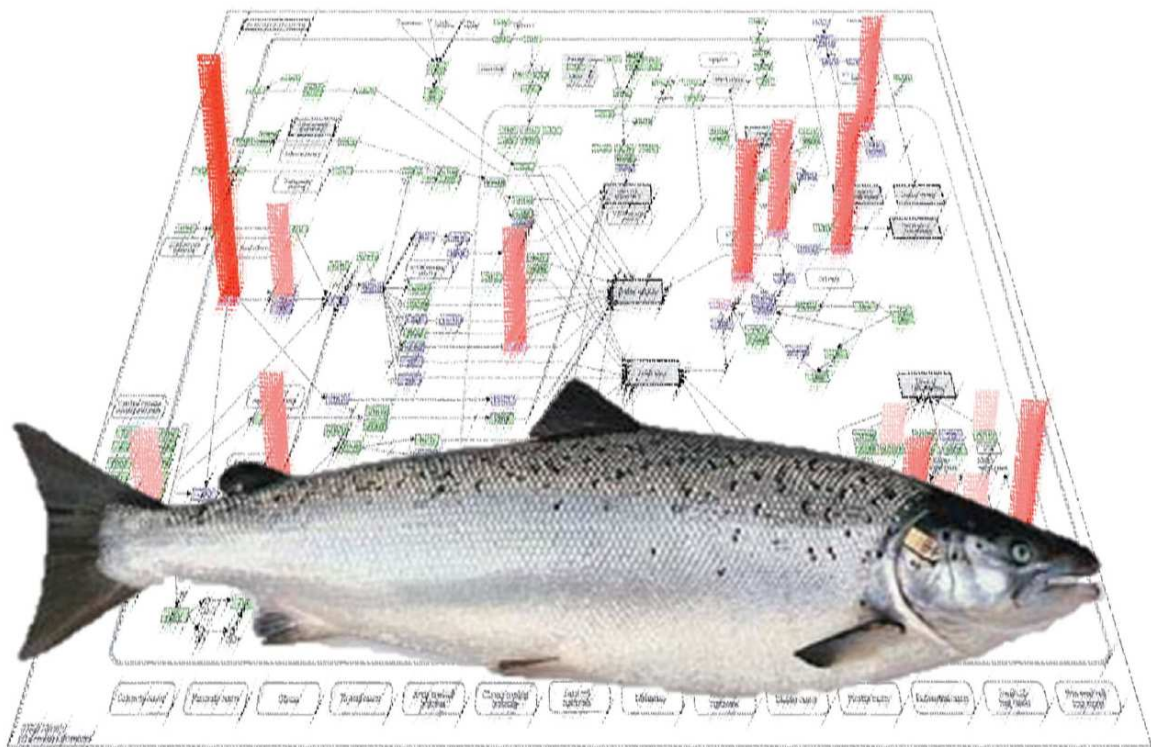


*Utredning: Hvordan kan kartleggingen av laksens
genom bidra til å løse utfordringene i
norsk havbruksnæring?*



Komité

Peter Aleström, Norges veterinærhøgskole (Professor)

Øyvind Drivenes, Universitetet i Bergen (Forsker, koordinator av evalueringen).

Unni Grimholt, Centre for Ecological and Evolutionary Synthesis, CEES, (Forsker)

Jon Vidar Helvik, Universitetet i Bergen (Professor, leder av komite),

Ivar Hordvik, Universitetet i Bergen (Professor)

Sigbjørn Lien, Universitetet for miljø- og biovitenskap, UMB/CIGENE (Professor)

Geir Lasse Taranger, Havforskningsinstituttet (Gruppeleder, Seniorforsker)

Eksterne bidragsyttere

Lars Ebbesson(UNI-Miljø)

Inge Jonassen (UiB, CBU)

Ivar Rønnestad (UiB)

Harald Takle (NOFIMA)

Styringsgruppe

Petter Arnesen, Marine Harvest

Håvard Bakke, Salmobreed AS,

Bård Skjelstad/Arne Storset, Aqua Gen AS

Harald Sveier, Lerøy Seafood Group ASA

Siri Vike, Cermaq/Mainstream

Merete Bjørgan Schr der, FHF (observatør i styringsgruppen)

Steinar Bergseth, NFR (observatør i styringsgruppen)

Forord	4
1. Oppsummering	5
Summary in English	6
Del 1 – Muligheter og bruk av laksegenomet - kortversjon	7
2 Bakgrunn	7
2.1. Lakseproduksjon i den bioteknologiske tidsalder	7
2.2 Hvilken informasjon ligger i laksegenomet og hvordan koble det til biologi?	8
2.3. Hvem er dagens og fremtidens brukere av informasjonen som ligger i laksegenomet?	9
3 Bruk av laksegenomressursene	10
3.1 Genomikk og produksjonsbiologi	10
3.2 Genomikk og forsvar mot sykdom (sykdomsmekanismer/forsvarsmekanismer)	11
3.3 Genomikk og avl	12
3.4 Modellarter – funksjonell og komparativ genomikk	13
3.5 <i>En felles «Laksebase»</i> for genomets struktur, funksjon og biologi (SalmonBase.org)	14
4 Konklusjoner	16
4.1 Strategiske satsinger	17
4.2 Tiltak	17
Del 2 Muligheter og bruk av laksegenomet - gjennomgang av utfordringer og mulige tiltak	19
5 Status og utfordringer	19
5.1 Bakgrunn for sekvenseringen av laksens genom, strategi og resultat	19
5.2 Fysiologi og ernæring	20
Utviklingsbiologi og produksjonslidelser	20
Endokrinologi	21
Vekstfysiologi	21
Reproduksjonsfysiologi	22
Sirkulasjon / respirasjon	23
Muskel/ bevegelse	24
Osmoregulering / ekskresjon	25
Smoltifisering og robust fisk	25
Appetitt og regulering av fôropptak	26
Fordøyelsessystemet	28
Stressresponser	29
5.3 Sykdomsproblematikk	30
Sykdomsproblematikk i næringen	30
Immunologi hos laks - forskning og status	31
Hva vet vi ennå ikke?	34
Hvordan utnytte laksens genom til bekjempelse av sykdommer i oppdrettsnæringen	35
5.4 Modellfisk	36
Analyse av genfunksjon i sebrafisk	38
Bruk av sebrafisk som modell innen akvakultur forskning	39
5.5 <i>Kompetanse</i>	42
5.6 Laksebasen, en informasjonsbase om genaktivitet bygget på RNAseq	43
Appendiks	46

Forord

Videreutvikling av norsk havbruksnæring er en viktig del av FHF's strategiske arbeid, og dette er den direkte årsaken til at FHF og aktører i næringen har bidratt til sekvensering av laksens genom. Første fase av sekvenseringsarbeidet er nå ferdig og tilgjengelig i Genbank, og det arbeides nå videre med å lage en høykvalitets referansesekvens. I FHF's Handlingsplan for 2011 inngår følgende: «*Bidra til at norsk næringsliv skal få best mulig innblikk i hvordan en kan nyttiggjøre seg kartleggingen av laksens genom*». Med bakgrunn i diskusjoner i FHF's fagapparat ble det etablert et prosjekt med målsetning om å skaffe laksenæringen en oversikt over hvordan en best mulig kan utnytte laksegenomet som et verktøy for å løse praktiske utfordringer i lakseproduksjonen. Kunnskap om utnyttelse av laksegenomet er forventet å bidra til forbedrete egenskaper som inngår i avlsmålene, forbedret helse, bedre fôrutnyttelse, bedre tilpasninger i miljøet og andre egenskaper.

En bredt sammensatt vitenskapelig prosjektgruppe ledet av Professor Jon Vidar Helvik, Universitetet i Bergen fikk i oppdrag å rette søkelyset mot de biologiske utfordringene i norsk lakseoppdrett hvor bruken av genominformasjon vil kunne være et viktig verktøy for å finne løsninger. En styringsgruppe bestående av sentrale aktører i næringen ble opprettet for å gi prosjektgruppen innspill om utfordringer i næringen og diskutere mulige løsninger. Prosjektgruppen har på noen områder som de faglig ikke helt dekket, fått innspill fra andre forskere. I tillegg har Steinar Bergseth (Norges Forskningsråd) og Merete Bjørgan Schrøder (FHF) vært observatører i arbeidet.

Prosjektgruppen og styringsgruppen har hatt tre felles møter i løpet av året. Innholdet i rapporten ble i tillegg fremlagt og diskutert på en egen sesjon på FHF's årsmøte på Gardermoen den 26. november 2012. Innspill fra denne sesjonen og videre innspill fra styringsgruppen er nå innarbeidet i den endelige rapporten.

Rapporten inneholder:

- 1) Kort punktvis oppsummering av forslag til tiltak
- 2) Kortversjon (executive summary) som gjennomgår hvordan genominformasjon kan brukes til å forstå biologiske prosesser og hvordan slik informasjon kan brukes for å løse utfordringer i havbruksnæringen og tiltak som må gjennomføres.
- 3) En dypere gjennomgang av utfordringer og tiltak, i forbindelse med fysiologiske og ernæringsmessige utfordringer, sykdom, bruk av modellfisk, utdanning og organisering av sekvensinformasjon i en Laksebase.

Bergen 1.02.2013

Jon Vidar Helvik

1. Oppsummering

Sekvensen til laksegenomet er nå i ferd med å bli kartlagt. Informasjon om struktur og funksjon til laksegenomet vil ha stor betydning for å løse utfordringene som havbruksnæringen står overfor, men det krever en langsiktig investering og strategi for å utnytte denne kunnskapen. Denne evalueringen er en analyse av hvordan informasjonen som ligger i laksegenomet i vid forstand kan brukes best mulig for å videreutvikle norsk havbruksnæring.

- Målet med kartleggingen av laksens genom har vært å frembringe et høykvalitets referanse-genom, slik at en kan vite hvilke gener og derigjennom proteiner laksen har, og bedre legge grunnlaget for å studere hvordan disse genene er organisert, regulert og hvor det finnes genetisk variasjon.
- Sekvenseringen av laksens genom, og kunnskap om uttrykte gen, proteiner og interaksjonen mellom dem (systembiologi) gir grunnlag for å lage bedre verktøy for:
 - Mer effektiv avl, - ved mere kunnskapsbasert seleksjon for spesifikke egenskaper
 - Bedre kontroll med produksjonsbiologi, - ved bruk av markører som predikerer fiskens fysiologiske status
 - Videreutvikling av fiskeernæring, - ved at nye fôrkilder tas i bruk
 - Bekjempelse av sykdom og bedre fiskehelse, - ved bruk av markører for patogener og immunrespons
- Laksegenomet vil også være nyttig for akvakulturforvaltningen, bl.a. for å overvåke innslag av rømt laks i ville populasjoner, og for å kartlegge genressursene som fins hos villaksen.
- For å utnytte kunnskapen om laksens genom raskest mulig, vil det være en stor fordel å etablere et nasjonalt rammeverk i form av en forskningsplattform etter modell av zebrafisk (zfin.org).
- En felles forskningsplattform:
 - Bør utvikle en felles laksebase ("Salmonbase") der en lagrer og systematiser gen aktivitetsdata og kobler disse til genomstruktur, genetiskvariasjon og biologiske prosesser
 - Bør bidra til ytterligere å forsterke og videreutvikle forskningsmiljø
 - Bør inkludere prosjekter som bruker modellorganismen zebrafisk
 - Vil knytte sammen en rekke ulike forskningsprosjekt, og være felles møteplass for forskning, næringen og forvaltning
- En bør stimulere til å fornye utdanningssektoren innen akvakultur, fiskehelse, fiskeernæring og fiskebiologi til å inkludere fagområder som bioinformatikk og systembiologi.

