

Neuroendokrine mekanismer forbundet med tap av appetitt hos kjønnsmodnende røye (*Salvelinus alpinus*)

Linn Therese Warem

Mastergradsoppgave i fiskeri- og havbruksvitenskap (60 stp)

Studieretning: Oppdrettsbiologi

Mai 2014

FORORD

Endelig er målet nådd, og 5 år ved Norges fiskerihøgskole avsluttes med levering av mastergradsoppgaven. Tiden som student har vært utfordrende og svært lærerik, men i all hovedsak preget av et sterkt samhold mellom studentene, og god oppfølging av fagpersoner som dyrker en lidenskap for fisken og havet.

I den anledning ønsker jeg først og fremst å rette en stor takk til professor Even. H. Jørgensen. Tusen takk for din tålmodighet, ditt gode humør, og for en fantastisk veiledning både i forbindelse med masteroppgaven og i studietiden generelt.

Jeg ønsker også å takke overingeniør Chandra Sekhar Ravuri og tidligere masterstudent Hans Ivar Hestdahl for all hjelp på laboratoriet. Takk til Anja Striberny, Tanja Hanebrekke, Helge Tveiten og Helge Johnsen for gode råd og oppfølging. Takk til personalet ved Havbruksstasjonen for all assistanse under forsøk, og takk til alle på AMB for et trivelig opphold gjennom mastergraden.

Jeg vil gjerne takke mine medstudenter for mange flotte stunder sammen, og for at studietiden har vært alt annet enn kjedelig. En spesiell takk går til medstudent Maria Leitet for et godt samarbeid både på masterprosjektet, og gjennom studietiden generelt.

Takk til

Min familie, som alltid stiller opp

Lena som aldri glemte en eksamen

Veronica som alltid kom på besøk

Randi og Ivan for all støtte

Min beste venn, og samboer Fredrik, for at du gjorde livet så mye finere.

Tromsø, 15. Mai 2014



Linn Therese Warem

SAMMENDRAG

Variasjon i appetitt og vekst hos individer av røye (*Salvelinus alpinus*) ble undersøkt i sammenheng med sesong, kjønnsmodning og uttrykk av hypothalamiske appetittregulatorer som er velbeskrevet hos pattedyr, men lite studert hos fisk. Individene som ble brukt i forsøkene var avkom av anadrom røye fanget i Storsvannet i Hammerfest i 1984, som siden er blitt holdt ved Havbruksstasjonen i Tromsø. I forsøk 1 ble umoden fisk behandlet med kjønns hormonene testosteron, østradiol og 11-ketotestosteron i en periode på 2 uker i mars for å undersøke hvorvidt en økning i plasmakonsentrasjon av kjønns hormoner (testosteron, østradiol og 11-ketotestosteron), *per se.*, påvirker appetitt og uttrykk av hypothalamiske neuropeptider. Det ble deretter (forsøk 2) gjennomført prøvetaking for å undersøke de samme parametere hos umodne og modne individer i juni og august, for å undersøke hvorvidt røye taper appetitt i forbindelse med kjønnsmodning, og om dette kan knyttes til endrede uttrykk av antatte appetittregulatorer i hypothalamus.

Det ble ikke funnet en sammenheng mellom forhøyede plasmanivå av kjønns hormoner og appetitt og vekst hos fisken i mars. Det ble heller ikke funnet store endringer i antatte hypothalamiske appetittregulatorer som følge av kjønns hormonbehandling, noe som heller ikke var ventet, gitt den manglende effekten av kjønns hormoner på appetitt og vekst.

Individ samlet i august hadde et lavere mageinnhold av fôr enn fisk samlet i juni, uavhengig av kjønnsmodningsstatus, sannsynligvis som følge av at de hadde oppnådd en tilstrekkelig størrelse og/eller energistatus i mellomtiden.

Det ble ikke funnet en sammenheng mellom tap av appetitt og uttrykk av neuropeptider som antas å være involvert i appetittregulering hos fisk. Det ble imidlertid observert et lavere uttrykk av *LepAI* i hypothalamus hos fisk som hadde mistet appetitt på høsten, noe som antyder en annen mekanisme av leptin i hjernen hos fisk enn den anorexigene rollen som dette hormonet har hos pattedyr, og som også er funnet i forbindelse med korttidsregulering av appetitt hos fisk tidligere. Forsøket er et av de svært få som har undersøkt neuroendokrine mekanismer knyttet til «frivillig» langtidsregulering av appetitt hos fisk. Resultatene antyder at denne reguleringen ikke omfatter endrede mRNA uttrykk av hypothalamiske neuropeptider som er sentrale i appetittregulering hos pattedyr. I videre studier må en derfor 1) inkludere analyser av peptidmengde for å undersøke muligheten for en posttranskriptorisk regulering og 2) inkludere flere potensielle neurale appetittregulerende neuropeptider.

INNHold

1.0.	INNLEDNING	1
1.1.	Utbredelse og biologi	1
1.2.	Tap av appetitt under kjønnsmodning	1
1.3.	Neuroendokrin regulering av appetitt hos fisk	3
1.3.1.	Vekst og appetitt hos fisk	3
1.3.2.	Sentrale appetittregulatorer	4
1.3.3.	Hormonet leptin.....	4
1.4.	Hensikt.....	6
2.0.	MATERIAL OG METODE.....	7
2.1.	Fisk og forsøksbetingelser.....	7
2.2.	Forsøksdesign.....	7
2.2.1.	Merking av fisk	7
2.2.2.	Pilotforsøk	8
2.2.3.	Forsøk 1	9
2.2.4.	Forsøk 2.....	10
2.3.	Analyser.....	10
2.3.1.	Hormonanalyser	11
2.3.2.	Analyser av genuttrykk i hypothalamus	15
2.4.	Databehandling og statistikk	21
3.0.	RESULTATER	22
3.1.	Forsøk 1.....	22
3.1.1.	Vekt	22
3.1.2.	Kondisjonsfaktor	24
3.1.3.	Mageinnhold.....	27
3.1.4.	Kjønns hormoner.....	28
3.1.5.	Genuttrykk.....	31
3.2.	Forsøk 2.....	34
3.2.1.	Vekt	34
3.2.2.	Kondisjonsfaktor	35
3.2.3.	Mageinnhold.....	36
3.2.4.	Gonadosomatisk Index	37
3.2.5.	Kjønns hormoner.....	38

INNHold

3.2.6.	Genuttrykk	41
4.0.	DISKUSJON	44
4.1.	Forsøk 1	44
4.1.1.	Vekst og appetitt	44
4.1.2.	Appetittregulatorer	46
4.1.3.	Leptin	47
4.2.	Forsøk 2	49
4.2.1.	Mageinnhold og kondisjonsfaktor	49
4.2.2.	Kjønns hormoner	50
4.2.3.	Appetittregulatorer	51
4.2.4.	Leptin	53
4.3.	Sammenfatning forsøk 1 og forsøk 2	54
5.0.	KONKLUSJON	55
6.0.	REFERANSER	56
7.0.	VEDLEGG	61
7.1.	Vedlegg 1 & 2: Resultater fra pilotforsøk	61
7.2.	Vedlegg 3: Ethanol precipitation Protocol	66

1.0. INNLEDNING

1.1. Utbredelse og biologi

Arktisk røye, *Salvelinus alpinus*, tilhører laksefamilien, og finnes i elver og i oligotrofe innsjøer i sitt cirkumpolare utbredelsesområde (Klemetsen *et al.*, 2003). Røya er verdens nordligste ferskvannsfisk, og finnes opp til 82 °N (Johnson, 1980). I den nordligste delen av sitt utbredelsesområdet kan arten etablere et anadromt livsmønster, som innebærer klekking og oppvekst i ferskvann, og næringsvandring til sjø om sommeren før den returnerer til oppvekstområdet hvor gytingen finner sted (Myers, 1949). Røye foretar flere migrasjoner til sjø gjennom livet, både før og etter at den har gjennomgått kjønnsmodning, men det finnes også individer som aldri migrerer til sjø i sjøvandrende populasjoner (residente individer), og «landlocked» populasjoner i innsjøer hvor de ikke har muligheten til å foreta en vandring til sjø (Rounsefell, 1958). Nordeuropeisk røye, både stasjonær og anadrom, gyter normalt om høsten, mellom september og november, og er kjent for å ha stor variasjon i valg av gytelokalitet (Johnson, 1980).

1.2. Tap av appetitt under kjønnsmodning

Tidspunkt for kjønnsmodning og gyting er for en rekke fiskearter sterkt forbundet med en spesifikk årstid (Oliveira & Sánchez-Vázquez, 2010), mens alder ved første kjønnsmodning avhenger av tilstrekkelig kroppsstørrelse, og/eller energireserver i form av for eksempel fettlagre (Thorpe *et al.*, 1998). Disse forutsetningene er med på å øke overlevelsesevnen, ettersom kjønnsmodning er en svært energikrevende prosess. Likevel er det vist at hos en rekke fiskearter opphører matinntaket i forbindelse med kjønnsmodning, noe som er et svært interessant valg av strategi sett fra et overlevelsesperspektiv. Kjønnsmodning medfører reduksjon i vekst hos blant annet atlantisk laks, *Salmo salar* (Berglund *et al.*, 1992), og hos vill atlantisk laks som returnerer til ferskvann for å gyte, opphører på et tidspunkt matinntaket frem til den er ferdig gytt. Det samme ses hos kjønnsmodnende laks som holdes i kar eller merder hvor fisken har mat tilgjengelig (Kadri *et al.*, 1997). Det vist at tidspunkt for reduksjonen i matinntak varierer mye mellom individer, på samme måte som at også tidspunkt for gyting varierer (Kadri *et al.*, 1997). Dette indikerer at tap av appetitt ikke bare er

styrt av årstidsinformasjon, men at fysiologiske endringer som skjer under kjønnsmodning innvirker på denne reguleringen.

Det er markerte temporale endringer i matinntak og vekst hos røye, selv hos individer i forskningsanlegg som holdes under konstant temperatur, og som har fri tilgang på mat (Tveiten *et al.*, 1996). Hos avkom av anadrom røye er det vist at appetitt avtar fra begynnelsen av juli hos individer som skal kjønnsmodne den kommende høst, og at de har sluttet å spise i månedsskiftet august-september, ca. en måned før gyting (Tveiten *et al.*, 1996). Reduksjonen i appetitt var i dette studiet omvendt proporsjonal med økningen av kjønns hormoner i plasma om høsten. Plasmanivå av kjønns hormoner hos individer som skal kjønnsmodne, øker svakt i perioden februar til mai, og denne økningen oppstår når fisken går inn i «sommerfasen», hvor den har et høyt matinntak og kraftig vekst. På ettervinteren har individene med de høyeste plasmanivåene av kjønns hormoner, også den høyeste vekstraten (Tveiten *et al.*, 1998). En direkte sammenheng mellom appetitt og kjønns hormoner er påvist hos atlantisk laks ved at implantering av 11-ketotestosteron og testosteron førte til en økning i kondisjonsfaktor om våren og tidlig på sommeren, mens implantering av disse kjønns hormonene tidlig på sommeren og høsten reduserte vekst og kondisjonsfaktor (Berglund *et al.*, 1992).

Det er åpenbart at temporale endringer i appetitt og vekst sammenfaller med endringer i plasmanivå av kjønns hormoner hos laksefisk, men det er fortsatt ikke klart hvorvidt kjønns hormoner er en proksimat faktor i appetittregulering hos fisk. Dette indikerer at sesong må være en medvirkende faktor, ettersom økt plasmanivå av kjønns hormoner tidlig på sommeren sammenfaller med økt matinntak og vekst, mens økningen om høsten sammenfaller med redusert matinntak og vekst.

1.3. Neuroendokrin regulering av appetitt hos fisk

1.3.1. Vekst og appetitt hos fisk

Reguleringen av appetitt er en viktig mekanisme for opprettholdelse av energibalanse hos en organisme. Energibalansen er forholdet mellom energiinntak og forbruk, og hos pattedyr vil denne være nøye regulert slik at kroppsmassen holdes stabil over tid (Schwartz *et al.*, 2000). Denne reguleringen er mye studert, og vel beskrevet hos pattedyr. Her opprettholdes energibalansen over tid ved at hjernen henter inn informasjon om tilgjengelige energireserver i perifere organer og vev, behandler signalene, og styrer appetitt og energiforbruk slik at de tilpasses den ernærings situasjonen organismen befinner seg i på et gitt tidspunkt (Yamada & Katagiri, 2007).

Metabolismen er ikke en serie individuelle prosesser, men en sammensatt, integrert prosess som involverer ulike organer og vev, og som krever at det finnes kommunikasjon mellom disse. Denne kommunikasjonen er helt essensiell for opprettholdelse av energibalansen (Yamada & Katagiri, 2007). Reguleringen av energibalansen involverer mekanismer som agerer på kort sikt, og mekanismer som agerer på lang sikt. Kortsiktige mekanismer kan være størrelse og hyppighet på måltider, mens de langsiktige er de som regulerer kroppsvekt og energistatus over tid. Hos voksne pattedyr og fugl er kroppsvekt og energistatus noenlunde stabile over år, selv om måltidenes størrelse og hyppighet kan variere mye på kortsiktig basis (Schwartz *et al.*, 2000).

Fisk vokser gjennom hele livet, og skiller seg på den måten fra pattedyr og fugl. En kan likevel snakke om energibalanse hos fisk ettersom matinntak, energistatus og kroppsvekt synes å være under streng kontroll så lenge mattilgang, temperaturforhold etc. er optimal. Dette er klart påvist ved at fisk som over en periode har blitt holdt på en lav fôrrasjon og taper vekt, har en betydelig høyere vekstrate (vekstkompensasjon) etter at de igjen får full rasjon, enn individer som kontinuerlig har fått full fôrrasjon (Jobling, 2010). Selv om det de siste to tiår har skjedd en gradvis økning i forskning på appetittregulering hos fisk, er det fortsatt mange elementer av de involverte mekanismene vi ikke forstår (Volkoff *et al.*, 2005).

1.3.2. Sentrale appetittregulatorer

Reguleringen av appetitt består av orexigene faktorer som stimulerer matinntak, og anorexigene faktorer som hemmer matinntak. Hos pattedyr er det identifisert et område i hypothalamus som antas å være hovedsenteret for regulering av matinntak og kroppsvekt (Schwartz *et al.*, 2000). Dette området er lokalisert ventralt i hypothalamus, og omfatter senterne arcuate nucleus (ARC), paraventriculært nucleus (PVN), ventromedial nucleus (VMN), dorsomedial nucleus (DMN) og lateral hypothalamus (LH). Av disse antas ARC å være det basale senter knyttet til regulering av appetitt (Dhillon, 2007). Det er også bekreftet at hypothalamus har en sentral rolle i kontrollen av matinntak hos fisk (Volkoff *et al.*, 2009), uten at man har lokalisert veldefinerte sentre slik som hos pattedyr. En rekke sentrale neuropeptider som deltar i denne reguleringen er imidlertid identifisert (Lin *et al.*, 2000), og disse neuropeptidene er i stor grad de samme i fisk som hos pattedyr. Av neuropeptider som er identifisert hos fisk, finner vi blant annet de orexigene Neuropeptid Y (NPY) og Agouti related protein (AgRP1 og AgRP2), og de anorexigene Cocaine and amphetamine regulated transcript (CART1 og CART2) og Pro-opiomelanocortin (POMCA1 og POMCA2) som hos pattedyr betegnes som førsteordens neuroner (Lin *et al.*, 2000). Disse har hhv. en hemmende og stimulerende effekt på Melanocortin – reseptor (MC4R), som er det første leddet i de nedstrøms mekanismer som til slutt regulerer appetitt (Gorissen & Huising, 2006). Alle disse har blitt vist å være involvert i korttidsregulering av appetitt hos fisk, enten gjennom forsøk hvor fisk sultes, eller gjennom forsøk hvor fisk behandles med en eller flere av disse (Volkoff *et al.*, 2009).

1.3.3. Hormonet leptin

I pattedyr har peptidhormonet leptin vist seg å spille en nøkkelrolle i opprettholdelsen av energibalansen. Leptin produseres i fettceller, og mengden sirkulerende leptin er proporsjonale med mengden tilgjengelige energireserver i form av fettvev (Zhang *et al.*, 1994). Oppdagelsen av dette hormonet bekreftet en allerede etablert hypotese om at langtids appetitt – og energihomeostase reguleres gjennom en lipostatisk mekanisme (Kennedy, 1953), hvor leptin fungerer som et negativt feedback signal mellom fettstatus i perifere vev og organer, og den sentrale reguleringen av appetitt via leptinreseptorer i ARC (Wynne *et al.*, 2005). Siden leptin først ble identifisert hos fisk i 2005 (Kurokawa *et al.*, 2005), har hormonet blitt identifisert hos flere andre fiskearter, også Arktisk røye (Frøiland *et al.*, 2010). I likhet

med leptinets funksjon hos pattedyr (Wynne *et al.*, 2005), er det vist at rekombinant regnbueørret – leptin har en anorexigen effekt, som reduserer matinntaket hos regnbueørret (*Oncorhynchus mykiss*) samtidig som det oppstår en økning i genuttrykk av det anorexigene POMC i hypothalamus (Murashita *et al.*, 2008). Forskning antyder at det kan foreligge en lipostatisk regulering av kroppsvekt også hos fisk (Silverstein *et al.*, 1998, Jobling & Johansen, 1999), og denne konklusjonen støttes av en nylig studie som viste at anadrom røye som ble sultet i en periode om sommeren, gjenopprettet fettstatus, men ikke kroppsvekt, etter at den fikk føret tilbake (Frøiland *et al.*, 2012). Økt uttrykk av leptin i lever under kjønnsmodning hos fisk er registrert hos kjønnsmodnende lakseparr (Trombley & Schmitz, 2013), og hos kjønnsmodnende, men ikke i umoden røye om høsten (Frøiland *et al.*, 2010, Frøiland *et al.*, 2012). Det er derfor antatt at leptin kan være involvert i regulering av kjønnsmodning hos fisk, men det er ennå ikke påvist hvilken prosess leptin innvirker på. Det er også vist at leptin og dens reseptor (LepR) produseres i hjerne hos mange fiskearter (Kurokawa & Murashita, 2009, Rønnestad *et al.*, 2010), inklusiv røye (E.H. Jørgensen, upubliserte data), men lite er kjent om hvorvidt sentralt produsert leptin gjennom en parakrin prosess påvirker prosesser som appetitt og kjønnsmodning. Det er hittil funnet to varianter av leptingenet i mange fiskearter, Leptin A1 (LepA1) og Leptin A2 (LepA2), inklusive røye (Frøiland *et al.*, 2012), men ingenting er hittil kjent om hvorvidt disse har separate, uavhengige regulatorisk roller hos fisk.

1.4. Hensikt

Hensikten med mitt masterprosjekt var å undersøke hvorvidt kjønnshormoner, *per se.*, påvirker appetitt og genuttrykk av hypothalamiske appetittregulatorer hos røye. Dette ble gjort for å se om tapet av appetitt under kjønnsmodning skyldes de forhøyede plasmanivåer av kjønnshormonene testosteron (T), 11 – ketotestosteron (11KT) og østradiol (E2), og om et eventuelt tap av appetitt kan relateres til et endret hypothalamisk uttrykk av gener som hos pattedyr er kjent å ha orexigene og anorexigene effekter på appetitt.

Videre skulle jeg sammenligne mageinnhold og genuttrykket av antatte appetittregulatorer i hypothalamus hos røye med høy appetitt tidlig på sommeren, med mageinnhold og genuttrykk hos kjønnsmodne og umodne individer den kommende høsten. Dette ble gjort for å 1) bekrefte eller avkrefte at kjønnsmoden røye mister appetitt og 2) undersøke hvorvidt anorexigene og/eller orexigene neuropeptider som er kjent for å regulere langtids appetitt – og energihomeostase hos pattedyr, også har en slik funksjon hos fisk.

2.0. MATERIAL OG METODE

2.1. Fisk og forsøksbetingelser

Forsøkene tilknyttet denne masteroppgaven omfatter et pilotforsøk utført i perioden 23.01-13.02.2013, et forsøk utført i perioden 01.03.13-15.03.13 (forsøk 1) og et forsøk utført i perioden 23.06.2013 – 22.08.2013 (forsøk 2). Alle forsøkene ble gjennomført ved Havbruksstasjonen i Tromsø (69 °N), og var godkjent av Forsøksdyrutvalget før start (Id. 4937). Prosjektet som denne masteroppgaven inngår i, omfatter også en annen masteroppgave, og det har dermed vært et samarbeid om sampling og analyser. Fisken som inngikk i pilotforsøket og forsøk 1 var avkom av anadrom røye opprinnelig fanget i Storvannet i Hammerfest i 1984, og som siden er blitt holdt ved Havbruksstasjonen. Fisken som inngikk i forsøk 2 var svalbardrøye klekket i 2010. Fisken ble holdt i et 4000 liters kar med ferskvann, i naturlig fotoperiode og ved 5 °C frem til starten av hvert av forsøkene. Både før og under forsøkene ble fisken fôret av skiveautomat med standard settefiskfôr (4mm) fra Skretting (Stavanger, Norge) i 4 timer frem til 11:30.

2.2. Forsøksdesign

2.2.1. Merking av fisk

Totalt 105 røyeindivider som skulle brukes til pilotforsøket og forsøk 1, ble merket 16.11.2012 og overført til et 4000 liters kar med ferskvann under et simulert, naturlig lysregime. Vanntemperaturen ble holdt konstant ved 5 °C. Vanntemperatur og oksygenmetning ble kontrollert jevnlig av ansvarlig røkter, og oksygenmetningen ble holdt over 90 % gjennom justering av vannflow. Kjønnbestemmelse av hvert enkelt individ ble gjort på bakgrunn av morfologiske karakteristika, og av disse ble 65 bestemt til å være hanner, og 40 bestemt til å være hunner. Ved merking ble individene bedøvet i Benzocaine (50 ppm) og merket med FTF-69 Fingerling Tags (Floy tag & Mfg. Inc. WA, USA) som ble sydd fast like i forkant av dorsalfinnen. Hvert individ fikk et unikt identitetsmerke som også angav individets antatte kjønn.

2.2.2. Pilotforsøk

Pilotforsøket ble gjennomført ved Havbruksstasjonen i Tromsø i perioden 23.01 – 13.02. Dette forsøket skulle danne grunnlag for bestemmelse av kjønnshormondose i forsøk 1. I pilotforsøket ble 18 individer, hvor 9 var antatte hanner, og 9 var antatte hunner, fordelt på tre behandlingsgrupper som hhv. ble injisert med testosteron (Sigma) (T-gruppe), østradiol (Sigma) (E2 – gruppe) og propylenglycol (Sigma) (Kontrollgruppe). Hver gruppe besto av 6 individer, (3 antatte hanner, og 3 antatte hunner).

