

# Undersøgelser af antifryseprotein-systemer hos antarktiske fisk med specielt henblik på Antarktisk Sølvfisk, *Pleurogramma antarcticum*

Af projektleder, lektor, ph.d. Hans Ramløv, Roskilde Universitetscenter

Togtben 12

Øvrige deltagere: Professor Arthur L. DeVries (USA), dr.scient. Peter Wilson (New Zealand), ph.d.-studerende Thomas Flarup Sørensen (Roskilde Universitetscenter).

## Formål

Formålet med projektet er at udvide vores forståelse af de generelle aspekter ved antifryseproteinsystemer. I projektet sammenlignes antifryseproteinsystemer fra forskellige arter af antarktiske fisk. Endvidere undersøges de evolutionære aspekter af forekomsten af antifryseglykoproteiner inden for overfamilien Nototheniidae og hos antarktiske og arktiske fisk.

Projektet er opdelt i tre hovedaktiviteter:

- 1) At fange den Antarktiske Sølvfisk, *Pleurogramma antarcticum*, og undersøge dens antifryseproteinsystem samt andre fysiologiske og biokemiske tilpasninger til lave temperaturer i isfyldt vand hos denne fisk
- 2) At fange fisk fra kontinental-shelfen i området ved Den Antarktiske Halvø og undersøge disses antifryseprotein-systemer og deres fysiologiske og biokemiske tilpasninger til lave temperaturer i isfyldt vand.
- 3) Hvis det er muligt at fange nye fiskearter fra det Antark-

Foto: Hans Ramløv





Adult og juvenil antarktisk sølvfisk (*Pleurogramma antarcticum*). Foto: Hans Ramløv

tiske Ocean og undersøge disses antifryseproteinsystemer og deres fysiologiske og biokemiske tilpasninger til lave temperaturer i isfyldt vand.

### Baggrund

Fisk, der lever i polare og tempererede havområder, udsættes om vinteren eller hele året rundt (Antarktis) for iskrystaller i vandet, hvis temperatur er på frysepunktet ( $-1,9^{\circ}\text{C}$ ). Isen forekommer som isdække, eller "ankeris", som findes i Antarktis ned til 30-40 meters dybde. I antarktiske farvande findes en anden type is, der forekommer som bittesmå iskrystaller, der flyder i den frie vandmasse. Disse små iskrystaller dannes, når relativt ferskt bundvand på 600 meters dybde strømmer ud under de store antarktiske isdækker (f.eks. Ross Iceshelf) og stiger op mod overfladen. På grund af trykforskellen mellem bund og overflade *nukleerer* vandet, og der dannes bittesmå iskrystaller (*isnukleation* er den proces, hvor vandmolekyler samler sig til små kerner, som vokser sig større til egentlige iskrystaller).

Fisk, der lever i de kolde farvande, er derfor underafkølede med ca.  $0,9^{\circ}\text{C}$ , når havvandets temperatur er ca.  $-1,9^{\circ}\text{C}$ . Havde disse fisk ikke noget forsvar mod frysning, ville deres kropsvæsker fryse til is, så snart de kom i kontakt med iskrystaller. Masser af fisk svømmer dog underafkølede omkring i det kolde isfyldte hav. I midten af tresserne arbejdede biologen A.L. DeVries på McMurdo Station i Antarktis, og han opdagede, at tog han noget serum fra en antarktisk fisk og tilførte en lille iskrystal, kunne han sænke temperaturen, uden at iskrystallen voksede. Når temperaturen nåede  $-2,3^{\circ}\text{C}$ , voksede iskrystallen pludselig eksplosivt som lange, parallelle, spydformede krystaller. Da fiskeblodet har et smeltepunkt (ligevægtsfrysepunkt) på ca.  $-1^{\circ}\text{C}$ , og isvæksten begynder ved  $-2,3^{\circ}\text{C}$ , selv når der er is til stede i prøven, kaldes fænomenet *termisk hysteresis*<sup>1</sup> eller *antifryseeffekten*. Temperaturen, hvor isvæksten sker ( $-2,3^{\circ}\text{C}$ ), kaldes hysteresefrysepunktet. Da frysepunktet af havvand er  $-1,9^{\circ}\text{C}$ , er denne hæmning af isvæksten altså lige tilstrækkelig til, at fiskenes blod ikke fryser til is i de kolde polare oceaner. De isvæksthæmmende stoffer viste sig at være en ny gruppe af proteiner. Disse proteiner

kaldes nu *antifryseproteiner* (AFP). Der kendes i dag fem typer af antifryseproteiner<sup>2</sup> i fisk.