Summary in English

The salmon genome has now been sequenced and assembled. The knowledge of the salmon genome structure and gene function will be important for solving challenges in salmon aquaculture. In order to fully take advantage from this knowledge, long term investment and strategy are needed. This evaluation is an analysis of how the salmon genome information, in broad sense, can be used for future development of Norwegian aquaculture.

- The aim of the salmon genom sequencing has been to generate a high quality reference sequence, to verify all salmon genes (including possible proteins), gene organisation and regulation. A reference sequence is also important for mapping genetic variation.
- Sequencing of the salmon genom, knowledge of gene expression, proteins and their interaction (systems biology) create a new and better toolbox for:
 - More efficient breeding, - using knowledge based selection for specific traits
 - Better control with biological production, - by using markers that predict the physiological status of the fish.
 - Developing fish nutrition, - by utilizing alternative feed resources
 - Fight diseases and improve fish health, - by using markers for pathogens and immune response.
- A sequenced salmon genome is also useful for aquaculture management, i.e. to follow interactions of escaped farmed salmon with wild populations and to map genetic resources in wild populations.
- To implement knowledge about the salmon genome quickly and efficiently, it will be beneficial to establish a national framework in form of a research platform similar to the zebrafish community (zfin.org).
- A common research platform:
 - Should develop a database “Salmon base” for storage and systematisation of gene activity data and connect this to genom structure, genetic variation and biological processes
 - Contribute to strengthen and improve research groups
 - Should include projects using the zebrafish model
 - Would connect various research projects and be a common meeting place for research, industry and management.
- One should stimulate to update the aquaculture, fish health, fish nutrition and fish biology education to include more bioinformatics and system biology.

Del 1 – Muligheter og bruk av laksegenomet

Kortversjon

2 Bakgrunn

2.1. Lakseproduksjon i den bioteknologiske tidsalder

Fisk blir en stadig viktigere kilde til human ernæring globalt. Norsk lakseproduksjon bidrar direkte til å forsyne befolkningen med sunne og næringsrike fiskeprodukter, og tall fra 2011 viser at norsk havbruksnæring solgte mer enn 1 million tonn laks. Indirekte representerer laksenæringen en unik kunnskapsbase på industriell produksjon av fisk hvor prinsippene for fiskehelse, ernæring, miljøovervåking, teknologi m.m. kan anvendes globalt. På linje med annen husdyrproduksjon er det i dag høye krav til velferd, miljøoptimalisering, produksjonseffektivitet og produktkvalitet. Bioteknologi og avl er blitt en stadig viktigere bidragsyter til moderne husdyrproduksjon, hvor produktoptimalisering og utvikling av vaksiner mot sykdom, samt systematisk produksjon av avlsdyr som har optimale egenskaper, står helt sentralt.

Suksessen av norsk havbruksnæring bygger på eksepsjonelt gode naturgitte forutsetninger, lang tradisjon innen fiskeri og marin sektor, samt innovative næringsaktører i kombinasjon med gode forskningsmiljøer som har fremskaffet den kunnskapen industrien har etterspurt. Utfordringene har vært mange, bl.a. av teknologisk karakter som å utvikle gode oppdrettsystemer, foredling og distribusjonssystemer. Biologiske utfordringer har bestått i å etablere en fundamental forståelse av fiskens biologi og miljøkrav, avle frem god produksjonsfisk, utvikle bedre fôr og bekjempe parasitter og sykdom.

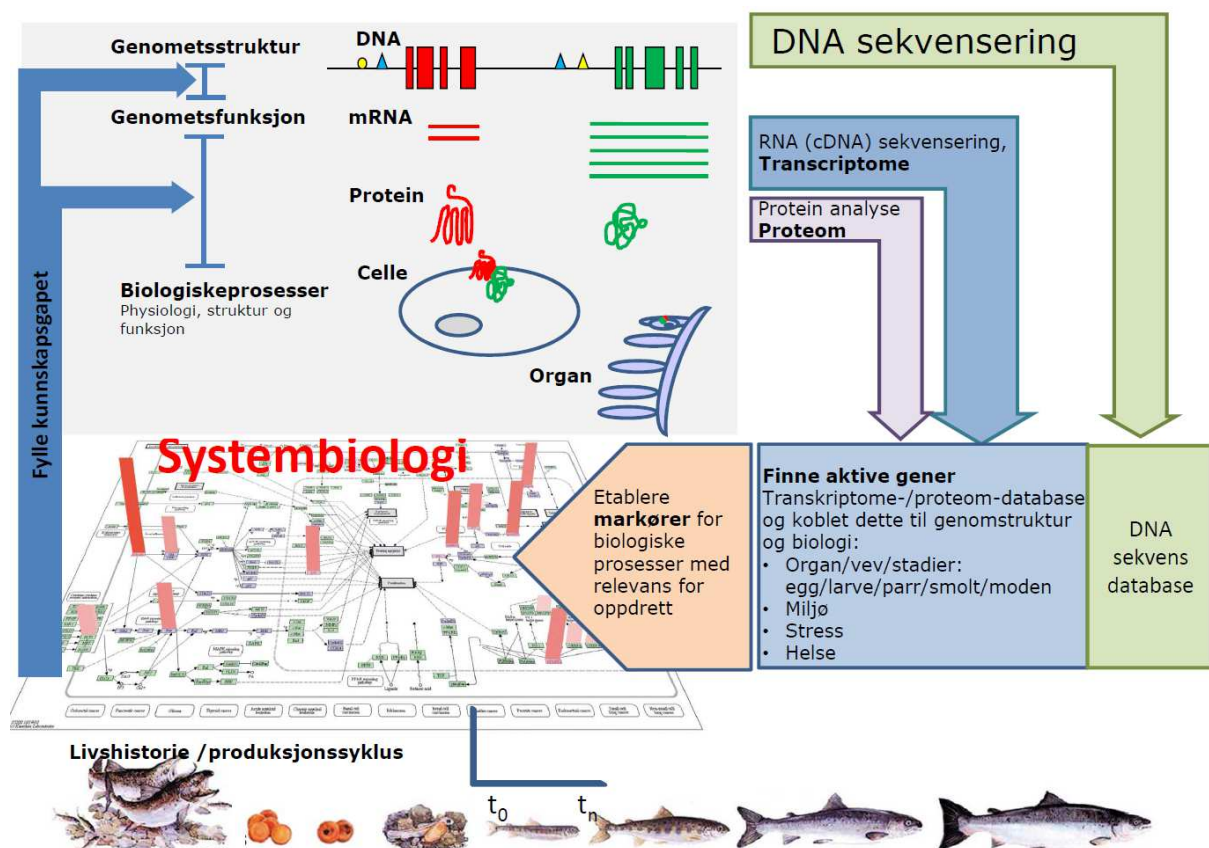
Biologisk forskning og forståelse er i en rivende utvikling, og en kan på mange måter si at en har vært igjennom et tidsskille i biologien ved sekvenseringen av det humane arvestoffet (genomet) - den «postgenomiske tidsalder» har startet. Stadig flere genomer blir sekvensert (<http://genome10k.soe.ucsc.edu/>), og moderne biologi tar i dag utgangspunkt i et fullstendig sekvensert genom når en kartlegger biologiske prosesser i en organisme. Genomene til flere fiskearter er nå kartlagt, inkludert modellarten sebrafisk og medaka. En ser også at stadig flere oppdrettsarter som tilapia, malle (catfish), havabbor (sea bass), regnbueørret og torsk er blitt eller er i ferd med å bli sekvensert. Laksegenomet er nå blitt sekvensert gjennom et internasjonalt samarbeid mellom Canada, Chile og Norge. I alt har Norge bidratt med omtrent 40 % av finansieringen hvor en hoveddel kommer fra næringen gjennom forskningsfondet FHF og næringsaktørene Marine Harvest, Cermaq, Aqua Gen og SalmoBreed.

Denne rapporten er en analyse av de muligheter som ligger i bruk av laksegenomet for å gjøre havbruksnæringen mer slagkraftig med henblikk på næringsrettet biologisk forskning og avl, samt å peke på hvordan norsk havbruksnæring, ved å samle innsatsen på sentrale problemområder, kan bygge opp en felles kunnskapsplattform omkring laksegenomets struktur og funksjon for på den måten å være bedre rustet til å løse utfordringene innen produksjon og havbruksrelatert leverandørindustri.

2.2 Hvilken informasjon ligger i laksegenomet og hvordan koble det til biologi?

Målet med kartleggingen av laksens arvestoff (genom) har vært å frembringe et høykvalitets referanse-genom, slik at en kan vite hvilke gener og proteiner laksen har, samt å gi strukturell informasjon om hvordan gener og regulatoriske elementer som styrer genuttrykk er organisert.

Genomets struktur (Fig 1) er på mange måter det rammeverket som begrenser og styrer biologiske prosesser. For å få innblikk i hvordan genomet fungerer (funksjonell genomikk), må en ha informasjon om hvordan ulike gener er uttrykt under ulike abiotiske og biotiske forhold, i ulike utviklingsstadier, vev og livsstadier. Genuttrykket bestemmer hvilke proteiner som produseres for å utføre biologiske prosesser under gitte betingelser. Dette kan studeres på to nivåer: 1) transkriptomanalyser hvor en ser på mRNA nivå og 2) proteomanalyser hvor en detekterer hvilke proteiner som finnes. Denne informasjonen kan da kobles til biologiske prosesser.



Figur 1. Et biologisk system fungerer ved at organenes celler utfører biologiske prosesser. Den sentrale faktoren i biologiske prosesser er proteiner. Oppskriften til proteinenes oppbygning (aminosyresekvens) er kodet i DNA som gener. Proteinene blir dannet ved at gener blir slått på og en får dannet mRNA, som brukes som templat for å danne proteiner. For laks begynner en å få oversikt over genomets struktur (DNA sekvens). Geners aktivitet vet vi lite om. Men nye RNA sekvenserings teknikker gir rask innblikk i mengden mRNA av alle aktive gener, og dermed informasjon om hvilke gener som er aktive. I arbeidet med å forstå biologiske prosesser som er viktig for havbruk er genaktivitet sentralt. Ved hjelp av systembiologi (gen-nettverk) kan en få innblikk i hvordan ulike faktorer (f.eks salttoleranse) påvirker hele systemer fremfor rollen til enkeltfaktorer, og deretter bruke dette til å finne markører for prosesser en vil ha kontroll over (smoltifisering).

På et molekylært nivå er biologiske prosesser et samspill av interaksjoner i celler og mellom celler, hvor ulike signalproteiner er den viktigste faktoren som utfører og regulerer disse prosessene. Nettverkene og reaksjonsveiene av proteiner som utfører en prosess er ofte konservert i levende organismer, som resulterer i at prosessene hos sebrafisk, mus og menneske har store likheter. Forskning som skjer på dette området kalles systembiologi, og innebærer at en kartlegger disse nettverkene. Dette er viktig kunnskap som kan utnyttes til å forstå laksens biologi og dermed bidra til å løse utfordringer innen havbruksnæringen. Når en kjenner nettverkene, vil en kunne velge noen sentrale faktorer som markører på en gitt biologisk prosess og bruke disse som en presis indikator på fiskens fysiologiske status.