Ved forsøkets start ble individene tatt ut og bedøvet med Benzocaine (50 ppm), og det ble tatt blodprøve fra caudalvenen (BD Vacutainer LH 341.U) av samtlige individ for å kunne bestemme konsentrasjon av kjønnshormoner før behandling. Fiskens gaffellengde og vekt ble også registrert. Individene ble deretter injisert med sine respektive behandlinger, og plassert i 3 stk. 300 liters kar gruppevis, under samme temperatur – og lysbetingelser som før. Kjønnsteroidene var løst i propylenglycol (20 mg/ml), og injisert med 1 ml sprøyter (BD Plastipack) i en mengde tilsvarende 0,1 ml per kg kroppsvekt, og en hormondose tilsvarende 2 mg/kg. Injisering ble foretatt intramuskulært på høyre side av fiskens dorsalfinne, og området rundt stikket ble lett massert for å unngå tilbakestrøm fra inngangssåret. Syv dager senere ble fisken på nytt bedøvet og tatt blodprøve av, lende/vekt målinger ble tatt, og fisken ble injisert for andre gang. Fjorten dager etter forsøkets start ble fisken injisert for tredje gang, med samme fremgangsmåte som tidligere. Ved forsøkets slutt, 21 dager etter forsøkets start, ble fisken bedøvd og tatt blodprøve av, lengde/vekt måling ble tatt, fisken ble avlivet med en overdose Benzocaine (200 ppm) og hypothalamus ble dissekert ut i sin helhet. Prøvene ble plassert i 1,5 ml eppendorfrør med RNA-later, og fryst ved -20 °C i påvente av analysering. Blodprøvene ble sentrifugert ved 5000 RPM i 10 minutter ved 3 °C, og plasma ble deretter pipettert fra hver prøve og overført til ferdig merkede 1,5 ml eppendorfrør. Prøvene ble holdt frosset ved -20 °C inntil analysering.

2.2.3. Forsøk 1

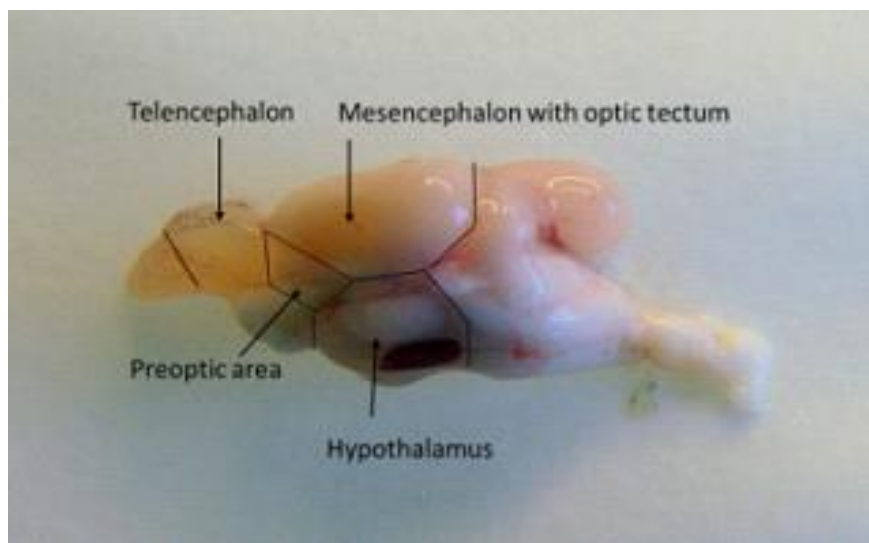
Forsøk 1 ble designet og gjennomført på bakgrunn av metode og resultater fra pilotforsøket (vedlegg 1 & 2). Før oppstart ble det bestemt at forsøk 1 skulle bestå av en ekstra behandlingsgruppe som fikk injeksjoner med 11-ketotestosteron (N.R.C. Massey, New Zealand), og at det skulle være 2 injeksjoner over en periode på 14 dager. 7 dager før forsøksstart, 21. 02, ble 44 hanner og 24 hunner tatt ut og tilfeldig fordelt på 4 behandlingsgrupper (tabell 1).

Tabell 1 viser de 4 behandlingsgruppene behandling og individer, med hunn- og hannfisk etter endelig kjønnsbestemmelse.

Gruppe	Behandling	Hormondose	Antall hunnfisk	Antall hannfisk
Kontrollgruppe	Propylenglycol	1 mg/kg	7	9
T – gruppe	Testosteron	1 mg/kg	6	12
11KT – gruppe	11 – ketotestosteron	1 mg/kg	6	11
E2 - gruppe	Østradiol	1 mg/kg	5	12

Etter etablering ble behandlingsgruppene overført til fire 300 liters kar gruppevis for akklimering, ved de samme temperatur – og lysbetingelser som før. Fôring ble utført ved bruk av skiveautomat, *ad lib*, i fire timer frem til kl. 11:30. Injeksjonene fant sted ved forsøkets start, 01.03 (dag 0) og 08.03 (dag 7). Fisken ble bedøvd i Benzocaine (50 ppm) før injeksjon. På bakgrunn av resultatene i pilotforsøket (vedlegg 1), ble dosen ble satt til 0,05 ml/kg kroppsvekt, som tilsvarer en hormondose på 1 mg/kg, Det ble også i dette forsøket tatt blodprøve av individene før første injeksjon som kontroll på kjønshormonstatus før behandling. Ved behandling dag 0 og dag 7, ble fisken tatt ut gruppevis og bedøvet, lengdemålt og veid. Det ble foretatt blodprøve av hvert individ, og fisken ble så injisert med sine respektive behandlinger og satt tilbake i karet til oppvåkning. Ved forsøkets slutt (dag 14), ble fisken i de 4 behandlingsgruppene avlivet ved hjelp av en overdose Benzocaine (200 ppm), og det ble utført vekt- og lengdemåling. Det ble så tatt en blodprøve av hvert individ, hvoretter individene ble åpnet ved å snitte buken for endelig kjønnsbestemmelse, samtidig som hypothalamus (figur 1) ble dissekert ut og plassert i ferdig merkede rør med RNA-later. Til slutt ble innhold i mage/tarm registrert for hvert enkelt individ. Blodprøvene ble

sentrifugert, og plasma pipettert fra. Plasma- og organprøver ble satt på is, og fryst ned til -20 °C ved Norges Fiskerihøgskole inntil analyse av kjønnshormoner og genuttrykk.



Figur 1. Røyehjerne hvor de ulike hjerneavsnitt er avmerket og navnsatt. Foto: Even Hjalmar Jørgensen, 2013.

2.2.4. Forsøk 2

Den 28.06 ble 10 umodne individer (5 hunner og 5 hanner), hentet ut fra stamkaret og avlivet i en overdose Benzocaine (200 ppm). Individene ble deretter veid lengdemålt, og det ble foretatt en blodprøve. Hypothalamus ble dissekert ut i sin helhet, mage- og tarminnhold ble registrert, fisken ble sjekket for kjønnsmodningsstatus og det ble målt gonadevekt. Dette ble gjort med samme fremgangsmåte som tidligere forsøk, og prøvene ble oppbevart ved -20 °C for senere analyser. Den 22.08 ble samme prøver tatt av ytterligere 19 fisk, 10 modnende (6 hanner og 5 hunner) og 9 umodne (4 hanner og 5 hunner).

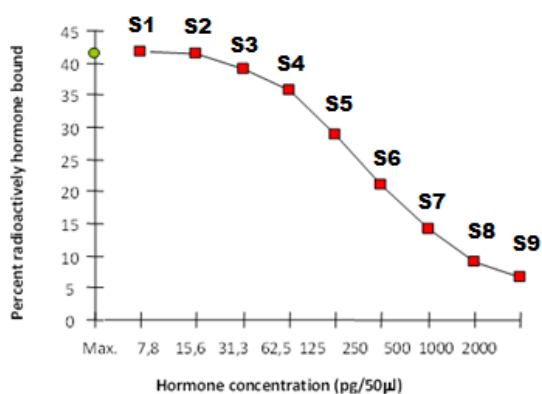
2.3. Analyser

Plasmaprøvene fra individene i pilotforsøket ble analysert for T og E2, og vevsprøvene ble analysert for genuttrykk av *LepA1*, *NPY*, *POMCA1* og *POMCA2* i hypothalamus. Plasmaprøver fra samtlige individ som inngikk i forsøk 1 og forsøk 2 ble analysert for T, 11KT og E2, mens 5 hunnfisk og 5 hannfisk fra hver behandlingsgruppe (forsøk 1), og samplingsgruppe (forsøk 2) ble analysert for uttrykk av 11 gen (*LepA1*, *LepA2*, *LepR*, *NPY*, *POMCA1*, *POMCA2*, *CART1*, *CART2*, *MC4*, *AgRP1* og *AgRP2*) i hypothalamus.

2.3.1. Hormonanalyser

Analysene av de steroide kjønns hormonene ble utført ved Norges Fiskerihøgskole, Universitetet i Tromsø. Kjønnssteroidanalysene ble utført ved hjelp av Radioimmunoassay (RIA) i henhold til protokoll utarbeidet fra Schulz (1985) og validert av Frantzen *et al.* (2004) og Tveiten *et al.* (2010).

RIA er en immunologisk analysemetode som kan brukes for kvantifisering av kjønnssteroider i blant annet plasmaprøver. Denne metoden virker ved at en blander naturlige antigen (i dette tilfellet kjønns hormon i plasma hvor mengden er ukjent) med en kjent mengde radioaktivt merket antigen (samme hormon), og tilsetter antistoff spesifikt for antigenet. Antigenet vil binde seg til det aktuelle antistoffet, og ettersom det er et overskudd av antigen i forhold til antistoff, oppstår det konkurranse mellom antigen i prøven og den kjente mengden radioaktivt merket antigen om bindingssteder på en begrenset mengde antistoff. Det vil etter hvert oppstå en likevekt i reaksjonen hvor frie antigen kan skilles fra bundet antigen, og en kan ved hjelp av en scintillasjonsteller måle β – stråling i en prøve og bestemme hvor mye radioaktivt antigen som er bundet til antistoffet. Mengden radioaktivt merket antigen har et invert forhold til mengden antigen fra plasma i prøven. Ved å konstruere en standardkurve (figur 2) av ulike fortynninger av standardløsninger kan det deretter bestemmes hvilken mengde antigen prøven inneholder (ng/ml).



Figur 2. Standardkurve for bestemmelse av kjønns hormon konsentrasjon i plasma. Modifisert etter Analysis protocol: *Steroid sexhormones, Cortisol*, (BIO-2504).

Totalt ble 229 prøver analysert, fordelt på 18 assay. Ettersom en kun kan lese av resultater for verdier som ligger innenfor den lineære delen av standardkurven, var det enkelte prøver som ikke var mulig å lese av resultatene for etter første analyserunde. Prøver hvor det tydelig forekom verdier som lå utenfor standardkurven, ble analysert på nytt med en høyere fortynning for å kunne bestemme mengden kjønnsormon tilstede i prøvene. Disse prøvene ble samlet opp mot slutten og kjørt i et eget assay.

2.3.1.1. Eterekstraksjon

Steroidene ble ekstrahert fra plasma ved bruk av dietyleter (DEE) før hormonanalysen. Dette ble gjort ved at 300 µl plasmaprøve ble tatt ut og overført til 16x125 mm glassrør. Det ble deretter tilsatt 4 ml DEE i hvert av rørene, og disse ble satt til røring i 4 minutter. Etter røring ble rørene senket i flytende nitrogen inntil vannfasen av prøvene var frosset. DEE – fasen med de fettløselige steroidene ble deretter overført til 12x75 mm glassrør ved dekantering. Rørene med DEE fasen ble så satt i vannbad (45 °C) i ca. 30 minutter, inntil all DEE var dampet av, slik at glassrørene kun inneholdt fettdråper med steroider.

Glassrørene med steroidedråpene ble så tilsatt 900 µl (3x fortynning) RIA buffer (1L: 1,0 g gelatin, 4,38 g NaH₂PO₄ + H₂O, 21,84 g Na₂HPO₄, 9 g NaCl, 1 ml Na-azid (5 %), MilliQ-vann). Rørene ble satt til side i 15 min, vortexet og innholdet ble overført til 2 ml eppendorfrør.

2.3.1.2. Radioaktive steroider – Tracer

De radioaktivt merkede steroidene løst i etanol (EtOH) ble oppbevart i kjøleskap (4 °C) som mellomstock-løsninger. Før bruk ble tracer for de ulike steroidene ble fortynnet til 10000 cpm/50 µl på følgende måte:

E₂: 19 ml RIA- buffer, 55 µl ³H – E₂

11KT: 12 ml RIA – buffer, 420 µl ³H – 11KT

T: 24 ml RIA – Buffer, 390 µl ³H – T

Etter fortynning ble traceraktiviteten til de fortynnede løsningene kontrollert før bruk ved å tilsette 50 µl tracer til 600 µl RIA – buffer i tellerør. Det ble så tilsatt 7 ml telleveske (Ultima

Gold XR scintillasjonsvæske), og rørene ble lukket og vortexet. β – stråling ble deretter målt i en scintillasjonsteller (Tri-CarB 2900TR, Perkin Elmer Inc.) i 2x5 min.

2.3.1.3. Antistoffer

Antistoffene (AS) brukt i disse analysene er produsert i kanin, og oppbevares som 10x fortynninger i biofryser ved -80°C . Antistoff for hvert hormon ble videre fortynnet fra 10x fortynning til en 500x fortynning mellomfraksjon ved å tilsette RIA-buffer (30 μl AS 10x + 1,47 ml RIA-buffer), og ble tilsatt noen korn Na-azid dersom løsningene skulle oppbevares i kjøleskap over lengre tid. De enkelte antistoff ble fortynnet videre fra mellomfraksjonen til det som var passende for de enkelte hormonene (tabell 2).

Tabell 2 viser hvilken fortynning som er brukt til de enkelte hormonene analysert i dette forsøket.

Hormon	Fortynning	Oppskrift
E₂	18000x	550 μl 500x AS + 19,5 ml RIA-buffer
11KT	20000x	500 μl 500x AS + 19,5 ml RIA - buffer
T	4500x	4 ml 500x AS + 32 ml RIA - buffer

2.3.1.4. Konstruksjon av standardkurve

For hvert steroid ble det konstruert en standardkurve til bruk for avlesing av analyseresultatene (figur 2). Denne ble laget ved at en konsentrert standardløsning (500 $\mu\text{g}/\text{ml}$) av det aktuelle steroidet løst i EtOH, ble videre fortynnet til 250 x (10 μl 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ mellomfraksjon ble tilsatt 2,49 ml RIA buffer), som gav en 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ standard-stock løsning. Videre ble 50 μl av standardstock løsningen tilsatt 2,45 ml RIA buffer overført til et 15 ml sentrifugerør og vortexet. Denne løsningen gir en konsentrasjon på 2000pg/50 μl , og er standardløsningen med høyest konsentrasjon (S9), som brukes til å konstruere de resterende standardløsningene ved fortynning. Dette gjøres ved at 1 ml S9 løsning ble overført til et nytt sentrifugerør, og tilsatt 1 ml RIA buffer. Denne løsningen (S8) ble deretter vortexet, og videre fortynnet for å lage S7. På denne måten ble løsningene fortynnet nedover 1:1, inntil det var laget 9 løsninger av ulike konsentrasjoner som dannet standardkurven.

2.3.1.5. *Dextran Coated Charcoal Solution (DCC)*

Kulløsningen har som hensikt å absorbere frie antigen som ikke er bundet til antistoff i analysevæsken. Kulløsningen lages ved at 100 ml RIA buffer tilsettes 1 g aktivert kull og 0,1 g dextran T70. Løsningen settes til røring på is i en time, og oppbevart i kjøleskap. Før bruk ble løsningen ble satt på is og rørt med magnetrører i 15 minutter.

2.3.1.6. *Radioimmunoassay*

Det ble utført totalt 18 RIA (6 assay per steroid). Plasmaprøvene tatt 01.03 ble kjørt på 3x fortykning, mens alle prøvene tatt 15.03 ble kjørt på en 48x fortykning, foruten kontrollgruppen, som ble kjørt på 3x. Hvert assay inneholdt 29 prøver.

Totalt 80 rør ble merket på forhånd, og rørene ble deretter tilsatt løsningene som var tillaget i henhold til tabell 3, med to paralleller av hver. Rørene ble deretter vortexet, dekket med aluminiumsfolie og inkubert ved 4 °C over natten.

Tabell 3 viser tilsetninger til de ulike prøvene i et assay. TC, Total count, TB, Total bound, NSB, Non spesific bound, STD, standardløsninger, Prøver.

	RIA-Buffer	Standard	Prøve	³ H	Antistoff
TC	600	-	-	50	-
TB	100	-	-	50	200
NSB	300	-	-	50	-
STD.S1-S9	50	50	-	50	200
Prøve 1-29	-	-	100	50	200

Etter ca. 16 timer ble rørene satt på is, og samtlige rør ble tilsatt 300 µl kald DCC- løsning. De ble så inkubert i romtemperatur i 5 min, før de ble sentrifugert i 5 min ved 4200 G (4 °C). Kullet som binder frie antigen fra prøven vil i denne prosessen akkumuleres i bunnen av rørene, og supernatanten vil kunne dekanteres over i tellerør. Tellerørene ble tilsatt 7 ml tellervæske (Ultima Gold XR), forseglet og ristet i 5 minutter. Tellerørene ble deretter plassert i en scintillasjonsteller og β-strålingen ble målt.

2.3.2. Analyser av genuttrykk i hypothalamus

Totalt ble 68 prøver fra hypothalamus (forsøk 1) analysert for mRNA av en rekke gen (*LepA1*, *LepA2*, *LepR*, *NPY*, *POMCA1*, *POMCA2*, *CART1*, *CART2*, *MC4*, *AgRP1* og *AgRP2*), for å bestemme i hvilken grad disse ble uttrykt på det tidspunktet prøven ble tatt. Alle analysene ble utført ved Institutt for Arktisk og Marin Biologi ved Universitetet i Tromsø under veiledning av ansvarlig laboratorietekniker.

For å måle genuttrykk av de ulike neuropeptidene som antas å være involvert i appetittregulering, ble det benyttet kvantitativ real-time polymerase chain reaction (PCR). PCR er en molekylærbiologisk analysemetode hvor en amplifiserer spesifikke sekvenser av et copy DNA (cDNA) produsert fra messenger RNA (mRNA) ekstrahert fra vevet ved å bruke oligonukleotider (primer) som er spesifikke for en gitt sekvens av cDNAet. Det er som regel 40 sykluser i en PCR analyse. En syklus består av en denatureringsfase, hvor DNA dobbeltråden separeres ved 95 °C, en annealingfase hvor primerne binder til enkeltrådene ved 60 °C, og en ekstensjonsfase, hvor komplementærtråden syntetiseres av DNA polymerase ved 70 °C. Dersom sekvensen som skal syntetiseres er kort, vil det også skje ekstensjon ved 60 °C. Primeren binder til enkeltråden etter at dobbeltråden er separert, og varmestabil DNA polymerase syntetiserer en komplementær tråd av deoksynukleotider. Hvis primerne og polymerasen er effektive, fordobler mengden DNA seg for hver syklus, noe som fører til en eksponentiell økning av DNA-mengden. I real-time PCR måles mengden DNA etter hver syklus ved at et fluorescent fargestoff binder til DNA dobbeltråden, som produserer et signal som øker med antall PCR produktmolekyler. I etterkant av ekstensjonsfasen vil fluorescens måles med et kamera. For å eliminere bakgrunnsstøy, etableres en terskel av PCR maskinen slik at en kan identifisere relevant amplifiseringssignal. Et sterkt fluorescent signal tidlig i PCR analysen vil derfor bety at det er amplifisert en stor mengde cDNA, og at den opprinnelige mengden mRNA var stor (Life Technologies, 2012). Mengden cDNA i prøven er proporsjonal med mengden mRNA fra et gitt gen i vevsprøven, noe som i sin tur gir et mål for hvorvidt, og i hvilken grad, dette genet er stimulert i det øyeblikket vevet ble fjernet fra fisken.

2.3.2.1. *Ekstraksjon av RNA*

RNA fra hypothalamus ble ekstrahert ved bruk av RNeasy Plus Universal Mini Kit (Qiagen), etter protokoll (Qiagen, 2010). Sentrifugerør (2 ml) ble merket og tilsatt en stålkule. Organprøvene av hypothalamus ble plassert i de respektive rør. Det ble så tilsatt 900 µl QIAzol Lysis Reagent i hvert rør, og rørene ble plassert i TissueLyser Adapter Set 2x24, og ble kjørt i 2 minutter ved 20 Hz. Lysatene ble så pipettert over i nye 1,5 ml mikrosentrifugerør og plassert på benken i 5 minutter. Rørene ble tilsatt 100 µl gDNA Eliminator Solution for å fjerne genomisk DNA (gDNA), forseglet og vortexet i 15 sekunder, og deretter tilsatt 180 µl kloroform. Rørene ble igjen forseglet og vortexet, og inkubert i romtemperatur i 2-3 minutter, før de ble sentrifugert ved 4 °C i 15 min ved 10000 RPM.

500 µl av vannfasen, som inneholder ribonukleinsyrer, ble pipettert over fra rørene til nye, merkede mikrosentrifugerør, tilsatt 500 µl 70 % etanol, og blandet godt ved å pipettere opp og ned. 700 µl av prøven ble deretter overført til RNeasy Mini spin column, plassert i et 2 ml samlør, og sentrifugert ved 10 000 RPM i 15 sekunder ved romtemperatur. Gjennomstrømmingsløsningen ble kastet, og prosessen ble gjentatt med det som var igjen av prøven.

700 µl Buffer RWT ble tilsatt RNeasy spin column. Røret ble forseglet og sentrifugert ved 10000 RPM i 15 sekunder i romtemperatur for å vaske membranen. Gjennomstrømmingsløsningen ble kastet. 500 RPE ble tilsatt RNeasy spin column. Røret ble forseglet og sentrifugert ved 10 000 RPM i 15 sekunder i romtemperatur for å vaske membranen, og gjennomstrømmingsløsningen ble kastet. Det siste trinnet ble så gjentatt, og røret ble sentrifugert ved 10000 RPM i 2 minutter. Spin column ble deretter plassert i et nytt mikrosentrifugerør, og det ble tilsatt 32 µl RNasefritt vann direkte på spin column membranen. Røret ble deretter sentrifugert ved full styrke i ett minutt. Spin column ble fjernet fra røret, og prøvens RNA-konsentrasjon og kvalitet ble sjekket ved hjelp av Nanodrop 2000c (Thermo Scientific). Nanodrop måler konsentrasjon av RNA i en prøve, og prøvens renhet, som uttrykkes i 260/280 ratio. Nukleinsyrer og proteiner har en absorbans ved maks 260 og 280 nM, og ratioen mellom disse ved RNA skal være nærmest mulig 2,0. Prøver som ikke tilfredsstilte krav til renhet og/eller konsentrasjon ble rensset etter protokoll ved bruk av ethanol precipitation (vedlegg 3). Prøvene ble deretter fryst ved – 80 °C i påvente av videre analysering.

2.3.2.2. *Fjerning av genomisk DNA*

gDNA, som anses som en kontaminerende agent i en PCR analyse, ble fjernet fra prøvene ved bruk av TURBO DNA-free™ Kit (ambion by life technologies™). gDNA fjernes ved at kontaminerende DNA blir nedbrutt av TURBO™DNase enzymet slik at det ligger under nivået som kan detekteres via PCR.

Prøvene ble tilsatt vann slik at konsentrasjonen ble 8 µg RNA/22 ml H₂O. Dette ble gjort på bakgrunn av den kjente RNA konsentrasjonen hver enkelt prøve inneholdt. Prøvene ble deretter tilsatt 1 ml Turbo DNase og 2,5 µl 10x buffer (turbo), og inkubert ved 37 °C i 30 minutter.

Etter inkubering ble prøvene tilsatt 2,5 µl DNase inaktiveringsbuffer som stoppet reaksjonen, og prøvene ble inkubert i romtemperatur i 5 minutter og ristet jevnlig. Prøvene ble så sentrifugert i 2 minutter ved 10000 RPM i romtemperatur, og ca. 20 µl RNA ble samlet opp i et nytt rør uten å forstyrre pelleten i bunnen av det gamle prøverøret. Prøvene ble deretter fryst ved - 80 °C i påvente av videre analysering.

