# FAGLIG SLUTTRAPPORT

#### FHF 901590

Identifisering av miljømessige signaler som regulerer smoltifisering og modning hos oppdrettslaks: Et funksjonelt grunnlag for å redusere taperfisk og tidlig kjønnsmodning

8. august 2023



# Forfattere og hoveddeltagere i prosjektet

Kjetil Hodne Marit Stormoen Ian Mayer Guro Sandvik Alexander Figenschou Charlott Kjærre Olofsson Sudip Mahat Marit Bråten Svendby Ellen-Andrea Grønneberg Hege Lund

# Innholdsfortegnelse

Forfattere og hoveddeltagere i prosjektet2
Sammendrag4
English summary
1 Innledning6
1.1 Faglig bakgrunn for at prosjektet ble igangsatt6
1.2 Prosjektets omfang7
1.3 Prosjektorganisering
2. Problemstilling og formål
3. Prosjektgjennomføring
3.1 AP1. Fysiologisk karakterisering av fenotypiske taperfisk9
3.2 AP2 Etablere knockout-modeller for fshb og tsh -paralogene tshba og tshbb
3.3 AP3. Molekylærbiologiske analyser ved bruk av enkeltcelle mRNA-sekvensering og elektrofysiologiske undersøkelser10
3.4 AP4. Undersøk strategier for fotoperiode-manipulering som forsterker robust tshβb-uttrykk og samtidig reduserer fshb-produksjon, noe som letter optimal smoltifisering og hemmer seksuell modning henholdsvis
4. Oppnådde resultater, diskusjon og konklusjon 13
4.1 Fysiologisk karakterisering av fenotypiske taperfisk (anlegg A)13
4.2 Tidlig kjønnsmodning hos hannfisk20
4.3 Lysspektrum26
4.4 Interaksjon mellom fshb og tshbb28
4.5 mRNA-sekvensering av enkeltceller fra dissosierte hypofyser31
5. Hovedfunn
6. Referanser
7. Vedlegg

# Sammendrag

Suboptimal smoltifisering hos laks er en vedvarende utfordring i oppdrettsnæringen, med konsekvenser som redusert vekst og økt dødelighet ved sjøutsetting. Dette prosjektet gir innsikt i hvordan ulike produksjonsprotokoller kan påvirke smoltifisering og kjønnsmodning, to kritiske faser i laksens livssyklus.

I studien ble det utført eksperimenter for å følge ulike fiskegrupper gjennom smoltifisering og frem til sjøutsetting. Noen av disse eksperimentene ble organisert som fullskala feltforsøk, hvor fisk fra samme populasjon ble utsatt for forskjellige fotoperiode-regimer. Prosjektet utforsket også bruk av forskjellige lyspektra for å forhindre tidlig modning. Videre ble det gjennomført knockout-studier og kartlegging av hypofysens cellestruktur basert på enkeltcelle mRNA-sekvensering.

Hovedfunnene inkluderer:

- Selv med synkronisering av populasjonens utvikling etter 5 ukers vintersignal, øker variasjonen i endokrin status mot smoltifisering. Variasjonen i endokrin status samsvarer ikke med typiske smoltparametere som måler sammensetningen ulike subenheter av natrium-kalium-ATPasen (nka). Dette kan skape utfordringer for et optimalt utsett av smoltgruppen i sjø.
- Karforsøk indikerer at et 7 ukers vintersignal med en lysmengde på minimum 0.15  $\mu$ mol/m<sup>2</sup>/s ved karbunnen gir et robust smoltifiseringssignal, hvor populasjonen forblir synkron også etter vintersignalets slutt og frem mot ferdig smolt.
- Etter utsett av smolt fra fullskala produksjon i sjø ble det identifisert en undergruppe av fisk med redusert vekst og overlevelse, kalt "tapere". Denne fisken hadde reduserte tyroksinnivåer samt redusert uttrykk av en hittil lite studert nka-variant, nkaα3, i gjellene.
- Mørkeperioder etter smoltifisering kan muligens bidra til å redusere kjønnsmodning. Bruk av lys med større innslag av blått spektrum kan også minimere kjønnsmodning, men effekten varierer avhengig av lysintensitet og tidspunkt.
- Det ble observert en signifikant økning i plasmanivåer av 11-ketotestosteron (11-KT) hos hannfisk i postsmoltfasen der vannet hadde et saltnivå på 14 ppt, noe som indikerer at dette saltnivået kanskje ikke er tilstrekkelig for å forhindre kjønnsmodning.
- Interessante funn ble også gjort angående forholdet mellom tyroksin (T4) og trijodtyronin (T3) gjennom smoltifiseringen, samt mulige interaksjoner mellom Tsh og gonadotrope celler som regulerer kjønnsmodning.

Disse funnene gir verdifull informasjon hvordan miljøparametere som lys og temperatur kan påvirke smoltifisering og kjønnsmodning. Imidlertid er det viktig å understreke at disse resultatene trenger videre undersøkelser for å bekrefte deres fullstendige implikasjoner og for å utvikle robuste, industrielle løsninger.

# **English summary**

Suboptimal smoltification in salmon remains a persistent challenge in the aquaculture industry, leading to consequences such as reduced growth and increased mortality upon sea transfer. This project provides insights into how different production protocols can influence smoltification and sexual maturation, two critical phases in the salmon's life cycle.

In the study, experiments were conducted to monitor various fish groups through smoltification and up to sea transfer. Some of these experiments were organized as full-scale field trials, where fish from the same population were subjected to different photoperiod regimes. The project also explored the use of various light spectra to prevent early maturation. Furthermore, knockout studies were conducted, and the pituitary cell structure was mapped based on single-cell mRNA sequencing.

The main findings include:

- Even with the synchronization of the population's development after a 5-week winter signal, the variation in endocrine status towards smoltification increases. This variation in endocrine status does not necessarily correlate with typical smolt parameters that measure the composition of different subunits of the sodium-potassium ATPase (nka). This can pose challenges for the optimal transfer of smolt to the sea.
- Tank experiments indicate that a 7-week winter signal with a light intensity of at least 0.15  $\mu$ mol/m<sup>2</sup>/s at the tank bottom provides a robust smoltification signal, where the population remains synchronized even after the winter signal, up to the fully developed smolt.
- After transferring smolt from full-scale production to the sea, a subgroup of fish with reduced growth, termed "losers", was identified. These fish had reduced thyroxine levels and reduced expression of a previously little-studied nka variant, nkaα3, in the gills.
- Dark periods after smoltification might help reduce sexual maturation. The use of light with a higher proportion of blue spectrum can also minimize sexual maturation, but the effect varies depending on light intensity and timing.
- A significant increase in plasma levels of 11-ketotestosterone (11-KT) was observed in male fish in the post-smolt phase where the water had a salinity level of 14 ppt, suggesting that this salinity level might not be sufficient to prevent sexual maturation.
- Intriguing findings were also made regarding the relationship between thyroxine (T4) and triiodothyronine (T3) throughout smoltification, as well as potential interactions between Tsh and gonadotropic cells regulating sexual maturation.

These findings offer valuable information on how environmental parameters like light and temperature can influence smoltification and sexual maturation. However, it's essential to emphasize that these results require further investigation to confirm their full implications and to develop robust, industrial solutions.

# **1** Innledning

#### 1.1 Faglig bakgrunn for at prosjektet ble igangsatt

Smoltifisering og kjønnsmodning er to separate og uforenelige prosesser i laksens livssyklus. Smoltifisering er en prosess som forbereder laksen på migrasjon fra ferskvann til sjøvann. Kjønnsmodning hos laks skjer alltid i ferskvann og flere av hormonene som styrer kjønnsmodningen reduserer fiskens hypoosmoregulatoriske kapasitet, og dermed evnen til å opprettholde ionebalansen i sjøvann. Kjønnsmodning og smoltifisering reguleres via to endokrine akser, der kjønnsmodning hovedsakelig styres av hormonene i hypothalamus-hypofyse-gonade (HHG) -aksen [3, 4], mens smoltifisering initieres trolig via hypothalamus-hypofyse-thyroidea (HHT) -aksen [5, 6]. I tillegg er en rekke andre hormoner som prolaktin (Prl), veksthormon (Gh) og kortisol involvert. Både kjønnsmodning og smoltifisering er sesongmessige hendelser, hvor tidspunktet påvirkes av miljømessige faktorer, spesielt dagslysforhold [7]. TH, eller thyroideahormonene, består av ulike former. I dette prosjektet rettet vi fokus mot tyroksin (eller tetrajodtyronin, T4) og den biologisk mer aktive trijodtyronin (T3).

Fortsatt er det usikkerhet rundt den nøyaktige rollen til thyroideaaksen under smoltifisering. Det som er klart, er at T4 øker ved eller under smoltifisering [8]. Videre, har flere Studier vist at thyroideaaksen påvirker laksens evne til å tåle endringer i salinitet ved å øke sjøvannstoleransen [9-11]. Hos atlantisk laks øker også T3 bindingen til kortisolreseptorer på gjellene, og effekten forsterkes når den gis sammen med Gh, noe som øker saltvannstoleransen [12]. Hos flere laksearter forsterker T4 behandlingen virkning av Gh på ionepumpen Na+/K+-ATPase (Nka) i gjellene [13], mens T3 og Gh har en synergistisk effekt på Nka-aktivitet hos atlantisk laks og regnbueørret [12]

Prl bør også diskuteres i denne sammenhengen da vi ser en mulig kobling mellom dette hormonet og reproduktiv akse. Tidligere studier har også vist at injisering av Prl i atlantisk laks begrenser kortisolreseptorbindingen og reduserer Nka-aktiviteten, noe som reduserer saltvannstoleransen. Hos enkelte laksearter er det vist at Prl alene ikke har noen effekt på T3-nivåene, men reduserer T4nivåene i plasma. Når Prl gis sammen med Tsh, forlenger det Tsh-indusert økning av TH-nivåer [14]. Det er nå godt etablert at hormonet melatonin formidler lyssignaler i kontrollen av både døgn- og årstidsrytmer. Imidlertid finnes det fortsatt kunnskapshull i vår forståelse av hvordan miljømessige signaler integreres sentralt i kontrollen av sesongmessige fysiologiske hendelser, inkludert smoltifisering og modning. En bedre forståelse av hvordan miljøsignaler påvirker smoltifisering og modning hos laks er spesielt viktig, gitt at moderne produksjonspraksis rutinemessig innebærer manipulering av fotoperioden. I særdeleshet, mens smoltifisering naturlig forekommer etter to år for de fleste laksepopulasjoner, er næringen nå avhengig av smoltproduksjon på under et år,  $(0^+)$  smolt, noe som oppnås gjennom manipulering av fotoperiode og temperatur. Selv om produksjonen av store 0+ smolt (> 120 g) generelt oppfattes som gunstig for næringen, har det også ført til økt forekomst av en rekke ugunstige egenskaper, inkludert nedsatt hypoosmoregulatorisk evne (dårlig smoltkvalitet) og økt forekomst av tidlig kjønnsmodning (spesielt hos hannfisk).

