

SARKOPLASMAKALVOSTON  $Ca^{2+}$ -ATPAASIN  
LÄMPÖTILANSIETO PUROTAIMENEN (*SALMO TRUTTA*  
*FARIO*) SYDÄMESSÄ

ELINA MIKKONEN

Pro gradu -tutkielma  
Itä-Suomen yliopisto  
Ympäristö- ja biotieteiden laitos  
2018

ITÄ-SUOMEN YLIOPISTO

Ympäristö- ja biotieteiden laitos, biologia

MIKKONEN, ELINA: Sarkoplasmakalvoston  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPaasin lämpötilansieto purotaimenen (*Salmo trutta fario*) sydämessä

Pro gradu –tutkielma (40 op), 38 s., liitteitä 3.

Tammikuu 2018

---

Purotaimen (*Salmo trutta fario*) on kylmissä, virtaavissa vesissä elävä varsinaisiin luukaloihin (Teleostei) kuuluva kalalaji, joka sietää vain suhteellisen pieniä ympäristön lämpötilan vaihteluita. Ektotermisenä lajina sen ruumiinlämpötila vaihtelee ympäristön lämpötilan mukaan, mikä puolestaan vaikuttaa sen fysiologiaan, kuten sydämen toimintaan.

Sydämen aktiopotentiaali saa aikaan kalsiumionien vapautumisen sytoplasmaan solun ulkopuolelta. Tämä aiheuttaa kalsiumionien vapautumisen sarkoplasmakalvostosta (SR). Kalsiumionipitoisuuden nousu johtaa sydämen supistumiseen myofilamenttien liukuessa toistensa lomaan. Relaksoitumisen edellytyksenä on kalsiumionipitoisuuden pieneneminen sytoplasmassa. Kalsiumioneja siirretään sarkoplasmakalvostoon SR:n  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPaasin avulla ja solun ulkopuolelle esimerkiksi solukalvon  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPaasin avulla.

Tämän Pro gradu -tutkielman tavoitteena oli selvittää purotaimenen SR:n  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPaasin toimintaa ja sen merkitystä kalojen lämpötila-akklimaatiossa. Tutkimuksessa verrattiin kylmä- ja lämminakklimoitujen taimenten SR:n  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPaasin aktiivisuutta ja lämpötilariippuvuutta ( $Q_{10}$ -arvot). Erityisesti tarkasteltiin SR:n  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPaasin korkeiden lämpötilojen sietoa. Tarkoituksena oli pohtia, onko sillä merkitystä purotaimenen akklimatisoitumisessa korkeisiin lämpötiloihin, kuten ilmastonmuutoksen aiheuttamaan vesien lämpenemiseen.

Koe-eläiminä oli kylmä- ja lämminakklimoituja (4 °C ja 12 °C) purotaimenia. Koesarjassa 1 SR:n  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPaasin aktiivisuutta mitattiin 15, 25, 35 ja 45 °C lämpötiloissa ja koesarjassa 2 25, 30, 35 ja 40 °C lämpötiloissa inkuboinnin aikana ATP:sta vapautuneen fosfaatin määrän perusteella. Se mitattiin spektrofotometrillä 390 nm:n aallonpituudella. Mittaustuloksista laskettiin aktiivisuudet ja aktiivisuuksista lämpötilariippuvuudet eri lämpötilaväleille.

SR:n  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPaasin aktiivisuus nousi 35 °C:seen ja laski korkeammassa lämpötiloissa molemmissa koesarjoissa. Akklimaatioryhmien välillä oli merkitsevä ero korkeissa lämpötiloissa koesarjassa 2.  $Q_{10}$ -arvot laskivat lämpötilan noustessa molemmissa koesarjoissa. Kun lämpötila oli alle 35 °C,  $Q_{10}$ -arvo > 1 eli aktiivisuus kasvoi.  $Q_{10}$ -arvo < 1 lämpötilan ollessa yli 35 °C eli aktiivisuus laski.

Tulosten mukaan SR:n  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPaasin aktiivisuus on lämpötilariippuvaista ja kylmäakklimaatio lisäsi aktiivisuutta. Lämpötila-akklimaatiolla ei kuitenkaan ollut merkitystä SR:n  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPaasin korkeiden lämpötilojen siedolle, koska aktiivisuus laski yhtä paljon molemmissa akklimaatioryhmissä korkeissa lämpötiloissa. Tulosten mukaan SR:n  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPaasin korkeiden lämpötilojen sieto ei ole purotaimenen korkeiden lämpötilojen siedon tai sen sopeutumisen kannalta rajoittavana tekijänä, koska sen aktiivisuus on korkeimmillaan lähellä 35 °C ja purotaimenen lämpötilansiedon ylärajana pidetään 22–25 °C.

UNIVERSITY OF EASTERN FINLAND

Department of Environmental and Biological Sciences, biology

MIKKONEN, ELINA: Temperature tolerance of the sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>-ATPase in the heart of brown trout (*Salmo trutta fario*)

MSc. Thesis (40 cp), 38 pp., Appendices 3.

January 2018

---

Brown trout (*Salmo trutta fario*) is teleost fish (Teleostei) of cold, flowing waters. They tolerate only relatively small variations of ambient temperature. As an ectothermic species, body temperature of brown trout varies according to the ambient temperature. Therefore, temperature has a strong effect on their physiology, for example on cardiac function.

The action potential of the heart triggers an influx of calcium into the cytoplasm of cardiac myocytes from the extracellular space. This calcium influx triggers a release of calcium from the sarcoplasmic reticulum (SR), an intracellular calcium storage site of muscle cells. Increase in cytoplasmic calcium concentration activates cardiac myofilaments to slide past each other, which causes contraction of the heart muscle. Relaxation of cardiac contraction requires that intracellular calcium concentration reverts back to its low diastolic level. This happens, when calcium is pumped back into the SR via SR Ca<sup>2+</sup>-ATPase and transported out of the cell by sarcolemmal Ca<sup>2+</sup>-ATPase and sodium-calcium exchanger.

The aim of my study was to examine the activity of the SR Ca<sup>2+</sup>-ATPase and its significance in temperature acclimation and thermal tolerance of brown trout. The study compared activity and temperature-dependence of the SR Ca<sup>2+</sup>-ATPase in the cold- and warm-acclimated trout. Specifically, the upper temperature tolerance of SR Ca<sup>2+</sup>-ATPase was studied. The significance of the temperature tolerance of SR Ca<sup>2+</sup>-ATPase during acclimatization to high temperatures such as global warming was discussed.

SR Ca<sup>2+</sup>-ATPase activity of cold- and warm-acclimated (4 °C and 12 °C, respectively) brown trout was measured at 15, 25, 35 and 45 °C (test series 1) and at 25, 30, 35 and 40 °C (test series 2) based on the amount of phosphate released from ATP. The amount of phosphate was measured with spectrophotometer at 390 nm wavelength. SR Ca<sup>2+</sup>-ATPase activity was determined for each temperature and temperature-dependence of the ATPase activity (Q<sub>10</sub> values) was calculated for different temperature ranges.

Activity of SR Ca<sup>2+</sup>-ATPase increased with increasing temperature up to 35 °C and decreased at higher temperatures in both acclimation groups. There was a statistically significant difference between the acclimation groups at temperatures of 30, 35, 40 °C in test series 2. Q<sub>10</sub> values decreased as temperature increased in both test series. At temperatures below 35°C Q<sub>10</sub> > 1, i.e. activity increased with rising temperature. At temperature above 35 °C Q<sub>10</sub> < 1, this means that activity decreased.

According to the results, the activity of SR Ca<sup>2+</sup>-ATPase is temperature-dependent and acclimation to cold increased the activity. However, the temperature acclimation did not affect to the thermal tolerance of the SR Ca<sup>2+</sup>-ATPase because the activity decreased equally in both acclimation groups at high temperatures. Results suggest that the upper temperature tolerance of the SR Ca<sup>2+</sup>-ATPase is not a limiting factor for the upper temperature tolerance or acclimatization to high temperatures of the brown trout because activity was highest at 35 °C and upper thermal limit of the brown trout is about 22–25 °C.

## SISÄLLYSLUETTELO

1 JOHDANTO.....	2
1.1 Luukalan verenkierto ja sydämen rakenne .....	3
1.2 Sydämen toiminta .....	5
1.3 Sydänlihassolujen sarkoplasmakalvosto ja sarkoplasmakalvoston $\text{Ca}^{2+}$ -ATPaasi.....	6
1.4 Sarkoplasmakalvoston kalsiumvaraston ja $\text{Ca}^{2+}$ -ATPaasin merkitys.....	7
1.5 Kalojen lämpötilansieto ja sydämen lämpötila-akklimatisaatio .....	9
1.6 Sarkoplasmakalvoston $\text{Ca}^{2+}$ -ATPaasin merkitys tonnikaloilla ( <i>Thunnus</i> ).....	11
2 TUTKIMUKSEN TAVOITTEET JA HYPOTEEESIT .....	13
3 AINEISTO JA MENETELMÄT .....	13
3.1 Koe-eläimet .....	13
3.2 Kalan preparointi ja kudoshomogenaatin valmistus.....	14
3.3 Inkubointi.....	14
3.4 Fosfaattikonsentraation mittaaminen spektrofotometrillä .....	15
3.5 Proteiininmääritys.....	16
3.6 SR:n $\text{Ca}^{2+}$ -ATPaasi aktiivisuuden ja lämpötilariippuvuuden laskeminen.....	16
3.7 Tilastollinen käsittely .....	17
4 TULOKSET .....	18
4.1 Sarkoplasmakalvoston $\text{Ca}^{2+}$ -ATPaasin aktiivisuus .....	18
4.1.1 Sarkoplasmakalvoston $\text{Ca}^{2+}$ -ATPaasin aktiivisuus koesarjassa 1.....	18
4.1.2 Sarkoplasmakalvoston $\text{Ca}^{2+}$ -ATPaasin aktiivisuus koesarjassa 2.....	20
4.2 Lämpötilariippuvuudet ( $Q_{10}$ -arvot) eri lämpötilaväleille .....	21
4.2.1 $Q_{10}$ -arvot koesarjassa 1.....	21
4.2.2 $Q_{10}$ -arvot koesarjassa 2.....	23
4.3 Purotaimenten painon, pituuden ja kammion painon tarkastelu.....	25
5 TULOSTEN TARKASTELO .....	26
5.1 Lämpötilan vaikutus sarkoplasmakalvoston $\text{Ca}^{2+}$ -ATPaasin aktiivisuuteen.....	26
5.2 Akkliimaatioryhmien erot sarkoplasmakalvoston $\text{Ca}^{2+}$ -ATPaasin aktiivisuudessa .....	28
5.3 Sarkoplasmakalvoston $\text{Ca}^{2+}$ -ATPaasin korkeiden lämpötilojen sieto.....	29
5.4 Purotaimeneen sarkoplasmakalvoston $\text{Ca}^{2+}$ -ATPaasin korkeiden lämpötilojen sieto verrattuna tonnikaloihin.....	31
5.5 Tulosten luotettavuus ja tutkimuksen kehittäminen .....	32
6 JOHTOPÄÄTÖKSET .....	33
KIITOKSET .....	35
LÄHDELUETTELO .....	35
LIITTEET	

## 1 JOHDANTO

Varsinaiset luukalat (Teleostei) ovat muutamia poikkeuksia lukuun ottamatta ektotermisiä eli niiden elimistön lämpötila vaihtelee ympäristön lämpötilan mukaan (Campbell & Reece 2011 s. 909). Poikkeuksena tästä ovat esimerkiksi osittain endotermisen tonnikalat (*Thunnus*), joilla on kyky ylläpitää ympäristön lämpötilaa korkeampaa ruumiinlämpöä erikoistuneiden lämpövaihtimien avulla (Carey & Teal 1966). Ektotermisten lajien lämpötilansiedon mukaan kalat luokitellaan steno-, meso- ja eurytermisiin lajeihin (Varley 1967, Hokanson 1977). Stenotermiset lajit sietävät vain suhteellisen pieniä ympäristön lämpötilan ja sitä kautta ruumiinlämmön muutoksia. Mesotermiset lajit puolestaan sietävät suurempaa lämpötilan vaihtelua ja eurytermisten lajien lämpötilan sietokyky on jo hyvin laaja. Varsinaisiin luukaloihin kuuluva purotaimen (*Salmo trutta fario*) on stenotermisen eli se sietää vain suhteellisen pieniä lämpötilanvaihteluita (Varley 1967). Sen lämpötilansiedon ylärajana pidetään noin 22–25 °C (Elliott & Elliott 2010). Lämpötilansiedon alaraja puolestaan on noin 0 °C. Purotaimen on taimenen (*Salmo trutta*) alalaji, joten se kuuluu taimenen tavoin lohien (Salmonidae) heimoon. Se elää nimensä mukaisesti kylmävetisissä virtaavissa vesissä, joissa veden happipitoisuus korkea. Ilmastonmuutoksen aiheuttama vesien lämpeneminen on erityinen haaste stenotermiselle purotaimelle, koska se ei siedä elinympäristönsä lämpötilanvaihteluiden aiheuttamia suuria muutoksia ruumiinlämpötilassaan.

Lämpötilan nouseminen vähentää hapen liukoisuutta veteen, mikä puolestaan vähentää hapen saatavuutta vedestä ja edelleen kiduksista kalan verenkiertoon siirtyvän hapen määrää (Farrell 2009). Lisäksi lämpötilan nouseminen lisää kalan kuluttaman hapen määrää kiihdyttämällä aineenvaihdunnan nopeutta. Tällöin myös sydämen lyöntitiheys ja työmäärä kasvavat. Vähentynyt hapen saatavuus heikentää sydämen toimintaa ja sitä kautta verenkiertoa vaikuttaen näin edelleen elimistön hapenkuljetukseen ja aiheuttaen mahdollisesti hapenpuutetta (hypoksiaa) kudoksissa (Pörtner ym. 2004). Sydämen toiminnan on havaittu olevan keskeisessä asemassa kalojen lämpötilansiedon kannalta. Sydämen ja sen toimintaan vaikuttavien ionipumppujen, kuten SR:n Ca<sup>2+</sup>-ATPaasin lämpötilansiedon tutkiminen on tärkeää, jotta saadaan tietoa siitä, mitkä tekijät tekevät sydäimestä lämpötilanvaihteluiden kannalta herkän elimen.

Sydämen supistumisrytmiä ohjaa sinussolmuke, josta sydämen sähköinen ärsyke etenee eteiseen ja kammioon (Irisawa 1978, Boyett ym. 2000). Sydämen toimintasykli eli sydänlihaksen supistumisen ja relaksoitumisen vuorottelu perustuu kalsiumionipitoisuuden vaihteluihin sydänlihassoluissa (Bers 2002). Sinussolmukkeesta alkunsa saanut sähköisen

jännitteen muutos eli aktiopotentiaali saa aikaan kalsiumionipitoisuuden nousun sytoplasmassa, mikä puolestaan johtaa kalsiumin vapautumiseen solunsisäisistä kalsiumvarastoista sarkoplasmakalvostosta (SR) (Shiels & Galli 2014). Sytoplasmassa kalsiumionipitoisuuden noususta seuraa sydänlihaksen supistuminen (systole) kalsiumionien saadessa aikaan lihassolun myofilamenttien eli aktiini- ja myosiinisäikeiden liukumisen toistensa lomaan. Edellä kuvattua prosessia kutsutaan sydämen ärsytys-supistus-kytkennäksi (Bers 2002). Sydänlihaksen relaxoituminen (diastole) edellyttää kalsiumionipitoisuuden pienenemistä, mikä tapahtuu poistamalla kalsiumioneja sytoplasmasta takaisin sarkoplasmakalvostoon SR:n  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPaasin (SERCA) avulla sekä solun ulkopuolelle muun muassa  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -vaihtimen (NCX) avulla (Shiels & Galli 2014).

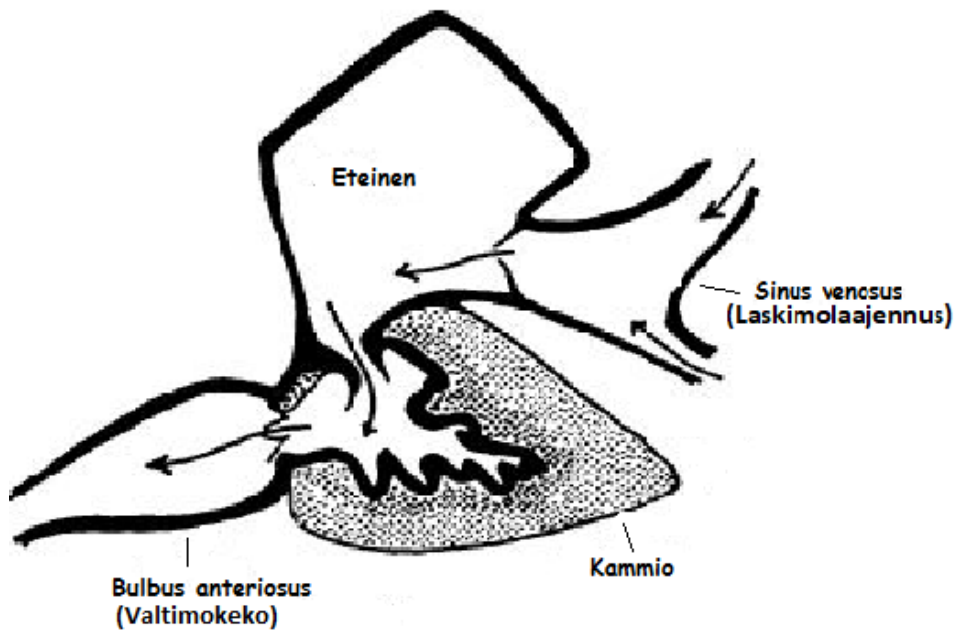
Tämän Pro gradu -tutkimuksen tarkoituksena on selvittää, onko puurotaimenen SR:n  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPaasin aktiivisuus lämpötilariippuvaista, ja onko kylmä- ja lämminaklimoitujen (4 °C ja 12 °C) taimenten SR:n  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPaasin aktiivisuudessa eroja. Tutkimuksessa tarkastellaan SR:n  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPaasin lämpötilansietoa ja sen aktiivisuuden muuttumista eri lämpötiloissa. Lisäksi pohditaan, onko SR:n  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPaasin lämpötilansiedolla mahdollisesti merkitystä puurotaimenen sopeutumisessa korkeisiin lämpötiloihin ja sitä kautta ilmastonmuutoksen aiheuttamaan vesistöjen lämpenemiseen. SR:n  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPaasin toimintaa ja fysiologista merkitystä on aikaisemmin tutkittu muun muassa tonnikaloilla (*Thunnus*) (mm. Landeira-Fernandez ym. 2004, Castilho ym. 2007, Landeira-Fernandez ym. 2012) ja jonkin verran myös esimerkiksi lohikaloihin kuuluvilla kirjolohilla (*Oncorhynchus mykiss*) (mm. Aho & Vornanen 1998, Da Silva ym. 2011).

## 1.1 Luukalan verenkierto ja sydämen rakenne

Luukaloilla on suljettu verenkiertoelimistö, joka koostuu sydäimestä, kidusten verenkierrasta ja systeemisestä eli muun elimistön verenkierrasta (Farrell & Pieperhoff 2011). Nisäkkäistä poiketen luukaloilla on yksinkertainen verenkierto (Campbell & Reece 2011 s. 946). Se tarkoittaa, että veri kulkee kidusten ja systeemisen verenkierron läpi samalla sydämen pumppaustyöllä käymättä niiden välissä uudestaan sydämessä. Sydämen supistuminen saa aikaan verenkierron verenpaineen, jonka avulla veri virtaa verenkiertoelimistössä (Ekström 2017).

