



UIT

NORGES  
ARKTISKE  
UNIVERSITET

Fakultet for biovitenskap, fiskeri og økonomi - Norges fiskerihøgskole

# Effekter av kjønnssteroider på genetisk uttrykk av leptin og vitellogenin i lever hos røye (*Salvelinus alpinus*)

---

**Maria Helen Thunestvedt Leitet**

*Masteroppgave i fiskeri- og havbruksvitenskap*

*Studieretning: Oppdrettsbiologi (60 stp)*

*Mai 2014*





## FORORD

Da var tiden kommet for å avslutte fem fantastiske år ved Universitet i Tromsø og Norges Fiskerihøgskole. Det er flere mennesker som har gjort disse årene til en spennende og lærerik tid og bidratt positivt til denne oppgaven, og som nå fortjener en takk.

Først og fremst vil jeg takke min veileder Helge K. Johnsen for gode råd og veiledning gjennom denne prosessen, og for å øke min interesse for reproduksjonsfysiologi hos fisk.

En stor takk rettes også til veileder Even H. Jørgensen for tålmodighet, konstruktive tilbakemeldinger og god humor. Jeg vil også takke seniorforsker Helge Tveiten ved Nofima AS for inspirerende dialoger og god veiledning under steroidanalyser. Takk til overingeniør Tanja L. Hanebrekke, Hans Ivar Hestdahl, Chandra Sekhar Ravuri og stipendiat Anja Striberny for god hjelp og veiledning med laboratoriearbeidet. Takk til gjengen i Kårvika for den daglige røktingen av forsøksfisken.

Takk til Linn Therese Warem for godt samarbeid gjennom de siste årene og resten av den fantastiske gjengen i kull 2009 for et godt samhold og en uforglemmelig studietid. Takk til venner i både nord og sør for å alltid være der.

Til slutt vil jeg takke mine foreldre Anne Kristin og Sigmund for all støtte og gode råd gjennom studiene og mine søstre Reidun og Silje Anita med familier for all oppmuntring og korrekturlesing gjennom denne prosessen.

Tromsø, 15 mai 2014



Maria Helen Thunestvedt Leitet



## SAMMENDRAG

Anadrom røye (*Salvelinus alpinus*) ble brukt for å undersøke mulige sammenhenger mellom kjønnssteroider og genetisk uttrykk av leptin og vitellogenin i lever. Det ble gjennomført to forsøk; et forsøk med *in vivo* injeksjon av kjønnssteroider over en periode på to uker utenfor den naturlige reproduksjonssesongen (forsøk 1), og et forsøk med naturlig modnende røye i juni og august (forsøk 2). Forsøksfisken ble holdt ved Havbruksstasjonen i Tromsø, Kårvika, Ringvassøy, under naturlig eller simulert naturlig fotoperiode, og i ferskvann med en temperatur på 5°C (forsøk 1) eller naturlig temperatur (forsøk 2).

Fisken i forsøk 1 ble gitt en intramuskulær dose tilsvarende 1 mg/ kg av kjønnssteroidene testosteron (T), 11-ketotesosteron (11KT) eller 17 $\beta$ -estradiol (E<sub>2</sub>) løst i propylenglykol 2 ganger i løpet av 14 dager. En gruppe ble kun injisert med propylenglykol, og fungerte som kontroll. Forsøket varte i 3 uker hvor vekt og lengde ble målt ukentlig, og blodprøve ble tatt før injeksjon ved forsøksstart, før andre injeksjon, og ved forsøkslutt. Ved siste uttak ble det også tatt vevsprøver av lever og målt for mageinnhold. I forsøk 2 ble stamfisk tatt ut i juni, og i august, hvor fisk i det siste uttaket ble delt i to modningsgrupper, modnende og umodne. Ved hvert uttak ble det tatt blodprøver og vevsprøver av lever, utført målinger av vekt og lengde, samt beregninger av gonadosomatisk indeks og mageinnhold.

Injeksjon av kjønnssteroider viste at E<sub>2</sub> førte til økt lever-uttrykk av paralogene Leptin A1 mRNA (*LepA1*) hos hann- og hunnfisk, Leptin A2 mRNA (*LepA2*) hos hunnfisk og vitellogenin mRNA (*Vtg*) hos hann- og hunnfisk, sammenlignet med kontrollfisk, mens T og 11KT førte til en nedregulering av *Vtg* hos hannfisk. Hos naturlig modnende hanner i august ble det funnet et høyere uttrykk av *LepA1* sammenlignet med umodne hanner i august, et høyere uttrykk av *LepA2* hos hannfisk i juni sammenlignet med modnende hanner i august. Hunnfisk i juni hadde et høyere uttrykk av leptinreseptor mRNA (*LepR*) sammenlignet med modnende hunner i august, mens sistnevnte gruppe hadde et høyere uttrykk av *Vtg* i lever sammenlignet med umodne hunnfisk i august. Forsøkene viste at uttrykket av begge leptinparalogene i lever ble stimulert av E<sub>2</sub>, og, noe overraskende, at *LepA1* uttrykk i lever var forhøyet i modnende hannfisk, men ikke hunnfisk, om høsten. Dette tyder på at leptin i lever er involvert i reguleringen av reproduksjonsutviklingen hos røye, men resultatene gir ikke grunnlag for en nærmere beskrivelse av de mekanismer som er involvert.



FORORD.....	I
SAMMENDRAG .....	II
1. INNLEDNING .....	1
1.1 RØYA – UTBREDELSE, BIOLOGI OG VEKST .....	1
1.2 REPRODUKSJONSBIOLOGI .....	1
1.2.1 HYPOTHALAMUS – HYPOFYSE – GONADE AKSEN .....	2
1.2.3 VITELLOGENESE.....	3
1.2.4 SESONGMESSIGE ENDRINGER AV KJØNNSSTEROIDER .....	4
1.2.5 INITIERING AV KJØNNSMODNING .....	4
1.2.6 LEPTINS ROLLE I REPRODUKSJONSUTVIKLINGEN .....	5
1.3 MÅLSETTING .....	6
2 . MATERIALE OG METODE .....	7
2.1 FISK OG FORSØKSFASILITETER.....	7
2.2 FORSØKSDESIGN .....	7
2.2.1 KJØNNSBESTEMMELSE OG MERKING AV FISK FØR FORSØKSSTART ...	8
2.3 INJEKSJON AV KJØNNSSTEROIDER OG PRØVETAKING .....	8
2.3.1 PILOTFORSØK.....	8
2.3.2 FORSØK 1 – INJEKSJON AV KJØNNSSTEROIDER .....	9
2.4 FORSØK 2 – NATURLIG REPRODUKSJONSUTVIKLING - PRØVETAKING.....	10
2.5 KONDISJONSFAKTOR OG GONADOSOMATISK INDEKS (GSI).....	10
2.6 ANALYSER.....	11
2.6.1 KVANTIFISERING AV TESTOSTERON, 11-KETOTESTOSTERON OG 17β- ØSTRADIOL .....	11
2.6.2 ANALYSER AV LEVER mRNA FOR LEPTIN A1, A2, LEPTIN RESEPTOR OG VITELLOGENIN UTTRYKK.....	14
2.7 DATABEHANDLING OG STATISTIKK.....	18

## INNHold

---

3. RESULTATER .....	20
3.1 FORSØK 1 – INJEKSJON AV KJØNNSSTEROIDER .....	20
3.1.1 KONDISJONSFAKTOR .....	20
3.1.2 PLASMAKONSENTRASJONER AV KJØNNSSTEROIDER.....	22
3.1.3 GENUTTRYKK I LEVER .....	24
3.2 FORSØK 2 – NATURLIG REPRODUKSJONSUTVIKLING .....	28
3.2.1 KONDISJONSFAKTOR .....	28
3.2.2 GONADOSOMATISK INDEKS .....	29
3.2.3 PLASMAKONSENTRASJONER KJØNNHORMONER.....	30
3.2.4 GENUTTRYKK I LEVER .....	32
4. DISKUSJON .....	36
4.1 INJEKSJON AV KJØNNSSTEROIDER .....	36
4.2 NATURLIG REPRODUKSJONSUTVIKLING .....	38
5. KONKLUSJON .....	41
6. LITTERATURLISTE .....	42
7. VEDLEGG .....	46
7.1 MAGEINNHOLD .....	46
7.1.1 FORSØK 1 – INJEKSJON AV KJØNNSSTEROIDER .....	46
7.1.2 FORSØK 2 – NATURLIG REPRODUKSJONSUTVIKLING .....	46
7.2 ETHANOL PRECIPITATION OF RNA OLIGONUCLEOTIDE.....	47
7.3 RESULTATER PILOTFORSØK .....	48
7.3.1 PLASMAKONSENTRASJONER PILOTFORSØK.....	48
7.3.2 GENUTTRYKK PILOTFORSØK .....	50



## 1. INNLEDNING

### 1.1 RØYA – UTBREDELSE, BIOLOGI OG VEKST

Arktisk røye (*Salvelinus alpinus*) er en kuldetolerant laksefisk som forekommer i ferskvanns- og anadrome former (Johnson, 1980). Den har en sirkumpolar utbredelse og ansees som verdens nordligste fiskeart (Johnson, 1980, Frantzen *et al.*, 1997, Klemetsen *et al.*, 2003). I enkelte ferskvannssystemer (for eksempel på Bjørnøya, Spitsbergen og Novaja Zemlja) kan den forekomme som eneste art (Frantzen, 1995). Karakteristisk levehabitat for røya er elver og oligotrofe/ultraoligotrofe innsjøer (Klemetsen *et al.*, 2003) preget av ekstreme sesongvariasjoner i næringstilgang og fotoperiode (Jobling *et al.*, 1998).

Den anadrome formen (sjørøya) holder til i de nordligste delene av røyas utbredelsesområde, med Nordland fylke som sørligste grense langs norskekysten. Overgangen fra ferskvann til sjø skjer normalt når røya er 4-5 år gammel, hvor den beiter i kystnære farvann etter smoltifiseringsprosessen fullføres om våren (Johnson, 1980). Ved smoltifisering går fisken gjennom et såkalt migrasjonsvindu om høsten, hvor individ over et lengdebestemt terskelnivå vil smoltifisere den følgende våren (Jørgensen og Johnsen, 2014).

Oppholdet i sjø varer i 40-50 dager før den returnerer til ferskvann for overvintring (Johnson, 1980, Jørgensen *et al.*, 1997b). Under sjøoppholdet kan røya oppnå en dobling i kroppsvekt (Jørgensen *et al.*, 1997a), mens den under ferskvannsoppholdet preges av et lavt næringsinntak og en negativ energibalanse (Jørgensen *et al.*, 1997a, Frøiland *et al.*, 2010). Disse sesongvariasjonene i appetitt og vekst er også observert hos avkom av anadrom røye i oppdrett, holdt under konstante temperaturforhold og overskuddsfôring (Tveiten *et al.*, 1996, Damsgård *et al.*, 1999).

### 1.2 REPRODUKSJONS BIOLOGI

Den anadrome røya antas å foreta 2-5 årlige migrasjoner før den kjønnsmoder og gyter i elver eller innsjøer om høsten (Johnson, 1980, Rikardsen *et al.*, 2004). Den representerer den iteropare reproduksjonsstrategien med gyting en gang per gyttesesong, og flere ganger i løpet av en livssyklus (Frantzen *et al.*, 1997). Hos fiskepopulasjoner ved høyere breddegrader beskrives reproduksjonsutviklingen som en årlig begivenhet hvor en endogen syklus,

fasejustert av fotoperiode og temperatur, styrer en sesongbasert kjønnsmodning og gonadeutvikling (Tveiten *et al.*, 1996, Adams og Huntingford, 1997, Gillet, 1994).

Initiering av kjønnsmodning ved rekruttering av primære oocytter i gonadene, skjer trolig opp mot et år før endelig modning og gyting finner sted (Frantzen, 2003, Jørgensen og Johnsen, 2014). Fullføring av modningsprosessen er avhengig av fiskens næringstilgang og energilagre om våren (Tveiten *et al.*, 1998), hvor begrensede ressurser vil arrestere kjønnsmodningen hos salmonider, en indikasjon på behovet for tilstrekkelige energilagre ved reproduksjon (Johnson, 1980, Silverstein *et al.*, 1998, Duston og Saunders, 1999).

Økningen i appetitt, vekt og kondisjonsfaktor hos modnende fisk om våren er en kortvarig prosess, da fôrintaket gjennom sommeren reduseres frem til de blir anorektiske på sensommeren. Overgangen fra høyt fôrintak og rask vekst til anorektiske forhold under modning er antatt å påvirkes av økningen i plasmakonsentrasjonene av kjønnssteroider (Tveiten *et al.*, 1998). Fisk under laboratorieforhold har også vist en slik økning og følgende nedgang i appetitt, gjennomsnittlig 1-2 måneder tidligere hos modnende sammenlignet med umodne fisk (Tveiten *et al.*, 1996, Sæther *et al.*, 1996).

### 1.2.1 HYPOTHALAMUS – HYPOFYSE – GONADE AKSEN

Den endogene reguleringen av gonadedifferensieringen foregår i hypothalamus-hypofyse-gonade aksene (HPG-aksene) (Yaron og Sivan, 2006). Frigjørende (gonadotropin-frigjørende hormon; GnRH) eller hemmende (dopamin) faktorer skilles ut fra neurosekretoriske celler i hypothalamus og regulerer adenohipofysens frigjøring av gonadotropinene follikelstimulerende hormon (FSH, også betegnet som GTH I) og luteiniserende hormon (LH, også betegnet som GTH II) over i blodstrømmen (Andersen, 1992). Gonadotropinene binder seg til spesifikke reseptorer i gonadene, som fører til produksjon og utskillelse av kjønnssteroider (steroidogenesen) (Andersen, 1992, Yaron og Sivan, 2006)

Hunnfisk skiller steroidene ut fra ulike cellelag som omgir oocytten i ovariene, hvor østrogener (i hovedsak  $17\beta$ -østradiol,  $E_2$ ) kontrollerer vitellogenese, og progestiner (i hovedsak  $17\alpha$ -hydroxy- $20\beta$ -dihydroprogesterone,  $17,20\beta$ -P) promoterer modning av follikler og ovulering (Yaron og Sivan, 2006). Binding av FSH til reseptorer i theca-laget i follikelen fører til syntese av testosteron (T) fra kolesterol (Takei og Loretz, 2006, Frantzen, 2003). T konverteres videre til  $E_2$  i follikelens granulosa-celler i ovariene.  $E_2$  fraktes fra ovariene til lever via blodet og stimulerer den hepatiske syntesen av vitellogenin (Vtg) ved å binde seg til

reseptorer i hepatocyttenes cytoplasma (Andersen, 1992, Patiño og Sullivan, 2002, Takei og Loretz, 2006). 17,20 $\beta$ -P syntetiseres også i granulosa-cellene fra fra 17-hydroxyprogesterone, og er ansett som det viktigste modningshormonet, ansvarlig for nedbryting av den germinale vesikkelen (Frantzen *et al.*, 1997). Syntesen av 17,20 $\beta$ -P stimuleres av LH, som initierer en kort modningsfase før gyting (Frantzen, 2003).

Hos hannfisk regulerer androgene hormoner spermatogenesisen og spermiogenesisen, og progestiner regulerer endelig modning av spermatozoa (Yaron og Sivan, 2006). GTH I binder seg til reseptorer på leydigcellene i spermkanalene og stimulerer syntese av androgenene T og 11-ketotestosteron (11KT) (Andersen, 1992). Begge androgene stimulerer gonadevekst og spermatogenese hos laksefisker (Tveiten *et al.*, 1998), hvor 11KT er ansett som det viktigste androgenet grunnet en mer effektiv stimulering av spermatogenesisen og sekundære kjønnskarakterer (Borg, 1994). Sammenlignet med 11KT har T lav androgen aktivitet og er vanligvis representert med høyere nivåer hos hunnfisk, grunnet konverteringen av testosteron til østradiol. (Mayer *et al.*, 1992, Andersen, 1992, Borg, 1994).

### 1.2.3 VITELLOGENESE

Vtg er et glukofosfolipoprotein (300-600kDa) (Patiño og Sullivan, 2002, Johnsen *et al.*, 1999), og forløper til plommemassen som akkumuleres i oocytten under kjønnsmodningen (Yaron og Sivan, 2006). Proteinet består av lipid- og aminosyrerik lipovitellin (Patiño og Sullivan, 2002), samt fosfoproteinene phosvitin og phosvettes (Brooks *et al.*, 1997) som inneholder polyserin og fosfor og gir Vtg bindeegenskaper til kalsium for transport i blodet til ovariene etter den hepatiske syntesen (Yaron og Sivan, 2006). Opptaket av Vtg i oocytterne er stimulert av GTH I, og skjer ved hjelp av endocytose gjennom ekstracellulære rom mellom theca- granulosa-cellene før Vtg binder seg til reseptorer på oocyttenes overflate (Patiño og Sullivan, 2002). Bindingen starter en fusjon av Vtg og lysosymnlignende faktorer, med kløyving av Vtg og dannelsen av plomme proteiner som etter hvert fyller hele cytoplasma (Andersen, 1992, Yaron og Sivan, 2006). Denne akkumuleringen av plommemasse betegnes vitellogenese, og foregår over flere måneder før ovulering finner sted (Mommsen og Walsh, 1988, Tveiten *et al.*, 1998).

#### 1.2.4 SESONGMESSIGE ENDRINGER AV KJØNNSTEROIDER

Plasmakonsentrasjoner av kjønnssteroider er lave eller ikke detekterbare hos både hunn- og hannrøya fra november til februar (Mayer *et al.*, 1992, Frantzen *et al.*, 1997, Tveiten *et al.*, 1998). En svak økning i steroidekonsentrasjonene fra mars til mai (Frantzen *et al.*, 1997, Tveiten *et al.*, 1998) markerer starten av den sekundære vekstfasen i reproduksjonssyklusen og skjer omtrent 6-8 måneder før gyting finner sted (Jørgensen og Johnsen, 2014).

Hos hunnfisk fører den svake økningen i  $E_2$  om våren til rekruttering av pre-vitellogene oocytter og initiering av vitellogenese, uten endringer i oocytts diameter (Frantzen *et al.*, 1997). En merkbar økning i nivåer av  $E_2$  og T fra juni stimulerer til intensiv vitellogenese og oocytvekst frem mot ovulering (Frantzen *et al.*, 1997).  $E_2$  når sitt høyeste nivå under den mest aktive fasen av vitellogenese (Frantzen *et al.*, 2004a) i midten av august og september, mens T når en topp omtrent en måned senere (Frantzen *et al.*, 1997, Tveiten *et al.*, 1998). Nedgang i plasmakonsentrasjonen av  $E_2$  og T indikerer avslutning av vitellogenese, og etterfølges normalt av en økning i  $17,20\beta\text{-P}$  i ovariene som markerer endelig modning av oocytene (Jørgensen og Johnsen, 2014).  $11\text{KT}$  og T øker også merkbart i juni hos hannfisker, og stimulerer spermatogenese og vekst (Tveiten *et al.*, 1998). Nivåene av de to androgenene forblir høye frem mot gyting, hvor rapporterte toppnivåer er observert i månedskiftet september/oktober (Mayer *et al.*, 1992, Tveiten *et al.*, 1998). Etter gyting i oktober faller konsentrasjonen av samtlige steroider til lave nivåer (Frantzen *et al.*, 1997, Tveiten *et al.*, 1998).

#### 1.2.5 INITIERING AV KJØNNSMODNING

De underliggende fysiologiske mekanismene som trigger kjønnsmodning hos laksefisk er ikke godt kjent (Frantzen *et al.*, 2004b, Taranger *et al.*, 2010). Det er likevel funnet at synkende daglende på høsten ett år før gyting finner sted fører fisken gjennom et modningsvindu, med et individuelt genetisk bestemt terskelnivå (Jørgensen og Johnsen, 2014, Caldwell *et al.*, 2013). Størrelsen på energireservene er her ansett som en nøkkelfaktor for en vellykket reproduksjonsutvikling hos både fisk og andre vertebrater (Kling *et al.*, 2012).