Den økte forekomsten av disse uønskede produksjonsegenskapene tyder sterkt på at dagens produksjonspraksis, inkludert manipulering av miljøfaktorer, har en skadelig effekt på de sentrale nevroendokrine banene som kontrollerer både smoltifisering og kjønnsmodning. Dette understreker behovet for å øke vår forståelse av hvordan endringer i miljøforholdene påvirker de underliggende nevroendokrine mekanismene som kontrollerer sesongmessige fysiologiske rvtmer (smoltifisering/modning). Kunnskapen her vil gi oss en bedre forståelse av hvorfor nåværende produksjonspraksis, inkludert manipulering av fotoperioden, stadig resulterer i en rekke helse- og velferdsutfordringer, både i settefisk- og sjøfasen. I tillegg til å øke vår grunnleggende kunnskap om sentral kontroll av sesongmessige fysiologiske hendelser, vil denne informasjonen på en funksjonell basis tillate oss å utarbeide egnede tiltak for å hjelpe til med å redusere produksjonsflaskehalser som oppstår i lakseindustrien, inkludert forekomst av redusert vekst og tidlig kjønnsmodning.

#### FHF prosjekt 901590

#### Hypofysen

Hovedorganet som ble studert i dette prosjektet var hypofysen (figur 1). Som hos pattedyr er hypofysen hos fisk (teleoster) plassert rett bak synsnervens krysningspunkt under hypothalamus, omgitt av en benstruktur kalt *sella turcic* [15]. Hypofysen mottar signaler fra hypothalamus og skiller ut hormoner som igjen regulerer fysiologiske prosesser som vekst, smoltifisering, reproduksjon, stoffskifte og opprettholder homeostase. Hos fisk er det en direkte innervering fra hypotalamiske nevroner til hypofysens forlapp og frigjøring av nevrohormoner skjer direkte eller i nærheten av de endokrine målcellene. Frigjøring av de ulike hormonene er Ca<sup>2+</sup> -avhengig. I tillegg er cellene elektrisk eksiterbare og fyrer spontane aksjonpotensial. Oversikt over de ulike hormonene er beskrevet i figur 1. I rapporten vil vi skille mellom måten vi beskriver protein og mRNA. Navn på ulike proteiner vil starte med stor bokstav som Fsh, Lh, og Tsh. Når vi snakker om mRNA vil vi skrive gen-navn i kursiv som eksempel, *fshb, lhb*, og *tshb* (*tshba, tshbb*). De tre nevnt genene har en felles alfa subenhet og en unik beta (*b*) subenhet.



**Figur 1. 3D modell av hypofysen.** Tre ulike bilder av hypofysen som viser sammensetningen av de ulike hormonproduserende cellene hos fisk. Venstre bilde ser vi hypofysen dorsalt, de to høyre bildene er ventralt. Figurmodellen lengst til høyre er de første lagene med celler fjernet. Veksthormon (Gh, rosa), prolaktin (Prl, blå), somatolaktin (Sl, brun-rød) luteiniserende hormon (Lh, grønn), follikkelstimulerende hormon (Fsh, gul), thyreoideastimulerende hormon (Tsh, magenta) og adrenokortikotropt hormon (POMC, grå). Blodårene er farget i rødt [1, 2].

#### 1.2 Prosjektets omfang

Prosjektet hadde et budsjett på 10 mill finansiert av FHF og varte fra 1. januar 2019 til 15. april 2023. Organiseringen er gitt i tabellen under (1.3). I tillegg til eksperimentelle karforsøk og molekylærbiologiske undersøkelser har vi gjennomført forsøk på laks fra 3 settefiskanlegg, to av anleggene har vært typiske feltstudier og et anlegg har vært satt opp som fullskala feltforsøk. I feltforsøkene har vi sammenliknet to ulike fotoperioderegimer. Vi har også knyttet dette prosjektet til andre FHF prosjekter, spesielt FHF 901462. Dette har resultert i nye metoder for måling ulike hormoner som T4, T3, kortisol og kjønnssteroider.

#### 1.3 Prosjektorganisering

Firma	Personer	Ansvar
	TZ' ('1 TT 1	D 1/1 1 /AD2
NMBU/	Kjetil Hodne	Prosjektleder/AP3
Veterinærhøgskolen	Marit Stormoen	API
	Guro Sandvik	AP2
	Ian Mayer	AP4
MOWI	Trond Rosten	Kontaktperson og koordinator
LERØY	Bjarne Reinert	Kontaktperson
	Erik Dahl Paulsen	koordinator
Patogen	Morten Lund	Referansegruppe
Flatanger settefisk	Morten Lund	Referansegruppe
ACDpharma	Øyvind Kileng	Referansegruppe

Tabell 1. Oversikt over prosjektets organisering.

# 2. Problemstilling og formål

To utfordringer i dagens lakseindustri er dårlig smoltkvalitet og tidlig kjønnsmodning, noe som medfører betydelige økonomiske og velferdsmessige konsekvenser. Fortsatt finnes kunnskapshull angående de eksakte årsakene til disse produksjonsutfordringene og mye tyder det på at nåværende produksjonsstrategier, spesielt bruken av suboptimale fotoperiode og høy temperatur under smoltproduksjon, er to av de viktigste årsaksfaktorene.

Miljømessige signaler, særlig fotoperioden, har avgjørende betydning for initiering og styring av sesongmessige fysiologiske rytmer som smoltifisering og kjønnsmodning. Derfor er det et presserende behov for å øke vår forståelse av hvordan endringer i miljømessige signaler påvirker de sentrale nevroendokrine mekanismene som styrer disse kritiske fysiologiske prosessene.

Ved å forbedre vår kunnskap om hvordan endrede miljømessige signaler kan forstyrre de nevroendokrine veiene, vil vi kunne utvikle egnede tiltak for å redusere både fisk med dårlig vekst og tidlig kjønnsmodning. Målet med dette prosjektet er å hjelpe lakseindustrien med å identifisere hvordan miljøfaktorer som fotoperioden kan justeres mest effektivt for å produsere robuste smolt samtidig som man reduserer forekomsten av tidlig kjønnsmodning.

På lang sikt vil dette bidra til en mer bærekraftig og lønnsom lakseindustri som bedre ivaretar fiskevelferd og miljøet.

#### Prosjektets hovedmål.

Å generere ny kunnskap som vil tillate en mer robust smoltproduksjon ved å eliminere vekststopp gjennom effektiv aktivering av HPT-aksen og redusere eller hemme initiering av modning ved hjelp av fotomanipulering.

#### Delmål

- Karakterisere fysiologiske parametere av «tapere» med vekt på den nye *tshbb*.
- Tilby nye verktøy ved hjelp av knockout-dyr for å undersøke laksens smoltifisering og modning.
- Forstå den funksjonelle rollen til hvordan melatonin regulerer cellulær oppførsel.

- Forstå hvordan endringer i fotoperiode og temperatur påvirker laksens smoltifisering og modning.

# 3. Prosjektgjennomføring

Prosjektet ble organisert i 4 arbeidspakker (AP):

#### 3.1 AP1. Fysiologisk karakterisering av fenotypiske taperfisk

Formålet med AP1 var å få en større forståelse av hvordan intensiv produksjon i settefiskfasen påvirker endokrine funksjoner som igjen regulerer laksens evne til å smoltifisere.

#### Metodikk og gjennomføring

Det ble til sammen benyttet 3 settefiskanlegg hvor vi fulgte fisken fra initiering av vintersignal til rundt 2 måneder etter overføring til sjøanlegg. Vi tok ut prøver fra 6 ulike tidspunkt med rundt 50 fisk pr tidspunkt. Lengde og vekt registrert fra samtlige fisk før vevsprøvene ble tatt ut. Fra hver fisk ble det tatt gjelleprøver, hel hypofyse, hjerne og plasma. Vi tok også ut hjerte fra enkelte anlegg. I denne arbeidspakken er det til sammen prøvetatt ca 1000 fisk. Gjellenes *nka*-sammensetning og hypofysens uttrykk av hormonkodende gener ble analysert med qPCR. Vi utviklet også et multiplekst panel for å undersøke opp mot 48 ulike gener fra hyofyseprøver. Dette panelt kan videre utvides til 96 gener. Multipleks qPCR panelet ble utviklet på Fluidigm Biomark plattformen. Panelet ble validert på hypofyseprøvene fra feltforsøkene (anlegg C beskrevet under). Plasmanivåer av hormonene T4, T3, kortisol, testosteron og estradiol ble analysert ved bruk av kulebasert multipleks immunpanel beskrevet nærmer i FHF901462. 11-KT nivåene ble analyserte med standard kommersielt ELISA-kit. Resultatene fra hormonanalysene ble forsøkt satt i sammenheng med anleggenes produksjonsdata for dødelighet og tilvekst.