Kalan sydän koostuu neljästä osasta, jotka ovat *sinus venosus* eli laskimolaajennus, eteinen, kammio ja *bulbus arteriosus* eli valtimokeko (kuva 1) (Randall 1968). Eteinen ja kammio ovat sydämen supistuvia rakenteita ja ne koostuvat suurimmalta osalta sydänlihaskudoksesta

(Ekström 2017). Sydämen eri osien välissä olevat läpät estävät verta virtaamasta taaksepäin verenpaineen vaihdellessa sydämen osien välillä. Vähähappinen laskimoveri tulee eteiseen laskimolaajennuksen kautta (Randall 1968). Eteisen supistuessa veri virtaa kammioon ja lopulta valtimokeon kautta pois sydäimestä ventraaliseen eli vatsanpuoleiseen aorttaan. Valtimokeko on elastinen sidekudoksesta muodostunut rakenne, jonka tehtävänä on toimia veren varastona ja verenpaineen tasaajana ennen veren virtaamista eteenpäin ventraaliseen aorttaan (Bone & Moore 2008). Se venyy, kun kammio pumpppaa verta varastoiden tällä tavalla sydämen lyöntienergiaa. Venytystilan purkautuminen mahdollistaa veren tasaisen virtauksen kohti kiduksia, mikä on tärkeää johtuen kidusten hauraista hiussuonista (Icardo 2012). Sydämen jälkeen veri virtaa valtimoiden kautta kidusten verenkiertoon, josta puolestaan hapekas valtimoveri virtaa dorsaalisen eli selänpuoleisen aorttan kautta systeemiseen verenkiertoon kuljettaen muun muassa happea elimistön käytettäväksi (Olson 2011).



Kuva 1. Luukalan sydämen rakenne (mukaiillen Randall 1968). Veri virtaa sydämeen laskimolaajennuksen kautta ja siitä eteenpäin eteisen kautta kammioon. Kammioista veri etenee valtimokeon kautta ventraaliseen aorttaan kohti kiduksia.

Lohikaloilla (Salmoniformes) kammio koostuu huokoisesta (spongy myocardium) ja tiiviistä sydänlihaskudoksesta (compact myocardium) (Pieperhoff ym. 2009). Tiivis sydänlihaskudos muodostaa kammion uloimman kerroksen ja huokoinen sydänlihaskudos puolestaan kammion sisemmän kerroksen (Santer & Walker 1980). Tiiviin kerroksen paksuus vaihtelee kalalajien välillä riippuen esimerkiksi kalalajin aktiivisuudesta (Pieperhoff ym. 2009). Nopeasti liikkuvilla ja hyvin aktiivisilla lajeilla, kuten tonnikaloilla ja kirjolohella, tiivis

sydänlihaskudoskerros on paksumpi verrattuna passiivisiin ja hitaasti liikkuviin lajeihin. Tiivistä sydänlihaskudosta esiintyy kalalajeilla, joilla on kammioon yhdistyvä hyvin kehittynyt sepelvaltimoverenkierto (Farrell & Pieperhoff 2011). Sen tarkoituksena on kuljettaa happea sydänlihaksen käytettäväksi.

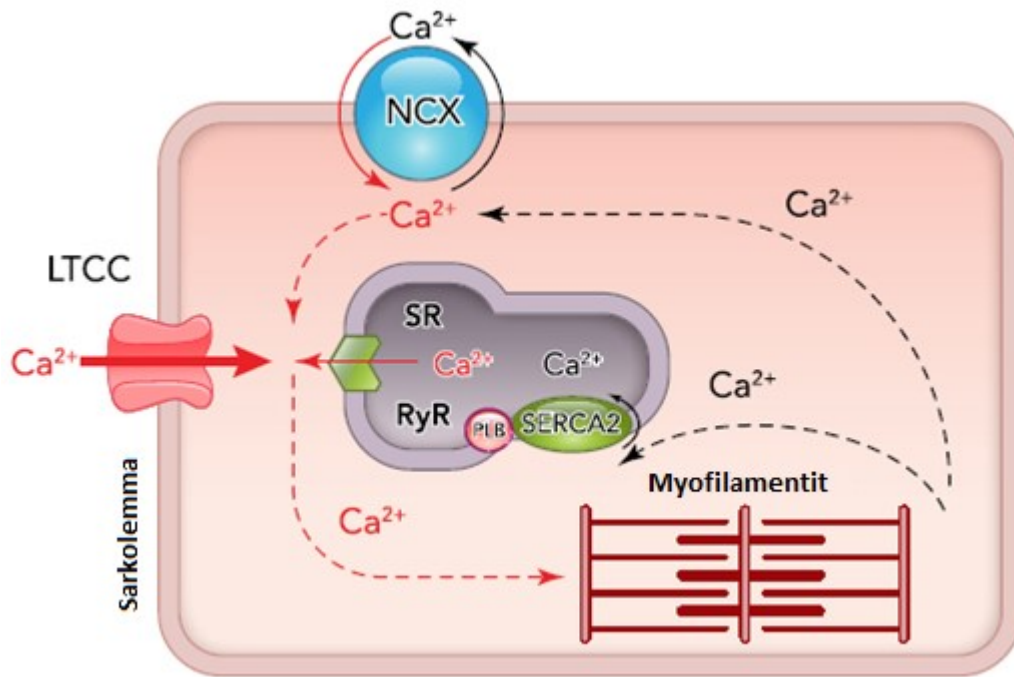
## 1.2 Sydämen toiminta

Sydämen toimintasykliin kuuluu diastolinen ja systolinen vaihe (Bone & Moore 2008). Systolisessa vaiheessa kammio supistuu eli veri pumpataan kammion eteenpäin. Diastolisessa vaiheessa kammio on puolestaan lepotilassa, minkä vuoksi se täyttyy verellä. Kaloilla, kuten myös nisäkkäillä, eteinen supistuu nopeasti verrattuna kammion supistumiseen (Aho & Vornanen 1999). Lisäksi on havaittu, että kammion täyttyminen on kaksivaiheinen prosessi (Lai ym. 1998). Se täyttyy osittain verellä jo ennen eteisen supistumista laskimoverenpaineen vaikutuksesta ja eteisen supistuminen täyttää lopulta jäljelle jäävän tilavuuden.

Sydämen supistumisessa keskeisessä asemassa on sydämen tahdistinsoluista koostuva sinussolmuke (Irisawa 1978, Boyett ym. 2000). Tahdistinsoluissa syntyvät sähköiset signaalit (aktiopotentiaalit) määräävät sydämen rytmin. Aktiopotentiaalien kulkiessa eteisen ja kammion läpi, ne aiheuttavat kalsiumionien vapautumisen sydänlihassolujen sytoplasmaan solujen ulkopuolelta L-tyypin kalsiumkanavien (LTCC) ja NCX:n kautta (Bers 2002, Shiels & Galli 2014) (Kuva 2). Nopea kalsiumionipitoisuuden kasvu sytoplasmassa saa aikaan kalsiumionien vapautumisen sydänlihassolun SR:sta ryanodiinireseptorien (RyR) kautta, mikä edelleen nostaa solunsisäistä kalsiumionipitoisuutta (Shiels & Galli 2014). Tätä kutsutaan kalsiumin indusoimaksi kalsiumin vapauttamiseksi (CIRC; Calcium-induced calcium release). Kalsiumioneja tulee soluun siis sekä solun ulkopuolelta että solun sisältä SR:sta. Sytoplasman kalsiumionipitoisuuden kasvu johtaa siihen, että kalsiumioneja sitoutuu myofilamenttien troponiini C:hen (Bers 2002). Tämä aiheuttaa myofilamenttien eli aktiini-myosiini-säikeiden liukumisen toistensa lomaan eli sydänlihaksen supistumiseen.

Sydänlihaksen relaksoitumisen edellytyksenä on erilaisten ATP:ta energianaan käyttävien ionisiirtäjien ja -vaihtimien kautta tapahtuva ionien takaisinsiirto solun ulkopuolelle ja SR:oon (Bers 2000, Shiels & Galli 2014). SR:n  $Ca^{2+}$ -ATPaasin avulla kalsiumioneja siirretään takaisin SR:oon ja solukalvon NCX:n sekä solukalvon  $Ca^{2+}$ -ATPaasin avulla takaisin solun ulkopuolelle. Lisäksi kalsiumia poistetaan sytoplasmassa mitokondrioihin niiden kalsiumionipumppujen avulla (Bers 2002).





Kuva 2. Ektotermisen eläimen sydänlihassolussa tapahtuvan kalsiumionipitoisuuden muutoksen aiheuttama sydänlihaksen supistuminen ja relaxoituminen (mukaillen Shiels & Galli 2014). SR = sarkoplasmakalvosto, Sarkolemma = lihassolun solukalvon, LTCC = L-tyypin kalsium kanava, NCX = Natrium-kalsium vaihdin, RyR = Ryanodiinireseptori, SERCA2 = Sarkoplasmakalvoston  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPaasi, PLB = fosfolambaani.

### 1.3 Sydänlihassolujen sarkoplasmakalvosto ja sarkoplasmakalvoston $\text{Ca}^{2+}$ -ATPaasi

SR on erikoistunutta endoplasmakalvostoa, jota esiintyy erityisesti lihassoluissa, mutta myös muissa soluissa (Galli 2011). Sen kalvorakenteissa on kalsiumkanavia (RyR) ja  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPaaseja (SERCA). SR toimii solunsisäisenä kalsiumionivarastona vapauttaen kalsiumia sytoplasmaan kalsiumkanavien eli ryanodiinireseptorien (RyR) kautta ja poistaen niitä sytoplasmasta  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPaasin avulla (Galli & Shiels 2012). Luukaloilla SR voi esiintyä solussa itsenäisenä kalvostona lähellä solun keskustaa (nonjunctional SR) tai liittyneenä muihin kalvorakenteisiin, kuten solukalvoon (junctional SR) (Di Maio & Block 2008). Nisäkkäiden soluissa SR esiintyy esimerkiksi liittyneenä T-putkiin, jotka ovat solukalvon solun sisään työntyviä ulokkeita (Tirri ym. 2001). Ne mahdollistavat aktiopotentialin kulkeutumisen lähelle SR:a ja solukalvon L-tyypin kalsiumkanavien läheisen sijainnin suhteessa SR:n ryanodiinireseptoreita, mikä puolestaan mahdollistaa tehokkaan kalsiumionien vapautumisen SR:sta. Kalojen lihassoluissa ei ole T-putkia ja niiden SR on vähemmän kehittyntä verrattuna nisäkkäisiin (Santer 1974).

P-tyypin ATPaaseihin kuuluvat SR:n  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPaasit ovat proteiineja, joita esiintyy tämän hetkisen tiedon mukaan kaikissa elävissä organismeissa (Periasamy & Kalyanasundaram 2007). Kaloilla  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPaaseja koodaavia geenejä ja niiden määrää ei vielä täysin tunneta (Korajoki & Vornanen 2012). Oletuksena kuitenkin on, että koodaavat geenit ja niiden tuotteena syntyneet  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPaasit ovat monimutkaisempia luukaloilla verrattuna nisäkkäisiin johtuen noin 350 miljoonaa vuotta sitten tapahtuneesta luukalojen genomien kahdentumisesta (duplikaatiosta) (Taylor ym. 2001, Volff 2005).

Nisäkkäillä on löydetty kolme eri geeniä, jotka koodaavat eri  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPaaseja (Wu & Lytton 1993). SERCA1-tyypin kalsiumpumput sijaitsevat erityisesti nopeissa luustolihasoluissa. SERCA2-tyypin kalsiumpumput puolestaan sijaitsevat pääosin sydänlihassoluissa sekä hitaissa luustolihasoluissa. SERCA3-tyypin pumput sijaitsevat lihassolujen lisäksi myös muissa soluissa. Lisäksi jokaisesta tyypistä on eri isomuotoja, jotka saavat alkunsa lähetti-RNA:n vaihtoehtoisen silmukoinnin kautta. Erityisesti SERCA2a-isomuodon on havaittu olevan sydänlihassoluissa keskeinen SR:n  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPaasi.

SR:n  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPaasi käyttää energiakseen ATP:ta (Periasamy & Kalyanasundaram 2007). Yhden ATP:n hydrolyysissa vapautuneen energian avulla SR:n  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPaasi siirtää kaksi kalsiumionia SR:oon. Sydänlihassolujen SR:n  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPaasin toimintaa säätelevät lihassolussa phospholambaani (PLB) ja sarkolipiini (SLN), jotka vaikuttavat siihen, kuinka hanakasti kalsium sitoutuu  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPaasiin (Kim ym. 1990).

Ryanodiinireseptorit (RyR) ovat SR:ssa sijaitsevia kalsiumin vapauttamiseen erikoistuneita kalsiumionikanavia, jotka aktivoituvat sytoplasman kalsiumionipitoisuuden kasvaessa vapauttaen kalsiumioneja SR:sta (Williams ym. 2010). Niitä on löydetty kolme muotoa: ryanodiinireseptorit 1–3, joista ryanodiinireseptori 2 (RyR2) ilmentyy sydänlihassoluissa. Nisäkkäillä SR:n ja sitä kautta ryanodiinireseptorien merkitys on suurempi lihaksen supistumiseen johtavassa sytoplasman kalsiumionipitoisuuden nousussa verrattuna ektotermisiin kaloihin (Shiels & Galli 2014). Lämpötila-akklimaatiolla ei ole havaittu olevan vaikutusta ryanodiinireseptorin ilmentymiseen kalan sydänlihassolussa (Birkedal ym. 2009).

#### 1.4 Sarkoplasmakalvoston kalsiumvaraston ja $\text{Ca}^{2+}$ -ATPaasin merkitys

Useiden tutkimuksien mukaan SR:n kalsiumin merkitys on lihassolun ulkoisen kalsiumin merkitystä pienempi sydänlihaksen supistumisessa ektotermisillä luukaloilla (Keen ym. 1994, Shiels & Farrell 1997, Aho & Vornanen 1998, Hove-Madsen ym. 1999). Endotermisillä selkärangaisilla, kuten nisäkkäillä, SR:sta vapautuvan kalsiumin merkityksen on puolestaan

havaittu olevan lihassolun ulkoisen kalsiumin merkitystä suurempi supistumisen käynnistymisessä (Bassani ym. 1994).

SR:n merkitystä on tutkittu muun muassa tarkastelemalla SR:n ryanodiinireseptorien toimintaa hyödyntämällä ryanodiinin inhiboivaa vaikutusta. Ryanodiini on kasvialkaloidi, joka vaikuttaa kalsiumin vapautumiseen SR:sta (Sutko & Kenyon 1983). Sen avulla pystytään selvittämään SR:n sisäisen kalsiumin merkitystä inhiboimalla kalsiumia vapauttavat ryanodiinireseptorit ja tarkastelemalla tämän jälkeen sydänlihaksen supistumista. Jos SR:n sisäisen kalsiumin merkitys eläinlajilla on suuri, saa kalsiumin vapautumisen estäminen aikaan suurempia ongelmia sydämen supistumisessa verrattuna eläinlajiin, jolla SR:n sisäisen kalsiumin merkitys on vähäinen.

Eri selkärangaisryhmien välisten erojen lisäksi eri luukalalajien välillä on havaittu eroja SR:n kalsiumin merkityksessä. Tutkimuksien mukaan ryanodiinilla ei ole vaikutusta sydämen supistumiseen ruutanalla (*Carassius carassius*) tai turskalla (*Gadus morhua*), kun puolestaan kirjolohilla (*Oncorhynchus mykiss*) ryanodiini vaikuttaa sydämen supistumiseen heikentäen sydämen toimintaa, koska se estää supistumisen kannalta riittävän kalsiumionien vapautumisen SR:sta (Driedzig & Gesser 1988, Vornanen 1996, Aho & Vornanen 1998). Esimerkiksi Shiels ja Farrell (1997) havaitsivat tutkimuksessaan, että kirjolohella ryanodiini heikentää sydämen toimintaa vaikuttamalla sydämen supistumistiheyteen. Tämän vuoksi voidaan olettaa, että kylmässä aktiivisilla kirjolohilla SR:n sisäisellä kalsiumilla on tärkeä merkitys sydämen ärsytys-supistus-kytkennässä ja sitä kautta sydämen supistumisessa.

SR:n sisäisen kalsiumin merkitykseen sydänlihaksen supistumisessa vaikuttaa lajien välisten erojen lisäksi myös moni muu tekijä (Galli & Shiels 2012). SR:n  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPaasin avulla tapahtuvan kalsiumin sisäänoton on muun muassa havaittu olevan suurempaa eteisen lihassoluissa verrattuna kammion lihassoluihin ja kylmäaklimoiduilla suurempi verrattuna lämminaklimoituihin kaloihin (Aho & Vornanen 1999). Myös Shiels ja Farrell (1997) havaitsivat tutkimuksessaan, että lämpimään (22 °C) akklimoituneilla kirjolohilla SR:n kalsiumin merkitys on suurempi verrattuna kylmään (12 °C) akklimoituneilla kirjolohilla. Lisäksi tutkittaessa SR:n merkitystä rotilla on havaittu, että se on suurempi täysikasvuisilla verrattuna vastasyntyneisiin rottiin johtuen vastasyntyneen rotan heikosti kehittyneestä SR:sta (Aho & Vornanen 1998, Fabiato 1982).

SR:n  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPaasin merkitykseen vaikuttaa se, kuinka tärkeitä SR:sta vapautuvat kalsiumionit ovat tietyn lajin sydämen supistumiselle. Nisäkkäistä esimerkiksi rotan kammion lihassolussa SR:oon siirrettiin SR:n  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPaasin avulla yli 90 % sytoplasman kalsiumista (Bassani ym. 1994). Kanilla vastaava osuus oli puolestaan noin 70 %. Luukaloilla osuuden on

arvioitu olevan huomattavasti tätä vähäisempi (Aho & Vornanen 1998). Lisäksi SR:sta vapautuvan kalsiumin merkityksessä on suuria eroja kalalajista riippuen. Kuitenkin kalojen SR:ssä olevan kalsiumin määrä näyttää olevan poikkeuksellisen suuri siitä vapautuvan kalsiumin merkitykseen nähden (Shiels & Galli 2014). Syitä suurelle kalsiumionipitoisuudelle ei kuitenkaan vielä tunneta. Suuren kalsiumionipitoisuuden mahdollistaa SR:ssa esiintyvät molekyylit, kuten kalsekvestriini, joka sitoo itseensä kalsiumioneja (Györke & Terentyev 2008). Tämän vuoksi vapaan kalsiumin määrä SR:ssa pysyy suhteellisen alhaisena.

### 1.5 Kalojen lämpötilansieto ja sydämen lämpötila-akklimatisaatio

Kalojen lämpötilansietoa on tutkittu laajalti, mutta tästä huolimatta ei olla täysin tietoisia siitä, mitkä ovat tärkeimmät tekijät lämpötilansiedon taustalla (Ekström 2017). Sydämen toiminnan oletetaan kuitenkin olevan tärkeässä osassa, koska lämpötilan nousemisen on havaittu vaikuttavan veden happipitoisuuteen ja sitä kautta sydämen toimintaan vaikuttaen edelleen hapen kuljetukseen elimistössä (Pörtner ym. 2004, Farrell 2009). Ektotermisillä lajeilla, joilla ympäristön lämpötila vaikuttaa suoraan ruumiinlämpötilaan, havaitaan usein muutoksia esimerkiksi sydämen lyöntitiheydessä ympäristön lämpötilan muuttuessa (Farrell 2009). Lisäksi lämpötila-akklimaation on havaittu vaikuttavan sydämen kokoon, erityisesti kammion lihaskerroksen paksuuteen (Klaiman ym. 2011). Liian korkea tai liian matala lämpötila aiheuttaa kuitenkin ongelmia kalan sydämen toiminnalle. Sydämen toiminnan heikkenemisestä johtuva verenkierron heikkeneminen puolestaan johtaa ongelmiin elimistölle välttämättömän hapen ja ravinteiden sekä kuona-aineiden kuljetuksessa (Pörtner ym. 2004, Farrell 2009). Ongelmien ilmenemislämpötila ja laajuus riippuvat lajikohtaisesti siitä lämpötilan vaihtelun laajuudesta, jota laji sietää. Lisäksi kalan kehitysvaihe vaikuttaa niiden lämpötilansietoon. Herkimpiä lämpötilanvaihteluille ovat kalojen aikaiset kehitysvaiheet, kuten niiden mätimunat (Elliott & Elliott 2010).