### 1.2.6 LEPTINS ROLLE I REPRODUKSJONSUTVIKLINGEN

Fettvevshormonet leptin er et av de viktigste komponentene i langtidsregulering av energihomeostasen hos pattedyr (Weil *et al.*, 2003, Friedman, 2009). Det er et 16 kDa protein som hos pattedyr hovedsakelig syntetiseres og sekreseres i det hvite fettvevet, der en finner leptin-mRNA og sirkulerende nivåer av leptin som er proporsjonale til kroppens fettmengde (Zhang *et al.*, 1994). Hormonet fungerer som en perifer faktor som signaliserer ernæringsstatus til sentralnervesystemet via spesifikke reseptorer i hypothalamus (Friedman, 2009). Leptin har en antatt regulerende rolle i flere neuroendokrine systemer, inkludert det reproduktive systemet (Casabiell *et al.*, 2001), da leptinreseptorer er funnet hovedsakelig i de deler av hypothalamus som kontrollerer matinntak og reproduktiv adferd. Initering av pubertet hos pattedyr er ansett å være avhengig av tilstrekkelige energireserver, med leptin involvert som signalmekanisme (Moschos *et al.*, 2002). Mennesker som ikke produserer leptin forblir infertile uten leptinbehandling, da lave plasmakonsentrasjonene oppfattes av hjernen som lave energilagre (Norman og Clark, 1997). Leptinreseptorer (*LepR*) er funnet i celler gjennom hele HPG-aksen hos pattedyr (gonadotropiske celler i hypofysen, granulosa – og theaceller, og i leydigceller), og hormonet er antatt å ha en rolle som regulator av HPG via parakrine og /eller endokrine mekanismer (Moschos *et al.*, 2002).

Hos fisk ble leptin først beskrevet hos pinnsvinfisk (*Takifugu rubripes*) i 2005 (Kurokawa *et al.*, 2005). Det såkalte *Fugu*-leptinet har imidlertid en aminosyresekvens som bare i liten grad (13%) er identisk med leptin hos mennesket. Leptin er senere identifisert med to ulike leptintranskripter (*LepA1* og *LepA2*) hos andre fiskearter, blant annet atlantisk laks (*Salmo salar*; (Rønnestad *et al.*, 2010), regnbueørret (*Onchorynchus mykiss*; (Murashita *et al.*, 2008) og røye (*Salvelinus alpinus*; (Frøiland *et al.*, 2010), der syntese hovedsaklig skjer i lever. Høyt uttrykk av leptin i lever, uten påfølgende høye konsentrasjoner i plasma, har ført til antakelser om en mulig parakrin rolle for leptin (Frøiland *et al.*, 2012). Dette er videre støttet opp av det faktum at alle undersøkte arter, blant annet røya, har leptinreseptorer i lever (Jørgensen *et al.*, 2013).

Leptin er funnet å medvirke i reguleringen av reproduksjon hos fisk (Copeland *et al.*, 2011). Behandling med rekombinant museleptin hos europeisk havabbor (*Dicentrarchus labrax*) er vist å føre til stimulering av LH (Peyon *et al.*, 2001). Målinger av modnende og gyttende vill lake (*Lota lota*) viste høyere plasmakonsentrasjoner av leptin hos hunnfisk enn hannfisk, som ble antatt å reflektere observasjoner hos rotter hvor en fant at  $E_2$  *in vivo* stimulerte produksjon av leptin. Samme studie viste et inverst forhold mellom plasmanivåer

av leptin og T hos hannfisk, hvor høye nivå av T ble antatt å undertrykke frigjøring av leptin fram til gyteperioden var avsluttet (Mustonen *et al.*, 2002).

Hos røya er det genetiske uttrykket av leptin i lever vist å endre seg i samsvar med sesongmessige endringer i fettstatus gjennom året (Frøiland *et al.*, 2010). Samme studie viste imidlertid at uttrykket av leptin i lever forble høyt på høsten hos modnende fisk, til tross for reduserte fettreserver. Det samme er også observert hos modnende hannparr av atlantisk laks (Trombley og Schmitz, 2013).

### 1.3 MÅLSETTING

Selv om tilgjengelig data tyder på at leptin spiller en rolle i reproduksjonsutviklingen hos teleoster (Trombley og Schmitz, 2013, Choi *et al.*, 2014), er det lite som er kjent med både hensyn til underliggende mekanismer som styrer syntese og frigjøring av leptin og hvordan dette henger sammen med reproduksjonsutviklingen hos teleoster. Etter som leveren er et sentralt organ i reproduksjonsutviklingen hos spesielt hunnfisk, hvor syntese og frigjøring av Vtg er regulert av  $E_2$ , er det nærliggende å se på hvorvidt også syntese og frigjøring av leptin i lever kan være regulert av  $E_2$  eller andre sentrale kjønnssteroider. Det er derfor i denne undersøkelsen valgt å studere hvorvidt ulike kjønnssteroider ( $E_2$ , T og 11KT) påvirker det genetiske uttrykket av både VTG og leptin i lever hos begge kjønn av røye.

Med bakgrunn i dette er hensikten å undersøke følgende:

- Hvorvidt *in vivo* injeksjon av kjønnssteroidene  $E_2$ , T og 11KT utenfor reproduksjonssesongen (vinterstid) påvirker det genetiske uttrykket av Vtg og leptin i lever hos røye
- Avdekke mulige sammenhenger mellom leptin og kjønnssteroider hos begge kjønn av røye som gjennomgår en naturlig reproduksjonsutvikling.

## 2 . MATERIALE OG METODE

### 2.1 FISK OG FORSØKSFASILITETER

Prosjektet ble utført ved Havbruksstasjonen i Tromsø (HiT; 69°N), i perioden 23. januar til 22. august, 2013 (Fig. 1). Fiskene brukt gjennom dette prosjektet var avkom av anadrom røye fra to ulike populasjoner, 5 år gammel røye opprinnelig fanget i Storvannet i Hammerfest i 1984 og 3 år gammel røye opprinnelig fanget i Vårfluesjøen på Svalbard i 1990. Fiskene ble klekket i henholdsvis 2008 og 2010 og holdt i 4 000 liters sirkulære kar med ferskvann under naturlige lysforhold (lysgjennomtrengelig tak) ved en vanntemperatur på 5°C. Fiskene ble gjennom hele prosjektet føret med 4 mm standard settefiskfôr (Skretting, Stavanger, Norge).

### 2.2 FORSØKSDESIGN

Det ble gjennomført 2 forsøk, samt et pilotforsøk (godkjent av Forsøksdyrutvalget; ID 4937). Pilotforsøket ble utført i februar for å finne optimal dosering og samplingstidspunkt i forbindelse med implantering av kjønnssteroider i forsøk 1, mens hovedforsøkene (forsøk 1 og 2) ble gjennomført i henholdsvis mars og juni/august måned (Fig. 1). Hensikten med forsøk 1 var å studere mulige effekter av kunstig tilførsel av kjønnssteroidene 17 $\beta$ -østradiol (E<sub>2</sub>), testosteron (T) og 11-ketotestosteron (11KT) på genetisk uttrykk (mRNA) av 2 paraloger av leptin (*LepA1* og *LepA2*), en reseptor for leptin (*LepR*), samt for vitellogenin (*Vtg*) i lever hos begge kjønn av røye. Forsøket ble utført utenfor reproduksjonssesongen (mars) for å unngå mulige effekter av naturlig produserte kjønnssteroider. Dette forsøket ble fulgt opp av forsøk 2, der en ønsket å undersøke mulige sammenhenger mellom de samme faktorer hos røye som får en naturlig økning i kjønnssteroider gjennom reproduksjonssyklusen. I de to implanteringsforsøkene ble Hammerfestrøya klekket i 2008 brukt, mens Svalbardrøya klekket i 2010 ble brukt i forsøk 2.



Figur 1. Oversikt uttakstidspunkt.

### 2.2.1 KJØNNBESTEMMELSE OG MERKING AV FISK FØR FORSØKSSTART

I alt 105 individer til pilotforsøket og forsøk 1 ble 16. november 2012 bedøvd (Benzocaine vet, 200 mg/ml tilsvarende 50 ppm), kjønnsbestemt ved stryking av gonadeprodukter samt visuell bedømmelse av ytre kjønnsstrekk, og deretter individmerket med Floy tags (MFG, Washington, USA). Individmerkene ble sydd fast i forkant av dorsalfinnen, hvor antatt hannfisk ble merket med blå tags og antatt hunnfisk ble merket med rosa tags. Fisken ble deretter satt tilbake for oppvåkning i 4 000 liters sirkulære kar, hvor de ble holdt fram til forsøkene ble utført.

### 2.3 INJEKSJON AV KJØNNSTEROIDER OG PRØVETAKING

#### 2.3.1 PILOTFORSØK

Pilotforsøket ble utført i tidsrommet 23. januar til 13. februar 2013 med 18 fisk, 9 av hvert kjønn. Det ble etablert tre grupper med tre individer av hvert kjønn i hver gruppe. To grupper ble behandlet med henholdsvis E<sub>2</sub> (Sigma Aldrich, Tyskland) og T (Sigma Aldrich, Tyskland) løst i propylenglykol (Sigma Aldrich, Tyskland) (20 mg steroid/ml), mens en gruppe fikk kun propylenglykol (kontroll).

Før injisering ble fisken bedøvd (Benzocaine vet 200 mg/ml, 50 ppm), individbestemt (avlesing av tagnummer) og deretter vekt- (nærmeste g) og lengdemålt (gaffellengde; nærmeste 0,5 cm). Det ble deretter tatt blodprøve fra caudalårene ved hjelp av 2 ml hepariniserte vacutainere (BD Diagnostics, Franklin lakes, New Jersey). Prøvene ble merket med individnummer og plassert direkte på is frem til plasma ble separert ved sentrifugering (5 000 rpm i 10 minutter ved 3°C). Plasma ble deretter overført til eppendorfrør merket med individnummer og lagret på -20°C for senere kvantifisering av kjønnssteroider.

Etter at blodprøve var tatt ble fisken gitt 0,1 ml steroidløsning/kg kroppsvekt, som tilsvarte en dose på 2 mg steroid/kg kroppsvekt i behandlingsgruppene, mens kontrollgruppen fikk tilsvarende mengde propylenglykol uten tilsetning av steroid. Det ble ikke foretatt injeksjon av 11-KT i pilotforsøket. Injeksjonene ble gjort intramuskulært ved hjelp av 1 ml sprøyter (BD Plastipak, Madrid) med 0,8 mm nålespiss, omtrent 2 cm bak dorsalfinnen på fiskens høyre side. Stikksårets område ble deretter massert lett for å unngå lekkasje av den



injiserte løsningen. Fisken ble deretter plassert i forsøkskaret og holdt under oppsyn til den hadde våknet fra bedøvelsen.

Behandlingen ble gjentatt 2 ganger, henholdsvis en og to uker etter oppstart, der fisken gjennomgikk samme prosedyre som ovenfor. I tillegg ble det avlivet ett individ av hvert kjønn etter henholdsvis en, to og tre uker, der det ble tatt vevsprøver av lever lagt i eppendorfrør tilsatt RNAlater (Ambion, Life Technologies) for senere analyse av genuttrykk. Dette ble gjort for å finne et optimalt tidspunkt for når fisken i forsøk 1 burde avlives etter at steroid-behandlingen ble startet.

### 2.3.2 FORSØK 1 – INJEKSJON AV KJØNNSSTEROIDER

Den 21. februar 2013 ble 68 individer tatt ut tilfeldig og fordelt i fire sirkulære 300 liters kar for akklimatisering i 8 dager før forsøksstart. Se tabell 1 for fordeling av behandlingsgrupper, antall individer og kjønn i de fire karene.

Tabell 1. Behandlingsgrupper i forsøk 1: n = antall individer, M = Hannfisk, F = Hunnfisk

	Gruppe 1	Gruppe 2	Gruppe 3	Gruppe 4
<b>Behandling</b>	Kontroll	Testosteron	11-ketotestosteron	17β- østradiol
<b>n</b>	16 (9 M,7 F)	18(12 M, 6F)	17 (11 M, 6 F)	17 (12 M, 5 F)

Fisken ble holdt i ferskvann (5°C og minimum 90% oksygenmetning) under simulert naturlig fotoperiode (69°N) og føret *ad libitum* fire timer daglig med skiveautomat (Aqua Produkter AS, Sunndalsøra, Norge). Temperatur og oksygenmetning ble kontrollert og eventuelt justert daglig.

#### *Prøvetaking og steroid-behandling*

Ved oppstart av forsøket 1. mars (etter 8 dager akklimatisering) ble 5 fisk om gangen håvet tilfeldig ut fra en gruppe og bedøvd slik som beskrevet ovenfor under pilotforsøket. Det ble deretter gjort målinger av vekt og lengde før blodprøver ble tatt og fisken fikk injisert steroidløsning eller propylenglykol (kontroll), slik som beskrevet. Basert på plasmaverdiene av kjønnssteroider fra pilotforsøket ble det imidlertid besluttet å halvere dosen av steroider til

1 mg/kg kroppsvekt for å oppnå plasmaverdier av kjønnssteroidene som kan sammenlignes med det en finner hos naturlig modnende røye (Tveiten *et al.*, 1998). Videre ble det i tillegg til E<sub>2</sub> og T også gitt 11-KT (N.R.C. Massey, New Zealand), med samme dosering som for E<sub>2</sub> og T. Etter behandling ble fisken satt tilbake i forsøkskaret og overvåket til alle individer var våkne.

Samme samplings- og behandlingsprosedyre ble gjentatt to ganger (8. og 15. mars), med unntak av injeksjon av kjønnssteroider/propylenglykol den 15. mars, før fisken ble avlivet (15. mars) og deretter kjønnsbestemt. Etter avliving ble det tatt ut vevsprøver av lever som ble lagt i eppendorfrør tilsatt RNAlater for senere analyser av genuttrykk. I tillegg ble mage og tarm dissekert ut og tømt for beregning av fôrintak (nærmeste 0,5 g).

### 2.4 FORSØK 2 – NATURLIG REPRODUKSJONSUTVIKLING - PRØVETAKING

Det ble tatt ut til sammen 29 individer av Svalbard-røye (2010-generasjon) som var antatt enten å være umoden (28. juni; 10 individ; 5 hunnfisk og 5 hannfisk) eller naturlig modnende (22. august; 19 individer; 11 hunnfisk og 8 hannfisk) for prøvetaking av blod og lever til analyse av kjønnssteroider og genuttrykk (samme prosedyre som ovenfor). Fisken ble fôret *ad libitum* med Skrettings 4 mm standard settefiskfôr (Stavanger, Norge) og holdt under naturlig fotoperiode og 5°C.

### 2.5 KONDISJONSFAKTOR OG GONADOSOMATISK INDEKS (GSI)

Fultons kondisjonsfaktor ble regnet ut for hvert individ etter følgende formel:

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

hvor L er lengde i cm, og W er fiskens totale kroppsvekt i g. Gonadosomatisk indeks (GSI) for målinger av gonader i forsøk 2 ble regnet ut fra formelen:

$$\frac{GW}{W} \times 100\%$$

hvor GW er vekten av gonaden i gram, og W er fiskens totale kroppsvekt i g.

## 2.6 ANALYSER

### 2.6.1 KVANTIFISERING AV TESTOSTERON, 11-KETOTESTOSTERON OG 17 $\beta$ -ØSTRADIOL

Alle analyser av kjønnssteroider i plasma fra forsøk 1 og 2 ble utført på Institutt for Arktisk og Marin Biologi, BFE, UiT, ved hjelp av radioimmunoassay (RIA), modifisert etter Schulz (1985) og videreutviklet/validert av Frantzen *et al.* (2004b) og Tveiten *et al.* (2010).

RIA er basert på at antigen fra en ukjent mengde av for eksempel et spesifikt hormon (T, 11KT eller E<sub>2</sub>) vil bindes til et hormon-spesifikt antistoff og samtidig konkurrere med radioaktivt merket antigen av samme hormon om samme bindingssete. Dette betyr at dersom det er en stor mengde antigen av ”kaldt” hormon til stede (ved høye hormorkonsentrasjoner i plasmaprøven), vil det ”kalde” plasma-hormonet utkonkurrere det radioaktivt merkede hormonet tilsatt prøven. Etter at likevekt er oppnådd og den frie ikke-bundne fraksjonen av antigen (både kaldt og radioaktivt merket hormon) er separert fra antistoff-bundet antigen, vil en sitte igjen med en aktivitet av radiomerket hormon (bundet til antistoffet) som er inverst proporsjonalt med mengden ukjent hormon i plasmaprøven.

En standardkurve konstruert av en kjent mengde standardløsning med det aktuelle ”kalde” steroidet og en kjent mengde av det radioaktivt merkede steroidet er nødvendig for å finne konsentrasjonen til steroidet. En slik standardkurve viser da en prosentvis mengde av det radioaktivt merkede steroidet som vil bindes til antistoffet ved ulike kjente konsentrasjoner av det ”kalde” steroidet.

Det radioaktivt merkede hormonets hydrogenatom (det radioaktive <sup>3</sup>H, tritium) avgir  $\beta$ -stråling, og måles i cpm (counts per minute) ved hjelp av en scintillasjonsteller. Den detekterte strålingen fra prøven kan da legges inn i standardkurven, og man kan lese av den ukjente mengden av det aktuelle steroidet i prøven.

#### *Ekstrahering av steroider*

Før RIA kan utføres må kjønnssteroideene i plasmaprøvene ekstrahert. Dette ble gjort ved å tilsette 4 ml eter (diethylether) til 300  $\mu$ l av plasmaprøven. Vannfasen (plasma) ble deretter frosset ved hjelp av flytende nitrogen, og eterfasen (med steroider) ble deretter dekantert over i nye rør og fordampet ved 45°C i 40 min, slik at sluttproduktet var noen oljedråper som inneholdt steroideene. Prøvene ble deretter løst og fortynnet 3 ganger (opprinnelig 300  $\mu$ l plasmaprøve mot 900  $\mu$ l buffer) med RIA-buffer (1 liter: 1 g gelatin, 21,84 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>+12H<sub>2</sub>O, 4,38 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>+12H<sub>2</sub>O, 9 g NaCl, 1 ml Na-azid 5% løsning i MilliQ-

vann). Fortynningen ble deretter blandet ved hjelp av en vortex røreplate og satt til "hvile" i 15 min før den ble rørt igjen og dekantert over i eppendorfrør. Prøvene ble deretter fryst inn ved -20°C frem til analysene ble utført.

#### *Radioaktive steroider*

De radioaktive steroidene ble oppbevart i EtOH-mellomstocker ved 4°C og fortynnet til en konsentrasjon tilsvarende 10.000 cpm/ 50 µl RIA-buffer (se tabell 2 for blandingsforhold). For kontroll av radioaktivitet ble 50 µl av løsningen og 600 µl RIA-buffer tilsatt i et tellerør med 7 ml tellevæske (Ultima Gold XR scintillasjonsvæske). Rørene ble forseglet, vortexet og målt for β-stråling i scintillasjonsteller (Tri-Carb 2900TR, Perkin Elmer, Illinois).

**Tabell 2. Fortynningsforhold av radioaktivt merkede steroider og RIA-buffer.**

Steroid	Total count (cpm)	<sup>3</sup> H-EtOH mellomstock (µl)	RIA-buffer (ml)
T	10 000	205	30
11KT	10 000	526	12
E <sub>2</sub>	10 000	75	19

#### *Antistoffer*

Antistoffene for de ulike steroidene (produsert i hvite kaniner) ble oppbevart ved -80°C i en 10x fortynning med RIA-buffer. Etter tining ble de lagret på 4°C og tilsatt et par korn Na-azid for konservering. Konstruksjon av mellomfraksjon med 500x fortynning ble utført ved å tilsette 30 µl antistoff til 1,47 ml RIA-buffer. De ulike brukerløsningene ble fortynnet videre i henhold til tabell 3.

