Jagd- und Fluchtschwimmen) des weißen Muskels bleiben dabei auf konstantem Niveau (Tabelle 2a). Der bereits diskutierte Unterschied in der Futterverfügbarkeit, welche bei den Schwedentieren im Vergleich zum Helgolandexperiment deutlich höher war, kann daher ebenfalls eine wichtige Rolle bei der Ausnutzung einer potentiell verbesserten Sauerstoffversorgung des somatischen Gewebes spielen. Des Weiteren könnte ein saisonaler Unterschied im aktiven Ionentransport der Erythrozyten einer Ansäuerung derselben entgegenwirken. Unter extremer Hyperkapnie wiesen die Erythrozyten des Kabeljau im Winter eine aktive Na^+/Cl^- - und HCO_3^- -abhängige H^+ -Exkretion auf, die einer Ansäuerung entgegenwirkt, während dies bei Sommertieren nicht der Fall war (Berenbrink und Bridges, 1994).

Tabelle 2a-b: Zusammenfassung aller untersuchten Parameter des ersten (a: Helgolandtiere) und zweiten (b: Schwedentiere) Inkubationsexperiments unter niedrigem (N=550 μatm), mittlerem (M=1.200 μatm) und hohem PCO_2 (H=2.200-2.500 μatm) bei 10°C und 18°C. Hochregulierte Prozesse im Vergleich zur Kontrollgruppe sind grün, herabregulierte Prozesse rot hinterlegt. Dabei ist ein Effekt im Bezug auf die Kontroll-Gruppe bei 10°C mit einem schwarzen Pfeil markiert, während ein Temperatureffekt bezogen auf die jeweilige 10°C-Gruppe bei hohem PCO_2 (H) mit einem roten Pfeil gekennzeichnet ist. Die Pfeil-Richtung zeigt die Richtung für die Regulation des jeweiligen Prozesses an, dabei stehen waagrechte Pfeile für „keine statistisch signifikante Änderung“ in dem hier dargestellten Bezug. Die Anzahl der hoch- bzw. herabregulierten Prozesse ist in der letzten Zeile, jeweils bezogen auf die Kontroll-Gruppe bei 10°C (schwarz) und gegebenenfalls als Temperatureffekt bezogen auf die jeweilige PCO_2 -Gruppe bei 10°C (rot) angegeben. Für die Inhibitorenexperimente sind jeweils Änderungen im Netto-Sauerstoffverbrauch (netto) und den anteiligen Fraktionen (%) angegeben, während sich die Veränderungen der Enzymkapazitäten jeweils auf Frischgewicht (FG) und Proteingehalt (P) beziehen.

a) Helgolandtiere	10°C H		18°C H	
Ganztier				
K-Faktor	→		↓	
Kieme				
Inhibitoren	netto	%	netto	%
Na^+/K^+ -ATPase <i>in vivo</i>	→	↓	↑	↓↓
Proteinbiosynthese	→	→	↑	→
RNA-Synthese	→	→	↑	→
F_1F_0 -ATPase <i>in vitro</i>	↑		↑↑	
Na^+/K^+ -ATPase <i>in vitro</i>	→		↑↑	
H^+ -ATPase <i>in vitro</i>	→		↑↑	
Leber				
Proteingehalt	→		→	
HSI	→		↑↑	
Enzymkapazitäten	FW	P	FW	P
COX	↓	→	↓	→
CS	→	→	→	→
HADH	→	→	→	→
PEPCK	↑	→	↑↑	→
GDH	→	→	↓	→
Muskel				
Proteingehalt	→		↓↓	
Enzymkapazitäten	FW	P	FW	P
COX	→	→	→	↑
CS	→	→	→	→
HADH	→	→	↑	↑↑
LDH	→	→	→	↑↑
PK	→	→	→	→
Anzahl gesteigerte Prozesse	2		8/11	
Anzahl reduzierte Prozesse	2		4	

Diskussion

b) Schwedentiere	10°C M		10°C H		18°C N		18°C M		18°C H	
Ganztier										
MO ₂	→		→		→		↑		↑	
Wachstum	→		→		↓		→		→	
Plasma Na ⁺	→		→		↓		→		↓	
Plasma Cl ⁻	↓		↓		↓		→		↓	
Plasma K ⁺	→		→		→		→		↑	
Plasma Mg ²⁺	→		→		→		↑		↑	
Plasma Ca ²⁺	→		→		↓		→		→	
Plasma SO ₄ ²⁻	→		→		→		→		→	
Osmolalität	→		→		→		→		→	
K-Faktor	→		→		↓		→		→	
Kieme										
MO ₂	↓		→		↑		↑		↑	
Frischmasse	↑		↑		→		→		→	
Inhibitoren	netto	%	netto	%	netto	%	netto	%	netto	%
Na ⁺ /K ⁺ -ATPase	→	→	→	→	↑	→	→	→	↑	↑
H ⁺ -ATPase	→	→	→	→	→	→	→	→	→	→
HCO ₃ ⁻ Transporter	→	→	→	→	→	→	→	→	↑↑	→
Na ⁺ /H ⁺ -Austauscher	↓	→	→	→	→	→	→	→	↑↑	→
Leber										
HSI	→		→		→		→		↑	
Proteingehalt	↑		↑		→		→		→	
Enzymkapazitäten	FM	P	FM	P	FM	P	FM	P	FM	P
COX	↑	→	→	→	↑	→	↑	→	↑	→
CS	→	↓	→	↓	→	↓	→	→	→	→
HADH	→	→	→	→	↑↑	→	↑↑	→	↑	→
PEPCK	↑	→	→	→	↑↑	↑↑	↑	↑↑	↑↑	↑↑
GDH	→	↓	→	↓	→	→	→	→	↑	→
Muskel										
Proteingehalt	→		→		↓↓		↓↓		→	
Enzymkapazitäten	FM	P	FM	P	FM	P	FM	P	FM	P
COX	↑	↑	→	→	→	→	→	→	↑	↑↑
CS	→	→	→	→	→	→	→	→	↑↑	↑
HADH	↑	↑	→	→	→	→	→	→	↑↑	↑↑
LDH	→	→	↓	↓	→	→	→	→	→	→
PK	→	↑	→	→	→	→	→	→	→	↑↑
Anzahl gesteigerte Prozesse	7		2		5		3/5		9/14	
Anzahl reduzierte Prozesse	5		4		6		1		2	

Der Hepatosomatische Index (HSI) beider Tiergruppen (Abb. 11b, Publikation II) unter niedrigem PCO_2 und Optimumtemperatur lag mit 1-2% sehr niedrig, wenn man davon ausgeht, dass für Kabeljau ein HSI von 2-6% erwartet wird (Jobling, 1988). Dies könnte unter anderem auf die noch nicht vollständig eingetretene Geschlechtsreife sowie den saisonalen Zeitpunkt der Experimente (Herbst und Frühling) zurückgeführt werden, da Fettreserven verstärkt im Winter sowie für die Ausbildung der Gonaden eingelagert werden (Eliassen, 1982). Darüber hinaus schwankt der hepatische Fettgehalt mit dem der Nahrung (Dos Santos et al., 1993). Durch die Verwendung von vorwiegend proteinreichem Futter in den vorliegenden Experimenten erklärt sich der deutlichere Muskelaufbau gegenüber einer nur geringen Fetteinlagerung. Ein erhöhter HSI war für Tiere beider Inkubationsexperimente jeweils unter hohem PCO_2 bei 18°C gegenüber den 10°C Tieren beobachtet worden (Abb. 11b, Publikation III). Dieser Befund kann auf veränderte Leberenzymkapazitäten von PEPCK und HADH, welche beide für den Auf- bzw. Abbau von hepatischen Energiereserven

verantwortlich sind, zurückgeführt werden. Die Kapazitäten der PEPCK waren jeweils für alle 18°C-Gruppen stark erhöht, was auf eine Einlagerung von Kohlenhydratreserven hindeutet. HADH-Kapazitäten waren ebenfalls in der Wärme erhöht (Schwedentiere), zeigten jedoch innerhalb der drei 18°C-Gruppen die niedrigsten Kapazitäten bei der hohen CO₂-Konzentration, während bei den Helgolandtieren keine Veränderung von HADH unter erhöhtem PCO₂ und/oder Temperatur festgestellt wurde. Somit ist der erhöhte HSI vermutlich auf die Einlagerung von Kohlenhydratreserven wie Glykogen zurückzuführen, eine Strategie, die wie bereits in Abschnitt 4.2.1 dargestellt, unter anhaltender Wärme und Hyperkapnie zur Bereitstellung schnell verfügbarer Energiereserven, beispielsweise zur Überwindung hypoxämischer Phasen, dienen könnte.

4.3.3 Verknüpfung der systemischen Ebenen und Auswirkungen auf das Ganztier

Das Energiebudget eines Organismus wird vom aeroben und anaeroben Stoffwechsel bereitgestellt und teilt sich zwischen Aufrechterhaltung des Grundstoffwechsels, Wachstum, Reproduktion, Aktivität und Aufbau von Energiereserven auf (Sokolova et al., 2012; Brett und Groves, 1979). In der vorliegenden Studie wurden nur Teile dieser Komponenten untersucht, jedoch lassen sich aus der Gesamtheit der Parameter (Tabelle 2a&b) und ausgewählten Faktoren Konsequenzen der Ozeanversauerung und -erwärmung für den Atlantischen Kabeljau ableiten. Dabei kann die LDH-Kapazität als Indikator für anaeroben Stoffwechsel neben dem den Energiestatus beschreibenden Grundsauerstoffverbrauch, dem Wachstum und dem Aufbau von Leberreserven (HSI) einen Hinweis auf Verschiebungen in diesem Gleichgewicht geben. Dafür wurden mit Bezug auf die Kontrollgruppe die anteiligen Veränderungen von metabolischer Rate, Wachstumsrate und HSI der Schwedentiere über die verschiedenen Versuchsbedingungen vergleichend dargestellt (Abb. 12).