Vedessä elävillä eliöillä lämpötilansiedon alarajana pidetään veden jäätymispistettä eli 0 °C (Reynolds & Casterlin 1980). Suolaisen meriveden jäätymispiste voi kuitenkin olla 0 °C:n alapuolella, mikä aiheuttaa ongelmia eliöiden selviytymiselle. Jotkin eliöt selviävät alle 0 asteisessa vedessä, koska niiden elimistössä on jäätymistä estäviä yhdisteitä. Useimmilla lajeilla alaraja on kuitenkin hiukan 0 °C yläpuolella, kuten purotaimenella 0–0,7 °C (Reynolds & Cesterlin 1980, Elliott & Elliott 2010). Trooppisilla lajeilla alaraja voi olla jopa 10 °C (Reynolds & Cesterlin 1980).

Lämpötilansiedon yläraja on alarajaa huomattavasti laajempi, koska joidenkin eliöläjien on havaittu selviävän hyvinkin kuumissa olosuhteissa (Reynolds & Casterlin 1980). Eliöistä suurimmalla osalla proteiinien denaturoituminen tapahtuu kuitenkin huomattavasti alhaisimmissa lämpötiloissa, minkä vuoksi niiden korkeiden lämpötilojen sieto on huomattavasti alhaisempi. Selkärangkaisilla on havaittu useita fysiologisten toimintojen ongelmia, jotka ilmenevät jo alhaisemmissa lämpötiloissa kuin proteiinien denaturoituminen. Esimerkiksi kaloilla lämpötilansiedon ylärajana pidetään lajista riippuvaista lämpötilaa, jossa ilmenee ongelmia sydämen toiminnassa ja sitä kautta hapekkaan veren kuljettamisessa kudoksille (Pörtner ym. 2004). Lohikaloilla lämpötilansiedon ylärajana pidetään 22–28 °C lämpötilaa (Vornanen ym. 2014). Purotaimenella ylärajana on noin 22–25 °C (Elliott & Elliott 2010).

Akklimatisaatio eli luonnossa tapahtuva muuttuvien olosuhteiden aiheuttama eläimen rakenteiden tai fysiologisten toimintojen muuttuminen on tärkeää, jotta kala pystyy kompensoimaan ympäristön olosuhteiden muutoksien aiheuttamat epäedulliset vaikutukset elimistössään (Tirri ym. 2001, Bennett 1985). Esimerkiksi kaloilla sydämen akklimatisaation on havaittu olevan yhtenä edellytyksenä niiden sopeutumisessa vaihteleviin olosuhteisiin, kuten lämpötilan vaihteluihin (Gamperl & Farrell 2004). Ympäristön lämpötilan muuttumisen sietoon vaikuttaa se, kuinka nopeasti muutos tapahtuu ja minkä kokoinen muutos on kyseessä. Monet kalalajit elävät maantieteellisesti alueilla, joilla esiintyy suuria kausittaisia vaihteluita vesistöjen lämpötilassa, minkä vuoksi kaloilla täytyy olla kyky akklimatisoitua ennakoitaviin ja hitaisiin ympäristön lämpötilan ja sitä kautta ruumiinlämpötilan muutoksiin (Vornanen ym. 2002). Kalojen liikkuminen vesistöjen eri lämpötilakerrostumissa eli termokliineissä voi kuitenkin muuttaa nopeastikin niiden ruumiinlämpöä. Jos ympäristön lämpötilassa tapahtuu suuri muutos nopeasti, siitä aiheutuvat ongelmat kalan fysiologiassa voivat olla liian suuria sen selviytymisen kannalta. Vaikka kalan lämpötilansieto olisikin suhteellisen laaja, se ei välttämättä ehdi akklimatisoitua nopeasti muuttuviin olosuhteisiin. Tämä johtaa elimistön toimintahäiriöihin. Jos kala ei pääse siirtymään viileämpään ympäristöön, se lopulta kuolee liian korkeassa lämpötilassa.

Termillä akklimoituminen tarkoitetaan puolestaan laboratorio-olosuhteissa tapahtuvaa fysiologista sopeutumista tietyn tekijän, kuten lämpötilan, muutokseen (Tirri ym. 2001). Kylmässä aktiivisella kirjolohella sydämen akklimoitumisen kylmään on havaittu johtavan sydämen kammion kasvuun ja siitä johtuvaan sydämen toiminnan tehostumiseen (Graham & Farrell 1989). Sydämen toiminnan muuttuminen on tärkeää, jotta kala pystyy kompensoimaan lämpötilan laskun aiheuttamat vaikutukset sydämen toiminnalle ja pysymään näin aktiivisena

huolimatta alhaisista lämpötiloista. Kylmällä kaudella inaktiivisella ruutanalla (*Carassius carassius*) puolestaan kylmäakklimoitumisen on havaittu hidastavan sydämen toimintaa laskemalla syketiheyttä ja pidentämällä supistumisaikaa, mikä voidaan selittää tarpeella vähentää energiankulutusta kylmän kauden hapettomassa elinympäristössä (Matikainen & Vornanen 1992). Sydämen rakenteiden akklimoitumisesta esimerkkinä on myös tiiviin sydänlihaskerroksen paksuus, joka voi muuttua kalan akklimoituessa erilaisiin lämpötiloihin (Klaiman ym. 2011). Kirjolohilla kylmäakklimoitumisen on havaittu ohentavan tiiviin kerroksen paksuutta ja vastaavasti lisäävän hohkaisen kerroksen paksuutta. Lämpimään akklimoituminen puolestaan näyttää lisäävän tiiviin lihaskerroksen paksuutta.

Ilmastonmuutoksen aiheuttama vesistöjen lämpeneminen johtaa usein siihen, että kalalaji siirtyy lämpötilansietonsa mukaan viileämmille alueille kohti maapalon napoja tai vaihtoehtoisesti korkeammille alueille (Lassalle & Rochard 2009). Purotaimenet elävät virtaavissa vesissä vaeltamatta välillä avoimempiin vesiin, kuten järviin ja meriin. Virtaavissa vesissä elävien lajien levittäytyminen viileämmille alueille ei siis ole usein mahdollista, koska niiden elinympäristö rajoittuu maantieteellisesti vesistöjen verkostojen mukaisesti (Buisson ym. 2008). Tästä syystä vesien lämpeneminen on erityisen suuri riski purotaimenen selviytymiselle. Koska laji sietää vain suhteellisen pieniä lämpötilanvaihteluita ja sen siirtyminen viileämmille alueille on hankalaa, sille sopivien elinympäristöjen määrä on vaarassa vähentyä ilmastonmuutoksen edetessä.

### 1.6 Sarkoplasmakalvoston $Ca^{2+}$ -ATPaasin merkitys tonnikaloilla (*Thunnus*)

Valtaosa tonnikaloista (*Thunnus*) poikkeaa fysiologialtaan ektotermisistä kaloista, koska niiden elimistö kykenee ylläpitämään ympäristön lämpötilaa korkeampaa lämpötilaa lihaksissa, sisäelimissä, aivoissa ja silmissä varastoimalla aineenvaihdunnasta syntyvää lämpöä verenkierron erikoistuneilla lämpövaihtimilla (Carey & Teal 1966). Ruumiinlämmön ylläpitäminen ympäristön lämpötilaa korkeammalla tasolla mahdollistaa monien elimistön toimintojen, kuten ruuansulatuksen, hermoimpulssien kulun ja lihaksiston toiminnan nopeamman tason. Tämä puolestaan selittää tonnikaloilla esiintyvän korkean metabolianopeuden, aktiivisuuden sekä kyvyn liikkua nopeasti huolimatta ympäristön lämpötilan vaihtelusta. Tonnikaloilla kiduksista sydämeen virtaavan veren lämpötila vastaa kuitenkin ympäristön lämpötilaa ja sydämen supistuminen tapahtuu ympäristön lämpötilassa (Carey ym. 1984). Tonnikalat ovat siis vain osittain endotermisiä. Kyky säädellä elimistön lämpötilaa mahdollistaa tonnikalalajien levittäytymisen laajemmille alueille. Koska sydämen

toimintaympäristön lämpötila vastaa kuitenkin ympäristön lämpötilaa, on mahdollista, että tonnikalojen lämpötilojen sietoa rajoittaa erityisesti sydämen toiminnan asettamat rajoitukset lämpötilan muuttuessa (Shiels ym. 2011). Tonnikalat uivat meriveden eri lämpötilakerroksissa sekä kohtaavat sekä kylmiä että lämpimiä merivirtoja, joten niiden tulee sietää melko laajoja ja nopeita lämpötilan muutoksia (Carey ym. 1971).

Tonnikaloilla, kuten myös monilla muilla kaloilla, nopea lämpötilan kylmeneminen rajoittaa kalsiumionien kiertoa lihassoluissa aiheuttaen ongelmia sydämen toiminnassa, mutta kylmään elinympäristöön akklimatisoitumisen jälkeen kalsiumionien kierto mukautuu muuttuviin olosuhteisiin lisäämällä esimerkiksi SR:n kalsiumin merkitystä (Shiels ym. 2011). Sinievätonnikalalla (*Thunnus orientalis*) SR:n ja sytoplasman välisen kalsiumionien kierron tehostumisen on havaittu olevan elintärkeää etenkin akklimatisaatioissa kylmiin olosuhteisiin. SR:n kalsiumkierron tehostumisen arvellaankin olevan yksi tärkeimmistä keinoista, joilla ne kykenevät akklimatisoitumaan lämpötilan muutoksiin, etenkin lämpötilan kylmenemiseen. Shiels (2011) havaitsi tutkimusryhmineen, että sinievätonnikalan sydämen sydänlihassolujen SR:n määrä oli suurempi kylmäakklimoiduilla verrattuna lämminakklimoituihin yksilöihin. SR:n määrän lisääntyminen ja kalsiumin siirron tehostuminen ovat keinoja kompensoida kylmän ympäristön aiheuttamat muutokset sydämen toiminnassa. Vaikka kylmäakklimaatio näyttää tehostavan SR:n toimintaa osana kalsiumionien kiertoa, ei vielä tiedetä täysin, mistä tehostuminen varsinaisesti johtuu (Shiels ym. 2011). Mahdollisia syitä SR:n toiminnan tehostumiseen voisi olla esimerkiksi SR:n määrän lisääntyminen, SR:n  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPaasin aktiivisuuden lisääntyminen, ryanodiinireseptorien aktiivisuuden lisääntyminen, muutokset niitä säätelevissä proteiineissa tai muutokset SR:n sisäisen kalsiumin määrässä.

Tonnikalojen sydämen SR:n  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPaasin aktiivisuutta eri lämpötiloissa on tutkittu useissa tutkimuksissa (Landeira-Fernandez ym. 2004, Castilho ym. 2007, Landeira-Fernandez ym. 2012). Tutkimuksissa on havaittu, että tonnikalojen SR:n  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPaasin aktiivisuus on riippuvainen lämpötilasta. Aktiivisuus laskee lämpötilan laskiessa, minkä oletetaan olevan syynä matalissa lämpötiloissa ilmenevällä sydämen kammion relaksoitumisen hidastumiselle ja sen aiheuttamille ongelmille sydämen toiminnassa. Eri tonnikalalajien välillä on myös havaittu eroja kylmien lämpötilojen siedossa, jonka arvellaan johtuvan ainakin osittain SR:n  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPaasin määrällisistä eroista eri lajeilla (Landeira-Fernandez ym. 2004).

## 2 TUTKIMUKSEN TAVOITTEET JA HYPOTEEESIT

Tutkimuksen tarkoituksena oli selvittää puurotaimenen (*Salmo trutta fario*) SR:n  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPaasin toimintaa ja sen fysiologista merkitystä kalojen sopeutumisessa eri lämpötiloihin. Tutkimuksessa tarkasteltiin SR:n  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPaasin aktiivisuuden lämpötilariippuvuutta ja lämpötila-akklimaation vaikutusta aktiivisuuteen. Erityisesti tarkastelun kohteena oli  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPaasin korkeiden lämpötilojen sieto sekä erot eri lämpötiloihin akklimoitujen kalojen  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPaasin aktiivisuudessa. Tutkimuskysymykset olivat: (1) Onko sydämen SR:n  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPaasin lämpötilansiedolla merkitystä puurotaimenen akklimoitumisessa korkeisiin lämpötiloihin ja (2) onko SR:n  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPaasilla merkitystä puurotaimenen kyvyssä sietää ilmastonmuutoksen aiheuttamaa vesien lämpenemistä.

Tutkimuksessa oli kolme hypoteesia: H1: SR:n  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPaasin aktiivisuus on korkeampi kylmäakklimoituneilla taimenilla verrattuna lämminakklimoituihin taimeniin, H2: Kylmäakklimoitujen taimenten SR:n  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPaasin korkeiden lämpötilojen sieto on huonompi kuin lämminakklimoitujen taimenten, H3: Kylmän stenotermisillä puurotaimenilla SR:n  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPaasin korkeiden lämpötilojen sieto on huonompi kuin tonnikaloilla.

## 3 AINEISTO JA MENETELMÄT

### 3.1 Koe-eläimet

Tutkimuksen koe-eläiminä oli kahteen eri lämpötilaan akklimoituja ( $4^{\circ}\text{C}$  ja  $12^{\circ}\text{C}$ ) puurotaimenia ( $149,5 \pm 7,34\text{g}$ ,  $n=20$ , liite 2). Taimenet akklimoitiin Itä-Suomen yliopiston Joensuun kampuksen tiloissa kahdessa erillisessä kala-altaassa  $4^{\circ}\text{C}$  ja  $12^{\circ}\text{C}$  lämpötiloissa (aika  $>4$  viikkoa). Ne saivat ravinnokseen kolmesti viikossa ravintopellettejä (Ewos; Turku; Suomi). Valojakson pituus kala-altaissa oli 12 tuntia. Koe suoritettiin ensin 10 kalalla (5 kpl/akklimaatiolämpötila) neljässä lämpötilassa ( $15, 25, 35, 45^{\circ}\text{C}$ , koesarja 1) ja vielä 10 kalalla (5 kpl/akklimaatiolämpötila) pienemmillä lämpötilaväleillä neljässä lämpötilassa ( $25, 30, 35, 40^{\circ}\text{C}$ , koesarja 2). Kokeissa käytettyjen liuosten valmistuksesta vastasivat paitsi tutkimuksen tekijä, myös myöhemmässä vaiheessa erikoislaboratoriomestari Anita Kervinen.



### 3.2 Kalan preparointi ja kudoshomogenaatin valmistus

Taimen tainnutettiin iskulla päähän, jonka jälkeen se tapettiin leikkaamalla selkäydin selänpuolelta niskan kohdalta. Kala punnittiin ja sen pituus mitattiin. Sen sydäimestä preparoitiin käytettäväksi ainoastaan kammio poistamalla tummanpunainen eteinen sekä vaalea sidekudoksinen valtimokeko. Tämän jälkeen myös kammiot punnittiin ( $0,13 \pm 0,0053$ g, liite 2). Kammioista valmistettiin päivittäin tuoret kudoshomogenaatit jääkylmään homogenisointiliuokseen (Sakkaroosi 200mM, L-histidiini 40 mM, EDTA 1 mM,  $\text{NaN}_3$  10 mM, pH 7,8) suhteessa 1:29 (esim. 0,11 g kammiota, 3,19 ml homogenisointiliuosta). Homogenisointi tapahtui homogenisaattorilla homogenisoimalla kammio jäähauteessa tasalaatuisesti noin 100:lla männän edestakaisella liikkeellä. Kudoshomogenaatin valmistuksessa ei pyritty erottelemaan sentrifugoimalla eri soluelimiä, koska se voisi johtaa SR:n  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPaasin hävikkiin jo ennestään vähäisestä SR:n määrässä. Pieni määrä (0,2 ml) homogenaattia pakastettiin myöhemmin tehtävää proteiinimäärittystä varten.

### 3.3 Inkubointi

SR:n  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPaasin toimintaa mitattiin entsyymaattisesti neljässä eri lämpötilassa (15, 25, 35, 45 °C ja 25, 30, 35, 40 °C)  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPaasin aktiivisuuden perusteella. Aktiivisuus saatiin mitattua thapsigargiinin (TG) inhiboimana aktiivisuutena. *Thapsia garginica* -kasvista eristetty laktoni thapsigargiini toimii SR:n  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPaasin spesifisenä inhibiittorina (Lytton ym. 1991). Tästä syystä sitä hyödynnetään tutkimuksessa tarkasteltaessa lihassolujen kalsiumionihomeostasiaa esimerkiksi määritettäessä lihassoluissa tapahtuvaa kalsiumionien siirtoa (Rogers ym. 1995). Esimerkiksi Aho ja Vornanen (1998) havaitsivat, että thapsigargiinin konsentraatio 20  $\mu\text{mol/l}$  ( $\mu\text{M}$ ) riittää inhiboimaan SR:n  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPaasin toiminnan.

Inkubointiliuos 1 ei sisällä thapsigargiinia, mutta sitä on inkubointiliuoksessa 2 20  $\mu\text{M}$  lopullisena pitoisuutena. Inkubointiliuoksia pipetoitiin putkiin, joista toisessa thapsigargiini inhiboi SR:n  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPaasin, jolloin ainoastaan inhiboimattomat ATPaasit toimivat. Toisessa putkista ei ollut thapsigargiinia, jolloin liuoksessa toimivat sekä SR:n  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPaasi että muut inhiboimattomat ATPaasit. Pelkän SR:n  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPaasin aktiivisuus saadaan laskettua inkubointiliuoksien välisenä erotuksena SR:n  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPaasin toimintaan kuluneesta ATP:sta vapautuneen epäorgaanisen fosfaatin määrästä ( $\text{Mg-ATP} \xrightarrow{\text{Serca-ATPaasi}} \text{ADP} + \text{P}_i$ ). Inkuboinnin lopuksi lisättiin katkaisuliuos, jonka molybdaattireagenssi sai aikaan kellertävän kompleksin epäorgaanisen fosfaatin kanssa. Tällä tavalla liuoksen fosfaattikonsentraatio saatiin

mitattua spektrofotometrillä. Kokeet tehtiin virheiden vähentämiseksi kahdella rinnakkaisella putkella, joten neljään eri lämpötilaan tuli yhteensä 16 putkea.

Näytteiden fosfaattikonsentraatioon vaikuttaa myös muut näytteessä inkuboinnin aikana toimivat ATPaasit, joiden toiminta on joko estettävä tai otettava muulla tavoin huomioon. Tästä syystä inkubointiliuoksissa oli ouabaiinia, joka toimii solukalvon Na-K-ATPaasin inhibiittorina ja  $\text{NaN}_3$ , joka toimii mitokondriaalisen ATPaasin inhibiittorina. Homogenaatissa on kuitenkin myös muun muassa myofibrillien ATPaaseja ja solukalvon  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPaaseja, joiden toimintaa ei pystytä inhihoimaan. Tästä syystä hyödynnettiin thapsigarginin SR:n  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPaasin inhihoivaa vaikutusta käyttämällä kahta erillistä inkubointiliuosta, joista toisessa  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPaasi toimi ja toisessa thapsigargini inhihoi toiminnan. Näiden näytteiden erotuksena saatiin lopullinen SR:n  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPaasin aktiivisuus thapsigarginin inhihoimana aktiivisuutena.

Testilämpötilaan säädetyssä lämpöhauteessa koeputkiin lisättiin 900  $\mu\text{l}$  inkubointiliuosta (Hepes 20mM, KCl 200mM,  $\text{MgCl}_2$  15 mM,  $\text{NaN}_3$  10mM, EGTA 1 mM,  $\text{Na}_2\text{ATP}$  5 mM,  $\text{CaCl}_2$  1 mM, Ouabaiini 0,01 mM, Triton X-100 0,005%, pH 7,8) ja lämmön annettiin tasaantua 10 minuuttia. Reaktio käynnistettiin koeputkessa lisäämällä 100  $\mu\text{l}$  kudoshomogenaattia ja ravistamalla. Reaktio keskeytettiin 20 minuutin kuluttua lisäämällä 2,0 ml katkaisuliuosta (1 % Ammoniumheptamolybdaatti 1.8 N  $\text{H}_2\text{SO}_4$ ).