**Tabell 3. Blandingsforhold av fortynningstil brukerløsning av steroidespesifikke antistoff.**

Steroid antistoff	Fortynning brukerløsning	500x mellomfraksjon (µl)	RIA-buffer (ml)
T	5 000	1500	13,5
11KT	20 000	500	19,5
E <sub>2</sub>	18 000	550	19,25

*Standardkurve*

Ikke-radioaktive steroider av ulike konsentrasjoner ble nytted for å konstruere standardkurver for det respektive steroidet. Steroidet ble oppbevart ved 4°C i stockløsninger fortynnet i etanol til 500 µg/ml. Videre fortynning til 250x til konstruksjon av standardløsning ble utført ved å tilsette 10 µl (500 µg/ml mellomløsning) til 2,49 ml RIA-buffer. Løsningene ble vortexet godt hver gang den ble brukt. Videre ble 50 µl arbeidsløsning overført til 15 ml sentrifugerør merket S9 og tilsatt 2,45 ml RIA-buffer. Etter at løsningen var vortexet, ble øvrige standarder konstruert ved å fortynne S9 nedover 1:1 (1 ml av S9-løsningen hentet ut og overført i et nytt 15 ml sentrifugerør inneholdende 1 ml RIA-buffer, og røret ble merket S8, osv). S9 til S1 gav dermed følgende konsentrasjoner: 2000, 1000, 500, 250, 125, 62,5, 31,2, 15,6 og 7,8 pg/50 µl.

*Dextran coated charcoal solution*

Kulløsning blir nytted for å absorbere frie antigen som ikke er bundet opp til antistoff. Løsningen ble konstruert ved å løse 1,0 g aktivt kull og 0,1 g dextran T70 i 100 ml buffer, og deretter satt til omrøring på is på en magnetrører (4°C) i en time. Kulløsningen ble oppbevart i kjøleskap ved 4°C. Før bruk ble løsningen rørt i minimum 15 minutter med magnetrører, og holdt ved 4°C ved bruk av is.

*RIA*

Det ble først utført 18 assay fordelt på 6 assay pr steroid. Prøvene ble kjørt på 3x og 24x fortynning, ut i fra forventede konsentrasjoner. Hvert assay inneholdt 29 plasmaprøver.

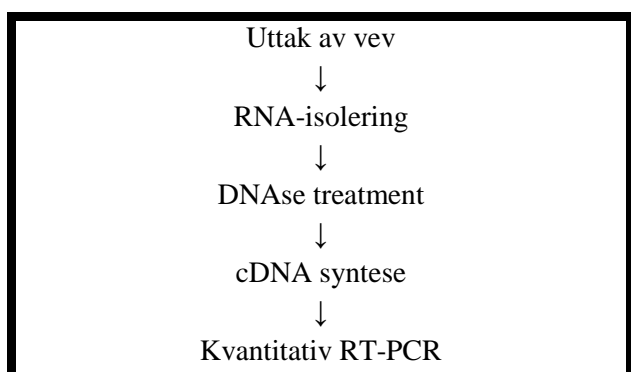
Standardkurven og Total Count (TC; 10 000 cpm), Total Bound (TB; viser maksnivået som kan bindes) og Non-Specific Binding (NSB; minimumsnivå – Ingen antistoff = ingen konkurranse) ble konstruert etter tabell 4, og stod over natten ved 4°C (ekvilibrering, hvor antistoffets bindingssteder er fullsatt).

**Tabell 4. Blandingsforhold i de forskjellige løsningene brukt under RIA-analysen. Alle volum er gitt i µl.**

	Buffer	Standard	Prøve	[ <sup>3</sup> H]	Antistoff
TC	600	-	-	50	-
TB	100	-	-	50	200
NSB	300	-	-	50	-
Std.1-9	50	50	-	50	200
Prøve 1-29	-	-	100	50	200

Et volum på 300 µl av kulløsningen ble tilsatt hvert rør for å binde opp det frie antigenet. Etter 5 min "hvile" ble løsningene sentrifugert (5 minutter, 4200 g). Resultatet er en utfelling av kullet med det frie antigenet, slik at supernatanten (med antistoffbundet antigen) kunne dekanteres over i tellerør. Deretter ble det tilsatt 7 ml Ultima Gold RX telleveske, som muliggjør avlesing av radioaktiviteten i løsningen ved hjelp av scintillasjonteller for  $\beta$ -stråling (Tri-Carb 2900TR, Perkin Elmer, Illinois). Resultatene fra målingene ble lagt inn i et rekneark (Excel) og verdier og figurer ble konstruert ut fra standardkurven til disse resultatene.

## 2.6.2 ANALYSER AV LEVER mRNA FOR LEPTIN A1, A2, LEPTIN RESEPTOR OG VITELLOGENIN UTTRYKK



Figur 2. Flyskjema over hovedsteg i qPCR.

Real-Time Reverse-Transcriptase Quantitative Polymerase Chain Reaction (RT- qPCR) analyse ble utført for kvantifisering av DNA-sekvenser fra lever av leptin A1, leptin A2, leptin reseptor og vitellogenin. Leverprøve for 10 fisk (5 hunn- og 5 hannfisk) fra hver behandlingsgruppe i forsøk 1, unntatt 1 manglete prøve for hunnfisk i testosterongruppen, og leverprøver for alle individene i forsøk 2 ble analysert. Dette utgjorde totalt 68 prøver.

Metoden fungerer ved å benytte et fluorescerende fargestoff til deteksjon av mengde gentranskript gjennom en syklisk amplifisering av en bestemt gensekvens. Måling av fluorescens utføres etter hver syklus, og øker ved en økning i genuttrykk (LifeTechnologies, 2012). Syklusen baseres på 1) denatureringsfasen: hvor høy temperatur (95°C) splitter dobbeltrådig DNA (dsDNA) til enkeltrådig DNA (ssDNA), 2) amplifiseringsfasen: reduksjon i temperatur (til 60°C) fører til at spesifikke primere og komplimenterære baser bindes til

DNAtråden, og 3) ekstensjonsfasen, hvor ny DNAtråd syntetiseres av en DNAPolymerase, Se tabell 6 for oversikt.

### *RNA ekstraksjon*

RNAeasy Plus Universal Mini Kit (Qiagen, Alameda, CA, USA) ble brukt for rensing av totalt RNA fra leverprøvene. Isolering av RNA ble utført i henhold til RNeasy<sup>®</sup> Plus Unvisersal Handbook (QIAGEN, 2010).

Omtrent 30-50 mg leverprøve i 2 ml mikrosentrifugerør ble homogenisert i 900 µl QIAzol lysis agent sammen med en 5 mm kule i rustfritt stål ved bruk av Tissuelyser II systemet (25Hz, 3 min). Etter homogenisering ble lysatet overført til nye 1,5 ml mikrosentrifugerør, og tilsetning av 100 µl gDNA Eliminator Solution reduserte eventuell kontaminering med genomisk DNA. Tilsetning av 180 µl kloroform og påfølgende sentrifugering (15 min, 4 °C) separerte løsningen i tre faser; en transparent øvre vannfase inneholdende RNAet, en hvit mellomfase og en nedre rosa organisk fase. Vannfasen (500 µl) ble hentet ut og blandet med 500 µl 70% etanol i nye mikrosentrifugerør. Overføring av lysatet til RNeasy Mini spin columns plassert i 2 ml oppsamingsrør for filtrering ved sentrifugering (10 000 rpm, 30 s) med påfølgende fjerning av oppsamlet lysat, ble utført i 2 omganger (500 µl x2). RNAeasy spin columns ble skyllet med 700 og 500 µl av henholdsvis RWT og RPE buffer (konsentrat tilsatt 70 % ethanol ble tilsatt, med sentrifugering; 10 000 rpm, 30 s). Skylling med 500 µl RPE buffer ble igjen tilsatt, med påfølgende sentrifugering (10 000 rpm, 2 min) og fjerning av oppsamlingsvæske. RNeasy Mini spin columns ble deretter kjørt i sentrifugen (full hastighet, 1 min) for fjerning av eventuelle rester av RPE bufferen. Avslutningsvis ble RNeasy Mini spin columns overført til 1,5 ml eppendorfrør, tilsatt 32 µl RNase-fritt vann direkte på membranen, og sentrifugert (1 000 rpm, 1 min) for å ekstrahere RNA. RNA-konsentrasjonen ble målt med ND-2000 spectrophotometer (NanoDrop<sup>®</sup>, Wilmington, Delaware, USA). Nanodrop måler absorbans av bølgelengde til nukleinsyre konsentrasjon ( $A_{260}$ ) og proteinkonsentrasjon ( $A_{280}$ ). Dersom  $A_{260}/A_{280}$ , var under optimal renhet (<2,0), ble etanolutfelling brukt for å rense RNAet i prøven, i henhold til protokollen (se vedlegg s 47).

### *DNase I behandling for fjerning av genomisk DNA*

TURBO Dnase Treatment and Removal Reagents, TURBO DNA-free™ kit (Am1907, Ambion, Life technologies, CA, USA) ble brukt for DNase behandling av RNA, for fjerning av eventuelt genomisk DNA og divalente kationer. gDNA i en prøve påvirker måltranskriptet og effektivitet i reaksjonen, og medfører ugyldige resultater (LifeTechnologies, 2012).

Ut fra RNA-konsentrasjonen målt med NanoDrop® ble det nødvendige volum av RNA-prøve og vann beregnet for å oppnå en konsentrasjon på 8 µg RNA med en væskemengde på til sammen 22 µl, som ble satt opp i nye eppendorfrør merket med prøvenummer. Mastermix inneholdende 1 µl TURBO DNase + 0,1 volum 10x TURBO DNase-buffer ble tilsatt hver prøveløsning og inkubert på varmeblokk (37 °C, 30 min). For å stoppe reaksjonen etter inkubering, ble 2,5 µl DNase-inaktiveringsbuffer tilsatt og blandet i hver prøve. Påfølgende ble prøvene inkubert (20°C, 5 min) med tidvis knipsing på rørene for miksing av løsningen. Ytterligere blanding av prøvene ble utført etter fullført inkuberingstid, med påfølgende sentrifugering (10 000 rpm, 2 min, 20 °C), for dannelse av ”pellet” (DNase inaktiveringsreagenten) i bunnen av prøverøret. RNA (supernatanten) ble hentet ut uten å ødelegge pelleten, og overført til nye eppendorfrør med påfølgende måling av konsentrasjon ved hjelp av NanoDrop®.

### *Revers transkripsjon*

Revers transkripsjon er en prosess hvor mRNA syntetiseres til cDNA. En dobbeltrådig sekvens ved 3'enden av mRNAet trengs for at transkripsjonen skal starte, og enzymet reverse transkriptase hjelper til å danne en slik komplementær nukleotidtråd (også kjent som en RNA-avhengig DNA polymerase).

iScript™ Advanced cDNA Synthesis Kit for RT-qPCR (Bio-Rad Laboratories, Hercules, California, USA) ble nyttet for cDNA syntese. Reaksjonsvolumet var 20 µl pr prøve: 4 µl 5x iScript advanced reaction mix, 1 µl iScript advanced reverse transcriptase og variable volum av prøven og nukleasefritt vann, avhengig av RNA konsentrasjon i prøven, hvor det ble brukt 1 µg RNA til cDNA syntesen.

Negative kontroller (NoRT, No Reverse Transkriptase) ble konstruert for å sjekke om det var genomisk DNA igjen i prøven, som i så fall ville gi et resultat i qPCR. Mastermix (nr 2) inneholdt 5 µl 5x iScript advanced reaction mix og variable volum av prøven og nukleasefritt vann, til sammen 20 µl. Det ble konstruert NoRT for omtrent hver 5 prøve (prøve 2, 7, osv).



## MATERIAL OG METODE

Alle prøver ble inkubert i thermal cycler (2720; Applied Biosystems, Forster City, California, USA), 12 rør pr omgang (10 prøver + 2 NoRT), med syklusen: Revers transkripsjon: 30 min ved 42 °C og følgende RT inaktivering: 5 min ved 85 °C. Etter endt inkubering ble prøvene fortynnet 5x til 100 µl og lagret på -20°C frem til qPCR- analysene ble kjørt.

### *Kvantitativ analyse av genuttrykk*

**Tabell 5. Gensymbol, assay navn, primersekvens og produktlengde for genene brukt i RT-qPCR. Access nummeret til genene i GenBank er også vist.**

Gen Symbol	Assay navn	Forward primer	Reverse primer	Produkt-lengde	Acc. nr	Bedrift
<b>LepA1</b>	Leptin A1	TCC TAG ACT GGG CAG ACC T	GCC TGG GCA GCG TGA TAT	91	JQ61 5967 .2	Primer-design (Southampton, UK)
<b>LepA2</b>	Leptin A2	TGG CAC TAA ACA GAC TCA AGG	CTC AGT GAT GAT CTA TGT CAG TAA C	102	AB49 0667 .1	Primer-design (Southampton, UK)
<b>LepR</b>	Leptin reseptor	CTT TGC TCG GGA GTC AGG A	CCT GTG CTT TGA GTG GAC TG	129		Primer-design (Southampton, UK)
<b>VTG1</b>	Vitello genin	ATG ACA GGG AGT CCA AAT GC	TAT CTG CTC CAC CAC AGC AC	243	X928 04	(Tingaud- Sequeira <i>et al.</i> , 2012)
<b>EF1α</b>	Elongation Factor	AGG CAT TGA CAA GAG AAC CATT	TGA TAC CAC GCT CCC TCT C	119	AF49 8320 .1	Primer-design (Southampton, UK)

SsoAdvanced™ Universal SYBR® Green Supermix (Bio-Rad, CA, USA) ble brukt, som inneholder DNA-bindende farge, med evne til å binde til ethvert dobbeltrådig DNA-molekyl. No Template (cDNA) Control (NTC) ble brukt for å kontrollere at primere, vann eller SYBR green Mix ikke var kontaminert med cDNA eller DNA. Elongation Factor 1α ble valgt som referansegen for relativ kvantifisering, grunnet positive erfaringer fra forskningsgruppens arbeid med røye. Valget av primere ble også basert på forskningsgruppens positive erfaringer.

Hard-Shell® Low Profile Thin Wall 96-well Skrited PCR Plates (Bio-Rad, CA, USA) ble nyttet for amplifisering med qPCR. Reaksjonsvolumet i hver brønn var 20 µl, med en konsentrasjon på 40 µg cDNA. Volum av SYBR-green og primer mix (250nM) var henholdsvis 10 og 1 µl, mens volum av cDNA var 4 µl og vann 5 µl. Platen ble forseglet, sentrifugert i 20 sekunder og kjørt med CFX96 Real-Time PCR Detection system (Bio-Rad, CA, USA) og programvaren CFX Manager 3.0 (Bio-Rad, CA, USA). Programmet for PCR er beskrevet i tabell 6.

Tabell 6. RT-PCR program med smeltekurve

Steg	Temperatur (°C)	Varighet	Antall syklr
	50	10 minutter	
Denaturering	95	5 minutter	Hold
Denaturering	95	10 sekunder	40
Amplifisering og ekstensjon	60	30 sekunder	40
Smeltekurve	95	10 sekunder	
	65	0,05 sekunder	
	95	0,5 sekunder	

Smeltekurve brukes for å validere at primerene bindes spesifikt, og ikke danner ”primer-dimers”, hvor to PCR-primere bindes til hverandre i stedet for målet, eller forsterker et ikke-spesifikt produkt. Smeltekurven viser endringen i fluoresens som observeres når dobbeltrådig DNA (dsDNA) dissosierer (”smelter”) til enkeltrådig DNA (ssDNA) etter hvert som temperaturen i reaksjonen økes (LifeTechnologies, 2012). Økt temperatur ved bruk av SYBR<sup>®</sup> Green bundet til dsDNA fører til deteksjon av en brå reduksjon i fluorescens idet smeltepunktet ( $T_m$ ) nås, grunnet dissosiasjon av DNA-trådene og følgende utslipp av fargen.

## 2.7 DATABEHANDLING OG STATISTIKK

Statistiske analyser ble utført ved hjelp av programvaren *R* (RCoreTeam, 2014) og konstruksjon av figurer ble utført ved hjelp av Excel 2007.

Den ikke-parametriske testen Mann-Whitney-Wilcoxon ble nyttet for testing av signifikans i datasettene, ettersom antall prøver var lavt og visuell inspeksjon av datamaterialet tydelig viste at det ikke var en normalfordeling. Et signifikansnivå hvor  $P < 0,05$  ble ansett som akseptabelt.

For plasmaverdier av de ulike kjønnssteroidene i forsøk 1 ble prøver tatt før behandling ble de statistiske analyser kjørt med tosidig test hvor steroidebehandlede grupper ble kjørt opp mot kontrollgruppen enkeltvis. Prøver fra steroidebehandlede grupper tatt ved forsøkslutt ble kjørt med en ensidig test mot kontrollgruppen, da injeksjon av kjønnssteroidene forventes å gi en økt plasmakonsentrasjon. Statistisk analyse av en gruppe før og etter behandling ble utført med ensidig, paret test.

I forsøk 2 ble det nytted tosidige tester for å se på forskjeller i plasmaverdier av de ulike kjønnssteroidene og de ulike genuttrykkene i lever, hvor gruppene ble kjørt opp mot hverandre enkeltvis.

Grunnet budsjettbegrensninger i prosjektet ble analyser på genetisk uttrykk i lever utført på 5 individ av hvert kjønn i hver gruppe i forsøk 1, utgjørende 40 av de 68 individene injisert. Ved bearbeiding av plasmakonsentrasjonresultater ble det derfor brukt de samme individ som analysert for genuttrykk, slik at antallet fisk fremstilt i resultater av plasmakonsentrasjon også er 40. Dette ble gjort for å få et mest mulig helhetlig bilde av sammenheng mellom plasmakonsentrasjonen av kjønnssteroider og det genetiske uttrykket i lever.