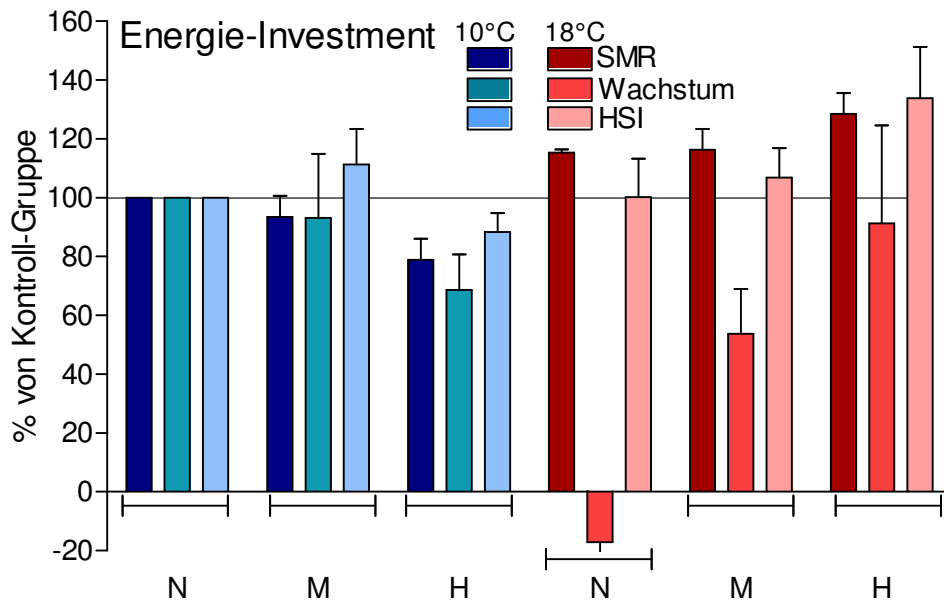


Abb. 12: Darstellung der Parameter hepatosomatischer Index (HSI), Wachstum und Grundstoffwechsel (SMR) relativ zur Kontrollgruppe als Indikatoren für das Energie-Investment des Kabeljaus unter niedrigem (N = 550 µatm), mittlerem (M=1.200 µatm) und hohem (H= 2.200 µatm) PCO₂ bei 10°C und 18°C. Die Indikatoren des Energie-Investment stammen aus dem Schwedenexperiment (Inkubation 2) und sind als Anteile der Kontrollgruppe (550 µatm) bei 10°C dargestellt, welche jeweils auf 100% gesetzt wurden.

Betrachtet man das globale Bild der Auswirkungen von Hyperkapnie und erhöhter Temperatur und die Anzahl der unter den jeweiligen Bedingungen regulierten Parameter (Tabelle 2a&b), wird deutlich, dass hohe Temperatur als einzelner Faktor für die Reduzierung der meisten Prozesse verantwortlich ist: von 29 untersuchten Parametern waren bei der Schwedeninkubation sechs negativ beeinflusst, darunter das Wachstum, Konditionsfaktor und Muskelproteingehalt sowie einige Plasmaparameter (Tab. 2b). In der Wärme ist mit einer gesteigerten Muskelaktivität zu rechnen (Green und Fisher, 2004), wodurch bei gleichzeitig abnehmender Sauerstofflöslichkeit, weniger Energie für das somatische Wachstum zur Verfügung stehen würde. Das Wachstumsoptimum von Atlantischem Kabeljau liegt bei 10-11°C. Entsprechend werden mit zu- bzw. abnehmender Temperatur sinkende Wachstumsraten verzeichnet (Björnsson et al., 2007; Fischer, 2003; Pörtner et al., 2001), was sich in dem vorliegenden Experiment für die Wärme weiter bestätigte.

Im natürlichen Habitat wurden bereits vor allem an der nördlichen und südlichen Verbreitungsgrenze Migrationsbewegungen des Atlantischen Kabeljaus als Reaktion auf Temperaturveränderungen beobachtet (Rose, 2005). Bei fortschreitender Ozeanerwärmung ist zu erwarten, dass dieser Effekt noch weiter zunimmt. Hyperkapnie bei Optimumtemperatur zeigte konzentrationsabhängig unterschiedliche Effekte. Fische, die unter mittlerem PCO₂ und 10°C inkubiert waren (Schwedenexperiment), zeigten mit sieben hochregulierten Prozessen und fünf reduzierten Parametern (Tab. 2b) eine stark ausgeprägte Umstrukturierung, welche in allen untersuchten Geweben (Kieme, Leber und

Muskel) stattfand. Unter hohem PCO_2 wurde hingegen der geringste Effekt bei Optimumtemperatur mit je zwei gesteigerten und zwei (Helgolandtiere) bzw. vier (Schwedentiere) reduzierten Prozessen beobachtet, welche hauptsächlich die Stoffwechsellzymaktivitäten betrafen (Tab. 2a&b). Das erlaubt die Annahme, dass die mittlere CO_2 -Konzentration, andere Regulationsmechanismen erfordert, als dies bei 2.200-2.500 $\mu\text{atm } CO_2$ der Fall ist.

Beim Vergleich mit vorherigen Studien fällt auf, dass unter leichter Hyperkapnie (bis ca. 2.000 μatm) eine oftmals starke Reaktion auf verschiedenen systemischen Ebenen hervorgerufen wird (Pope et al., 2014; Couturier et al., 2013; Forsgren et al., 2013; Jutfelt et al., 2013; Miller et al., 2013; Munday et al., 2009a). Unter moderat erhöhtem PCO_2 zwischen 2.000-3.000 μatm scheint ein „nicht-kompensatorischer“ Bereich zu existieren wie unveränderte oder reduzierte Na^+/K^+ -ATPase Kapazitäten und stabiles Larvenwachstum, -entwicklung und -schwimmverhalten zeigen (Bignami et al., 2013; Melzner et al., 2009b). Bei extremer Hyperkapnie (> 3.000 <10.000 μatm) erfolgt wiederum eine starke Regulation die in gesteigerten *in vivo* und *in vitro* Aktivitäten von Ionentransportern und Stoffwechsellzymen, als auch veränderten Wachstumsraten deutlich wird (Bignami et al., 2013; Rummer et al., 2013; Frommel et al., 2011; Moran und Støttrup, 2011; Deigweiher et al., 2010; Melzner et al., 2009b; Deigweiher et al., 2008; Michaelidis et al., 2007; Ishimatsu et al., 2005). Die zu Grunde liegenden Regulationsmechanismen bleiben zu klären, jedoch impliziert dieses Muster keine lineare Antwort auf steigende CO_2 Konzentrationen.

Bei Betrachtung der Parameter Grundstoffwechsel, Wachstum und HSI als Indikatoren für das Energie-Investment, wie für die Schwedentiere in Abbildung 12 dargestellt, zeigt sich bei hohem PCO_2 und 10°C eine Reduktion aller Prozesse, während die Anteile der mittleren PCO_2 -Gruppe jeweils auf Kontrollniveau lagen. Gleichzeitig waren unter 2.200 $\mu\text{atm } CO_2$ und 10°C die LDH-Kapazitäten reduziert (Tab. 2b). Ein erhöhter Anteil im Sauerstoffverbrauch der Kieme am Grundstoffwechsel des Gesamttiers, der unter anderem mit der erhöhten Kiemengewebssmasse zusammenhing, könnte sich einschränkend auf andere Prozesse auswirken. Welche langzeitigen Folgen dieser Befund haben wird, bleibt offen.

Für die Kombination von Hyperkapnie und Temperaturerwärmung zeigte sich ein entgegengesetztes Bild. Die mittlere CO_2 -Konzentration bei 18°C wies drei hochregulierte und vier temperaturabhängige Effekte, aber nur einen reduzierten Prozess auf (Tab. 2b). Mit einer nur schwachen Reduktion der für das Energie-Investment ausschlaggebenden Parameter lag sie näher am Bereich der Kontroll-Tiere unter Optimumtemperatur als die entsprechende Gruppe bei 10°C sowie die 18°C -Gruppe unter niedrigem PCO_2 (Abb. 12). Dieser „positive“ Effekt verstärkte sich mit steigender CO_2 -Konzentration, was vor allem für die Muskelparameter auffällig war (Tab. 2a und b). Für beide Inkubationsexperimente wurde unter 18°C und hohem PCO_2 eine stark ausgeprägte Hochregulierung verschiedener

Prozesse beobachtet. Jeweils acht (Helgolandtiere) bzw. neun (Schwedentiere) Prozesse waren im Vergleich zu den Kontrollbedingungen (10°C niedriger PCO_2) gesteigert und sogar elf bzw. 14 Parameter zeigten einen Temperatureffekt bezogen auf die gleiche PCO_2 -Gruppe bei 10°C, während zwei bzw. vier Prozesse reduziert waren (Tab. 2a&b).

Diese Umstrukturierung beinhaltete einen Anstieg der Energie-Investment-Indikatoren gegenüber den Kontrolltieren (10°C niedriger PCO_2) (Abb. 12). Eine sich verstärkende Wirkung von erhöhter Temperatur und PCO_2 , die für Fische (Enzor et al., 2013; Munday et al., 2009a), und andere marine Organismen (Dissanayake und Ishimatsu, 2011; Walther et al. 2010; Rosa und Seibel, 2008, Langdon und Atkinson, 2005) beobachtet wurde, tritt unter den angewandten experimentellen Bedingungen beim Atlantischen Kabeljau nicht auf. Im Gegenteil, Hyperkapnie scheint die Energiebereitstellung in der Wärme und damit auch die Temperaturtoleranz zu erhöhen, was sich in reduzierten LDH-Kapazitäten mit gleichzeitig hohen Wachstumsraten und dem Aufbau von Leberreserven zeigt. Ähnliche interaktive Effekte von Hyperkapnie und warmer Temperatur wurden bereits für Wachstum, aerobe Leistungsfähigkeit, Futterverhalten und Fortpflanzung bei Larval- und Juvenilstadien verschiedener Fischarten beschrieben (Couturier et al., 2013; Miller et al., 2013; Hurst et al., 2012; Nowicki et al., 2012). Die zu Grunde liegenden Mechanismen blieben jedoch ungeklärt. Die vorherig diskutierte verbesserte Sauerstoffversorgung des Gewebes unter Hyperkapnie (Rummer et al., 2013; Rummer und Brauner, 2011) (Abschnitt 4.3.2) bietet einen interessanten Erklärungsansatz. Jedoch lässt die Reduktion des Konditionsfaktors der Helgolandtiere erwarten, dass dieser Mechanismus von hoher Nahrungsverfügbarkeit abhängt, saisonal beeinflusst ist, oder nur über einen begrenzten Zeitraum zu den beobachteten Effekten führt.