### 3.4 Fosfaattikonsentraation mittaaminen spektrofotometrillä

Näytteiden fosfaattikonsentraatio mitattiin 390 nm:n aallonpituudella spektrofotometrillä. Se mittaa näytteiden absorbanssin ja laskee suoraan näytteiden fosfaattikonsentraatiot ( $\mu\text{mol/l}$ ) standardisuoran avulla. Mittaaminen suoritettiin mahdollisimman nopeasti katkaisuliuoksen lisäämisen jälkeen. Tiedossa oleva absorbanssin ja konsentraation yhteydestä kertova standardisuora on saatu mittaamalla absorbanssit jo tiedossa olevista fosfaattikonsentraatioista. Standardisuoran teosta vastasi Anita Kervinen.

Liuoksen tausta-absorbanssi otettiin huomioon mittaamalla myös näytteet, joissa homogenaatti lisättiin vasta juuri ennen konsentraation mittaamista eli SR:n  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPaasi ei ole käyttänyt energianaan ATP:ta vapauttaen fosfaattia. Näin saatujen konsentraatioiden ja varsinaisten näytteiden konsentraatioiden erotus kertoo halutun fosfaattikonsentraation.

### 3.5 Proteiinimääritys

Proteiinimääritys suoritettiin Lowryn menetelmällä (Lowry et al. 1951) mittaamalla spektrofotometrillä näytteiden absorbanssit 500 nm:n aallonpituudella. Konsentraatiot saatiin valmiilta standardikuvaajalta. Proteiinimääritys tehtiin jokaisen taimenen kammion kudoshomogenaateista pakastetuista 0,2 ml näytteistä.

Homogenaateista pakastetut 0,2 ml näytteet sulatettiin ja siirrettiin 14 ml:n muovisiin putkiin. Näytteessä olevat proteiinit saostettiin lisäämällä 2 ml 10 % perkloorihappoa, minkä jälkeen näytteet sentrifugoitiin 10 minuuttia 3500 kierrosta/min huoneenlämmössä. Sentrifugoinnin jälkeen liuos kaadettiin sakan päältä pois ja valkoinen sakka liuotettiin 1 ml 1 N NaOH:ia. Tästä otettiin 0,2 ml näyte 14 ml muoviputkiin, joihin lisättiin 3 ml C:tä (C: sekoitettu 1 ml B:tä 50 ml A:ta juuri ennen koetta, A: 2 % Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 0,1 N NaOH:ssa, B: 0,5 % CuSO<sub>4</sub> x 5 H<sub>2</sub>O 1 %:ssa Na-sitraatissa), sekoitettiin ja annettiin liuosten seistä huoneenlämmössä tasan 10 minuuttia. Tämän jälkeen lisättiin sekoittaen 0,3 ml Folin-Ciocalteu-reagenssia laimennettuna deionisoitulla vedellä 1:1 ja annettiin liuoksen värin kehittyä 30 minuuttia. Näytteiden absorbanssit ja sen avulla saadut konsentraatiot (µg/l) mitattiin 500 nm:n aallonpituudella spektrofotometrillä. Virhelähteiden vähentämiseksi proteiinimääritys tehtiin kahdella rinnakkaisella näytteellä. Spektrofotometrin nollaukseen käytettiin deionisoitua vettä, joka oli käsitelty täsmälleen samalla tavalla kuin näytteet.

Proteiinimäärityksessä saadut proteiinikonsentraatiot täytyi suhteuttaa varsinaisessa kokeessa käytettyihin näytemääriin. Lowryn menetelmässä alkuperäistä homogenaattia otettiin 0,2 ml näyte, joka käsiteltiin perkloorihapolla proteiinien saostamiseksi ja sentrifugoitiin. Tämän jälkeen sakka liuotettiin 1 ml NaOH:ia. Varsinaiseen proteiinivärjäykseen otettiin 0,2 ml näyte eli vain 1/5 alkuperäisestä homogenaattinäytteen proteiinista. Lisäksi tulee ottaa huomioon se, että varsinaisessa kokeessa homogenaattia käytettiin 0,1 ml yhdessä putkessa. Näistä syistä johtuen proteiinimäärityksessä saadut proteiinikonsentraatiot kerrottiin 2,5, jotta saatiin todellinen proteiinin määrä yhdessä mittauksessa.

### 3.6 SR:n Ca<sup>2+</sup>-ATPaasi aktiivisuuden ja lämpötilariippuvuuden laskeminen

Spektrofotometrillä saaduista fosfaattikonsentraatioista laskettiin lopulliset SR:n Ca<sup>2+</sup>-ATPaasi aktiivisuudet sekä kammiokudoksen että proteiinin määrään (mg) suhteutettuna (µmol fosfaattia/mg proteiinia tai µmol fosfaattia/mg kudosta/h). SR:n Ca<sup>2+</sup>-ATPaasin aktiivisuutta kuvattiin siis sen käyttämästä ATP:sta vapautuneena fosfaatin määränä. Kudoksen määrä

yhdessä näytteessä saatiin ottamalla huomioon homogenisoinnissa käytetty kammiokudoksen laimennussuhde 1:29. Kun homogenaattia lisättiin kuhunkin näyteputkeen 0,1 ml, saadaan kammiokudoksen määräksi 3,45 mg/näyteputki. Yhdessä näyteputkessa olevan proteiinin määrään suhteutettu SR:n Ca<sup>2+</sup>-ATPaasin aktiivisuus saatiin laskettua hyödyntämällä proteiinimäärittelyssä saatuja proteiinikonsentraatioita.

$$\text{SR:n Ca}^{2+}\text{-ATPaasin aktiivisuus} = ((P_i/t)*V)/\text{mg}$$

P<sub>i</sub>: epäorgaanisen fosfaatin määrä (μmol/L)

t: inkubointiaika (min) = 20 min

V: lopullinen inkubointitilavuus (L) = 0,003 L

mg: kudoksen/ proteiinin määrä reaktiossa (mg)

SR:n Ca<sup>2+</sup>-ATPaasin aktiivisuuden lämpötilariippuvuudet (Q<sub>10</sub>-arvot) laskettiin lämpötilaväleille 15–25, 25–35 ja 35–45 °C (koesarja 1) sekä lämpötilaväleille 25–30, 30–35, 35–40 °C (koesarja 2). Lisäksi lämpötilariippuvuudet laskettiin suuremmille lämpötilaväleille. Lämpötilariippuvuus kuvaa lämpötilan vaikutusta SR:n Ca<sup>2+</sup>-ATPaasin aktiivisuuteen kertomalla, kuinka paljon aktiivisuus muuttuu lämpötilan noustessa 10 °C.

$$Q_{10} = (R_2/R_1)^{(10/T_2-T_1)}$$

R<sub>1</sub>: SR:n Ca<sup>2+</sup>-ATPaasin aktiivisuus T<sub>1</sub>:ssä

R<sub>2</sub>: SR:n Ca<sup>2+</sup>-ATPaasin aktiivisuus T<sub>2</sub>:ssa

T<sub>1</sub>: lämpötila, jossa aktiivisuus mitattu

T<sub>2</sub>: lämpötila, jossa aktiivisuus mitattu

### 3.7 Tilastollinen käsittely

Tutkimuksessa saatu aineisto käsiteltiin Microsoft Office Excel 2016 –ohjelmalla ja tilastolliset testit suoritettiin SPSS-ohjelmalla (IBM SPSS Statistics, versio 23). Kaikki tulokset on annettu keskiarvoina ± S.E.M. Tilastollisilla testeillä selvitettiin, onko SR:n Ca<sup>2+</sup>-ATPaasin aktiivisuudessa eroja eri testilämpötilojen ja eri akklimaatioryhmien välillä. Lisäksi testattiin, muuttuuko SR:n Ca<sup>2+</sup>-ATPaasin aktiivisuuden lämpötilariippuvuus eri lämpötilaväleillä, ja onko tässä eroja eri akklimaatioryhmien välillä. Tilastollisin testein tarkasteltiin myös taimenten painon, pituuden ja kammion painon eroja eri akklimaatioryhmissä sekä eri muuttujien riippuvuutta toisistaan.

Johtuen pienestä otoskoosta tulokset eivät ole täysin normaalijakauman mukaisia. Normaalijakautuneisuus ei toteudu, vaikka tulokset muuttaisi luonnolliseen logaritmiin. Tästä

syystä käytettiin ei-parametristä Kruskal-Wallisin yksisuuntaista ANOVA -testiä, joka ei vaadi tulosten normaalijakautuneisuutta. Testi tarkastelee mittaustulosten suuruusjärjestyksen mukaan annettujen järjestyslukujen eroja, ei keskiarvojen eroja. Kruskal-Wallisin-testin tilastollisen merkitsevyyden rajana käytetään  $p < 0,05$ .

## 4 TULOKSET

Tulokset on esitetty erikseen eri koesarjoina niin, että koesarja 1 tarkoittaa taimenia 1–10 ja koesarja 2 tarkoittaa taimenia 11–20. Koesarjoja ei voida verrata toisiinsa, koska koesarja 1:ssä käytettyjen inkubointiliuoksien  $\text{Na}_2\text{-ATP:n}$  huomattiin olleen osittain hajonnutta (katso 5.5 Tulosten luotettavuus ja tutkimuksen kehittäminen).

### 4.1 Sarkoplasmakalvoston $\text{Ca}^{2+}$ -ATPaasin aktiivisuus

SR:n  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPaasin aktiivisuutta ( $\mu\text{mol}$  fosfaattia/mg kudosta/h ja  $\mu\text{mol}$  fosfaattia/mg proteiinia/h) tarkasteltiin kymmenellä taimenella neljässä eri lämpötilassa (15, 25, 35, 45 °C, koesarja 1) ja kymmenellä taimenella tiheämmillä lämpötilaväleillä neljässä eri lämpötilassa (25, 30, 35, 40 °C, koesarja 2). Molemmissa koesarjoissa puolet taimenista oli kylmäakklimoituja (4 °C) ja puolet lämminakklimoituja (12 °C).

Proteiinin määrään suhteutetut ( $\mu\text{mol}$  fosfaattia/mg proteiinia/h) SR:n  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPaasin aktiivisuudet olivat luonnollisesti huomattavasti korkeammat kuin koko kudosta kohti ( $\mu\text{mol}$  fosfaatti/mg kudosta/h) lasketut aktiivisuudet, koska vain osa kudoksen massasta on proteiinia. Proteiinin määrä homogenaatissa mitattiin Lowryn menetelmällä ja suhteutettiin kokeessa käytettyyn näytemäärään. Proteiinin määrään suhteutettu SR:n  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPaasin aktiivisuus noudatti samanlaista trendiä kuin kudosta kohti laskettu aktiivisuus molemmissa koesarjoissa. Kuitenkin tilastollisella testauksella saadut merkitsevyyssarvot erosivat jonkin verran eri testilämpötilojen ja akklimaatioryhmien välille kudosta kohti laskettujen SR:n  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPaasin aktiivisuuden merkitsevyyssarvoista.

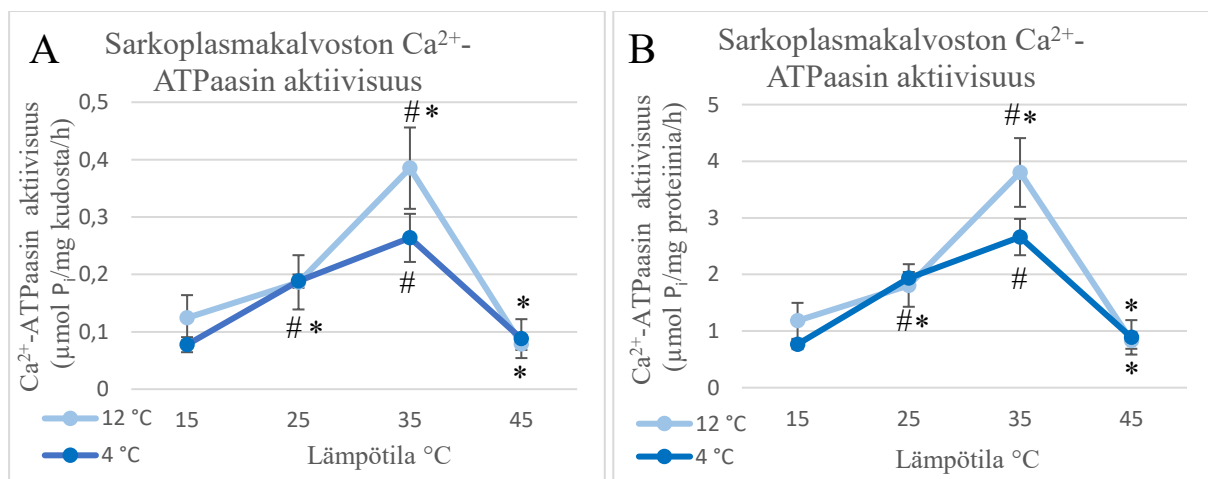
#### 4.1.1 Sarkoplasmakalvoston $\text{Ca}^{2+}$ -ATPaasin aktiivisuus koesarjassa 1

Koesarjassa 1 kylmäakklimoituilla taimenilla SR:n  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPaasin aktiivisuus ( $\mu\text{mol}$   $\text{P}_i$ /mg kudosta/h) kasvoi 15 °C:sta 25 °C:seen merkitsevästi ( $p=0,014$ ) (kuva 3A). Testilämpötilojen 25 °C ja 35 °C välillä havaittiin nouseva trendi, mutta aktiivisuudessa ei ollut merkitsevää eroa

( $p=0,251$ ). Kuitenkin 15 °C ja 35 °C välillä aktiivisuus nousi merkitsevästi ( $p=0,014$ ). Aktiivisuus puolestaan laski 35 °C:sta 45 °C:seen merkitsevästi ( $p=0,028$ ).

Lämminakklimoituilla taimenilla aktiivisuudessa havaittiin nouseva trendi testilämpötilojen 15 °C ja 25 °C välillä, mutta aktiivisuudessa ei ollut merkitsevää eroa ( $p=0,327$ ) (kuva 3A). Testilämpötilojen 25 °C ja 35 °C välillä aktiivisuus puolestaan kasvoi merkitsevästi ( $p=0,047$ ). Merkitsevä ero aktiivisuuksissa saatiin myös 15 °C ja 35 °C ( $p=0,027$ ) välille. Lisäksi aktiivisuus laski 35 °C:sta 45 °C:seen merkitsevästi ( $p=0,014$ ). Kylmä- ja lämminakklimoitujen taimenten välillä ei ollut tilastollisesti merkitsevää eroa SR:n  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPaasin aktiivisuudessa yhdessäkään testilämpötilassa koesarjassa 1.

Koesarjassa 1 SR:n  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPaasi aktiivisuudet ( $\mu\text{mol P}_i/\text{mg}$  proteiinia/h) suhteutettuna homogenaatissa olevan proteiinin määrään noudattivat samanlaista trendiä kudoksen määrään suhteutettujen aktiivisuuksin kanssa (kuva 3B). Aktiivisuus nousi merkitsevästi testilämpötilojen 15 °C ja 35 °C välillä (kylmäakklimoitunut  $p=0,014$ , lämminakklimoitunut  $p=0,027$ ) ja laski merkitsevästi 35 °C:sta 45 °C:seen (kylmäakklimoitunut  $p=0,016$ , lämminakklimoitunut  $p=0,014$ ). Kylmä- ja lämminakklimoitujen taimenten välillä ei ollut tilastollisesti merkitsevää eroa myöskään proteiinia kohden lasketuissa aktiivisuuksissa yhdessäkään testilämpötilassa koesarjassa 1.



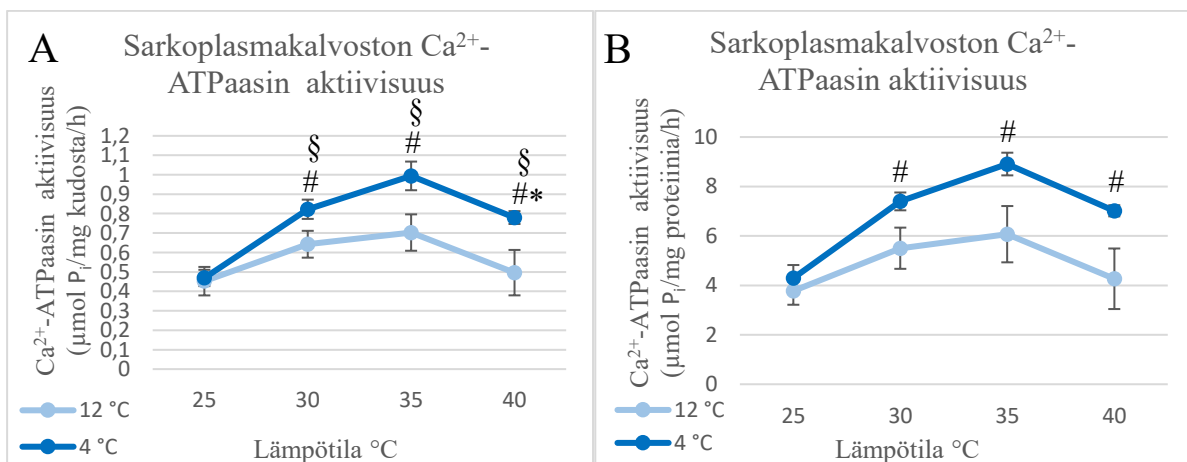
Kuva 3. Lämpötilan vaikutus sarkoplasmakalvoston  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPaasin aktiivisuuteen 4 °C:ssa ja 12 °C:ssa akklimoitujen puurotainten sydämen kammion homogenaatissa koesarjassa 1. A:  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPaasin aktiivisuus ( $\mu\text{mol P}_i/\text{mg}$  kudosta/h). B:  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPaasin aktiivisuus ( $\mu\text{mol P}_i/\text{mg}$  proteiinia/h). Tulokset ovat keskiarvoja  $\pm$  S.E.M. ( $n=4-5/\text{akklimaatioryhmä}$ ). Tilastolliset erot testattu Kruskal-Wallis-testillä: #: merkitsevä ero 15 °C:seen verrattuna akklimaatioryhmän sisällä. \*: merkitsevä ero edelliseen testilämpötilaan verrattuna akklimaatioryhmän sisällä. Tilastollisen merkitseyden rajana  $p<0,05$ .

#### 4.1.2 Sarkoplasmakalvoston Ca<sup>2+</sup>-ATPaasin aktiivisuus koesarjassa 2

Koesarjassa 2 kylmäaklimoiduilla taimenilla SR:n Ca<sup>2+</sup>-ATPaasin aktiivisuus (µmol fosfaattia/mg kudosta/h) kasvoi 25 °C:sta 30 °C:seen merkitsevästi (p=0,009) (kuva 4A). Aktiivisuudessa havaittiin nouseva trendi testilämpötilojen 30 °C ja 35 °C välillä, mutta nousu ei ollut tilastollisesti merkitsevä (p=0,076). Tilastollisesti merkitsevä ero löytyi kuitenkin 25 °C ja 35 °C väliltä (p=0,009). Testilämpötilojen 35 °C ja 40 °C välillä aktiivisuus laski merkitsevästi (p=0,047). Lisäksi 25 °C ja 40 °C välillä oli merkitsevä ero (p=0,009) niin, että aktiivisuus on merkitsevästi korkeampi 40 °C:ssa verrattuna 25 °C:seen. Lämminaklimoiduilla taimenilla eri testilämpötilojen välillä ei ollut tilastollisesti merkitseviä eroja. Lämpötilojen 15 °C ja 35 °C välillä voidaan kuitenkin havaita nouseva ja välillä 35 °C ja 40 °C puolestaan laskeva trendi.

Kylmä- ja lämminaklimoitujen taimenten SR:n Ca<sup>2+</sup>-ATPaasin aktiivisuudessa oli tilastollisesti merkitsevä ero testilämpötiloissa 30 °C (p=0,047), 35°C (p=0,028) ja 40 °C (p=0,047) (kuva 4A). Akklimaatioryhmien välillä ei kuitenkaan löytynyt merkitsevää eroa 25 °C:ssa (p=0,917).