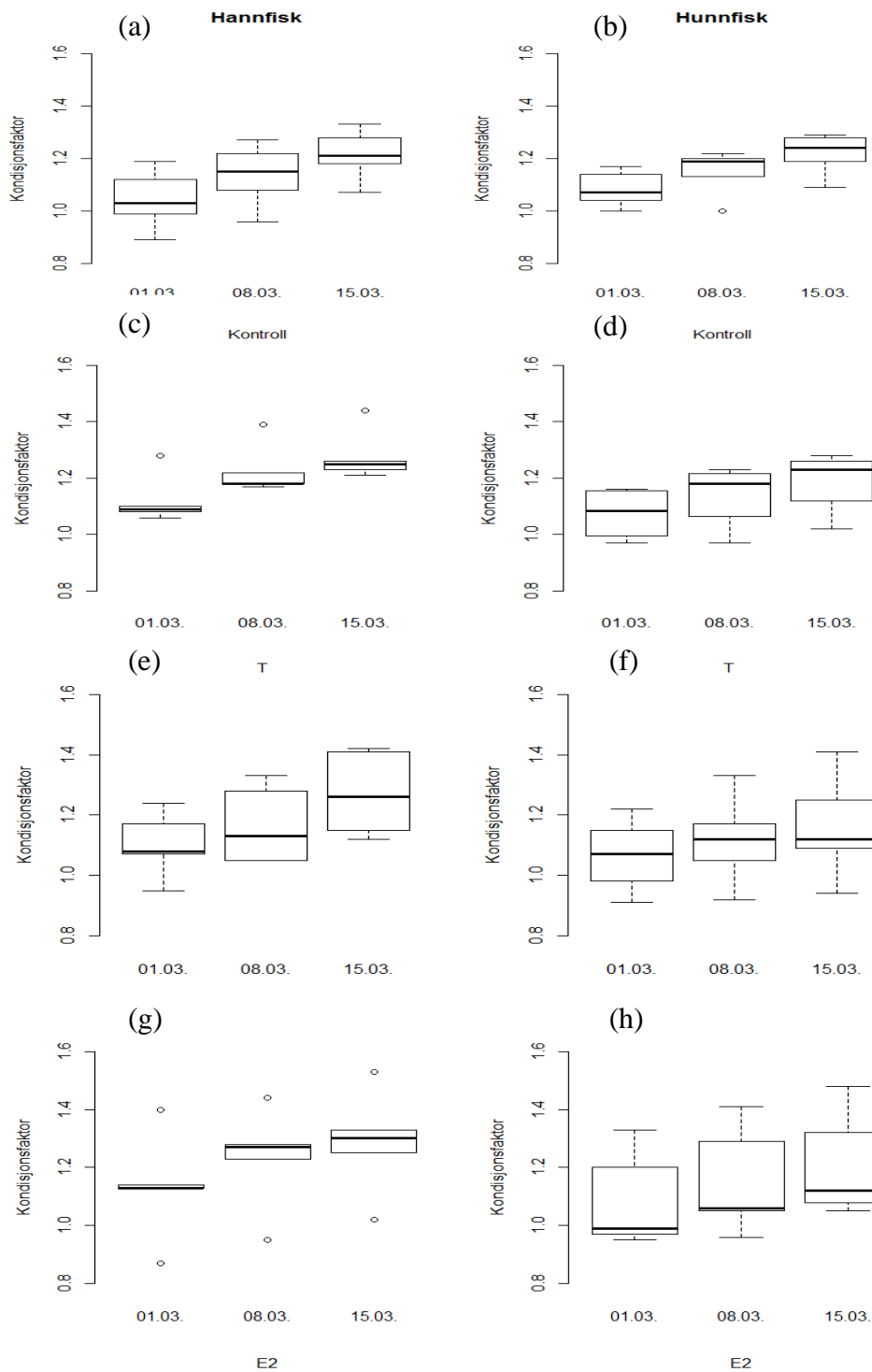
Tukey-boxplot konstruert i R ble brukt for presentasjon av data, etter som verdiene ikke var normalfordelte. I boxplotet viser rektangelen den *interkvartile rekkevidden* (IQR), som går fra den første kvartilen (25 prosentilen, Q1), via den andre kvartilen (50 prosentilen - medianen Q2) til den tredje kvartil (75 prosentilen, Q3). De ytre strekene (*whiskers*) markerer minimums- og maksimumsverdier. Verdier utenfor 1,5 ganger IQR fra den første kvartilen er vist som "uteliggere", markert med en rund sirkel under eller over strekene. Alle gjennomsnittsverdier er angitt som medianverdier. Verdiene for genuttrykk er normalisert mot  $EF1\alpha$ .

### 3. RESULTATER

#### 3.1 FORSØK 1 – INJEKSJON AV KJØNNSSTEROIDER

##### 3.1.1 KONDISJONSFAKTOR

Det var en gjennomgående tendens til økt kondisjonsfaktor grunnet økt vekt i alle behandlingsgrupper gjennom forsøksperioden (fra 1. til 15. mars), men endringene var ikke signifikante (Fig. 3). Gjennomsnittlig vekt (median) økte fra 1124 til 1252 g hos hannfisk og fra 1080 til 1236 g hos hunnfisk i kontroll-gruppen, fra 1085 til 1218 g hos hannfisk og fra 993 til 1139 g hos hunnfisk i T-gruppen, fra 1179 til 1414 g hos hannfisk og fra 1107 til 1165 g hos hunnfisk i 11KT-gruppen og fra 1114 til 1291 g hos hannfisk og fra 930 til 1057 g hos hunnfisk i E<sub>2</sub>-gruppen. Gjennomsnittlig lengde hos begge kjønn i alle behandlingsgrupper varierte fra 45 til 48 cm.



**Figur 3.** Endring i kondisjonsfaktor i behandlingsgruppene av hann- og hunnrøye, for gruppene implantert med propylenglykol (kontroll, a og b), testosteron (T, c og d), 11-ketotestosteron (11KT, e og f) og 17 $\beta$ -østradiol (E<sub>2</sub>, g og h). Boxplot viser medianverdier, 50% persentiler, værhar for verdier < 1,5 IQR og sirkler for øvrige uteliggere. Medianverdiene er basert på henholdsvis 5 hann- og hunnfisk i hver behandlingsgruppe, unntatt hunnfisk behandlet med T, hvor n=4. Statistiske forskjeller i plasmakonsentrasjon mellom kontrollgruppen og behandlingsgruppene er vist med asterisker over klammetegn (\*; P<0,05, \*\*; P<0,01).

### 3.1.2 PLASMAKONSENTRASJONER AV KJØNNSSTEROIDER

#### *Behandlingsgruppe testosteron*

Hannfisk injisert med T viste signifikant ( $P<0,05$ ) høyere plasmanivå av T etter injeksjon (7,5 ng/ml) sammenlignet med nivåer før injeksjon (1,2 ng/ml; Fig. 4a). Det ble også påvist signifikant ( $P<0,01$ ) høyere plasmanivå av T hos fisk injisert med T, sammenlignet med kontrollgruppen før (1,8 ng/ml) og etter (3,1 ng/ml) injeksjon av propylenglykol.

Hunnfisk behandlet med T viste også etter signifikant ( $P<0,01$ ) høyere plasmanivå av T etter injisering (44,7 ng/ml) sammenlignet med kontrollgruppen før (2,6 ng/ml) og etter (2,7 ng/ml) injeksjon av propylenglykol (Fig. 4b). Det ble også påvist signifikante ( $P<0,05$ ) forskjeller mellom de to behandlingsgruppene før injeksjon, hvor plasmanivået av T i kontrollgruppen var 0,9 ng/ml høyere enn i gruppen behandlet med T.

#### *Behandlingsgruppe 11-ketotestosteron*

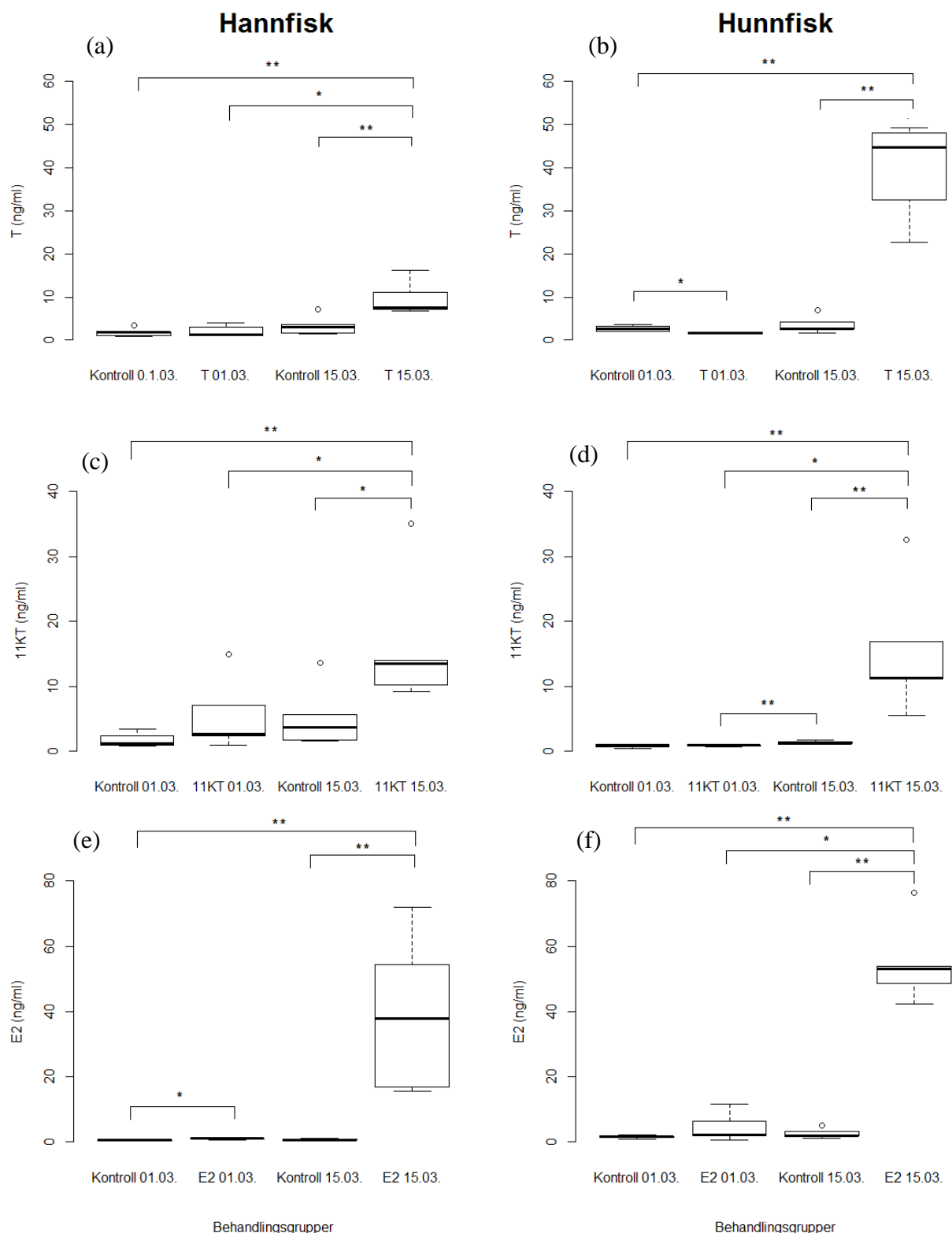
Hannfisk behandlet med 11KT hadde et signifikant høyere plasmanivå av 11KT (13,6 ng/ml) enn kontrollgruppen før (1,3 ng/ml;  $P<0,01$ ) og etter injeksjon (3,7 ng/ml;  $P<0,05$ ) av propylenglykol (Fig. 4 c). Det var også en signifikant økning av plasmanivå av 11KT hos hannfisk etter 11KT-implantering sammenlignet med samme gruppe før implantering (2,7 ng/ml;  $P<0,05$ ).

Hunnfisk behandlet med 11KT viste også signifikant høyere nivå av 11KT i plasma (11,3 ng/ml) sammenlignet med kontrollgruppen før (1,0 ng/ml;  $P<0,01$ ) og etter (1,2 ng/ml;  $P<0,01$ ) injeksjon av propylenglykol (Fig. 4d). Det var også en signifikant forskjell av 11KT i plasma hos 11KT gruppen før behandling (1,0 ng/ml) og etter behandling (11,3 ng/ml;  $P<0,05$ ). Hunnfisk i 11KT-gruppen hadde også et signifikant lavere nivå av 11KT før injeksjon sammenlignet med kontrollgruppen etter injeksjon av propylenglykol (1,2ng/ml;  $P<0,01$ ).

#### *Behandlingsgruppe 17 $\beta$ - $\phi$ stradiol*

Det var et signifikant høyere plasmanivå av  $E_2$  hos hannfisk etter injeksjon av  $E_2$  (37,8 ng/ml) sammenlignet med kontrollgruppen før (0,5 ng/ml) og etter (0,6 ng/ml) injeksjon av propylenglykol ( $P<0,01$ ; Fig. 4e). Hannfisk i  $E_2$  gruppen hadde også et signifikant høyere nivå av  $E_2$  før injeksjon (1,1 ng/ml) enn kontrollgruppen før injeksjon av propylenglykol ( $P<0,05$ ).

Hunnfisk behandlet med  $E_2$  viste et signifikant høyere plasmanivå av  $E_2$  etter injeksjon (53,1 ng/ml) enn før (2,3 ng/ml;  $P<0,05$ ), og sammenlignet med hunnfisk i kontrollgruppen før (1,6 ng/ml) og etter (2,1 ng/ml) injeksjon av propylenglykol ( $P<0,01$ ; Fig. 4f).



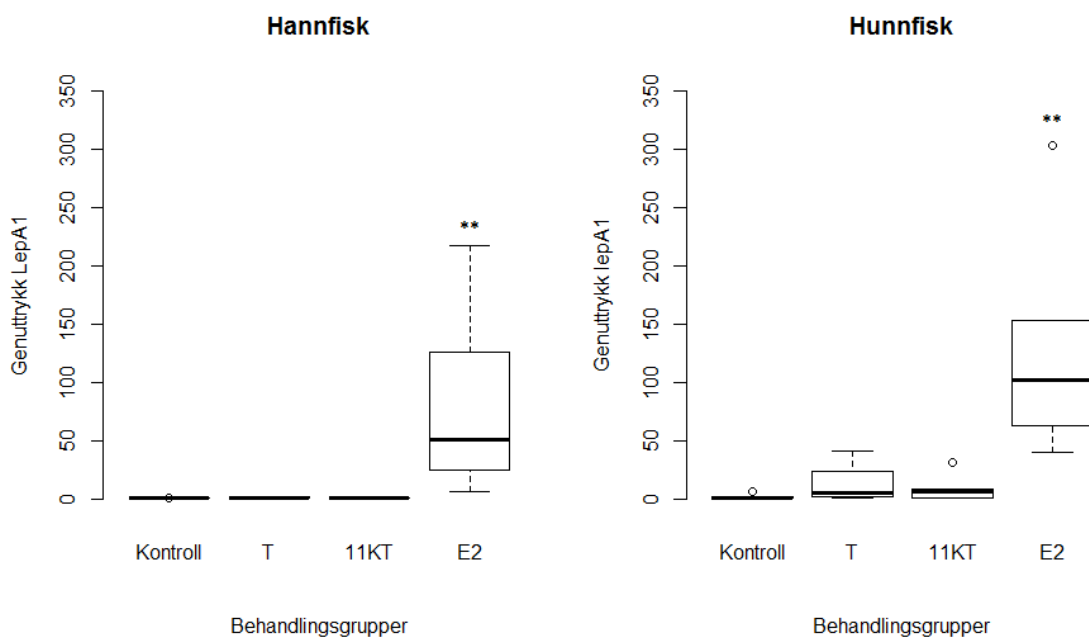
**Figur 4.** Endring i plasmakonsentrasjoner av steroider hos hann- og hunnrøye gitt intramuskulære injeksjoner av testosteron (T, a og b), 11-ketotestosteron (11KT, c og d) eller 17 $\beta$ -østradiol (E<sub>2</sub>, e og f). Kontrollfisk (injisert med kun propylenglycol) er angitt som "Kontroll" i figurene. Boxplot viser medianverdier, 50% persentiler, værhår for verdier < 1,5 IQR og sirkler for øvrige uteliggere. Medianverdiene er basert på henholdsvis 5 hann- og 5 hunnfisk i hver behandlingsgruppe, unntatt hunnfisk behandlet med T, hvor n = 4. Statistiske forskjeller i plasmakonsentrasjon mellom kontrollgruppen og behandlingsgruppene er vist med asterisker over klammetegn (\*; P<0,05, \*\*; P<0,01).

### 3.1.3 GENUTTRYKK I LEVER

#### *Leptin A1 mRNA*

Hannfisk i gruppen injisert med E<sub>2</sub> viste et signifikant høyere uttrykk av *LepA1* i lever etter injisering (51,1) sammenlignet med kontrollgruppen injisert med propylenglykol (0,6; P<0,01; Fig. 5). Det var stor variasjon i uttrykk hos hannfisk i E<sub>2</sub> gruppen, hvor laveste verdi var 6,2 og høyeste var 217,3. Lever *LepA1* uttrykkene hos hannfisk behandlet med T og 11KT var i likhet med kontrollgruppen lave, med medianverdier på henholdsvis 0,8 og 0,6.

Det ble også påvist et signifikant høyere uttrykk av *LepA1* hos hunnfisk injisert med E<sub>2</sub> (102,3) sammenlignet med hunnfisk i kontrollgruppen (P<0,01). Også hos hunnfisk implantert med E<sub>2</sub> var det stor variasjon i uttrykket av *LepA1*, med laveste verdi på 39,9 og høyeste på 302,9. Verdier for lever *LepA1* hos hunnfisk behandlet med T og 11KT var også lave; henholdsvis 5,5 og 6,8.



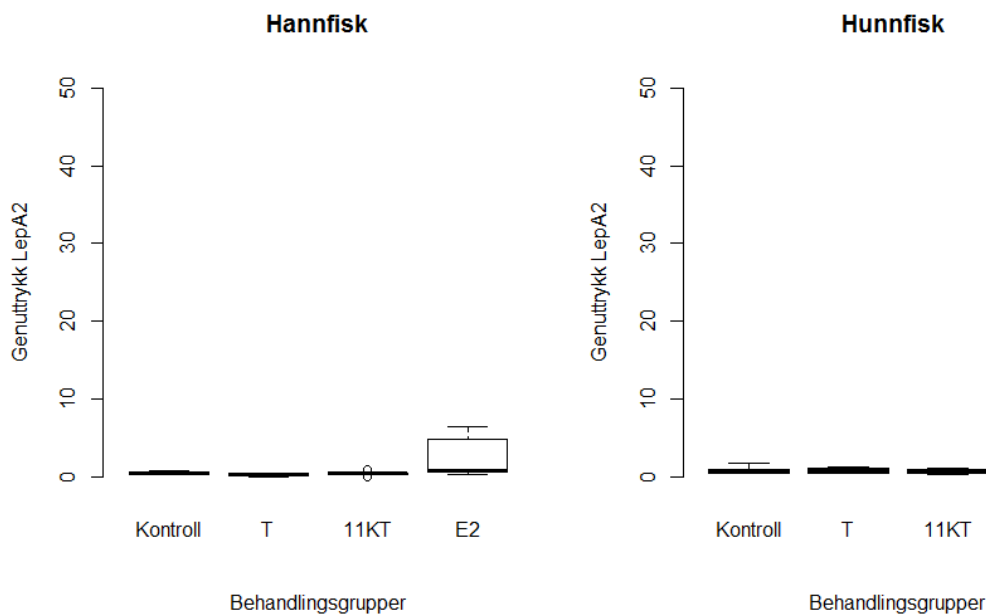
**Figur 5. Normalisert uttrykk av leptin A1 mRNA (*LepA1*) i lever hos hann- og hunnrøye gitt intramuskulære injeksjoner av henholdsvis propylenglykol (kontroll), testosteron (T), 11-ketotestosteron (11KT) eller 17β-østradiol (E2). Boxplot viser medianverdier, 50% persentiler, værhar for verdier < 1,5 IQR og sirkler for øvrige uteliggere. Medianverdiene er basert på henholdsvis 5 hann- og 5 hunnfisk i hver behandlingsgruppe, unntatt hunnfisk behandlet med T, hvor n = 4. Statistiske forskjeller i plasmakonsentrasjon mellom kontrollgruppen og behandlingsgruppene er vist med asterisker over klammetegn (\*\*; P<0,01).**



*Leptin A2 mRNA*

Det ble ikke påvist signifikante forskjeller i leveruttrykk av *LepA2* mellom behandlingsgrupper og kontrollgruppen (Fig. 6), og det var lave verdier i de fire gruppene (Kontroll: 0,4; T: 0,4; 11KT: 0,5; E<sub>2</sub>: 0,8). Det var større variasjon i uttrykk av *LepA2* i lever hos hannfisk i E<sub>2</sub>-gruppen (høyeste verdi på 6,5) enn i de andre behandlingsgruppene.