4.4. Zusammenfassung und Einordnung der Effekte auf den Kabeljau innerhalb des natürlichen Habitats

Abschließend sollen die eingangs gestellten Fragen beantwortet und ein Prognose für die Auswirkungen von Ozeanversauerung und -erwärmung auf den Kabeljau gestellt werden:

- 1. Welche ionenregulatorischen Mechanismen tragen unter den gewählten CO_2 -Konzentrationen und an der warmen Grenze des Temperaturfensters zur Säure-Base-Kompensation bei, und wie wirken sich diese auf das Energiebudget der Kieme sowie des Ganztiers aus?*

Unter den hier applizierten Klimafaktoren wurde neben veränderter Na^+/K^+ -ATPase-Aktivität vor allem eine Beteiligung der Na^+/H^+ -Austauscher sowie der HCO_3^- -Transporter deutlich. Dabei wurde unter Hyperkapnie bei 10°C nur eine geringfügige Adaption der

Ionenregulations-Mechanismen beobachtet, die aus einer Reduktion der Na^+/H^+ -Austauscher-Aktivität bei mittlerem PCO_2 sowie der Na^+/K^+ -ATPase-Aktivität bei hohem PCO_2 bestand. Diese Mechanismen, welche eine Kiemenremodellierung vermuten lassen, wurden parallel zur Erhöhung der Kiemengewebsmasse beobachtet und können mit veränderten Transporteraktivitäten in Zusammenhang stehen. Eine Zunahme der Zellmasse würde auch den anteilig erhöhten Gesamtkiemensauerstoffverbrauch bezogen auf das Ganztier erklären. Die Beteiligung der Na^+/H^+ -Austauscher und HCO_3^- -Transporter war unter 18°C und hohem PCO_2 maximal, wobei insbesondere die $\text{HCO}_3^-/\text{Cl}^-$ -Austauscher und $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ -Co-Transporter mögliche Kandidaten für dieses Muster sind. Als wesentliche Triebkraft dieser erhöhten Transporteraktivitäten diene vermutlich die Na^+/K^+ -ATPase, da in der Wärme sowohl die *in vivo* Aktivität als auch die *in vitro* Kapazität gesteigert war. Für H^+ -ATPase wurde nur im Ansatz eine erhöhte *in vivo* Fraktion unter niedrigem PCO_2 bei 18°C festgestellt, die sich nicht in den *in vitro* Kapazitäten widerspiegelte. In der Wärme war unabhängig von der PCO_2 -Konzentration die Gesamtkiemensauerstoffverbrauchsrates bei unveränderter Kiemengewebsmasse gleichmäßig erhöht. Da bei 18°C die Ganztier-Sauerstoffverbrauchsrates mit steigendem PCO_2 positiv korreliert waren, verringerte sich somit der Sauerstoffverbrauchsanteil der Kiemen. Dies lässt auf einen entsprechend höheren Energiebedarf anderer Prozesse schließen. Unterschiede, die zwischen den beiden Inkubationsexperimenten für *in vivo* Fraktionen der Na^+/K^+ -ATPase und *in vitro* Kapazitäten der H^+ -ATPase deutlich wurden, könnten auf saisonale Unterschiede in den Präferenztemperaturen der Herbst- bzw. Frühlingstiere zurückzuführen sein. Des Weiteren sind populationsspezifische Voranpassungen durch beispielsweise unterschiedliche Temperatur- und/oder PCO_2 -Bedingungen im jeweiligen Habitat denkbar. Nicht zuletzt variierten die beiden Inkubationsexperimente in Akklimationsdauer und Fütterung, deren Einfluss ebenfalls nicht ausgeschlossen werden kann.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass unter 10°C und hohem PCO_2 ein negativer Effekt auf das Ganztier mit möglichen Auswirkungen auf dessen Fitness zu erwarten ist. Dieser ist jedoch auf die potentielle Zunahme an Gewebsmasse der Kieme zurückzuführen, während die veränderte Beteiligung von Ionentransportern keinen direkten Effekt auf das Energiebudget des Ganztiers hat. Indirekt kann jedoch die Erhöhung der Na^+/K^+ -ATPase-Aktivität in der Wärme zu einer verstärkten Hypo-Osmoregulation und damit zur Reduzierung der Plasma- Na^+ - und Cl^- -Konzentration in der Wärme bei niedrigem und hohem PCO_2 geführt haben. Die weitere Auswirkung dieses Mechanismus bleibt im hier untersuchten Kontext jedoch ungeklärt.

2. Wie wirkt sich ein erhöhter PCO_2 und/oder erhöhte Temperatur auf die zentralen Energiestoffwechselwege aus, und wie sind diese Prozesse mit der Fitness des Ganztiers verknüpft?

Auf Ganztierebene wurde vermindertes Wachstum bei 18°C und niedrigem PCO_2 festgestellt. Dieses Defizit wurde jedoch mit zunehmender CO_2 -Konzentration aufgehoben, so dass das Wachstum der Gruppe unter hohem PCO_2 wieder im Bereich der Kontrolltiere (10°C) lag. Parallel dazu wurden bei hohem PCO_2 und 18°C steigende Enzymkapazitäten (COX, CS, HADH) beobachtet. Wegen der eng verknüpfte Regulierung der beiden aeroben Enzyme COX und CS weist dies auf eine Zunahme der mitochondrialen Volumendichten hin. Für die niedrige und mittlere PCO_2 -Gruppe bei 18°C, bezogen auf die 10°C Kontrollgruppe, wurde dagegen keinerlei Veränderungen der Enzymkapazitäten festgestellt. COX-, CS- und HADH-Kapazitäten des Muskelgewebes spiegelten demnach vor allem in der Wärme den Zustand des somatischen Gewebes wider. LDH-Kapazitäten, als Indikator für anaeroben Stoffwechsel, zeigten dagegen eher einen negativen Zusammenhang mit der Tierkondition. Dieser Zusammenhang war zudem temperaturabhängig und könnte mit der Sauerstoffversorgung und der aeroben Kapazität des Gewebes in Verbindung stehen, welche unter Hyperkapnie möglicherweise stimuliert wird, wie eine vorherigen Studie der Sauerstoffkapazität des Blutes zeigte (Rummer et al., 2013). Die saisonale Abhängigkeit dieses Mechanismus sowie der generelle Einfluss der Diät auf die muskulären Enzymkapazitäten bedürfen weiterer, detaillierter Untersuchungen.

Die Leber reagierte deutlich unter mittlerem PCO_2 bei 10°C Hälterungstemperatur sowie für alle 18°C-Gruppen und zeigte dabei einen generellen Effekt mit erhöhten Kapazitäten von Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase (PEPCK), HydroxyacylCoA-Dehydrogenase (HADH) und Cytochrom-c-Oxidase (COX) bei gleichbleibender Citratsynthase-Kapazität (CS). Ein ähnliches Muster war bereits bei antarktischen Fischen unter Warmakklimation beobachtet und als „Wärme-Abhärtung“ interpretiert worden (Windisch et al., 2011). Dieser Mechanismus, der möglicherweise durch Aufbau schnellverfügbarer Kohlenhydratreserven auf eine länger anhaltende Wärmephase mit potentiellen hypoxämischen Bedingungen vorbereitet, könnte ein generelles Adaptationsprinzip der Knochenfische darstellen.

3. Welche Konsequenzen lassen sich aus diesen Ergebnissen für den Atlantischen Kabeljau, aber auch für vergleichbare Arten aus den gemäßigten Breiten ableiten?

Das große Repertoire an Adaptionsmechanismen auf verschiedenen Ebenen bietet dem Kabeljau unter ausreichender Futter- und Sauerstoffverfügbarkeit eine gute Voraussetzung

für die Anpassung an hyperkapnische Bedingungen im Bereich der für die nächsten 300 Jahre vorhergesagten CO₂-Konzentrationen (Collins et al., 2013; Meinshausen et al., 2011). Diese Fähigkeit ist wahrscheinlich unter anderem als Anpassung an den demersalen Lebensstil dieser Spezies entstanden, die bei Ihrer Nahrungssuche auch auf tiefliegende hypoxische und damit hyperkapnische Wasserschichten trifft (Neuenfeldt et al., 2009) und bereits in ihrem natürlichen Lebensraum saisonalen PCO₂-Schwankungen ausgesetzt ist (Gypens et al. 2011; Takahashi et al. 1993). Der gegenläufige Effekt von zunehmender Hyperkapnie auf die Ganztierkondition, bei Optimumtemperatur reduzierend und in der Wärme stimulierend, ist ein interessanter Aspekt, welcher sich im natürlichen Lebensraum bei paralleler Einwirkung beider Klimafaktoren positiv auswirken könnte. Jedoch ist diese Vermutung mit Hinblick auf die beschränkte Dauer der Experimente und die hohe Fütterungsrate unter Vorbehalt zu betrachten. Hohe Temperatur hat sich hingegen als limitierender Faktor bestätigt. Wie bereits bei der Skagerrakpopulation des Atlantischen Kabeljaus beobachtet, führt eine erhöhte Sommertemperatur oberhalb des Juli-Durchschnitts von 16°C zu reduzierter Körpergröße, während überdurchschnittlich warme Temperaturen im Frühling (>3,5°C) einen wachstumsfördernden Effekt haben können (Rogers et al. 2011). Folgt man derzeitigen Modellen, verhält sich innerhalb des nächsten Jahrhunderts die prognostizierte Erwärmung des Skagerrak von 2-3°C (Ádlandsvik, 2008) jedoch nicht linear und wird voraussichtlich vor allem im Sommer zum Tragen kommen. Sie fällt damit mit ihren negativen Auswirkungen zeitlich mit der reduzierten Futterverfügbarkeit (Plankton), mit der zu dieser Jahreszeit zu rechnen ist, zusammen (Rogers et al. 2011). Als direkte Folge einer Ozeanerwärmung ist mit der fortschreitenden Abwanderung des Kabeljaus sowie weiterer Fischarten der gemäßigten Breiten (z.B. Seeteufel *Lophius piscatorius*, Spitzschwanz-Schlangenhalsrochen *Lumpenus lampretaeformis*, Hering *Clupea harengus*) aus deren südlichen Verbreitungsgebiet und in tiefere Wasserschichten zu rechnen (Perry et al., 2005; Rose, 2005). Die Interaktion mit Arten in den nördlicheren Lebensräumen (z.B. dem Polardorsch *Boreogadus saida*) lässt dann Konsequenzen wie zum Beispiel Futterkonkurrenzsituationen erwarten.