Å løse utfordringene innen lakseproduksjon er enklere når en forstår de bakenforliggende biologiske prosessene. Et kjent eksempel er smoltkvalitet som i stor grad bestemmes av evne til sjøvannstoleranse (osmoregulering), en prosess hvor gjellene er svært viktig. Gjeller er sammensatt av tusener av celler, men bare et fåtall celletyper bygger opp gjellevevet. Hver av disse celletypene har spesifikke funksjoner, f.eks. er det kloridceller som regulerer fiskens nivå av klorid uavhengig av om fisken befinner seg i ferskvann (klorid lekker ut av fisken) eller i sjøvann (klorid trenger inn i fisken). Alle cellene i en organisme har det samme arvematerialet (DNA), men hvilke gener som er aktive varierer fra celletype til celletype, f.eks. er genene for kloridhomeostase slått på i kloridcellene. Når et gen aktiveres, dannes mRNA som så blir brukt til å bygge proteiner av aminosyrer. Det er proteinene som deretter utfører de biologiske prosessene, f.eks. ionetransport i kloridcellene. Ved å måle mengde av et gitt mRNA eller protein som produseres, kan man derfor måle hvor langt f.eks. smoltifiseringen har kommet.

Et presist biologisk system er organisert av genomets struktur (DNA sekvens, hvilke gener finnes) via genomets funksjon (hvilke gener som er aktivert; uttrykker mRNA (transkriptom), og danner protein (proteom)) som utfører de biologiske prosessene. For å kunne koble genomets struktur med biologisk prosess, er det viktig å fylle gapet mellom struktur, funksjon og prosess. For osmoreguleringen sin del, vil det være å få kjennskap til hvilke osmoregulerende gener som finnes hos laks (struktur), hvilke gener som er aktive og danner mRNA og protein (funksjon), og hvordan disse proteinene utfører osmoreguleringen (biologisk prosess). Slik informasjon er avgjørende for å finne ut når systemet er aktivert og at det fungerer, eventuelt hva som ikke fungerer hos fisk med dårlig smoltkvalitet (hva gikk galt) og hvordan kan man stimulere dette på en effektiv måte (styrt smoltifisering). Slik informasjon vil være viktig for å kunne manipulere og aktivere, eller styre prosesser som smoltifisering. I prinsippet gjelder denne logikken for alle biologiske prosesser.

2.3. Hvem er dagens og fremtidens brukere av informasjonen som ligger i laksegenomet?

I Universitets- og instituttsektoren er informasjonen i laksegenomet allerede tatt i bruk for å finne markører og kartlegge mekanismer for ulike biologiske problemstillinger som er viktig for lakseprodusentene og hele næringen. I avlsselskapene tar en i større grad bruk av markør- og genom-assistert avl hvor en kartlegger spesifikke egenskaper. Markørene brukes for å selekttere avlsfisk som gir et avkom med ønskede egenskaper som f.eks. sykdomsresistens, hurtig tilvekst og/eller god innfarging. Kjennskap til laksens genomsekvens vil bl.a. gjøre det mye lettere å koble markører til underliggende gener. Vaksineprodusentene har behov for å forstå hvordan laksens immunsystem

responderer på patogener og hvor effektive vaksiner er for å hindre sykdom, samtidig som bivirkningene må holdes på et lavt nivå. Det er sentralt for fôrproducentene å utvikle og produsere fôr som gir god tilvekst og helse. Økt forståelse for vekstmekanismer og fordøyelse er viktig for å utnytte og ta i bruk nye fôrkomponenter. Flere firma leverer biologiske analysetjenester innen f.eks. fiskehelseovervåkning som er viktig for optimal produksjon og sykdomsforebygging.

3 Bruk av laksegenomressursene

3.1 Genomikk og produksjonsbiologi

Kjennskapen til laksegenomsekvensen kan brukes for å enten lage nye, eller forbedre eksisterende verktøy som kan løse viktige utfordringer i havbruksnæringen knyttet til produksjonsbiologi, helse og avl. Kunnskap om hvilke gener som styrer ulike biologiske prosesser kan brukes til å lage indikatorer der uttrykket av et mindre antall gen i et vev sier noe om status på fisken. *Noen av de mest aktuelle bruksområdene innen produksjonsbiologi er:*

Smoltkvalitet: En signifikant del av tapet i matfiskanlegg skjer tidlig i sjøfasen og er gjerne knyttet til suboptimal smoltifisering. Grunnleggende kunnskap om smoltifisering og desmoltifisering på gen-nivå kan brukes til å lage bedre markørsett for disse prosessene, slik at en kan få en mer sikker og robust testmetode sammenlignet med dagens metoder som bygger på å måle enzymaktivitet i gjellene.

Vekstpotensial hos laks: Veksthastigheten hos laks i oppdrett er blitt kraftig forbedret de siste 30 årene grunnet både avl for raskere vekst, bedre oppdrettsmiljø og bedre fôr. Gjennom kartleggingen av variasjon i arvestoffet mellom ulike familier og individer, og mellom vill og oppdrettet laks kan en finne genetiske markører som er koblet til bl.a. bedre vekst og bedre fôrutnyttelse. En kan også finne hvilke gen som er høyere uttrykt i ulike vev hos laks med høy vekstrate eller høyt vekstpotensial, og dermed bedre forståelsen av hvorfor noen laks vokser bedre enn andre, og om det er negative bivirkninger koblet til høy vekstrate.

Fôr og ernæring: Fôret som brukes i laksenæringen er i stadig utvikling (økt bruk av ikke-marine fett/oljekilder, og proteiner), og det er behov for å dokumentere hvordan ulike fôrtyper virker inn på bl.a. helse/tarmhelse, fôrutnyttelse, vekst og kvalitet. Det er forsket betydelig på dette temaet de seinere år, og ved å identifisere hvilke gener og reaksjonsveier som blir påvirket av ulike fôr og fôr-ingredienser, vil en kunne etablere molekylære indikatorsett som vil kunne bli brukt under utprøving av nye fôr. Dette kan også gi grunnlag for å effektivisere utviklingen av nye spesialiserte fôr for å stryke fisken helse, økt tilvekst, eller for å få bedre produktkvalitet.

Produksjonslidelser og stress: I dag måler en ofte hormonet kortisol i blodet hos laks som et mål på stress. Denne metoden har imidlertid en del begrensinger, spesielt ved påvisning av langvarig kronisk stress. Ved å kartlegge gen som er påvirket av langtidsstress kan en finne gode molekylære markører. En kan også studere genetiske forskjeller mellom individer og grupper av fisk som har ulik evne til å mestre stress, og f. eks. finne genetiske markører for høy stressmestring i oppdrett.

Velferdsindikatorer: Fiskevelferd er et sammensatt og komplekst begrep. Miljøforhold som regnes som negative for fiskens velferd, som for eksempel lave oksygennivå, kan gi endret genuttryksprofil. Dette kan være grunnlag for molekylære markører som kan brukes til å påvise slike tilstander i en fiskepopulasjon.

Varsling av tidlig modning: Tidlig kjønnsmodning slår fremdeles inn på noen lokaliteter og i noen år, spesielt ved høy sjøtemperatur. En rekke av genene som setter i gang kjønnsmodning er nå kartlagt hos laks, og dette kan være grunnlag for metoder for tidlig påvisning av modning ved å måle genuttrykk i ulike vev. Identifisering av genet eller genene som bestemmer laksens kjønn kan også være nyttig kunnskap innenfor reproduksjonsteknologier.

Indikator for eggkvalitet: Eggkvaliteten varierer hos laks, og særlig overmodning kan forårsake deformiteter hos yngelen. En har få gode indikatorer på eggkvalitet i fisk, men molekylære metoder kan påvise overmodning, og det er mulig at en kan finne markører som kan si noe om risiko for feilutvikling.

Steril fisk: Rømt oppdrettslaks kan krysse seg med villaks - og dermed potensielt påvirke de genetiske/epigenetiske egenskapene hos villaks. For å forhindre slik påvirkning kan steril laks være en god løsning. Triploid laks er steril og en mulig løsning for kommersiell bruk, men det gjenstår en del optimalisering før denne laksen har like gode produksjonsegenskaper og velferd som vanlig laks. Ved å studere genuttryksprofiler i steril triploid laks kan en få en bedre forståelse for hvilke miljøkrav og hvilket fôr denne fisken trenger. Kartleggingen av laksens arvestoff kan også gi grunnlag for å finne nye måter å lage steril fisk, som for eksempel ved vaksinerings mot viktige reproduksjonsproteiner.

3.2 Genomikk og forsvar mot sykdom (sykdomsmekanismer - forsvarsmekanismer)

Sykdomsfrembringende organismer utgjør en stadig trussel for lakseoppdrett. Ifølge helserapporten for 2011 fra Veterinærinstituttet er det i hovedsak virus som er problemet, da vi har utviklet effektive vaksiner mot de bakteriesykdommene som herjet på 1980-tallet. Så hvorfor kan vi ikke lage tilsvarende gode vaksiner mot virus? En forklaring kan være at vi må aktivere andre forsvarsmekanismer for å få en beskyttende vaksine mot virus, og at vi ennå ikke har klart å finne vaksineprinsipper som stimulerer disse responsene, til dels fordi mye av laksens immunforsvar fortsatt er ukjent.

Innen humanmedisin og veterinærmedisin har man gjennom lang tid utviklet kunnskap om immunsystemet og verktøy for å måle immunresponser. Også hos laks har vi studert immunforsvaret i mange år, primært med molekylære metoder, slik at vi kjenner sekvensen til mange av immunmolekylene. Men til tross for at det er mange likheter mellom immunforsvaret til menneske og laks, er det også såpass mange forskjeller at vi ikke kan gjette oss til funksjon tuftet alene på det vi vet fra pattedyr. Om enn i liten skala, har vi begynt å etablere verktøy for å studere funksjonen til mange av immunmolekylene.

For laksefisk utgjør den ekstra fordoblingen av genomet (tertraploidisering) for en del titalls millioner år siden en kompliserende faktor, ettersom mange gen finnes i to relativt like utgaver. Eksempelvis vil dette kunne føre til unøyaktige målinger dersom verktøyet man bruker ikke fanger opp begge

variantene. Mangel på enhetlig nomenklatur er generelt en kompliserende faktor som vanskeliggjør sammenligning av resultater mellom forskjellige studier.

Ny teknologi gjør at vi i dag kan sekvensere både genomer (hele arvemassen til en organisme) og transkriptomer (alle uttrykte genvarianter) i løpet av dager. Når laksegenomet nå er sekvensert kan vi systematisere de data vi allerede har mht. immungener. Antall genvarianter kan da gjenspeiles i en enhetlig nomenklatur som standardiseres innenfor alle laksefisk. Slik kan en også sammenligne responser mellom ulike arter. Vi kan også kartlegge elementer som regulerer uttrykk av gener (promoter, enhancer etc.).

For å kunne nyttiggjøre oss eksisterende og fremtidige sekvensdata må dataen systematiseres og gjøres tilgjengelige i en database via web. Dette danner fundamentet for søkemotorer hvor en effektivt kan analysere transkriptomer og derved bidra til økt forståelse av hvilke responser som virker beskyttende mot ulike patogener.