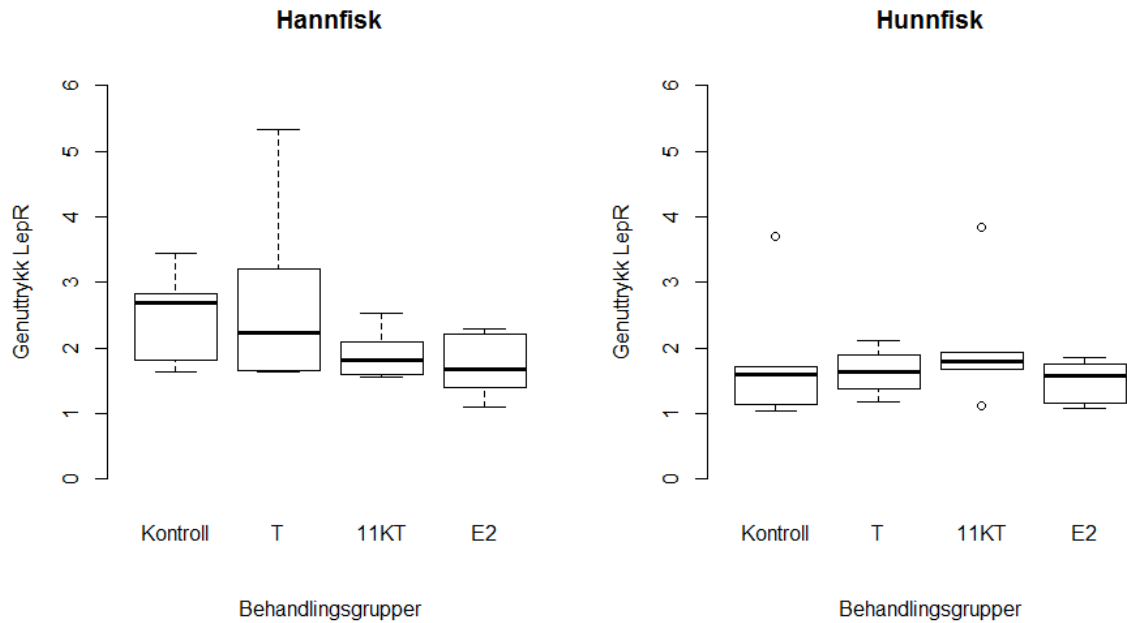
Hunnfisk behandlet med E<sub>2</sub> viste imidlertid et signifikant høyere uttrykk av *LepA2* i lever (5,6) enn kontrollgruppen (0,7; P<0,01). Også for hunnfisk i E<sub>2</sub> gruppne var det stor variasjon i leveruttrykk av *LepA2*, som varierte mellom 42,8. Genuttrykk av *LepA2* hos hunnfisk behandlet med T og 11KT var i liket med kontrollgruppen lave, med verdier på henholdsvis 0,8 og 0,7.



**Figur 6.** Normalisert uttrykk av leptin A2 mRNA (*LepA2*) i lever hos anadrom hann-og hunnrøye gitt intramuskulære injeksjoner av henholdsvis propylenglykol (kontroll), testosteron (T), 11-ketotestosteron (11KT) eller 17β-østradiol (E2). Boxplot viser medianverdier, 50% persentiler, værhår for verdier < 1,5 IQR og sirkler for øvrige uteliggere. Medianverdiene er basert på henholdsvis 5 hann- og 5 hunnfisk i hver behandlingsgruppe, unntatt hunnfisk behandlet med T, hvor n = 4. Statistiske forskjeller i plasmakonsentrasjon mellom kontrollgruppen og behandlingsgruppene er vist med asterisker over klammetegn (\*\*; P<0,01).

*Leptin reseptor mRNA*

Det ble ikke funnet signifikante forskjeller i genuttrykk av leptin reseptor i lever mellom behandlingsgruppene og kontrollgruppen for hverken hann- eller hunnfisk (Fig. 7).

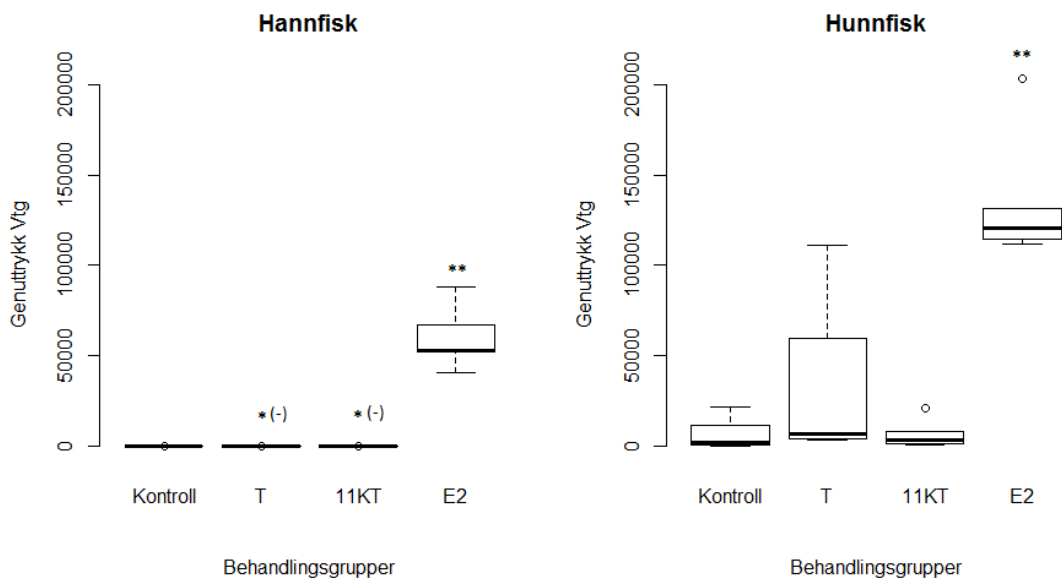


**Figur 7.** Normalisert uttrykk av leptin reseptor mRNA (*LepR*) i lever hos androm hann-og hunnrøye gitt intramuskulære injeksjoner av henholdsvis propylenglykol (kontroll), testosteron (T), 11-ketotestosteron (11KT) eller 17 $\beta$ -østradiol (E2). Boxplot viser medianverdier, 50% persentiler, værår for verdier < 1,5 IQR og sirkler for øvrige uteliggere. Medianverdiene er basert på henholdsvis 5 hann- og 5 hunnfisk i hver behandlingsgruppe, unntatt hunnfisk behandlet med T, hvor n = 4.

*Vitellogenin mRNA*

Det ble påvist et signifikant høyere genuttrykk av *Vtg* i lever hos hannfisk behandlet med E<sub>2</sub> (53066,2) enn hannfisk i kontrollgruppen (4,1; P<0,01; Fig. 8). Det var også forskjeller mellom kontrollgruppen og de andre behandlingsgruppene, hvor T-gruppen (0,1) og 11KT-gruppen (0,6) hadde et signifikant lavere uttrykk av vitellogenin enn kontrollgruppen (4,1; P<0,05).

Hunnfisk behandlet med E<sub>2</sub> (120550,9) hadde et signifikant høyere genuttrykk av *Vtg* enn hunnfisk i kontrollgruppen (1768; P<0,01). Stor variasjon i uttrykk ble observert i gruppen behandlet med T, med laveste verdi 3294, median 6459 og høyeste verdi 110850.



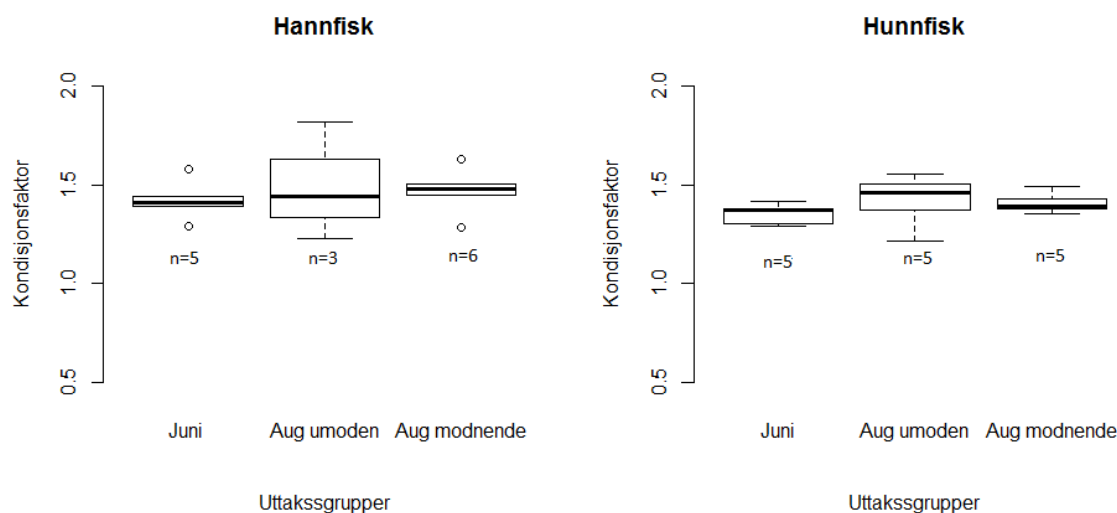
**Figur 8. Normalisert uttrykk av vitellogenin mRNA (*VTG*) i lever hos anadrom hann-og hunnrøye gitt intramuskulære injeksjoner av henholdsvis propylenglykol (kontroll), testosteron (T), 11-ketotestosteron (11KT) eller 17β-østradiol (E2). Boxplot viser medianverdier, 50% persentiler, værthår for verdier < 1,5 IQR og sirkler for øvrige uteliggere. Medianverdiene er basert på henholdsvis 5 hann- og 5 hunnfisk i hver behandlingsgruppe, unntatt hunnfisk behandlet med T, hvor n = 4. Statistiske forskjeller i plasmakonsentrasjon mellom kontrollgruppen og behandlingsgruppene er vist med asterisker over klammetegn (\*; P≤0,05, \*\*; P≤0,01). (-) indikerer nedregulert uttrykk sammenlignet med kontrollgruppen.**

## 3.2 FORSØK 2 – NATURLIG REPRODUKSJONSUTVIKLING

### 3.2.1 KONDISJONSFAKTOR

Det ble ikke påvist signifikante forskjeller i kondisjonsfaktor mellom de tre gruppene hos hann- eller hunnfisken (Fig. 9). Kondisjonsfaktoren for hannfisken ved de to uttakstidspunktene var høy, med verdier på 1,41 for uttaket i juni, 1,44 for hannfisk karakterisert som umodne i august, og 1,48 for hannfisk karakterisert som modnende i august. Vekt og lengde var høyest hos modnende hannfisk i august (henholdsvis 834 g og 40 cm), mens umodne hannfisk i august hadde en vekt på 729 g, og lengde på 37 cm. Tilsvarende verdier for hannfisk tatt ut i juni var 712 g og 37 cm.

Hunnfisk i juni hadde lavest kondisjonsfaktor (1,37), fulgt av modnende hunnfisk i august (1,39), mens umodne hunnfisk i august hadde høyest kondisjonsfaktor (1,46). Modnende hunnfisk i august hadde høyest vekt og lengde med medianverdier på 834 g og 39,5 cm, fulgt av hunnfisk tatt ut i juni med 718 g og 37 cm, mens lavest medianverdi for vekt og lengde hos umodne individer i august var 640 g og 36 cm.

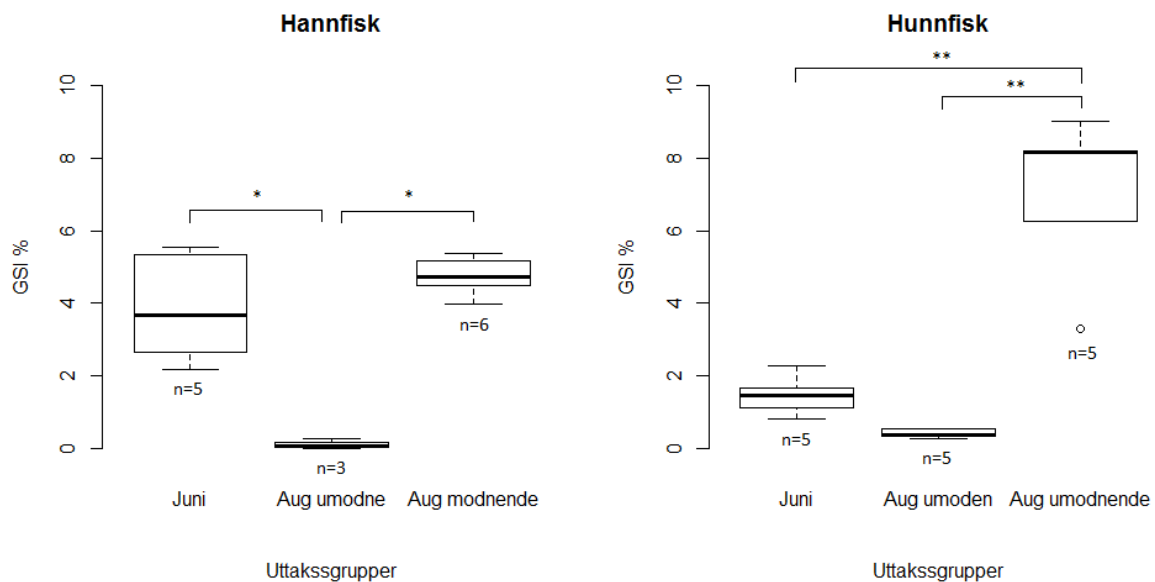


**Figur 9.** Forskjell i kondisjonsfaktor hos røye holdt under naturlig lysforhold, med uttak i juni og august. Boxplot viser medianverdier, 50% persentiler, værhår for verdier < 1,5 IQR og sirkler for øvrige uteliggere. (n) er antall individ i hver gruppe.

3.2.2 GONADOSOMATISK INDEKS

Det ble funnet signifikante forskjeller i GSI hos hannfisk i de tre gruppene. GSI hos hannfisk i juni og modnende hannfisk i august (henholdsvis 3,6% og 4,7%) var ikke signifikant forskjellig (Fig. 10), mens umoden hannfisk i august hadde signifikant lavere GSI enn de andre gruppene ( $P < 0,05$ ).

Det ble påvist signifikant høyere GSI for modnende hunnfisk i august (8,15 %) sammenlignet både med hunnfisk tatt ut i juni (1,44%) og umodne (0,35%) hunnfisk tatt ut i august ( $P < 0,01$ ).



**Figur 10.** Forskjell i gonadosomatisk indeks (GSI) hos hann- og hunnrøye holdt ved naturlig lysforhold, med uttak i juni og august. Boxplot viser medianverdier, 50% persentiler, værhaar for verdier  $< 1,5$  IQR og sirkler for øvrige uteliggere. (n) er antall individ i hver gruppe. Statistiske forskjeller i plasmakonsentrasjon mellom kontrollgruppen og behandlingsgruppene er gitt med asterisker (\*\*;  $P \leq 0,01$ ).

### 3.2.3 PLASMAKONSENTRASJONER KJØNNSHORMONER

Plasmanivåer av kjønnssteroider hos både hann- og hunnfisk i juni og august er vist i figur 11. Plasmanivå av T var signifikant høyere hos modnende hannfisk i august (46,3 ng/ml) sammenlignet med hannfisk i juni (9,9 ng/ml;  $P < 0,05$ ). Hannfisk i juni hadde også et signifikant høyere plasmanivå av T enn umodne hannfisk i august (medianverdi 2,75 ng/ml;  $P < 0,05$ ). Det kunne ikke påvises signifikante forskjeller i plasmanivå av T mellom umodne og modnende hanner (på grunn av det lavde antallet individer i hver gruppe; umodne  $n=3$ , modnende  $n=4$ ), selv om det var en åpenbar forskjell mellom gruppene.

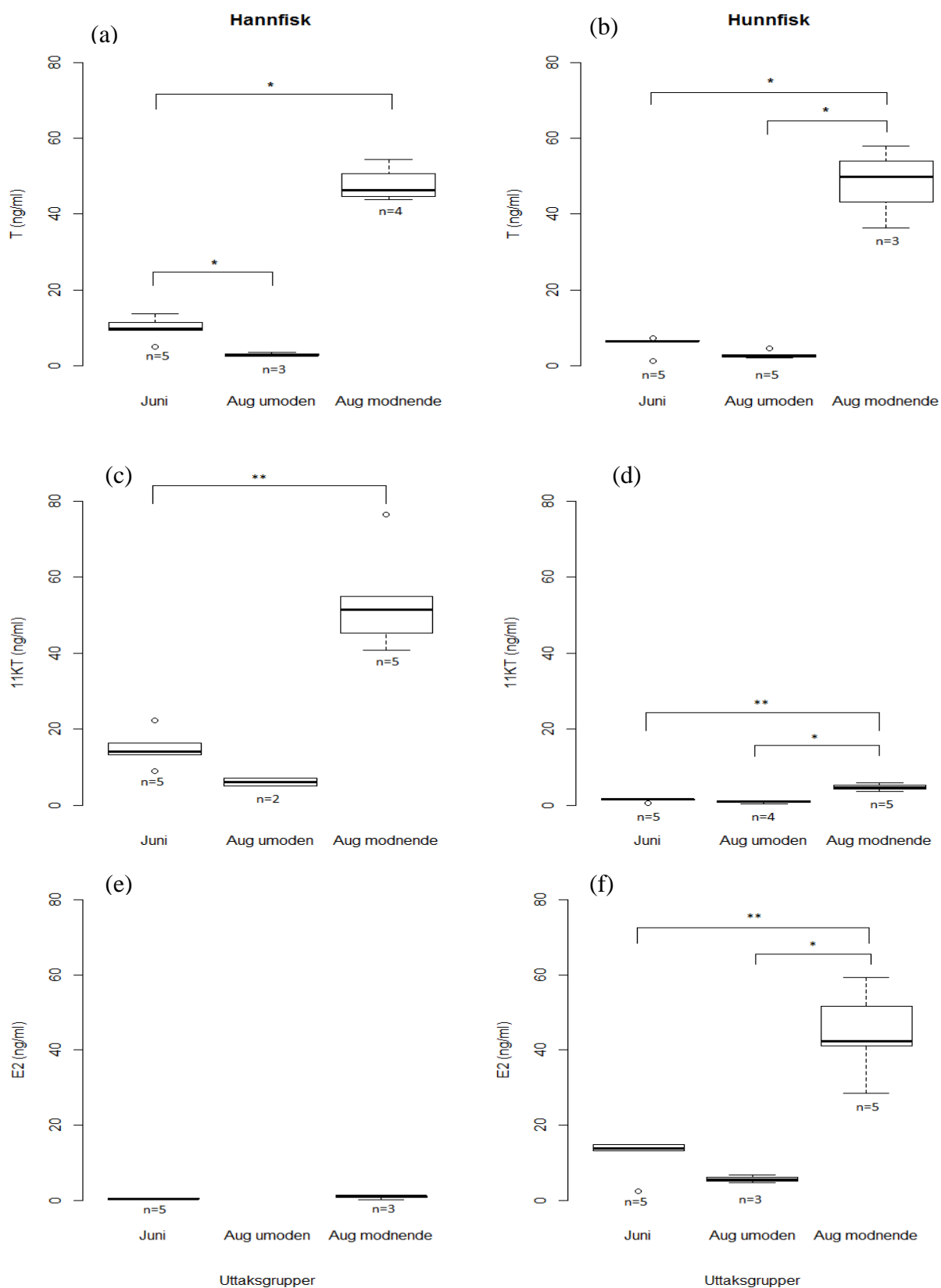
Blant hunnfisk ble det påvist et signifikant høyere plasmanivå av T hos modnende hunner i august (49,9 ng/ml) sammenlignet med både hunnfisk i juni (6,5 ng/ml) og umodne hunnfisk i august (2,8 ng/ml) i august ( $P < 0,05$ ; Fig. 11b).