2.3.2.3. *Revers transkripsjon*

RNA ble transkribert til cDNA ved bruk av iScript Advanced cDNA Synthesis Kit for RT-qPCR (Biorad). Mastermix (5x iScript advanced reaction mix og iScript advanced reverse transcriptase) ble konstruert i henhold til tabell 4, og blandet godt ved å pipettere rolig et par ganger.

Tabell 4. Komponenter som inngår i revers transkriptase.

Komponent	Volum
5x iScript advanced reaction mix	4 µl
iScript advanced reverse transcriptase	1 µl
Nuclease-fritt vann	Variabelt
RNA template	Variabelt
Totalt volum	20 µl

cDNA ble syntetisert av 2µg RNA fra hypothalamus. 5 µl mastermix ble overført til de ferdig merkede eppendorfrørene, og prøvevolum og vann som ble tilsatt eppendorfrøret varierte med konsentrasjonen av RNA i prøven (163 – 320 ng/µl). Arbeidet ble gjort på is. Det ble konstruert 12 NO-RT kontroller per analyserte gen, hvor iScript advanced reverse

transcriptase ble erstattet med vann. Dette ble gjort for å forsikre at prøvene ikke var kontaminerte med gDNA, og fungerte som en negativ kontroll. Prøvene ble inkubert i thermal cyclus i 30 minutter ved 42 °C, etterfulgt av 5 minutter ved 85 °C. Det ble tilsatt 180µl H₂O, og prøvene ble fryst ved -80 °C i påvente av videre analysering.

2.3.2.4. *Real Time PCR*

Ved kjøring av real time PCR ble prøvene analysert for de enkelte gen ved at det ble tilsatt 4 µl cDNA (40 ng) og 16 µl Mastermix (10 µl Sybergreen (SsoAdvanced™ Universal SYBR® Green Supermix, Bio-Rad, CA, USA), 1 µl primer, 250 nM (se tabell 6 for primerliste) 5 µl H₂O), i platebrønner (Hard Shell PCR plates 96 well white clear Catalog no HSP9601, Biorad, CA, USA). Det ble kjørt 68 prøver og 14 kontroller (12 NO-RT, 2 NTC), som hver hadde to tekniske replikater per gen. NTC, No Template Control, er brønner som ikke inneholder cDNA, og disse fungerer derfor som kontroll for kontaminering av brønnene. Prøvene fra forsøk 1 og forsøk 2 ble analysert i separate platebrønner. Platen ble forseglet, sentrifugert i 30 sekunder i Labnet mini plate reader mps 1000, ved 1000 RPM og kjørt i CFX96 Real-Time PCR Detection system (Bio-Rad, CA, USA) med programvaren CFX Manager 3.0 (Bio-Rad, CA, USA) (se tabell 5 for PCR program). Etter at analysen var fullført, ble resultatet lest av og dataene eksportert til Microsoft Excel 2010.

Tabell 5. PCR – program med steg, temperatur og tid.

Steg	Temperatur	Tid
1	50 °C	10 min
2	95 °C	5 min
3	95 °C	10 sek
4	60 °C	30 sek
5	Plateavlesning. Steg 3, 4 og 5 gjentas 39 ganger.	
6	95 °C	10 sek
7	Smeltekurve: temperatur går fra 65 °C (0,5 sek) – 95 °C (0,5 sek). Plateavlesning.	

Genet Elongation Factor 1A (EF1A) ble brukt som referansegen i denne analysen, ettersom dette genet har vist seg å være stabilt uttrykt i atlantisk laks (Olsvik et al., 2005), og røye (E. Jørgensen, upublisert). Det ble brukt relativ kvantifisering for å beregne mengde RNA av de ulike gen i prøven. I relativ kvantifisering brukes et referansegen, her EF1A, som en kontroll for variabilitet, mens en selve uttrykket av genet en analyserer for, blir sett i forhold til uttrykket av det samme genet i en annen prøve – dvs. om uttrykket har økt eller blitt redusert. Produktspesifisiteten ble sjekket ved at en så på smeltekarakteristika på dissosieringskurven. Den cDNA konsentrasjon som er mest gunstig, samt primereffektivitet, sjekkes ved å lage en standardkurve – men i vårt tilfelle var denne allerede etablert av laboratorietekniker.

MATERIAL OG METODE

Tabell 6. Liste over primere som ble brukt for de ulike gen.

Gen	Primer Sekvens (5'-3')	Prod. Str. (bp)	Acc. nummer	Firma
Elongation Factor 1 Alpha (EF 1 α)	F AGGCATTGACAAGAGAA CCATT R TGATACCACGCTCCCTCT C	119	AF498320.1	Primerdesign, United Kingdom
Proopiomelanocortin (POMC) A 1	F ACTGTTCAAAAATGTCAT CATCAAAG R CACCTATCCTCCCTTCCT CTC	83	AB462418	Primerdesign
POMC A2	F GTTGGAGGAAAGAAGAG AGAGAA R CAATAACCACGCAGGAC ACA	119	AB462420	Primerdesign
Cocaine and amphetamine regulated transcript (CART) I	F GTCCATCGTTCTTAGTGC TGAA R CAGTTGCTTTTCGTTGGT CAA	115	AB455538	Primerdesign
CART II	F AGAAGAGTGAGGACCTG AACT R TGAGAGGATGCGAAACA AGTC	110	NM_001141227	Primerdesign
Melanocortin receptor 4 (MC4-R)	F TTCTCACACTGGGGATAG TCA R CACAGCCAAAGAACAGA TGAAT	113		Primerdesign
Leptin (Lep) A1	F TCCTAGACTGGGCAGAC CT R GCCTGGGCAGCGTGATA T	92	JQ615967.2	Primerdesign
LepA2	F TGGCACTAAACAGACTC AAGG R CTCAGTGATGATCTATGT CAGTAAC	102	AB490667.1	Primerdesign
Leptin Receptor (LepR)	F CTTTGCTCGGGAGTCAGG A R CCTGTGCTTTGAGTGGAC TG	129		Primerdesign
Agouti related peptide (AgRP) I	F CTGAGCAGGAAGAGGAG GAG R ATACAGCGACGGGAGAG AC	109	NM_001146677 .1	Primerdesign
AgRP II	F TCGCCGAAGACCTGAAG AG R CGTGGTGCTGTCCCTGAT	123		Primerdesign
Neuropeptide (NP) Y	F AGAATTGCTGCTGAAGG AGAG R GGGACAGACACTATTAC CACAA	83	AF203902	Primerdesign

2.4. Databehandling og statistikk

Kondisjonsfaktor ble beregnet ved hjelp av formel for Fultons kondisjonsfaktor:

$$\frac{W}{L^3} \times 100$$

der W er kroppsvekt (g), og L er fiskens lengde (cm).

Gonadosomatisk index (GSI) ble beregnet ved hjelp av følgende formel:

$$\left(\frac{\text{Gonadevekt}}{\text{Kroppsvekt}} \right) * 100$$

hvor både gonadevekt og kroppsvekt uttrykkes i gram.

Data er presentert ved medianverdier (50 prosentil) i boxplot med 25 og 75 prosentiler. Ettersom det ble fastslått at datasettene ikke var normalfordelte, ble det brukt en ikke-parametrisk tosidig Mann-Whitney test for å undersøke om det eksisterte statistiske forskjeller mellom de ulike behandlingsgruppene. Mann – Whitney benyttes når det skal sammenlignes ulikheter mellom to uavhengige populasjoner som ikke er normalfordelt. Signifikansnivå ble satt til $p < 0,05$.

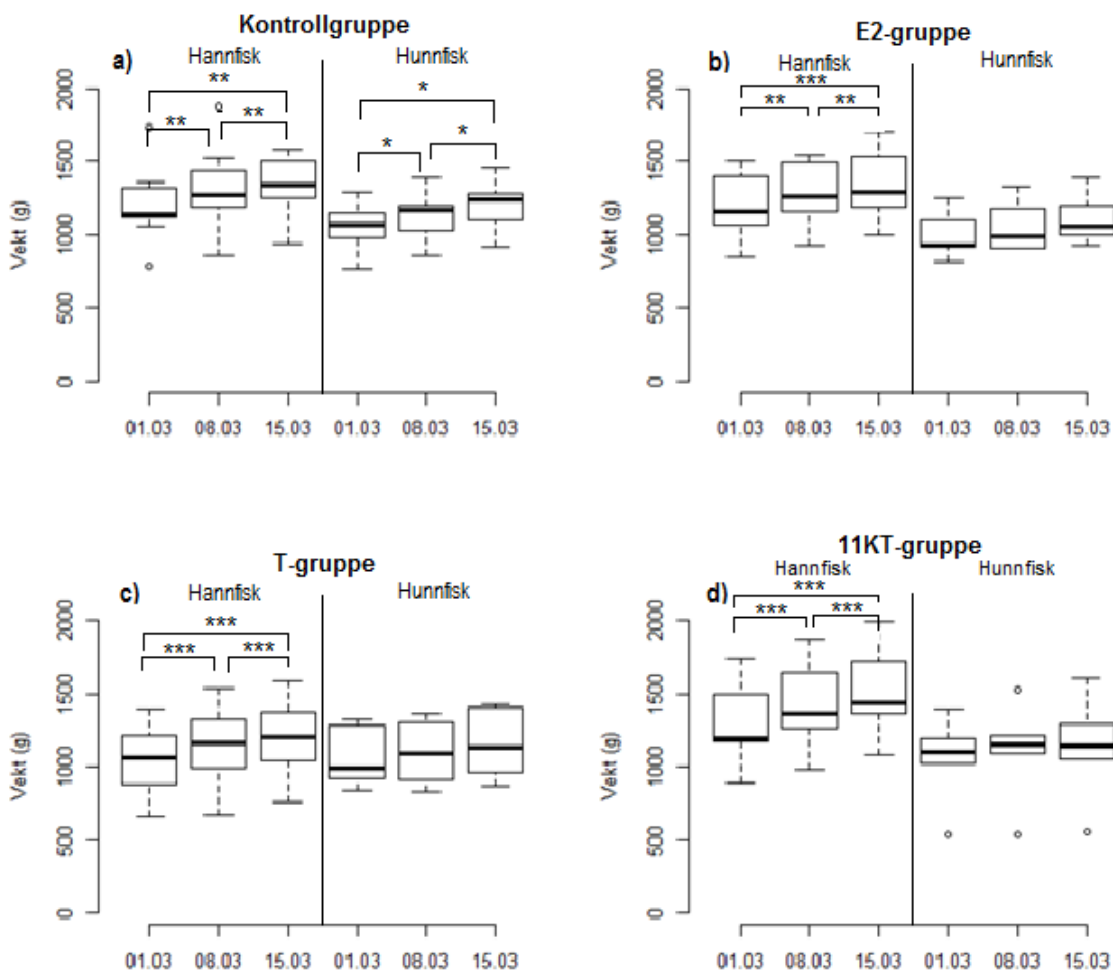
Uttrykket av de ulike genene ble bestemt på bakgrunn av uttrykket av referansegnet EF1A. De ulike genes uttrykk (dvs. mRNA mengde) er dermed oppgitt som en relativ verdi av mengde EF1A mRNA. Statistiske analyser og konstruksjon av alle figurer ble gjennomført i statistikkprogrammet R (R Core Team, 2012). Tabeller er konstruert i Microsoft Excel 2010.

3.0. RESULTATER

3.1. Forsøk 1

3.1.1. Vekt

Alle behandlingsgruppene, med unntak av hunnindividene i E2 gruppen og 11KT gruppen viste signifikant økning i vekt fra forsøkets start til forsøkets slutt. Det var ingen signifikante forskjeller i vekt mellom kontrollgruppen og behandlingsgruppene hverken ved starten av forsøket eller slutten av forsøket.



Figur 3. Endring i vekt gjennom forsøksperioden for individer av røye, kontrollgruppe (a) - hannfisk n=9, hunnfisk n= 7, behandlingsgruppe E2 (b) – hannfisk n=12, hunnfisk n=5, T (c) – hannfisk n= 12, hunnfisk n=6 og 11KT (d), hannfisk n= 11, hunnfisk n=6, presentert med hann – og hunnfisk separat. Boxplot viser median, 50 prosentiler, 25 og 75 prosentiler (boks). Minimums – og maksimumsverdier for data vist som stiplede linje, og ytterpunkter vist som sirkler. Stjerner angir signifikante forskjeller mellom siste og første måletidspunkt for kontrollfisk og behandlede fisk separat, som $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**) eller $p < 0,001$ (***)

RESULTATER

Det var ingen signifikante forskjeller i vektøkning (tabell 7) gjennom forsøket mellom kontrollgruppen og behandlingsgruppene. To av hunnfiskindividene i 11KT-gruppen hadde fått redusert vekt i løpet av forsøket, og dette er årsaken til at denne gruppen har en mye lavere vektøkning enn de resterende behandlingsgruppene, selv om denne ikke er signifikant.

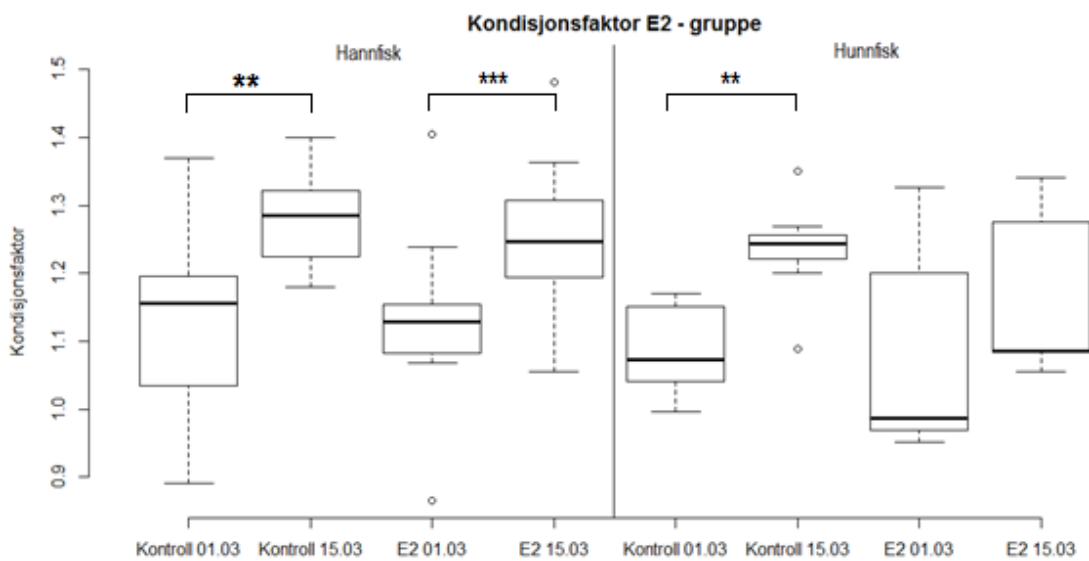
Tabell 7. Vektøkning gjennom forsøksperioden for de ulike behandlingsgruppene, presentert med medianverdier.

Gruppe	Vektøkning Hannfisk (g)	Vektøkning Hunnfisk (g)
Kontroll	196	168,5
E2	136,75	126,5
T	145,5	145,75
11KT	245,5	44

3.1.2. Kondisjonsfaktor

E2-GRUPPEN

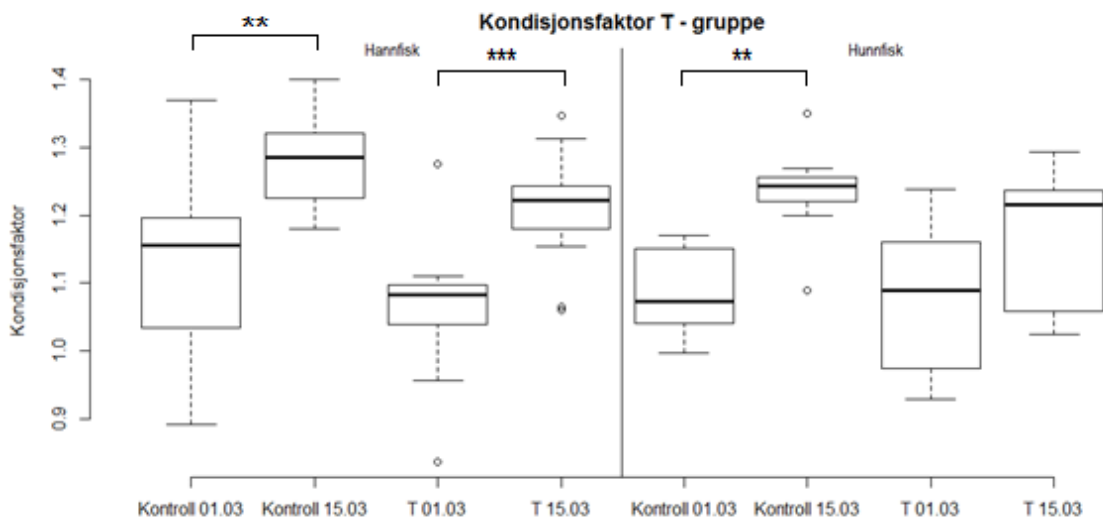
Gruppen som ble behandlet med østradiol viste signifikant økning i kondisjonsfaktor (1,1-1,2) gjennom forsøksperioden ($p < 0,001$) for hannindividene. Det samme ble ikke funnet for hunnindividene i denne gruppen (1,0 -1,1). Kontrollgruppen viste signifikant økning i kondisjonsfaktor for både hannindividene (1,2-1,3) ($p < 0,01$) og hunnindividene (1,1-1,2) ($p < 0,01$). Det var ingen forskjeller i kondisjonsfaktor mellom kontrollgruppen og E2-gruppen, uansett kjønn, hverken ved forsøkets start - eller forsøkets slutt.



Figur 4. Endring i kondisjonsfaktor gjennom forsøksperioden for individer av røye, kontrollgruppe og behandlingsgruppe E2, presentert med hann – og hunnfisk separat. Kontrollgruppe (hannfisk $n= 9$, hunnfisk $n= 7$), E2-gruppe (hannfisk $n=12$, hunnfisk $n= 5$). Boxplot viser median, 50 prosentiler, 25 og 75 prosentiler (boks). Minimums – og maksimumsverdier for data vist som stiplede linje, og ytterpunkter vist som sirkler. Stjerner angir signifikante forskjeller mellom siste og første måletidspunkt for kontrollfisk og behandlede fisk separat, som $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**) eller $p < 0,001$ (***)).

T-GRUPPEN

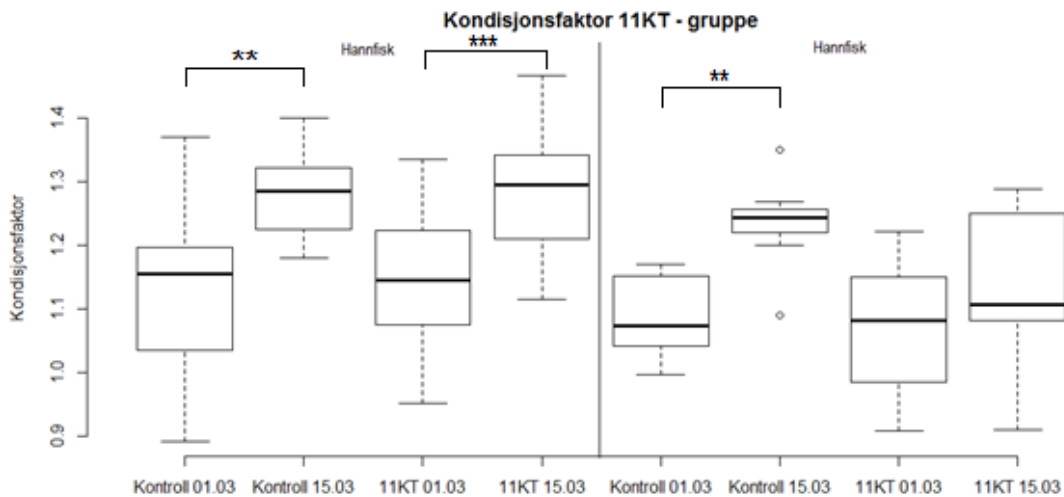
Gruppen som ble behandlet med testosteron viste en signifikant økning i kondisjonsfaktor fra forsøkets start til forsøkets slutt for hannindividene (1,08-1,12) ($p < 0,001$), men ikke for hunnindividene (1,09-1,13). Det var ingen forskjell i kondisjonsfaktor mellom kontrollgruppen og T-gruppen, uansett kjønn, hverken ved starten eller slutten av forsøket.



Figur 5. Endring i kondisjonsfaktor gjennom forsøksperioden for individer av røye, kontrollgruppe og behandlingsgruppe T, presentert med hann – og hunnfisk separat. Kontrollgruppe (hannfisk n= 9, hunnfisk n= 7), T-gruppe (hannfisk n=12, hunnfisk n= 6). Boxplot viser median, 50 prosentiler, 25 og 75 prosentiler (boks). Minimums – og maksimumsverdier for data vist som stiplet linje, og ytterpunkter vist som sirkler. Stjerner angir signifikante forskjeller mellom siste og første måletidspunkt for kontrollfisk og behandlede fisk separat, som $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**) eller $p < 0,001$ (***).

11KT-GRUPPEN

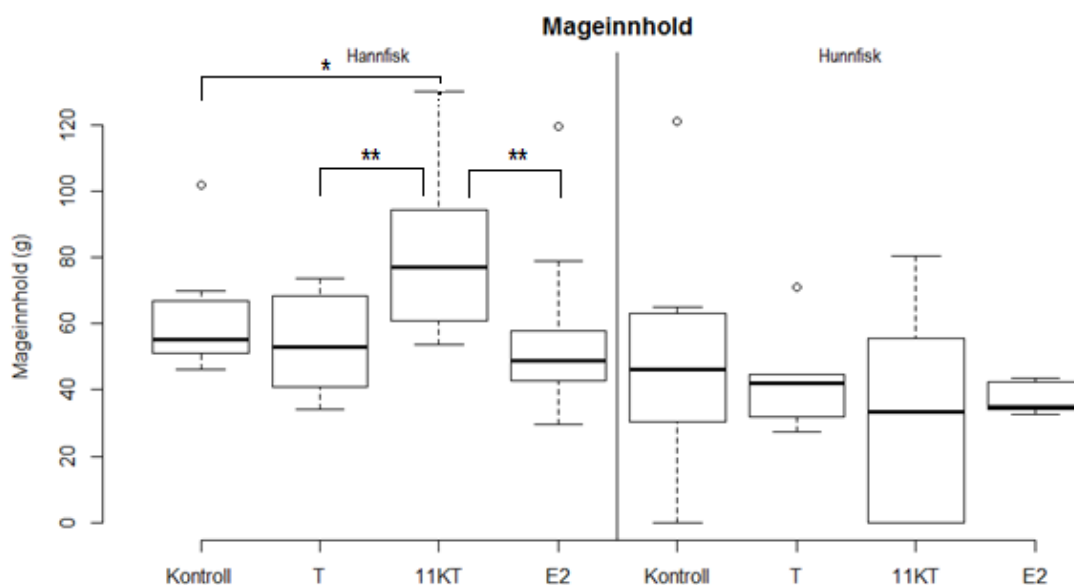
Gruppen som ble behandlet med 11-KT viste en signifikant økning i kondisjonsfaktor gjennom forsøksperioden for hannindividene (1,15-1,30) ($p < 0,001$), men ikke for hunnindivider (1,08-1,10). Det var ingen forskjell i kondisjonsfaktor mellom kontrollgruppen og 11KT-gruppen, hverken for hann eller hunnindivider.