**Anlegg A (feltstudie):** Produserer 0+ smolt i gjennomstrømningsanlegg. Anlegget bruker typisk smoltprotokoll hvor parr går på 24-timers lys frem til de er mellom 30 og 40 g. Et vintersignal på 5 uker med 12 timer mørke og 12 timer lys (12:12) initierer smoltifiseringen og fullføres med 3-5 uker på 24-timers lys.

Det ble identifisert tapere 2 mnd etter sjøutsett.

Anlegg B (feltstudie): Produserer 0+ smolt i RAS. Etter smoltifisering ble fisken overført til postsmoltavdeling med hvor vannet hadde en salinitet på14 ppt. Anlegget benytter standard smoltprotokoll likt anlegg A, men hadde en gradvis reduksjon i daglengde.

**Anlegg C (feltforsøk).** Produsere 0+ smolt (stor smolt) i RAS. Anlegget benytter normalt kun 24timers fotoperiode. I prosjektet ble en subpopulasjon satt på 12:12 i 4 uker fra fisken hadde en snittvekt på 150 g.

#### 3.2 AP2 Etablere knockout-modeller for *fshb* og tsh -paralogene *tshba* og *tshbb*



Figur 2. CRISPER/Cas teknologien for knockout av *fshb* og *tshba* sammen med *slc45.* Øverste bilde viser en kontrollfisk hvor Cas enzymet er injisert uten guid RNA (gRNA). Nederste bilde viser positiv knockout. Cas enzymet er injisert sammen med gRNA rettet mot *slc45.* I tillegg benyttet vi gRNA mot *fshb* og *tshba*-genene. Formålet med AP2 var å etablerer tre ulike knockoutmodeller for *fshb*, *tshba* og *tshbb*.

#### Metodikk og gjennomføring

Vi benyttet CRISPER/Cas teknologien som er kjent for effektivt kunne slå ut målgener i F0 generasjonen. CRISPR står for "Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats", mens Cas er et protein som fungerer som en "saks" som klipper DNA. Metoden baserer seg på å benytte komplementære RNA molekyler (guide RNA, gRNA) som bindes til målgenets komplimentere sekvens. Samtidig innehar gRNA en gjenkjenningssekvens som gjør det mulig for Cas-enzymet å navigere til riktig gensekvens. Cas-enzymet klippe så DNA-tråden og skaper en lesjon. Under reparasjonen av genet blir det ofte introdusert feil som inaktiverer genet [16]. Sammtidig med målgenene ble også *slc45a* slått ut (figur 2) [17]. Genet *slc45a* kontrollerer pigmentering, og ved å slå ut dette genet vil vi generere fenotypiske albinoer. Injeksjonen av gRNA og Cas-enzymet gjennomføres på en-celle-stadiet under embryogenesen (omtrent 5 timer etter fertiliseringen). Vellykket injeksjon for knockout ble i første steg validert ved å screene for albinoer. Etterfulgt av en screening for albino ble målgenet sekvensert for validering av knockout. Av målgenene *fshb, tshba* og *tshbb* klarte vi i dette prosjektet kun å frembringe vellykket knockout av *fshb* og *tshba*.

# 3.3 AP3. Molekylærbiologiske analyser ved bruk av enkeltcelle mRNA-sekvensering og elektrofysiologiske undersøkelser

Formålet med AP3 var å se nærmere på interaksjonen mellom Fsh og Tsh i hypofysen. Her benytter vi enkeltcelle mRNA-sekvensering,  $Ca^{2+}$  målinger og elektrofysiologiske registrering fra ulike hypofyseceller. Interaksjonen mellom de endokrine cellene kan føre til genregulatorisk forandringer og/eller regulere sekresjon (regulere cytosolisk  $Ca^{2+}$ ). Prosjektet startet med en generell hypotese for interaksjon mellom Fsh og Tsh produserende celler (figur 3).



**Figur 3. Illustrasjon av hypotesen for AP3 ved oppstart av prosjektet**. Fotoperioden blir oversatt til det kjemiske signalet, melatonin. Melatonin regulerer aktiviteten til forskjellige hypofyseceller som er ansvarlige for hormonutskillelse. *Tshbb* (thyreoideastimulerende hormon er viktig under smoltifisering. *Fshb* (follikkelstimulerende hormon) er viktig for å sette i gang puberteten.

#### Metodikk og gjennomføring

Enkeltcelle mRNA-sekvensering ble gjennomført på dissosierte hypofyser fra hannlaks ved 5 ulike tidspunkt under smoltifisering (figur 4). Vi brukte her kun fisk som ikke var kjønnsmodne. For å dissosiere cellene utviklet vi en protokoll som innebar bruk av kuldeadaptert protease fra bakterien *Bacillus Licheniformis* som sammen med forsiktig mekanisk dissosiasjon førte til en cellesuspensjon med viable enkeltceller. Protokollen er tilpasset til disse forsøkene fra [18]. Det at både hypofysen og cellene kan holdes på lave temperaturer under hele dissosiasjonsprosessen reduserer faren for store forandringer i cellenes regulering av mRNA. Etterfulgt av dissosiasjonen ble cellene sortert og fordelt på 384 brønns plate med én celle pr brønn. Hver brønn inneholder lyseringsbuffer samt en unik kode som merker RNA (bar code). Sekvensering ble gjennomført via firmaet Single-cell Discoveries.



For å undersøke en mulig effekt av Tsh på hypofysen generelt og Fsh produserende celler spesielt gjennomførte vi en serier av forsøk der vi kombinerte  $Ca^{2+}$  målinger og elektrofysiologisk registreringer på både cellekulturer og hypofyseskiver (figur 5).  $Ca^{2+}$  målingene ble gjennomført ved å lade opp cellene med det fluoriserende fargestoff, Fluo4. Når  $Ca^{2+}$  bindes til fargestoffet øker det fluoriserende signalet. Intensiteten på emisjonen registreres av et kamera som er koblet opp mot en PC. Analyseringen av bildene fra disse forsøkene er gjennomført ved bildebehandlingsprogrammet Fiji [19].

Patch-clamp er en teknikk som gjør det mulig å registrer elektrisk forandringer over cellemembranen på enkeltceller i cellekultur eller fra ulike vevsskiver [20]. I denne teknikken benytter vi glasskapillærer (patch pipette) som er fylt med en elektrodeløsning. Via en sølvelektrode kobles den fylte patch-pipetten til en forsterker som igjen styres av en egnet programvare. Under gitte omstendigheter, når glasskapillæret kommer i kontakt med cellemembranen skapes en høy-ohmsk forsegling (gigaseal) mellom cellemembran og tuppen av glasset. Gigasealet gjør at ingen elektrisk strøm slippes forbi mellom glasset og membran. Etterfulgt av gigaseal lages små perforeringer i membranen ved bruk av antibiotika slik at det dannes elektrisk kontakt med cellens innside. Vi kan nå både registrer strømmer og spennings-forandringer over hele cellens membran.

I tillegg benyttet vi oss av en teknikk der intracellulær bundet Ca<sup>2+</sup> kan fotoaktiveres og dermed frigjøres i cytosol ved bruk av UV-laser («uncaging» teknikken) [21]. Uncaging ble brukt for å studere signaloverføring mellom celler i hypofysen. Spesielt ønsket vi å se på funksjonen til en gruppe celler kalt follikulostellate celler (FS-celler). De er stellate (stjerneformede) i form og ligger i kontakt med endokrine celler og spiller en viktig rolle i regulering og støtte av disse cellene. Follikulostellate celler danner blant annet et nettverk for kommunikasjon mellom hypofysens celler og er involvert i ulike prosesser inkludert regulering av hormonfrigjøring, celleproliferasjon og -differensiering, og immunologiske funksjoner [22].

### FHF prosjekt 901590

#### Sluttrapport



Figur 5. Skjematisk fremstilling av oppsettet for elektrofysiologiske registreringer og intracellulære Ca<sup>2+</sup> målinger.

Hypofysene fra laks bla dissosiert på samme måte som ved enkeltcelle mRNA-sekvensering [18, 23] Det ble også benyttet friske vevsskiver av hypofyser [24]. I enkelte forøk hvor vi målrettet målte elektrisk aktivitet fra Fsh produserende benyttet vi modellfisken medaka. Vi har ulike transgene varianter der fluoriserende protein reguleres enten av promotoren til Lh eller Fsh. Vi kan dermed gjennomfører målrettet studier av disse celletypene.

# 3.4 AP4. Undersøk strategier for fotoperiode-manipulering som forsterker robust tshβb-uttrykk og samtidig reduserer fshb-produksjon, noe som letter optimal smoltifisering og hemmer seksuell modning henholdsvis.

Formålet med AP4 var todelt. Vi ønsket i første omgang å studere hvordan ulike bølgelengder av lys påvirker smoltifisering og kjønnsmodning. I tillegg brukte vi karforsøkene til å supplere feltstudiene. Tre ulike spekter av lys ble benytte (figur 6). Fullspektrum med blått lys, fullt spektrum med redusert blått lys og et nærmest monokromatisk blått lys. Standard smoltifiseringsprotokoll ble brukt med 7 uker på 12:12 fra fisken var 50 g. Smoltifiseringen ble fullført med 4 uker på 24 t lys. Forsøkene ble satt opp med to parallelle kar for å ta høyde for kar til kar variasjon. Smoltstatus ble evaluert basert på gjellenes sammensetninger av *nka*-subenhetene *nkaa1a*, *nkaa1b* og *nkaa3*. Hypofyser fra individuelle fisk ble analysert for genuttrykket av *tshbb*, fshb, og reseptor for Tsh, *tshr*. Oppsettet ble også brukt i forbindelse med enkeltcelle mRNA-sekvensering i AP3 samt funksjonelle Ca<sup>2+</sup> imaging studiene.