Koesarjassa 2 SR:n Ca<sup>2+</sup>-ATPaasin aktiivisuus (µmol P<sub>i</sub>/mg proteiinia/h) suhteutettuna proteiinin määrään muuttui testilämpötilan noustessa samalla tavalla kuin kudoksen määrään suhteutetut aktiivisuudet (kuva 4B). Aktiivisuus nousi merkitsevästi kylmäaklimoiduilla taimenilla 25 °C ja 35 °C välillä (p=0,009) ja laski merkitsevästi 35 °C ja 40 °C välillä (p=0,016). Erona kudosta kohti laskettuihin aktiivisuuksiin, proteiinia kohden laskettujen SR:n Ca<sup>2+</sup>-ATPaasin aktiivisuuksissa kylmä- ja lämminaklimoitujen taimenten välillä ei ollut tilastollisesti merkitseviä eroja yhdessäkään testilämpötilassa.



Kuva 4. Lämpötilan vaikutus sarkoplasmakalvoston Ca<sup>2+</sup>-ATPaasin aktiivisuuteen 4 °C:ssa ja 12 °C:ssa akklimoitujen purotainten sydämen kammion homogenaatissa koesarjassa 2. A:

Ca<sup>2+</sup>-ATPaasin aktiivisuus (μmol P<sub>i</sub>/mg kudosta/h). B: Ca<sup>2+</sup>-ATPaasin aktiivisuus (μmol P<sub>i</sub>/mg proteiinia/h). Tulokset ovat keskiarvoja ± S.E.M. (n=5/akklimaatioryhmä). Tilastolliset erot testattu Kruskal-Wallis-testillä: #: merkitsevä ero 25 °C:seen verrattuna akklimaatioryhmän sisällä. \*: merkitsevä ero edelliseen testilämpötilaan verrattuna akklimaatioryhmän sisällä. §: merkitsevä ero akklimaatioryhmien välillä. Tilastollisen merkitsevyyden rajana p<0,05.

#### 4.2 Lämpötilariippuvuudet (Q<sub>10</sub>-arvot) eri lämpötilaväleille

SR:n Ca<sup>2+</sup>-ATPaasin aktiivisuuden lämpötilariippuvuudet (Q<sub>10</sub>-arvot) laskettiin lämpötilaväleille 15–25, 25–35 ja 35–45 °C (koesarja 1) ja 25–30, 30–35 ja 35–40 °C (koesarja 2) 4 °C ja 12 °C akklimoiduille taimenille. Lämpötilariippuvuudet laskettiin myös suuremmille lämpötilaväleille 15–35 °C, 15–45 °C ja 25–45 °C (koesarja 1) sekä väleille 25–35 °C, 25–40 °C ja 30–40 °C (koesarja 2).

Q<sub>10</sub>-arvo kertoo, kuinka paljon SR:n Ca<sup>2+</sup>-ATPaasin aktiivisuus muuttuu, kun lämpötila muuttuu 10 °C:lla eli se kuvaa aktiivisuuden riippuvuutta lämpötilasta. Kun Q<sub>10</sub> saa arvokseen 1, aktiivisuus ei muutu lainkaan lämpötilan muuttuessa 10 °C. Kun Q<sub>10</sub> > 1, aktiivisuus nousee ja vastaavasti Q<sub>10</sub> < 1, aktiivisuus laskee. Jos Q<sub>10</sub> saa arvokseen 2 tai enemmän, aktiivisuus vähintään kaksinkertaistuu lämpötilan muuttuessa 10 °C.

##### 4.2.1 Q<sub>10</sub>-arvot koesarjassa 1

Koesarjassa 1 kylmäakklimoiduilla taimenilla SR:n Ca<sup>2+</sup>-ATPaasin aktiivisuudesta lämpötilaväleille 15–25 °C, 25–35 °C ja 35–45 °C laskettu Q<sub>10</sub>-arvo pienenee lämpötilan noustessa (taulukko 1, kuva 5). Lämpötilavälien 15–25 °C ja 25–35 °C Q<sub>10</sub>-arvojen välillä löytyi merkitsevä ero (p=0,014). Myös lämpötilavälien 25–35 °C ja 35–45 °C välillä Q<sub>10</sub>-arvo laski merkitsevästi (p=0,009). Kylmäakklimoiduilla taimenilla lämpötilavälillä 15–25 °C Q<sub>10</sub>-arvo oli 2,7 eli aktiivisuus kasvaa yli kaksinkertaiseksi lämpötilan noustessa 15 °C:sta 25 °C:seen. Lämpötilavälillä 25–35 °C Q<sub>10</sub> saa arvokseen 1,4 eli aktiivisuus kasvaa, mutta kasvu on vähäisempää verrattuna lämpötilaväliin 15–25 °C. Lämpötilavälillä 35–45 °C Q<sub>10</sub>-arvo oli 0,3, mikä tarkoittaa, että aktiivisuus laskee voimakkaasti tällä välillä.

Koesarjassa 1 lämminakklimoiduilla taimenilla Q<sub>10</sub>-arvo on suurin lämpötilavälillä 25–35 °C, mutta laski merkitsevästi lämpötilavälille 35–45 °C (p=0,014) (taulukko 1, kuva 5). Lämpötilavälien 15–25 °C ja 25–35 °C välillä ei kuitenkaan löytynyt merkitsevää eroa Q<sub>10</sub>-arvossa (p=0,221). Q<sub>10</sub>-arvo oli kuitenkin merkitsevästi suurempi 15–25 °C lämpötilavälillä verrattuna 35–45 °C lämpötilaväliin (p=0,021). Lämminakklimoiduilla taimenilla



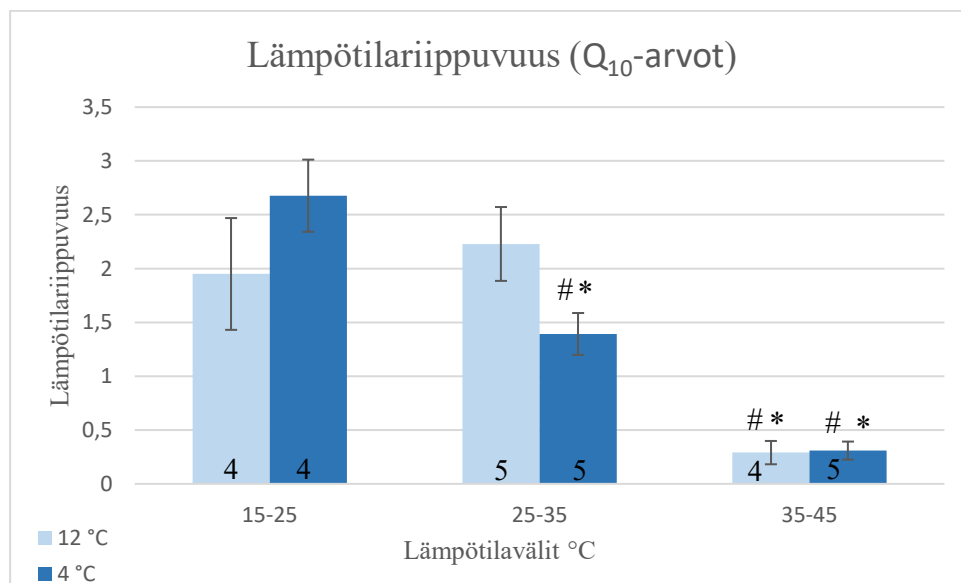
lämpötilavälillä 15–25 °C  $Q_{10}$ -arvo oli 1,95, jolloin aktiivisuus kasvaa melkein kaksinkertaiseksi tällä lämpötilavälillä. Lämpötilavälillä 25–35 °C  $Q_{10}$ -arvo oli 2,2 eli aktiivisuus nousee yli kaksinkertaiseksi. Lämpötilavälillä 35–45 °C  $Q_{10}$  oli 0,3 eli aktiivisuus laskee voimakkaasti.

Kylmä- ja lämminakklimoitujen taimenten SR:n  $Ca^{2+}$ -ATPaasin aktiivisuudesta laskettujen  $Q_{10}$ -arvojen välillä ei ollut tilastollisesti merkitsevää eroa yhdelläkään lämpötilavälillä (kuva 5). Aktiivisuus muuttuu siis samalla tavalla molemmissa akklimaatioryhmissä lämpötilan muuttuessa 10 °C.

Suuremmalla lämpötilavälillä 15–35 °C  $Q_{10}$  saa arvokseen noin 2 molemmissa akklimaatioryhmissä (taulukko 1, kuva 6). SR:n  $Ca^{2+}$ -ATPaasin aktiivisuus on siis melko voimakkaasti lämpötilariippuvaista kaksinkertaistuen lämpötilan noustessa 10 °C. Välillä 15–45 °C  $Q_{10}$ -arvo on lähellä 1 molemmissa akklimaatioryhmissä, mikä tarkoittaa, että aktiivisuus on yhtä suurta 15 °C:ssa ja 45 °C:ssa.

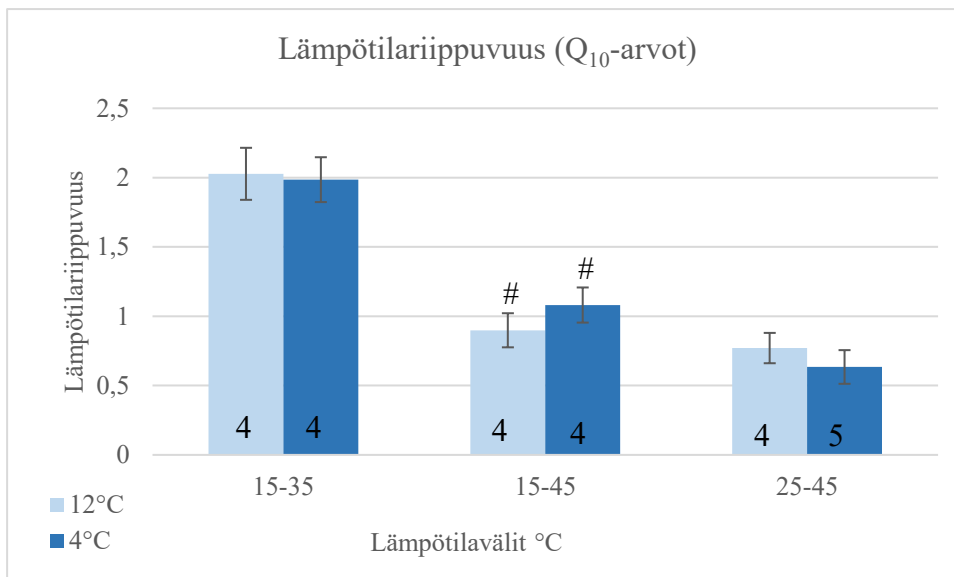
Taulukko 1. Lämpötilariippuvuudet ( $Q_{10}$ -arvot) taimenten sarkoplasmakalvoston  $Ca^{2+}$ -ATPaasin aktiivisuuksista 4 °C ja 12 °C akklimaatioryhmistä eri lämpötilaväleillä koesarjassa 1. Tulokset ovat keskiarvoja  $\pm$  S.E.M. (n=4–5/akklimaatioryhmä).

Akklimaatiolämpötila	Lämpötilaväli					
	15–25 °C	25–35 °C	35–45 °C	15–35 °C	15–45 °C	25–45 °C
4 °C	2,68 $\pm$ 0,33	1,39 $\pm$ 0,19	0,31 $\pm$ 0,084	1,99 $\pm$ 0,16	1,08 $\pm$ 0,13	0,63 $\pm$ 0,12
12 °C	1,95 $\pm$ 0,52	2,23 $\pm$ 0,34	0,29 $\pm$ 0,11	2,03 $\pm$ 0,19	0,90 $\pm$ 0,12	0,77 $\pm$ 0,11



Kuva 5. Lämpötilariippuvuudet ( $Q_{10}$ -arvot) taimenten sarkoplasmakalvoston  $Ca^{2+}$ -ATPaasin aktiivisuuksista eri lämpötilaväleillä koesarjassa 1. Lämpötilariippuvuudet ovat keskiarvoja  $\pm$  S.E.M. (n=4–5/akklimaatioryhmä). Tilastolliset erot testattu Kruskal-Wallis-testillä: #:

merkitsevä ero verrattuna edelliseen lämpötilaväliin akklimaatioryhmän sisällä. \*: merkitsevä ero verrattuna lämpötilaväliin 15–25 °C akklimaatioryhmän sisällä. Tilastollisen merkitsevyyden rajana  $p < 0,05$ .



Kuva 6. Lämpötilariippuvuudet ( $Q_{10}$ -arvot) taimenten sarkoplasmakalvoston  $Ca^{2+}$ -ATPaasin aktiivisuuksista suuremmille lämpötilaväleillä koesarjassa 1. Lämpötilariippuvuudet ovat keskiarvoja  $\pm$  S.E.M. ( $n=4-5$ /akklimaatioryhmä). Tilastolliset erot testattu Kruskal-Wallis-testillä: #: merkitsevä ero verrattuna edelliseen lämpötilaväliin akklimaatioryhmän sisällä. Tilastollisen merkitsevyyden rajana  $p < 0,05$ .

#### 4.2.2 $Q_{10}$ -arvot koesarjassa 2

Koesarjassa 2 kylmäakklimoiduilla taimenilla lämpötilavälien 25–30 °C ja 30–35 °C välillä  $Q_{10}$ -arvo laski merkitsevästi ( $p=0,016$ ) (taulukko 2, kuva 7). Lisäksi  $Q_{10}$ -arvo oli merkitsevästi suurempi välillä 30–35 °C verrattuna lämpötilaväliin 35–40 °C ( $p=0,009$ ). Myös lämpötilavälien 25–30 °C ja 35–40 °C välillä löytyi tilastollisesti merkitsevä ero ( $p=0,009$ ). Lämminakklimoitujen taimenten  $Q_{10}$ -arvo noudatti vastaavanlaista trendiä kuin kylmäakklimoitujen taimenten  $Q_{10}$ -arvot. Lämpötilavälien 25–30 °C ja 30–35 °C välillä  $Q_{10}$ -arvot laskivat merkitsevästi ( $p=0,028$ ). Samoin 30–35 °C ja 35–40 °C välillä ( $p=0,009$ ). Myös lämpötilavälien 25–30 °C ja 35–40 °C välillä löytyi merkitsevä ero ( $p=0,009$ ).

Lämpötilariippuvuuksien mukaan SR:n  $Ca^{2+}$ -ATPaasin aktiivisuus nousee voimakkaimmin lämpötilavälillä 25–30 °C, koska  $Q_{10}$ -arvo oli kylmäakklimoiduilla taimenilla 3,7 ja lämminakklimoiduilla taimenilla 2,4 (taulukko 2, kuva 7). Lämpötilavälillä 30–35 °C  $Q_{10} > 1$  eli aktiivisuus kasvaa, mutta vähemmän verrattuna ensimmäiseen lämpötilaväliin.

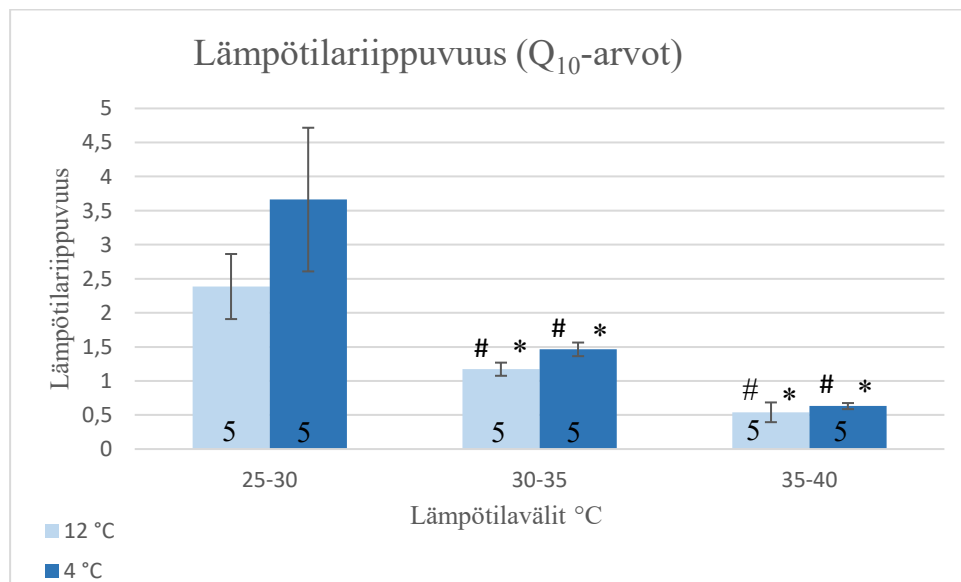
Lämpötilavälillä 35–40 °C aktiivisuus puolestaan laskee ( $Q_{10}<1$ ) molemmissa akklimaatioryhmissä.

Suuremmalla lämpötilavälillä 25–35 °C kylmäakklimoiduilla taimenilla  $Q_{10}$ -arvo on 2,2 eli SR:n  $Ca^{2+}$ -ATPaasin aktiivisuus kaksinkertaistuu (taulukko 2, kuva 8). Lämminakklimoiduilla taimenilla  $Q_{10}$ -arvo on puolestaan 1,6 eli aktiivisuus kasvaa, mutta vähemmän verrattuna lämminakklimoituihin taimeniin.

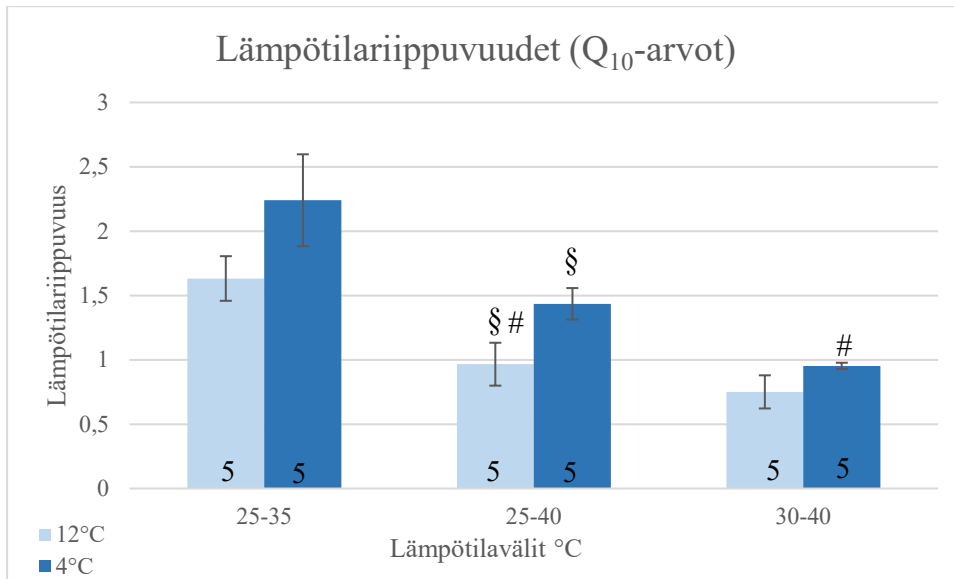
Koesarjassa 2 kylmä- ja lämminakklimoitujen taimenten välillä löytyi merkitsevä ero  $Q_{10}$ -arvoissa lämpötilavälillä 25–40 °C ( $p=0,047$ ) (kuva 8). Muilla lämpötilaväleillä ei löytynyt merkitseviä eroja SR:n  $Ca^{2+}$ -ATPaasin aktiivisuuksien mukaan lasketuista  $Q_{10}$ -arvoista eri akklimaatioryhmien väliltä.

Taulukko 2. Lämpötilariippuvuudet ( $Q_{10}$ -arvot) taimenten sarkoplasmakalvoston  $Ca^{2+}$ -ATPaasin aktiivisuuksista 4 °C ja 12 °C akklimaatioryhmistä eri lämpötilaväleillä koesarjassa 2. Lämpötilariippuvuudet ovat keskiarvoja  $\pm$  S.E.M. ( $n=5$ /akklimaatioryhmä).