Det ble påvist et signifikant høyere plasmanivå av 11KT hos modnende hannfisk (51,5 ng/ml) i august sammenlignet med hannfisk i juni (14,2 ng/ml;  $P < 0,01$ ; Fig. 11c). Hos umodne hannfisk i august var det bare to individer som hadde detekterbare nivå av 11KT (henholdsvis 7 og 5 ng/ml), mens tre fisk hadde nivå under deteksjonsgrensen (0,2 ng/ml). Lav  $n$  førte til at det ikke lot seg gjøre å kjøre statistikk med denne gruppen, som hadde et tydelig lavere plasmanivå enn fisk tatt ut i juni og modnende fisk i august.

Hos hunnfisk var det et signifikant høyere nivå av 11TK i plasma hos modnende i august (4,7 ng/ml) sammenlignet med hunnfisk i juni (1,5 ng/ml;  $P < 0,01$ ) og umodne hunnfisk i august (1 ng/ml).

Det ble ikke funnet signifikante forskjeller i plasmanivåer av  $E_2$  hos hannfisk. Modnende hunnfisk i august (42,4 ng/ml) viste signifikante høyere plasmanivåer av  $E_2$  sammenlignet med hunnfisk i juni (13,9 ng/ml;  $P < 0,01$ ) og umodne hunnfisk i august (5,6;  $P < 0,05$ ; Fig. 11f).

## RESULTATER



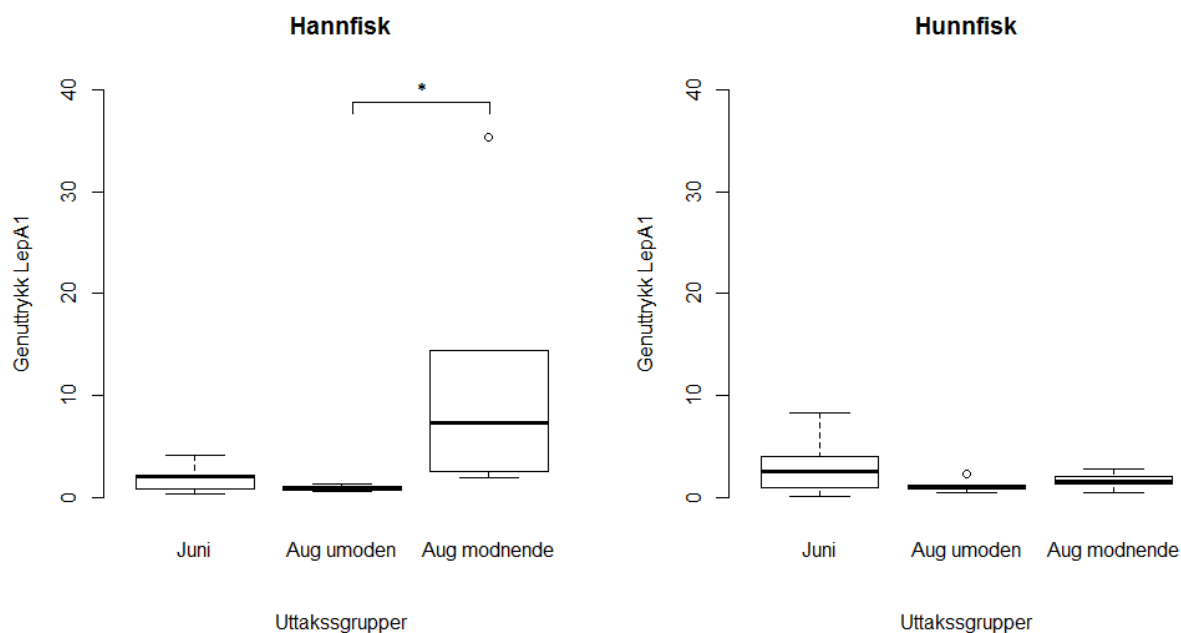
**Figur 11.** Plasmakonsentrasjon av (a,b) testosteron (T), (c,d) 11-ketotestosteron (11KT) og (e,f) 17 $\beta$ - $\text{E}_2$  hos hann- og hunnrøye holdt ved naturlig lysforhold og 5°C, med uttak i juni og august. Boxplot viser medianverdier, 50% persentiler, værhår for verdier < 1,5 IQR og sirkler for øvrige uteliggere. (n) er antall individ i hver gruppe. Statistiske forskjeller i plasmakonsentrasjon mellom gruppene er gitt med asterisker over klammetegn (\*;  $P \leq 0,05$ , \*\*;  $P \leq 0,01$ ).

3.2.4 GENUTTRYKK I LEVER

*Leptin A1 mRNA*

Det ble påvist et signifikant høyere uttrykk av *LepA1* i lever (Fig. 12) hos modnende hannfisk i august (7,32) sammenlignet med umodne hannfisk i august (0,8;  $P < 0,05$ ), men ikke mellom hannfisk tatt ut i juni og de to gruppene tatt ut i august. Modnende hannfisk i august viste stor individuell variasjon i uttrykket av *LepA1* i lever, med verdier fra 2,5 til 35,4.

Hunnfisk viste små forskjeller i genuttrykk av *LepA1* i lever, med medianverdier i juni på 2,5 og 0,9 og 1,5 hos henholdsvis og umodne modnende fisk i august.



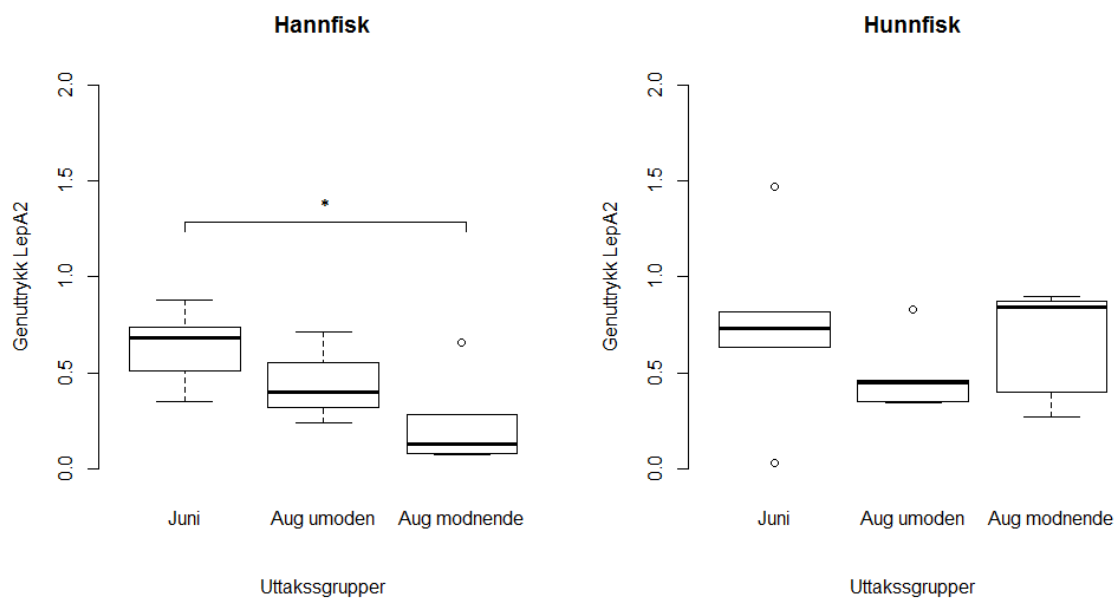
**Figur 12. Normalisert uttrykk av leptin A1 mRNA (*LepA1*) i lever hos hann-og hunnrøye holdt ved naturlig lysforhold, med uttak i juni og august. Boxplot viser medianverdier, 50% persentiler, værhar for verdier < 1,5 IQR og sirkler for øvrige uteliggere. (n) er antall individ i hver gruppe. Statistiske forskjeller i plasmakonsentrasjon mellom kontrollgruppen og behandlingsgruppene er gitt med asterisker over klammetegn (\*;  $P \leq 0,05$ ).**



*Leptin A2 mRNA*

Det ble påvist et signifikant høyere uttrykk av *LepA2* i lever hos hannfisk i juni (0,7) sammenlignet med modnende hanner i august (0,1;  $P < 0,05$ ), men ikke mellom umodne og modne hanner i august (Fig. 12).

Det ble ikke funnet forskjeller i genuttrykk for *LepA2* i lever hos hunnfisk mellom noen av gruppene. Medianverdier for hunnfisk i de tre gruppene var 0,7 i juni, 0,5 hos umodne i august og 0,8 hos modnende hunnfisk i august.

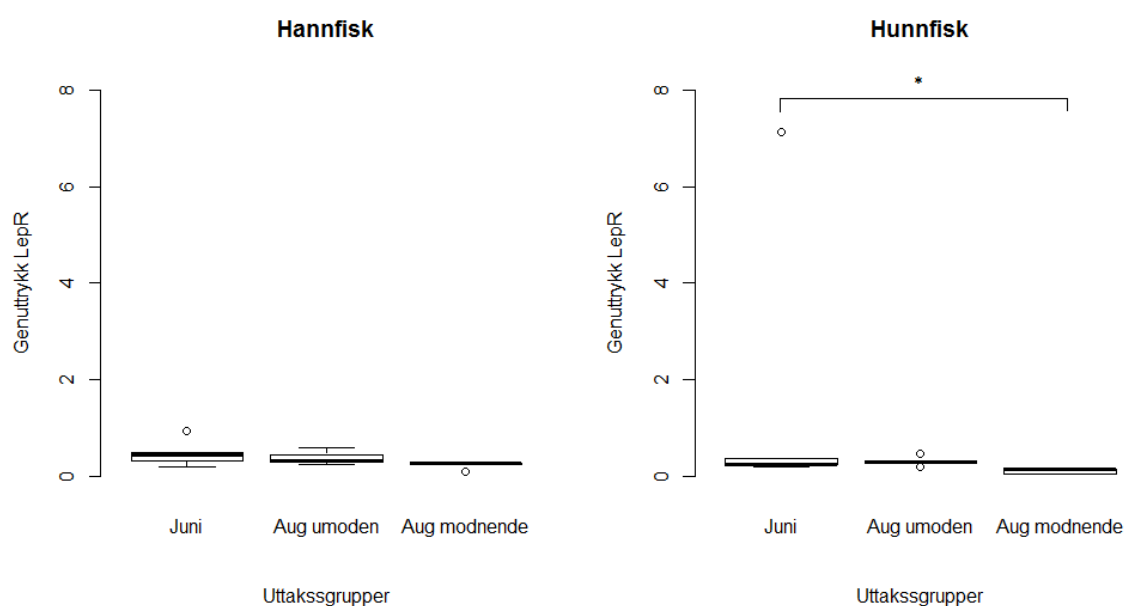


**Figur 13.** Normalisert uttrykk av leptin A2 mRNA (*LepA2*) i lever hos hann-og hunnrøye holdt ved naturlig lysforhold, med uttak i juni og august. Boxplot viser medianverdier, 50% persentiler, værhår for verdier  $< 1,5$  IQR og sirkler for øvrige uteliggere. (n) er antall individ i hver gruppe. Statistiske forskjeller i plasmakonsentrasjon mellom kontrollgruppen og behandlingsgruppene er gitt med asterisker over klammetegn (\*;  $P \leq 0,05$ ).

*Leptin reseptor mRNA*

Hannfisk viste ingen signifikante forskjeller i genuttrykk av *LepR* i lever mellom de tre gruppene (Fig. 14).

Det ble påvist et signifikant høyere genuttrykk av *LepR* i lever hos hunnfisk i juni (0,3) sammenlignet med modnende hunnfisk i august (0,1;  $P < 0,05$ ; også uten uteligger i juni;  $P < 0,05$ ), mens den umodne hunnfisken tatt ut i august hadde en intermediær verdi som ikke var forskjellig fra de to andre gruppene.

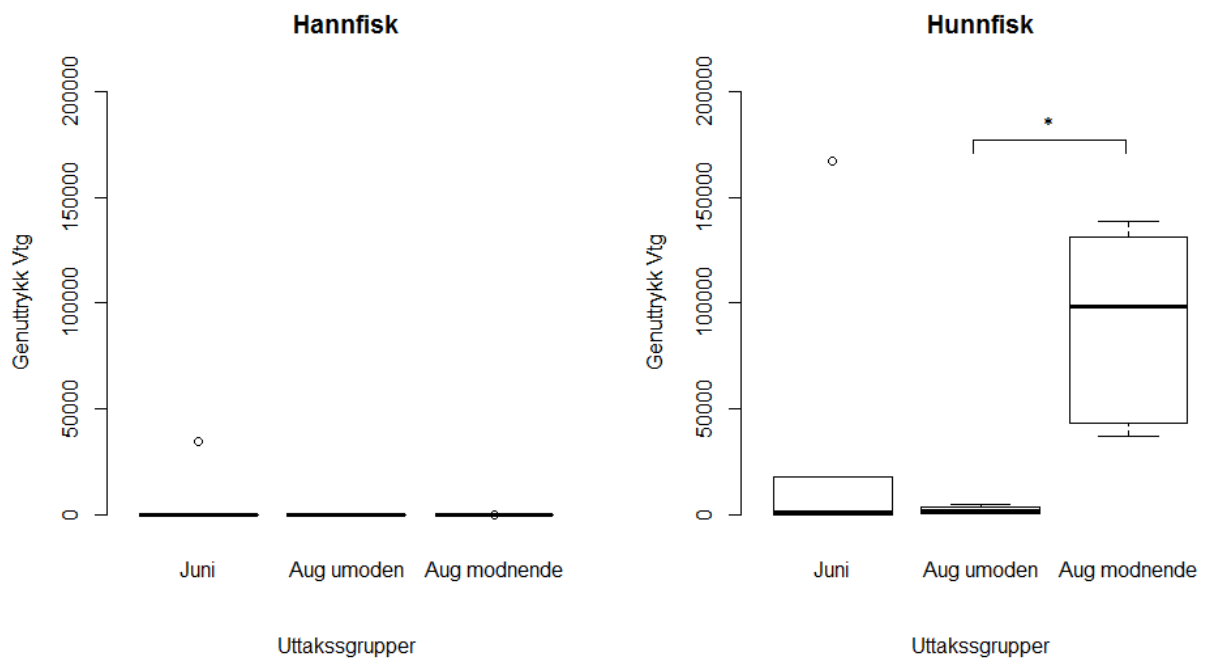


**Figur 14.** Normalisert uttrykk av leptin reseptor mRNA (*LepR*) i lever hos hann-og hunnrøye holdt ved naturlig lysforhold, med uttak i juni og august. Boxplot viser medianverdier, 50% persentiler, værhår for verdier <1,5 IQR og sirkler for øvrige uteliggere. (n) er antall individ i hver gruppe. Statistiske forskjeller i plasmakonsentrasjon mellom kontrollgruppen og behandlingsgruppene er gitt med asterisker (\*;  $P \leq 0,05$ ).

*Vitellogenin mRNA*

Genuttrykk av *Vtg* i lever var lavt hos alle hannfisk, med medianverdier på 0,1 for fisk tatt ut i juni og umodne fisk i august, og 3,3 for modnende hannfisk i august (Fig. 15).

Det ble påvist et signifikant høyere uttrykk av *Vtg* hos modnende hunnfisk i august (98371) sammenlignet med umodne hunnfisk i august (1636,2;  $P < 0,001$ ). Det var en stor variasjon i uttrykk hos de modnende hunnfiskene med verdier fra 36702 til 138529. Hunnfisk i juni viste også variasjon i uttrykk av *Vtg*, med en medianverdi på 1217, og verdier fra 2,14 til 167505.



**Figur 15.** Normalisert uttrykk av vitellogenin mRNA (*Vtg*) i lever hos hann-og hunnrøye holdt ved naturlig lysforhold, med uttak i juni og august. Boxplot viser medianverdier, 50% persentiler, værhaar for verdier < 1,5 IQR og sirkler for øvrige uteliggere. (n) er antall individ i hver gruppe. Statistiske forskjeller i plasmakonsentrasjon mellom kontrollgruppen og behandlingsgruppene er gitt med asterisker over klammetegn (\*\*;  $P \leq 0,01$ ).

## 4. DISKUSJON

Tidligere undersøkelser med røye har vist at uttrykket av leptin i lever er lavt om vinteren og våren, etterfulgt av en økning i uttrykk sommer og høst (Frøiland *et al.*, 2010). Dette ble satt i sammenheng med endringer i fettstatus, fra lave verdier gjennom vinter og vår etterfulgt av en økning i mengde fettvev utover sommeren. Tross reduksjoner i fettvev om høsten forble imidlertid leptinuttrykket høyt, og det ble antatt at dette skyldtes at alle fisk i forsøket kjønnsmodnet (Frøiland *et al.*, 2010). Denne konklusjonen ble styrket da det i et senere forsøk med røye ikke ble funnet et økt uttrykk av leptin hos ikke-modnende fisk (Frøiland *et al.*, 2012).

Studier av leptins rolle under kjønnsmodning har ført til antakelser om en mulig direkte rolle av kjønnssteroider på produksjonen av leptin hos teleoster (Nagasaka *et al.*, 2006, Trombley og Schmitz, 2013, Choi *et al.*, 2014).

Hensikten med dette prosjektet var å se på eventuelle effekter av kjønnssteroider på det genetiske uttrykkene av to paraloger av leptin (*LepA1* og *LepA2*), *LepR* og *Vtg* i lever hos begge kjønn av røya. Det ble gjennomført to forsøk i denne sammenheng; et injeksjonsforsøk med *in vivo* implantering av kjønnssteroidene T, 11KT og E<sub>2</sub> utenfor reproduksjonssesongen når den naturlige produksjonen av kjønnssteroider er lav (vinterstid), samt et forsøk med røye som gjennomgår naturlige endringer i plasmanivå av kjønnssteroider knyttet til reproduksjonsutviklingen (sommer og høst). Så langt jeg kjenner til er dette første gang det er gjort undersøkelser på direkte effekter (*in vivo* stimulering) av kjønnssteroider på genetisk uttrykk av leptin og en leptinreseptor i lever hos beinfisk.

### 4.1 INJEKSJON AV KJØNNSSTEROIDER

Før implanteringsforsøket ble satt i gang ble det gjennomført et innledende pilotforsøk for å finne hvilke doser som skulle benyttes for å oppnå fysiologiske plasmanivå av steroider (Mayer *et al.*, 1992, Frantzen *et al.*, 1997, Tveiten *et al.*, 1998), samt hvor lenge behandlingen skulle pågå for å oppnå klare genuttrykk av de faktorer som skulle undersøkes. Basert på resultatene fra pilotforsøket (Fig. 3-5, s 48-49 i vedlegg) ble det besluttet å bruke en dose på 1

mg/kg kroppsvekt for alle steroider og en behandlingstid på 14 dager med reimplantering av steroider en uke etter oppstart.

Det ble påvist signifikante effekter av  $E_2$  på genuttrykkene av både *LepA1* (Fig. 5) og *LepA2* (Fig. 6) hos begge kjønn, med unntak av hannkjønn der det ble målt et ikke-signifikant men forhøyet nivå av *LepA2*. For de andre steroidene (T og 11KT) var det ingen målbar effekt på uttrykkene av de to leptin-paralogene hos noen av kjønnene. Det ble ikke funnet noen behandlingseffekter på uttrykket av *LepR* hos verken hann- eller hunnfisk (Fig. 7), noe som indikerer at en eventuell parakrin rolle av leptin i lever ikke er assosiert med endringer i *LepR*.

Etter min kjennskap er det ikke utført forsøk med direkte fokus på uttrykk av *LepR* i lever i sammenheng med reproduksjonsutviklingen hos beinfisk. Hos pattedyr er det imidlertid funnet *LepR* i celler i hele HPG-aksen (Moschos *et al.*, 2002), og arbeid med juvenil atlantisk laks har avdekket et høyt uttrykk av *LepR* i gonader hos umodne hannfisk. At Trombley og Schmitz (2013) fant at leveruttrykk av *LepA1* økte hos modnende hannparr av atlantisk laks, uten at plasmanivået av leptin økte hos de samme individene, støtter antagelsen om en parakrin rolle av leptin i lever i forbindelse med kjønnsmodning hos beinfisk.