Referenzen

- Aas-Hansen, Ø.**, Vijayan, M.M., Johnsen, H.K., Cameron, C., Jørgensen, E.H., 2005. Resmoltification in wild, anadromous Arctic char (*Salvelinus alpinus*): a survey of osmoregulatory, metabolic, and endocrine changes preceding annual seawater migration.
- Ádlandsvik, B.**, 2008. Marine downscaling of a future climate scenario for the North Sea. *Tellus* 60A: 451-458.
- Artioli, Y.**, Blackford, J.C., Butenschön, M., Holt, J.T., Wakelin, S.L., Thomas, H., Borges, A.V., Allen, J.I. 2012. The carbonate system in the North Sea: Sensitivity and model validation. *J. Mar. Sys.* 102-104: 1-13.
- Avella, M.**, Berhaut, J., Bornancin, M., 1993. Salinity tolerance of two tropical fishes, *Oreochromis aureus* and *Oreochromis niloticus*: biochemical and morphological changes in the gill epithelium. *J. Fish. Biol.* 42: 243-254.
- Baker, D.W.**, Matey, V., Huynh, K.T., Wilson, J.M., Morgan, J.D., Brauner, C.J., 2009. Complete intracellular pH protection during extracellular pH depression is associated with hypercarbia tolerance in white sturgeon, *Acipenser transmontanus*. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 296: R1868-R1880.
- Battersby, B.J.**, Moyes, C., 1998. Influence of acclimation temperature on mitochondrial DNA, RNA, and enzymes in skeletal muscle. *Am. Physiol. Reg. Integr. Comp. Physiol.* 44 (3) 905-912.
- Berenbrink, M.**, Bridges, C.R., 1994. Active Na⁺, Cl⁻-and HCO₃⁻-dependent acid extrusion in Atlantic cod red blood cells in winter activated by hypercapnia. *J. Exp. Biol.* 192: 239-252.
- Björnsson, B.**, Steinarsson, A., 2002. The food-unlimited growth rate of Atlantic cod (*Gadus morhua*). *Can. J. Aquat. Sci.* 59: 494-502.
- Björnsson, B.**, Steinarsson, A., Arnasson, T., 2007. Growth model for Atlantic cod (*Gadus morhua*): Effects of temperature and body weight on growth rate. *Aquacult* 271: 216-226.
- Bignami, S.**, Sponaugle, S., Cowen, R.K., 2013. Response to ocean acidification in larvae of a large tropical marine fish, *Rachycentron canadum*. *Glob. Change Biol.* 19: 996-1006.
- Blackford, J.**, Gilbert, F. 2007. pH variability and CO₂ induced acidification in the North Sea. *J. Mar. Sys.* 64: 229-241.
- Boutilier, R.G.**, Heming, T.A., Iwama, G.K., 1984. Physico-chemical parameters for use in fish respiratory physiology. In *Fish Physiology*, vol. XA (Hoar, W.S., Randall, D.J., eds.) Academic Press, NY, USA, pp. 201-430.
- Brander, K.**, 2003. What kind of fish stocks do we need and what kind of information will help us to make better predictions? *Sci. Mar.* 67: 21-33.

- Brauer, P.R.**, Sanmann, J.N., Petzel, D.H., 2005. Effects of warm acclimation on Na⁺, K⁺-ATPase α -Subunit expression in chloride cells of Antarctic fish. *Anat. Rec.* 285A: 600-609.
- Brauner, C.J.**, Baker, D.W., 2009. Patterns of acid-base regulation during exposure to hypercarbia in fishes. In *Cardio-respiratory Control in Vertebrates* (ed. Glass, M. L. and Wood, S.C.), Springer, Berlin, pp. 43-46.
- Brauner, C.J.**, Wang T., Wang. Y., Richards, J.G., Gonzalez, R.J., Bernier, N.J., Xi, W., Patrick, M., Val, A.L., Limited extracellular but complete intracellular acid-base regulation during short-term environmental hypercapnia in the armoured catfish, *Liposarcus pardalis*. *J. Exp. Biol.* 207: 3381-3390.
- Bray, E.S.**, 1971. Observations on the reproductive cycle of the roach (*Rutilus rutilus*) with particular reference to the effects of heated effluents, pp. 93-99. Proc. 5th Br. Coarse Fish Conf.
- Brett, J.R.**, Groves, T.D.D., 1979. Physiological energetics. In: Hoar, W.S., Randall, D.J., Brett, J.R. (eds.), *Fish Physiology*, vol. 8, Bioenergetics and growth. Academic Press, NY, USA, pp. 279-352.
- Brix, O.**, Thorkildsen, S., Colosimo, A., 2004. Temperature acclimation modulates the oxygen binding properties of the Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) genotypes-Hbl*1/1, Hbl*1/2, and Hbl*2/2 by changing the concentrations of their haemoglobin components (results from growth studies at different temperatures). *Comp. Biochem. Physiol.* 138A: 241-251.
- Brodte, E.**, Knust, R., Pörtner, H.-O., 2006. Temperature dependent energy allocation to growth in Antarctic and boreal eelpout (*Zoarcidae*). *Polar Biol.* Doi: 10.1007/s00300-006-0165-y.
- Butler P.J.**, Axelsson M., Ehrenström F., Metcalfe J.D., Nilsson S., 1989. Circulating catecholamines and swimming performance in the Atlantic cod, *Gadus morhua*. *J. Exp. Biol.* 141: 377-387.
- Catches, J. S.**, Burns, J.M., Edwards, S.L., Claiborne, J.B., 2006. Na⁺/H⁺ antiporter, V-H⁺-ATPase and Na⁺/K⁺-ATPase immunolocalization in a marine teleost (*Myoxocephalus octodecemspinosus*). *J. Exp. Biol.* 204, 3251-3259.
- Claiborne, J.B.**, Edwards, S.L., Morrison-Shetlar, A.I., 2002. Acid-base regulation in fishes: Cellular and molecular mechanisms. *J. Exp. Zool.* 293, 302-319.
- Claireaux, G.**, Dutil, J.-D., 1992. Physiological response of the Atlantic cod (*Gadus morhua*) to hypoxia at various environmental salinities. *J. Exp. Biol.* 163: 97-118.
- Clark, D.S.**, Green, J.M., 1991. Seasonal variation in temperature preference of juvenile Atlantic cod (*Gadus morhua*), with evidence supporting an energetic basis for their diel vertical migration. *Can. J. Zool.* 69, 1302-1307.

- Clark, R.A.**, Fox, C.,J., Viner, D., Livermore, M., 2003. North sea cod and climate change – modelling the effects of temperature on population dynamics. *Glob. Change Biol.* 9:1-12.
- Clarke, M.E.**, Calvi, C., Domeirer, M., Edmonds, M., Walsh, P.J., 1992. Effects of nutrition and temperature on metabolic enzyme activities in larvae and juvenile red drum, *Sciaenops ocellatus*, and lane snapper, *Lutjanus synagris*. *Mar. Biol.* 112:31-36.
- Clarke, A.**, Fraser, K.P.P., 2004. Why does metabolism scale with temperature. *Func. Ecol.* 18: 243-251.
- Collins, M.**, Knutti, R., Arblaster, J., Dufresne, J.-L., Fichetef, T., Friedlingstein, P., Gao, X., Gutowski, W.J., Johns, T., Krinner, G., Shongwe, M., Tebaldi, C., Weaver, A.J., Wehner, M., 2013: The Physical Science Basis. Contribution of Working Group I to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel of Climate Change [Stocker, T.F., Qin, D., Plattner, G.-K., Tignor, M., Allen, S.K., Boschung, J., Nauels, A., Xia, Y., Bex, V., Midgley, P.M. (eds.)]. Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom and New York, NY, USA.
- Costas B.**, Aragão C., Ruiz-Jarabao I., Vargas-Chacoff L., Arjona F.J., Mancera J.M., Dinis M.T., Conceição L.E.C., 2012. Different environmental temperatures affect amino acid metabolism in the eurytherm teleost Senegalese sole (*Solea senegalensis* Kaup, 1985) as indicated by changes in plasma metabolites. *Amino acids* 43:327-335.
- Couturier, C.S.**, Stecyk, J., A.W., Rummer, J.L., Munday, P.L., Nilsson, G.E., 2013. Species-specific effects of near-future CO₂ on the respiratory performance of two tropical fish and their predator. *Comp. Biochem. Physiol. A: Mol. Integr. Physiol.* 166: 482-489.
- Cubasch, U.D.**, Wuebbles, D., Chen, M.C., Facchini, D., Frame, N., Mahowald, N., Winther, J.-G. 2013. The Physical Science Basis. Contribution of Working Group I to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel of Climate Change [Stocker, T.F., Qin, D., Plattner, G.-K., Tignor, M., Allen, S.K., Boschung, J., Nauels, A., Xia, Y., Bex, V., Midgley, P.M. (eds.)]. Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom and New York, NY, USA: 119-158.
- Deigweiher K.**, Koschnick N., Pörtner H.-O., Lucassen, M., 2008. Acclimation of ion regulatory capacities in gills of marine fish under environmental hypercapnia. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 295: R1660-R1670.
- Deigweiher K.**, Hirse T., Bock C., Lucassen M., Pörtner H.O., 2010. Hypercapnia induced shifts in gill energy budgets of Antarctic notothenioids. *J. Comp. Physiol. B* 180: 347-359.
- Despotovic, S.G.**, Perendija, B.R., Gavric, J.P., Borkovic-Mitic, S.S., Paunovic, M.M., Pavlovic, S.Z., Saicic, Z.S., 2012. Seasonal changes in oxidative stress biomarkers of the snail *Viviparus acerosus* from the velika Morava river, Serbia. *Arch. Biol. Sci. Belgrade* 64(3): 953-962.

- Devaraj, S.**, Arulprakasam, C., Kandhan, A.P., Neelamegam, K., Kalaiselvan, R., 2014. Toxicological effects of ammonia on gills of *Cyprinus carpio* var. *communis* (Linn.). *J. Coast. Life Med.* 2(2): 94-98.
- Dickson, A.G.**, Millero F.J., 1987. A comparison of the equilibrium constants for the dissociation of carbonic acid in seawater media. *Deep-Sea Res.* 34:1733-1743.
- Dissanayke, A.**, Ishimatsu, A., 2011. Synergistic effects of elevated CO₂ and temperature on the metabolic scope and activity in a shallow-water coastal decapod (*Metapenaeus joyneri*; Crustacea: Penaeidae). *ICES J. Mar. Sci.* 68(6): 1147-1154.
- Domenici, P.**, Allan, B., McCormick, M.I. and Munday, P.L., 2012. Elevated carbon dioxide affects behavioural lateralization in a coral reef fish *Biol. Lett.* 8: 78-81.
- Dos Santos, J.**, Burkow, I.C., Jobling, M., 1993. Patterns of growth and lipid deposition in cod (*Gadus morhua* L.) fed natural prey and fish-based feeds. *Aquacult.* 110: 173-189.
- Driedzic, W.R.**, De Almeida-Val, V.M.F., 1996. Enzymes of Cardiac energy metabolism in Amazonian teleosts and the fresh-water stingray (*Potamotrygon hystrix*). *J. Exp. Zool.* 274:327-333.
- Drinkwater, K.F.**, 2005. The response of Atlantic cod (*Gadus morhua*) to future climate change. *ICES J. Mar. Sci.* 62:1327-1337.
- Dulvy, N.K.**, Rogers, S.I., Jennings, S., Stelzenmüller, V., Dye, S.R., Skjoldal, H.R., 2008. Climate change and deepening of the North Sea fish assemblage: a biotic indicator of warming seas. *J. Appl. Ecol.* 45: 1029-1039.
- Duraton C.**, Tauc M., Avella M., Poujeol P., 1997. Chloride channels in primary cultures of seawater fish (*Dicentrarchus labrax*) gill. *Cell physiology* 273: C874-C882.
- Eggington, S.**, Sidell, B.D., 1989. Thermal acclimation induces adaptive changes in subcellular structure of fish skeletal muscle. *Am. J. Physiol.* 256: R1-R9.
- Eliassen J.E.**, 1982. Seasonal variations in biochemical composition and energy content of liver, gonad and muscle of mature and immature cod, *Gadus morhua* (L.) from Balsfjorden, northern Norway. *J Fish Biol* 20: 707-716.
- Enzor L.A.**, Zippay M.L., Place S.P., 2013. High latitude fish in a high CO₂ world: Synergistic effects of elevated temperature and carbon dioxide on the metabolic rates of Antarctic notothenioids. *Comp. Biochem. Physiol. A* 164:154-161.
- Esbaugh, A.J.**, Heuer, R., Grosell, M., 2012. Impacts of ocean acidification on respiratory gas exchange and acid-base balance in a marine teleost, *Opsanus beta*. *J. Comp. Physiol. B* 182, 921-934.
- Evans, D.H.**, Piermarini, P.M., Potts, W.T.W., 1999. Ionic transport in the fish gill epithelium. *J. Exp. Zool.* 283: 641-652.