Vaksinetesting: Vaksiner må testes både for beskyttelse mot en gitt smitte - og for uønskede bivirkninger. Bedre kunnskap om de viktigste genene som blir aktivert av f. eks. ulike virus og bakterier, kan brukes til å finne molekylære indikatorer som viser hvilke immunreaksjoner som blir mest aktivert – og som kan si noe om mulig beskyttelse og bivirkninger av gitte vaksiner.

Sykdomsdiagnostikk og påvisning av nye smittestoff: Kunnskap om genomsekvensen til ulike virus og bakterier brukes allerede i dag til påvisning og kvantifisering i laks. Dette har gitt ett viktig bidrag i arbeidet med å kunne iverksette sykdomsforebyggende tiltak i rett tid, tilpasset den aktuelle trussel. Kunnskapen om laksens arvestoff kan i tillegg være grunnlag for å identifisere ukjente typer smitte/parasitter ved metagenomisk analyse.

En kartlagt laksegenomsekvens bidrar til å løse utfordringene ved at en lettere kan:

- Systematisere immungener («Immunomet») og utvikle brukervennlige web-verktøy til Immunom-analyser på DNA og protein-nivå
- Identifisere patogener da laksens genom kan "trekkes fra"
- Belyse multifaktorielle årsakssammenhenger, synergieffekter osv.
- Utvikle bedre vaksiner og vaksineringsstrategier

3.3 Genomikk og avl

Avlsarbeid de siste 50 årene har ført til store forbedringer av viktige egenskaper innen landbruk og akvakultur. Tradisjonelt har dette blitt oppnådd ved seleksjon av de beste avlsdyrene basert på dyrets egne prestasjoner og prestasjonene til dyrets slektninger. Klassisk seleksjonsavl gir en sikker og langvarig forbedring av egenskapene, men har sine klare begrensinger med hensyn til presisjon og rask genetisk framgang. Særlig gjelder dette forbedring av egenskaper som ikke kan registreres på seleksjonskandidaten. Et godt eksempel på dette er genetisk forbedring av resistens mot mange sykdommer innen akvakultur. Tradisjonelt medfører dette en omfattende smittetesting av slektninger til avlsfisken, noe som medfører store kostnader for avlsselskapene og har dyrevelferdsmessige negative sider. Andre eksempler er egenskaper som best registreres etter at fisken er slaktet, og som dermed vanskelig kan måles på seleksjonskandidatene, som filetfarge,

fettinnhold og tekstur. Her vil også seleksjon basert på genominformasjon være til stor nytte for å kunne oppnå mer presis seleksjon og reduksjon av «genetisk etterslep», tiden det tar fra genetisk forbedring i avlskjernen til den overføres til fisken i merdene. Seleksjon basert på genanalyser gjør det også mulig å foreta individseleksjon direkte på stamfisken.

Tilgang på genomsekvens og andre nyvinninger innen storskala genomforskning har ført til nye og mer effektive seleksjonsverktøy som allerede har revolusjonert avlsarbeidet på husdyr. På storfe, som har en avlstruktur som er spesielt egnet for dette, regner man med at genombasert avl kan gi en dobling av genetisk framgang for sentrale egenskaper sammenliknet med mer tradisjonelle metoder. Med tilgang til referansegenomsekvens på laks vil man kunne forvente en liknende utvikling også innen lakseavl. Et utvalg av de beste avlsdyrene direkte på DNA-nivå, vil gi verdiskaping i form av raskere genetisk fremgang for viktige egenskaper, samtidig som man kan øke konkurransekraften til næringsaktørene i form av utvikling av nye produkter og foredlet merkevarebygging nasjonalt og internasjonalt.

Et godt eksempel på hvordan markørbasert seleksjon kan bidra til rask endring av en viktig egenskap i lakseoppdrett er arbeidet med infeksjøs pankreasnekrose (IPN). IPN var en av de første virussykdommene lakseoppdrettere fikk stifte bekjentskap med og sykdommen forårsaker fremdeles store tap for næringen. Banebrytende forskning for noen år tilbake framskaffet et sett av genetiske markører som gjør det mulig, ved hjelp av enkle DNA tester, å velge ut stamfisk som er tilnærmet resistent mot sykdommen. Bruk av avkom etter 'IPN resistent' stamfisk kan gi betydelige gevinster for den enkelte oppdretter i form av reduserte tap. Samtidig ser man at avlsselskapene er avhengig av å implementere teknologien for å beholde sin konkurransekraft. Seleksjon for IPN-resistens fungerer så bra fordi et område i genomet, også kalt quantitative trait locus (QTL), forklarer hele 80 % av den genetiske variasjonen i egenskapen. Genetisk forbedring av egenskaper med mer kompleks nedarving, eksempelvis et større antall QTLer med mindre effekter, vil måtte kreve en mer helgenombasert tilnærming. Analyse av simulerte datasett som etterlikner dagens avlsstruktur på laks tilsier at også for slike egenskaper er det mye å hente på genombasert avl sammenliknet med mer tradisjonelle metoder.

Bruk av genomikk i avl: Det er oppnådd stor framgang i produksjonsegenskapene hos laks med klassisk familie- og individbasert avl. Gjennom kartlegging av laksens arvestoff har en fått en rekke markører som blir brukt til markørassistert seleksjon, dvs. at en finner større eller mindre områder i arvestoffet som er koblet mot viktige egenskaper som motstand mot ulike virussykdommer. Ved å øke antallet genetiske markører til flere hundre tusen kan en gå videre med genombasert seleksjon, som kan gjøre avlsarbeidet enda mer effektiv og målstyrt. For å sikre en videre forbedring av lakseavlen er det viktig at man også investerer i funksjonell genomforskning for å avdekke mekanismene til genene og proteinene i hele arvestoffet - og å bedre forståelsen av hvordan disse samvirker til dannelsen av komplekse egenskaper.

3.4 Modellarter – funksjonell og komparativ genomikk

For å få en effektiv fremdrift i forskningen er en avhengig av å kunne sammenligne en mengde relevante resultat fra mange ulike forskningsprosjekt for å skape en helhetlig forståelse. En effektiv metode er å konsentrere basalforskningen om noen enkeltarter (modellarter) som er godt egnet for å studere biologiske systemer. Sebrafisk er i de senere årene blitt en svært viktig genetisk modell for

å studere biologiske mekanismer og sykdom (zfin.org; zebrafish.no). I Europa er det i dag over 350 laboratorier (hvorav 13 i Norge) som bruker sebrafisk, og på verdensbasis godt over 1000. Med genteknologisk verktøy kan en enkelt manipulere genomet til sebrafisken og dermed kartlegge enkeltgeners funksjon i alle utviklingsstadier hos en teleost fisk. Embryoutviklingen med vev og organdannelse kan enkelt følges i mikroskop. De fleste organer og vev er ferdigdannet etter bare fem døgn. Sebrafisk har kort generasjonstid (4 generasjoner/år; 12 generasjoner pr laksegenerasjon) og kan gyte 200 gjennomsiktige egg hver uke. Genomet til sebrafisk er sekvensert og kartlagt, og av de 25.000 genene en finner hos sebrafisk har langt over halvparten sin motpart i menneske, og flere studier viser funksjonelle likheter mellom sebrafisk og menneske.

Når sebrafisk kan være en utmerket modell for menneske er det klart at den er en god modell for andre fisk som laks. Sebrafiskmodellen gir anledning til å teste store prøvepaneler for å sammenligne vaksinekandidater (epitoper, genkonstrukt mm), kartlegge faktorer som effekt av konsentrasjon, synergi/antagonisme med andre reagenter etc, for å redusere antall tids- og kostnadskrevende eksperimenter i mållarten.

Systembiologi er en ny vitenskap hvor en kartlegger nettverkene av gener og genprodukter i en biologisk prosess. Kartleggingen av slike nettverk i sebrafisk er en viktig mal for å kunne kartlegge og forstå biologiske nettverk også hos laks som har relevans innen havbruk. Ved å overføre kunnskap som etableres i sebrafisk til akvakulturarter (translasjonsforskning), vil en kunne få økt forståelse av ulike fysiologiske og biologiske prosesser på en effektiv måte.

Områder hvor sebrafisk vil kunne bidra direkte med informasjon gjennom *komparativ og funksjonell genomikk*:

- Forenkle og fremskynde annotering av laksegenomet
- Komparativ og funksjonell epigenomikk, kartlegge funksjonen til ikke kodende RNA
- Koble SNPer til funksjon
- Kartlegge mekanismer som styrer tidlig utvikling, organdannelse og pubertet
- Utvikle steril oppdrettsfisk
- Få dypere forståelse av immunsystemet, enkelte sykdomsmekanismer og vaksine-strategier
- Utvikling av nye strategier for profylakse og bekjempelse av sykdom
- Få dypere forståelse av fordøyelse, metabolisme og vekst, for å optimalisere nye (ikke-marine) fôrråvarer og fôrutnyttelse
- Kartlegge mekanismer for biologisk respons av miljø: lys, temperatur, CO₂/pH (klimaendringer), ioner ol.

3.5 En felles «Laksebase» for genomets struktur, funksjon og biologi (SalmonBase.org)

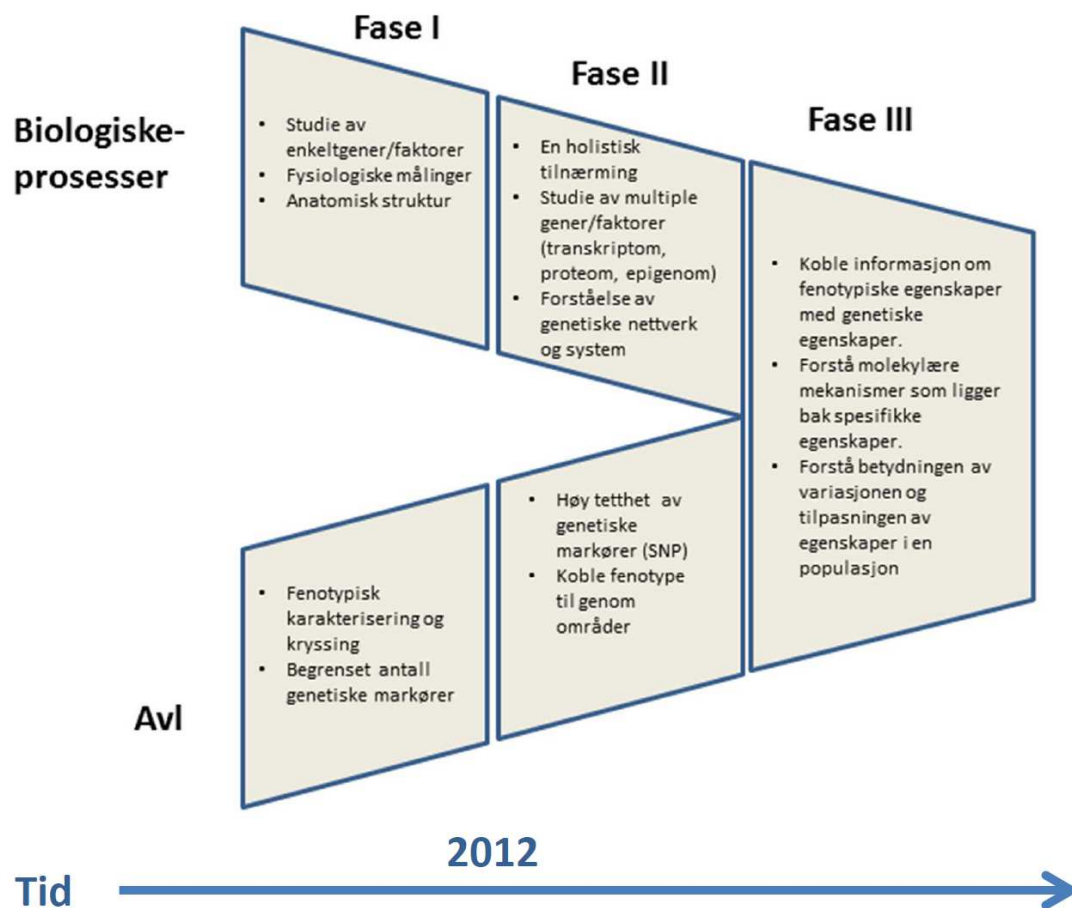
I dag mangler det en oversikt over hvilke gener og gen-nettverk som er viktig for ulike havbruksrelevante biologiske prosesser. Laksenæringen trenger å optimalisere og styre produksjonen gjennom ulike livsfaser, både i ferskvann og i sjøvann. Fisken må trives, vokse optimalt og utnytte fôret effektivt, i tillegg til å ha høy motstand mot sykdom. Altså, er det et stort antall biologiske prosesser og nettverk som inngår. Å få en total oversikt over dette er meget krevende, men ny sekvenseringsteknologi og kunnskap om genomstruktur, genomfunksjon og systembiologi gjør at en i dag kan få et innblikk i disse prosessene på en mer holistisk måte enn tidligere (systembiologi).