Fra et udviklingsmæssigt (evolutionært) synspunkt har AFP vist sig at være meget spændende. Man har længe vidst, at antifryseglykoproteiner (AFGP) fra familien Nototheniidae er fuldstændig de samme, som man finder hos torskefisk. Disse to fiskefamilier har været adskilt i mange millioner år og er ikke ret tæt beslægtede. I en lang periode var det uklart, om AFP var udviklet, før de to fiskegrupper blev adskilt, altså om de har et fælles "stamfaderstof", eller om de udviklede sig parallelt, hver for sig (konvergent evolution). Det er blevet vist, at AFGP fra Nototheniidae er udviklet fra et fordøjelsesenzym, mens AFGP fra torskefisk er udviklet fra et helt andet protein. Dette er et af de bedste eksempler på konvergent evolution inden for proteiner, der kendes.

### **Deltagelse i Galathea 3 samt forskningsmæssig status**

Antifryseproteingruppen mødtes i Christchurch og gik om bord på VÆDDEREN den 11. januar 2007. VÆDDEREN afsejlede samme aften med kurs mod Peter d. 1.'s Ø i Antarktis via Antipodeøerne. Ved Antipodeøerne blev der fisket med både et lille Agazzitrawl samt med fiskestang. Fiskeriet med stang gav ca. 20 eksemplarer af arten *Notothenia microlepidota*. Dette er ikke en antarktisk fisk, men en art inden for familien Nototheniidae, som blot lever i lidt varmere vand. Vi udtog prøver fra disse fisk, og det viste sig da også, at de har en vis antifryseaktivitet i blodet. Da vi også har eksemplarer af arten *Notothenia angustata* fra New Zealand, og da vi yderligere fangede arten *Notothenia coriiceps* i Antarktis, er vi nu i stand til at se en gradient i antifryseaktivitet inden for slægten *Notothenia*. Dette vil medvirke til at klarlægge slægtskabsforholdene samt klimaets betydning for antifryseaktiviteten og de molekulære forhold. Efter besøget på Antipodeøerne fortsattes mod Den Antarktiske Halvø. Det var planen at trawle tæt på iskanten ved Peter d. 1.'s Ø, men skibschefen vurderede, at det var for farligt at gå tæt på isen, og det blev derfor besluttet at fortsætte forlægningen mod Den Antarktiske Halvø. Vi fiskede med et stort pelagisk trawl i ca. 700 meters dybde i tre timer inde over kontinentalskræ-

1 Termisk hysteresis betyder, at der er en veldefineret adskillelse mellem frysepunktet og smeltepunktet i en opløsning.

2 Antifryseglykoproteiner (AFGP): Familier: Nototheniidae and Gadidae. Stangformed, aminosyresekvensen gentages som Ala-Ala-Thr, sukren sidder på Thr, størrelse: op til 32 kDa. Type I AFP, Alanin rige, Alpha helix, amfifile, 3 kDa, familier: Pleuronectidae (Flyndre), Cottidae (Ulke). Type II AFP, Cystein rige,  $\beta$ -sheets, 14 kDa, Sild, Sea raven (Ulk). Type III AFP, ingen aminosyre-repetition, Helix,  $\beta$ -sheet, 7 kDa, Zoarcidae (Ålekvabber). Type IV AFP, 12 kDa, Langhornet ulk.

ten, men desværre gav trækket ingen *P. antarcticum*. Derimod fangede vi en del "prikfisk" (Myctophidae). Der er ikke kendt antifryseaktivitet hos denne fiskegruppe, men efter at have undersøgt fire arter af disse fisk er det nu klart, at mindst én art har en ikke uvæsentlig antifryseaktivitet i blodet. Dette er interessant, idet 1) der ikke tidligere var kendt antifryseaktivitet hos disse fisk, 2) disse fisk er meget primitive, og man må således forvente, at deres antifryseproteiner er meget forskellige fra de andre kendte antifryseproteiner, 3) forekomsten af antifryseaktivitet hos disse fisk vil medvirke til at klarlægge de forskellige fisks indbyrdes slægtskab (fylogeni) og evolutionen af antifryseproteiner hos fisk.