Akklimaatiolämpötila	Lämpötilaväli					
	25–30 °C	30–35 °C	35–40 °C	25–35 °C	25–40 °C	30–40 °C
4 °C	3,66 $\pm$ 1,1	1,46 $\pm$ 0,10	0,63 $\pm$ 0,045	2,24 $\pm$ 0,36	1,44 $\pm$ 0,12	0,95 $\pm$ 0,025
12 °C	2,39 $\pm$ 0,48	1,17 $\pm$ 0,10	0,54 $\pm$ 0,14	1,63 $\pm$ 0,17	0,97 $\pm$ 0,17	0,75 $\pm$ 0,13



Kuva 7. Lämpötilariippuvuudet ( $Q_{10}$ -arvot) taimenten sarkoplasmakalvoston  $Ca^{2+}$ -ATPaasin aktiivisuuksista eri lämpötilaväleillä koesarjassa 2. Lämpötilariippuvuudet ovat keskiarvoja  $\pm$  S.E.M. ( $n=5$ /akklimaatioryhmä). Tilastolliset erot testattu Kruskal-Wallis-testillä: #: merkitsevä ero verrattuna edelliseen lämpötilaväliin akklimaatioryhmän sisällä. \*: merkitsevä ero verrattuna lämpötilaväliin 25–30 °C akklimaatioryhmän sisällä. Tilastollisen merkitsevyyden rajana  $p<0,05$ .



Kuva 8. Lämpötilariippuvuudet (Q<sub>10</sub>-arvot) sarkoplasmakalvoston Ca<sup>2+</sup>-ATPaasin aktiivisuuksista suuremmille lämpötilaväleille koesarjassa 2. Lämpötilariippuvuudet ovat keskiarvoja ± S.E.M. (n=5/akklimaatioryhmä). Tilastolliset erot testattu Kruskal-Wallis-testillä: §: merkitsevä ero akklimaatioryhmien välillä. #: merkitsevä ero verrattuna edelliseen lämpötilaväliin akklimaatioryhmän sisällä.

#### 4.3 Purotaimenten painon, pituuden ja kammion painon tarkastelu

Purotaimenten painojen keskiarvo oli  $149,5 \pm 7,3$  g ja niiden pituus oli  $24,5 \pm 0,43$  cm (liite 2). Sydämen kammiot painoivat  $0,13 \pm 0,0053$  g. Kylmäaklimoiduilla taimenilla painojen keskiarvo oli  $150,5 \pm 9,6$  g, pituuksien keskiarvo  $24,6 \pm 0,42$  cm ja kammion painojen keskiarvo  $0,12 \pm 0,0058$  g. Lämminaklimoiduilla taimenilla painojen keskiarvo oli  $148,5 \pm 12$  g, pituuksien keskiarvo  $24,5 \pm 0,78$  cm ja kammion painojen keskiarvo  $0,13 \pm 0,0091$  g. Akklimaatioryhmien väliltä ei löytynyt tilastollisesti merkitsevää eroa taimenten painoissa, pituuksissa tai kammion painoissa Kruskal-Wallis-testillä. Myöskään kammion suhteellisissa painoissa (kammion paino/kalan paino) ei ollut merkitsevää eroa akklimaatioryhmien välillä.

Muuttujien välistä riippuvuutta tarkasteltiin Spearmanin korrelaation avulla. Painon ja pituuden väliltä löytyi positiivinen korrelaatio ( $r_s = 0,951$ ,  $p < 0,001$ ). Positiivinen korrelaatio löytyi myös painon ja kammion painon väliltä ( $r_s = 0,672$ ,  $p = 0,001$ ) sekä kammion painon ja kalan pituuden väliltä ( $r_s = 0,603$ ,  $p = 0,005$ ).

## 5 TULOSTEN TARKASTELO

### 5.1 Lämpötilan vaikutus sarkoplasmakalvoston Ca<sup>2+</sup>-ATPaasin aktiivisuuteen

Tämän tutkimuksen tulokset antavat tukea sille, että lämpötilalla on vaikutusta SR:n Ca<sup>2+</sup>-ATPaasin aktiivisuuteen eli aktiivisuus on lämpötilariippuvaista. Koesarjassa 1 SR:n Ca<sup>2+</sup>-ATPaasin aktiivisuus kasvoi merkitsevästi sekä kylmä- että lämminakklimoituilla taimenilla testilämpötilan noustessa 15 °C:sta 35 °C:seen ja puolestaan laski merkitsevästi lämpötilan noustessa 35 °C:sta 45 °C:seen. Myös koesarjassa 2 kylmäakklimoituilla taimenilla SR:n Ca<sup>2+</sup>-ATPaasin aktiivisuus kasvoi merkitsevästi 25 °C:sta 35 °C:seen ja laski merkitsevästi välillä 35–40 °C. Lisäksi aktiivisuus oli 40 °C:ssa merkitsevästi korkeampi verrattuna aktiivisuuteen 25°C:ssa. Aikaisempien tutkimuksien vastaisesti koesarjassa 2 lämminakklimoituilla taimenilla ei kuitenkaan havaittu tilastollisesti merkitseviä eroja eri testilämpötilojen välillä. Aktiivisuus noudatti kuitenkin samanlaista trendiä, kuin kylmäakklimoitujen taimenten SR:n Ca<sup>2+</sup>-ATPaasin aktiivisuus.

SR:n Ca<sup>2+</sup>-ATPaasin aktiivisuudesta eri lämpötilaväleille lasketut Q<sub>10</sub>-arvot erosivat toisistaan merkitsevästi akklimaatioryhmän sisällä. Koesarjassa 2 Q<sub>10</sub>-arvo oli suurin matalimpien testilämpötilojen välillä ja laski testilämpötilojen noustessa. Tämä tarkoittaa, että alhaisemmissa lämpötiloissa 10 °C:n nousulla lämpötilassa on suurempi vaikutus SR:n Ca<sup>2+</sup>-ATPaasin aktiivisuuteen kuin samalla nousulla korkeammassa testilämpötiloissa. Tästä voi päätellä, että SR:n Ca<sup>2+</sup>-ATPaasin aktiivisuus muuttuu alhaisissa lämpötiloissa enemmän verrattuna korkeampiin lämpötiloihin. Koesarjassa 2 suuremmalle lämpötilavälille 25–35 °C laskettu Q<sub>10</sub>-arvo > 1,5 molemmissa akklimaatioryhmissä, mikä tarkoittaa, että myös tällä välillä SR:n Ca<sup>2+</sup>-ATPaasin aktiivisuus on lämpötilariippuvaista ja aktiivisuus nousee. Koesarjassa 1 suuremmalla lämpötilavälillä 15–35 °C Q<sub>10</sub>-arvo oli noin 2, mikä tarkoittaa sitä, että SR:n Ca<sup>2+</sup>-ATPaasin aktiivisuus kaksinkertaistuu, kun lämpötila nousee 10 °C. Koesarjassa 1 lämminakklimoitujen taimenten Q<sub>10</sub>-arvo saa pienemmän arvon lämpötilavälillä 15–25 °C verrattuna lämpötilaväliin 25–35 °C, mutta Q<sub>10</sub>-arvojen välillä ei ole merkitsevää eroa. Kylmäakklimoituilla taimenilla Q<sub>10</sub>-arvojen muutos vastaa koesarjan 2 Q<sub>10</sub>-arvojen muutosta lämpötilan noustessa.

Ympäristön lämpötilan muutoksien aiheuttamalla ruumiinlämpötilan muutoksilla on suuri vaikutus ektotermisten luukalojen elimistön toimintaan. Lämpötilalla on vaikutusta SR:n Ca<sup>2+</sup>-ATPaasin toimintaan ektotermisistä luukaloista esimerkiksi kirjolohilla, joilla SR:n Ca<sup>2+</sup>-ATPaasilla on myös havaittu olevan merkitystä sydämen toiminnassa (Da Silva ym. 2011).

SR:n  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPaasin aktiivisuus näyttää nousevat lämpötilan noustessa kohti sen toiminnan optimilämpötilaa sekä endotermisillä että ektotermisillä lajeilla (Bassani ym. 1994, Landeira-Fernandez ym. 2004, Castilho ym. 2007, Da Silva ym. 2011). Lisäksi SR:n  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPaasin aktiivisuus laskee, kun lämpötila nousee optimilämpötilan yläpuolelle ja lopulta inaktivoituu liian korkeassa lämpötilassa (Landeira-Fernandez ym. 2012). Optimilämpötilan on havaittu olevan riippuvainen esimerkiksi siitä, onko laji endoterminen vai ektoterminen. Tämän tutkimuksen perusteella purotaimenella SR:n  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPaasin toiminnan voidaan todeta olevan riippuvaista lämpötilasta ja SR:n  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPaasin aktiivisuuden muutokset lämpötilan noustessa vastaavat aikaisemmin saatuja tutkimustuloksia. Purotaimenen SR:n  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPaasin aktiivisuus kasvaa lähelle 35 °C ja laskee lämpötilan noustessa sen yläpuolelle. Sen SR:n  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPaasin optimilämpötila on siis lähellä 35 °C.

SR:n  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPaasin aktiivisuus on useissa tutkimuksissa osoitettu olevan riippuvaista lämpötilasta endotermisillä nisäkkäillä sekä osittain endotermisillä tonnikaloilla (Bassani ym. 1994, Landeira-Fernandez ym. 2004, Castilho ym. 2007). Endotermisillä lajeilla ruumiinlämpö pysyy kohtalaisen tasaisena huolimatta ympäristön lämpötilan muutoksista. Niiden sydän toimii suhteellisen tasaisessa lämpötilassa, minkä vuoksi sen toimintaan vaikuttavien ionikanavien ja –pumppujen täytyy pysyä aktiivisina ainoastaan ruumiinlämpöä vastaavassa suhteellisen vähän vaihtelevassa lämpötilassa. Da Silva (2011) havaitsi tutkimusryhmineen, että SR:n  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPaasin aktiivisuus on vähemmän lämpötilariippuvaista ektotermisellä kirjolohella verrattuna endotermiseen rottaan (*Rattus norvegicus*). Kirjolohella SR:n  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPaasi säilytti aktiivisuutensa 5 °C:sta 30 °C:seen laskien vain vähän lämpötilan laskiessa, kun puolestaan rotalla aktiivisuus laski voimakkaammin lämpötilan laskiessa sen ruumiinlämmön alapuolelle. Tämän tutkimuksen tulokset purotaimenella vastaavat kirjolohella saatuja tuloksia. Aktiivisuudessa on havaittavissa vastaavanlainen lämpötilasta johtuva muutos testilämpötilan noustessa, mutta aktiivisuutta pystytään kuitenkin ylläpitämään muuttuvassa lämpötilassa.

Kylmässä aktiiviset ektotermiset kalat kohtaavat elinympäristössään suuria kausittaisia sekä veden eri kerrostumien lämpötilanvaihteluita (Da Silva ym. 2011, Aho & Vornanen 1998). Ympäristön lämpötilan aiheuttama vaihtelu kalan elimistön lämpötilassa aiheuttaa muutoksia lämpötilalle herkissä fysiologisissa toiminnoissa. Esimerkiksi kalan sydämen toiminnan kannalta on tärkeää, että sen toimintaan vaikuttavat tekijät, kuten erilaiset ionikanavat ja –pumput, pystyvät toimimaan vaihtelevissa lämpötiloissa. SR:n  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPaasin aktiivisuuden ylläpitämisen lämpötilan muuttuessa arvellaan olevan tärkeä tekijä ektotermisten kalalajien

kyvyssä pysyä aktiivisena huolimatta ympäristön lämpötilan suurista kausittaisista muutoksista (Aho & Vornanen 1998).

## 5.2 Akkliimaatioryhmien erot sarkoplasmakalvoston $\text{Ca}^{2+}$ -ATPaasin aktiivisuudessa

Aho & Vornanen (1998) havaitsivat, että kalsiumin siirrossa SR:oon  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPaasin avulla on eroja kylmäakklimoitujen (4 °C) ja lämminakklimoitujen (17 °C) kirjolohien välillä. Myös ruutanan SR:n  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPaasin toiminnan havaittiin eroavan akkliimaatioryhmien välillä. Akkliimoitumisen vaikutukset olivat kuitenkin erilaisia kirjolohella verrattuna ruutanaan. Kylmäakkliimaatio lisäsi kalsiumionien sisäänottoa SR:oon kirjolohella, mutta vähensi ruutanalla. Tämän arveltiin johtuvan lajien erilaisista vasteista kylmään kauteen. Kirjolohi pysyy aktiivisena, kun puolestaan ruutana horrosta kyllällä kaudella. Kirjolohen täytyy aktiivisuuden ylläpitämiseksi pyrkiä kompensoimaan kylmyyden aiheuttamia ongelmia sydämen toiminnassa. Ruutanan puolestaan vähentää energiankulutustaan, muun muassa alentamalla sydämen sykettä, selvitäkseen kylmän kauden inaktiivisuudesta.

Tässä tutkimuksessa SR:n  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPaasin aktiivisuudet ( $\mu\text{mol}$  fosfaattia/mg kudosta/h) erosivat toisistaan merkitsevästi lämpötiloissa 30, 35 ja 40 °C koesarjassa 2. Samalla tavalla kuin ympäri vuoden aktiivisella kirjolohella (Aho & Vornanen 1998), myös purotaimenella kylmäakklimoitujen kalojen SR:n  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPaasin aktiivisuus oli korkeampi verrattuna lämminakklimoituihin kaloihin. Koesarjan 2 tulokset tukevat aikaisempia lohikaloilla saatuja tutkimustuloksia, joiden mukaan lämpötila-akkliimaatiolla on vaikutusta SR:n  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPaasin toimintaan (Aho & Vornanen 1998). Tulokset puoltavat myös kylmäakkliimaation SR:n  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPaasin toimintaa lisäävää vaikutusta kylmässä aktiivisilla lohikaloilla. Koesarjan 2 tulokset antavat siis tukea hypoteesille 1, jonka mukaan kylmäakklimoitujen taimenten  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPaasin aktiivisuus on korkeampi verrattuna lämminakklimoituihin taimeniin.

Koesarjan 2 tulokset antavat tukea sille, että kylmällä kaudella aktiivisena pysyvät ektotermiset lohikalat, kuten purotaimenet, pyrkivät kompensoimaan kylmien olosuhteiden aiheuttamia negatiivisia vaikutuksia sydämen toiminnassa lisäämällä SR:n merkitystä sydämen supistumisessa. Kylmäakklimoituiden taimenet siis pyrkivät SR:n  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPaasin aktiivisuuden korkeammalla tasolla kompensoimaan kylmän aiheuttamaa sydämen toiminnassa esiintyviä ongelmia, kuten sydämen relaksoitumisen ja syketaajuuden hidastumista. Näin niiden sydän kykenee toimimaan paremmin myös kylmissä lämpötiloissa.

Kylmäakklimoitumisen aiheuttaman SR:n  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPaasin korkeamman aktiivisuuden taustalla olevia syitä on tutkittu muun muassa tarkastelemalla kylmäakkliimaation vaikutuksia

SR:n  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPaasin ja sitä säätelevän PLB:n geenien ilmentymiseen sydämessä. Korajoki & Vornanen (2012) kuitenkin havaitsivat, että lämpötila-akklimaatiolla ei ole vaikutusta SR:n  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPaasin tai PLB:n ilmentymiseen sydämen kammiossa. Kylmäakklimoituilla kaloilla esiintyvän SR:n  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPaasin lisääntyneen aktiivisuuden taustalla oletetaan mahdollisesti olevan muutokset sitä säätelevän PLB:n aktiivisuudessa (Korajoki & Vornanen 2012).

SR:n  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPaasin aktiivisuuksista laskettujen  $Q_{10}$ -arvojen välillä ei ollut merkitsevää eroa akklimaatioryhmien välillä lukuun ottamatta lämpötilaväliä 25–40 °C koesarjassa 2. Tämän mukaan 10 °C nousu lämpötilassa vaikuttaa SR:n  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPaasin aktiivisuuteen pääsääntöisesti yhtä paljon molemmissa akklimaatioryhmissä. Koesarjassa 2 lämpötilavälillä 25–40 °C  $Q_{10}$  saa arvokseen lämminakklimoituilla taimenilla noin 1 ja kylmäakklimoituilla taimenilla noin 1,4. Lämminakklimoituilla taimenilla aktiivisuus ei siis muutu, kun puolestaan kylmäakklimoituilla aktiivisuus kasvaa tällä lämpötilavälillä. Tämä tukee edelleen käsitystä kylmäakklimaation SR:n  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPaasin aktiivisuutta lisäävästä vaikutuksesta.

### 5.3 Sarkoplasmakalvoston $\text{Ca}^{2+}$ -ATPaasin korkeiden lämpötilojen sieto

Tässä tutkimuksessa SR:n  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPaasin aktiivisuus laski molemmissa koesarjoissa kylmä- ja lämminakklimoituilla taimenilla 35 °C:sta 40 °C:seen. Tuloksista voidaan havaita, että 35 °C on lähellä purotaimenen SR:n  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPaasin aktiivisuuden optimilämpötilaa. Tulokset poikkeavat lohikaloilla aikaisemmin tehtyjen tutkimuksien tuloksista antaen suuremman SR:n  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPaasin aktiivisuuden optimilämpötilan. Lohikalojen SR:n  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPaasin toiminnan riippuvuutta lämpötilasta on tutkittu muun muassa hopealohella (*Onchorhynchus kisutch*) (Landeira-Fernandez m. 2012) ja kirjolohella (Da Silva ym. 2011). Sekä hopealohella että kirjolohella SR:n  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPaasin aktiivisuus oli korkeimmillaan 25–30 °C:ssa. Hopealohella testilämpötilan noustessa 35 °C:seen aktiivisuus puolestaan laski jyrkästi. Purotaimenen SR:n  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPaasin korkeiden lämpötilojen siedon voidaan tämän tutkimuksen tulosten perusteella sanoa olevan parempi verrattuna hopealohen ja kirjolohen SR:n  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPaasin korkeiden lämpötilojen sietoon. Huolimatta lajien sukulaisuudesta, eri lohikalojen välillä on kuitenkin huomattavia eroja esimerkiksi elinympäristöissä ja levinneisyysalueissa, mikä voi selittää niiden SR:n  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPaasin optimilämpötilassa esiintyviä eroja. Lisäksi täytyy ottaa huomioon se, että tulokset on saatu osittain eri menetelmillä, mikä voi johtaa eriäviin tuloksiin ja päätelmiin.

Koesarjassa 1 eri akklimaatioryhmien välillä ei ollut eroa korkeissa testilämpötiloissa (35 ja 45 °C) eikä lämpötilariippuvuuksissa lämpötilavälillä 35–45 °C. Koesarjan 1 tulokset eivät siis



annan tukea hypoteesille 2 eli lämminakklimoitujen taimenten SR:n  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPaasin korkeiden lämpötilojen sieto ei ole parempi verrattuna kylmäakklimoituihin taimeniin. Koesarjassa 2 eri akklimaatioryhmien välillä ei myöskään löytynyt merkitsevää eroa lämpötilariippuvuuksissa lämpötilavälillä 35–45 °C. Koska  $Q_{10}$ -arvoissa ei ollut merkitsevää eroa akklimaatioryhmien välillä, voidaan olettaa, että lämpötilan nouseminen optimilämpötilan yläpuolelle vaikuttaa yhtä paljon eri akklimaatioryhmien SR:n  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPaasin aktiivisuuteen. Myöskään koesarjan 2 tulokset eivät siis tue hypoteesia 2. SR:n  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPaasin aktiivisuuden riippuvuus lämpötilasta on yhtä suuri kyseisellä lämpötilavälillä, minkä vuoksi voidaan olettaa molemmilla akklimaatioryhmillä SR:n  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPaasin korkeiden lämpötilojen siedon olevan samanlainen.

Koesarjassa 2 eri akklimaatioryhmien väliltä löytyi merkitsevä ero SR:n  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPaasin aktiivisuudessa sekä 35 °C:ssa että 40 °C:ssa. Molemmissa testilämpötiloissa aktiivisuus oli korkeampi kylmäakklimoituilla taimenilla verrattuna lämminakklimoituihin taimeniin. Johtuen SR:n  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPaasin korkeammasta aktiivisuudesta korkeissa lämpötiloissa kylmäakklimoituilla taimenilla, voidaan todeta, että kylmäakklimoituilla taimenilla  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPaasi kykenee toimimaan tehokkaammin korkeissa lämpötiloissa verrattuna lämminakklimoituihin taimeniin. Korkeat lämpötilat eivät kuitenkaan vaikuta aktiivisuuteen enempää kylmäakklimoituilla verrattuna lämminakklimoituihin kaloihin, koska näiden lämpötilojen välillä  $Q_{10}$ -arvot eivät eronneet toisistaan merkitsevästi eli SR:n  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPaasin lämpötilariippuvuus oli samanlaista.