Løsningen på utfordringen med å koble biologisk prosess med genomets struktur ligger i å investere i og bygge opp en felles "**SalmonBase**" som inneholder informasjon om hvilke gener som er aktive i ulike organ, vev og utviklingsstadier, samt å kartlegge hvordan aktiviteten av disse genene endres under ulike betingelser som; miljø, ernæring, sykdom ol. Slik informasjon vil være uhyre viktig for å kartlegge relevante biologiske prosesser, og for å finne markører som er viktig for å overvåke produksjonen. Slik overvåkning kan f.eks. være; om genene som styrer sjøvannstoleranse er skrudd på, har det vært patogener som har aktivert sykdomsmekanismer, eller er genene for kjønnsmodning aktivert?

Hvert vev og hver tilstand har et distinkt transkriptom som både overlapper og skiller seg fra andre vev og celletyper. Utfordringene med analyser hvor en henter informasjon fra hele genomet ved å sekvensere transkriptomet er at en får store datamengder som må lagres på en systematisk og lett tilgjengelig måte. I tillegg må en ha et godt verktøy for å analysere datasettet (bioinformatikk). Denne informasjonen vil være svært interessant for å løse ulike oppdrettsrelaterte problemer. Det anbefales å samle all transkriptom sekvensdata i en stor felles database, som også inneholder nøyaktig katalogisert informasjonen om forsøksoppsett og det biologiske materialet dataen er hentet fra. Dermed vil en få en unik mulighet til å kartlegge hvordan ulike gener er uttrykt i ulike vev, på forskjellige utviklingsstadier og ved endrede omgivelser. En mangfoldig transkriptomdatabase vil være avgjørende for å kartlegge hvordan miljø, sykdom og andre faktorer påvirker fisken, og til å finne markører for mange spesifikke prosesser og bruke disse til å kartlegge enkeltfisk, populasjoner av fisk (de som vokser fort mot de som vokser seint). Slik kan en fremskaffe en mest mulig robust fisk for oppdrett.

Immungenene er meget komplisert organisert hos laksefisk og bør derfor samles i en egen database koblet til **SalmonBase**. For å kunne få til en god immundatabase må en standardisere nomenklatur på tvers av laksefisk, og dette krever et felles internasjonalt løft. Enkelte immungenfamilier er også utrolig komplekse (slik som TRIM eller NK-reseptorer) og dette krever en betydelig innsats fra både immunologer og molekylærbiologer for å komme frem til en enhetlig forståelse av genfamiliene. Det eksisterer allerede internasjonale arenaer innen marin immunologi med forskere som har spesialisert seg på gitte immungener. Det vil derfor være nødvendig at de kommer med innspill på nomenklatur innenfor sine spesialfelt.

Dagens kunnskap om laksens biologi bygger på en lang rekke eksperimentelle forsøk, fysiologiske målinger, anatomiske studier og molekylære analyser. Samtidig har avlsarbeidet foregått ved krysning av fisk med egnet fenotype hvor en hadde få genetiske markører. Som vist i Figur 2. utvikler både biologisk forskning og avlsforskning seg i retning av å bruke mer genomisk informasjon. I **Fase I** har en i stor grad brukt informasjon om enkeltgener for å forstå biologiske prosesser, mens en nå beveger seg mot analysing av genetiske nettverk (**Fase II**).



Figur 2. Hvordan biologisk kunnskap og klassisk avlsarbeid går mot et felles mål og gjensidig nytte, for å øke kunnskapen, og for å avle frem en optimal laks med kjente egenskaper.

I avlsarbeidet bruker en nå genomet til å kartlegge tusentalls genetiske markører (SNPs) slik at en kan koble fenotypisk fremgang til område(er) på genomet. En vil da kunne koble detaljert informasjon om genetiske nettverk som styrer biologiske prosesser (**Fase III**) med detaljert informasjonen om genomområder/gener som er viktig for spesifikke egenskaper og hvilke alleler (genvarianter) som gir en spesifikk egenskap. Med en slik oversikt vil en da kunne spesifikt lete i naturen etter laksestammer hvor evolusjonen har selektert frem varianter som har ønskede egenskaper, som f.eks. et robust immunforsvar.

4 Konklusjoner

Lakseproduksjon er kompleks og må bygge på en bred forståelse av laksens genetikk og biologi. Denne evalueringen fokuserer på hovedområder som er en utfordring for laksenæringen og hvor genominformasjon er sentralt for videre utvikling. Prinsippene og strategisk bruk av genominformasjonen vil også være gyldig for biologiske problemstillinger som ikke er nevnt i rapporten.

4.1 Strategiske satsinger

Ny kunnskap om laksens biologi, som har høy relevans for havbruksnæringen, vil komme som en følge av at forskerne nå har mye bedre verktøy for å studere biologiske prosesser ved inkludering av alle relevante faktorer/gener. Et viktig grunnlag for denne typen forskning er at man systematisk samler inn den informasjonen som er og vil bli generert i enkeltstående forskningsprosjekt. Informasjonen blir så gjort lett tilgjengelig for andre forskere og næringsaktører, på linje med det man har gjort i andre arter og andre fagområder som f.eks. innen kreftforskning og lignede.

Informasjon om struktur og funksjon til laksegenomet vil ha stor betydning for å løse utfordringene som havbruksnæringen står overfor, men det krever en langsiktig strategi for å utnytte denne kunnskapen. Kompleksiteten i genomikk og biologiske mekanismer er av en slik karakter at en bør satse på både grunnforskning, translasjonsforskning (overføring av kunnskap fra grunnforskning til praktisk anvendelse) og ren anvendt forskning for å utnytte mulighetene denne kunnskapen gir. Den internasjonalt sterke stillingen norsk akvakulturnæring har i dag, gjør det naturlig at Norge er en pådriver for å videreutvikle laksenæringen. Bruk av genomikk og biologisk kunnskap er her avgjørende.

Å finne koblingene mellom produksjonsegenskaper og enkelt gen, eller biologiske prosesser, vil muliggjøre utnyttelse av kunnskapen innen relevante deler av næringen. Industrien får også bedre markører til å kartlegge hva som går galt, og kan dermed lettere løse disse utfordringene ved å iverksette tiltak rettet mot det aktuelle problemet.

4.2 Tiltak

- Målet med kartleggingen av laksens genom har vært å frembringe et høykvalitets referanse-genom, slik at en kan vite hvilke gener og derigjennom proteiner laksen har, og legge bedre grunnlag for å studere hvordan disse genene er organisert, regulert og hvor det finnes genetisk variasjon.
- Sekvenseringen av laksens genom, og kunnskap om uttrykte gen, proteiner og interaksjonen mellom dem (systembiologi) gir grunnlag for å lage bedre verktøy for:
 - Mer effektiv avl, - ved mer kunnskapsbasert seleksjon for spesifikke egenskaper
 - Bedre kontroll med produksjonsbiologi, - ved bruk av markører som predikerer fiskens fysiologiske status
 - Videreutvikling av fiskeernæring, - ved at nye fôrkilder tas i bruk
 - Bekjempelse av sykdom og bedre fiskehelse, - ved bruk av markører for patogener og immunrespons
- På relativt kort sikt er det en rekke molekylære verktøy som kan utvikles for bruk i avls-, vaksine-, fôr- og oppdrettsselskap, samt i spesialiserte firma som leverer tjenester til havbruksnæringen.
- Eksempler på slik kunnskap kan være å skreddersy tilsetningen av ulike immunstimulerende fôringredienser avhengig av fiskens fysiologiske tilstand og den aktuelle trusselsituasjonen.
- Utnytte sesongvariasjon og ulike fiskestørrelsers kapasitet til å utnytte fôret optimalt for hurtigst mulig tilvekst.

- Laksegenomet vil også være nyttig for akvakulturforvaltningen, bl.a. for å overvåke innslag av rømt laks i ville populasjoner, og for å kartlegge genressursene som fins hos villaksen.
- For å utnytte kunnskapen om laksens genom raskest mulig, vil det være en stor fordel å etablere et nasjonalt rammeverk i form av en forskningsplattform etter modell av zebrafisk (zfin.org).
- En felles forskningsplattform:
 - Bør utvikle en felles laksebase ("Salmonbase") der en lagrer og systematiser genaktivitetsdata og kobler disse til genomstruktur, genetisk variasjon og biologiske prosesser
 - Vil være en effektiv måte å øke tilgangen til og systematisere informasjonen i laksegenomet, genomstruktur, genaktivitet, genetisk variasjon etc.
 - Bør inkludere støttefunksjoner på fellestjenester innen datalagring, bioinformatikk og systembiologisk verktøy.
 - For å bidra til ytterligere å forsterke og videreutvikle forskningsmiljø innen fiskebiologi/sykdom/avl, som har kompetanse inn mot sentrale avls-, produksjons- og helsemessige utfordringer i laksenæringen.
 - Ved å koble forskning på laks med modellorganismer som sebrafisk, vil en også kunne få en raskere kunnskapsoppbygging i laks på en rekke områder som kartlegging av genetiske nettverk med relevans for utfordringer i havbruk.
 - Vil knytte sammen en rekke ulike forskningsprosjekt, og være felles møteplasser der ulike forskningsmiljø, næringen, akvakulturforvaltningen og andre interessenter møtets jevnlig for å presentere og diskutere resultater, samt å utvikle gode forsknings- og implementeringsstrategier.
- En bør stimulere til å fornye utdanningssektoren innen akvakultur, fiskehelse, fiskeernæring og fiskebiologi til å også inkludere fagområder som bioinformatikk og systembiologi.