- Evans, D.H.**, Piermarini, P.M., Choe, K.P., 2005. The multifunctional fish gill: dominant site of gas exchange, osmoregulation, acid-base regulation and excretion of nitrogenous waste. *Physiol. Rev.* 85, 97-177.
- Fabry, V.J.**, Seibel, B.A., Feely, R.A., Orr, J.C., 2008. Impacts of ocean acidification on marine fauna and ecosystem processes. *ICES J. Mar. Sci.* 65: 414-432.
- Feely, R.A.**, Alin, S.R., Newton, J., Sabine, C.L., Warner, M., Devol, A., Krembs, C., Maloy, C. 2010. The combined effects of ocean acidification, mixing, and respiration on pH and carbonate saturation in an urbanized estuary. *Estuar. Coast Shelf S.* 88:442-449.
- Ferrari, M.C.O.**, Manassa, R. P., Dixon, D.L., Munday, P.L., McCormick, M. I., Meekan, M.G., Sih, A. and Chivers, D.P., 2012a. Effects of ocean acidification on learning in coral reef fishes *PLoS ONE* 7: e31478.
- Ferrari, M.C.O.**, McCormick, M.I., Munday, P.L., Meekan, M.I., Dixon, D.L., Lohnstedt, O. and Chivers, D., 2012b. Effects of ocean acidification and visual risk assessment by coral reef fishes *Funct Ecol* 26, 553-558.
- Farrell, A.P.**, Thorarensen, H. Axelsson, M., Crocker, C.E., Gamperl, A.K., Cech Jr., J., 2001. Gut blood flow in fish during exercise and severe hypercapnia. *Comp. Biochem. Physiol: Mol. Integr. Physiol.:* 128A(3): 549-561.
- Fischer T.**, 2003. The effects of climate induced temperature changes on cod (*Gadus morhua* L.): Linking ecological and physiological investigations. Dissertation Rep. *Pol. Mar. Res:* 454.
- Forsgren, E.**, Dupont, S., Jutfelt, F., Amundsen, T., 2013. Elevated CO₂ affects embryonic development and larval phototaxis in a temperate marine fish. *Ecol. Evol.* 3: 3637-3646.
- Franke, A.**, Clemmesen, C., 2011. Effect of ocean acidification on early life stages of Atlantic herring (*Clupea harengus* L.). *Bio. Geosci.* 8:3697-3707.
- Frommel, A.Y.**, Maneja, R., Lowe, D., Malzahn, A.M., Geffen, A. J., Folkvord, A., Piatkowski, U., Reusch, T.B.H., Clemmesen, C., 2011. Severe tissue damage in Atlantic cod larvae under increasing ocean acidification. *Nature Clim. Chang.* DOI:10.1038/NCLIMATE1324
- Frommel, A.Y.**, Maneja, R., Lowe, D., Malzahn, A.M., Geffen, A.J., Folkvord, A., Piatkowski, U., Reusch, T.B.H. and Clemmesen, C., 2012. Severe tissue damage in Atlantic cod larvae under increasing ocean acidification. *Nat. Clim. Chang.* 2: 42-46.
- Fry, F.E.**, Hart, J.S., 1948. The relation of temperature to oxygen consumption in the goldfish. *Biol. Bull.* 94: 66-77.
- Gillooly, J.F.**, Zenil-Ferguson, R., 2014. Vertebrate blood cell volume increases with temperature: implications for aerobic activity. *PeerJ* 2:e346;DOI 10.7717/peerj.346.
- Goss, G.G.**, Perry, S.F., Fryer, J.N., Laurent, P., 1998. Gill morphology and acid-base regulation in freshwater fishes. *Comp. Biochem. Physiol.* 199A: 107-115.

- Gonzalez-Cabrera, P.J.**, Dowd, F., Pedibhotla, V.K., Rosario, R., Stanley-Samuelson, D., Petzel, D., 1995. Enhanced hypo-osmoregulation induced by warm-acclimation in Antarctic fish is mediated by increased gill and kidney Na⁺/K⁺-ATPase activities. *J. Exp. Biol.* 198, 2279-2291.
- Green, B.S.**, Fisher, R., 2004. Temperature influences swimming speed, growth and larval duration in coral reef fish larvae. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 299: 115-132.
- Guderley, H.**, St.-Pierre, J., 2002. Going with the flow or life in the fast lane: contrasting mitochondrial responses to thermal change. *J. Exp. Biol.* 205: 2237-2249.
- Gypens, N.**, Lacroix, G., Lancelot, C., Borges, A.V. 2011. Seasonal and inter-annual variability of air-sea CO₂ fluxes and seawater carbonate chemistry in the Southern North Sea. *Prog. Oceanogr.* 88: 59-77.
- Hayashi, M.**, Kikkawa, T., Ishimatsu, A., 2013. Morphological changes in branchial mitochondria-rich cells of the teleost *Paralichthys olivaceus* as a potential indicator of CO₂ impacts. *Mar. Poll. Bull.* 73: 409-415.
- Heisler, N.**, 1984. Acid-base regulation in fishes. In: Hoar W.S. and Randall D.J. (Eds.), *Fish Physiology*, vol. 10, Academic, New York, pp. 315-401.
- Heisler, N.**, 1986. Buffering and transmembrane ion transfer processes. In: Heisler, N (Ed.), *Acid-base regulation in animals*, Elsevier, Amsterdam, pp 3-47.
- Heuer, R.M.**, Grosell, M., 2014. Physiological impacts of elevated carbon dioxide and ocean acidification on fish. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* Doi:10.1152/ajpregu.00064.2014.
- Hochaka, P.W.**, Somero, G.N., 1971. Biochemical Adaption to the environment: In Hoar, W.S. and Randall, D.J., eds: *Fish Physiol* 6: 99-156.
- Hurst, T.P.**, Fernandez, E.R., Mathis, J.T., Miller, J.A., Stinson, C.M., Ahgeak, E.F., Resiliency of juvenile walleye pollock to projected levels of ocean acidification. *Aquat. Biol.* 17: 247-259.
- Hutchings, J.A.**, Reynolda, J.D., 2004. Marine fish population collapses: consequences for recovery and extinction risk. *Biosci.* 54(4): 297-309.
- Ishimatsu, A.**, Kikkawa, T., Hayashi, M., Lee, K.-S. and Kita, J., 2004. Effects of CO₂ on Marine Fish: Larvae and Adults. *J. Oceanogr.*: 60: 731-741.
- Ishimatsu, A.**, Hayashi, M., Lee, K.-S., Kikkawa, T., 2005. Physiological effects on fishes in a high-CO₂ world. *J. Geophys. Res.* 110: doi:10.1029/2004JC002564.
- Johannessen, O.M.**, Bengtsson, L., Miles, M.W., Kuzima, S.I., Semeno, V.A., Alekseev, G.V., Nagurnyi, A.P., Zakharov, V.F., Boblev, L.P., Pettersson, L., Hasselmann, K., Cattle, H.P., 2004. Arctic climate change – observed and modelled temperature and sea ice variability. *Tellus* 56A:1-18.

- Jonassen, T.M.**, Imsland, A.K., Stefansson, S.O., 2005. The interaction of temperature and fish size on growth of juvenile halibut. *J. Fish Biol.* 54(3): 556-572.
- Jobling M.**, 1988. A review of the physiological and nutritional energetics of cod, *Gadus morhua* L., with particular reference to growth under farmed conditions. *Aquacult.* 70: 1-19.
- Jutfelt, F.**, Bresolin de Souza, K., Vuylsteke, A., Sturve, J., 2013. Behavioural Disturbance in a temperate fish exposed to sustained high-CO₂-levels. *PLOS one* 8(6): e65825.doi:10.1371/journal.pone.0065825.
- Jutfelt, F.**, Hedgärde, 2013. Atlantic cod actively avoid CO₂ and predator odour, even after long-term CO₂ exposure. *Front. Zool.* 10: 81.
- Kaneko, T.**, Watanabe, S., Lee, K.M., 2008. Functional morphology of mitochondrion-rich cells in euryhaline and stenohaline teleosts. *Aqua-BioSci. Monogr.*1(1): 1-62.
- Koenig, S.**, Solé, M., 2014. Muscular cholinesterase and lactate dehydrogenase activities in deep sea fish from the NW Mediterranean. *Mar. Environ. Res.* 94: 16-23.
- Kornberg, A.**, 1955. Lactic dehydrogenase of muscle: Pyruvate + DPNH \rightarrow Lactate + DPN. *Methods Enzymol* 1: 441-443.
- Kroeker, K.J.**, Kordas, R.L., Crim, R., Hendriks, I. E., Ramajos, L., Singh, G.S., Duarte, C.M., Gattuso, J.-P. 2013. Impacts of ocean acidification on marine organisms: quantifying sensitivities and interaction with warming. *Glob. Change Biol.* 19: 1884-1896.
- Krumschnabel G.**, Wieser W., 1994. Inhibition of the sodium pump does not cause a stoichiometric decrease of ATP-production in energy limited fish hepatocytes. *Experientia* 50: 483-485.
- Langdon, C.**, Atkinson, M.J., 2005. Effect of elevated PCO₂ on photosynthesis and calcification on coral and interactions with seasonal change in temperature/irradiance and nutrient enrichment. *J. Geophys. Res.* 110, C09S07.
- Lannig, G.**, Bock, C., Sartoris, F.J., Pörtner, H.-O., 2004. Oxygen limitation of thermal tolerance in cod, *Gadus morhua* L., studied by magnetic resonance imaging and on-line venous oxygen monitoring. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 287: R902-R910.
- Larsen, B.K.**, Pörtner, H.- O., Jensen, F.B., 1997. Extra- and intracellular acid-base balance and ionic regulation in cod (*Gadus morhua*) during combined and isolated exposures to hypercapnia and copper *Mar Biol* 128: 337-346.
- Li, P.**, Mai, K., Trushenski, J., Wu, G., 2008. New developments in fish amino acid nutrition: towards functional and environmentally oriented aquafeeds. *Amino Acids*: DOI.1007/s00726-008-0171-1.
- Lin, H.**, Pfeiffer, D.C., Vogl, A.W., Pan, J., Randall, D.J., 1994. Immunolocalization of the H⁺-ATPase in the gill epithelium of rainbow trout. *J. Exp. Biol.* 195: 169-183.