Figur 6. Lysspektrum som ble benyttet ved de eksperimentelle karforsøkene. Fra venstre: Fult spektrum med blått lys. Fult spektrum med reduserte mengder blått lys. Nær monokromatisk blått lys.

# 4. Oppnådde resultater, diskusjon og konklusjon

Som følge av antall anlegg som ble fulgt i prosjektet er resultatene svært omfattende. Vi har her forsøkt å trekke ut de mest relevante resultatene. Hvert av settefiskanleggene hadde ulike utfordringer. Disse utfordringene dekker både problemer med taperfisk og utfordringer knyttet til tidlig kjønnsmodning.

#### 4.1 Fysiologisk karakterisering av fenotypiske taperfisk (anlegg A)

Fra anlegg A ble det identifisert fenotypiske tapere relativt kort tid etter utsett i sjø (figur 7 og høyre bilde figur 8A). Fisken på anlegget testet på dette tidspunktet negativt for salmonid alphavirus (SAV) og hadde heller ingen andre kjente sykdommer som medfører utvikling av tapere. Anlegget fikk påvist pankreassykdom (PD) (forårsaket av SAV) ni måneder etter utsett, dette er den viktigste infeksiøse årsaken til utvikling av tapere i Norge i dag. Taperfisk som utvikles grunnet PD i løpet av sjøfasen kan oftest skilles fra «smolttapere» ved at de har utviklet seg normalt fram til sykdommen påvirker fiskens appetitt (tidlig fase PD) og evne til å fordøye fôret (sen fase PD), fisken vil da visuelt oppfattes som lang og tynn, i motsetning til «smolttapere» som ikke har vokst vesentlig i lengde etter utsett. Det ble aldri registrert dødelighet grunnet infeksiøs pankreas nekrose (IPN) på anlegget, IPN er også en kjent årsak til avmagring hos laks. Det ble registrert dødelighet grunnet hjerte og skjelettmuskelbetennelse (HSMB) og kardiomyopatisyndrom (CMS) om lag en måned etter at de første taperne ble identifisert, men hverken HSMB eller CMS er assosiert med utvikling av tapere. Det ble altså ikke funnet noen åpenbare infeksiøse årsaker til de fenotypiske taperne som ble identifisert i den tredje måneden etter utsett. Se figur 7 for oversikt over hendelser første 12 måneder etter utsett i sjø, samt dødelighet på lokalitetsnivå.



**Figur 7. Oversikt over hendelser og prosent dødelighet første 12 måneder etter utsett på sjøanlegg A**. Tallene i hvitt viser kalendermåned. Den grå linjen viser daglig akkumulert prosent totaldødelighet på lokalitetsnivå. Bokstavene viser viktige hendelser første 12mnd i sjø: A – utsettsperiode, B – første dødelighet i kategori «taper», C – første dødelighet i kategori «HSMB», D – første dødelighet i kategori «CMS», E – periode med dødelighet grunnet sårutfordringer, F – PD-diagnose.

For å avdekke mulige årsaker til at deler av fisken blir tapere tok vi ut prøver av fisk ved ulike tidspunkter under smoltifisering i settefiskfasen (se figur 8A). Både kondisjonsfaktor (K-faktor) og hepatosomatisk indeks (HSI) lavere for alle fiskene vi analyserte (figur 8B). K-faktor fortsetter å synke etter sjøutsett, men ved siste prøveuttak har K-faktor igjen begynt å øke. HSI øker allerede ved første prøveuttak etter sjøutsett. K-faktor på gruppen av tapere var signifikant lavere (figur 8C). Snittvekten var også mye lavere på taperfisken, 77.5 ± 13.05 g mot 347.6 ± 60.3 g for fisk som vokste normalt (samme gruppe).



**Figur 8. Oversikt over prøveuttak anlegg A.** A) Produksjonsprotkollen der prøveuttakene er markert med røde sirkler i forhold til tidspunkt for sjøutsett. Sekstini dager (69d) etter sjøutsett ble de første taperne identifisert (bilde til høyre). B) Hepatosomatisk index (HSI) og kondisjonsfaktor (K-faktor) fra 1 uke før vintersignal og frem til 69d. C) Sammenlikning av K-faktor og HSI fra normal fisk og tapere (stunts). For HSI og K-faktor er dataene presentert som gjennomsnitt  $\pm$  standardfeil.

# Gjellenes sammensetning av de ulike *nka* subenheten. Basert på

genuttrykket av ferskvanns-ATP-asen,  $nka\alpha la$  ser vi at fiskegruppen er homogen ved tidspunktet før sjøutsett (-4d, figur 9A). Videre er det en signifikant nedregulering av genet  $(nka\alpha la)$  fra vintersignalets slutt og frem til like før sjøutsett. Resultatene viser også at tapere har et signifikant høyere uttrykk av nkaα1a 69 dager etter sjøutsett (figur 9B). Vi observerte også en økning i genuttrykk av saltvannvarianten,  $nka\alpha lb$ , men med en større spredning (figur 9C). Det var ikke registrert forskjeller i nkaa1b uttrykk mellom tapere og normal fisk (figur 9d).



Figur 9. Relativt genuttrykk av *nkaala* og *nkalb* fra gjellevev. A) Relativt genuttrykk av *nkaala* målt fra gjellvev til individuelle fisk gjennom smoltifiseringen og frem til dag 69 etter sjøutsett. B) Sammenlikning av genuttrykk av *nkaala* mellom normal fisk og tapere (stunts) ved dag 69 (+69d) etter sjøutsett. C) Relativt genuttrykk av *nkaalb* målt fra gjellvev til individuelle fisk gjennom smoltifiseringen og frem til dag 69 etter sjøutsett. D) Sammenlikning av genuttrykk av *nkaalb* mellom normal fisk og tapere (stunts) ved dag 69 (69d) etter sjøutsett.



Figur 10. Relativt genuttrykk av *nkaa3* fra gjellevev og plasma osmolalitet. A) Relativt genuttrykk av *nkaa3* målt fra gjellvev til individuelle fisk gjennom smoltifiseringen og frem til dag 69 etter sjøutsett. B) Sammenlikning av genuttrykk av *nkaa3* mellom normal fisk og tapere (stunts) ved dag 69 (+69d) etter sjøutsett. C) Plasma osmolalitet hos normal fisk og tapere (stunts) ved dag 69.

Vi analyserte også genuttrykket av en mindre studert subenhet,  $nka\alpha 3$  (figur 10a). Det viser seg at  $nka\alpha 3$  har samme uttrykksmønster som  $nka\alpha 1b$ , og øker frem mot ferdig smolt. Sammenliknet med fisk som har normal utvikling ser vi at  $nka\alpha 3$  er signifikant laver hos taperfisk (figur 10b). Til tross for en forskjell i uttrykk av både  $nka\alpha 1a$  og  $nka\alpha 3$ opprettholder taperfisk sin plasmaosmolalitet (figur 10c). Faktisk ser vi en signifikant reduksjon fra  $377 \pm 22$  til  $351 \pm 21$  mOsm hos taperfisk.

Basert på gjellenes utrykksmønster av de ulike *nka*-variantene gjennom smoltifiseringen er det ingen klare trekk som tyder på at tapere kan identifiseres tidlig i settefiskfasen. Faktisk er vårt inntrykk at hele fiskegruppen hadde en veldig jevn utvikling.

Plasmanivåene av kortisol viser en økning gjennom hele smoltifiseringen og frem til og med siste uttak (figur 11). Normalt ville vi forventet at kortisolnivåene var redusert etter mer enn to måneder i sjø. Vi kunne ikke se forskjeller mellom tapere (270.6  $\pm$  91.9 ng/ml) og normal 279.1  $\pm$  68.6 ng/ml) fisk, begge men hos gruppene var kortisolnivåene elevert.



**Figur 11. Plasmanivåer av kortisol.** A) Kortisolnivåene hos individuelle fisk gjennom smoltifiseringen frem til dag 69 etter sjøutsett. B) Sammenlikning av kortisolnivået i plasma mellom normal fisk og tapere (stunts) ved dag 69 etter sjøutsett.



Figur 12. Relativt genuttrykk av *tshbb* målt fra hel hypofyse til individuelle fisk gjennom smoltifiseringen fra eksperimentelle karforsøk.

dessverre ikke gjennomført prøveuttak de 3 første ukene etter vintersignalets slutt. Uttrykksmønsteret av *tshbb* er veldig likt mellom de eksperimentelle karforsøkene og settefiskanlegget før og under vintersignalet (figur 13A). Populasjonen har svært lite spredning, også i settefiskanlegget. Vi ser også at tshbb ikke forandrer seg ved overgangen fra 24-timers lys til vintersignal. Derimot ser vi at *tshbb*- uttrykket øker etter avsluttet vintersignal. Sammenlignet med fra karforsøkets to resultatene siste tidspunkter med siste måling fra settefiskfasen (før utsett i sjø) observerte vi en mulig dysynkronisering i populasjonen med stor individuell variasjon i tshbb. Ser vi nærmere på gh-uttrykket fra prøvene i settefiskanlegget, øker også dette fra vintersignalets slutt og frem til utsett (figur 13B). Etter sjøutsett ser vi, basert på ghuttrykket, at fiskegruppen deler seg i to ved dag 17 etter sjøutsett.