Figur 6. Endring i kondisjonsfaktor gjennom forsøksperioden for individer av røye, kontrollgruppe og behandlingsgruppe 11KT, presentert med hann – og hunnfisk separat. Kontrollgruppe (hannfisk n= 9, hunnfisk n= 7), 11KT-gruppe (hannfisk n=11, hunnfisk n= 6). Boxplot viser median, 50 prosentiler, 25 og 75 prosentiler (boks). Minimums – og maksimumsverdier for data vist som stiplede linje, og ytterpunkter vist som sirkler. Stjerner angir signifikante forskjeller mellom siste og første måletidspunkt for kontrollfisk og behandlede fisk separat, som $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**) eller $p < 0,001$ (***)

3.1.3. Mageinnhold

Det var ingen forskjeller i mageinnhold mellom de ulike behandlingsgruppene, med unntak av hannfisk som ble behandlet med 11KT, som hadde et signifikant høyere mageinnhold (77 g) ($p < 0,05$) enn kontrollgruppen (55 g). Hannindividene i 11KT gruppen hadde også et signifikant høyere mageinnhold enn E2-gruppen ($p < 0,01$), og T-gruppen ($p < 0,01$). Det var ingen signifikante forskjeller i mageinnhold for hunnindivider mellom kontrollgruppen og behandlingsgruppene, og heller ikke mellom behandlingsgruppene. De to hunnfiskene i 11KT-gruppen som hadde tapt vekt, hadde heller ikke mageinnhold.

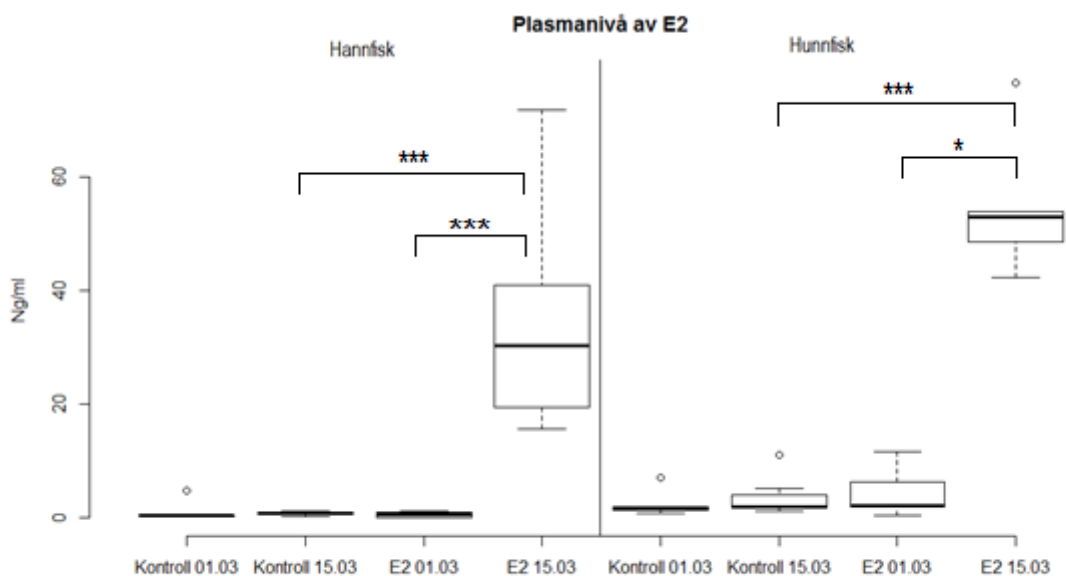


Figur 7. Mageinnhold ved slutten av forsøk 1 i individene fra de ulike behandlingsgruppene av røye, presentert med hann- og hunnfisk separat. Kontrollgruppe (hannfisk n= 9, hunnfisk n= 7), T-gruppe (hannfisk n= 12, hunnfisk n= 6), 11KT-gruppe (hannfisk n=11, hunnfisk n= 6), E2-gruppe (hannfisk n=12, hunnfisk n= 5). Boxplot viser median, 50 prosentiler, 25 og 75 prosentiler (boks). Minimums – og maksimumsverdier for data vist som stiplet linje, og ytterpunkter vist som sirkler. Stjerner angir signifikante forskjeller mellom siste og første måletidspunkt for kontrollfisk og behandlede fisk separat, som $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**) eller $p < 0,001$ (***)

3.1.4. Kjønnshormoner

E2-GRUPPEN

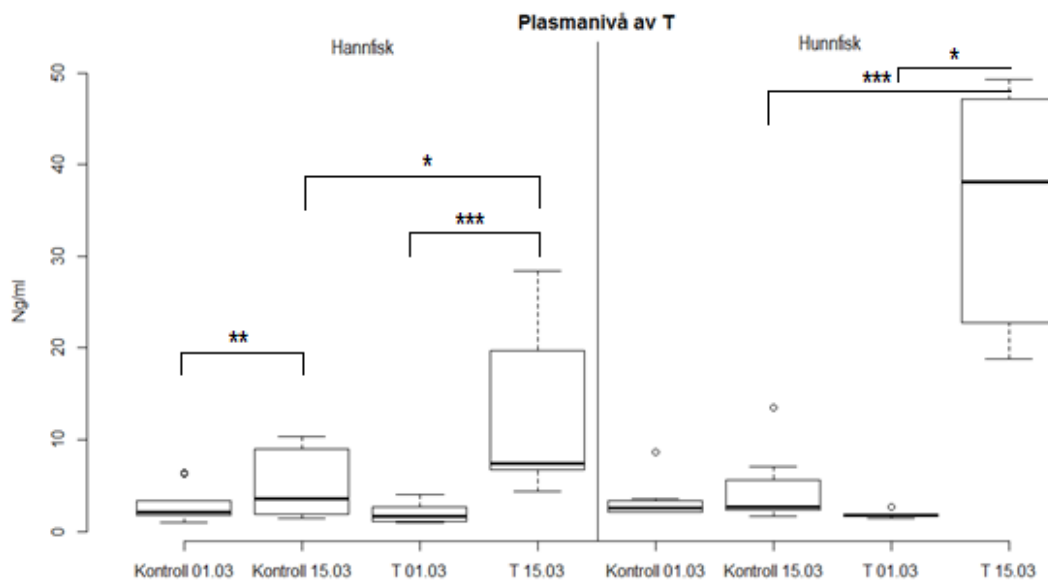
Fisken som ble behandlet med E2 viste en signifikant økning i plasmanivå av østradiol gjennom forsøksperioden, både for hannfisk ($p < 0,001$) og hunnfisk ($p < 0,05$). Ved forsøkets slutt ble det registrert høye E2 nivå hos både hann – og hunnfisk, på hhv. 30 ng/ml og 53 ng/ml, og både hannfisk og hunnfisk hadde signifikant høyere E2 nivå ($p < 0,001$) enn kontrollgruppen ved forsøkets slutt. Kontrollgruppen hadde et lavt plasmanivå av E2 gjennom forsøksperioden, og det var ingen signifikant økning i E2 i tiden forsøket pågikk.



Figur 8. Forskjell i plasmanivå av testosteron før og etter behandling hos fisk i behandlingsgruppe E2 av røye, sammenlignet med kontrollgruppe, presentert med hann- og hunnfisk separat. Kontrollgruppe (hannfisk n= 9, hunnfisk n=7), E2-gruppe (hannfisk n= 12, hunnfisk n=5). Boxplot viser median, 50 prosentiler, 25 og 75 prosentiler (boks). Minimums – og maksimumsverdier for data vist som stiplet linje, og ytterpunkter vist som sirkler. Stjerner angir signifikante forskjeller mellom siste og første måletidspunkt for kontrollfisk og behandlede fisk separat, som $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**) eller $p < 0,001$ (***)).

T-GRUPPEN

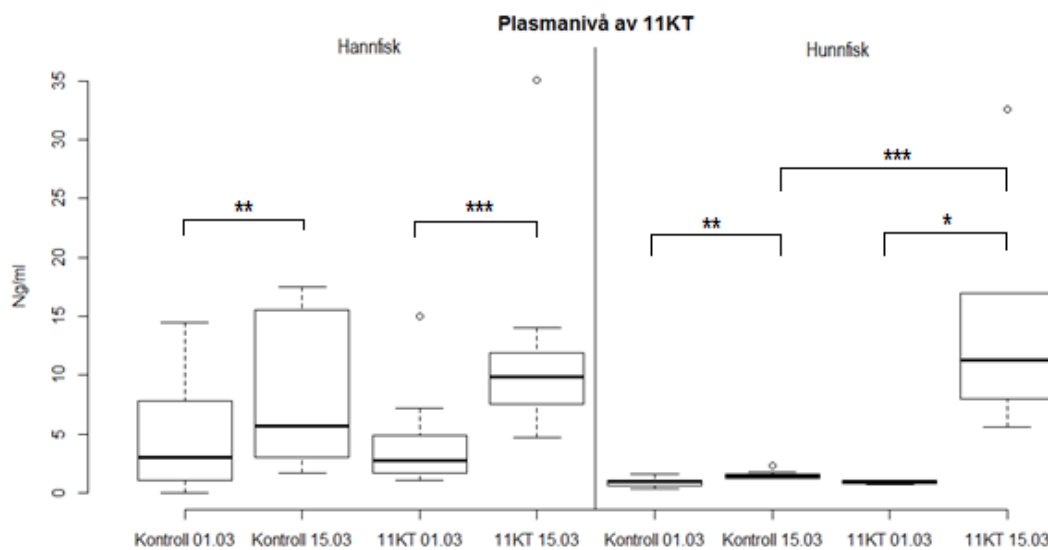
Fisken som ble behandlet med T viste en signifikant økning i plasmanivå av testosteron gjennom forsøksperioden, både hos hannfisk ($p < 0,001$) og hunnfisk ($p < 0,05$). Hannindividene i kontrollgruppen viste en signifikant økning i plasmanivå av T gjennom forsøksperioden ($p < 0,01$), noe en ikke fant hos hunnindividene i kontrollgruppa. Ved forsøkets slutt hadde den behandlede fisken et signifikant høyere plasmanivå av T enn kontrollgruppen, både hos hannindividene ($p < 0,05$), og hunnindividene ($p < 0,001$). Plasmanivåene av T hos den behandlede fisken lå på hhv. 7,4 ng/ml og 38,1 ng/ml hos hann- og hunnfisken, mens kontrollgruppen hadde nivåer på hhv. 3,5 ng/ml og 2,7 ng/ml.



Figur 9. Forskjell i plasmanivå av testosteron før og etter behandling hos fisk i behandlingsgruppe T av røye, sammenlignet med kontrollgruppe, presentert med hann- og hunnfisk separat. Kontrollgruppe (hannfisk n= 9, hunnfisk n=7), T-gruppe (hannfisk n= 12, hunnfisk n=6). Boxplot viser median, 50 prosentiler, 25 og 75 prosentiler (boks). Minimums – og maksimumsverdier for data vist som stiplede linje, og ytterpunkter vist som sirkler. Stjerner angir signifikante forskjeller mellom siste og første måletidspunkt for kontrollfisk og behandlede fisk separat, som $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**) eller $p < 0,001$ (***)

11KT-GRUPPEN

Fisken som ble behandlet med 11-KT viste en signifikant økning i plasmanivå av 11-KT gjennom forsøksperioden for både hannfisk ($p < 0,001$) og hunnfisk ($p < 0,05$). Signifikant økning i plasmanivå av 11KT ble også funnet i kontrollgruppen, både hos hunn ($p < 0,01$) - og hannfisk ($p < 0,01$), men hunnfisken i kontrollgruppen hadde et signifikant lavere plasmanivå av 11KT enn 11KT-gruppen 15. mars ($p < 0,001$). 11KT verdiene ved forsøkets slutt lå på 9,8 ng/ml for behandlet hannfisk, mens kontrollgruppen hadde et 11KT nivå på 5,7 ng/ml. Behandlet hunnfisk hadde et plasmanivå av 11KT på 11,3 ng/ml, mens kontrollgruppen hadde et nivå på 1,4 ng/ml.

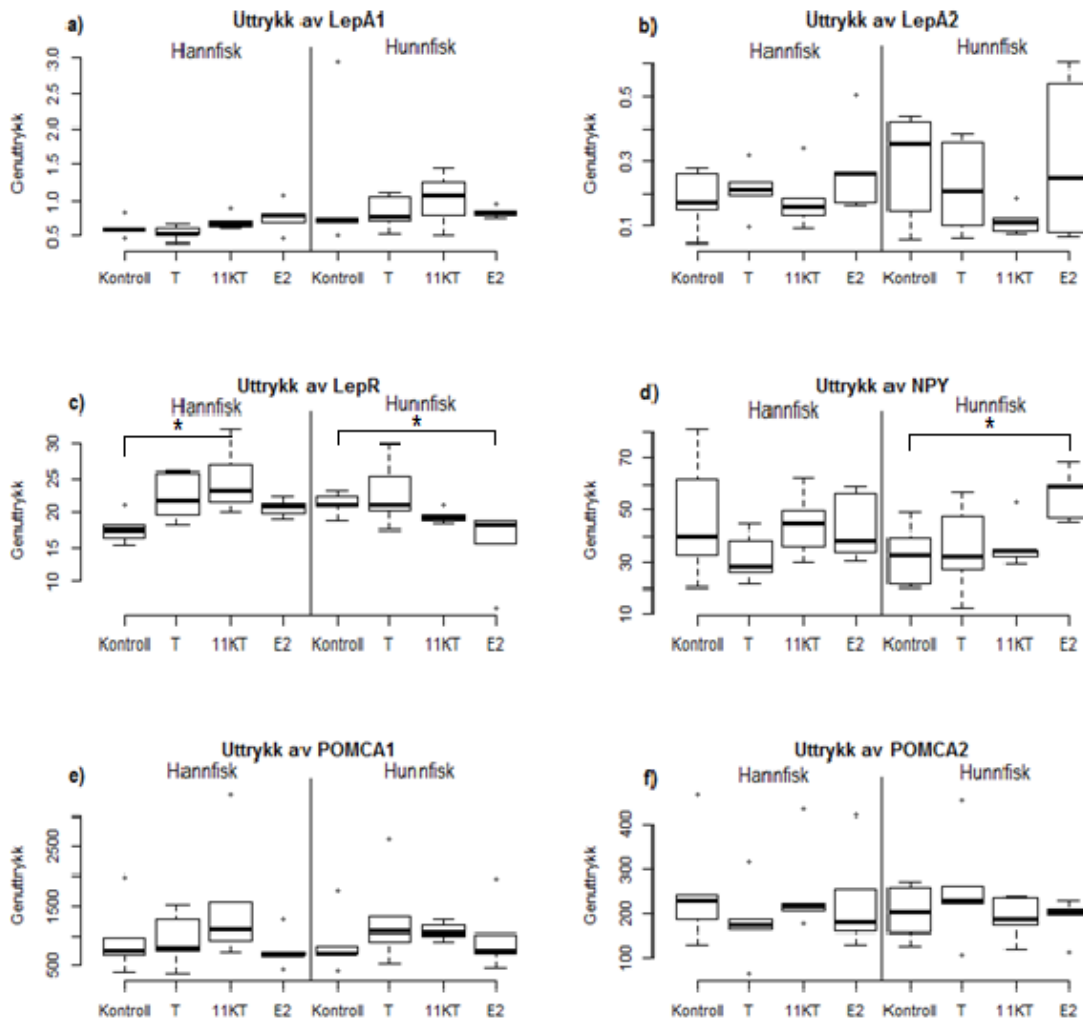


Figur 10. Endringer i plasmanivå av testosteron før og etter behandling hos fisk i behandlingsgruppe 11-KT av røye, sammenlignet med kontrollgruppe, presentert med hann- og hunnfisk separat. Kontrollgruppe (hannfisk n= 9, hunnfisk n=7), 11KT-gruppe (hannfisk n= 11, hunnfisk n=6). Boxplot viser median, 50 prosentiler, 25 og 75 prosentiler (boks). Minimums – og maksimumsverdier for data vist som stiple linje, og ytterpunkter vist som sirkler. Stjerner angir signifikante forskjeller mellom siste og første måletidspunkt for kontrollfisk og behandlede fisk separat, som $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ () eller $p < 0,001$ (***).**

3.1.5. Genuttrykk

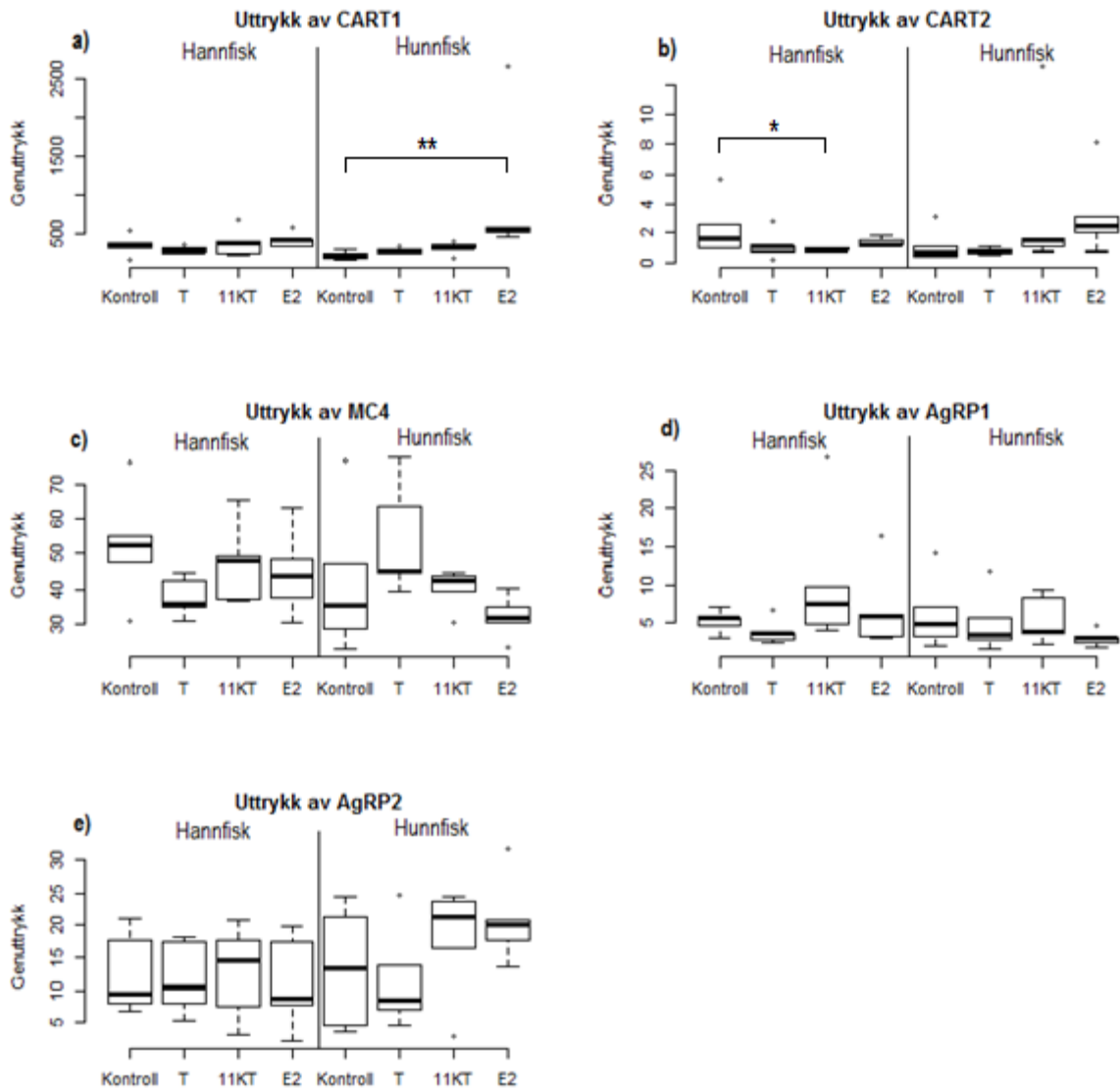
Det var få signifikante effekter av hormonbehandlingen på genuttrykk i hypothalamus i forsøk 1. Som det fremgår av figur 11 c var det signifikant lavere uttrykk av LepR ($p < 0,05$) hos E2 – behandlet hunnfisk sammenlignet med kontrollgruppen, og et signifikant høyere uttrykk av LepR ($p < 0,05$) hos E2 behandlet hannfisk sammenlignet med kontrollgruppen. Det var også et signifikant høyere uttrykk av NPY (figur 11 d) ($p < 0,05$) og CART1 (figur 12 a) ($p < 0,01$) hos E2 behandlet fisk sammenlignet med kontrollene i hunnfiskgruppen. 11KT-behandlet hannfisk hadde et signifikant lavere uttrykk av CART2 ($p < 0,05$) enn hannfisken i kontrollgruppen (figur 12 b).