- Lin, J.J.** and Somero, G.N., 1995. Temperature-dependent changes in expression of thermostable and thermolabile isozymes of cytosolic malate dehydrogenase in the eurythermal goby fish *Gillichthys mirabilis*. *Physiol. Zool.* 68:114-128.
- Lebedeva N.Y.**, Vosilene M.Z.Y., Golovkina T.V., 1994. Aspects of stress in rainbow trout, *Salmo gairdneri*, release of chemical alarm signals. *J. Ichthyol.* 33:66-74.
- Lee, C.E.**, Kiergaard, M., Gelembiuk, G.W., Eads, B.D., Posavi, M., 2011. Pumping ions: rapid parallel evolution of ionic regulation following habitat invasions. *Evolution* 65(8): 2229-2244.
- Lemarié G.**, Dutto G., Le Roux A., Lemoalle J., Maxime V., Person-Le Ruyet J., 2000. Long term effects of pH and carbon dioxide on growth and feed efficiency in European seabass. In: responsible aquaculture in the new millennium, Conference AQUA 2000, Nice, France, May 2-6 2000. European Aquaculture Society Special Publication 28, p484 (Abstract).
- Leiniö, S.**, Lethonen, K.K., 2005. Seasonal variability in biomarkers in the bivalves *Mytilus edulis* and *Macoma balthica* from the northern Baltic Sea. *Comp. Biochem. C. Toxicol. Pharmacol.* 140(3-4): 408-421.
- Lewis E.**, Wallace D., 1998. Program developed for CO₂ system calculations. In ORNL/CDIAC-105a. Oak Ridge, Tennessee: Carbon Dioxide Information Analysis Center, Oak Ridge National Laboratory, U.S. Department of Energy.
- Lucassen, M.**, Koschnick, N., Eckerle, L.G., Pörtner, H.O., 2006. Mitochondrial mechanisms of cold adaptation in cod (*Gadus morhua* L.) populations from different climatic zones. *J. Exp. Biol.* 209: 2462-2471.
- Mark F.C.**, Hirse T., Pörtner H.O., 2005. Thermal sensitivity of cellular energy budgets in some Antarctic fish hepatocytes. *Polar Biol.* 28:805-814.
- Matey, V.**, Richards, J.G., Wang, Y., Wood, C.M., Rogers, J., Davies, R., Murray, B.W., Chen, X.-Q., Du, J., Brauner, C.J., 2008. The effect of hypoxia on gill morphology and ionregulatory status in the Lake Qinghai scaleless carp, *Gymnocypris przewalskii*. *J. Exp. Biol.* 211:1063-1704.
- McClelland, G.B.**, Dalziel, A.C., Fragoso, N.M., Moyes, C.D., 2005. Muscle remodelling in relation to blood supply: implications for seasonal changes in mitochondrial enzymes. *J. Exp. Biol.* 208:515-522.
- McBryan, T.L.**, Anttila, K., Healy, T.M., Schulte, P.M., 2013. Response to temperature and hypoxia as interacting stressors in fish: implications for adaptation to environmental change. *Integr. Comp. Biol.* 53(4): 648-659.
- McKenzie, D.J.**, Piccolella, M., Dalla Valle, A.Z., Taylor, E.W., Bolis, C.L., Steffensen, J.F., 2003. Tolerance of chronic hypercapnia by the European eel *Anguilla anguilla*. *J. Exp. Biol.* 206, 1717-1726.

- McKenzie, R.A.**, 1934. Cod and water temperature. Biol. Board Can., Atlantic Prog. Rep. 12:3-6.
- McKenzie, R.A.**, 1938. Cod take smaller bites in ice-cold water. Fish. Res. Board Can., Atlantic Prog. Rep. 22: 12-14.
- Mehrbach C.**, Culberson C.H., Hawley J.E., Pytkowicz R.M., 1973. Measurement of the apparent dissociation constants of carbonic acid in seawater at atmospheric pressure. Limnol. Oceanogr. 18:897-907.
- Meinshausen, M.**, Smith, S.J., Calvin, K., Daniel, J.S., Kainuma, L.T., Lamarque, J.-F., Matsumoto, K., Montzka, S.A., Raper, S.C.B., Riahi, K., Thomson, A., Velders, G.J.M., van Vuuren, D.P.P., 2011. The RCP greenhouse gas concentrations and their extensions from 1765 to 2300. Clim. Chang. 109: 213-241.
- Melzner, F.**, Gutowska, M.A., Langenbuch, M., Dupont, S., Lucassen, M., Thorndyke, M.C., Bleich, M., Pörtner, H.-O., 2009a. Physiological basis for high CO₂ tolerance in marine ectothermic animals: pre-adaptation through lifestyle and ontogeny? Biogeosci. 6: 2313-2331.
- Melzner, F.**, Göbel, S., Langenbuch, M., Gutowska, M.A., Pörtner, H.O., Lucassen, M., 2009b. Swimming performance in Atlantic cod (*Gadus morhua*) following long-term (4-12 months) acclimation to elevated seawater PCO₂. Aquat. Toxicol. 92:30-37.
- Michaelides, B.**, Spring, A. and Pörtner, H.-O., 2007. Effects of long term acclimation to environmental hypercapnia on extracellular acid-base status and metabolic capacity in Mediterranean fish *Sparus aurata*. Mar. Biol. 150: 1417-1429.
- Miller, G.M.**, Watson, S.A., Denelson, J.M., McCormick, M.I., Munday, P.L., 2012. Parental environment mediates impacts of increased carbon dioxide on a coral reef fish. Nature Clim. Change 2: 858-861.
- Miller, G.M.**, Watson, S.A., McCormick, M.I., Munday, P.L., 2013. Increased CO₂ stimulates reproduction in a coral reef fish. Glob. Chang. Biol. 19: 3037-3045.
- Miller, T.J.**, Herra, T., Leggett, W.C. 1995. An individual-based analysis of the variability of eggs and subsequent newly-hatched larvae of Atlantic cod (*Gadus morhua*) on the Scotian Shelf. Can. J. Fish. Aquat. Sci. 52: 1083-1093.
- Moran D.**, Støttrup J.G., 2011. The effect of carbon dioxide on growth of juvenile Atlantic cod *Gadus morhua* L. Aq. Tox. 102: 24-30.
- Moreira, S.M.**, Moreira-Santos, Rendon-von Osten, J., da Silva, E.M., Ribeiro, R., Guilhermino, L., Soares, A., 2010. Ecotoxicological tools for the tropics: sublethal assays with fish to evaluate edge-of-field pesticide runoff toxicity. Ecotoxicol. Environ. Saf. 73: 893-899.
- Morgan J.D.**, Iwama G.K., 1999. Energy cost of NaCl transport in isolated gills of cutthroat trout. Am. J Physiol Regul Integr Comp Physiol 277:R631-R639.

- Morrison J.F.**, S.R. Guynn, M.A. Scofield, F.J. Dowd, D.H. Petzel, 2006. Warm acclimation changes the expression of the Na⁺, K⁺-ATPase α subunit isoforms in Antarctic fish gills. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 333: 129-139.
- Moyes, C.D.**, Mathieu-Costello, O.A., Tsuchiya, N., Filburn, C., Hansford, R.G., 1997. Mitochondrial biogenesis during cellular differentiation. *Am. J. Physiol.* 272:C1345-C1351.
- Munday, P.L.**, Crawley, N.E., Nilsson, G.E. 2009a. Interacting effects of elevated temperature and ocean acidification on the aerobic performance of coral reef fishes. *Mar. Ecol. Progr. Ser.* 388: 235-242.
- Munday, P.L.**, Donelson, J. M., Dixson, D.L., Endo, G.G.K., 2009b. Effects of ocean acidification on the early life history of a tropical marine fish. *Proc. R. Soc. B.* 22: 276 (1671): 3275-3283.
- Munday, P.L.**, Dixson, D.L., Donelson, J.M., Jones, G.P., Pratchett, M.S., Devitsina, G.V., Døving, K.B., 2009c. Ocean acidification impairs olfactory discrimination and homing ability of a marine fish. *PNAS* 106(6): 1848-1852.
- Munday, P.L.**, Gagliano, M., Donelson, J.M., Dixson, D.L., Thorrold, S.R., 2011. Ocean acidification does not affect the early life history development of a tropical marine fish. *Mar. Ecol. Progr. Ser.* 423:211-221.
- Munday, P.L.**, McCormick, M.I., Nilsson, G.E., 2012. Impact of global warming and rising CO₂ levels on coral reef fishes: What hope for the future? *J. Exp. Biol.* 215: 3865-3873.
- Nielsen, E.E.**, Hansen, M.M., Ruzzante, D.E., Meldrup, D., GrønkJaer, P., 2003. Evidence of a hybrid-zone in Atlantic cod (*Gadus morhua*) in the Baltic and the Danish Belt Sea revealed by individual admixture analysis. *Mol. Ecol.* 12: 1497-1508.
- Nikinmaa, M.**, Soivio, A., Railo, E., 1981. Blood volume of *Salmo gairdneri*: Influence of ambient temperature. *Comp. Biochem. Physiol.* Vol. 69A: 767-769.
- Nilsson, G.E.**, 2007. Gill remodelling in fish- a new fashion or an ancient secret? *J. Exp. Biol.* 210: 2403-2409.
- Nilsson, G.E.**, Crawley, N.E., Lunde, I.G., Munday, P.L. 2009. Elevated temperature reduces the respiratory scope of coral reef fishes. *Glob. Change Biol.* 15: 1405-1412.
- Nilsson, G.E.**, Dixson, D.L., Domenici, P., McCormick, M.I., Sorensen, C., Watson, S.A., Munday, P.L., 2012. Near-future carbon dioxide levels alter fish behaviour by interfering with neurotransmitter function. *Nature Clim. Change* 2: 201-204.
- Neill, W.H.**, J.M. Miller, H.W. van der Veer, and K. O. Winemiller, 1994. Ecophysiology of marine fish recruitment: a conceptual framework for understanding interannual variability. *Neth. J. Sea Res.* 32(2):135-152.
- Nowicki J.P.**, Miller G.M., Munday P.L., 2012. Interactive effects of elevated temperature and CO₂ on foraging behaviour of juvenile coral reef fish. *J. Exp. Biol.* 412: 46-51.