**Taperfisk har redusert plasmanivåer av T4 og T3.** Plasma T4-nivåene øker gradvis gjennom vintersignalet og er signifikant høyere ved dag 4 før utsett. (figur 14A). Samtidig reduseres T3-nivåene gjennom hel e smoltifiseringen. Etter 17 dager i sjø er T4 og T3 på sitt laveste, før nivåene i øker signifikant etter 69 dager i sjø. Ratioen mellom T3 og T4 synker frem til sjøutsett (figur 14B). Den forblir uendret i sjøfasen

Relativt genuttrykket av tshbb og gh fra hel hypofysen til individuelle fisk gjennom smoltifiseringen viser økende heterogenitet etter vintersignal. For å se på fiskegruppens variasjon i utrykksmønster av de ulike genene tok vi utgangspunkt i de eksperimentelle karforsøkene. Genuttrykket av tshbb fra disse karforsøkene viser en signifikant økning 6 dager etter vintersignalets slutt, for så å avta etter ca 2 uker. En dag før vi avsluttet forsøket og betraktet fisken som ferdig smoltifisert (basert på sammensetningen av nkasubenheter) er tshbb-uttrykket nede på nivåer observert før vintersignalet (figur 12). Vanntemperaturen i karforsøket er sammenlignbar med settefiskanlegget, med et snitt på 14,5 °C under forsøket. I settefiskanlegget (anlegg A) ble det



**Figur 13. Relativt genuttrykk av** *tshbb* **og** *gh.* Relativt genuttrykk av A) *tshbb* og B) *gh* målt fra hel hypofyse til individuelle fisk gjennom smoltifiseringen og frem til dag 69 etter sjøutsett.

frem til dag 69. Både T4 og T3 er lavere hos taperfisk sammenliknet med fisk som vokser normalt (figur 15).



Figur 14. Plasmanivåene av tyroksin (T4), trijodtyronin (T3) og T3/T4 ratio fra individuelle fisk gjennom smoltifiseringen fra settefiskanlegg. A) plasma T4-nivåene øker gjennom vintersignalet og frem til sjøutsett, Plasma T3-nivåene faller frem til og med dag 17 etter sjøutsett Plasmanivåene av både T4 og T3 øker fra dag 17 til dag 69 etter utsett. B) T3/T4 profilen viser en gradvis reduksjon gjennom hele smoltifiseringen. Dataene presentert som gjennomsnitt  $\pm$  standardfeil.

Økning i plasma T4-nivåene under vintersignalet samsvarer ikke med uttrykket av tshbb. Vi ønsket å se nærmere på reguleringen av tshbb, i forhold til plasmanivåene av T4 og T3. I anlegg B fikk vi tatt prøver både før, under og like etter vintersignalet ble avsluttet (figur 16). Resultatene samsvarer med karforsøkene hvor vi observerte en økning i tshbb én uke etter vintersignalets slutt (se -100d, figur 16A. Etter 21 dager (-79d figur 16B)) var spredningen noe større i settefiskanlegget, men etter overføring



Figur 15. Plasma tyroksin (T4) og trijodtyronin (T3) hos normale fisk og taperfisk ved dag 69 etter sjøutsett.

til postsmolt ser vi igjen en mer samlet gruppe med reduksjon i *tshbb* som fortsetter etter sjøutsett. I motsetning til *tshbb*, øker plasmanivåene av T4 under vintersignalet også i anlegg B (-12d, figur 16C), før nivåene igjen synker frem til 100 dager før sjøutsett. På dette tidspunktet (-100d) er uttrykket av *tshbb* høyest. Nivåene av T4 øker igjen fra -100d og frem til postsmoltperioden (-79d). Nivåene av T3synker under vintersignalet og er dermed motsatt av T4. Deretter øker T3 og får en liten topp 100 dager før sjøutsett (hvor *tshbb* også er høyest uttrykt). T3 avtar noe frem til overførsel til postsmolt før nivåene igjen øker frem til og med sjøutsett. Samlet sett ser vi at ratioen mellom T3 og T4 fra anlegg B øker frem til og med 27 dager ette sjøutsett (figur 16D).

I motsetning til anlegg A (med tapere), øker nivåene av plasma T3 etter vintersignalet. Ratioen mellom T3 og T4 øker også. Som følge av at vi ikke fikk tatt ut prøver i uken etter avslutning av vintersignalet i anlegg A, er det uklart om det også har vært en økning i T3 i tidspunktene like etter avsluttet vintersignal. Dette vil også kunne påvirke ratioen mellom T3 og T4. I studiene av *tshbb* er det viktig å presisere at det er flere regulatoriske elementer som vi ikke har oversikt over mellom

#### Sluttrapport

genuttrykk og faktiske nivåer av Tsh i plasma. Både translasjon fra mRNA til protein og hormonutskillelse er nøye regulert. For å få en fullstendig oversikt må det utvikles metoder som tillater målinger av Tsh og skille mellom de ulike paralogen.



**Figur 16. Relativt genuttrykk av** *tshbb***, plasmanivåer av tyroksin (T4), trijodtyronin (T3) og T3/T4 ratio fra anlegg B gjennom smoltifiseringen.** A) Temperaturprofil med avmerket dager for prøvetaking relatert til sjøutsett. B) Relativt genuttrykket til *tshbb*. C) Plasmanivåene av T4 og T3. D) Ratio mellom T3 og T4. For hormonprofilene er dataene presentert som gjennomsnitt ± standardfeil.

Prinsipal komponentanalyse (PCA) analyser viser to distinkte fiskegrupper hvor vi finner tapere i den ene gruppen. Det ble gjennomført en rekke andre analyser både av gjellevev og hypofysen. Fra gjellene analyserte vi i tillegg til nevnte *nka*-subenheter genuttrykket av følgende gener; cystisk fibrose transmembrane conductance regulator (*cftr*) I og II, nka subenhetene *nka1* og *nkaa1c*. Fra hypofysen analyserte vi utrykket til alle hypofysens hormoner (se figur 1 og 17). Vi gjennomførte også undersøkelser av 11-KT hos hannfisk. Alle variablene som ble analysert fra anlegg A ble videre analysert og visualisert her i et «heatmap» (figur 17). For å identifisere nøkkelfaktorer som kan forklare observasjonene våre benyttet vi oss av PCA (figur 18). PCA er en statistisk teknikk som brukes til å redusere dimensjonaliteten i et datasett, samtidig som mest mulig av den underliggende variasjonen beholdes. Denne metoden er spesielt nyttig når vi har data med mange variabler eller funksjoner, og ønsker å identifisere hovedstrukturen eller mønstrene i dataene. Fordelen med PCA er at den kan hjelpe med å forenkle komplekse datasett, redusere støy, og identifisere underliggende mønstre og strukturer.

Basert på PCA-plottet (figur 18) ble to distinkte fiskegrupper fra anlegg A identifisert. Vi ser også at taperfisk tilhører den ene gruppen. Det er derfor nærliggende å tro at blant all fisk vi identifiserte som normale ved dag 69 i sjø ville, på sikt, flere mulig utvikle seg til fenotypiske tapere.



Figur 17. Heatmap over alle variablene som ble analyser ved anlegg A



Figur 18. PCA plot basert på alle variabler analysert i anlegg A. Dottene representerer individuelle fisk hvor de blå dottene er taperfisk (stunts).

#### 4.2 Tidlig kjønnsmodning hos hannfisk

Det er observert økende utfordringer knyttet til tidlig kjønnsmodning blant hannfisk i settefiskperioden og tidlig sjøfase, spesielt under vårutsett med økende sjøtemperaturer. Tidligere studier har også demonstrert at høye temperaturer kombinert med kontinuerlig lys stimulerer kjønnsmodning hos hannfisk i postsmoltfasen [25, 26]. I dette prosjektet benyttet vi et settefiskanlegg (anlegg B) som tidligere har rapportert om utfordringer knyttet til tidlig kjønnsmodning. Vi gjennomførte også et fullskala feltforsøk for å undersøke om vintersignal etter smoltifisering påvirker deler av den reproduktive akse.

Før sjøutsett overføres smolt fra dette anlegget til postsmoltavdeling med en salinitet på rundt 14 ppt (figur 19a). Dessverre fikk vi ikke muligheten til å følge et vårutsett. Fiskegruppen vi fulgte ble satt på sjø i januar, men kan likevel gi mulige forklaringer på tidlig kjønnsmoden. I første del undersøkte vi genuttrykket av *fshb*. Hormonet Fsh spiller en viktig rolle i tidlige faser av kjønnsmodningen, og en økning i dette hormonet kan indikere aktivering av den reproduktive aksen. Hos hannfisk vil det også være en økning i kjønnssteroidet 11-KT.

Vi ser at det relative genuttrykket av den unike subenhet for Fsh, *fshb*, øker etter overføring til postsmoltavdelingen, sammen med en økning i 11-KT (figur 19b). Vi observerte også en signifikant økning i 11-KT under vintersignalet, fra  $33.8 \pm 11.1$  til  $91.8 \pm 31.0$  pg/ml. Kjønnsmodne hannfisk som ble identifisert under dette vintersignalet hadde et plasmanivå på >1200 pg/ml. Rett før vintersignalet økte vanntemperaturen fra rundt 14 °C til 15 °C. Temperaturen var heller ikke stabil under vintersignalet (figur 19a). Økningen i 11-KT skjer uavhengig av *fshb*-uttrykket under vintersignalet. Etter sjøutsett reduseres 11-KT kraftig. Temperaturen synker fra rundt 14 °C i postsmoltavdelingen til 4,5 °C i sjøen. Daglengden er også korte (utsett i midten av januar). Som nevnt observerte vi kjønnsmodne hannfisk ved andre uttak (-121d, figur 19) under vintersignalet. Tidligere studier har vist at en brå økning i temperatur kan initiere kjønnsmodning, spesielt hvis temperaturen allerede er høy. Det er også interessant å se hvordan 11-KT reduseres etter sjøutsett.



Figur 19. Relativt genuttrykk av *fshb*, og plasmanivåer av 11-ketotestosteron (11-KT) gjennom smoltifiseringen. A) Temperaturprofil på vannet med avmerket dager for prøvetaking relatert til sjøutsett. B) Relativt genuttrykket av *fshb* og plasmanivåene 11-KT. Dataene i figur B er presentert som gjennomsnitt  $\pm$  standardfeil.