Del 2 Muligheter og bruk av laksegenomet,

Gjennomgang av utfordringer og mulige tiltak

5 Status og utfordringer

5.1 Bakgrunn for sekvenseringen av laksens genom, strategi og resultat

Utviklingen de siste 10-15 årene, der arvestoffet (genomet) til mennesket, samt en del dyr, planter og mikroorganismer er blitt helt eller delvis kartlagt, har åpnet for helt nye muligheter til å studere biologiske og fysiologiske prosesser. Vi har beveget oss inn i en ny tid, populært kalt den 'postgenome tidsalder', der kunnskap og teknologi baner vei for å finne ut funksjon til gener og proteiner i hele arvestoffet, samt forstå hvordan de samvirker i et "globalt" perspektiv, både i celler, organer og organismer. En detaljert kartlegging av genomene til viktige produksjonsarter har også dannet grunnlaget for utviklingen av nye og mer effektive seleksjonsverktøy som har revolusjonert det tradisjonelle avlsarbeidet på planter og husdyr. Så langt har mulighetene for å skape en lik utvikling i laks vært begrenset av tilgang på en genomsekvens av høy kvalitet.

FAKTABOKS: Hva er et genom og hvilken informasjon ligger der?

Alle organismer, både encellede og flercellede, har et genom som inneholder all biologisk informasjon som trengs for å bygge, vedlikeholde og reproducere organismen. Et genom kan derfor sies å være en arts totale sum av genetisk informasjon. Denne informasjonen i genomet blir kodet av deoksyribonuklein syrer (DNA) som består av fire ulike nukleotider (A, T, C og G) i en eller flere kjeder som er kveilet rundt histonproteiner i nukleosomer. Til sammen utgjør disse de strukturelle grunnene i **kromatin** og **kromosom**. Den komplette DNA sekvensen i et genom representerer den totale samling av gener som koder for alle proteiner, samt all RNA. I tillegg inkluderer genomet regulatorisk DNA samt DNA som ligger mellom gener (intergenisk DNA). Hvordan blir så en nyrecelle forskjellig fra en muskel celle dersom genomet i alle cellene er like? Svaret ligger i hvordan hver celle utnytter genomet. Mange gener koder for proteiner som kan binde til regulatorisk DNA og på den måten aktivere eller hemme ekspresjonen (uttrykk av mRNA/transkripsjonen) av andre gener. Hvilke gener som til enhver tid er uttrykt dikterer dermed morfologien og funksjonen til cellen. Nyere forskning viser at mer enn 80 % av genomet blir transkribert til RNA og begrepet gen blir ofte erstattet med en transkripsjonell enhet hvor ulike transkripter dannet fra samme region utgjør en felles enhet. Det komplette sett av gener/RNA som blir transkribert fra et genome blir kalt et **transkriptom**, mens det totale sett av proteiner kodet fra et genom blir kalt et **proteom**. Ulike celler og vev vil dermed også ha forskjellige transkriptom og proteom på ulike utviklingsstadium, eller ved forskjellige fysiologiske betingelser.

Genomforskning eller genomikk kan deles inn i strukturell genomikk som studerer strukturen, organiseringen og evolusjonen til genomer, og funksjonell genomikk som studerer ekspresjonen og funksjonen til genomer.

Atlantisk laks og andre laksefisk utgjør en gruppe beinfisk av meget stor betydning for akvakultur, sportsfiske og rekreasjon i en rekke land. Siden geninformasjon til en viss grad kan overføres mellom nært beslektede arter ved hjelp av komparativ genomanalyse, vil en høykvalitets referansegenomsekvens på Atlantisk laks også ha stor nytteverdi for forvaltning og industriell utnyttelse på øvrige laksefisk.. I tillegg til å ha en viktig økonomisk og samfunnsmessig betydning, er laksefiskene av stor interesse for forskning innen; evolusjonsbiologi, økologi, fysiologi, genetikk, immunologi, toksikologi, fysiologi og ernæring. Ingen andre virveldyr omfatter en liknende kombinert nærings og vitenskapelig oppmerksomhet.

FAKTABOKS: Sekvenseringen av genomet til Atlantisk laks

Arbeidet med å få finansiert en sekvensering av laksens genom startet opp i 2005. Første del av arbeidet var å etablere et internasjonalt konsortium med en sammensetning og nok finansielle midler til å produsere en referansesekvens av høy kvalitet. Dette arbeidet resulterte i etableringen av *"The International Collaboration to Sequence the Atlantic Salmon Genome – ICSASG"* i 2009. ICSASG inkluderer forskere, virkemiddelapparatet og industri fra Canada, Chile og Norge og har som hovedmålsetning å **produsere en genomsekvens som identifiserer og fysisk kartlegger alle genene i Atlanterhavslaks**. Norge bidrar med omtrent 40 % av finansieringen hvor en hoveddel kommer fra næringen gjennom forskningsfondet FHF og næringsaktørene Marine Harvest, Cermaq, Aqua Gen og SalmoBreed.

Selve sekvenseringsarbeidet er delt opp i to faser. I Fase 1 (som nå er slutført) har man generert en nær 4 ganger dekning av genomet ved hjelp av tradisjonell Sanger sekvensering. Sekvensene er generert fra ulike biblioteker (plasmider, fosmider og BACs) slik at en på best mulig måte kan sette sammen sekvensene til en god referansegenomsekvens. Referansegenomsekvensen fra Fase 1 er tilgjengelig i Genbank på <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/354459050>. I Fase 2 av prosjektet vil man generere enda mer sekvensdata ved hjelp av ny sekvenseringsteknologi og kombinere denne informasjonen med dataene fra Fase 1 til å lage en forbedret referansegenomsekvens. Når dette arbeidet er slutført i 2013 vil man integrere sekvensen med tilgjengelige fysiske og genetiske kart, annotere sekvensen (bestemme plassering og funksjon til genene i genomet) og gjøre informasjonen offentlig tilgjengelig via internett.

5.2 Fysiologi og ernæring

Innen fysiologisk forskning er salmonider blant de mest studerte fiskene hvor det finnes et bredt spekter av kartlagte fysiologiske systemer. Slike studier på laksefisk er svært fordelaktige både på grunn av laksens størrelse og at de er enkle å kultivere. Det at laks er en svært viktig art innen havbruksnæringen i Norge og ellers i verden, har resultert i en betydelig mengde forskning på ulike fysiologiske aspekter. For å få fullt utbytte av ulike genomiske teknikker, og da spesielt transkripsjonsstudier, er det viktig med godt gjennomtenkte og gjennomførte forsøksdesign.

Relevante tilnæringer kan være; kronologiske studier under stabile miljøforhold for å få kunnskap om hvilke gener som blir aktivert i ulike vev i forhold til utviklingsstadium, samt ulike former for eksperimentelle design der en endrer miljøfaktorer og sammenligner de ulike behandlingene på gitte tidspunkt etter intervensjon eller miljøendring. Laksen er godt egnet til slike eksperimentelle design, da det normalt er god overlevelse og mulig å gjøre godt kontrollerte forsøk på alle livsstadier.

Utviklingsbiologi og produksjonslidelser

Deformiteter og feildannelser i organer kan ofte detekteres hos oppdrettsfisk, mest sannsynlig grunnet feil ernæring og oppdrettsmiljø. Selv om en har klart å avdekke årsakene til en rekke slike lidelser i lakseoppdrett – og dermed kunne redusere forekomsten, har en fortsatt tidvis problemer med bla skjelettdeformiteter, katarakt og bløtvevsfeil. Innføring av nye teknikker som for eksempel bruk av triploid steril laks gir økt risiko for skjelettdeformiteter og katarakt, og en trenger derfor mer kunnskap for å forebygge og forhindre slike produksjonslidelser. En har tidligere sett at suboptimal temperatur på eggstadiet gir økt forekomst både av skjelett og bløtvevskader, og det er også vist

lignende effekter av stamfiskstress (kortisolinjeksjoner) på avkommet. Det er også vist at for lavt innhold av biologisk tilgjengelig fosfor gir skjellettdeformiteter hos laks i hurtig vekst, som nullårssmolt og triploid laks i ferskvannsfasen. Ved å kartlegge gennettverk og genuttrykk som regulerer normal utvikling av ulike vev og organer i laks, kan en skaffe en referanse for sammenligning av tilstander med høy risiko for produksjonslidelser. I tillegg til å kartlegge hvordan ulike miljøfaktorer inkludert ernæring virker inn på genreguleringen og risiko for feilutvikling, kan denne informasjonen kombineres med SNP studier for å avdekke genvarianter som gir mer robust fisk som igjen kan brukes til markørassistert avl.

Endokrinologi

En bedre forståelse av laksens endokrinologi, som omfatter både endokrin, parakrin og autokrin regulering, er en nøkkel for å forstå hvordan en hel rekke fysiologiske prosesser blir styrt gjennom ontogenesen, bli påvirket av ulike miljøfaktorer og oppdrettsprosedyrer. Dette gjelder en rekke prosesser som tidlig utvikling, kjønnsdifferensiering, fordøyelse- og appetittregulering, osmoregulering- og smoltifisering, stressfysiologi, aktivering- og modulering av immunresponser, generell metabolisme, vekstregulering og reproduksjon (pubertet og gyting). I tillegg kan fiskens atferd bli sterkt påvirket av endokrine prosesser. Laksens endokrinologi har stor likhet med andre beinfisk og vertebrater generelt, men har også særegenheter. Den store fordelen med å kartlegge laksens genom er at en får en oversikt over ulike gen- og reseptorvarianter, som er ekstra omfattende i laks på grunn av dens tetraploide fortid. Tidligere studier av hormonreseptorer har vist at en ikke alltid testet den aktive paraloge formen. I et samspill med det internasjonale fiskeendokrinologimiljøet, og med god kobling mot tilsvarende kartlegging i bl.a. pattedyr, kan en ved hjelp av laksegenomet identifisere hormonreseptorer i en helt annen skala. En kan også undersøke regulatoriske element i tilknytning til genene som koder for de ulike hormonene og signalmolekylene. Slik grunnleggende kunnskap vil være en nøkkelfaktor for å kunne studere optimalisering av fysiologiske prosesser og forstå betydningen av oppdrettsmiljø og genetisk bakgrunn

Vekstfysiologi

Vekst, appetitt og fôrutnyttelse er sentrale egenskaper i lakseoppdrett, og har vært studert i detalj både i forbindelse med avl, miljøforbedringer inkl fôr og ernæring, og til og med forsøk med veksthormon-transgen laks. Hurtig vekst er vanligvis assosiert med god fôrutnyttelse, og dagens oppdrettsfisk vokser betydelig fortere enn sitt villaksopphav under identiske miljøbetingelser på grunn av målstyrt avlsarbeid. I tillegg har miljøet stor betydning for veksten. Fôr og fôrtilgang er miljøfaktorer som åpenbart er viktig for vekst, men andre miljøfaktorer som lysperiode (daglengde) og saltholdighet er også viktig for laksen. Spesielt er det vist at daglengden er viktig for å regulere veksten i både ferskvann og saltvannsfasen, delvis gjennom å påvirke smoltifisering og kjønnsmodning, men også direkte ved å påvirke appetitt og plasmanivåene av bl.a. veksthormon. Sammenligning av veksthormon-transgen domestisert laks med vill laksefisk viser en liten effekt av ekstra veksthormon i laksefisk som har vært gjennom mange generasjoner med avl for hurtig vekst.