- Orr, J.C.**, Fabry, V.J., Aumont, O., Bopp, L., Doney, S.C., Feely, R.A., Gnanadesikan, A., Gruber, N., Ishida, A., Joos, F., Key, R.M., Lindsay, K., Maier-Reimer, E., Matear, R., Monfray, P., Mouchet, A., Raymond, G.N., Plattner, G.-K., Rodgers, K.B., Sabine, C.L., Sarmiento, J.L., Schlitzer, R., Slater, R.D., Totterdell, I.J., Weirig, M.-F., Yamanaka, Y., Yool, A. 2005. Anthropogenic ocean acidification over the twenty-first century and its impact on calcifying organisms. Doi:10.1038/nature04095.
- Packer R.K.**, Garvin J.L., 1998. Seasonal differences in activity of perch (*Perca flavescens*) gill Na⁺/K⁺-ATPase. Comp. Biochem. Physiol. 120B: 777-783.
- Page, F.H.**, Frank, K.T., 1989: Spawning time and egg duration in Northwest Atlantic haddock (*Melanogrammus aeglefinus*) stocks with emphasis on Georges and Browns Brank. Can. J. Fish. Aquat. Sci. 46: 68-81.
- Pankhurst, N.W.**, King, H.R., 2010. Temperature and reproduction: Implications for aquaculture. J. Fish Biol. 76(1):69-85.
- Parks S.K.**, Tresguerres M., Goss G.G., 2007. Interactions between Na⁺ channels and Na⁺-HCO₃⁻-cotransporters in the freshwater fish gill MR cell: a model for transepithelial Na⁺ uptake. Am. J. Physiol. Cell Physiol. 292: 935-944.
- Pelletier, D.**, Guderley, H., Dutil, J.-D., 1993. Does aerobic capacity of fish muscle change with growth rates. Fish Physiol. Biochem. 12: 83-93.
- Pelletier, D.**, Dutil, J.-D., Blier, P., Guderley, H., 1994. Relation between growth rate and metabolic organization of white muscle, liver and digestive tract in cod, *Gadus morhua*. J Comp. Physiol. B. 164: 179-190.
- Perry, A.L.**, Low, P.L., Ellis, J.R., Reynolds, J.D., 2005. Climate change and distribution shifts in marine fishes. Science 308: 1912-1915.
- Perry, S.F.**, Gilmour, K.M., 2006. Acid-base balance and CO₂ excretion in fish: unanswered questions and emerging models. Respir. Physiol. Neurobiol. 154: 199-215.
- Petterson, K.**, Nilsson, S., 1980. Drug induced Changes in Cardio-Vascular Parameters in the Atlantic Cod, *Gadus morhua*. J. Comp. Physiol. 137, 131-138.
- Piermarini, P.M.**, Verlander, J.W., Royaux, I.E., Evans, D.H., 2002. Pendrin immunoreactivity in the gill epithelium of a euryhaline elasmobranch. Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol. 283: R983-R992.
- Planque, B.**, Fredou, T., 1999. Temperature and the recruitment of Atlantic cod (*Gadus morhua*). Can. J. Fish. Aquat. Sci. 56:2069-2077.
- Platzack, B.**, Axelsson, M., Nilsson, S., 1993. The Renin-Angiotensin system in blood pressure control during exercise in the cod *Gadus morhua*. J. Exp. Biol. 180, 253-262.
- Pope, E.C.**, Ellis, R.P., Scolamacchia, M., Scolding, J.W.S., Keay, A., Chingombe, P., Shields, R.J., Wilcox, R., Speirs, D.C., Wilson, R.W., Lewis, C., Flynn, K.J., 2013.

- European sea bass, *Dicentrarchus labrax*, in a changing ocean. *Biogeosci.* 11: 2519-2530.
- Pörtner, H.-O.**, Berdal, B., Blust, R., Brix, O., Colosimo, 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., Zakhartsev, 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.**, Bock, C., Reipschläger, A., 2000. Modulation of the cost of pH_i regulation during metabolic depression: a ³¹P-NMR study in invertebrate (*Sipunculus nudus*) isolated muscle. *J. Exp. Biol.* 203: 2417-2428.
- Pörtner, H.-O.**, 2008. Ecosystem effects of ocean acidification in times of ocean warming: a physiologist's view. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 373:203-217.
- Pörtner, H.-O.** and A. P. Farrell, 2008. Physiology and climate change *Science* 322: 690-692.
- Pörtner, H.-O.**, 2010. Oxygen- and capacity-limitation of thermal tolerance: a matrix for integrating climate-related stressor effects in marine ecosystems. *J. Exp. Biol.* 213: 881-893.
- Pörtner, H.-O.**, Bickmeyer, U., Bleich, M., Bock, C., Brownlee, C., Melzner, F., Michaelidis, B., Sartoris, F.-J., Storch, D., 2010. Studies of acid-base status and regulation. In: Riesebell, U., Fabry, V.J., Hansson, L., Gattuso, J.-P. (Eds.), *Guide to best practices for ocean acidification research and data reporting*, Publications office of the European Union, Luxembourg, pp. 137-166.
- Pörtner, H.-O.**, Peck, M., 2010. Climate change effects on fishes and fisheries: towards a cause-and-effect understanding. *J. Fish. Biol.* 77:1745-1779.
- Pörtner, H.-O.**, Gutowska, M., Ishimatsu, I., Lucassen, L., Melzner, F., Seibel, B., 2011. Effects of ocean acidification on nektonic organisms. In: *Ocean acidification*, Gattuso, J.-P., Hansson, L. (Eds.), Oxford University Press, NY, USA, pp. 154-169.
- Pörtner, H.-O.**, 2012. Integrating climate-related stressor effects on marine organisms: unifying principles linking molecule to ecosystem-level changes. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 470: 273-290.
- Pörtner, H.O.**, Karl, D.M., Boyd, P.W., Cheung, W.L., Lluch-Cota, S.E., Nojiri, Y., Schmidt, D.N., Zavialov, P.O., 2014. Ocean systems. In: *Climate Change 2014: Impacts, Adaptation, and Vulnerability. Part A: Global and Sectoral Aspects. Contribution of Working Group II to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change* [Field, C.B., Barros, V.R., Dokken, D.J., Mach, K.J., Mastrandrea, M.D., Bilir, T.E., Chatterjee, M., Ebi, K.L., Estrada, Y.O., Genova, R.C., Girma, B., Kissel, E.S.,

- Levy, A.N., MacCracken, S., Mastrandrea, P.R., White, L.L. (eds)]. Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom and New York, NY, USA.
- Pratap, H.B.**, Wendelaar Bonga, S.E., 1993. Calcium homeostasis in low and high calcium water acclimatized *Oreochromis mossambicus* exposed to ambient and dietary cadmium. J. Environ. Biol. 28:385-393.
- Ramnanan, C.J.**, Storey, K.B., 2006. Suppression of Na⁺/K⁺-ATPase activity during estivation in the land snail *Otala lactea*. J. Exp. Biol. 209: 677-688.
- Righton, D.A.**, Andersen, K.H., Neat, F., Thorsteinsson, V., Steingrund, P., Svedäng, H., Michalsen, K., Hinrichsen, H.-H., Bendall, V., Neuenfeldt, S., Wright, P., Jonsson, P., Huse, G., van der Kooij, J., Mosegaard, H., Hüsey, K., Metcalfe, J., 2010. Thermal niche of Atlantic cod *Gadus morhua*: limits, tolerance and optima. Mar. Ecol. Prog. Ser. 420: 1-13.
- Rogers, L.A.**, Stige, L.C., Olsen, E.M., Knutsen, H., Chan, K.-S., Stensetz, N.C., 2011. Climate and population density drive changes in cod body size throughout a century on the Norwegian coast. PNAS 108(5): 1961-1966.
- Rosa, R.**, Seibel, B., 2008. Synergistic effects of climate-related variables suggest future physiological impairment in a top predator. PNAS 105(52): 20776-20780.
- Rose, G.A.**, 2005. On distributional responses of North Atlantic fish to climate change. ICES J. Mar. Sci. 62: 1360-1374.
- Rummer, J.L.**, Brauner, C.J., 2011. Plasma-accessible carbonic anhydrase at the tissue of a teleost fish may greatly enhance oxygen delivery: *in vitro* evidence in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. J. Exp. Biol. 214: 2319-2328.
- Rummer, J.L.**, McKenzie, D.J., Innocenti, A., Supuran, C.T., Brauner, C.J., 2013. Root effect hemoglobin may have evolved to enhance general tissue oxygen delivery. Science 340: 1327-1329.
- Sanchez-Muros, M.J.**, Rejon, G., Salguero, G., de la Higuera, M., Lupianez, J.A., 1998. Long-term nutritional effects on the primary liver and kidney metabolism in rainbow trout. Adaptive response to nutritional effects on the primary liver and kidney metabolism in rainbow trout. Adaptive response to starvation and a high-protein, carbohydrate-free diets on glutamate dehydrogenase and alanine amino transferase kinetics. Biochem. Cell Biol. 30:55-63.
- Sarazin G.**, Michard G., Prevot F., 1999. A rapid and accurate spectroscopic method for alkalinity measurements in sea water samples. Water Res. 33:290-294.
- Schurmann H.**, Steffensen J.F., 1997. Effects of temperature, hypoxia and activity on the metabolism of juvenile Atlantic cod. J Fish Biol 50(6):1166-1180.