$E_2$  gav en klar effekt på genuttrykk av *Vtg* hos hann- og hunnfisk (figur 8). Behandling med T på hunnfisk gav en svak, men ikke signifikant effekt, mens behandling med T og 11KT på hannfisk førte til en tydelig nedregulering av *Vtg* i lever. Det er tidligere vist at hannfisk og umodne hunner har evnen til å produsere *Vtg* gjennom administrering av  $E_2$  (Patiño og Sullivan, 2002). Dette er også vist hos hannrøya etter intraperitoneal behandling med  $E_2$  (Johnsen *et al.*, 1999), noe som viser at hannfisk har  $E_2$ -reseptorer men ingen evne til å produsere endogent  $E_2$ .

Dette forsøket har vist hvordan administrasjon av kjønnssteroidet  $E_2$  stimulerer til økt genuttrykk av leptin og vitellogenin i lever hos røye. Denne effekten kan sees i sammenheng med tidligere studier med den semelpare laksefisken ayu (*Plecoglossus altivelis*), hvor plasmanivå av leptin ble funnet å korrelere med plasmanivå av  $E_2$  under og etter kjønnsmodning (Nagasaka *et al.*, 2006). Dette tyder på at  $E_2$  kan stimulere både uttrykket av leptin i lever og frigjøring av leptin i plasma hos beinfisk, og at leptin inngår i regulering av reproduksjonsutviklingen hos beinfisk. Denne rollen kan også være delvis knyttet til produksjon av vitellogenin i lever, eventuelt ved at leptin stimulerer til økt mobilisering av fett og glukose, som vist i forbindelse med langvarig sult hos røye (Frøiland *et al.*, 2012).

Observasjonen av et høyere uttrykk av *LepA1* hos modnende hannparr under spermatogenesis ble antatt som en mulig effekt av kjønnssteroider, med henvisning til Nagasaka *et al.* (2006) og deres observasjon av  $E_2$  som stimulant av plasmaleptin (Trombley og Schmitz, 2013). Administrering med androgener gav imidlertid ingen endring i leptinproduksjonen i lever hos røya under dette forsøket. Dette kan skyldes forsøkets korte varighet sammenlignet med en den naturlige modningsprosessen, og en kan anta at en lengre behandlingstid kunne resultert i et oppregulert uttrykk. Dette støttes av Trombley *et al.* (2014) sin funn av en økning i genuttrykket av både *LepA1* og *LepA2* i lever hos modnende hannparr av atlantisk laks fra midt-spermatogenesisen, med registrerte toppnivåer under sluttmodning. Studier har i midlertid også påvist en inhiberende effekt av T på leptinproduksjon, hvor Mustonen *et al.* (2002) fant et inverst forhold mellom plasmakonsentrasjonene av T og leptin hos lake. Dette inverse forholdet er også observert hos menn, hvor testosteronbehandling har redusert forhøyede plasmanivåer av leptin hos hypogonadale menn (Behre *et al.*, 1997, Jockenhövel *et al.*, 1997). Det er derfor uklart hvorvidt androgener *per se* har en direkte effekt på leptin i lever hos beinfisk, og hvorvidt det er artsspesifikke forskjeller i leptins rolle i kjønnsmodning hos hannfisk.

Forhøyede nivåer av T om våren hos modnende laksefisk er antatt å ha en anabolsk virkning ved å stimulere til høyere appetitt og raskere vekst i en tidlig fase av reproduksjonsutviklingen (Tveiten *et al.*, 1998). En slik effekt ble imidlertid ikke påvist i dette forsøket, ettersom endringene i kondisjon var lik i alle grupper inkludert kontrollgruppen (Fig. 3). Dette kan skyldes det korte tidsrommet forsøket ble utført på, sammenlignet med andre undersøkelser der den anabolske effekten er observert over en periode på tre måneder om våren (Tveiten *et al.*, 1998). Økningen i kondisjon (vekt) som ble observert i alle grupper i dette forsøket er mest sannsynlig en følge av den naturlige overgangen fra frivillig anoreksi og negativ energibalanse til økt appetitt og vekst om åren/sommeren (Tveiten *et al.*, 1998). Hva som trigger denne overgangen er imidlertid ikke kjent.

## 4.2 NATURLIG REPRODUKSJONSUTVIKLING

Modnende hannfisk i august viste et klart høyere uttrykk av *LepA1* i lever sammenlignet med hannfisk i de andre modningsgruppene (Fig. 12). Dette samsvarer med de funn som ble gjort på modnende hannparr (Trombley og Schmitz, 2013), og oppreguleringen av *LepA1* og *LepA2* hos modnende hannparr under senere stadier av spermatogenesisen og endelig modning (Trombley *et al.*, 2014), som antyder en rolle for leptin under modningsprosessen hos

beinfisk. Mangel på forskjeller i kondisjonsfaktor (Fig. 9) hos de ulike modningsgruppene er også med å støtte antakelsen leptins hovedvirkning ikke er på energimetabolismen, men heller spiller en rolle under modningsprosessen.

Genuttrykk av *LepA2* i lever ble observert høyere hos hannfisk i juni sammenlignet med de andre modningsgruppene (Fig. 13), og står i kontrast oppreguleringen av hepatisk *LepA2* uttrykk funnet av Trombley *et al.* (2014) under midt-spermatogenesisen og endelig modning. Det er dermed vanskelig å kunne si noe om hvilke mekanismer som har gitt denne økningen i dette forsøket.

Det ble også funnet et høyere genuttrykk av *LepR* i lever hos hunnfisk i juni sammenlignet med modnende hunner i august (Fig. 14). Det synes å være en synkende trend i hepatisk *LepR* uttrykk om en sammenligner fisken som ble brukt i forsøk i mars med de som ble samlet i juni og august (Fig. 7 og 14). Dette samsvarer med tidligere resultater på røye, som viser at uttrykk av *LepA1* i lever synker i løpet av perioden på våren etter hvert som den spiser seg opp og energistatus øker (Jørgensen *et al.*, 2013), og at leptins mulige rolle som metabolsk regulator synker i denne perioden.

Genuttrykket av vitellogenin var klart forhøyet hos modnende hunnfisk i august, sammenlignet med de andre gruppene. Dette er i tråd med at et høyt nivå av  $E_2$  sammenfaller med den mest intensive perioden av vitellogenese, hvor gonadeveksten (oocyttevekst)(Frantzen *et al.*, 1997) og plasmanivået av Vtg (Johnsen *et al.*, 1999) er på sitt høyeste.

Behandling med  $E_2$  på hunnfisk i forsøk 1 førte til et oppregulert uttrykk av *LepA1* og *LepA2*. Dette indikerer, i tråd med det som tidligere er antatt av Nagasaka *et al.* (2006), at  $E_2$ , direkte eller indirekte, stimulerer produksjonen av leptin i lever. En slik sammenheng mellom  $E_2$  og uttrykket av leptin i lever kunne imidlertid ikke påvises i forsøk 2, til tross for tilsvarende plasmakonsentrasjoner av  $E_2$  hos de naturlige modnende hunnfiskene i august som etter injeksjon av  $E_2$  i forsøk 1. En mulig forklaring på dette kan være at den stimulatoriske effekten av  $E_2$  på leptin observert i forsøk 1 hos hunnfisk er en kortvarig effekt, medførende at denne effekten ikke ble målt i forsøk 2, og kan forklare det oppregulerte, men ikke signifikante uttrykket hos hunnfiskene i juni, dog tidspunktet hvor uttrykket av *LepA1* nådde toppnivå er ikke mulig å si. Samplingstidspunktet i juni sammenfaller med initieringen av den intensive fasen av vitellogenese, er det mulig å anta sammenheng mellom økte nivåer av  $E_2$  i plasma, uttrykk av *LepA1* i lever og start av intensiv vitellogenese. Det må imidlertid tas hensyn til at det økte uttrykket ikke var signifikant og det er derfor ikke mulig å trekke konklusjoner i denne retning.

Den hemmende effekten av T på leptin beskrevet av (Mustonen *et al.*, 2002) er i kontrast til funn i dette forsøket, ettersom hannfisk i dette forsøket hadde en høy plasmakonsentrasjon av T samtidig med et oppregulert mRNA uttrykk av *LepA1* i lever, og settes i sammenheng med det økte uttrykket under spermatogenesis hos laks (Trombley og Schmitz, 2013). Som beskrevet samsvarer økningen av uttrykket av *LepA1* i lever i dette forsøket med tidligere funn hos røye av Frøiland *et al.* (2010). Selv om det ikke ble skilt mellom paraloger i studiet av Frøiland *et al.* (2010), er det mulig å anta at det var mRNA uttrykk *LepA1* som ble identifisert i lever. Dette baseres på funn av et nedregulert *LepA2* uttrykk i modnende hannfisk i dette forsøket. Det er ennå lite som er kjent om hvorvidt de to leptinparalogene i fisk har spesifikke roller i fisk, men *LepA2* er svakt uttrykt i lever og desto sterkere uttrykt i mage/-tarmsystemet hos atlantisk laks (Rønnestad *et al.*, 2010), noe som antyder en viktigere rolle for *LepA2* knyttet til fordøyelsen enn i levermetabolismen.

Forsøket har påvist en sammenheng mellom kjønnsmodning og leptin i fisk, men det har ikke fått frem hvilken rolle leptin produsert i lever har under reproduksjonsutviklingen. Det er imidlertid klart at modnende laksefisk, med redusert appetitt, er i en katabolsk situasjon. En kraftig økning i uttrykk av *LepA1* i lever er tidligere sett hos røye som har vært utsatt for langvarig sult om våre/sommeren, og som er satt i sammenheng med mobilisering og økonomisering av endogene substrat- og energiresurser (Frøiland *et al.*, 2012, Jørgensen *et al.*, 2013). Modningsprosessen er imidlertid utstrakt i tid, og preget av ulike faser med varierende nivåer av kjønns hormoner, vitellogenese og gonadeutvikling og som sådan, en kompleks prosess å studere. Modningsprosessen spenner også over et tidsrom som innebærer store temporære endringer i appetitt og energistatus hos røye, og det er naturlig å tenke at leptin responderer på, og er involvert i reguleringen av begge disse prosessene. Både dette forsøket, og andre publiserte arbeid, gir sterk indikasjon på at leptin er involvert i kjønnsmodning hos fisk, og røye vil representere en svært attraktiv modellart for videre studier av leptins rolle i forbindelse med regulering av kjønnsmodning og intermediermetabolisme.



## 5. KONKLUSJON

Det ble i dette prosjektet gjennomført to ulike forsøk for å belyse mulige sammenhenger mellom kjønnssteroider og genetisk uttrykk av leptin (*LepA1* og *LepA2*), leptinreseptor (*LepR*) og vitellogenin (*Vtg*) i lever hos røye. Forsøkene viste imidlertid samlet sett en del variasjoner og var ikke entydige. Mens det på den ene side er funnet en klar stimulatorisk effekt av E<sub>2</sub>, men ikke T eller 11KT, på uttrykkene av både *LepA1* og *LepA2*, men ikke *LepR*, i lever hos begge kjønn av røye gitt kjønnssteroider på kunstig vis utenom reproduksjonssesongen, ble det ikke funnet noen klar sammenheng mellom E<sub>2</sub> og uttrykkene av de samme leptin-paraloger hos naturlig modnende hunnfisk med forhøyede nivå av E<sub>2</sub>. Videre ble det registrert en signifikant økning i uttrykket av *LepA1* og en signifikant reduksjon i uttrykket av *LepA2* hos naturlig modnende hannfisk, men ikke hos hannfisk stimulert på kunstig vis med androgener.

For å få en bedre forståelse av mulige samspill mellom kjønnssteroider og leptin knyttet til reproduksjonsutviklingen hos røye, vil det derfor være interessant i fremtidig forskning å se på det genetiske uttrykk av *Lepa1*, *Lepa2* og *LepR* i gonader, samt måling av leptin og kjønnssteroider i plasma. En lengre forsøksperiode med hyppigere samplingsfrekvens vil også kunne være med å gi et tydeligere bilde av leptins rolle innenfor reproduksjon hos røye.

## 6. LITTERATURLISTE

- Adams, C. & Huntingford, F. 1997. Growth, maturation and reproductive investment in Arctic charr. *Journal of Fish Biology*, 51(4), 750-759.
- Andersen, Ø. (red.). 1992. *Reproduksjon og livssyklus*. Serie: Fiskens fysiologi. Døving, K. & Reimers, E. (red.). Stavanger: John Grieg Forlag AS.
- Behre, H. M., Simoni, M. & Nieschlag, E. 1997. Strong association between serum levels of leptin and testosterone in men. *Clinical Endocrinology*, 47(2), 237-240.
- Borg, B. 1994. Androgens in teleost fishes. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology*, 109(3), 219-245.
- Brooks, S., Tyler, C. R. & Sumpter, J. P. 1997. Egg quality in fish: what makes a good egg? *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 7(4), 387-416.
- Caldwell, L. K., Pierce, A. L. & Nagler, J. J. 2013. Metabolic endocrine factors involved in spawning recovery and rematuration of iteroparous female rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *General and Comparative Endocrinology*, 194, 124-132.
- Casabiell, X., Piñeiro, V., Vega, F., Luis, F., Diéguez, C. & Casanueva, F. F. 2001. Leptin, reproduction and sex steroids. *Pituitary*, 4(1-2), 93-99.
- Choi, Y. J., Kim, N. N., Shin, H. S. & Choi, C. Y. 2014. The Expression of Leptin, Estrogen Receptors, and Vitellogenin mRNAs in Migrating Female Chum Salmon, *Oncorhynchus keta*: The Effects of Hypo-osmotic Environmental Changes. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences (AJAS)*, 27(4), 479-487. doi: <http://10.5713/ajas.2013.13592>.
- Copeland, D. L., Duff, R. J., Liu, Q., Prokop, J. & Londraville, R. L. 2011. Leptin in teleost fishes: an argument for comparative study. *Frontiers in Physiology*, 2.
- Damsgård, B., Arnesen, A. M. & Jobling, M. 1999. Seasonal patterns of feed intake and growth of Hammerfest and Svalbard Arctic charr maturing at different ages. *Aquaculture*, 171(1), 149-160.
- Duston, J. & Saunders, R. 1999. Effect of winter food deprivation on growth and sexual maturity of Atlantic salmon (*Salmo salar*) in seawater. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 56(2), 201-207.
- Frantzen, M. 1995. Histologisk utvikling av ovarier og plasmakonsentrasjoner av estradiol17B, testosteron og 17 $\alpha$ ,20B-dihydroxy-4-Pregnen-3-one hos hunnkjønn av røye (*Salvelinus alpinus*). *Masteroppgave*. Seksjon for ressursbiologi, Norges Fiskerihøgskole, Universitetet i Tromsø.
- Frantzen, M. 2003. Control of reproduction in salmonids - experimental studies on Arctic charr. *Philosophae Doctor thesis*. Aquatic Bioscience, Norwegian College og Fishery Science, University of Tromsø.
- Frantzen, M., Arnesen, A. M., Damsgård, B., Tveiten, H. & Johnsen, H. K. 2004a. Effects of photoperiod on sex steroids and gonad maturation in Arctic charr. *Aquaculture*, 240(1), 561-574.
- Frantzen, M., Damsgård, B., Tveiten, H., Moriyama, S., Iwata, M. & Johnsen, H. 2004b. 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(6), 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(4), 697-709.
- Friedman, J. M. 2009. Leptin at 14 y of age: An ongoing story. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 89(3), 973S-979S.

## LITTERATURLISTE

---

- 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(2), 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(1), 136-143.
- Gillet, C. 1994. Egg production in Arctic charr (*Salvelinus alpinus* L.) broodstock: effects of photoperiod on the timing of ovulation and egg quality. *Canadian Journal of Zoology*, 72(2), 334-338.
- Jobling, M., Tveiten, H. & Hatlen, B. 1998. REVIEW Cultivation of Arctic charr: an update. *Aquaculture International*, 6(3), 181-196.
- Jockenhövel, F., Blum, W. F., Vogel, E., Englaro, P., Müller-Wieland, D., Reinwein, D., Rascher, W. & Krone, W. 1997. Testosterone substitution normalizes elevated serum leptin levels in hypogonadal men. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 82(8), 2510-2513.
- Johnsen, H. K., Tveiten, H., Willassen, N. P. & Arnesen, A. M. 1999. Arctic charr (*Salvelinus alpinus*) vitellogenin: development and validation of an enzyme-linked immunosorbent assay. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 124(3), 355-362.
- Johnson, L. 1980. The arctic charr, *Salvelinus alpinus*. *Charrs, Salmonid Fishes of the Genus Salvelinus*, 15-98.
- Jørgensen, E., Burkow, I., Foshaug, H., Killie, B. & Ingebrigtsen, K. 1997a. Influence of lipid status on tissue distribution of the persistent organic pollutant octachlorostyrene in Arctic charr (*Salvelinus alpinus*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology*, 118(3), 311-318.
- Jørgensen, E., Johansen, S. & Jobling, M. 1997b. Seasonal patterns of growth, lipid deposition and lipid depletion in anadromous Arctic charr. *Journal of Fish Biology*, 51(2), 312-326.
- Jørgensen, E. H. & Johnsen, H. K. 2014. Rhythmic life of the Arctic charr: Adaptations to life at the edge. *Marine Genomics*. In Press. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.margen.2013.10.005>.
- Jørgensen, E. H., Martinsen, M., Strøm, V., Hansen, K. E. R., Ravuri, C. S., Gong, N. & Jobling, M. 2013. Long-term fasting in the anadromous Arctic charr is associated with downregulation of metabolic enzyme activity and upregulation of leptin A1 and SOCS expression in the liver. *The Journal of Experimental Biology*, 216(17), 3222-3230.
- 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), 1-59.
- Kling, P., Jönsson, E., Nilsen, T. O., Einarsdottir, I. E., Rønnestad, 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(1), 153-162.
- Kurokawa, T., Uji, S. & Suzuki, T. 2005. Identification of cDNA coding for a homologue to mammalian leptin from pufferfish, *Takifugu rubripes*. *Peptides*, 26(5), 745-750.
- Lifetechnologies. 2012. *Real-time PCR handbook*. 2. utg. Life Technologies Corporation.
- 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 $\alpha$ -

## LITTERATURLISTE

---

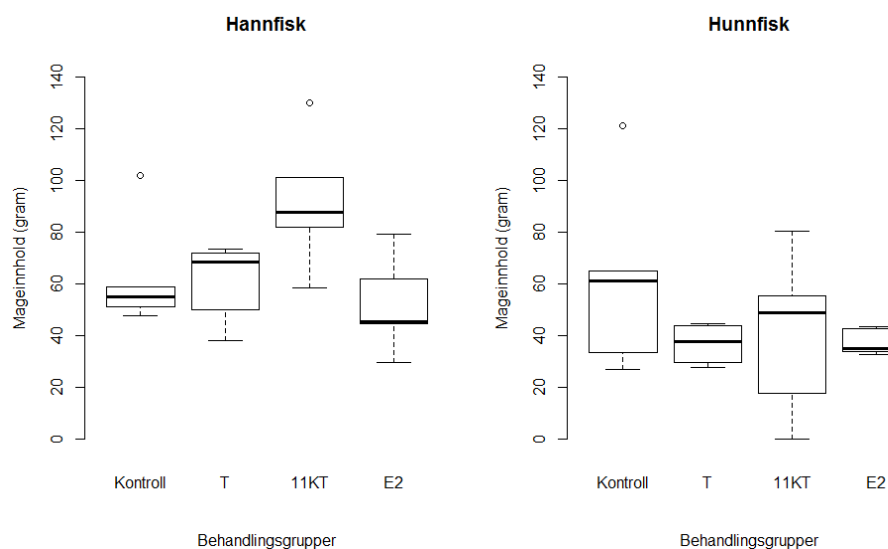
- hydroxy-20 $\beta$ -dihydroprogesterone, and 17 $\beta$ -estradiol. *Canadian Journal of Zoology*, 70(1), 37-42.
- Mommsen, T. P. & Walsh, P. J. 1988. Vitellogenesis and oocyte assembly. *Fish Physiology*, 11(part A), 347-406.
- Moschos, S., Chan, J. L. & Mantzoros, C. S. 2002. Leptin and reproduction: a review. *Fertility and Sterility*, 77(3), 433-444.
- 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(4), 377-384.
- Mustonen, A. M., Nieminen, P. & Hyvärinen, H. 2002. Leptin, ghrelin, and energy metabolism of the spawning burbot (*Lota lota*, L.). *Journal of Experimental Zoology*, 293(2), 119-126.
- 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(6), 507-512.
- Norman, R. J. & Clark, A. M. 1997. Obesity and reproductive disorders: a review. *Reproduction, Fertility, and Development*, 10(1), 55-63.
- Patiño, R. & Sullivan, C. V. 2002. Ovarian follicle growth, maturation, and ovulation in teleost fish. *Fish Physiology and Biochemistry*, 26(1), 57-70.
- Peyon, P., Zanuy, S. & Carrillo, M. 2001. Action of leptin on in vitro luteinizing hormone release in the European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Biology of Reproduction*, 65(5), 1573-1578.
- Qiagen 2010. RNeasy Plus Universal Handbook.
- Rcoreteam 2014. R: A Language and Environment for Statistical Computing. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing.
- Rikardsen, A., Thorpe, J. & Dempson, J. 2004. Modelling the life-history variation of Arctic charr. *Ecology of Freshwater Fish*, 13(4), 305-311.
- 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(1), 55-70.
- Schulz, R. 1985. Measurement of five androgens in the blood of immature and maturing male rainbow trout, *Salmo gairdneri* (Richardson). *Steroids*, 46(2), 717-726.
- Silverstein, J. T., Shearer, K. D., Dickhoff, W. W. & Plisetskaya, E. M. 1998. Effects of growth and fatness on sexual development of chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) parr. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 55(11), 2376-2382.
- 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(6), 1113-1122.
- Takei, Y. & Loretz, C. A. 2006. Endocrinology. I: Evans, D. H. C., J. B. (red.). *The Physiology of Fishes*. 3. utg. Boca Raton: CRC Press. Taylor & Francis Group, 271-318.
- Taranger, G. L., Carrillo, M., Schulz, R. W., Fontaine, P., Zanuy, S., Felip, A., Weltzien, F.-A., Dufour, S., Karlsen, Ø. & Norberg, B. 2010. Control of puberty in farmed fish. *General and Comparative Endocrinology*, 165(3), 483-515.