RESULTATER



Figur 11. Genuttrykk i hypothalamus, normalisert mot uttrykk av EF1A, etter behandling hos fisk i de ulike behandlingsgruppene presentert med hann – og hunnfisk separat. Kontrollgruppe (hannfisk n= 9, hunnfisk n= 7), T-gruppe (hannfisk n= 12, hunnfisk n= 6), 11KT-gruppe (hannfisk n=11, hunnfisk n= 6, T-gruppe (hannfisk n=12, hunnfisk n= 6), E2-gruppe (hannfisk n=12, hunnfisk n= 5). Boxplot viser median, 50 prosentiler, 25 og 75 prosentiler (boks). Minimums – og maksimumsverdier for data vist som stiplede linje, og ytterpunkter vist som sirkler. Stjerner angir signifikante forskjeller mellom siste og første måletidspunkt for kontrollfisk og behandlede fisk separat, som $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**) eller $p < 0,001$ (***)

RESULTATER

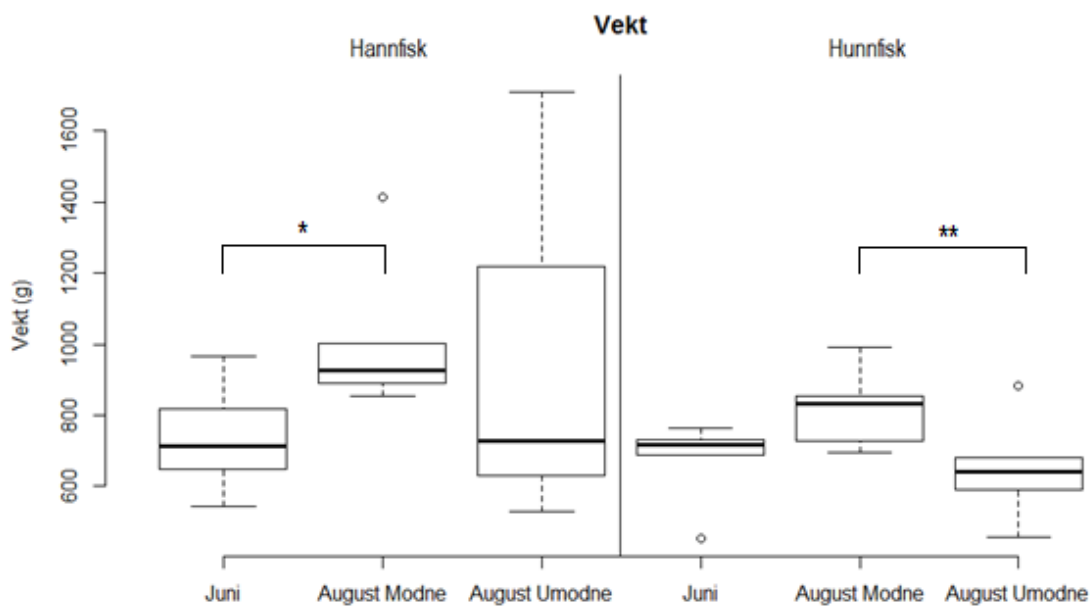


Figur 12. Genuttrykk i hypothalamus, normalisert mot uttrykk av EF1A, etter behandling hos fisk i de ulike behandlingsgruppene presentert med hann – og hunnfisk separat. Kontrollgruppe (hannfisk n= 9, hunnfisk n= 7), T-gruppe (hannfisk n= 12, hunnfisk n= 6), 11KT-gruppe (hannfisk n=11, hunnfisk n= 6), T-gruppe (hannfisk n=12, hunnfisk n= 6), E2-gruppe (hannfisk n=12, hunnfisk n= 5). Boxplot viser median, 50 prosentiler, 25 og 75 prosentiler (boks). Minimums – og maksimumsverdier for data vist som stiplede linje, og ytterpunkter vist som sirkler. Stjerner angir signifikante forskjeller mellom siste og første måletidspunkt for kontrollfisk og behandlede fisk separat, som $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**) eller $p < 0,001$ (***)

3.2. Forsøk 2

3.2.1. Vekt

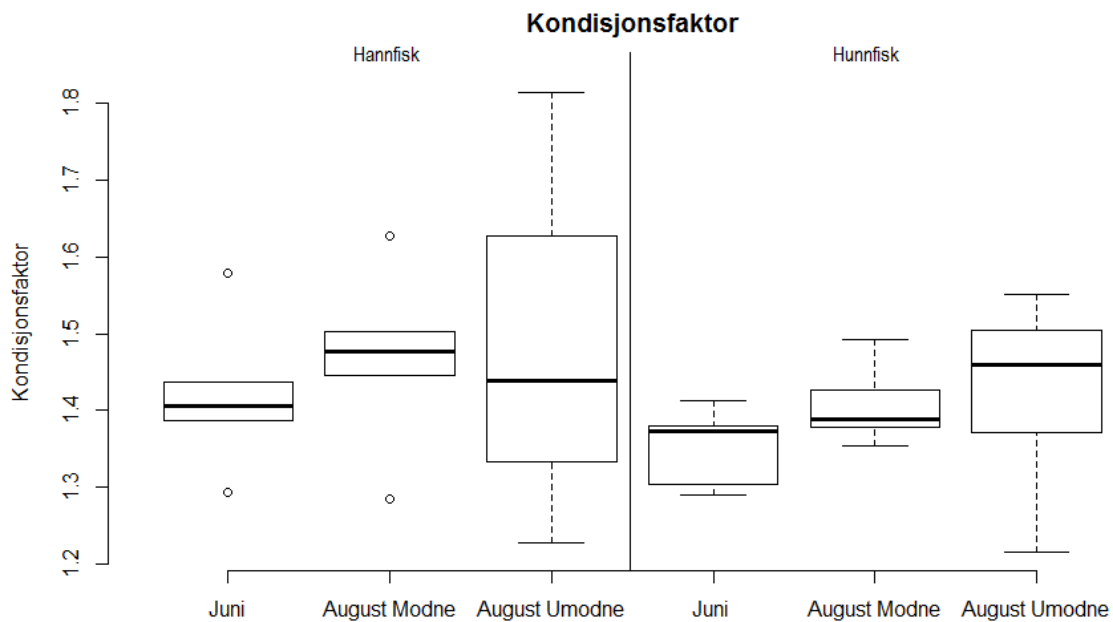
De modnende hannindividene hadde en signifikant høyere vekt ($p < 0,05$) enn hannfisken samlet i juni. Det var ingen forskjeller i vekt mellom umoden hannfisk i juni, og umoden hannfisk i august. Den modnende hannfisken hadde en høyere vekt enn den umodne hannfisken i august, men denne var ikke signifikant, da det var stor spredning i vekt hos umodne hannindivider i august. Det var ingen signifikant forskjell i vekt mellom umodne hunnindivider i juni, og modnende og umodne hunnindivider i august. Den modnende hunnfisken hadde imidlertid en signifikant høyere vekt ($p < 0,01$) enn den umodne hunnfisken i august.



Figur 13. Endring i vekt gjennom forsøksperioden for individer av røye, samlet i juni (hannfisk $n=5$, hunnfisk $n=5$), august - modnende (hannfisk $n=16$, hunnfisk $n=5$), august umodne (hannfisk $n=3$, hunnfisk $n=5$), presentert med hann – og hunnfisk separat. Boxplot viser median, 50 prosentiler, 25 og 75 prosentiler (boks). Minimums – og maksimumsverdier for data vist som stiplet linje, og ytterpunkter vist som sirkler. Stjerner angir signifikante forskjeller mellom siste og første måletidspunkt for kontrollfisk og behandlede fisk separat, som $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**) eller $p < 0,001$ (***)

3.2.2. Kondisjonsfaktor

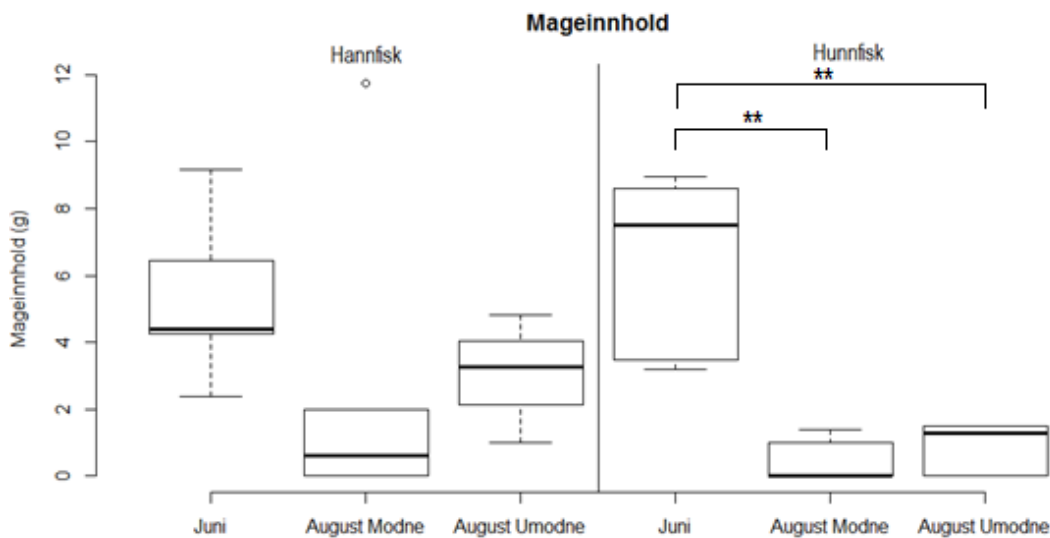
Det var ingen signifikant forskjell i kondisjonsfaktor mellom umodne individer i juni, og modnende/umodne i august (figur 14). Det var heller ingen signifikante forskjeller mellom gruppen som var modnende og de som var umodne i august.



Figur 14. Kondisjonsfaktor hos individer av røye samlet i juni (hannfisk n=5, hunnfisk n= 5), august - modnende (hannfisk n=16, hunnfisk n=5), august umodne (hannfisk n= 3, hunnfisk n=5), presentert med hann – og hunnfisk separat. Boxplot viser median, 50 prosentiler, 25 og 75 prosentiler (boks). Minimums – og maksimumsverdier for data vist som stiplet linje, og ytterpunkter vist som sirkler. Stjerner angir signifikante forskjeller mellom siste og første måletidspunkt for kontrollfisk og behandlede fisk separat, som $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**) eller $p < 0,001$ (***)

3.2.3. Mageinnhold

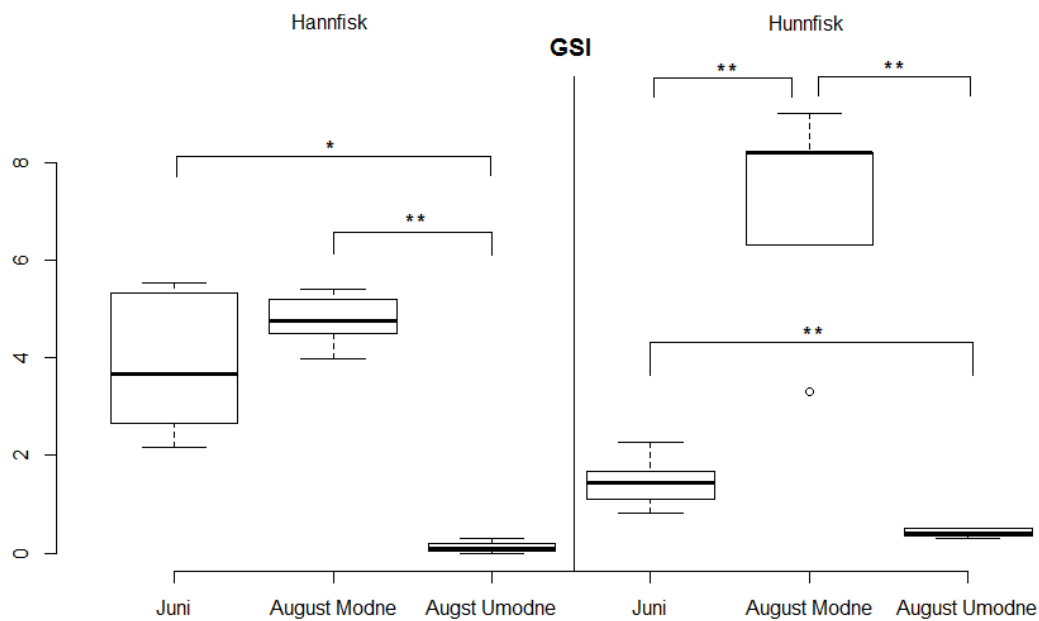
Det var ingen signifikante forskjeller i mageinnhold hos hannfisk samplet på sommeren og i august (figur 15). Hunnindividene samplet i juni hadde et signifikant høyere mageinnhold sammenlignet med modnende hunnindivider samplet i august ($p < 0,01$) og umodne hunnindivider samplet i august ($p < 0,01$).



Figur 15. Mageinnhold hos individer av røye samplet i juni (hannfisk n=5, hunnfisk n= 5), august - modnende (hannfisk n=16, hunnfisk n=5), august umodne (hannfisk n= 3, hunnfisk n=5), presentert med hann – og hunnfisk separat. Boxplot viser median, 50 prosentiler, 25 og 75 prosentiler (boks). Minimums – og maksimumsverdier for data vist som stiplede linje, og ytterpunkter vist som sirkler. Stjerner angir signifikante forskjeller mellom siste og første måletidspunkt for kontrollfisk og behandlede fisk separat, som $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**) eller $p < 0,001$ (***)

3.2.4. Gonadosomatisk Index

Det ble observert en signifikant høyere GSI hos modnende hunnindivider i august, enn hos umodne hunnindivider i juni og august ($p < 0,01$). Det ble også observert en signifikant lavere GSI hos umodne hunnindivider i august ($p < 0,01$), sammenlignet med umodne individer i juni. De modnende hannindividene i august hadde en signifikant høyere GSI enn umodne hanner i august ($p < 0,01$), og de umodne hannene i august hadde en signifikant lavere GSI enn de umodne hannene i juni ($p < 0,05$).

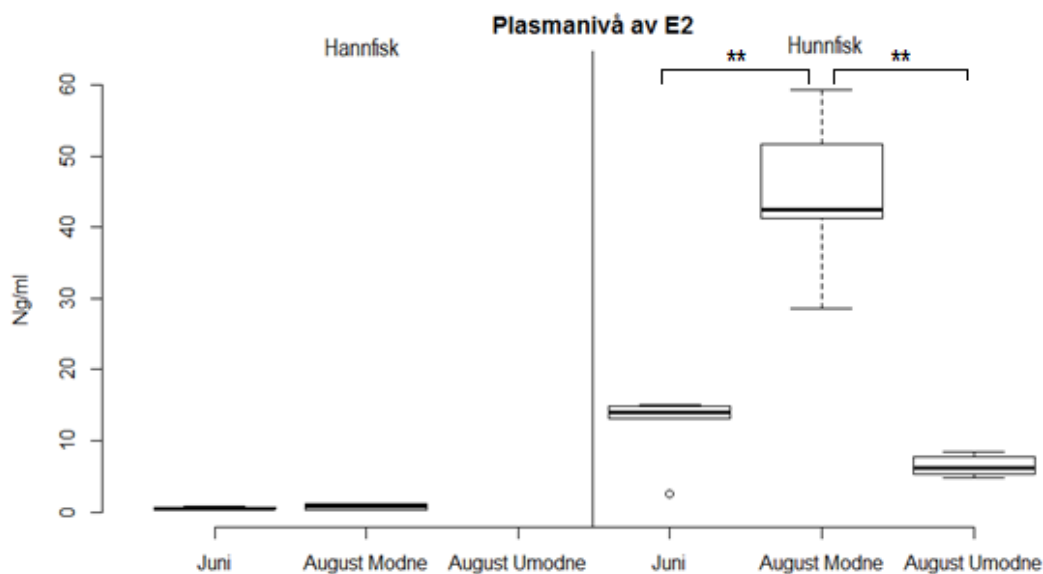


Figur 16. GSI hos individer av røye samlet i juni (hannfisk n=5, hunnfisk n= 5), august - modnende (hannfisk n=16, hunnfisk n=5), august umodne (hannfisk n= 3, hunnfisk n=5), presentert med hann – og hunnfisk separat. Boxplot viser median, 50 prosentiler, 25 og 75 prosentiler (boks). Minimums – og maksimumsverdier for data vist som stiplet linje, og ytterpunkter vist som sirkler. Stjerner angir signifikante forskjeller mellom siste og første måletidspunkt for kontrollfisk og behandlede fisk separat, som $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**) eller $p < 0,001$ (***)

3.2.5. Kjønnshormoner

PLASMANIVÅ AV E2

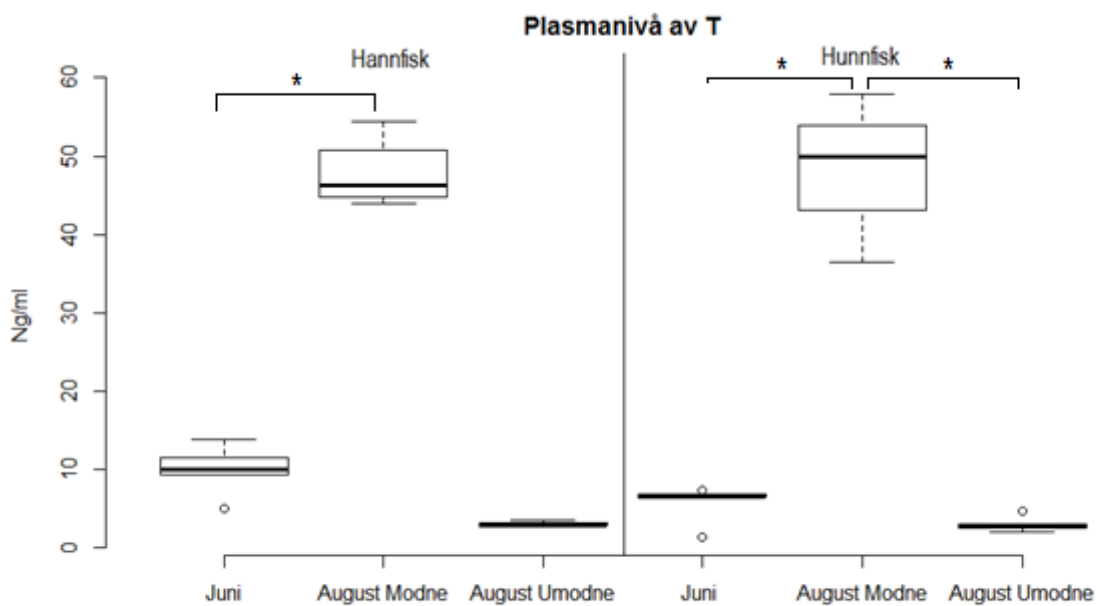
Plasmanivå av E2 (figur 17) viste en signifikant økning fra umoden hunnfisk samlet i juni og modnende hunnfisk samlet i august ($p < 0,01$). Den modnende hunnfisken samlet i august hadde også et signifikant høyere E2-nivå enn umoden hunnfisk samlet i august ($p < 0,01$). Gruppen med umodne hannfisk samlet i august hadde ikke detekterbare nivåer av E2 i plasma, hvilket betyr at samtlige individer hadde en plasmaverdi av E2 som lå under 0,2 ng/ml. Det var ingen forskjeller i plasmanivå av østradiol mellom umoden hannfisk samlet i juni, og umoden/modnende hannfisk i august. Det ble heller ikke funnet forskjeller mellom umodne og modnende fisk samlet i august, hverken hos hanner eller hunner.



Figur 17. Plasmanivå av E2 hos individer av røye samlet i juni (hannfisk $n=5$, hunnfisk $n=5$), august - modnende (hannfisk $n=16$, hunnfisk $n=5$), august umodne (hannfisk $n=3$, hunnfisk $n=5$), presentert med hann – og hunnfisk separat. Boxplot viser median, 50 prosentiler, 25 og 75 prosentiler (boks). Minimums – og maksimumsverdier for data vist som stippet linje, og ytterpunkter vist som sirkler. Stjerner angir signifikante forskjeller mellom siste og første måletidspunkt for kontrollfisk og behandlede fisk separat, som $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**) eller $p < 0,001$ (***)

PLASMANIVÅ AV T

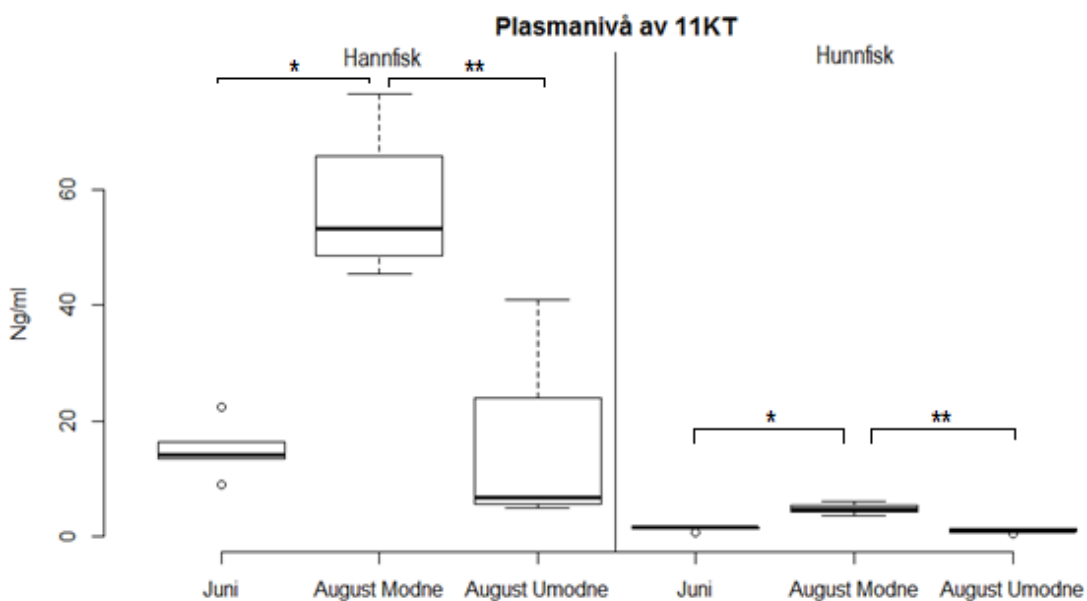
Plasmamålingene av T (figur 18) viste at den modnende fisken samlet i august hadde et signifikant høyere plasmanivå av testosteron i forhold til den umodne fisken samlet i juni ($p < 0,05$), både for hann – og hunnfisk. Det var et signifikant lavere plasmanivå av testosteron ($p < 0,05$) hos de umodne hunnene samlet i august, enn hos de modnende hunnene som ble samlet samtidig. Denne forskjellen i plasmanivå så man ikke mellom de umodne og modnende hannene samlet i august.



Figur 18. Plasmanivå av T hos individer av røye samlet i juni (hannfisk n=5, hunnfisk n= 5), august - modnende (hannfisk n=16, hunnfisk n=5), august umodne (hannfisk n= 3, hunnfisk n=5), presentert med hann – og hunnfisk separat. Boxplot viser median, 50 prosentiler, 25 og 75 prosentiler (boks). Minimums – og maksimumsverdier for data vist som stiplet linje, og ytterpunkter vist som sirkler. Stjerner angir signifikante forskjeller mellom siste og første måletidspunkt for kontrollfisk og behandlede fisk separat, som $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**) eller $p < 0,001$ (***)

PLASMANIVÅ AV 11KT

Plasmamålingene av 11-KT (figur 19) viste en signifikant økning ($p < 0,05$) mellom de umodne individene samlet i juni, og de modnende individene samlet i august, både hos hannfisk og hunnfisk. Denne forskjellen så man ikke mellom de umodne individene i juni og de umodne i august. Den modnende hann – og hunnfisken samlet i august hadde imidlertid et signifikant høyere plasmanivå av 11-KT ($p < 0,01$) sammenlignet med umoden fisk samlet i august.