Dette tyder på at veksthormonavhengige prosesser er sentrale når en avler for hurtig vekst og god fôrutnyttelse. Sekvenseringen av laksens genom gir mulighet til å studere gennettverk som styrer og påvirker vekst og fôrutnyttelse direkte, og samspillet med andre prosesser som smoltifisering og pubertet som betydelig modulerer/påvirker veksten hos laks. Ved å kombinere dette med analyse av SNPer som er assosiert med hurtig vekst, eller som for eksempel er veldig forskjellige mellom vill og oppdrettslaks, kan en få bedre forståelse for hvilke prosesser og gen som er blitt påvirket gjennom domestisering og avl. Dette kan legge til rette for enda mer målstyrt markørassistert avl for hurtig vekst, samtidig som slik forståelse kan bidra til å forhindre at en selekterer fram uheldige bivirkninger ved høy vekst, som for eksempel økt risiko for skjelett-deformiteter. Analyse av slike gennettverk kan også gi verdifull kunnskap om hvordan miljøfaktorer påvirker vekstprosessene, og samspill med andre prosesser som smoltifisering og kjønnsmodning.

Reproduksjonsfysiologi

Det finnes mer kunnskap om reproduksjonsbiologi i laksefisk enn i noen annen fiskegruppe. God tilgjengelighet til fisk gjennom hele livssyklusen har gjort det relativt enkelt å studere denne fisken fra kjønns-celler til seksuelt voksent individ. Noen av områdene innen reproduksjonsbiologi hvor det er gjort enestående arbeid på laksefisk er bl.a.: Gamet fysiologi, kjønnsbestemmelse, og reprodutivendokrinologi og betydning av miljøfaktorer som lysperiode.

Laksen har stor genetisk variasjon i reproduksjonsparametre som alder og størrelse ved pubertet, gytetid i sesong, eggstørrelse og fekunditet. Den har også stor fenotypisk plastisitet i de nevnte egenskapene, og er en særlig god modell for å studere hvordan arv og miljø samvirker i å bestemme hvilke reproduksjonsstrategier som blir valgt.

En har i stor grad kartlagt hvor stor arvbarehet det er i de ulike reproduksjonsegenskapene og en har en del kunnskap om hvordan ernæring og miljøfaktorer som temperatur og lysperiode virker inn på reproduksjon hos laks. Derimot er de molekylære mekanismene bak dette i liten grad kartlagt, og i enda mindre grad hvordan genetisk variasjon på SNP nivå virker inn. En har nylig funnet ett konkret kjønnsbestemmende gen for laksefisk som åpner opp for mer detaljerte studier av kjønnsbestemmelsesmekanismene i fisk. I tillegg er en rekke gen viktig for pubertet også kartlagt. Ved å bruke den omfattende informasjonen som ligger i laksegenomet, herunder ulike paraloge gen og splicing varianter, kan en på en mye mer effektiv måte kartlegge ulike gennettverk som styrer reproduksjonsprosessene. Dermed kan en kartlegge i detalj hvordan genetisk variasjon og ulike miljøfaktorer samspiller i så måte. Nytteverdien kan ligge i nye og bedre sterilitetsmodeller, bedre teknikker for monosex-populasjoner, forbedret stamfiskhold og eggkvalitet, kunnskap for markørassistert seleksjon, samt bedre forståelse for hvordan arv og miljø virker inn på f.eks. modningsalder og gytetid for å kunne styre dette bedre i oppdrett.

SNP (single-nucleotide polymorphism; enkeltnukleotidpolymorfi) er variasjon i DNA sekvens på enkel nukleotid nivå – A, T, C eller G. Variasjonen kan være mellom kromosompar eller mellom individer. For eks. kan to individer ha DNA sekvensen av det samme fragmentet lik AAGCCTA eller AAGCTTA, - i.e. en forskjellig nukleotid i en spesifikk posisjon. Med andre ord to ulike alleler. Sekvensering av laksegenomet har gjort det mulig å kartlegge og systematisere hundretusener av slik punkt variasjoner. Disse SNPene brukes som **markører** i genomet for å karakterisere spesifikke individer eller stammer. Ved å analysere hvilke nukleotider som finnes i disse markørposisjonene får en et unikt bilde av enkelt individer/stammer. Sammenligner en så denne informasjonen(genotype) med spesifikke egenskaper (fenotypen, f.eks. sykdomsresistens) kan en koble egenskaper med genetikk. Slik informasjon kan da brukes til å plukke ut individer som har spesifikke genetiske egenskaper en vil avle på. Markørene gir også informasjon om hvilke område i genomet disse egenskapene er lokalisert. Jo flere markører en har jo mere nøyaktig vil en kunne forutsi hvor i genomet egenskapene er lokalisert, helt ned på gen nivå.

Sirkulasjon / respirasjon

Den store dødeligheten representerer uten tvil en av de største utfordringene for lakseindustrien. De siste 12 årene har denne dødeligheten ligget på ca 20 %, og hjertefeil er en av faktorene som bidrar til den høye dødeligheten. Blant annet har hjertemisdannelser og forstyrrelser i sirkulasjonssystemet gjentatte ganger blitt påvist i forbindelse med dødelighet i lakseoppdrett. Hjerterelatert dødelighet skjer vanligvis hos stor fisk før slakting og i sammenheng med ulike håndteringsprosedyrer som for eksempel ved sortering, transport og vaksinerings, samt ved suboptimale miljøbetingelser som høy vanntemperatur, lavt oksygenivå og ved algeoppblomstring. En rekke hjertemisdannelser og hjerterelaterte avvik har blitt beskrevet, blant annet hypoplasi av det ytre kompaktlaget av ventrikkelen, avvikende ventrikkel morfologi, cyster på ventrikkelen og manglende skillevegg *septum transversum* mellom hjerte og bukhule. Likevel er det mest vanlige og største problemet relatert til at oppdrettshjertene er mindre og mer avrundet enn hos villfisk. Disse hjertene har lavere pumpeeffektivitet enn normale pyramideformede hjerter, og de er dermed assosiert med redusert hjertekapasitet og blodsirkulasjon. Redusert blodsirkulasjon fører til dårligere oksygenering av perifere organ, noe som kan gi ulike negative konsekvenser, for eksempel dårligere tilvekst og svakere immunforsvar og dermed en større risiko for flere og sterkere sykdomsutbrudd. Vintersår er et eksempel på et komplekst problem i laksenæringen som kan være relatert til redusert hjerte- og sirkulasjonskapasitet. Besparelsene vil derfor være formidable om vi kan produsere en mer robust laks med et sterkere hjerte. Hjertet er også det organet som er mest utsatt for infeksjøs virusykdommer (CMS, HSMB, PD, IPN). Evnen til å motstå virusreplikasjon og skade i hjertet varierer på individnivå, men årsakene til disse er ukjente. Likeledes er evnen til vevsreparasjon av hjertevevet i forbindelse med virusinfeksjon variabel, men av ytterst stor betydning for fiskens overlevelsessevne ved sykdom. Tilgjengelig kunnskap gir sterke indikasjoner på at hjertehelse er definert både utfra evne til muskel regenerering og immunkapasitet. Samlet sett og hver for seg representerer de ulike hjertepatologiene store kunnskapshull.

Forskning har i de siste år vist at laksens hjertehelse kan forbedres og at disse forbedringene kan knyttes til molekylære mekanismer. En rekke treningsforsøk har vist at hjertekapasiteten kan forbedres betydelig og at dette innebærer økt aktivering av gener som styrer kontraksjonsevne, muskelvekst, vaskularisering, produksjon av røde blodceller, bedre evne til vevsreparasjon og ikke minst positiv modulering av immunsystemet. Et annet spennende og relatert eksempel er den adrenergiske samordning av oksygentilførsel til vev i perioder med hypoksi. De katekolamine

hormonene adrenalin og noradrenalin koordinerer en rekke fysiologiske prosesser påvirket av hypoksi og frigjøring av disse hormonene fører til stabilisering av den intracellulære pH'en i røde blodceller og dermed stabilisering av funksjonen til hemoglobin. Flere gener er blitt funnet som er assosiert med dette (f.eks Natrium-Hydrogen vekslere). Et spennende prosjekt videre vil bli å finne de genomiske effektene av hypoksi i fisk. Dette vil være viktig for å forstå betydning av effekten av hypoksiepisoder i oppdrett i forhold til fiskevelferd og risiko for sykdomsutbrudd. Sekvenseringen av laksegenomet vil i stor grad gi nye muligheter til å forstå samspill mellom genetikk og miljøfaktorer, hvor både forståelse av epigentisk programmering og anvendelse av ulike «omics» plattformer vil være nødvendige for generering av nødvendig kunnskap for implementering av tiltak innen hjertehelse som gir konkrete forbedringer for næringen.

Muskel/ bevegelse

Både innen den tradisjonelle fiskerinæringen og oppdrettsnæringen er kvaliteten på fileten en svært viktig **komponent**. Teksturen eller konsistensen til fiskemuskel er avhengig av en rekke faktorer hvor bl.a. alder og størrelse, fettinnhold og fettfordeling, mengde av og egenskaper til muskelproteiner og håndteringsstress før slakting er viktige parametre. Hvor fort pH i muskelen synker etter slakting og enzymatiske (proteolytiske) prosesser er også viktige for bløtgjøring av fiskevev etter slakting. Dette sammen med de lange vandringene som laksefisk foretar, gjør at det de siste 10 årene har blitt et større fokus på muskel- og bevegelsesfysiologi hos laks.

Trening av laksefisk ved moderate hastigheter resulterer i økt muskelvekst. Tilgjengelig kunnskap foreslår at veksten er et resultat av kvantitative og kvalitative endringer i muskulaturen. Skjelettmuskulaturen hos fisk gjennomgår strukturelle (f.eks myotomal muskel struktur og vaskularisering), morfometriske (f.eks fiber tetthet og størrelse) og biokjemiske (f.eks enzyme aktivitet) endringer som respons på økt svømmeaktivitet. Trening har i gjentatte forsøk stimulert hypertrofi av muskelfibrene, påvist som økt andel store fibre i muskel hos fisk som har svømt ved økt hastighet over lengre tid. Derimot har det til nå ikke blitt dokumentert om trening også stimulerer ny-rekruttering av muskelfibre (hyperplasi), men det er indikasjoner på at trening øker cellulariteten til muskelfibrene. Videre antas det at trening har en positiv effekt på vaskularisering av skjelettmuskulaturen, noe som vil bedre kapasitet for transport av oksygen, karbondioksid og næringsstoffer i den aktive muskulaturen. I tillegg til morfologiske endringer vil økt bevegelse endre musklens biokjemiske egenskaper. Trening øker kontraktil kapasitet hos den arbeidende muskulaturen, det forventes derfor en økning i det totale energiforbruket og økt opptak og utnyttelse av næringsstoffer. I særdeleshet er økt ATP behov i rød aerob muskulatur knyttet til oksidasjon av fett og karbohydrat.

Fiskens filetkvalitet er bestemt av ytre og indre faktorer som definerer skjelettmuskulaturen, inkludert muskelens kjemiske sammensetning (fett innhold og fettsyre profil, glykogen lager, oksidativ stabilitet, farge og muskel cellularitet). Et av de viktigste kriteriene for filetkvalitet er tekstur, som er et produkt av muskel cellularitet (antall og distribusjon av muskel fiber) og bindevevsegenskaper (total mengde kollagen og kryssbindinger mellom kollagen fiber eller mellom kollagen og elastin). Myk tekstur har tidvis vært en utfordring for norsk laksenæring, noe som medfører produkt nedklassifisering og store økonomiske tap. Økt bevegelse induisert ved trening har

i flere forsøk vist å bedre teksturen til laksefisk, og positiv effekt på farge har også blitt dokumentert. Dokumentasjon indikerer videre at trening øker intramuskulært fett, med mulige positive effekter på omega-3 nivåene i sluttproduktet. Det er viktig å påpeke at selv om det er til dels veldokumenterte effekter av trening på et overordnet nivå så er det lite kunnskap om molekylære mekanismer og responser. Ny kunnskap som integrerer transkriptom, epigenittikk, proteom og metabolom data fra skjelettmuskulaturen hos fisk kan gi den nødvendige innsikten som skal til for å tilby optimal trening og ikke minst for slik at filetkvaliteten blir best mulig. Denne kunnskapen kan også nyttes til å bedre presisjonen i fremtidens genombaserte avlsarbeid.

