



# Regnbueørreden

## – ekspert i

### Forfattere



Thea Christensen, b.sc.-studerende, Institut for Biokemi og Molekylærbiologi. thech11@student.sdu.dk



Jeanette Højrup Søholm, b. sc.-studerende. Biologisk institut.



Sebastian Theodor Hansen, b.sc.-studerende, Biologisk institut.



Steffen S. Madsen, Lektor, lic. scient. Biologisk institut. steffen@biology.sdu.dk

Alle ved Syddansk Universitet, Odense.

Regnbueørreden kan som en af de relativt få fiskearter i verden leve i både fersk- og saltvand. De fysiologiske mekanismer bag denne tilpasningsevne er et interessant forskningsemne..

Regnbueørreden (*Oncorhynchus mykiss*) er blandt den cirka ene procent af alle fiskearter i verden, der kan tilpasse sig stærkt varierende saltkoncentrationer. Dette er en fordel for ørreden, da den kan udnytte alternative fødeområder, hvis konkurrencen bliver for hård i det ferskvandsvandløb, den er udklækket i.

Regnbueørredens tilpasningsmuligheder benyttes også i kommercielt opdræt, idet fiskene vokser hurtigere og smager bedre, hvis de tilbringer de første 1-2 leveår i ferskvand og herefter flyttes til saltvand i ca. et halvt år inden slagtning. Tilpasningen til de nye omgivelser er dog meget energikrævende og stiller store krav til ørredens kropsfunktioner. For at fysiologiske processer i fisken kan forløbe uforstyrret, må den opretholde en stabil vand- og saltbalance, uanset saltkoncentrationen i det omgivende vand. Derfor må regnbueørreden aktivt optage salt i ferskvand, mens den må udskille salt, når den lever i havet. Omstil-

lingen mellem de to fysiologiske tilstande er en kritisk proces, og regnbueørreden må investere stofskifteenergi for at opretholde den indre balance og sikre overlevelse. Denne fascinerende omstillingsproces ligger langt ud over, hvilke muligheder mennesker har for miljøtilpasning.

Vores nysgerrighed på ørredens rejse fra bækken til havet motiverede os til at tage emnet op i vores 1. års projekt, som led i vores naturvidenskabelige uddannelse på Syddansk Universitet.

### Fokus på $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -pumpen

I det eksperimentelle arbejde overførte vi regnbueørreder fra ferskvand til saltvand for at undersøge hvilke forandringer, der ligger til grund for fiskenes unikke omstillingsmuligheder. Efter overflytningen, kommer fisken midlertidigt ud af balance. Både saltkoncentration i blodet og vandindholdet i kroppen undergår en drastisk forandring, der

Nogle fisk kan tilpasse sig ekstremt forskellige miljøforhold. Regnbueørreden kan gennem sit liv vandre mellem ferskvand og saltvand og sætter derved sine fysiologiske mekanismer under pres. Fiskens overlevelse afhænger af dens evne til at gennemgå en omstilling, der indebærer en udskiftning af salttransporterende proteiner i gællen.

# miljøtilpasning

kulminerer efter ca. 24 timer. Ændringerne overstiger langt hvad noget pattedyr ville kunne overleve, men hos ørreden sætter forstyrrelsen gang i et tilpasningsforløb, som bringer salt- og vandbalancen i orden igen efter ca. syv dage. Omstillingsforløbet inkluderer mange fysiologiske, cellulære og molekylære forandringer i fisken. Vi har fokuseret på at undersøge de molekylære forandringer der medfører tilpasning. Her viste det sig, at en ændring i et bestemt protein påvirker hele organismen, idet dets regulering er medvirkende til, at fisken kan tilpasse sig vidt forskellige miljøforhold.

Nøglen til regnbueørredens tilpasningsevne skal findes i funktionen af specielle proteiner, der er til stede i gællen. Transporten af salt varetages af et samarbejde mellem flere membranproteiner i forskellige kombinationer og finder sted i gællens yderste, tynde cellelag. En præcis regulering af disse proteiner gør det muligt for ørreden at leve i de meget skiftende saltholdigheder, den udsættes for gennem sit liv. Et af de vigtigste proteiner i salttransporten er  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -pumpen.  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -pumpen består

af flere forskellige proteinkomponenter kaldet subunits (side 37). Disse subunits fabrikteres og samles til funktionelle pumper i specielle celler kaldet chloridceller, der varetager salttransporten over gællen.

Hver subunit i  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -pumpen findes i flere forskellige udgaver kaldet isoformer. Vores opmærksomhed blev fanget af isoformerne af en bestemt subunit i  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -pumpen kaldet alfa ( $\alpha$ ). Mængden af de to specifikke isoformer,  $\alpha_{1a}$  og  $\alpha_{1b}$ , ændres markant under saltvandstilpasning, og netop derfor valgte vi at undersøge dem nærmere. Vi satte os for at finde ud af, hvilken rolle de spiller i salttransport i både saltvand og ferskvand.