I flere artikler har det blitt rapportert at bruk av vintersignal kan ha en gunstig effekt med tanke på å hindre tidlig kjønnsmodning etter smoltifisering [25, 26]. I vårt fullskala feltforsøk separerte vi en fiskegruppe i to grupper. Gruppe 1 (Exp, i figur 20), ble eksponert for 12:12 vintersignal fire uker etter smoltifisering. Vintersignalet varte i 4 uker og utsett i sjø var 4 uker etter vintersignalets slutt (15.04.21). Gruppe 2 (Control i figur 20), ble brukt som kontroll og ble utsatt for kontinuerlig lys frem til sjøutsett. Det var en marginal forskjell i vekt mellom de to gruppene ved sjøutsett. Gruppe 1 hadde en snittvekt på 474 ±113 g, mens gruppe 2 hadde noe lavere vekt,  $388 \pm 88$  g. Vekten var helt lik etter 3 uker i sjø. K-faktor var heller ikke signifikant forskjellig mellom de to gruppene. Her kan



**Figur 20. Vekst og kondisjonsfaktor på fisk fra feltforsøket.** A) Vektutviklingen på fisken under forsøket målt i gram. B) Kondisjonsfaktor (K-faktor) på fisken under forsøket. Exp; eksperimentell gruppe (gruppe 1) ble eksponert for et vintersignal anvist med brunt rektangel mellom 18.2 og 15.3 -21. Control; kontrollgruppe ble eksponert for kontinuerlig lys. Dataene er presentert som gjennomsnitt ± standardfeil.

noe av forklaring ligge i en forholdsvis stor spredning i gruppe 2. Ser vi isolert på hver av gruppene er det en signifikant økning i K-faktor hos fisk i gruppe 1 fra tidspunktene 20.1.21 og frem til 18.3.21. Økningen er fra  $1.26 \pm 0.09$  til  $1.4 \pm 0.1$ . Det var ingen forandringer i K-faktor mellom de ulike tidspunktene hos fisk i gruppe 2.

Vi overvåket smoltifiseringsstatusen ved å måle gjellens sammensetning av ulike *nka*-subenheter og kloridtester (figur 21). Selv om genuttrykket av sjøvannsformen av nka, *nkaa1b*, ikke øker før utsett i sjø (figur 21A) ser vi at mellom 16.12.20 og 20.1.21 reduseres ferskvannsformen av nka, *nkaa1a*, betraktelig. *Nkaa1b* øker først etter sjøutsett og skiller seg fra anlegg A hvor det var en økning også under smoltifiseringen. Utrykket til *nkaa3* viser en gradvis økning også i settefiskfasen, frem til utsett (figur 21C). Det er ingen forskjeller mellom de to gruppene i gjellenes utrykk av *nka*-subenheter. Kloridtestene viser også at fisken har tilfredsstillende hypoosmoregulatorsisk kapasitet under hele perioden fra 5.3.21 til siste test 31.3.21. Her der det heller ingen forskjell mellom de to gruppene.



**Figur 21. Relativt genuttrykk av** *nka*-subenheter fra gjellevev, og kloridmålinger. Sjøutsett var 15.04.21. Relativt genuttrykk av A) *nkaa1a* B) *nkaa1b* og C) *nkaa3* ble målt fra gjellvev til individuelle fisk gjennom smoltifiseringen og frem til 3 uker ette sjøutsett. D) plasmakloridnivåer ble målt fra individuelle fisk der første måling ble gjort to uker etter Exp (gruppe 1) fikk vintersignal. Exp; eksperimentelle gruppe eksponert for et 12:12 vintersignal. Control; kontrollgruppen eksponert for kontinuerlig lys. Dataene er presentert som gjennomsnitt ± standardfeil.

I dette forsøket utviklet vi et multiplekspanel for genuttrykk. Vi har til nå testet ut 48 gener som utrykkes i hypofysen og tidligere identifisert som nøkkelgener under smoltifisering og kjønnsmodning. I tillegg har vi tatt med gener som bidrar i regulering av celledeling og apoptose.

Sammen med multipleksanalysene og basale registreringer som vekt, K-faktor, og HSI gjennomførte vi PCA analyser (figur 22). Her ser vi at det dannes to grupper, med noe overlapp, basert på om fisken fikk vintersignal eller ikke. Panelets gensammensetning er fortsatt ikke ferdigutviklet, men resultatene gir et bilde på hvordan vintersignal etter smoltifisering påvirker hypofysens genuttrykk. I analysene har vi også fremstilt dataene i «heatmaps» (figur 23). En oversikt over utrykksmønstrene til de ulike genene er fremstilt i figur 24. Her ser vi blant annet at viktige gener som regulerer reproduksjon nedreguleres av et vintersignal inkluderte flere av reseptorene for Gnrh. I tillegg ser vi at enzymene *p450aroma* og *p450aromb* (*cyp19*) som konverterer androgener til østrogen også nedreguleres ved et vintersignal, sammen med østrogenreseptorene *era* og *erb*. Ettersom fisken allerede var ferdig smoltifisert før vintersignalet ble indusert var det overaskende å se at tshbb også øker for fisk i gruppe 1. Det er fortsatt for tidlig å trekke konklusjon på hvorfor vi ser en slik økning i *tshbb*.



**Figur 22.** PCA plot basert på alle variabler analysert i anlegg C (feltforsøk). Dottene representerer individuelle fisk hvor de sorte dottene er kontrollfisk som ble eksponert for kontinuerlig lys og de gule dottene representerer fisk som ble eksponert for et vintersignal på 12 timer lys og 12 timer mørke.



**Figur 23. Heatmap basert på analyser fra genpanelet utviklet i dette prosjektet.** Analysene er gjennomført på fisk fra anlegg C (feltforsøk). Øverste figur representerer data fra kontrollfisk som ble eksponert for kontinuerlig lys. Nederste figur representerer data fra gruppen av fisk som ble eksponert for et vintersignal på 12 timer lys og 12 timer mørke.



**Figur 24. Multiplot av alle aktuelle gener fra Fluidigm-panelet etablert i prosjektet.** Analysene er gjennomført på fisk fra anlegg C (feltforsøk). Røde grafer (Treatment 0) representerer målinger fra kontrollfisk som ble eksponert for kontinuerlig lys. Grønne grafer (Treatment 1) representerer data fra gruppen av fisk som ble eksponert for et vintersignal på 12 timer lys og 12 timer mørke. Tidsperioden for vintersignalet er merket i grått og lyseblått representerer tiden fra og med sjøutsett.

#### 4.3 Lysspektrum

I tillegg til lysstyringsregimer, har oppdrettsnæringen nå økt søkelys på lysets bølgelengdesammensetning. Flere leverandører av lyskilder tilbyr skreddersydde lyskilder med ulike sammensetninger av bølgelengder, og Light Emitting Diode (LED) har økt i popularitet på grunn av deres evne til å skreddersys etter behov. Dette har også ført til reduserte strømkostnader og en lengre levetid for LED-lys. Både spektrum og intensitet er viktige faktorer for å oppnå ønsket resultat. Særlig har det vært satt søkelys på bruk av blått lys for å hindre kjønnsmodning hos oppdrettsfisk.

Det er imidlertid en utfordring at forsøkene ikke alltid tar høyde for lysintensitet, og det er et misforhold mellom lyset som kan oppnås under industrielle forhold sammenlignet med små karforsøk. I våre forsøk har vi derfor sørget for å justere intensiteten ned til nivåer som er tilstrekkelig for blokkering av melatoninproduksjon, men ikke høyere. Vi har brukt måleenheten Par (Photosynthetically Active Radiation) for å bestemme lysmengden, som beskriver mengden av synlig lys med bølgelengder mellom 400 og 700 nanometer. Grensen for mengde lys på bunnen av hvert kar ble satt til 0,15  $\mu$ mol/m<sup>2</sup>s.Vi sammenliknet tre ulike lysspektrum (beskrevet i figur 6); Fullspektrum med blått lys (fullspektrum). Fullspektrum med reduserte mengder blått lys (redusert blått) og nær monokromatisk blått lys (ekstra blått).



Figur 25. Relativt genuttrykk av *nka*-subenheter fra gjellvev under smoltifisering fra fisk eksponert for ulike lysspektrum. A) *nkaala*. B) *nkaalb*. C) *nkaa3*. Røde grafer er fra fisk eksponert for fullspektrum lys inkludert blått. Orange grafer er fra fisk eksponert for fullspektrum med redusert blått lys. Blåe grafer er fra fisk eksponert for nær monokromatisk blått lys. Dataene i figurene er presentert som gjennomsnitt  $\pm$  standardfeil.

Vi evaluerte smoltifiseringen basert på *nka*-sammensetningen og finner ingen vesentlige forskjeller mellom de tre ulike lyskildene (figur 25). Ser vi på genuttrykket til *tshbb* er det heller ingen store forskjeller (figur 26). Toppen for *tshbb* uttrykket er likt, men det er en mindre spredning i den gruppen av fisk som ble eksponert for ekstra blått lys. Vi observerte heller ingen stor forskjell i fiskens adferd mellom de tre ulike lyseksponeringene.

Vi observerte et lavere antall fisk som var kjønnsmodne ved bruk av ekstra blått lys, men det totale antall fisk er muligens noe lavt slik at det lett kan bli feilrapportering. På slutten av smoltifiseringen ser vi at *fshb* øker i en subpopulasjon av hannfisk i karene som fikk fullspektrum og fullspektrum med reduserte mengder blått lys (figur 27). Vi observerte ingen økning i *fshb* hos hannfisk som ble eksponert for ekstra blått lys. Normal vil kjønnsmoden parr beholde sin karakteristiske parrdrakt. I karforsøkene observerte vi en tydelig overgang til sølvfarget smoltdrakt også hos hannfisk som ble kjønnsmodne under forsøkene. Resultatene totalt sett viser ingen tydelig effekt i bruken av blått lys, med unntak av en mulig inhibering av *fshb* seint under smoltifiseringen. Denne effekten kan være viktig og vi trenger å gjennomføre flere studier før det kan konkluderes.