Purotaimenen lämpötilansiedon ylärajana pidetään noin 22–25 °C lämpötilaa (Elliott & Elliott 2010). Tämän tutkimuksen mukaan purotaimenen SR:n  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPaasin aktiivisuus on korkeimmillaan lähellä 35 °C. SR:n  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPaasin lämpötilansieto on siis varsin korkea verrattuna purotaimenen lämpötilansietoon. Tästä voidaan päätellä, että SR:n  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPaasin toiminnalla ei ole suoraa vaikutusta purotaimenen korkeiden lämpötilojen sietoon eli se ei ole rajoittavana tekijänä lämpötilansiedon kannalta. Kuitenkin aktiivisuuden  $Q_{10}$ -arvo oli suurempi lämpötilavälillä 25–30 °C verrattuna seuraavaan lämpötilaväliin 30–35 °C koesarjassa 2. SR:n  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPaasin aktiivisuuden kasvu siis hidastuu lämpötilan noustessa yli 30 °C:seen. Tämä tarkoittaa, että purotaimenen elinympäristöjen lämmitessä SR:n  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPaasin aktiivisuus kasvaa, mutta kasvu hidastuu, kun lämpötila nousee yli 30 °C:seen. Vertaamalla purotaimenen lämpötilansiedon ylärajaa 22–25 °C ja 35 °C:ssa esiintyvän SR:n  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPaasin korkeaa aktiivisuutta voidaan kuitenkin olettaa, että SR:n  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPaasilla ei todennäköisesti ole suurta merkitystä lajin sopeutumisessa ilmastonmuutoksen aiheuttamaan vesien lämpenemiseen.

Sydämen toiminnan oletetaan olevan yksi tärkeimmistä lämpötilansiedon rajatekijöistä ektotermisillä kaloilla (Pörtner ym. 2004, Ekström 2017). Korkeat lämpötilat vaikuttavat yleensä ensin eliön korkeamman tason toimintoihin, kuten koko elimistön toimintaan ja vasta lämpötilan noustessa edelleen esiintyy ongelmia matalamman tason, kuten solu- ja molekyyli-tason toiminnoissa (Lagerspetz 1987 Vornasen ym. 2014 mukaan). Purotaimenen sydämen toimintaa ja siihen vaikuttavia ionivirtauksia tutkittaessa on kuitenkin havaittu, että  $\text{Na}^+$ -ionien virtauksien korkeiden lämpötilojen sieto on huomattavasti alhaisempi verrattuna  $\text{Ca}^{2+}$ - ja  $\text{K}^+$ -ionien virtauksiin sekä sydämen korkeamman tason toimintoihin, kuten sydämen sykkeeseen (Vornanen ym. 2014).  $\text{Na}^+$ -virtausten heikkeneminen sydämessä puolestaan heikentää aktiopotentialin kulkeutumista sydämessä aiheuttaen muutoksia sydämen toiminnassa.  $\text{Na}^+$ -virtausten alhainen korkeiden lämpötilojen sieto verrattuna muihin ionivirtauksiin antaa viitteitä siitä, että se saattaa toimia rajoittavana tekijänä purotaimenen sydämen lämpötilansiedon kannalta.

#### 5.4 Purotaimenen sarkoplasmakalvoston $\text{Ca}^{2+}$ -ATPaasin korkeiden lämpötilojen sieto verrattuna tonnikaloihin

Yhtenä tutkimuksen hypoteeseista (H3) oli se, että stenotermisellä purotaimenella SR:n  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPaasin korkeiden lämpötilojen sieto on huonompi kuin tonnikaloilla. Hypoteesi 3 ei saa vahvistusta, koska molempien koesarjojen tuloksien mukaan SR:n  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPaasin aktiivisuuden optimilämpötilan oli purotaimen kammiossa lähellä 35 °C, kuten myös isosilmätonnikalan (*Thunnus obesus*) kammiossa sekä isosilmä-, sinievä-, valko- (*Thunnus alalunga*) ja keltaevätonnikalan (*Thunnus albacares*) eteisessä (Castilho ym. 2007, Landeira-Fernandez ym. 2012). Myös tonnikaloilla SR:n  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPaasin aktiivisuus on riippuvaista lämpötilasta (Landeira-Fernandez y. 2004, Landeira-Fernandez ym. 2012, Castilho ym. 2007).

Vertaamalla isosilmätonnikalan, hopealohen ja villikanin (*Oryctolagus cuniculus*) kammion SR:n  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPaasin toimintaa Landeira-Fernandez (2012) havaitsi tutkimusryhmineen, että  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPaasin optimilämpötila eli lämpötila, jossa  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPaasin aktiivisuus on korkeimmillaan ja kalsiumia siirretään tehokkaimmin, vaihtelee eri selkärankaisryhmillä. Isosilmätonnikalan kammion SR:n  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPaasin aktiivisuus on suurinta 35 °C:ssa mitattuna ATP:n hydrolyysissä vapautuneen fosfaatin määrän mukaan (Landeira-Fernandez ym. 2012). Hopealohen SR:n  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPaasin aktiivisuus puolestaan ei noussut merkitsevästi 25 °C:sta 30 °C:seen ja laski voimakkaasti lämpötilan noustessa 30 °C:sta 35 °C:seen. Myös isosilmä-, sinievä-, valko- ja keltaevätonnikalan eteisen SR:n  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPaasin aktiivisuuden on havaittu

olevan korkeimmillaan 35 °C:ssa (Castilho ym. 2007). Kalsiumin sisäänotto SR:oon kuitenkin laski isosilmätönnikalan kammiossa sekä sinievä-, valko- keltaevä- ja isosilmätönnikalan eteisessä lämpötilan noustessa 30 °C:sta 35 °C:seen (Castilho ym. 2007, Landeira-Fernandez ym. 2012). Hopealohen SR:n  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPaasin havaittiin olevan vähemmän riippuvainen lämpötilasta verrattuna isosilmätönnikalan ja villikanin  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPaasiin (Landeira-Fernandez ym. 2012). SR:n  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPaasi säilytti aktiivisuutensa hopealohella jopa 5 °C:ssa. Tässä tutkimuksessa ei mitattu SR:n  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPaasin toimintaa kalsiumin sisäänoton perusteella, joten tuloksia ei voida verrata kalsiumin sisäänoton perusteella mitattuihin tuloksiin tonnikaloilla. Koska Landeira-Fernandez (2012) havaitsi tutkimusryhmineen, että hopealohen ja isosilmätönnikalan SR:n  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPaasin korkeiden lämpötilojen siedossa on eroja kalsiumin sisäänotossa, ei ATP:n hydrolyysin määrässä, on mahdollista, että myös purotaimenella erot tonnikaloihin olisivat tulleet esille vasta mitattaessa kalsiumin sisäänottoa SR:oon.

## 5.5 Tulosten luotettavuus ja tutkimuksen kehittäminen

Tutkimustulosten luotettavuuteen vaikuttaa pieni aineisto ( $n=10$ /koesarja). Lisäksi koesarjan 1 mittaustulokset eroavat huomattavasti koesarjan 2 mittaustuloksista. Syyksi mittaustulosten eroavaisuuteen arvellaan olevan koesarjassa 1 käytetyssä inkubointiliuoksessa ATP:n lähteenä käytetyn  $\text{Na}_2\text{-ATP}$ :n osittainen hajoaminen tai sen kontaminoituminen ennen käyttöä. Tästä syystä SR:n  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPaasi ei saanut kokeessa tarvitsemaansa ATP:n energiaa käytettäväksi. Tällöin myös mitattava fosfaattikonsentraatio ja siitä laskettu SR:n  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPaasin aktiivisuus jäivät todellisista tilannetta alhaisemmaksi koesarjassa 1. Koesarjan 2 tuloksia voidaan tästä syystä pitää paremmin todellista aktiivisuutta vastaavana. Koesarjoja ei siis voida verrata toisiinsa, vaan ne käsitellään erillisinä otoksina. Koesarja 1:en mittaustuloksista kaksi 15°C:n ja yksi 45°C:n mittaustulos jouduttiin hylkäämään johtuen niiden virheellisistä negatiivisista arvoista. Tämä tarkoittaa, että koesarjassa 1 tuloksien keskiarvoissa on näissä lämpötiloissa huomioitu vain 4 taimenesta saadut tulokset ( $n=4$ ). Tämä pienensi entisestään aineiston kokoa.

Syitä siihen, miksi joidenkin mittaustulosten välille ei saatu merkitsevää eroa, voidaan esittää useita. Purotaimenilla voidaan olettaa olevan yksilökohtaisia eroja SR:n  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPaasin aktiivisuudessa, minkä vuoksi yhden testilämpötilan mittaustuloksissa oli vaihtelua. Tämä voidaan havaita keskiarvojen keskivirheen suuruutena monissa testilämpötiloissa. Tietysti mittaustuloksiin vaikuttavat myös mahdolliset epätarkkuudet, joita esiintyy esimerkiksi pipetoimisessa ja spektrofotometrin tulosten lukemisessa. Nämä todennäköisesti lisäävät

tuloksissa esiintyvää hajontaa ja sitä kautta vaikeuttavat tilastollisen merkitsevyyden saamista testilämpötilojen ja eri akklimaatioryhmien välille. Lisäksi ei-parametrinen Kruskal-Wallis-testi on parametrisiä testejä heikompi tuomaan esille tuloksissa esiintyviä tilastollisia eroja (Taanila 2010). Tämä johtuu siitä, että ei-parametrinen testi tarkastelee tulosten suuruusjärjestyksen mukaan annettujen järjestyslukujen eroja, ei keskiarvojen eroja, kuten esimerkiksi parametrinen yksisuuntainen ANOVA -testi. Tällöin menetetään tarkkojen mittaustulosten antamaa tietoa.

SR:n  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPaasin aktiivisuudet laskettiin sekä homogenaatissa olevaan kudoksen että proteiinin määrään suhteutettuna. Näiden välillä esiintyi eroja merkitsevyysarvoissa koesarjassa 2. Tämän taustalla on mahdollisesti se, että kokeissa käytetyssä homogenaatissa kudoksen määrän oletettiin olevan vakio, joten aktiivisuudet laskettiin käyttäen kudoksen määränä samaa arvoa jokaisessa mittaustuloksessa. Proteiininmäärityksessä saatujen proteiinin määrissä oli puolestaan jonkin verran vaihtelua, mikä todennäköisesti aiheutti enemmän vaihtelua myös proteiinin määrään suhteutetuissa SR:n  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPaasin aktiivisuuksissa. Tästä syystä testilämpötilojen ja akklimaatioryhmien välille saaduissa tilastollisissa merkitsevyyksissä oli eroja kudosta ja proteiinia kohti lasketuissa aktiivisuuksissa.

Tämän tutkimuksen keskeisiä kehittämiskohteita olisi suuremman aineistokoon käyttö, jotta saataisiin tarkempaa tietoa SR:n  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPaasista ja sen lämpötilansiedosta sekä vähennettäisi mahdollisten virheiden osuutta. Lisäksi suurempi aineisto mahdollistaisi tehokkaampien tilastollisten testien käytön, koska se todennäköisesti johtaisi mittaustulosten normaalijakaumaoletuksen toteutumiseen. Toisena kehittämiskohteena olisi  $\text{Na}_2\text{-ATP:n}$  toimivuuden varmistaminen käyttämällä tuoretta reagenssia ja ottamalla paremmin huomioon sen hajoamiseen ja mahdolliseen kontaminoitumiseen johtavat tekijät. Tässä tutkimuksessa  $\text{Na}_2\text{-ATP:n}$  osittaisen hajoamisen tai kontaminoitumisen oletettiin olevan syynä eriävälle tuloksille koesarjassa 1 ja 2. Tästä syystä niitä ei myöskään voitu verrata toisiinsa, mikä pienensi entuudestaan tutkimuksen verrattavissa olevan aineiston kokoa.

## 6 JOHTOPÄÄTÖKSET

Tämän tutkimuksen tulokset vahvistavat käsitystä siitä, että SR:n  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPaasin aktiivisuus on lämpötilariippuvaista eli lämpötilalla on vaikutusta sen aktiivisuuteen. SR:n  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPaasin aktiivisuus on lämpötilariippuvaista purotaimenilla, koska SR:n  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPaasin aktiivisuus muuttui lämpötilan muuttuessa ja aktiivisuudesta lasketut  $Q_{10}$ -arvot poikkesivat 1,0:sta ja erosivat toisistaan eri lämpötilaväleillä.

Koesarjan 2 tuloksien mukaan kylmäakklimoitujen taimenten SR:n  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPaasin aktiivisuus ( $\mu\text{mol Pi}/\text{mg kudosta}/\text{h}$ ) on korkeampi 30, 35, 40 °C:ssa verrattuna lämminakklimoituihin taimeniin, joten eri akkliimaatioryhmien välillä voitiin havaita eroja SR:n  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPaasin aktiivisuudessa. Tulokset siis antavat tukea sille, että kylmässä aktiivisilla lohikaloilla SR:sta vapautuvan kalsiumin ja sitä kautta SR:n  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPaasin merkitys kasvaa sydämen toiminnassa ympäristön lämpötilan laskiessa. Tällä kala pyrkii kompensoimaan kylmyyden aiheuttamia ongelmia, kuten syketaajuuden ja sydämen relaksoitumisen hidastumista sydämessä. Lämpötila-akkliimaatiolla ei kuitenkaan näytä olevan merkitystä SR:n  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPaasin kykyyn sietää korkeita lämpötiloja, koska aktiivisuus laskee yhdenmukaisesti molemmassa akkliimaatioryhmissä lämpötilan noustessa.

SR:n  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPaasin toiminnan ei voida tämän tutkimuksen perusteella olettaa olevan purotaiminen korkeiden lämpötilojen siedon kannalta rajoittavana tekijänä, koska sen aktiivisuus oli korkeimmillaan huomattavasti purotaiminen lämpötilansiedon ylärajaa 22–25 °C korkeammassa lämpötilassa 35 °C. Voidaan siis olettaa, että SR:n  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPaasilla ei ole merkitystä purotaiminen sopeutumisessa korkeisiin lämpötiloihin. Tulee kuitenkin ottaa huomioon se, että aktiivisuuden kasvu hidastui lämpötilan noustessa yli 30 °C:seen eli lämpötilan nousun myötä aktiivisuuden kasvu hidastuu. Purotaiminen elinympäristön lämpötilan nousulla olisi siis merkitystä SR:n  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPaasin aktiivisuuden kasvuun ja sitä kautta kalan sydämen toimintaan. Johtuen purotaiminen alhaisesta lämpötilansiedosta, voidaan kuitenkin olettaa, että sen sydämessä on mahdollisesti jokin toinen korkeiden lämpötilojen sietoa rajoittava tekijä, jonka toiminnasta esiintyy ongelmia jo alle 30 °C:ssa. Tästä syystä näyttää siltä, että SR:n  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPaasin korkeiden lämpötilojen siedolla ei olisi suurta merkitystä myöskään lajin sopeutumisessa ilmastonmuutoksen aiheuttamaan vesien lämpenemiseen.

Tämän tutkimuksen perusteella näyttää siltä, että purotaiminen SR:n  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPaasin korkeiden lämpötilojen sieto ei poikkea tonnikalojen SR:n  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPaasin korkeiden lämpötilojen siedosta. Tonnikaloilla tehtyihin aikaisempiin tutkimuksiin verrattessa tulee kuitenkin ottaa huomioon menetelmäkohtaiset erot SR:n  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPaasin aktiivisuutta tutkittaessa.

Purotaiminen ja muiden ektotermisten lajien korkeiden lämpötilojen sietoa rajoittavista tekijöistä tarvitaan lisää tutkimusta, jotta voidaan ennakoida ilmastonmuutoksen aiheuttamat vaikutukset lajien selviytymiseen ja levinneisyyteen. Erityisesti stenotermisten luukalojen tutkiminen on tärkeää, koska ne sietävät vain pieniä ympäristön lämpötilan muutoksia. Sydämen ja sen toimintaan vaikuttavia ionikanavia ja -pumppuja tutkimalla voidaan selvittää, mitkä tekijät heikentävät sydämen toimintaa lämpötilan noustessa. SR:n  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPaasin

toiminnan tutkiminen eri lämpötiloissa ja eri lämpötiloihin akklimoiduilla kaloilla edellyttää myös lisätutkimusta, koska sillä saadaan tärkeää tietoa lämpötilan vaikutuksista sydämen relaksoitumiseen. Lisäksi SR:n  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPaasin tutkiminen ektotermisillä lajeilla antaisi lisätietoa siitä, minkälainen merkitys SR:n kalsiumionivarastolla on sydämen supistumiseen verrattuna endotermisiin lajeihin. Erityisesti tutkimalla SR:n  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPaasin toimintaa matalissa testilämpötiloissa (0–10 °C) saataisiin tärkeää tietoa sen kylmänsiedosta ja siitä, minkälainen merkitys sillä on ektotermisten lajien kylmien lämpötilojen siedon kannalta.

## KIIITOKSET

Haluan kiittää Pro gradu -tutkielman ohjaajia Matti Vornasta ja Hanna Korajokea ohjauksesta, korvaamattomista neuvoista läpi tutkielman kirjoittamisen sekä tutkielman nopean etenemisen mahdollistamisesta. Hanna Korajokea kiitän myös avusta laboratoriotyöskentelyssä sekä tulosten tilastollisessa testauksessa. Lisäksi haluan kiittää erikoislaboratoriomestari Anita Kervistä kokeissa tarvittavien liuosten valmistamisesta sekä avusta spektrofotometrin käytössä.

## LÄHDELUETTELO

- Aho E., Vornanen M. 1998:  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase activity and  $\text{Ca}^{2+}$  uptake by sarcoplasmic reticulum in fish heart: effects of thermal acclimation. – *The Journal of Experimental Biology* 201: 525–532.
- Aho E., Vornanen M. 1999: Contraction Properties of Atrial and Ventricular Myocardium of the Heart of Rainbow Trout *Oncorhynchus Mykiss*: Effects of Thermal Acclimation. – *The Journal of Experimental Biology* 202: 2663–2677.
- Bassani J.W.M., Bassani R.A., Bers D.M. 1994: Relaxation in rabbit and rat cardiac cells: species-dependent differences in cellular mechanisms. – *Journal of Physiology* 476: 279–293.
- Bennett A.F. 1985: Temperature and Muscle. – *Journal of Experimental Biology* 115: 333–344.
- Bers D. M. 2000: Calcium Fluxes Involved in Control of Cardiac Myocyte Contraction. - *Circulation Research* 87: 275–281.
- Bers D.M. 2002: Cardiac excitation-contraction coupling. – *NATURE* 415: 198–205.
- Birkedal R., Christopher J., Thislethwaite A., Holly S. 2009: Temperature acclimation has no effect on ryanodine receptor expression or subcellular localization in rainbow trout heart. – *Journal of Comparative Physiology: B Biochemical, Systemic, and Environmental Physiology* 179: 961–969.
- Bone Q., Moore R.H. 2008: *Biology of Fishes*. – 478 s. Taylor & Francis. New York.
- Boyett M.R., Honjo H., Kodama I. 2000: The sinoatrial node, a heterogeneous pacemaker structure. – *Cardiovascular Research* 47: 658–687.
- Buisson L., Thuiller W., Lek S., Lim P., Grenouillet G. 2008: Climate change hastens the turnover of stream fish assemblages. – *Global Change Biology* 14: 2232–2248.
- Campbell N.A., Reece J.B. 2011: *Biology*. – 1309 s. Pearson Education. San Francisco.