## Lille ændring med stor betydning

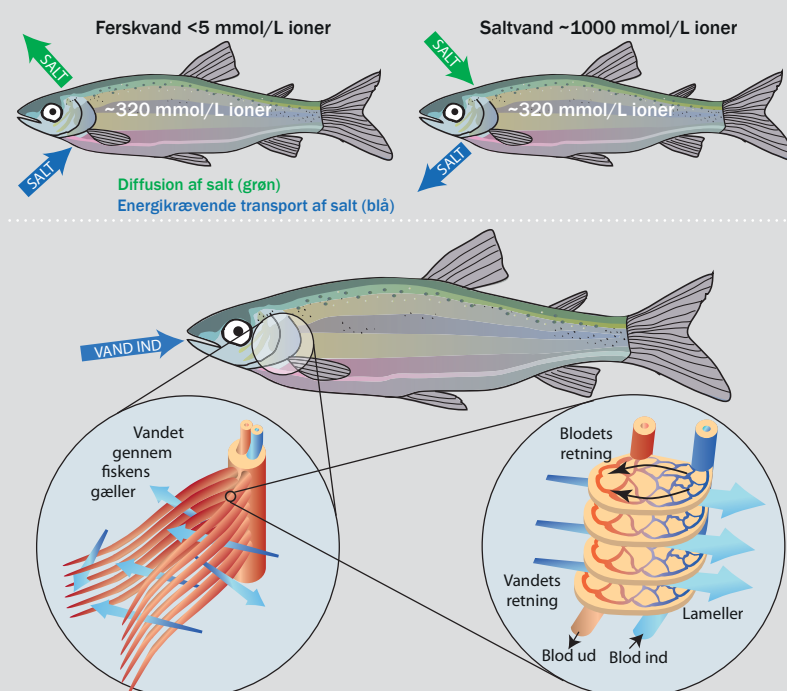
I laboratoriet undersøgte vi i et intensivt projektforløb over tre uger, hvordan udtrykket af de to  $\alpha$ -isoformer ændrede sig i løbet af syv dage, når vi flyttede regnbueørreder fra ferskvand til saltvand.

Vore undersøgelser viste, at  $\alpha$ -subuniten i de fleste  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -pumper i gællen udskiftes fra en form til en

## Regnbueørredens tilpasning

Gællen er fiskens gasudvekslingsorgan. Her sker udvekslingen af  $\text{O}_2$  og  $\text{CO}_2$  ind og ud af fisken ved diffusion. En effektiv diffusion opnås ved, at cellegaget, der adskiller det omgivende vand og blodkarrene, er meget tyndt og har et stort overfladeareal. Denne egenskab af gællen bevirker dog, at andre små molekyler og ioner som fx salt ( $\text{NaCl}$ ) og vand også let trænger gennem cellerne. Når det sker, vil sammensætningen af det indre miljø forandres i ugunstig retning. Fisk, der lever i ferskvand, vil miste salt ved diffusion, fordi koncentrationen af salt i ferskvand er lavere end i fiskens indre væsker. For at opretholde en stabil koncentration på ca. 320 mmol/L må fisken kompensere ved at optage salt fra vandet.

Når fisken lever i saltvand, er problemstillingen modsat. Her vil salt diffundere ind over gællen, fordi koncentrationen i det omgivende vand er højere end inde i fisken. Fisken kompenserer her ved at udskille salt til vandet. Når fisken flytter sig fra ferskvand til saltvand, må den altså skifte fra at optage salt til at udskille salt. Begge processer er energikrævende og foregår i gællen.





anden og reguleres nøje under fiskens saltvandstilpasning. Dette kunne vi vise ved både at måle mængden af mRNA, der koder for de to isoformer  $\alpha_{1a}$  og  $\alpha_{1b}$ , og mængden af protein af de to isoformer. Vore resultater blev bekræftet af forsøg, hvor vi ved hjælp af fluorescerende antistoffer, der binder sig til udvalgte proteiner, kunne dokumentere hvor de to isoformer var lokaliseret i gællen (se boksen næste side).

Ud fra vore forsøg kan vi se, at isoformen  $\alpha_{1a}$  primært findes i gællen i ferskvand, mens  $\alpha_{1b}$  overtager funktionen i saltvand. Der sker med andre ord et skift i gællens relative mængder af de to isoformer i  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -pumpen. Dette tyder på, at  $\alpha_{1a}$  har en betydning for fiskens optagelse af salt i gællen, mens  $\alpha_{1b}$  spiller en rolle i saltudskillelse. Vi anser omstillingen for at være af stor vigtighed, fordi  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -pumpen er den grundlæggende drivkraft for henholdsvis optagelse og udskillelse af salt i fisken.