- Scott, G.R.**, Rogers, J.T., Richards, J.G., Wood, C.M., Schulte, P.M., 2004. Intraspecific divergence of ionoregulatory physiology in the euryhaline teleost *Fundulus heteroclitus*: possible mechanisms of freshwater adaptation. *J. Exp. Biol.* 207: 3399-3410.
- Sidell, B.D.**, Driedzic, W.R., Stowe, D.B., Johnston, I.A., 1987. Biochemical correlations of power development and metabolic fuel preferenda in fish hearts. *Physiol. Zool.* 60(2):221-232.
- Simpson, S.D.**, Munday, P.L., Wittenrich, M.L., Manassa, R., Dixson, D.L., Gagliano, M., Yan, H.Y., 2011. Ocean acidification erodes crucial auditory behaviour in a marine fish. *Biol. Lett.* 7: 917-920.
- Seidelin, M.**, Brauner, C.J., Jensen, F.B., Madsen, S.S., 2001. Vacuolar-type H⁺-ATPase and Na⁺, K⁺-ATPase expression in gills of Atlantic salmon (*Salmo salar*) during isolated and combined exposure to hyperoxia and hypercapnia in fresh water. *Zool. Sci.* 18:1199-1205.
- Smatresk, N.J.**, Cameron, J.N. (1981). Respiration and acid-base balance of the spotted gar, a bimodal breather. III. Control of ventilation and response to a transfer from fresh water to 50% sea water. *J. Exp. Biol.* 96: 263-280.
- Soivio, A.**, Oikari, A., 1976. Haematological effects of experimental stress on a teleost, *Esox lucius* L. *J. Fish Biol.* 8:397-411.
- Sokolova, I.M.**, Frederich, M., Bagwe, R., Lannig, G., Sukhotin, A.A., 2012. Energy homeostasis as an integrative tool for assessing limits of environmental stress tolerance in aquatic invertebrates.
- Sollid, J.**, Weber, R.E., Nilsson, G.E., 2005. Temperature alters the respiratory surface area of crucian carp *Carassius carassius* and goldfish *Carassius auratus*. *J. Exp. Biol.* 208: 1109-1116.
- Somero, G.N.**, Hochaka, P.W., 1969. Isozymes and short-term temperature compensation in poikilotherms: activation of lactate dehydrogenase isoenzymes by temperature decreases. *Nature* 223: 194-195.
- Tabaoda, F.G.**, Anadón, R. 2012. Patterns of change in sea surface temperature in the North Atlantic during the last three decades: beyond mean trends. *Clim. Chang.* DOI 10.1007/s10584-012-0485-6.
- Takahashi, T.**, 1993. Seasonal variation of CO₂ and nutrients in the high-latitude surface oceans: a comparative study. *Glob. Biogeochem. Cyc.* 7 (4): 843-878.
- Toews, D.P.**, Holeyton, G.F., Heisler, N., 1983. Regulation of the acid-base status during environmental hypercapnia in the marine teleost fish *Conger conger*. *J. Exp. Biol.* 107: 9-20.

- Tseng, Y-C.**, Hu, M.Y.; Stumpp, M., Lin, L.-Y., Melzner, F., Hwang, P.-P., 2013. CO₂-driven seawater acidification differentially affects development and molecular plasticity along life history of fish (*Oryzias latipes*).
- Vanlandeghem, M.M.**, 2010. Physiological responses of largemouth bass to acute temperature and oxygen stressors. *Fish. Manage. Ecol.* 17:414-425.
- Vieira, L.R.**, Sousa, A., Frasco, M.F., Lima, I., Morgado, F., Guilhermino, L., 2008. Acute effects of benzo[a]pyrene, anthracene and a fuel oil biomarkers of the common goby *Pomatoschistus microps* (Teleostei, Gobiidae). *Sci, Total Environ.* 395:87-100.
- Wahlquist, I.** and Nilsson, S., 1977. The role of sympathetic fibers and circulating catecholamines in controlling the blood pressure and heart rate in the cod *Gadus morhua*. *Comp. Biochem. Physiol.* 57C, 65-67.
- Walther, K.**, Anger, K., Pörtner, H.-O., 2010. Effects of ocean acidification and warming on the larval development of the spider crab *Hyas araneus* from different latitudes (54° vs. 79°N). *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 417: 159-170.
- Weiss, M.**, Heilmayer, O., Brey, T., Lucassen, M. and Pörtner, H.-O., 2012. Physiological capacity of *Cancer setosus* larvae- adaptation to El Nino Southern Oscillation conditions. *J. Exp. Biol.* 413, 100-105.
- Wendelaar Bonga, S.E.**, 1997. The stress response. *Physiol. Rev.* 77(3):591-625.
- Windisch, H.S.**, Kathöver, R., Pörtner, H.O., Frickenhaus, S., Lucassen, M., 2011. Thermal acclimation in Antarctic fish: transcriptomic profiling of metabolic pathways. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 301: R1453-R1466.
- Windisch, H.S.**, Frickenhaus, S., John, U., Knust, R., Pörtner, H.-O., Lucassen, M., 2014. Stress response or beneficial temperature acclimation: transcriptomic signatures in Antarctic fish (*Pachycara brachycephalum*). *Mol. Ecol.* Doi:10.1111/mec.12822.
- Wittmann, A.C.**, Pörtner, H.-O. 2013. Sensitivities of animal taxa to ocean acidification. *Nature Clim. Change*, DOI:10.1038/NCLIMATE1982.
- Yang, T.-H.**, Somero, G.N., 1993. Effects of feeding and food deprivation on oxygen consumption, muscle protein concentration and activities of energy metabolism enzymes in muscle and brain of shallow-living (*Scorpaena guttata*) and deep-living (*Sebastobolus alascanus*) scorpaenid fishes. *J. Exo. Biol.* 181: 213-232.
- Zadunaisky, J.A.**, Cardona, S., Au, L., Roberts, D.M., Fisher, E., Lowenstein, B., Cragoe, E.J., Spring, K.R., 1995. Chloride transport activation by plasma osmolarity during rapid adaptation to high salinity of *Fundulus heteroclitus*. *J. Membr. Biol.* 143: 207-217.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei all denen bedanken, die mir diese Arbeit ermöglicht und mich während dieser Zeit begleitet haben:

An erster Stelle meinem Doktorvater **Prof. Dr. Hans-Otto Pörtner**, für das ermöglichen der Promotion in seiner Arbeitsgruppe. Vielen Dank für die gute wissenschaftliche Betreuung und stete Diskussionsbereitschaft, sowie für wertvolle Unterstützung bei den Alternativplänen und die Möglichkeiten, die mir dabei eröffnet wurden.

PD. Dr. Holger Auel möchte ich für die Begutachtung dieser Arbeit danken, sowie **Prof. Dr. Wilhelm Hagen** für die Bereitschaft mein Promotionskolloquium zu ergänzen. Ein großes Dankeschön an **Dr. Magnus Lucassen** für die stete Unterstützung während dieser Zeit, die gute wissenschaftliche Betreuung sowie für die umfassende Einweisung in die Methoden der Enzymanalytik.

Dr. Christian Bock möchte ich für sein Interesse und die Hilfestellungen bei meinen Kiemenexperimenten danken. **Timo** für die immerwährende Unterstützung bei Kiemenrespirations-Sorgen und, genauso wie Nils, bei jeglichen technischen Fragen. Außerdem ein großes Danke an **Nils** für die Hilfe beim Fische präparieren und dem bewältigen der Enzyme an sich. **Imke** und **Caroline**, vielen Dank für die Unterstützung bei der Ionenchromatographie und Extrakterstellung, als auch **Karim** für die Hilfe bei den Enzymmessungen. **Silvia** und **Guido** alias „Happy Fish Tours“ danke ich für die beste Unterstützung bei Fischtransport und -haltung, der Inkubationsanlagenplanung, sowie für euren Einsatz im Säure-Schutzanzug und im Kampf gegen die verrückte Wasserchemie. **Anette**, für technische Unterstützung im Labor und einfach für die kleinen netten Momente zwischendurch. Der gesamten **Crew der Uthörn**, sowie unseren Helfern, für den Helgoländer Kabeljau und einer schönen Zeit rings um die Tiefe Rinne. Ein großes Dankeschön an das gesamte Team vom Sven Lovén Institut in Kristineberg, für die nette Aufnahme und das ermöglichen unserer riesigen Fisch-Inkubation. Dabei ganz besonders an **Sam Dupont** für die gute Organisation, **Bengt Lundve** für zuverlässige Unterstützung bei jeglichen Logistikfragen, der Fisch- und Garnelenbeschaffung und **Lars Ljungqvist** für die technische Hilfe; sowie dem Kakaoautomaten für mindestens 300 kleine Pausen.

Danke an alle Kollegen der IEP für die gute Zusammenarbeit und die gemeinsame Zeit, sowie ganz besonders: **Dr. Kadda**, für die tolle Zusammenarbeit in unserem Projekt, das beste Troubleshooting zwischen Bremerhaven und Schweden, auf See, im Kühlraum genauso wie im Labor, als auch abseits davon bei vielen heißen und kalten Getränken und im stetigen Kampf gegen den inneren S(port)chweinehund. **Laura** für deine Unterstützung bei „Biocopper“, die unzähligen Physiologie-Diskussionen und solche ohne Physiologie,

sowie dafür, immer einen guten Grund zu haben, dem Büro zwei Zimmer weiter einen Besuch abzustatten. Genauso wie **Mela**, und für viele geteilte Stunden im Inkubationslabor, den experimentellen Methodenexperimenten und, nicht zuletzt, für den Jahrhundertfang auf Helgoland! Danke an **Lars** für die besten Fakten der Mittagspausen und der gesamten Koch- und Eisgruppe für viele schöne Unterbrechungen und das Ertragen jeglicher Essbehinderungen und sonstiger Umstände. Außerdem **Mela** und **Lars** für das Aufrechterhalten der Clark'schen Weihnachtstraditionen in Bremerhaven. Meinem Büro und ganz besonders **Lena**, **Burgel** und **Axinja** vielen Dank für eure Unterstützung in allen Lebenslagen auch abseits der Meeresbiologie. Außerdem **Lena** für deine Geduld und Hilfe bei all den Ioni-Fragen sowie für (Yogitee)-Weisheiten in allen anderen Bereichen. **Anna** für viele Küchentisch-Gespräche und einfach einer schönen Zeit in der Bremer Neustadt.

Meinen **Schildgener Mädels** dafür, dass ihr immer da seid. Nicht zuletzt **meinen Eltern**, euch möchte ich ein riesiges Dankeschön für die immerwährende Unterstützung und den Rückhalt aussprechen, den ihr mir entgegen bringt. Danke an **Phil**, für die Unterstützung und das Verständnis, all die Schwedenpost und dafür, dass Du immer da bist.

Cornelia Kreiss
Lortzingstr. 18
51467 Bergisch Gladbach

Bremen, den 16.03.2015

**Erklärung gemäß § 6(5) der PromO der Universität Bremen für die mathematischen,
natur- und ingenieurwissenschaftlichen Fachbereiche**

(vom 14. März 2007)

Hiermit erkläre ich, Cornelia Kreiss, dass ich die Arbeit mit dem Titel

**Einfluss der Klimafaktoren CO₂ und Temperatur auf die Physiologie von
Gesamtorganismus sowie isolierten Geweben des Atlantischen Kabeljaus
(*Gadus morhua*)**

1. Ohne unerlaubte fremde Hilfe angefertigt habe.
2. Keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.
3. Die in den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Cornelia Kreiss