- Carey F.G., Teal J.M. 1966: Heat conservation in tuna fish muscle. – Proceedings of the National Academy of Sciences 56: 1464–1469.
- Carey F.G., Teal J.M., Kanwisher J.W., Lawson K.D. 1971: Warm-bodied Fish. – American Zoologist 11: 137–145.
- Carey F.G., Kanwisher J.W., Don Stevens E. 1984: Bluefin tuna warm their viscera during digestion. – Journal of Experimental Biology 109: 1–20.
- Castilho P.C., Landeira-Fernandes A.M., Morrissette J., Block B.A. 2007: Elevated Ca<sup>2+</sup> ATPase (SERCA2) activity in tuna hearts: Comparative aspects of temperature dependence. – Comparative Biochemistry and Physiology 148: 124–132.
- Da Silva D., Costa D.C.F., Alves C.M., Block B.A., Landeira-Fernandez A.M. 2011: Temperature dependence of cardiac sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>-ATPase from rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. – Journal of Fish Biology 79: 789–800.
- Di Maio A., Block B.A. 2008: Ultrastructure of the sarcoplasmic reticulum in cardiac myocytes from Pacific bluefin tuna. – Cell and tissue research 334: 121–134.
- Driedzic W.R., Gesser H. 1988: Difference in force-frequency relationships and calcium dependency between elasmobranch and teleosts hearts. – Journal of experimental Biology 140: 227–241.
- Ekström A. 2017: Thermal tolerance in teleost fish – importance of cardiac oxygen supply, ATP production and autonomic control. – Väitöskirja. Department of Biological and Environmental Sciences, The faculty of Science, University of Gothenburg, 56 s, Gothenburg.
- Elliott J.M., Elliott J.A. 2010: Temperature requirements of Atlantic salmon *Salmo salar*, brown trout *Salmo trutta* and Arctic charr *Salvelinus alpinus*: predicting the effect of climate change. – Journal of Fish Biology 77: 1793–1817.
- Fabiato A. 1982: Calcium release in skinned cardiac cells: variation with species, tissue and development. – Federation Proceedings 41: 2238–2244.
- Farrell A.P. 1991: From Hagfish to Tuna: A Perspective on Cardiac Function in Fish. – Physiological Zoology 64: 1137–1164.
- Farrell A.P. 2009: Environment, antecedents and climate change: lessons from the study of temperature physiology and river migration of salmonids. – The Journal of Experimental Biology 212: 3771–3780.
- Farrell A.P., Pieperhoff S. 2011: Cardiac Anatomy in Fishes. – Teoksessa: Farrell A.P. (toim.), Encyclopedia of Fish Physiology: From genome to environment vol 3: 977–983. Academic Press. San Diego.
- Galli G.L.J. 2011: Cellular Ultrastructure of Cardiac Cells in Fishes. – Teoksessa: Farrell A.P. (toim.), Encyclopedia of Fish Physiology: From genome to environment vol. 3: 977–983. Academic Press. San Diego.
- Galli G.L.J., Shiels H.A. 2012: The Sarcoplasmic Reticulum in the Vertebrate Heart. – Teoksessa: Sedmera D., Wang T. (toim.), Ontogeny and Physiology of the Vertebrate Heart: 103–124. Springer. New York.
- Graham M.S., Farrell A.P. 1989: The Effect of Temperature Acclimation and Adrenaline on the Performance of a Perfused Trout Heart. – Physiological Zoology 62: 38–6.
- Gamperl A.K., Farrell A.P. 2004: Cardiac plasticity in fishes: environmental influences and intraspecific differences. – The Journal of Experimental Biology 207: 2539–2550.
- Györke S., Terentyev D. 2008: Modulation of ryanodine receptor by luminal calcium and accessory proteins in health and cardiac disease. – Cardiovascular Research 77: 245–255.
- Hokanson K.E.F. 1977: Temperature Requirements of Some Percids and Adaptations to the Seasonal Temperature Cycle. – Journal of the Fisheries Research Board of Canada 34: 1524–1550.

- Hove-Madsen L., Llach A., Tort L. 1999. Quantification of calcium release from the sarcoplasmic reticulum in rainbow trout atrial myocytes. – *European Journal of Physiology* 438: 545–552.
- Icardo J.M. 2012: *The Teleost Heart: A Morphological Approach*. – Teoksessa: Sedmera D., Wang T. (toim.), *Ontogeny and Phylogeny of the Vertebrate Heart*: 35–54. Springer Science & Business Media. New York.
- Irisawa H. 1978: Comparative Physiology of the Cardiac Pacemaker mechanism. – *Physiological reviews* 58: 461–498.
- Keen J.E., Vianzon D.m., Farrell A.P., Tibbits G.F. 1994: Effect of temperature and temperature acclimation on the ryanodine sensitivity of the trout myocardium. – *Journal of Comparative Physiology B* 164: 438–443.
- Kim H.W., Steenaert N.A., Ferguson D.G., Kranias E.G. 1990: Functional Reconstitution of the Cardiac Sarcoplasmic Reticulum Ca<sup>2+</sup>-ATPase with Phospholamban in Phospholipid Vesicles. – *The Journal of Biological Chemistry* 265: 1702–1709.
- Klaiman J.M., Fenna A.J., Shiels H.A., Macri J., Gillis T.E. 2011: Cardiac Remodeling in Fish: Strategies to Maintain Heart Function during Temperature Change. – *PloS One* 6: e24464.
- Korajoki H., Vornanen M. 2012: Expression of SERCA and phospholamban in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) heart: comparison of atrial and ventricular tissue and effect of thermal acclimation. – *The Journal of Experimental Biology* 215: 1162–1169.
- Lagerspetz K.Y. 1987: Temperature effect on different organization levels in animals. – *Symposia of the Society for Experimental Biology* 41: 429–449.
- Lai N.C., Graham J.B., Dalton N., Shabetai R., Bhargava V. 1998: Echocardiographic and Hemodynamic Determinations of the Ventricular Filling Pattern in Some Teleost Fishes. – *Physiological Zoology* 71: 157–167.
- Landeira-Fernandes A.M., Morrissette J., Blank J.M., Block B.A. 2004: Temperature dependence of the Ca<sup>2+</sup>-ATPase (SERCA2) in the ventricles of tuna and mackerel. – *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology* 286: R398–R404.
- Landeira-Fernandes A.M., Castilho, P.C., Block B.A. 2012: Thermal dependence of cardiac SR Ca<sup>2+</sup>-ATPase from fish and mammals. – *Journal of Thermal Biology* 37: 217–223.
- Lassalle G., Rochard E. 2009: Impact of twenty-first century climate change on diadromous fish spread over Europe, North Africa and the Middle East. – *Global Change Biology* 15: 1072–1089.
- Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J. 1951: Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent. – *The Journal of Biological Chemistry* 193: 25–275.
- Lytton J., Westlin M., Hanley M.R. 1991: Thapsigargin Inhibits the Sarcoplasmic or Endoplasmic Reticulum Ca-ATPase Family of Calcium Pumps. – *The Journal of Biological Chemistry* 266: 17067–17071.
- Matikainen N., Vornanen M. 1992: Effect of Season and Temperature Acclimation on the Function of Crucian Carp (*Carassius Carassius*) heart. – *The Journal of Experimental Biology* 167: 203–220.
- Olson K.R. 2011: *Circulatory System Design: Roles and Principles*. – Teoksessa: Farrell A.P. (toim.), *Encyclopedia of Fish Physiology: From genome to environment* vol. 3: 977–983. Academic Press. San Diego.
- Periasamy M., Kalyanasundaram A. 2007: Serca Pump Isoforms: Their Role in Calcium Transport and Disease. – *Muscle Nerve* 35: 430–442.
- Pieperhoff S., Bennett W., Farrell A.P. 2009: The intercellular organization of the two muscular systems in the adult salmonid heart, the compact and the spongy myocardium. – *Journal of Anatomy* 215: 536–547.



- Pörtner H.O., Mark F.C., Bock C. 2004: Oxygen limited thermal tolerance in fish?: Answers obtained by nuclear magnetic resonance techniques. – *Respiratory Physiology & Neurobiology* 141: 243–260.
- Randall D.J. 1968: Functional Morphology of the Heart in Fishes. – *American Zoologist* 8: 179–189.
- Reynolds W.W., Casterlin M.E. 1980: The Role of Temperature in the Environmental Physiology of Fishes. – Teoksessa: Ali M.A. (toim.), *Environmental Physiology of Fishes*. NATO Advanced Study Institutes Series vol 35:497–518. Springer. Boston.
- Rogers T.B., Inesi G., Wade R., Lederer W.J. 1995: Use of Thapsigargin to Study  $Ca^{2+}$  Homeostasis in Cardiac Cells. – *Bioscience Reports* 15: 341–349.
- Santer R.M. 1974: The organization of the sarcoplasmic reticulum in teleost ventricular myocardial cells. – *Cell and Tissue Research* 151: 395–402.
- Santer R.M., Walker G. M. 1980: Morphological studies on the ventricle of teleost and elasmobranch hearts. – *Journal of Zoology* 190: 259–272.
- Shiels H.A., Farrell A.P. 1997: The Effect of Temperature and Adrenaline on the Relative Importance of the Sarcoplasmic Reticulum in Contributing  $Ca^{2+}$  to Force Development in Isolated Ventricular Trabeculae from Rainbow Trout. *The Journal on Experimental Biology* 200: 1607–1621.
- Shiels H.A., Galli G.L.J. 2014: The Sarcoplasmic Reticulum and the Evolution of the Vertebrate Heart. – *Physiology* 29: 456–469.
- Shiels H.A., Di Maio A., Thompson S., Block B.A. 2011: Warm fish with cold hearts: thermal plasticity of excitation-contraction coupling in bluefin tuna. – *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 278: 18–27.
- Sutko J.L., Kenyon J.L. 1983: Ryanodine Modification of Cardiac Muscle Responses to Potassium-free Solutions. – *The Journal of General Physiology* 82: 385–404.
- Taanila A. 2010: Tilastollinen päättely.  
<http://www.helsinki.fi/~komulain/Tilastokirjat/12.%20Taanila-SPSS-p%E4%E4ttely.pdf>
- Taylor J.S., Van de Peer Y., Braasch I., Meyer A. 2001: Comparative genomics provides evidence for an ancient genome duplication event in fish. – *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences* 356: 1661–1679.
- Tirri R., Lehtonen J., Lemmetyinen R., Pihakoski S., Portin P. 2001: *Biologian sanakirja*. – 888 s. Otava. Vantaa.
- Varley M.E. 1967: *British Freshwater Fishes*. – 148 s. Fishing News (Books). London.
- Volff J-N. 2005: Genome evolution and biodiversity in teleost fish. – *Heredity* 94: 280–294.
- Vornanen M. 1996: Effect of extracellular calcium on the contractility of warm- and cold-acclimated crucian carp heart. – *Journal on Comparative Physiology* 165: 507–517.
- Vornanen M., Shiels H., Farrell A.P. 2002: Plasticity of excitation-contraction coupling in fish cardiac myocytes. – *Comparative Biochemistry and Physiology A* 132: 827–846.
- Vornanen M., Haverinen J., Egginton S. 2014: Acute heat tolerance of cardiac excitation in the brown trout (*Salmo trutta fario*). – *Journal of Experimental Biology* 217: 299–309.
- Williams G.S.B., Smith G.D., Sobie E.A., Saleet Jafri M. 2010: Models of cardiac excitation-contraction coupling in ventricular myocytes. – *Mathematical Biosciences* 226: 1–15.
- Wu K., Lytton J. 1993: Molecular cloning and quantification of sarcoplasmic reticulum  $Ca^{2+}$ -ATPase isoforms in rat muscles. – *American Journal of Physiology* 264: 333–341.

**MENETELMÄSSÄ KÄYTETYT LIUOKSET****LIITE 1****Homogenisointiliuos** (säilytys jääkaapissa)

Sakkaroori	200 mM
L-histidiini	40 mM
EDTA	1 mM
NaN <sub>3</sub>	10 mM
pH 7.8	

## Käyttöliuos:

Sakkarooosi	13,692 g
L-histidiini	1,241 g
EDTA	0,074 g
NaN <sub>3</sub>	0,130 g
Kokonaistilavuus	200 ml

**Inkubointiliuos -1** (säilytys pakastimessa 10 ml putkissa)

Hepes	20 mM
KCl	200 mM
MgCl <sub>2</sub>	15 mM
NaN <sub>3</sub>	10 mM
EGTA	1 mM
Na <sub>2</sub> ATP	5 mM
CaCl <sub>2</sub>	1 mM
Ouabaiini	0,01 mM
Triton X-100	0,005%

## Käyttöliuos:

Hepes	0,953g
KCl	2,982 g
MgCl <sub>2</sub>	0,610 g
NaN <sub>3</sub>	0,130 g
EGTA	0,076 g

Na <sub>2</sub> ATP	0,551 g
CaCl <sub>2</sub>	0,029 g
Ouabaiini	0,0015 g
Triton X-100	
Kokonaistilavuus	200 ml

**Inkubointiliuos -2:** Kuten inkubointiliuos -1, mutta lisätään ennen käyttöä 20 µM thapsigagiinia (lopullinen konsentraatio)

### Katkaisuliuos

a) 1 % Ammoniumheptamolybdaatti 1,8 N Rikkihappoon H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

1.8 N rikkihappoliuos:

Väkevä rikkihappo	50 ml
Deionisoitu vesi	
Kokonaistilavuus	500 ml

Ammoniumheptamolybdaatti	5 g
1.8 N rikkihappoliuos	500 ml
Kokonaistilavuus	500 ml (täytetään)

b) 1 % Lubrol W (tehdään päivittäin)

Lubrol W	0,25 g
deionisoitua vettä	25 ml
Kokonaistilavuus	25 ml

Käyttöliuos saadaan 1:1 a ja b

### Proteiinimäärityksessä käytetyt liuokset

**10 % perkloorihappo (valmis)**

**1 N NaOH:**

NaOH	4 g
deionisoitua vettä	100 ml
kokonaistilavuus	100 ml

**A: 2 % Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 0,1 N NaOH:ssa:**

0,1 N NaOH:

1 N NaOH	20 ml
deionisoitu vesi	180 ml

Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	4 g
0,1 N NaOH	200 ml
kokonaistilavuus	200 ml

**B: 0,5 % CuSO<sub>4</sub> x 5 H<sub>2</sub>O 1 %:ssa Na-sitraatissa**

1 % Na-sitraatti:

Na-sitraatti	0,25 g
deionisoitu vesi	25 ml

CuSO <sub>4</sub> x 5 H <sub>2</sub> O	0,125 g
1 % Na-sitraatti	25 ml
kokonaistilavuus	25 ml

**C: sekoitetaan 1 ml B:tä 50 ml:aan A:ta välittömästi ennen koetta**

A: 2 % Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> 0,1 N NaOH:ssa:	150 ml
B: 0,5 % CuSO <sub>4</sub> x 5 H <sub>2</sub> O 1 %:ssa Na-sitraatissa	3 ml
kokonaistilavuus	153 ml

**D: Folin-Ciocalteu-reagenssi laimennettuna vedellä (1:1)**

## TARKEMMAT TIEDOT KOE-ELÄIMISTÄ

## LIITE 2

	<b>Paino (g)</b>	<b>Pituus (cm)</b>	<b>Kammion paino (g)</b>	<b>Sukupuoli</b>	<b>Akklimaatiolämpötila</b>
<b>Taimen1</b>	89,82	20,5	0,08	♂	12 °C
<b>Taimen2</b>	153,34	25,1	0,11	♂	12 °C
<b>Taimen3</b>	167,26	26,2	0,15	♀	12 °C
<b>Taimen4</b>	205,82	27,3	0,18	♀	12 °C
<b>Taimen5</b>	188,9	27,5	0,13	♂	12 °C
<b>Taimen6</b>	162,91	26,2	0,13	♂	4 °C
<b>Taimen7</b>	145,42	24,8	0,12	♀	4 °C
<b>Taimen8</b>	122,85	23,3	0,11	♀	4 °C
<b>Taimen9</b>	153,37	25,1	0,11	♀	4 °C
<b>Taimen10</b>	135,6	23,7	0,11	♀	4 °C
<b>Taimen11</b>	144,14	25,4	0,12	♂	12 °C
<b>Taimen12</b>	108,84	21,5	0,11	♂	12 °C
<b>Taimen13</b>	144,65	24,2	0,15	♂	12 °C
<b>Taimen14</b>	170,92	25,3	0,15	♂	12 °C
<b>Taimen15</b>	111,09	21,7	0,15	♀	12 °C
<b>Taimen16</b>	136,7	23,8	0,11	♂	4 °C
<b>Taimen17</b>	219,53	26,8	0,16	♀	4 °C
<b>Taimen18</b>	122,91	23,2	0,11	♀	4 °C
<b>Taimen19</b>	178,57	25,8	0,15	♂	4 °C
<b>Taimen20</b>	127,01	23,2	0,13	♀	4 °C
<b>keskiarvot</b>	149,48	24,53	0,13		
<b>S.E.M.</b>	±7,34	±0,43	0,0053		

Kalan preparointi ja kammion homogenisointi

1. Tainnuta kala ja leikkaa selkäydin. Punnitse ja mittaa kalan pituus.
2. Avaa kalan vatsa varovasti kiduksiin asti ja etsi sydän.
3. Irrota sydän eteisestä aloittaen ja poista eteinen (tumma) sekä valtimokeko (vaalea).
4. Punnitse kammio ja laita se 1:29 jääkylmää homogenisointiliuosta.
5. Homogenisoi tasalaatuisesti noin 100 männän edestakaisella liikkeellä pitäen koko ajan jäähauteessa.
6. Laita pieni määrä homogenaattia (200 µl) pakastimeen proteiininmäärittystä varten.
7. Säilytä homogenaattia jäissä ja valolta suojattuna

Inkubointi lämpöhauteessa eri lämpötiloissa (katso pipetointitaulukko)

1. Pipetoi inkubointiliuokset (900 µl) putkiin ja anna lämpötilan tasaantua lämpöhauteessa 10 minuuttia.
2. Käynnistä reaktio lisäämällä homogenaatti (100 µl).
3. Reaktio keskeytetään 20 minuutin kuluttua lisäämällä katkaisuliuos (2 ml).
4. Nosta näytteet huoneenlämpöön ja mittaa niiden absorbanssi (standardikuvaaja antaa suoraan myös konsentraation) spektrofotometrillä valmiilla ohjelmalla 390 nm:n aallonpituudella.
5. Spektrofotometrin nollaukseen käytetään deionisoitua vettä.
6. Lisää blankkiputkiin homogenaatti vasta juuri ennen absorbanssin mittaamista.

### Pipetointitaulukko

Lämpötila	Liuos	Serca	Serca	blankki_serca	Tausta	Tausta	blankki-tausta
15 °C	Inkubointiliuos-1	0.9 ml	0.9 ml	0.9 ml	-	-	-
15 °C	Inkubointiliuos-2	-	-	-	0.9 ml	0.9 ml	0.9 ml
15 °C	Homogenaatti	0.1 ml	0.1 ml	0.1 ml	0.1 ml	0.1 ml	0.1 ml
15 °C	Katkaisuliuos	2.0 ml	2.0 ml	2.0 ml	2.0 ml	2.0 ml	2.0 ml
25 °C	Inkubointiliuos-1	0.9 ml	0.9 ml	0.9 ml	-	-	-
25 °C	Inkubointiliuos-2	-	-	-	0.9 ml	0.9 ml	0.9 ml
25 °C	Homogenaatti	0.1 ml	0.1 ml	0.1 ml	0.1 ml	0.1 ml	0.1 ml
25 °C	Katkaisuliuos	2.0 ml	2.0 ml	2.0 ml	2.0 ml	2.0 ml	2.0 ml
35 °C	Inkubointiliuos-1	0.9 ml	0.9 ml	0.9 ml	-	-	-
35 °C	Inkubointiliuos-2	-	-	-	0.9 ml	0.9 ml	0.9 ml

35 °C	Homogenaatti	0.1 ml	0.1 ml	0.1 ml	0.1 ml	0.1 ml	0.1 ml
35 °C	Katkaisuliuos	2.0 ml	2.0 ml	2.0 ml	2.0 ml	2.0 ml	2.0 ml
45 °C	Inkubointiliuos-1	0.9 ml	0.9 ml	0.9 ml	-	-	-
45 °C	Inkubointiliuos-2	-	-	-	0.9 ml	0.9 ml	0.9 ml
45 °C	Homogenaatti	0.1 ml	0.1 ml	0.1 ml	0.1 ml	0.1 ml	0.1 ml
45 °C	Katkaisuliuos	2.0 ml	2.0 ml	2.0 ml	2.0 ml	2.0 ml	2.0 ml