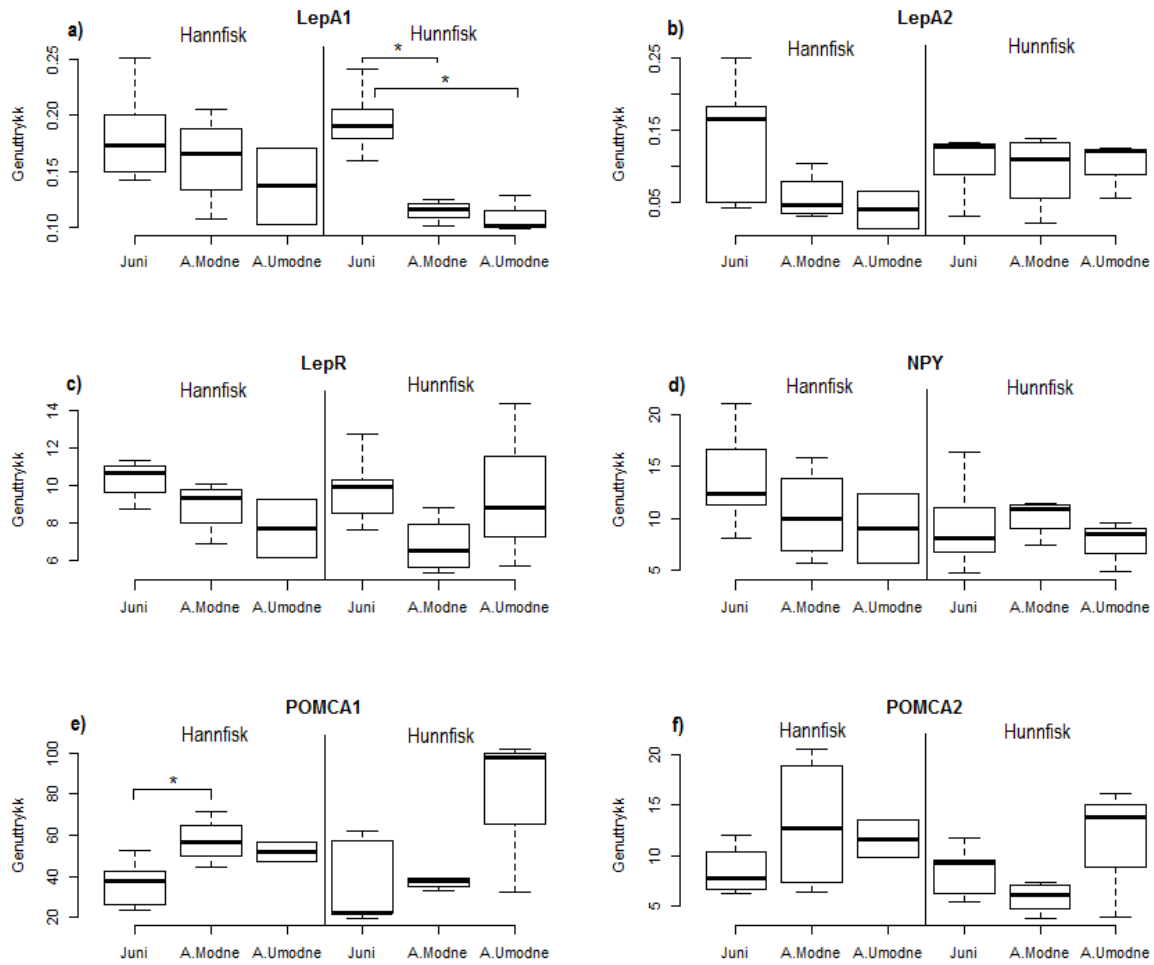


Figur 19. Plasmanivå av 11KT hos individer av røye samlet i juni (hannfisk n=5, hunnfisk n= 5), august - modnende (hannfisk n=16, hunnfisk n=5), august umodne (hannfisk n= 3, hunnfisk n=5), presentert med hann – og hunnfisk separat. Boxplot viser median, 50 prosentiler, 25 og 75 prosentiler (boks). Minimums – og maksimumsverdier for data vist som stiplet linje, og ytterpunkter vist som sirkler. Stjerner angir signifikante forskjeller mellom siste og første måletidspunkt for kontrollfisk og behandlede fisk separat, som $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ () eller $p < 0,001$ (***)**

3.2.6. Genuttrykk

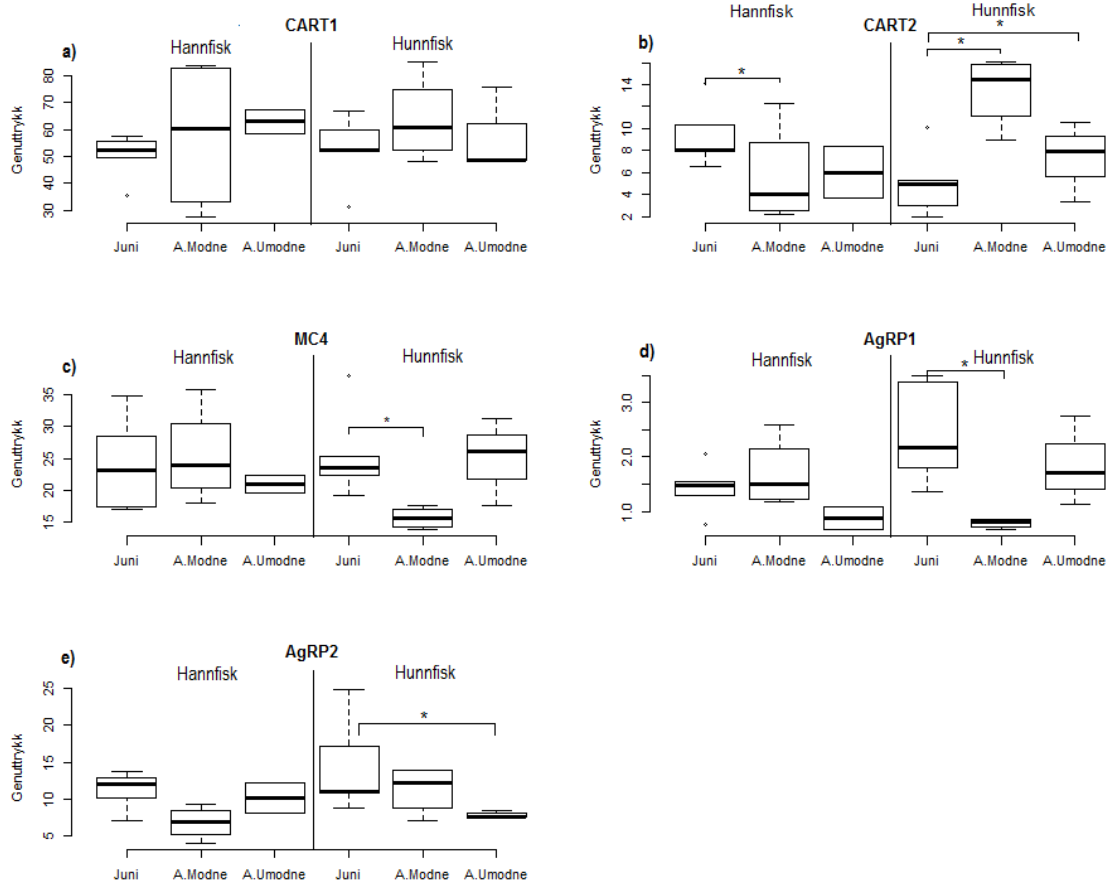
Det var få signifikante effekter av tid og kjønnsmodning på genuttrykk i hypothalamus. Som det fremkommer av figur 20 a var det et signifikant lavere uttrykk av LepA1 hos modnende og umodne hunnfisk i august sammenlignet med i juni ($p < 0,05$), og et signifikant høyere uttrykk av POMCA1 (figur 20 e) hos modnende hannfisk i august sammenlignet med umodne hanner i juni ($p < 0,05$). Det ble også funnet et signifikant lavere uttrykk av CART2 (figur 21 b) hos modnende hanner i august enn hos umodne hanner i juni ($p < 0,05$) og et signifikant høyere uttrykk av CART2 i august hos modnende og umodne hunner enn hos umodne hunner i juni ($p < 0,05$). Det ble funnet et signifikant lavere uttrykk av MC4R (figur 21 c) hos modnende hunnfisk i august enn hos umodne hunnfisk i juni ($p < 0,05$), og et signifikant lavere uttrykk av AgRP1 (figur 21 d) hos modnende hunner i august enn hos umodne hunner i juni ($p < 0,05$). Umodne hunnfisk i august hadde et signifikant lavere uttrykk av AgRP2 (figur 21 e) enn umodne hunnfisk i juni ($p < 0,05$).

RESULTATER



Figur 20. Genuttrykk i hypothalamus, normalisert mot uttrykk av EF1A, hos fisk samlet i juni (hannfisk $n = 5$, hunnfisk $n = 5$), modnende individer i august (hannfisk $n = 4$, hunnfisk $n = 4$), og umodne individer i august (hannfisk $n = 2$, hunnfisk $n = 3$), presentert med hann – og hunnfisk separat. Boxplot viser median, 50 prosentiler, 25 og 75 prosentiler (boks). Minimums – og maksimumsverdier for data vist som stiplet linje, og ytterpunkter vist som sirkler. Stjerner angir signifikante forskjeller mellom siste og første måletidspunkt for kontrollfisk og behandlede fisk separat, som $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**) eller $p < 0,001$ (***)

RESULTATER



Figur 21. Genuttrykk i hypothalamus, normalisert mot uttrykk av EF1A, hos fisk samlet i juni (hannfisk $n = 5$, hunnfisk $n = 5$), modnende individer i august (hannfisk $n = 4$, hunnfisk $n = 4$), og umodne individer i august (hannfisk $n = 2$, hunnfisk $n = 3$), presentert med hann – og hunnfisk separat. Boxplot viser median, 50 prosentiler, 25 og 75 prosentiler (boks). Minimums – og maksimumsverdier for data vist som stiplet linje, og ytterpunkter vist som sirkler. Stjerner angir signifikante forskjeller mellom siste og første måletidspunkt for kontrollfisk og behandlede fisk separat, som $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ () eller $p < 0,001$ (**).**

4.0. DISKUSJON

4.1. Forsøk 1

4.1.1. Vekst og appetitt

Det antas at Arktisk røye har utviklet en anadrom livsstrategi på bakgrunn av en sterk sesongvariasjon i mattilgang og det faktum at marine systemer er mye rikere på mat enn ferskvannssystemene i Arktis (Gross *et al.*, 1988). Som en følge av dette har den over tid tilsynelatende utviklet en sesongbasert regulering av matinntak og vekst som er uavhengig av tilgangen på mat (Tveiten *et al.*, 1996, Sæther *et al.*, 1996).

Hos røye blir beslutningen om hvorvidt et individ skal kjønnsmodne eller ikke, antakelig tatt høsten ett år i forkant av selve kjønnsmodningen (Frantzen, 2003), og røye som skal kjønnsmodne kommende høst, har vist seg å ha et høyere kjønnsormonnivå, vekst og kondisjonsfaktor om vinteren enn individer som ikke skal kjønnsmodne (Tveiten *et al.*, 1998). En svak økning i plasmanivå av kjønnsormoner om vinteren kan dermed være en indikasjon på at et individ vil kjønnsmodne påfølgende høst (Frantzen *et al.*, 1997), og denne økningen må i så fall være en del av en fysiologisk mekanisme som inngår i kjønnsmodningsprosessen. Det er fortsatt ikke klart hvorvidt det er økningen i plasmanivå av kjønnsormoner om vinteren som fører til økt vekst og energideponering hos individer som skal kjønnsmodne, eller om dette er forårsaket av andre mekanismer knyttet til kjønnsmodningsprosessen.

I forsøk 1 var det vanskelig å forutsi hvilke individ som ville ha blitt kjønnsmodne om høsten, ettersom alle hadde små gonader. Det er tidligere blitt observert tegn til kjønnsmodning hos røye allerede i mars, men det er problematisk å skille fisk som skal modne fra fisk som ikke skal modne på et så tidlig stadium av gonadeutviklingen (Frantzen *et al.*, 1997). Det ble også registrert stor individuell variasjon i plasmanivå av T og 11KT hos kontrollgruppen, noe som indikerer at gruppen både besto av fisk som skulle kjønnsmodne, og fisk som ikke skulle kjønnsmodne påfølgende høst. Som følge av dette er det ikke kjent hvorvidt begge kategorier av fisk ble behandlet med kjønnsormoner, og i hvilken grad dette i så fall kan ha påvirket mulige effekter av hormonbehandlingen.

Som det fremgår av figur 8, 9, og 10, førte injeksjon av de respektive kjønnshormoner til en tydelig og signifikant økning i plasmanivå av disse i perioden forsøket pågikk. Plasmanivå av T hos T-behandlet fisk (figur 9) hadde en medianverdi på 7,35 ng/ml hos hanner og 38,1 ng/ml hos hunner. Til sammenligning lå T-nivåer hos kontrollgruppen på 3,55 ng/ml og 2,69 ng/ml, respektivt. Hannfisk behandlet med T viste stor variasjon i plasmanivå av T ved forsøkets slutt, og nivåene kan sammenlignes med tidligere registreringer av naturlig plasmanivå av T i mars-juni hos hannfisk (Tveiten *et al.*, 1998). Plasmanivå av T hos T-behandlet hunnfisk er sammenlignbare med det som tidligere er funnet hos modnende hunnfisk i august (Tveiten *et al.*, 1998, Frantzen *et al.*, 1997).

Plasmanivå av 11KT hos 11KT-behandlet fisk var 9,8 ng/ml og 11,25 ng/ml hos hhv. hann – og hunnfisk, mens kontrollgruppen hadde plasmanivå av 11KT på hhv. 5,69 ng/ml og 1,38 ng/ml ved forsøkets slutt (figur 10). 11KT-behandlet hannfisk hadde plasmanivå av 11KT som er sammenlignbare med det som tidligere er registrert i juli og august (Tveiten *et al.*, 1998), men også i denne gruppen var det stor individuell variasjon både hos hann- og hunnfisk, og enkelte av individene hadde plasmanivå av 11KT som kan sammenlignes med verdier registrert i september hos modnende hannfisk (Tveiten *et al.*, 1998).

Plasmanivå av E2 hos E2-behandlet hunn- og hannfisk lå på hhv. 53,1 ng/ml og 30,5 ng/ml. Kontrollgruppen hadde E2 verdier på 2,1 og 0,8 ng/ml (figur 8). Plasmanivåene hos E2-behandlet hunnfisk var betydelig høyere enn det som tidligere er registrert hos hunnrøye like før ovulering (Frantzen *et al.*, 1997, Tveiten *et al.*, 1998). De høye nivåene av E2 som ble oppnådd i dette forsøket står i kontrast til tidligere studier som har observert en høy nedbrytningsrate av E2 hos regnbueørret, som førte til lave plasmanivå av E2 etter injisering (Baroiller *et al.*, 1987). Det ble imidlertid registrert et plasmanivå av E2 på 42,5 ng/ml hos modnende hunnfisk i august i forsøk 2 (figur 17), og dette gjør at vi kan anta at behandlingen av kjønnshormoner på hunnfisk har imitert økningen i kjønnshormoner som oppstår på sensommeren/høsten, før gyting. For hannfisk har behandlingen antakelig simulert den økning i T og 11KT som normalt skjer om våren og sommeren hos individer som skal kjønnsmodne kommende høst. Hormonbehandlingene hadde derved bare delvis oppnådd den ønskede effekt om å gi et hormonnivå sammenlignbart med det som en finner hos kjønnsmodnende fisk på høsten.

Det ble funnet få, eller ingen effekter av hormoninjeksjon på mageinnhold (figur 7), tilvekst (figur 3, tabell 7) og endring i kondisjonsfaktor (figur 4, 5 og 6). Dette indikerer at

kjønns hormoner, *per se.*, ikke er en regulerende faktor for matinntak og vekst hos røye. Disse resultatene motstrider det som tidligere er funnet ved intraperitoneal injeksjon av E2 og T hos sea bass (*Dicentrarchus labrax*), hvor det ble sett en dose-avhengig reduksjon i vekst, matinntak og føreffektivitet (Leal *et al.*, 2009). Leal *et al.* (2009) implanterte sea bass individene med en dose tilsvarende 15 mg T og 17- β østradiol (60 μ g/g), på et tidspunkt hvor fiskens gonader var umodne, og kjønns hormonnivåer var lave. Til sammenligning ble individene i forsøk 1 injisert med en hormondose tilsvarende 1 μ g/g kroppsvekt for hver injeksjon, under lignende modningsstatusforhold.

Selv om det tidligere er funnet at implantert eller oralt administrert E2 har ført til en reduksjon i vekst hos fisk (Leal *et al.*, 2009, Davis & Ludwig, 2004), er det også funnet at oral administrasjon av E2 hos ål (*Anguilla anguilla*) fører til en økning i vekst ved dosene 10 mg/kg og 20 mg/kg, men ikke ved dosen 2 mg/kg (Tzchori *et al.*, 2004). Dette indikerer tilstedeværelsen en artsspesifikk, doseavhengig effekt av E2 (Leal *et al.*, 2009), som kan forklare hvorfor resultatene fra dette forsøket strider mot tidligere funn. Det er også mulig at tidspunkt på året behandlingen skjer, og grad av kjønnsmodning kan påvirke effekten av hormonbehandlingen på appetitt og tilvekst.

4.1.2. Appetittregulatorer

Resultatene viser en manglende respons av hormonbehandling på mageinnhold ved slutten av forsøket, og økningen i vekt og kondisjonsfaktor indikerer at hormonbehandlingen ikke hadde påvirket fiskens førintak og energiforbruk. Det ble heller ikke funnet noen effekt av hormonbehandling på uttrykk av antatte appetittregulatorer i hypothalamus, som er antatt å være det basale området i hjernen som regulerer appetitt hos fisk (Volkoff *et al.*, 2009).

Det er overraskende at det ikke ble funnet større effekter av hormonbehandling på uttrykket av hypothalamiske neuropeptider. Blant effektene som ble observert, var en økning i uttrykket av det orexigene *NPY* hos E2 behandlet hunnfisk (figur 11 d), men denne økningen gjenspeiles ikke i fiskens vekst sammenlignet med den ubehandlede hunnfisken (figur 3). Dette står i kontrast til tidligere forsøk, hvor det er vist at sentral injeksjon av *NPY* utøver en sterk orexigen effekt hos gullfisk (*Carassius auratus*) (Narnaware *et al.*, 2000). Det er også vist at *NPY* stimulerer til frigjøring av luteiniserende hormon (LH) hos flere fiskearter (Van Der Kraak, 2009) og hos pattedyr er *NPY* nært knyttet til reproduksjon ved å delta i signaliseringen om energistatus fra perifere vev og organer til hjernen (review av Roa, 2013).

I forbindelse med dette forsøket er det ikke mulig å trekke noen slutninger om hvorvidt det eksisterer en kobling mellom *NPY* og LH, da uttrykket av LH i hjernen ikke ble målt. Den observerte stimulerende effekten av E2 på *NPY* uttrykk i hypothalamus etterlater også en rekke spørsmål om hvilken mekanisme som her antydes hos umoden røye.

E2 ble også funnet å virke stimulerende på uttrykket av hypothalamisk *CART1* hos hunnfisk (figur 12 a), og 11KT ble funnet å virke hemmende på uttrykket av *CART2* hos hannfisk (figur 12 b). Disse effektene av kjønnshormoner på uttrykket av de anorexigene CART-neuropeptidene viste heller ingen effekt på vekst og mageinnhold, noe som indikerer at forholdet mellom kjønnshormoner og CART i hypothalamus har en annen mekanisme enn regulering av appetitt og energihomeostase hos røye.

Gonadotropin releasing hormone (GnRH) er et neuropeptid som spiller en viktig rolle i regulering av reproduksjon ved å stimulere til utskillelse av blant annet LH og follikkelstimulerende hormon (FSH), som igjen virker på gonadene som produserer kjønnshormoner. Hos gullfisk er det funnet at sentral injeksjon av GnRH virker hemmende på matinntak hos modne hannindivider ved å nedregulere det hypothalamiske mRNA uttrykket av det orexigene preproorexin (Hoskins *et al.*, 2008). Det er derfor mulig at en appetitthemmende effekt av kjønnsmodning er knyttet til basale aktører i den hormonelle hypothalamus-hypofyse-gonadeaksen, som GnRH, og at temporære endringer i interaksjonen mellom kjønnshormoner og GnRH vil påvirke utfallet av et forsøk hvor plasmanivå av kjønnshormoner manipuleres.

4.1.3. Leptin

Fisk skiller seg fra pattedyr ved at leptin produseres i så å si alle vev og organer som er undersøkt, inklusive ulike hjerneavsnitt (Tinoco *et al.*, 2012). Hos røye er det påvist uttrykk av *LepA1* og *LepA2* i telencephalon, optisk tectum, cerebellum og hypothalamus (E. Jørgensen, upublisert). Hos regnbueørret er det vist at intraperitoneal injeksjon av regnbueørret-leptin virker anorexigent via regulering i hypothalamus (Murashita *et al.*, 2008), og hos gullfisk har både sentralt og perifert administrert leptin vist å ha en anorexigen effekt (Volkoff *et al.*, 2003). Hos røye er det funnet at leptin har en medvirkende rolle i reguleringen av energiomsetningen under lange perioder med faste (Frøiland *et al.*, 2012), men det er ikke funnet indikasjoner på at leptinnivå i plasma reflekterer fiskens energistatus (Kling *et al.*, 2012, Fuentes *et al.*, 2013), eller at plasma leptinnivåer korrelerer negativt med appetitt hos

fisk (Frøiland *et al.*, 2012, Kling *et al.*, 2009), som hos pattedyr (Wynne *et al.*, 2005). Det er imidlertid ikke publisert noen arbeid hittil hvor uttrykket av *leptin* i hypothalamus er målt og relatert til kjønnsmodning og appetitt hos fisk, og det er heller ikke undersøkt en mulig effekt av kjønns hormoner på uttrykket av *leptin* i hjerne hos fisk.

I forsøk 1 ble det ikke funnet noen effekter av kjønns hormonbehandling på uttrykk av *LepA1* og *LepA2* i hypothalamus hos umoden røye i mars (figur 11 a & b). Resultatene fra dette forsøket indikerer dermed at kjønns hormoner, *per se.*, ikke påvirker uttrykket av *leptin* i hypothalamus hos røye.

Hos de samme individene som ble brukt i forsøk 1, ble det funnet en kraftig oppregulering av *LepA1* i lever hos E2-behandlede hunn- og hannindivider, og en oppregulering av *LepA2* i lever hos E2-behandlede hann – og hunnindivider, selv om sistnevnte ikke var signifikant (M. Leitet, upublisert). Dette viser at E2 har en spesifikk effekt på leptinuttrykk i lever, men ikke i hjerne hos røye. Dette kan knyttes til en rolle av leptin i produksjonen av vitellogenin i lever, som også ble stimulert av E2-behandling hos røye (M. Leitet, upublisert). Ettersom hormonbehandlingen ikke påvirket appetitt og vekst, er det ikke mulig å konkludere med hvorvidt genuttrykk av antatte appetittregulatorer i hypothalamus påvirkes av fiskens energistatus.

Det ble imidlertid funnet en effekt av kjønns hormoner på uttrykket av *LepR* (figur 11 c), hvor 11KT stimulerte *LepR* uttrykk hos hannfisk, og E2 nedregulerte *LepR*-uttrykk hos hunnfisk. Endringene i *LepR* uttrykk var ikke store, og det fremstår som uklart hvilken mekanisme som avspeiles mellom kjønns hormoner og *LepR* i dette forsøket.

4.2. Forsøk 2

4.2.1. Mageinnhold og kondisjonsfaktor

På tross av at kjønnsmodning er en energikrevende prosess, er det et kjent faktum at en rekke fiskearter ikke inntar mat i en periode før gyting. I forbindelse med kjønnsmodning hos laksefisk er det vist at tidspunktet hvor et individ får redusert appetitt, kan variere med opptil 2 mnd. innenfor en populasjon (Kadri *et al.*, 1995), men også at den største reduksjonen i vekst skjer i de senere stadier av gonadeutviklingen (Arndt, 2000). Det er imidlertid også studier som konkluderer med at opphør av matinntak hos røye ikke er forbundet med kjønnsmodning *per se.*, men at fisk får redusert appetitt når de når en kondisjonsfaktor på 1,4-1,5 (Tveiten *et al.*, 1996). Det er derfor mulig at fisken slutter å innta mat idet den har opparbeidet seg tilstrekkelig med energireserver i møte med vinteren og eventuelt reproduksjon (Kadri *et al.*, 1995), og at reduksjonen i appetitt dermed er forbundet med en genetisk terskel knyttet til energistatus (Tveiten *et al.*, 1996).

I forsøk 2 ble det ikke observert forskjeller i kondisjonsfaktor mellom umoden og modnende fisk (figur 14). Modnende hannfisk hadde i august en kondisjonsfaktor på 1,47, som var noe høyere enn den umodne fiskens kondisjonsfaktor på 1,44. Den modnende hunnfisken hadde imidlertid en kondisjonsfaktor på 1,39, som lå noe lavere enn hos den umodne hunnfisken på 1,46. I juni lå kondisjonsfaktoren på hhv. 1,4 hos hanner, og 1,37 hos hunner.