Efter det noget mislykkede forsøg på at fange *P. antarcticum* ud for Den Antarktiske Halvø, lykkedes det os (via Arthur L. DeVries) at komme i kontakt med amerikanske forskere, der har arbejdet med *P. antarcticum*'s udbredelse, døgnvandring og temperaturpræference i Det Antarktiske Ocean. De amerikanske forskere foreslog, at vi skulle prøve at fiske i Crocker Passage (64°05'S, 61°48'W), hvilket lå meget nær nogle af de fiskesteder, vi oprindeligt havde udpeget som interessante. Et første trawltræk blev prøvet på 1.000 meters dybde i Crocker Passage, og det gav ca. 20 larver af *P. antarcticum* på 5–8 cm samt en masse krill og overraskende nogle isfisk-larver. Dette var en vigtig opdagelse, fordi:

- 1) de amerikanske forskere havde sagt, at det var et forsøg, idet deres erfaring var, at der ikke mere var *P. antarcticum* i Crocker Passage og i givet fald sikkert kun larver. Det var blot deres bedste bud på et fangststed, hvorfor de også var meget interesserede i at vide, om vi fangede *P. antarcticum* her. Fangsten var således af almen interesse - også set i sammenhæng med den mulige opvarmning af Det Antarktiske Ocean forbindelse med den globale opvarmning. Vores fangst viser, at *P. antarcticum* i hvert fald endnu ikke er forsvundet fra denne del af Det Antarktiske Ocean på trods af, at det fra den amerikanske Palmer Station er vist, at denne del af oceanet er under opvarmning
- 2) der var *P. antarcticum* på dette sted, og vi derfor kunne fiske yderligere her. Vi trak i alt tre gange i Crocker Passage og fangede i alt 16 voksne *P. antarcticum* og 35 larver i forskellige størrelser. Derudover gav trækkene et antal forskellige arter isfisk samt mange krill.

Undersøgelser om bord af serum fra de fangede *P. antarcticum* viste, at disse havde en antifryseaktivitet, der ligger tæt på de øvrige fisks i denne overfamilie. Dette er i nogen modstrid med de tidligere publicerede undersøgelser, men falder helt i tråd med den opfattelse, vi havde af problemstillingen inden deltagelsen i Galathea 3-ekspeditionen.

På hele ekspeditionen fangede vi ca. 50 fiskearter, heriblandt en ny art ålekvabbe. Vores initiale undersøgelser om bord viste, at ca. 30 af arterne havde antifryseaktivitet i blo-

det, deriblandt også den nye ålekvabbeart, som faktisk havde en kraftigere antifryseaktivitet end det, der kendes fra kendte arter antarktiske ålekvabber. Der blev udtaget følgende prøver af de fangede fisk: blod, lever, tarmsystem og milt. Prøverne blev overført til kold 80 %-ethanol og opbevaret ved -20°C.

Efter ankomsten til Valparaiso, Chile, blev de fleste af prøverne overført til to Dry Shippers med flydende kvælstof, og disse blev sendt hhv. til Danmark og USA – begge Dry Shippers ankom i god behold, og prøverne opbevares nu ved -80°C på hhv. Roskilde Universitetscenter og University of Illinois at Urbana-Champaign, indtil bearbejdningen af det indsamlede materiale kan påbegyndes.

Disse undersøgelser vil omfatte videre målinger af antifryseaktivitet, undersøgelser af sammensætningen af antifryseproteiner hos de forskellige fiskearter og undersøgelser af de gener, der koder for antifryseproteiner hos de forskellige fiskearter.

Ud over de ovennævnte aktiviteter deltog antifryseproteingruppen i følgende formidlingsaktiviteter:

- Thomas Flarup Sørensen og Arthur L. DeVries holdt hver et foredrag om bord på VÆDDEREN for Søværnets besætning og ekspeditionsbesætningen.
- Thomas Flarup Sørensen blev interviewet til en avis i Valparaiso, Chile.
- Dr. Peter Wilson skrev weblog på engelsk på Jyllands-Postens hjemmeside.
- Undertegnede holdt foredrag for VÆDDERENs besætning om bord.
- Undertegnede holdt foredrag for inviterede gæster fra Valparaisos Universitet om bord på VÆDDEREN, efter at vi var kommet i havn.
- Undertegnede deltog i udarbejdelsen af tre tv-udsendelser og blev interviewet til TV 2/ Nyhederne direkte.
- Undertegnede deltog i en direkte web-cast-udsendelse til skolebørn i Fåborg (ca. 200 børn) arrangeret af Undervisningsministeriet.
- Undertegnede figurerede i flere avisartikler samt forskellige webbaserede artikler i den periode, jeg var om bord, og skrev en weblog på Dansk Polarcenters hjemmeside.

For økonomisk støtte takkes Villum Kann Rasmussen Fonden.



*Paraliparis devriesi*. Foto: Hans Ramløv