**Figur 26. Relativt genuttrykk av** *tshbb* **under smoltifisering fra hel hypofyse til fisk eksponert for ulike lysspektrum.** A) Fullspektrum lys med blått. B) Fullspektrum lys med reduserte mengder blått. C) Nær monokromatisk blått lys. D) Relativt genuttrykk av *tshbb* 6 dager etter avsluttet vintersignal.



**Figur 27. Relativt genuttrykk av** *fshb* **under smoltifisering fra hel hypofyse til fisk eksponert for ulike lysspektrum.** A) Relativt genuttrykk av *fshb* ved de ulike lysspektrum. B) Relativt genuttrykk av *fshb* ved de ulike lysspektrum ved siste dag (-1d). C) Kjønnsmoden hannfisk. Dataene i figur A er presentert som gjennomsnitt ± standardavvik.

#### 4.4 Interaksjon mellom fshb og tshbb

I de eksperimentelle karforsøk ser vi at *tshbb* oppreguleres i en kort periode etter at vintersignalet er avsluttet (figur 12). Den samme observasjonen ble også gjort på fisk som allerede var ferdig smoltifisert (figur 24). I to studier så vi nærmere på en mulig interaksjon mellom *tshbb* og *fshb*. Kjønnsmodne hannfisk hadde en GSI på >9 og utrykket av *fshb* var signifikant høyere (figur 28A)



Sammenlikner vi kjønnsmodne med ikke kjønnsmodne hannfisk før vintersignal er *tshbb* høyere utrykt i hypofysen hos ikke kjønnsmodne hannfisk (figur 28B). For å verifisere om mulig interaksjon utførte vi genspesifikk knockout av *fshb* og *tshba* (*tshbb* knockout ble dessverre ikke vellykket). Vi gjennomførte RNA-sekvensering på hel hypofyse samt *saccus vasculosus* (SV). SV har i et tidligere studie vist å holder en nøkkelrolle i forbindelse med sesongmessige endringer i dagslys [27]. Ved knockout av *fshb* ser vi at *tshbb* genet oppreguleres (figur 29A). Dette sammenfaller også med observasjonene gjort i kjønnsmodne hannfisk hvor høyt utrykk av *fshb* reduserte utrykket *tshbb*. Interessant nok ser vi at *tshba* og *tshbb* har en mulig interaksjon. Knockout av *tshba* reduserer uttrykket av *tshbb*. Vi klarte ikke å måle noe uttrykk av *tshbb* i SV (figur 29B).



Figur 29. Genuttrykk av tshbb etter genspesifikk knockout av fshb og tshba A) Hypofyse. B) saccus vasculosus (SV).

#### FHF prosjekt 901590

#### Sluttrapport

For å studere om det er en direkte interaksjon mellom Fsh-celler og Tsh-celler gjennomførte vi først et søk for å identifisere aktuelle Tsh-reseptorer (*tshr*). Vi identifiserte én *tshr* (ENSSSAG00000117601) som utrykkes i hypofysen. Denne reseptoren reguleres gjennom smoltifiseringen og uttrykket økte etter vintersignalet ble initiert (figur 30A) I tillegg ble Tshr bekreftet med funksjonelle (Ca<sup>2+</sup>-imaging) studier der vi stimulerte hypofyseceller fra hannfisk med Tsh (bovint Tsh, figur 30B). For å finne hvilke celletyper som utrykker *tshr* gjennomførte vi et søk i sekvenseringsdataene fra enkeltcelle-sekvenseringene, men dessverre klarte vi ikke å finne utrykk av *tshr* her. Mengden mRNA for reseptorer som uttrykkes er generelt veldig lavt og dette kan muligens være hovedgrunnen til at vi ikke klarer å identifisere *tshr*.



**Figur 30. Identifisering av funksjonell Tshr i hypofysen hos laks** A) Relativt genuttrykk av *tshr* sammen med *tshbb* under smoltifisering fra hel hypofyse. B) Tsh indusert  $Ca^{2+}$ -respons fra hypofyseseller isolert fra hannflaks. Øverst i B vises pseudfarget mikrografier fra ulike tidspunkt under cellens respons til Tsh. Blå farge viser lave  $Ca^{2+}$  verdier som øker mot gult og rødt etter hvert som  $Ca^{2+}$  øker i cellen.  $Ca^{2+}$  responsen er også illustrert grafisk under med markering for når Tsh ble applisert på cellen. Hvit bar på bilde 1 tilsvarer 15 µm. Dataene i figur A er presentert som gjennomsnitt ± standardfeil.

I medaka er *tshr* lokalisert til en liten subpopulasjon av celler som er identifisert som FS-celler. Det er kun disse celletypene som utrykker *tshr*. FS-celler fungerer som støtteceller i hypofysen og er kjent for å være elektrisk eksiterbare og kan overfører signaler mellom ulike celler.

De utgjør en mindre del av hypofysens cellepopulasjon, men spiller likevel en viktig rolle i reguleringen av hormonproduksjonen.

Som nevnt tidligere, er FS-celler stjerneformet og er spredt mellom hypofyseceller i en spesiell struktur som kalles den interstitielle plassen. De har utvidede, forgrenede prosesser som gir kontakt mellom hypofysecellene og støtter den intercellulære kommunikasjonen mellom dem.

FS-celler produserer og frigjør cytokiner, nevropeptider og andre signalstoffer som kan påvirke hypofysens funksjon og hormonproduksjon. De spiller en viktig rolle i reguleringen av hormonsekresjonen og kan påvirke hypofysens funksjon på flere nivåer, både i basaltilstanden og under betingelser med hormonelle endringer eller stress [22].

Levende FS-celler kan markeres med et dipeptid (Beta-Ala-Lys-N(epsilon)-AMCA) som cellene tar opp i cytosol. Det er kun FS-celler som har denne kapasiteten og andre celler blir derfor ikke merket. Dipeptidet er fluoriserende og eksiteres ved bruk av UV-lys. For å bekrefte FS-cellenes evne til å overføre signal gjennomførte vi en serie med fotoaktivering av Ca<sup>2+</sup> kjent som «uncaging» (figur 31).





Aktivering av FS-celler med laser indusert uncaging demonstrer at disse cellene kan overføre elektriske signaler til grupper av celle som ligger langt borte fra FS-cellens soma.

Tatt i betraktning observasjonene gjort i medaka utforsket vi mulig indirekte kommunikasjon mellom FS-celler og Fsh-celler. Ved å stimuler hypofyseskiver med Tsh (bovin) og samtidig registrere elektrisk aktivitet fra Fsh-celler (figur 32). I forsøkene vi gjennomførte klarte vi ikke å påvise noe forandring i verken elektrisk aktivitet over cellemembranen eller i intracellulære Ca<sup>2+</sup> forandringer. Vi observerte forandringer i andre nærliggende celler. Det er viktig å legge til at metodene vi brukte her ikke sier noe om genregulering, og det kan ikke utelukkes at det er andre mekanismer som blir påvirket av Tsh.

Figur 31. Signaloverføring fra follikulostellate (FS) celler til nærliggende celler fra hypofyseskiver. Øverst vises pseudfarget mikrografier fra ulike tidspunkt under cellenes Ca<sup>2+</sup> respons etter fotoaktivering av en bestemt FS-celle. Første venstre bilde er et oversiktsbilde hvor FS-cellen er merket lilla sammen som målet for laseren som brukes for aktivering av Ca<sup>2+</sup>. Bokstavene a, b og c representerer her cellene som responsen fra aktivert FScelle ble målt fra. Hvit bar i nedre venstre del av første bilde representerer 15 µm (litt over en celle diameter). Resterende bilder viser utvalgte bilder fra responsen hvor tallene i venstre hjørne tilsvarer tallene på grafen under. Lilla merke på grafen markerer når laseren ble skutt mot FScellen. Blå farge på mikrografiene viser lave Ca<sup>2+</sup> verdier som øker mot gult og rødt etter hvert som Ca<sup>2+</sup> øker i cellen.



Figur 32. Elektrofysiologiske registreringer ved bruk av teknikken perforert patch-clamp fra Fsh-celler under Tsh stimulering. A) Registrering gjort på en Fshcelle som danner spontane aksjonspotensialer. B) Registrering gjort på en Fsh-celle som ikke danner aksjonspotensial.

#### 4.5 mRNA-sekvensering av enkeltceller fra dissosierte hypofyser

Hypofysen er et komplekst organ. For å få en oversikt over alle endokrine celler samt identifiserer nøkkelgener som utrykkes i de ulike cellene gjennomførte vi en kartleggingsstudie under smoltifisering der vi dissosierte hypofysen til hannfisk og høstet enkeltceller for mRNA-sekvensering. Resultatene er visualisert i ulike PCA-plot (figur 33, detaljer ligger under punkt 8. Vedlegg). PCA plottet (figur 33) viser 8 ulike grupperingeringer hvor de hormonproduserende cellene utgjør 6 av gruppene. I en av gruppene identifiserte vi et hittil lite studert gen, *glykoprotein hormon beta 5 (gphb5*, ENSSSAG00000053262). Gruppen av celler som uttrykker *gphb5* utrykker også andre gener som i tidligere studier er blitt identifisert i FS-celler, inkluder Ca<sup>2+</sup> bindende proteinet S100 (ENSSSAG00000051351) [28]. Proteinet Gphb5 er spesielt interessant fordi det kan bindes til Tshr. Overuttrykk av Gphb5 i mus øker serumnivåene av T4 [29]. I våre studier observerte vi en gradvis økning i uttrykk av *gphb5* gjennom smoltifiseringen (figur 34) Vi kunne dessverre ikke finne celler som spesifikt uttrykker *tshbb*. Gjennom dette prosjektet har vi vi sett at *tshbb* generelt er veldig lavt uttrykt, mye lavere enn det som er observert for de andre hormonkodende genene.