Det ble observert en tydelig forskjell i mageinnhold mellom umodne individer i juni, og modnende og umodne individer i august (figur 15). Mageinnholdet til modnende hunn- og hannfisk i august var mindre enn hos umoden fisk både i juni og august, selv om forskjellen ikke var signifikant hos hannfisk. Dette samsvarer med tidligere funn, hvor det er observert at både modnende og ikke modnende røye får redusert fôrinntak i perioden juli-august (Sæther *et al.*, 1996). Dette indikerer at matinntaket er blitt redusert på et tidspunkt mellom juni-august for både modnende og umoden fisk, og ettersom alle uttaksgrupper hadde en kondisjonsfaktor som lå nært 1,4-1,5, er dette i tråd med konklusjonen i Tveiten *et al.* (1996), om at fisken mister appetitt når den har nådd en kondisjonsfaktor på 1,4-1,5 på sommeren.

Hvorvidt kjønnsmoden røye får en reduksjon i matinntak før umoden røye, er her ikke mulig å konkludere med, ettersom mageinnhold ikke ble målt mellom juni og august. Gruppen som ble tatt ut i juni besto trolig både av fisk som skulle modne, og fisk som ikke skulle modne

kommende høst, noe som kan være årsaken til at det ikke ble funnet forskjeller i kondisjonsfaktor. Det er tidligere observert at umoden fisk har bedre kondisjon enn moden fisk om høsten (Tveiten *et al.*, 1996, Jobling & Baardvik, 1991), og det er mulig at den modnende fisken i august allerede på uttakstidspunktet i august hadde fått en nedgang i kondisjon som følge av redusert appetitt, og oppbygging av gonader.

Resultatene fra forsøk 2 underbygger konklusjonen fra forsøk 1 om at kjønnshormoner *per se.*, ikke har en effekt på appetitt og vekst, ettersom det 1) ikke ble observert forskjeller i vekt mellom modnende og umodne individer i august og 2) at det ble observert et lavere matinntak hos både modnende og umoden fisk i august.

4.2.2. Kjønnshormoner

Det er tidligere observert at modnende røye når et «toppunkt» i plasmanivå av kjønnshormoner i slutten av august og begynnelsen av september, etterfulgt av en rask nedgang etter ovulering (Mayer *et al.*, 1992). I forsøk 2 var det tydelig at de modnende individene hadde et høyere plasmanivå av kjønnshormoner (figur 17, 18 & 19), og en høyere GSI (figur 16) enn de umodne individene i august.

Hos voksen hannfisk av røye, er 11KT hovedandrogen (Mayer *et al.*, 1992). Den modnende hannfisken i forsøk 2 viste klart forhøyede plasmanivå av T og 11KT sammenlignet med umoden fisk i juni og august (figur 18 & 19). Det ble sett en klart høyere plasmakonsentrasjon av E2 hos modnende hunnfisk i august, enn umoden hunnfisk i juni og august. Plasmanivåene av E2 registrert hos modnende hunnfisk i dette forsøket er betydelig høyere enn det som tidligere er registrert hos røye om høsten (Tveiten *et al.*, 1998, Mayer *et al.*, 1992, Frantzen *et al.*, 1997). Dette indikerer at den modnende hunnfiskens E2-nivå befant seg nært et toppunkt på uttakstidspunktet, og både GSI og kjønnshormonnivå indikerer at både hann- og hunnfisken var kjønnsmoden

Umodne individer i juni hadde ingen stor individuell variasjon i plasmanivå av kjønnshormoner, men det er likevel trolig at hannfiskgruppen besto av både modnende og ikke modnende individer, ettersom det ble observert stor individuell spredning i GSI hos denne gruppen (figur 16). Det er usikkert hvorvidt dette kan ha påvirket resultatene i forsøk 2.

4.2.3. Appetittregulatorer

Det ble ikke funnet signifikante forskjeller i kondisjonsfaktor og mageinnhold mellom kjønnsmodnende og umoden fisk i august. På bakgrunn av dette ble det heller ikke forventet at det skulle finnes forskjeller i uttrykk av antatte appetittregulatorer i hypothalamus – dersom disse utelukkende virker på appetitt. En slik forskjell i genuttrykk av appetittregulatorer mellom kjønnsmodnende og umoden fisk ble heller ikke funnet.

Fisken som ble samlet i juni hadde et høyere mageinnhold enn fisken som ble samlet i august (figur 15). Dette indikerer at fisken brukt i dette forsøket har hatt en høyere appetitt i juni enn i august, noe som samsvarer med tidligere funn hos anadrom røye (Tveiten *et al.*, 1996).

Hos modnende hunnfisk samlet i august ble det registrert et signifikant lavere uttrykk av *AgRP1* (figur 21 d) og *MC4* (figur 21 c) enn hos umoden hunnfisk i juni. Dette strider mot tidligere funn, hvor det ble vist at påtvungen sult oppregulerte hypothalamisk *AgRP* mRNA hos gullfisk (Cerdá-Reverter & Peter, 2003b) og zebrafisk (Song *et al.*, 2003), noe som indikerer at *AgRP* har en orexigen effekt hos fisk. Det er imidlertid tidligere vist at introcerebroventrikulær injeksjon av en *MC4R*-antagonist hos regnbueørret førte til økt appetitt (Schjolden *et al.*, 2009), og resultatene fra dette forsøket støtter dermed teorien om at *MC4R* er involvert i regulering av energiomsetning hos fisk. Det ble også observert et signifikant høyere uttrykk av *CART2* (figur 21 b) hos både modnende og umodne hunnfisk i august som hadde mistet appetitt, enn hunnfisk med et høyere mageinnhold i juni. Hos gullfisk er det vist at sentral injeksjon av humant *CART* virker anorexigent, i tillegg til å påvirke fiskens adferd (Volkoff & Peter, 2000). Det er også funnet at sulting medfører en reduksjon i mRNA uttrykk av *CART* i hjerne hos gullfisk, og at mRNA uttrykket av *CART* øker etter et måltid – men denne økningen ble ikke funnet for uttrykket av *CART2* (Volkoff & Peter, 2001). Volkoff *et al.* (2000) fant en reduksjon i uttrykket av *CART2* i forbindelse med fasting hos gullfisk, noe som resultatene fra hannfisken i forsøk 2 samsvarer med. Det ble imidlertid funnet et signifikant høyere uttrykk av *CART2* hos hunnfisk uten mageinnhold i august, enn hos umoden hunnfisk i juni, noe som indikerer at *CART2* ikke utøver en lik effekt hos røye som hos gullfisk.

Moden hannfisk hadde et signifikant høyere uttrykk av *POMCA1* (figur 20 e) enn umoden hannfisk i juni. Den samme oppreguleringen ble sett hos umoden hannfisk i august, dog ikke signifikant. Disse resultatene strider mot tidligere funn, hvor fasting ikke påvirket uttrykket av *POMC* i hypothalamus hos gullfisk (Cerdá-Reverter *et al.*, 2003a). Samme studie antok at en eventuell anorexigen effekt av *POMC* kunne overstyres av *MC4R*-antagonister, som *AgRP*, noe som indikerer at *POMCA1* kan ha en medvirkende rolle i reguleringen av appetitt hos fisk.

På bakgrunn av resultatene fra forsøk 2, er det ikke funnet indikasjoner på at *AgRP1*, *AgRP2*, *POMCA1*, *MC4* og *CART2* i hypothalamus har en rolle i langtidsregulering av appetitt hos røye. De endringer som faktisk ble funnet, var uventede, i og med at de er i strid med den antatte orexigene og anorexigene rolle som disse neuropeptidene er kjent å ha hos pattedyr, og antatt å ha hos fisk (Volkoff *et al.*, 2009). Dette indikerer at de målte neuropeptidene ikke er involvert i langtidsreguleringen av appetitt hos fisk, og at det må være andre mekanismer, eventuelt andre signalmolekyler, involvert i en slik regulering.

Det er imidlertid ikke klart hvilken spesifikk mekanisme som antydes, men at det eksisterer artsspesifikke, og muligvis kjønnsspesifikke reguleringsmekanismer knyttet til appetitt og vekst hos røye. Det er også en mulighet for at uttrykt mRNA ikke gir et korrekt bilde av den reelle situasjonen. Dette kan skyldes at det finnes forskjeller på peptidnivå som ikke reflekteres i genuttrykk, at det finnes reguleringsmekanismer på et post-transkriptorisk nivå. Det er også mulig at ettersom en har målt genuttrykk i hele hypothalamus, kan det være uttrykt neuropeptider i områder som ikke er forbundet med appetittregulering, og at disse neuropeptidene kan ha flere funksjoner, for eksempel knyttet til energiforbruk. I videre studier må en derfor 1) inkludere analyser av peptidmengde for å undersøke muligheten for en posttranskriptorisk regulering og 2) inkludere flere potensielle neurale appetittregulerende neuropeptider.

4.2.4. Leptin

Hos pattedyr stimulerer leptin uttrykket av *POMC* og *CART* i hypothalamus (review av Morris & Rui, 2009). En lignende mekanisme kan vanskelig forestilles hos røye, da uttrykket av *POMC* og *CART* begge var høyere uttrykt hos gruppene med lavere uttrykt *LepAI* (figur 20 a). Hos modnende lakseparr er det hos hannfisk tidligere funnet et høyere mRNA uttrykk av *LepAI* i lever enn hos umodne hannfisk, samt et høyere av nivå sirkulerende leptin (Trombley & Schmitz, 2013). Det er tidligere registrert en oppregulering av plasma leptin samtidig med forhøyede E2 nivå i plasma hos Ayu (*Plecoglossus altivelis*), hvor det ble foreslått at E2 stimulerer til produksjon av leptin (Nagasaka *et al.*, 2006). Det foreligger resultater som viser at mRNA uttrykk av *LepAI* i lever oppreguleres hos E2 behandlet røye, men ikke hos individer med et naturlig forhøyet E2 nivå i plasma (M. Leitet, upublisert). Ettersom det ble registrert et lavere *LepAI* uttrykk i hypothalamus hos både modnende og umoden fisk i august enn hos umoden fisk i juni, er dette er indikasjon på at uttrykket av *LepAI* i hypothalamus ikke er knyttet til kjønnsmodning. Begge grupper hadde imidlertid et svært lavt mageinnhold, noe som kan knytte uttrykket av *LepAI* i hjernen hos fisk til regulering av matinntak og/eller regulering av energimetabolisme. Dette er imidlertid det eneste rapporterte studiet av uttrykket av *leptin* i hypothalamus hos fisk i relasjon til sesongbasert appetittregulering, og en svært interessant kjønnsforskjell i uttrykk av ulike antatte appetittregulatorer, inklusiv *leptin*, antyder ikke bare at det foreligger forskjeller i appetittregulering mellom ulike fiskearter, men at det også foreligger forskjeller mellom kjønn.

4.3. Sammenfatning forsøk 1 og forsøk 2

Effekten av kjønnsormonbehandling i forsøk 1 gav ingen klare antydninger til en effekt av forhøyet kjønnsormonnivå på appetitt og vekst. I forsøk 2 hadde det skjedd en tydelig reduksjon i mageinnhold, som sammenfaller med forhøyede nivå av kjønnsormoner i plasma. Dersom en sammenligner mageinnhold hos kontrollgruppen 15. mars i forsøk 1, og mageinnhold hos modnende og umodne individer i august i forsøk 2, hadde det skjedd en drastisk nedgang i mageinnhold. Dette er i tråd med det som tidligere er funnet for sesongendringer i vekst og appetitt hos anadrom røye. Reduksjonen i mageinnhold i forsøk 2 har imidlertid også oppstått hos umodne individer uten forhøyede kjønnsormonnivåer, noe som styrker konklusjonen om at kjønnsormoner ikke er en proksimat årsak til tap av appetitt hos kjønnsmodnende røye. Sesongendringene i appetitt som fremkom i forsøk 1 og 2 var ikke assosiert med de endringer i genuttrykk av hypothalamiske neuropeptider som en kunne forvente, gitt at de hos fisk utøver en tilsvarende anorexigen og orexigen effekt som hos pattedyr. De endringer som ble sett i uttrykk av hypothalamiske neuropeptider mellom forsøk 1 og 2 antyder heller en sesongmessig regulering, uten at det på grunnlag av dette arbeidet kan sies noe om hvilke mekanismer som avspeiles.

Fôringsadferd hos fisk er en viktig indikasjon på fiskens velferd (Kulczykowska & Sánchez Vázquez, 2010) og naturligvis viktig med hensyn til vekst og fôrutnyttelse. I den forbindelse er det svært viktig å forstå mekanismene som regulerer appetitt og vekst hos fisk dersom en skal kunne drive oppdrett på en forsvarlig, effektiv og lønnsom måte. Forskning som adresserer denne problemstillingen er derfor et viktig bidrag til å effektivisere oppdrettsnæringen, og økt kunnskap om appetittregulerende mekanismen vil i sin tur bidra til å skape bedre rammer for god fiskevelferd.

5.0. KONKLUSJON

Kjønns hormoner, *per se.*, er ikke den underliggende årsak til tap av appetitt under kjønnsmodning hos røye. Hvorvidt reduksjonen i appetitt hos røye er forbundet med endring i uttrykk av hypothalamiske neuropeptider antatt å være delaktig i regulering av appetitt hos fisk, forblir ubesvart ettersom det ikke ble funnet endringer i disse som samsvarer med deres anorexigene og orexigene roller hos pattedyr.

Det ble heller ikke bekreftet eller avkreftet hvorvidt røye under kjønnsmodning taper appetitt før umoden røye, men det fremgår som åpenbart at det skjer en markant reduksjon i appetitt på sensommeren og høsten, både hos modnende og umodne individ av begge kjønn. Resultatene antyder at genuttrykk av orexigene og anorexigene neuropeptider ikke har en lignende funksjon i appetittregulering som de har hos pattedyr.

6.0. REFERANSER

- ARNDT, S. 2000. Influence of sexual maturity on feeding, growth and energy stores of wild Atlantic salmon parr. *Journal of Fish Biology*, **57**. 589-596.
- BAROILLER, J., FOSTIER, A., ZOHAR, Y. & MARCUZZI, O. 1987. The metabolic clearance rate of estradiol-17 β in rainbow trout, *Salmo gairdneri* R., estimated by both single injection and constant infusion methods: Increase during oocyte maturation. *General and Comparative Endocrinology*, **66**. 85-94.
- BERGLUND, I., MAYER, I. & BORG, B. 1992. Effects of sexual maturation, castration, and androgen implants on growth in one- and two-year-old parr in a Baltic Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) stock. *Journal of Fish Biology*, **40**. 281-292.
- BIO- 2504. 2013 Analysis protocol: *Steroid sexhormones, Cortisol*
- CERDÁ-REVERTER, J. M. & PETER, R. E. 2003b. Endogenous melanocortin antagonist in fish: structure, brain mapping, and regulation by fasting of the goldfish agouti-related protein gene. *Endocrinology*, **144**. 4552-4561.
- CERDÁ-REVERTER, J. M., SCHIÖTH, H. B. & PETER, R. E. 2003a. The central melanocortin system regulates food intake in goldfish. *Regulatory Peptides*, **115**. 101-113.
- DAVIS, K. B. & LUDWIG, G. M. 2004. Hormonal effects on sex differentiation and growth in sunshine bass *Morone chrysops* \times *Morone saxatilis*. *Aquaculture*, **231**. 587-596.
- DHILLO, W. S. 2007. Appetite regulation: an overview. *Thyroid*, **17**. 433-445.
- FRANTZEN, M. 2003. *Control of reproduction in salmonids - experimental studies on Arctic charr*. Dr.scient. Thesis. Department of Aquatic BioScience, Norwegian College of Fishery Science. University of Tromsø, Norway
- FRANTZEN, M., DAMSGÅRD, B., TVEITEN, H., MORIYAMA, S., IWATA, M. & JOHNSEN, H. 2004. Effects of fasting on temporal changes in plasma concentrations of sex steroids, growth hormone and insulin-like growth factor I, and reproductive investment in Arctic charr. *Journal of Fish Biology*, **65**. 1526-1542.
- FRANTZEN, M., JOHNSEN, H. & MAYER, I. 1997. Gonadal development and sex steroids in a female Arctic charr broodstock. *Journal of Fish Biology*, **51**. 697-709.
- FRØILAND, E., JOBLING, M., BJÖRNSSON, B. T., KLING, P., RAVURI, C. S. & JØRGENSEN, E. H. 2012. Seasonal appetite regulation in the anadromous Arctic charr: Evidence for a role of adiposity in the regulation of appetite but not for leptin in signalling adiposity. *General and Comparative Endocrinology*, **178**. 330-337.
- FRØILAND, E., MURASHITA, K., JØRGENSEN, E. H. & KUROKAWA, T. 2010. Leptin and ghrelin in anadromous Arctic charr: cloning and change in expressions during a seasonal feeding cycle. *General and Comparative Endocrinology*, **165**. 136-143.
- FUENTES, E. N., SAFIAN, D., EINARSDOTTIR, I. E., VALDÉS, J. A., ELORZA, A. A., MOLINA, A. & BJÖRNSSON, B. T. 2013. Nutritional status modulates plasma leptin, AMPK and TOR activation, and mitochondrial biogenesis: Implications for cell metabolism and growth in skeletal muscle of the fine flounder. *General and Comparative Endocrinology*, **186**. 172-180.
- GORISSEN, M. H. F., GERT & HUISING, M. O. 2006. Peptides and proteins regulating food intake: a comparative view. *Animal Biology-Leiden*, **56**. 447-474.
- GROSS, M. R., COLEMAN, R. M. & MCDOWALL, R. M. 1988. Aquatic productivity and the evolution of diadromous fish migration. *Science(Washington)*, **239**. 1291-1293.

- HOSKINS, L. J., XU, M. & VOLKOFF, H. 2008. Interactions between gonadotropin-releasing hormone (GnRH) and orexin in the regulation of feeding and reproduction in goldfish (*Carassius auratus*). *Hormones and Behavior*, **54**. 379-385.
- JOBLING, M. 2010. Are compensatory growth and catch-up growth two sides of the same coin? *Aquaculture international*, 18. 501-510.
- JOBLING, M. & BAARDVIK, B. 1991. Patterns of growth of maturing and immature Arctic charr, *Salvelinus alpinus*, in a hatchery population. *Aquaculture*, **94**. 343-354.
- JOBLING, M. & JOHANSEN, S. 1999. The lipostat, hyperphagia and catch-up growth. *Aquaculture Research*, **30**. 473-478.
- JOHNSON, L. 1980. The arctic charr, *Salvelinus alpinus*. I: Balon, E.K. (red.) *Charrs, Salmonid fishes of the genus Salvelinus*, vol.1. Dr.W.Junk, The Hague. 15-98.
- KADRI, S., METCALFE, N., HUNTINGFORD, F. & THORPE, J. 1995. What controls the onset of anorexia in maturing adult female Atlantic salmon? *Functional Ecology*, **9**. 790-797.
- KADRI, S., THORPE, J. E. & METCALFE, N. B. 1997. Anorexia in one-sea-winter Atlantic salmon (*Salmo salar*) during summer, associated with sexual maturation. *Aquaculture*, **151**. 405-409.
- KENNEDY, G. C. 1953. The role of depot fat in the hypothalamic control of food intake in the rat. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B-Biological Sciences*, **140**. 578-592.
- KLEMETSEN, A., AMUNDSEN, P. A., DEMPSON, J., JONSSON, B., JONSSON, N., O'CONNELL, M. & MORTENSEN, E. 2003. Atlantic salmon *Salmo salar* L., brown trout *Salmo trutta* L. and Arctic charr *Salvelinus alpinus* (L.): a review of aspects of their life histories. *Ecology of Freshwater Fish*, **12**. 1-59.
- KLING, P., JÖNSSON, E., NILSEN, T. O., EINARSDOTTIR, I. E., RÖNNESTAD, I., STEFANSSON, S. O. & BJÖRNSSON, B. T. 2012. The role of growth hormone in growth, lipid homeostasis, energy utilization and partitioning in rainbow trout: Interactions with leptin, ghrelin and insulin-like growth factor I. *General and Comparative Endocrinology*, **175**. 153-162.
- KLING, P., RÖNNESTAD, I., STEFANSSON, S. O., MURASHITA, K., KUROKAWA, T. & BJÖRNSSON, B. T. 2009. A homologous salmonid leptin radioimmunoassay indicates elevated plasma leptin levels during fasting of rainbow trout. *General and Comparative Endocrinology*, **162**. 307-312.
- KULCZYKOWSKA, E. & SÁNCHEZ VÁZQUEZ, F. J. 2010. Neurohormonal regulation of feed intake and response to nutrients in fish: aspects of feeding rhythm and stress. *Aquaculture Research*, **41**. 654-667.
- KUROKAWA, T. & MURASHITA, K. 2009. Genomic characterization of multiple leptin genes and a leptin receptor gene in the Japanese medaka, *Oryzias latipes*. *General and Comparative Endocrinology*, **161**. 229-237.
- KUROKAWA, T., UJI, S. & SUZUKI, T. 2005. Identification of cDNA coding for a homologue to mammalian leptin from pufferfish, *Takifugu rubripes*. *Peptides*, **26**. 745-750.
- LEAL, E., SÁNCHEZ, E., MURIACH, B. & CERDÁ-REVERTER, J. M. 2009. Sex steroid-induced inhibition of food intake in sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Journal of Comparative Physiology B*, **179**. 77-86.
- LIFE TECHNOLOGIES. 2012. *Real-time PCR handbook*. 2. utg. Life Technologies Corporation
- LIN, X., VOLKOFF, H., NARNAWARE, Y., BERNIER, N. J., PEYON, P. & PETER, R. E. 2000. Brain regulation of feeding behavior and food intake in fish. *Comparative*

- Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, **126**. 415-434.
- MAYER, I., SCHMITZ, M., BORG, B. & SCHULZ, R. 1992. Seasonal endocrine changes in male and female Arctic charr (*Salvelinus alpinus*). I. Plasma levels of three androgens, 17 α -hydroxy-20 β -dihydroprogesterone, and 17 β -estradiol. *Canadian Journal of Zoology*, **70**. 37-42.
- MORRIS, D. L. & RUI, L. 2009. Recent advances in understanding leptin signaling and leptin resistance. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, **297**. 1247-1259.
- MURASHITA, K., UJI, S., YAMAMOTO, T., RØNNESTAD, I. & KUROKAWA, T. 2008. Production of recombinant leptin and its effects on food intake in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, **150**. 377-384.
- MYERS, G. S. 1949. Usage of anadromous, catadromous and allied terms for migratory fishes. *Copeia*. 89-97.
- NAGASAKA, R., OKAMOTO, N. & USHIO, H. 2006. Increased leptin may be involved in the short life span of ayu (*Plecoglossus altivelis*). *Journal of Experimental Zoology Part A: Comparative Experimental Biology*, **305**. 507-512.
- NARNAWARE, Y. K., PEYON, P. P., LIN, X. & PETER, R. E. 2000. Regulation of food intake by neuropeptide Y in goldfish. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, **279**. 1025-1034.
- OLIVEIRA, C. & SÁNCHEZ-VÁZQUEZ, F. J. 2010. Reproduction rhythms in fish. *Biological clock in fish. E. Kulczykowska, W. Popek, BG Kapoor (Eds). Science Publishers, Enfield, New Hampshire*. 185-215.
- OLSVIK, P. A., LIE, K. K., JORDAL, A.-E. O., NILSEN, T. O. & HORDVIK, I. 2005. Evaluation of potential reference genes in real-time RT-PCR studies of Atlantic salmon. *BMC Molecular Biology*, **6**. 21.
- QIAGEN. 2010. *RNeasy Plus Universal handbook*. RNeasy Plus Universal Mini Kit: For purification of total RNA from all types of tissue. AMBION, Inc., Austin, Texas
- R CORE TEAM 2012. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing. Vienna, Austria. ISBN: 3-900051-07-0 <http://www.R-project.org/>
- ROA, J. 2013. Role of GnRH neurons and their neuronal afferents as key integrators between food intake regulatory signals and the control of reproduction. *International Journal of Endocrinology* 2013.
- ROUNSEFELL, G. A. 1958. *Anadromy in North American Salmonidae*. US Government Printing Office.
- RØNNESTAD, I., NILSEN, T. O., MURASHITA, K., ANGOTZI, A. R., GAMST MOEN, A.-G., STEFANSSON, S. O., KLING, P., THRANDUR BJÖRNSSON, B. & KUROKAWA, T. 2010. Leptin and leptin receptor genes in Atlantic salmon: cloning, phylogeny, tissue distribution and expression correlated to long-term feeding status. *General and comparative endocrinology*, **168**. 55-70.
- SCHJOLDEN, J., SCHIÖTH, H. B., LARHAMMAR, D., WINBERG, S. & LARSON, E. T. 2009. Melanocortin peptides affect the motivation to feed in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *General and Comparative Endocrinology*, **160**. 134-138.
- SCHULZ, R. 1985. Measurement of five androgens in the blood of immature and maturing male rainbow trout, *Salmo gairdneri* (Richardson). *Steroids*, **46**. 717-726.
- SCHWARTZ, M. W., WOODS, S. C., PORTE, D., SEELEY, R. J. & BASKIN, D. G. 2000. Central nervous system control of food intake. *Nature*, **404**. 661-671.