### Næste skridt i forskningen

Projektet har givet os et indblik i nogle af de mekanismer, der kan sættes i gang, når et dyr udsættes for en miljøforandring, og som kan ende med en tilpasning til de nye forhold. Vi har set, at en forholdsvis lille ændring i et bestemt proteins ud-

tryk i et bestemt organ, kan få store konsekvenser for en hel organismes overlevelsessevne. Samtidig har vi også set, at svar på ét spørgsmål ofte giver anledning til nye spørgsmål og afprøvning af nye hypoteser.

Celler bruger generelt ikke unødigt energi på at fabricere nye proteiner, og derfor må der være en grund til, at udtrykket af  $\alpha_{1a}$  og  $\alpha_{1b}$  ændres, afhængigt af hvilket miljø, fisken befinder sig i. Det næste skridt i forskningen kunne derfor være at finde ud af, om der er forskel på de to isoformers struktur og funktion. Vores hypotese vil være, at  $\alpha_{1a}$  har egenskaber der egner sig bedst til *saltoptagelse*, mens  $\alpha_{1b}$  er favorabel for *saltudskillelse*.

Udover at projektet gav os en masse håndværksmæssig kunnen og indsigt i den videnskabelige proces, var det for os studerende stærkt motiverende at kunne producere resultater, der var direkte brugbare i den igangværende forskning på Biologisk Institut Syddansk Universitet.

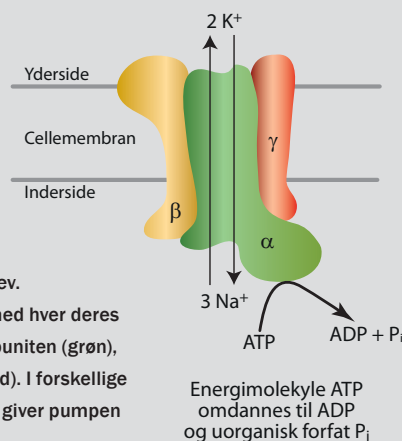
Og så var det en ekstra cadeau, at vore resultater blev belønnet med en pris for bedste poster ved en festlig postersession, hvor samtlige ca. 100 projekthold på Det Naturvidenskabelige Fakultet præsenterede resultaterne af deres projekter. ■

## ANNONCE

## Sådan er Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-pumpen opbygget

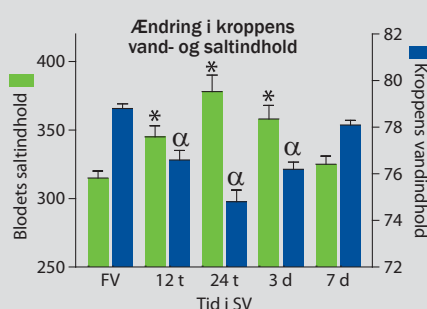
Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-pumpen er et vigtigt protein, der findes i de fleste cellers membran. Under forbrug af energimolekylet ATP, som omdannes til ADP og uorganisk fosfat, translokeres tre Na<sup>+</sup>-ioner ud af cellen og to K<sup>+</sup>-ioner ind. Pumpens aktivitet skaber en koncentrationsforskel, men også en ladningsfordeling over membranen, der kaldes en elektrokemisk gradient. Gradienten kan bl.a. benyttes til at sende nervesignaler rundt i kroppen, men også til andre processer som fx at optage næringsstoffer i tarmen eller transportere salt i fiskens gællelevæv. Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-pumpen består af tre forskellige proteinkomponenter, kaldet subunits, med hver deres funktion. Den del af pumpen, som sørger for transport af Na<sup>+</sup> og K<sup>+</sup>, kaldes  $\alpha$ -subuniten (grøn), mens  $\beta$ - er en forankringsenhed (gul) og  $\gamma$ -subuniten er en regulerende enhed (rød). I forskellige Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-pumper findes forskellige udgaver af  $\alpha$ -subuniten, kaldet isoformer, som giver pumpen forskellige egenskaber.

I regnbueørredens gællelevæv har forskere for nylig fundet fire forskellige isoformer:  $\alpha_{1a}$ ,  $\alpha_{1b}$ ,  $\alpha_{1c}$  og  $\alpha_3$ . I projektet undersøgte vi, mængden og placeringen af  $\alpha_{1a}$ ,  $\alpha_{1b}$  i fiskens gællelevæv i hhv. ferskvand og saltvand. Man kender ikke den præcise funktion af de forskellige isoformer endnu.