Flere reseptorer ble identifisert og lokalisert til ulike cellepopulasjoner. Av de mest interessante reseptorene fant vi *gnrhr1* varianten kalt *gnrhrcab* (ENSSSAG00000063356, se vedlegg og figur 24) og *fshr*. Disse reseptorene er uttrykt i *prl*-produserende celler (Se pkt 8 Vedlegg under lokalisering av ulike reseptorer). Vi ser også at *prl*-produserende celler reduseres ved ferdig smoltifisering. Prl er kjent som ferskvannshormon og vil i sjøvann redusere fiskens evne til å opprettholde hypoosmoregulatorsik kapasitet. En aktivering av reproduktiv akse vil mulig kunne stimulere produksjon og frigjøring av Prl. Dette vil igjen kunne reduser fiskens sjøvannstoleranse. Denne reduksjonen i sjøvannstoleranse vil være uavhengig av gjellenes Nka-sammensetning.



**Figur 33. PCA-plot basert på resultatene fra enkeltcelle mRNA-sekvensering.** Hver dott representerer én celle. Venstre plot viser oversikt over hvilke hovedgrupper som er identifiser og hvilke grupper som uttrykker de ulike hormonkodende gener. Høyre figuren visualisering av totalt antall gener som er identifisert.



Figur 34. Visualisering av hvordan genuttrykket til enkelte gener forandrer seg gjennom smoltifiseringen basert på enkeltcelle mRNAsekvensering. Gruppen merket 12:12 er fra fisk som er satt på vintersignal. De to andre gruppene representerer før og etter vintersignal hvor fisken står på 24 timers lys.

# 5. Hovedfunn

- Selv med synkronisering av populasjonens utvikling etter 5 ukers vintersignal, øker variasjonen i endokrin status mot smoltifisering. Variasjonen i endokrin status samsvarer ikke med typiske smoltparametere som måler sammensetningen ulike subenheter av natrium-kalium-ATPasen (nka). Dette kan skape utfordringer for optimal utsett av smolt i sjø.
- Karforsøk indikerer at et 7 ukers vintersignal med en lysmengde på minimum 0.15 µmol/m²/s ved karbunnen gir et robust smoltifiseringssignal, hvor populasjonen forblir synkron også etter vintersignalet, frem mot ferdig smolt.
- Etter utsett av smolt fra fullskala produksjon i sjø ble det identifisert en undergruppe av fisk med redusert vekst, kalt "tapere". Disse hadde reduserte tyroksinnivåer samt redusert uttrykk av en hittil lite studert nka-variant, nkaα3, i gjellene.
- Mørkeperioder etter smoltifisering kan muligens bidra til å redusere kjønnsmodning. Bruk av lys med større innslag av blått spektrum kan også minimere kjønnsmodning, men effekten varierer avhengig av lysintensitet og tidspunkt.
- Det ble observert en signifikant økning i plasmanivåer av 11-ketotestosteron (11-KT) hos hannfisk i postsmoltfasen der vannet hadde et saltnivå på 14 ppt, noe som indikerer at dette saltnivået kanskje ikke er tilstrekkelig for å forhindre kjønnsmodning.
- Interessante funn ble også gjort angående forholdet mellom tyroksin (T4) og trijodtyronin (T3) gjennom smoltifiseringen, samt mulige interaksjoner mellom Tsh og gonadotrope celler som regulerer kjønnsmodning.

# 6. Referanser

- 1. Royan, M.R., et al., *3D Atlas of the Pituitary Gland of the Model Fish Medaka (Oryzias latipes).* Frontiers in Endocrinology, 2021. **12**.
- 2. ; Available from: <u>https://arken.nmbu.no/medaka-pituitary-atlas/AM/</u>.
- 3. Fleming, I.A., *Reproductive strategies of Atlantic salmon: ecology and evolution.* Reviews in Fish Biology and Fisheries, 1996. **6**(4): p. 379-416.
- 4. Weltzien, F.A., et al., *The brain-pituitary-gonad axis in male teleosts, with special emphasis on flatfish (pleuronectiformes).* Comparative Biochemistry and Physiology a-Molecular & Integrative Physiology, 2004. **137**(3): p. 447-477.
- 5. Hoar, W.S., *The thyroid gland of the Atlantic salmon.* Journal of Morphology, 1939. **65**(2): p. 257-295.
- 6. Deal, C.K. and H. Volkoff, *The Role of the Thyroid Axis in Fish.* Frontiers in Endocrinology, 2020. **11**.
- 7. Cowan, M., C. Azpeleta, and J.F. López-Olmeda, *Rhythms in the endocrine system of fish: a review.* Journal of Comparative Physiology B, 2017. **187**(8): p. 1057-1089.
- 8. Boeuf, G. and P. Prunet, *Measurements of gill (Na+ K+)-ATPase activity and plasma thyroid hormones during smoltification in Atlantic salmon (Salmo salar L.).* Aquaculture, 1985. **45**(1-4): p. 111-119.
- 9. Young, G., et al., *Smoltification and seawater adaptation in coho salmon (Oncorhynchus kisutch):* plasma prolactin, growth hormone, thyroid hormones, and cortisol. General and Comparative Endocrinology, 1989. **74**(3): p. 335-345.
- 10. Saunders, R., et al., *The effect of orally administered 3, 5, 3'-triiodo-L-thyronine on growth and salinity tolerance of Atlantic salmon (Salmo salar L.).* Aquaculture, 1985. **45**(1-4): p. 143-156.
- 11. Refstie, T., *The effect of feeding thyroid hormones on saltwater tolerance and growth rate of Atlantic salmon.* Canadian journal of zoology, 1982. **60**(11): p. 2706-2712.
- 12. Shrimpton, J.M. and S.D. McCormick, *Regulation of gill cytosolic corticosteroid receptors in juvenile Atlantic salmon: interaction effects of growth hormone with prolactin and triiodothyronine.* General and comparative endocrinology, 1998. **112**(2): p. 262-274.
- Miwa, S. and Y. Inui, *Effects of L-thyroxine and ovine growth hormone on smoltification of amago salmon (Oncorhynchus rhodurus).* General and Comparative Endocrinology, 1985. **58**(3): p. 436-442.
- 14. Leatherland, J.F., *Effect of Ambient Salinity, Food-deprivation and Prolactin on the Thyroidal Response to TSH, and in vitro Hepatic T4 to T3 Conversion in Yearling Coho Salmon, Oncorhynchus kisutch.* Acta Zoologica, 1982. **63**(1): p. 55-64.
- 15. Frisén, L., *Rapid transmandibular hypophysectomy of small fish.* Experientia, 1967. **23**(12): p. 1079-1080.
- Adli, M., *The CRISPR tool kit for genome editing and beyond.* Nature Communications, 2018.
  9(1): p. 1911.
- 17. Edvardsen, R.B., et al., *Targeted mutagenesis in Atlantic salmon (Salmo salar L.) using the CRISPR/Cas9 system induces complete knockout individuals in the F0 generation.* PLoS One, 2014. **9**(9): p. e108622.
- 18. Adam, M., A.S. Potter, and S.S. Potter, *Psychrophilic proteases dramatically reduce single-cell RNA-seq artifacts: a molecular atlas of kidney development.* Development, 2017. **144**(19): p. 3625-3632.
- 19. Schindelin, J., et al., *Fiji: an open-source platform for biological-image analysis.* Nature Methods, 2012. **9**(7): p. 676-682.
- 20. Neher, E. and B. Sakmann, *Single-channel currents recorded from membrane of denervated frog muscle fibres.* Nature, 1976. **260**(5554): p. 799-802.
- 21. Hodne, K., et al., *Gnrh1-Induced Responses Are Indirect in Female Medaka Fsh Cells, Generated Through Cellular Networks.* Endocrinology, 2019. **160**(12): p. 3018-3032.
- 22. Herkenham, M., *Folliculo-Stellate (FS) Cells of the Anterior Pituitary Mediate Interactions between the Endocrine and Immune Systems.* Endocrinology, 2005. **146**(1): p. 33-34.
- Hodne, K., et al., Optimized conditions for primary culture of pituitary cells from the Atlantic cod (Gadus morhua). The importance of osmolality, pCO<sub>2</sub>, and pH. Gen Comp Endocrinol, 2012.
  **178**(2): p. 206-15.
- 24. Fontaine, R., K. Hodne, and F.A. Weltzien, *Healthy Brain-pituitary Slices for Electrophysiological Investigations of Pituitary Cells in Teleost Fish.* J Vis Exp, 2018(138).
- 25. Crespo, D., et al., *Pituitary Gonadotropin Gene Expression During Induced Onset of Postsmolt Maturation in Male Atlantic Salmon: In Vivo and Tissue Culture Studies.* Front Endocrinol (Lausanne), 2022. **13**: p. 826920.

# FHF prosjekt 901590

- 26. Fjelldal, P.G., T. Hansen, and T.-s. Huang, *Continuous light and elevated temperature can trigger maturation both during and immediately after smoltification in male Atlantic salmon (Salmo salar).* Aquaculture, 2011. **321**(1-2): p. 93-100.
- 27. Nakane, Y., et al., *The saccus vasculosus of fish is a sensor of seasonal changes in day length.* Nature Communications, 2013. **4**(1): p. 2108.
- 28. Lloyd, R.V. and J. Mailloux, *Analysis of S-100 protein positive folliculo-stellate cells in rat pituitary tissues.* Am J Pathol, 1988. **133**(2): p. 338-46.
- 29. Okada, S.L., et al., A Glycoprotein Hormone Expressed in Corticotrophs Exhibits Unique Binding Properties on Thyroid-Stimulating Hormone Receptor. Molecular Endocrinology, 2006. **20**(2): p. 414-425.

# 7. Vedlegg



Hormonkodende gener lokalisert til ulike cellegrupper fra hypofysen ved enkeltcellesekvensering





Markører for de ulike cellepopulasjonene identifisert med enkeltcellesekvensering





![](_page_40_Figure_2.jpeg)

Lokalisering av ulike reseptorer i ulike celler identifisert med enkeltcellesekvensering