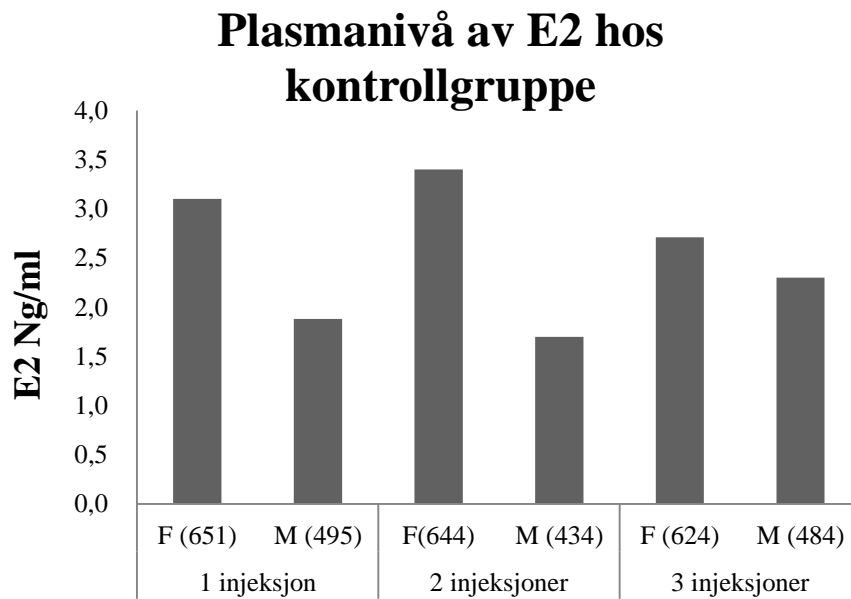
- SILVERSTEIN, J. T., BREININGER, J., BASKIN, D. G. & PLISETSKAYA, E. M. 1998. Neuropeptide Y-like gene expression in the salmon brain increases with fasting. *General and Comparative Endocrinology*, **110**. 157-165.
- SONG, Y., GOLLING, G., THACKER, T. L. & CONE, R. D. 2003. Agouti-related protein (AGRP) is conserved and regulated by metabolic state in the zebrafish, *Danio rerio*. *Endocrine*, **22**. 257-265.
- SÆTHER, B. S., JOHNSEN, H. & JOBLING, M. 1996. Seasonal changes in food consumption and growth of Arctic charr exposed to either simulated natural or a 12:12 LD photoperiod at constant water temperature. *Journal of Fish Biology*, **48**. 1113-1122.
- THORPE, J. E., MANGEL, M., METCALFE, N. B. & HUNTINGFORD, F. A. 1998. Modelling the proximate basis of salmonid life-history variation, with application to Atlantic salmon, *Salmo salar* L. *Evolutionary Ecology*, **12**. 581-599.
- TINOCO, A. B., NISEMBAUM, L. G., ISORNA, E., DELGADO, M. J. & DE PEDRO, N. 2012. Leptins and leptin receptor expression in the goldfish (*Carassius auratus*). Regulation by food intake and fasting/overfeeding conditions. *Peptides*, **34**. 329-335.
- TROMBLEY, S. & SCHMITZ, M. 2013. Leptin in fish: possible role in sexual maturation in male Atlantic salmon. *Fish Physiology and Biochemistry*, **39**. 103-106.
- TVEITEN, H., BJØRN, P., JOHNSEN, H., FINSTAD, B. & MCKINLEY, R. 2010. Effects of the sea louse *Lepeophtheirus salmonis* on temporal changes in cortisol, sex steroids, growth and reproductive investment in Arctic charr *Salvelinus alpinus*. *Journal of Fish Biology*, **76**. 2318-2341.
- TVEITEN, H., JOHNSEN, H. & JOBLING, M. 1996. Influence of maturity status on the annual cycles of feeding and growth in Arctic charr reared at constant temperature. *Journal of Fish Biology*, **48**. 910-924.
- TVEITEN, H., MAYER, I., JOHNSEN, H. & JOBLING, M. 1998. Sex steroids, growth and condition of Arctic charr broodstock during an annual cycle. *Journal of Fish Biology*, **53**. 714-727.
- TZCHORI, I., DEGANI, G., ELISHA, R., ELIYAHU, R., HURVITZ, A., VAYA, J. & MOAV, B. 2004. The influence of phytoestrogens and oestradiol-17 β on growth and sex determination in the European eel (*Anguilla anguilla*). *Aquaculture Research*, **35**. 1213-1219.
- VAN DER KRAAK, G. 2009. The GnRH system and the neuroendocrine regulation of reproduction. *Fish Physiology*, **28**. 115-149.
- VOLKOFF, H., CANOSA, L., UNNIAPPAN, S., CERDA-REVERTER, J., BERNIER, N., KELLY, S. & PETER, R. 2005. Neuropeptides and the control of food intake in fish. *General and Comparative Endocrinology*, **142**. 3-19.
- VOLKOFF, H., JOY EYKELBOSH, A. & ECTOR PETER, R. 2003. Role of leptin in the control of feeding of goldfish *Carassius auratus*: interactions with cholecystokinin, neuropeptide Y and orexin A, and modulation by fasting. *Brain Research*, **972**. 90-109.
- VOLKOFF, H. & PETER, R. 2001. Characterization of two forms of cocaine- and amphetamine-regulated transcript (CART) peptide precursors in goldfish: molecular cloning and distribution, modulation of expression by nutritional status, and interactions with leptin. *Endocrinology*, **142**. 5076-5088.
- VOLKOFF, H. & PETER, R. E. 2000. Effects of CART peptides on food consumption, feeding and associated behaviors in the goldfish, *Carassius auratus*: actions on neuropeptide Y- and orexin A-induced feeding. *Brain Research*, **887**. 125-133.

- VOLKOFF, H., UNNIAPPAN, S. & KELLY, S. P. 2009. The endocrine regulation of food intake. *Fish Physiology*, **28**. 421-465.
- WYNNE, K., STANLEY, S., MCGOWAN, B. & BLOOM, S. 2005. Appetite control. *Journal of Endocrinology*, **184**. 291-318.
- YAMADA, T. & KATAGIRI, H. 2007. Avenues of communication between the brain and tissues/organs involved in energy homeostasis. *Endocrine Journal*, **54**. 497-505.
- ZHANG, Y., PROENCA, R., MAFFEI, M., BARONE, M., LEOPOLD, L. & FRIEDMAN, J. M. 1994. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature*, **372**. 425-432.

7.0. VEDLEGG

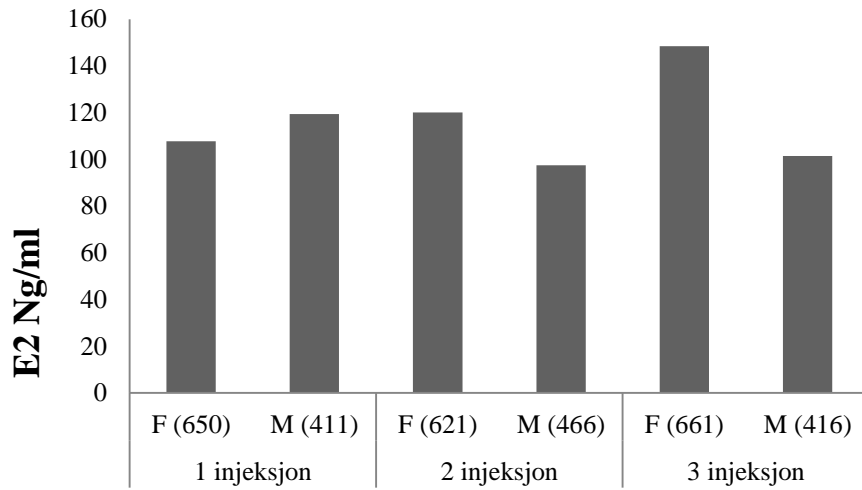
7.1. Vedlegg 1 & 2: Resultater fra pilotforsøk

7.1.1. Vedlegg 1: Kjønnshormoner



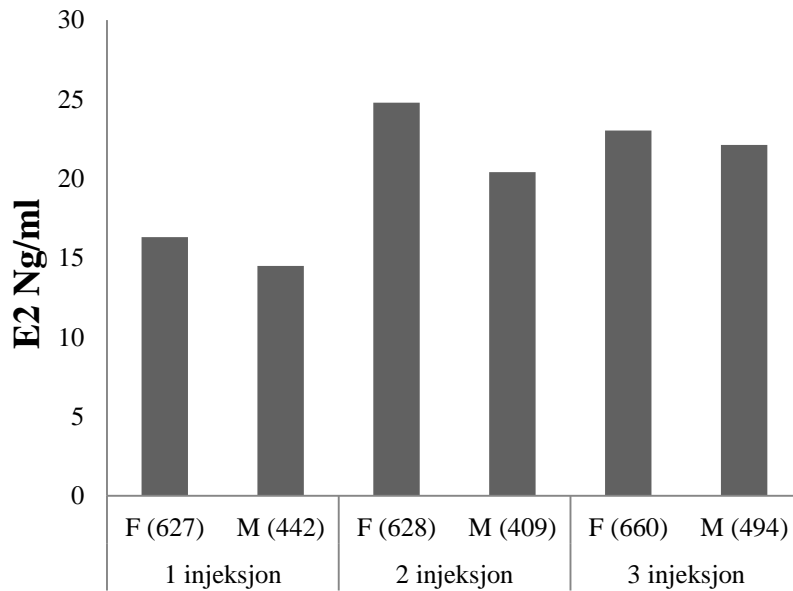
Figur 22. Plasmanivå av E2 hos individer fra pilotforsøk som har fått hhv. 1, 2 og 3 injeksjoner av 0,10 ml/kg propylenglycol. Stolper viser plasmanivå hos enkeltindivider av hunn (F) og hannfisk (M). Identitetsnummer i parentes.

Plasmanivå av E2 hos E2-gruppen

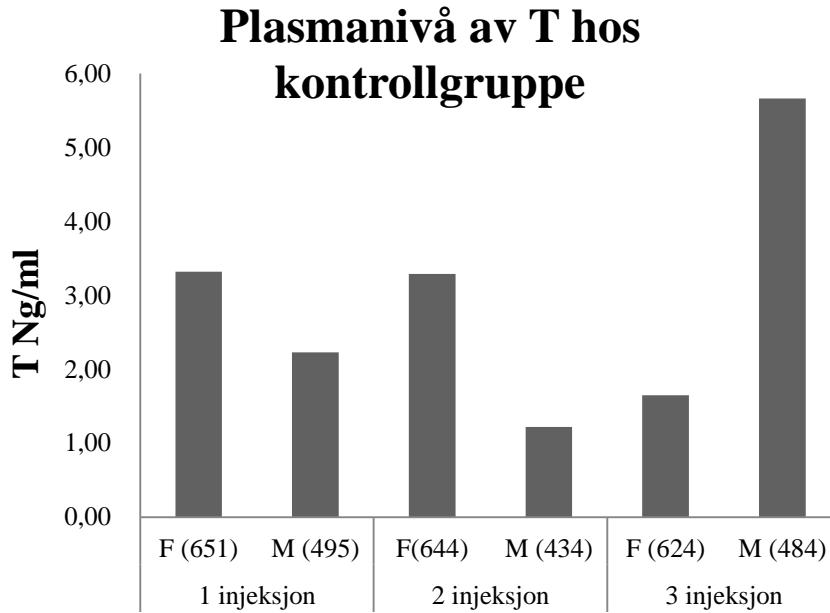


Figur 23. Plasmanivå av E2 hos individer fra pilotforsøk som har fått hhv. 1, 2 og 3 injeksjoner av 0,10 ml/kg E2 løst i propylenglycol. Stolper viser plasmanivå hos enkeltindivider av hunn (F) og hannfisk (M). Identitetsnummer i parentes.

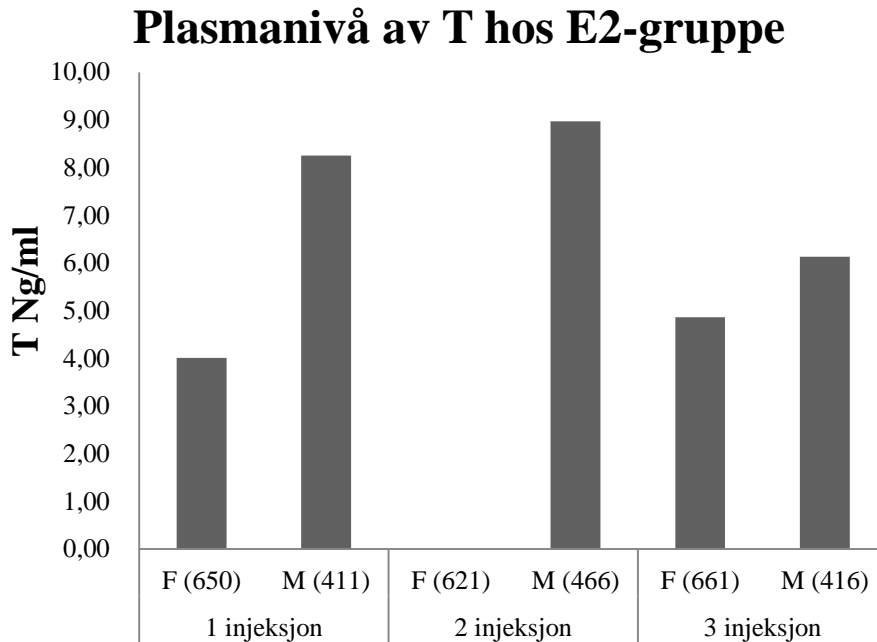
Plasmanivå av E2 hos T-gruppe



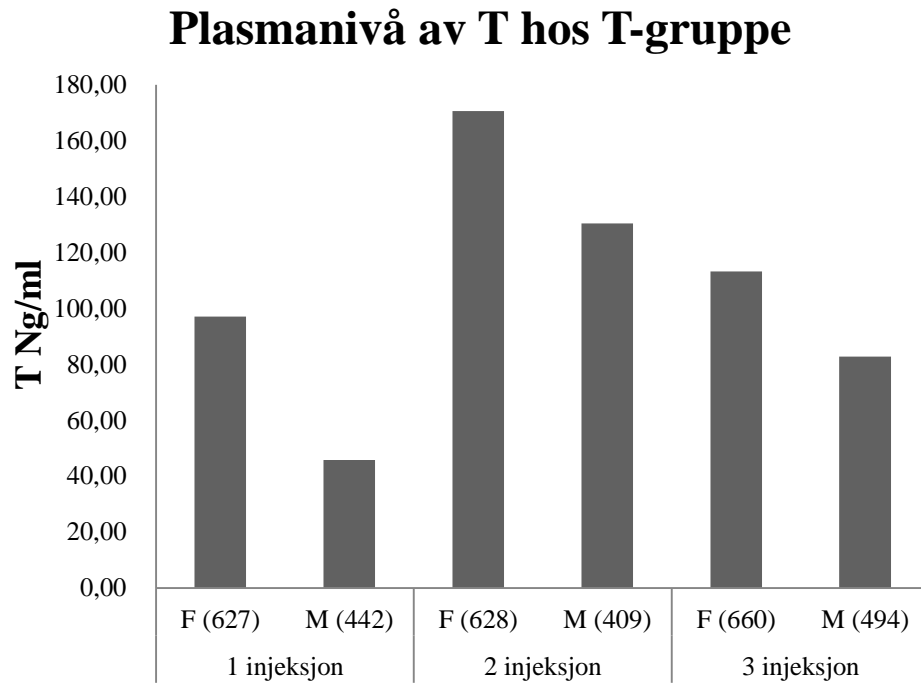
Figur 24. Plasmanivå av E2 hos individer fra pilotforsøk som har fått hhv. 1, 2 og 3 injeksjoner av 0,10 ml/kg T løst i propylenglycol. Stolper viser plasmanivå hos enkeltindivider av hunn (F) og hannfisk (M). Identitetsnummer i parentes.



Figur 25. Plasmanivå av T hos individer fra pilotforsøk som har fått hhv. 1, 2 og 3 injeksjoner av 0,10 ml/kg propylenglycol. Stolper viser plasmanivå hos enkeltindivider av hunn (F) og hannfisk (M). Identitetsnummer i parentes.

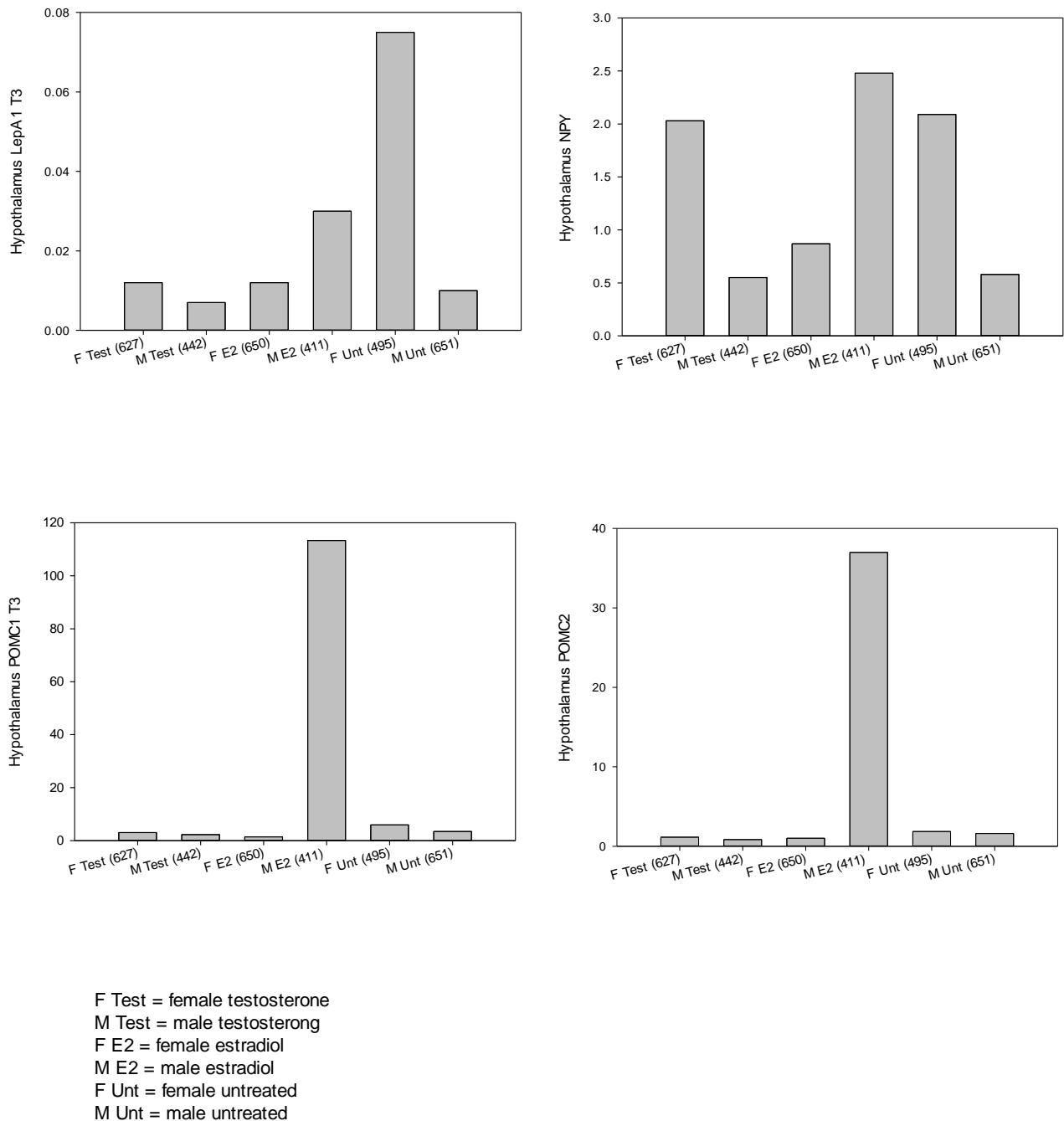


Figur 26. Plasmanivå av T hos individer fra pilotforsøk som har fått hhv. 1, 2 og 3 injeksjoner av 0,10 ml/kg T løst i propylenglycol. Stolper viser plasmanivå hos enkeltindivider av hunn (F) og hannfisk (M). Identitetsnummer i parentes.



Figur 27. Plasmanivå av T hos individer fra pilotforsøk som har fått hhv. 1, 2 og 3 injeksjoner av 0,10 ml/kg T løst i propylenglycol. Stolper viser plasmanivå hos enkeltindivider av hunn (F) og hannfisk (M). Identitetsnummer i parentes.

7.1.2. Vedlegg 2: Genuttrykk



Figur 28. Genuttrykk av *LepA1*, *NPY*, *POMCA1* og *POMCA2* hos enkeltindivider fra pilotforsøk etter 3 injeksjoner av hhv. E2 (E2), T (Test) og propylenglycol (Unt). Identitetsnummer i parentes. Hannfisk merket med M, og hunnfisk merket med F.

7.2. Vedlegg 3: Ethanol precipitation Protocol

Ethanol Precipitation of RNA Oligonucleotide

Materials for each oligonucleotide sample

Consumables

1. 1.5 mL Microfuge tubes

Chemicals

1. Ethanol
2. 3 Molar Sodium Acetate
3. Molecular Grade Water, RNase-free

Procedure

1. Take the RNA into 1.5 mL microfuge tubes.
2. Add 1/10 volume of 3 M sodium acetate (final concentration 0.3 M).
3. Add 3 volumes 100% ethanol per tube.
4. Vortex 10 seconds.
5. Store at -20°C overnight or at -80°C for 2 hours.
6. Centrifuge at 13000x g for 20 minutes (4 °C).
7. Pour the supernatant from the tube without disturbing the pellet.
8. Add 1000 µL of 80% ice cold Ethanol onto the pellet.
9. Centrifuge at 13000x g for 5 minutes (4 °C).
10. Carefully take out the ethanol from the tube without disturbing the pellet.
10. Dry the sample at room temp about 5 mins.
11. The dry pellet can be dissolved in an appropriately buffered RNase-free Solution (RNase free water).
12. Store the RNA at -80°C.