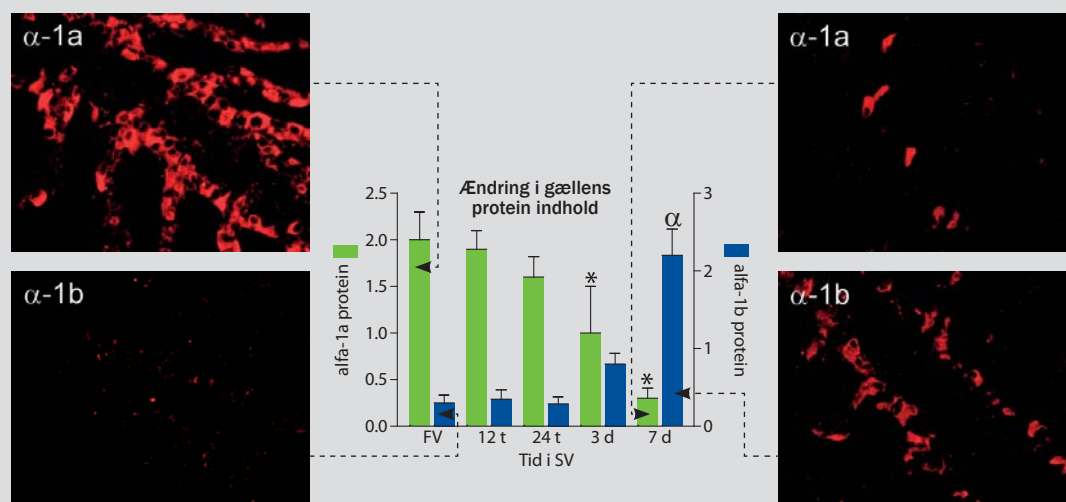
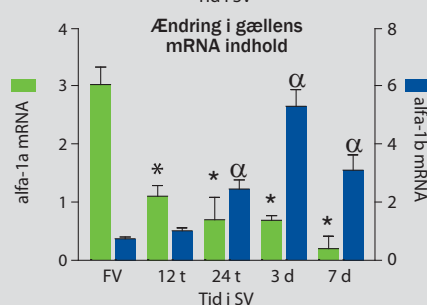
Øverste figur viser, hvordan blodets saltindhold (grøn) og kroppens vandindhold (blå) ændrer sig de første syv dage efter en overflytning af regnbueørreder fra ferskvand (FV) til saltvand (SV).

De to parametre ændrer sig relativt hurtigt og i modsat retning inden for de første 24 timer og vender derefter gradvist tilbage mod de oprindelige værdier. Resultaterne viser, at fiskene i starten stresses af omstillingen, men efterhånden begynder at udvikle de nødvendige mekanismer for at bringe stabilitet i kropsvæskerne igen.



Nederste figur viser, hvordan gællens indhold af mRNA, der koder for de to interessante isoformer af Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-pumpens  $\alpha$ -subunit, ændres efter overflytning til saltvand.  $\alpha_{1a}$  mængden (grøn) falder til et meget lavt niveau samtidigt med at  $\alpha_{1b}$  mængden (blå) stiger til et højere niveau.

Ændringerne tyder på, at der sker en ændring af mængden og funktionen af Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-pumpen, som varetager reguleringen af kroppens saltindhold. \* og  $\alpha$  symboler over søjlerne angiver signifikante ændringer i forhold til ferskvands-værdierne.



Figuren viser, hvordan mængden og lokaliseringen i gællen af de to Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-pumpe isoformer  $\alpha_{1a}$  og  $\alpha_{1b}$  ændres efter overflytning fra ferskvand (FV) til saltvand (SV).  $\alpha_{1a}$  mængden (grøn) falder til et meget lavt niveau samtidigt med, at  $\alpha_{1b}$  mængden (blå) stiger til et højt niveau. Disse resultater harmonerer fint med lokaliseringen af de to isoformer i de histologiske længdesnit af gællen. I ferskvands-gællen ses næsten udelukkende celler, der indeholder  $\alpha_{1a}$ -isoformen (øverst tv.), hvorimod celler med højt indhold af  $\alpha_{1b}$ -isoformen dominerer i SV-gællen (nederst th.). Billederne viser længdesnit af gællen med lameller siddende vinkelret på filamentet (boks, forrige side). \* og  $\alpha$  symboler over søjlerne angiver signifikante ændringer i forhold til ferskvands-værdierne.

### Videre læsning:

Madsen, S.S., Kiilerich, P. & Tipsmark C.K. (2009) Multiplicity of expression of Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase alpha-subunit isoforms in the gill of Atlantic salmon (*Salmo salar*): cellular localisation and absolute quantification in response to salinity change. *Journal of Experimental Biology* 212: 78-88.

McCormick, S.D., Regish, A.M., Christensen, A.K. & Björnsson, B.T. (2013) Differential regulation of sodium-potassium pump isoforms during smolt development and seawater exposure of Atlantic salmon. *Journal of Experimental Biology* 216: 1142-1151.