- Tingaud-Sequeira, A., Knoll-Gellida, A., André, M. & Babin, P. J. 2012. Vitellogenin expression in white adipose tissue in female teleost fish. *Biology of Reproduction*, 86(2), 38.
- Trombley, S., Mustafa, A. & Schmitz, M. 2014. Regulation of the seasonal leptin and leptin receptor expression profile during early sexual maturation and feed restriction in male Atlantic salmon, *Salmo salar* L., parr. *General and Comparative Endocrinology*, In press. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.yggen.2014.04.033>.
- Trombley, S. & Schmitz, M. 2013. Leptin in fish: possible role in sexual maturation in male Atlantic salmon. *Fish Physiology and Biochemistry*, 39(1), 103-106.
- 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(5), 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(4), 714-727.
- Weil, C., Le Bail, P., Sabin, N. & Le Gac, F. 2003. In vitro action of leptin on FSH and LH production in rainbow trout (*Onchorynchus mykiss*) at different stages of the sexual cycle. *General and Comparative Endocrinology*, 130(1), 2-12.
- Yaron, Z. & Sivan, B. 2006. Reproduction. I: Evans, D. H. C., J. B. (red.). *The Physiology of Fishes*. 3. utg. Boca raton: CRC Press. Taylor & Francis Group, 343-386.
- 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(6505), 425-432.

## 7. VEDLEGG

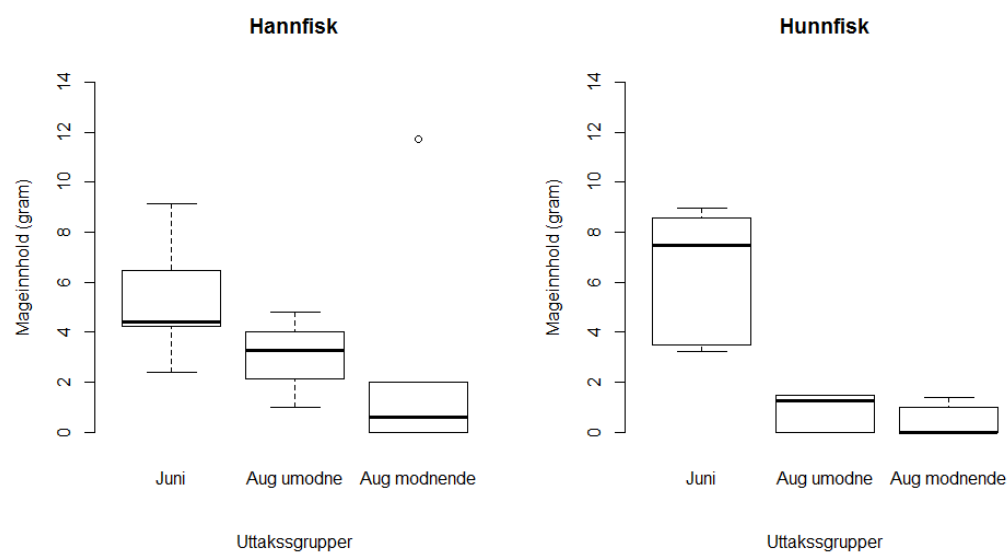
### 7.1 MAGEINNHOLD

#### 7.1.1 FORSØK 1 – INJEKSJON AV KJØNNSSTEROIDER



Figur 1. Mageinnhold (gram) for hann- og hunnrøye i de ulike behandlingsgrupper ved forsøkslutt, forsøk 1.

#### 7.1.2 FORSØK 2 – NATURLIG REPRODUKSJONSUTVIKLING



Figur 2. Mageinnhold (gram) for hann- og hunnrøye holdt ved naturlig lysforhold, mwd uttak i juni og august, forsøk 2.

## 7.2 ETHANOL PRECIPITATION OF RNA OLIGONUCLEOTIDE

### Materials for each oligonucleotide sample

#### Consumables

1. 1.5 mL Microfuge tubes

#### Chemicals

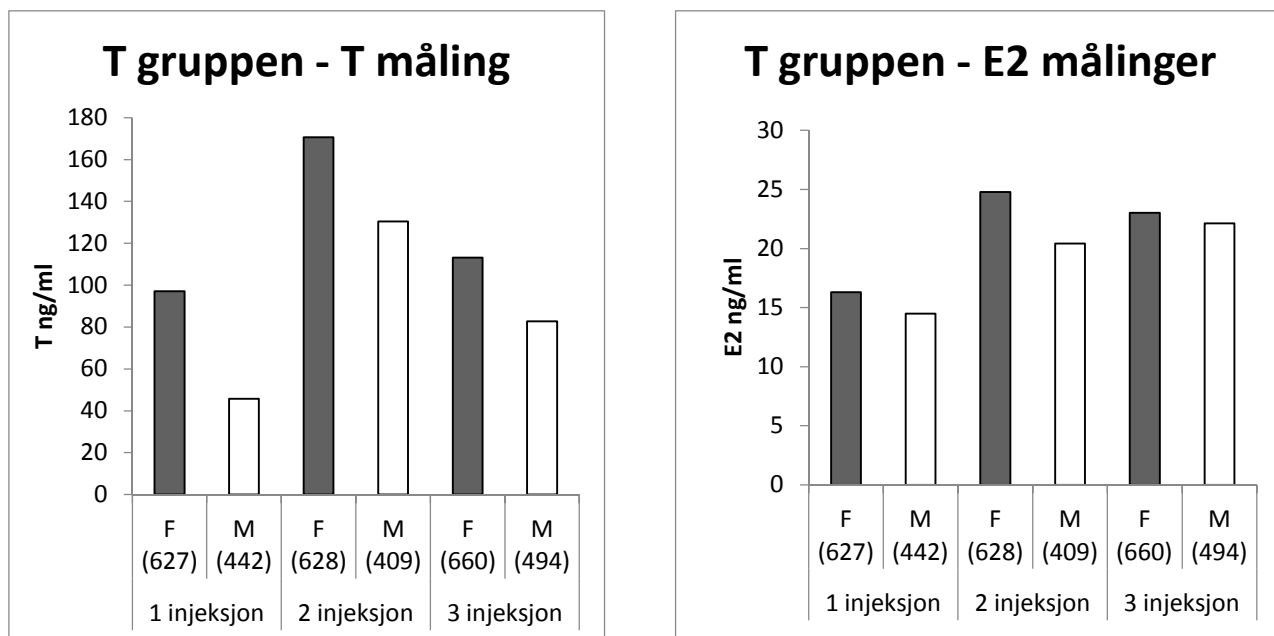
1. Ethanol
2. 3 Molar Sodium Acetate
3. Molecular Grade Water, RNase-free

#### Procedure

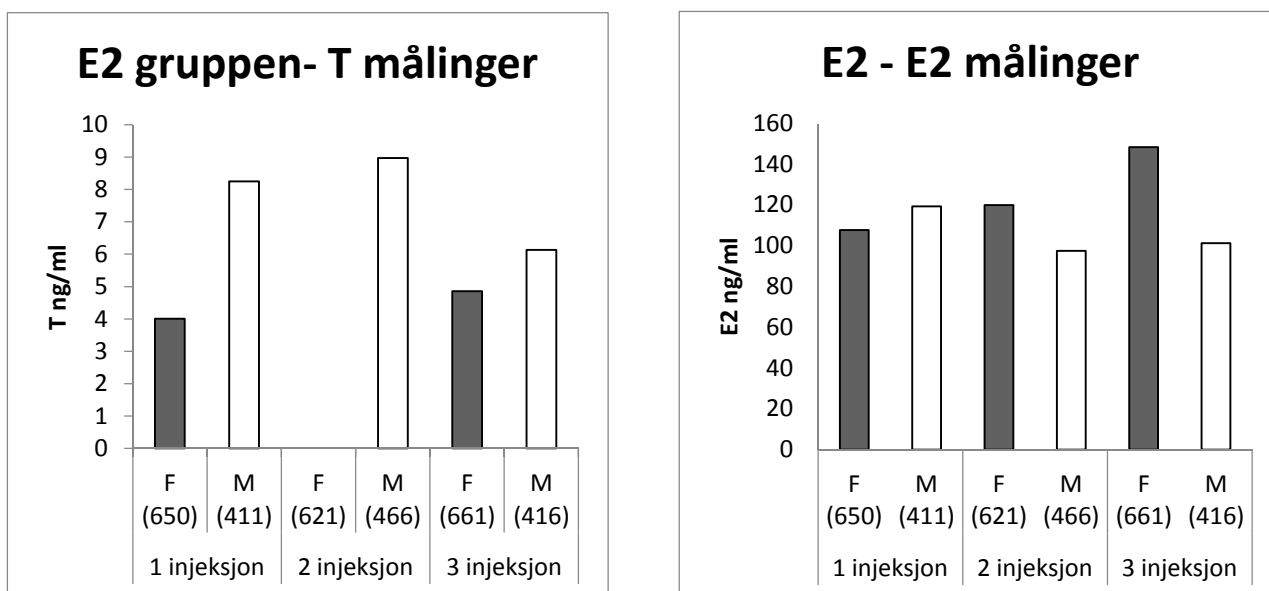
1. Take the RNA into 1.5 mL microfuge tubes.
2. Add 1/10 volume of 3 M sodium acetate (final concentration 0.3 M).
3. Add 3 volumes 100% ethanol per tube.
4. Vortex 10 seconds.
5. Store at -20°C overnight or at -80°C for 2 hours.
6. Centrifuge at 13000x g for 20 minutes (4 °C).
7. Pour the supernatant 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.

### 7.3 RESULTATER PILOTFORSØK

#### 7.3.1 PLASMAKONSENTRASJONER PILOTFORSØK

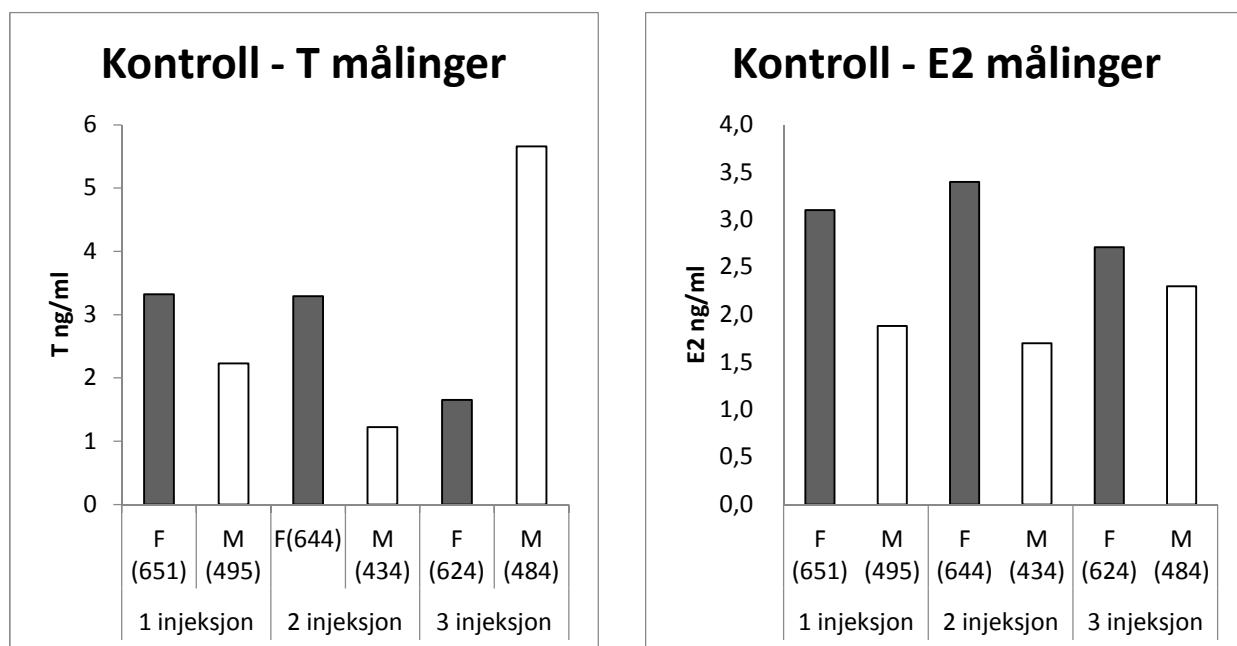


Figur 3. Endringer i plasmakonsentrasjoner av testoteron (T) og østradiol (E2) for hann- og hunnrøye gitt intramuskulære injeksjoner av T.



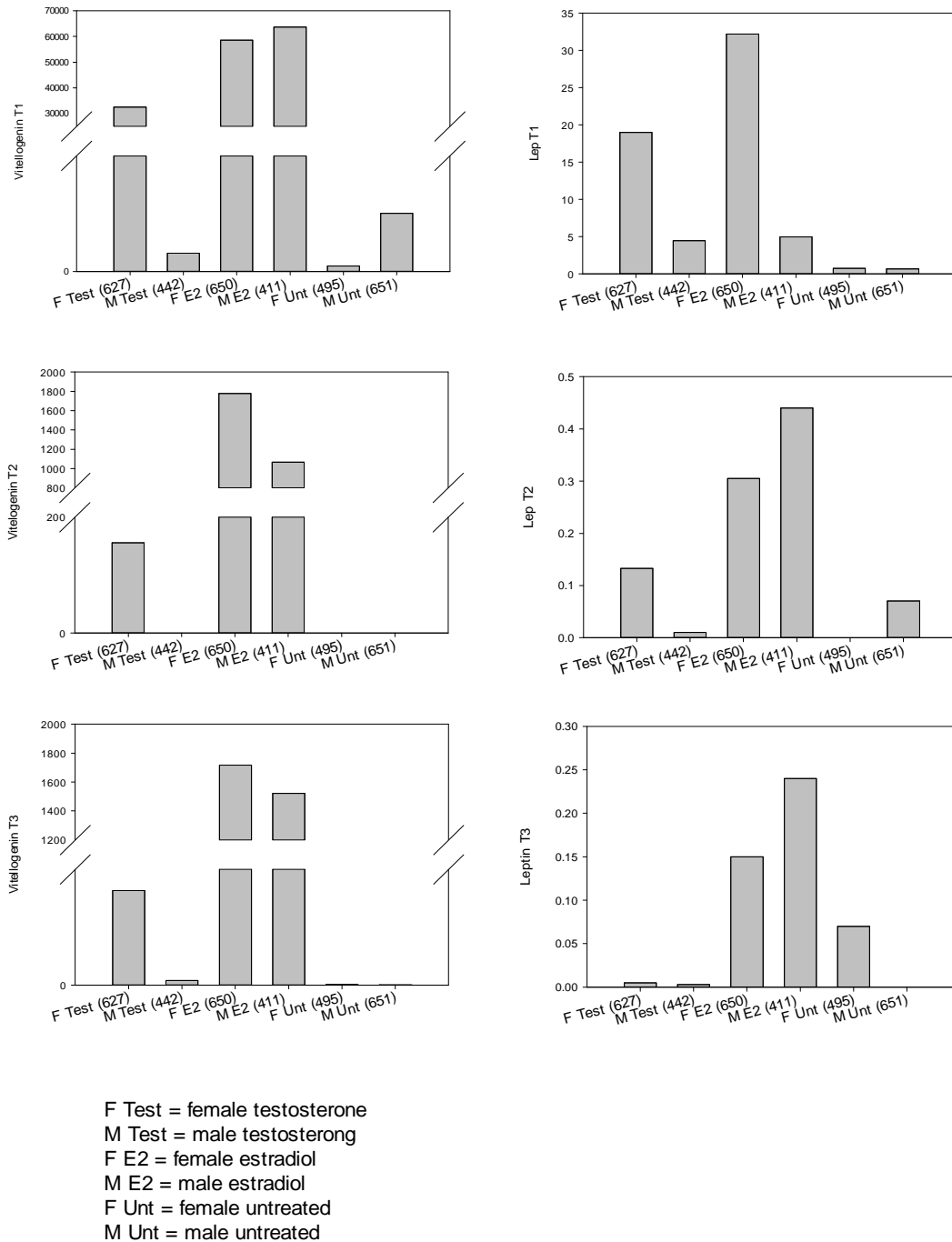
Figur 4. Endringer i plasmakonsentrasjoner av testoteron (T) og østradiol (E2) for hann- og hunnrøye gitt intramuskulære injeksjoner av E2.





**Figur 5. Endringer i plasmakonsentrasjoner av testoteron (T) og østradiol (E2) for hann- og hunnrøye gitt intramuskulære injeksjoner av propylenglykol.**

7.3.2 GENUTTRYKK PILOTFORSØK



**Figur 6. Normalisert uttrykk av vitellogenin og LepA1 hos hann- og hunnrøye gitt intramuskulære injeksjoner av henholdsvis 1 (T1), 2 (T2) og 3 (T3) injeksjoner propyleglykol (Kontroll, "untreated"), Testosteron (T) eller østradiol (E2). M= hannfisk, F = hunnfisk.**