Osmoregulering / ekskresjon

Innen transportfysiologi har små molekyler som NH_3 , CO_2 , urea og vann tradisjonelt sett blitt antatt å være relativt diffusjonsbare uten å kreve noen spesielle transportører eller kanaler, men man har trodd at disse bare glir gjennom membranlipider basert på diffusjon. Derimot har man lenge visst at ioniske molekyler (f.eks NH_4^+ , Na^+ , Cl^-) krever aktive proteintransportører/kanaler som f.eks Na^+ / K^+ -ATPase, eller passive f.eks $\text{HCO}_3^- / \text{Cl}^-$ utveksling, Na^+ -kanaler. I de siste 40 årene har vårt syn på ikke-ionisk transport endret seg radikalt, først ved oppdagelsen av urea transportører og deretter vannkanaler som aquaporiner, og nå nylig glycoproteiner involvert i ammoniakk og muligens CO_2 -transport. Laksefisk har vært en viktig modell for studier av ulike nettverk og mekanismer for slik ekskresjon og osmoregulering, hovedsakelig på grunn av betydningen dette har for oppdrettsnæringen. Anadrome fiskeslag som laks gyter og har yngelstadiet i ferskvann, men lever vanligvis hele sitt voksne liv i saltvann noe som gjør studier av slike nettverk spesielt interessant. Hoveddelen av nitrogenholdig avfall, som stammer fra nedbrytning av proteiner, i både juvenile og voksen fisk er i form av ammoniakk som diffunderer passivt via gjellene, mens en mindre del består av urinstoff og urinsyre. I embryoer derimot er hoveddelen av nitrogenholdig avfall skilt ut som urinstoff, noe som ser ut til å være relatert til store mengder nitrogen i plommesekken og til den lave gjennomtrengbarheten av ammoniakk i eggeskallet. Dette kompenseres av ett sett av urea transport gener som er uttrykt i svært mange teleoster. Slike ekskresjons mekanismer er også viktige for osmoreguleringen og er en viktig del av homeostasen. Disse mekanismene regulerer vann og salter i blod og vevsvæske slik at konsentrasjonen er mest mulig konstant. Laks og laksefisk står overfor et kontinuerlig passivt tap av ioner til, og en passiv gevinst av vann fra et akvatisk miljø som har lavere konsentrasjon av salter enn det som finnes i vevet og blodet. Slike arter kompenserer ved at de aktivt tar opp ioner via gjellene og ved å utskille store mengder fortynnet urin. I regnbueørret er det bl.a. funnet to gener som er uttrykt i gjeller (V og H^+ ATPase) som er med på å regulere homeostasen i fisk ved aktiv opptak av natrium. Ved hjelp av transkriptom studier vil en kunne påvise nye og ukjente gener som er involvert i denne prosessen, samt finne ut hvilke uttrykkningsnivåer som trengs for at systemet skal fungere.

Smoltifisering og robust fisk

Moderne produksjonsregimer med redusert generasjonstid, høye tettheter, oppvarmet vann og bruk av lysstyring har blitt viktige krav for å forbedre vekst og akselerere utviklingen i intensiv sesong-

uavhengig og kostnadseffektiv smoltproduksjon. En har gjennom solid forskningsinnsats fremskaffet kunnskap om hvordan en kan effektivt kontrollere og styre produksjonen av smolt gjennom kontroll av ulike miljøparametere som lys, temperatur, vannhastighet og vannkvalitet.

Produksjon av høykvalitets- og robust smolt er en viktig innsatsfaktor som kan gi betydelig økonomisk gevinst for næringen. Foreløpige rapporter fra Mattilsynet indikerer at 6 % av tapet i sjø er direkte forårsaket av dårlig smoltkvalitet. Havbruksnæringen søker derfor kontinuerlig praktiske-, kostnads- og tidsbesparende effektive metoder for å forutsi smoltens evne til å overleve og vokse i sjøvann. Gjelle Na, K ATPse aktivitet er et eksempel på suksessfull utvikling og implementering av slike metoder. På grunn av sin nøkkelrolle i utviklingen av sjøvannstoleranse er gjelle Na, K ATPase aktivitet introdusert til norske laksenæring i et forsøk på å bedre forutsi prestasjon og ytelse i sjøvann, samt øke presisjonen for timingen av sjøvannsoverføring av smolt, og metoden benyttes mye av næringen i dag.

Til tross for å ha utviklet en sterkt industrialisert og sesong-uavhengig produksjon med rask vekst for å møte kravene til forbedret kostnadseffektiv produksjon av smolt, står laksenæringen fortsatt overfor utfordringer som må løses for å sikre en videre bærekraftig produksjon av sjømat. En særlig utfordring for industri og regulerende myndigheter, er hvordan redusere et uforklarlig tap av omtrent 20 % av det totale antallet fisk som blir overført til sjø. En andel av dette tapet antas forbundet med varierende smoltkvalitet. En utfordring blir derfor å finne flere og målbare kvalitetsmål som dekker sentrale biologiske prosesser som naturlig inngår i et utvidet kvalitetsbegrep for en robust kvalitets smolt. Treningsforsøk har vist at smoltens robusthet og sykdomsmotstand signifikant kan forbedres under optimale forhold, og mikromatrise studier har identifisert en rekke stress og immunrelaterte gener som er assosiert med bedre overlevelse i smitteforsøk. Dette viser hvilke enorme muligheter kartleggingen av laksens genom gir for effektivt å identifisere komplekse nettverk av gener som styrer de ulike biologiske prosesser gjennom smoltifiseringen, inkludert immunsystemet. Man kan effektivt studere ulike gennettverk og reguleringsfaktorer som er viktige i utviklingen av for eksempel sjøvannstoleranse/homeostase og smoltens evne til å håndtere stress i dagens intensive produksjonsstrategier. Studier og integrering av gennettverk som er viktige for forståelsen og regulering av både nye og kjente fysiologiske og molekylære biologiske prosesser gjennom smoltifiseringen, vil kunne gi store muligheter for å indentifisere og evaluere lovende biologiske markører med det formål å identifisere et utvalg av markører som kan benyttes til dokumentasjon av robust og god kvalitets smolt.

Appetitt og regulering av fôropptak

Den fysiologiske reguleringen av appetitt og inntak innebærer en kompleks integrering av perifere og sentrale signaler fra hjernen. Som i pattedyr, synes midtpunktet for reguleringen av inntak og energi homeostase i fisk å være plassert i hypothalamus. Flere appetitt-regulerende hormoner har blitt beskrevet, og mange av de samme neuropeptidene og hormonene som er involvert i den sentrale reguleringen av appetitt hos pattedyr har homologer i fisk. For eksempel har gullfisk flere neuropeptider en regulerende virkning på appetitt lik den som er beskrevet i pattedyr.

Signaler om sult og metthetsfølelse fra mage-tarmkanalen (GI tarmkanalen), inkludert magen hvis den finnes, har en stor innvirkning på appetitten og måltidsstørrelse i både juvenile og voksne stadier. Studier utført på regnbueørret har vist at appetitten returneres når 80-90% av mageinnholdet fra forrige måltid har blitt ført nedover i den proksimale delen av tarmen. Flere mage-tarmkanalhormoner sammen med ulike nervebaner synes å være involvert i denne metthetsfølelse mekanismen. Videre mottar den sentrale regulatoren av appetitt også afferente/sensoriske signaler om energien som er lagret i kroppen. Det har blitt foreslått at leptin produsert i leveren og at fett spiller en viktig rolle i denne signalveien i fisk.

Bortsett fra gullfisk, er det svært få funksjonelle studier av hvordan neuropeptider og endokrine faktorer påvirker appetitt og inntak i teleoster. I voksen fisk, inkluderer listen av appetitt-regulerende endokrine faktorer i dag orexigenic faktorer som neuropeptid Y (NPY), apelin og galanin, og en lang liste av anorexigenic faktorer som kokain-amfetamin-regulerende transskript (CART), cholecystokinin (CCK), Pro-opiomelanocortin (POMC) og amylin. Den presise fysiologiske rollen av hver faktor er ikke riktig forstått enda, og er blitt studert bare i noen få arter. Det vi vet om dette systemet i pattedyr antyder at listen over endokrine og andre faktorer som påvirker appetitten og energi homeostase (likevekt/balanse) i fisk vil bli betydelig utvidet, og at den vil inkludere både sentrale og perifere signalveier. I tillegg kan bestemte næringsstoffer (dvs. noen aminosyrer, glukose + +) også påvirke fôrintaket enten direkte eller indirekte gjennom metabolske signalveier. I tillegg vil integreringen og samhandlingen av de ulike faktorene som er involvert øke kompleksiteten. Et interessant spørsmål i laks er hvordan disse prosessene er regulert gjennom ulike livsstadier siden det er kjent at appetitten varierer med utviklingstrinn, årlige sykluser osv.

Lav appetitt og fôropptak er en av de viktigste utfordringene når ikke-marine fett/oljekilder, og proteiner blir brukt som fôringredienser. Det å forstå de fysiologiske systemene som regulerer appetitten og fôropptaket inkludert feedbacksløyfer fra fordøyelseskanalen (for sult eller metthetsfølelse) og / eller fra kroppen (næringsstoffer / energi lagret / fedme) er svært viktig for å utforme dietter og fôringsregimer som er optimalisert for produksjon av laks. Dette inkluderer den underliggende kunnskapen om hvordan bestemte kosttilskudd/ingredienser påvirker appetitten (orexigenic eller anorexigenic).

Transkriptom og proteom analyser av viktige organer (hjerne, hypofyse, GI-tarmkanalen, lever, muskel) samt **epigenetiske** studier på atlantisk laks fôret med spesielt utviklede dietter under ulike livsstadier, med peri-prandial prøvetaking (før og etter foring) vil kunne gi unike muligheter for dyptgående analyser av reguleringen av appetitt (oppstrøms) samt signalveien til vekst (nedstrøms). Dette gjelder spesielt de stadiene som fremdeles er en utfordring innen akvakultur.

FAKTABOKS: Epigenetikk

Nyere forskning viser at det ikke bare er gener som blir arvet fra en generasjon til neste, men også andre faktorer blir arvet som særlig er involvert i tidlig utvikling eller sykdom. Disse «ikke-genetiske» eller epigenetiske faktorene er med på å opprettholde eller igangsette arvelige mønstre av gen ekspresjon og funksjon uten å endre DNA sekvensen. Det er så langt funnet fire typer av epigenetisk regulering: DNA metylering, histon modifisering, nukleosom remodelering, og ikke-kodene RNA mediert regulering. Disse nettverkene samarbeider om å kontrollere ekspresjonen av gener på et epigenetisk nivå. De mest kjente av disse er DNA metylering og histon modifisering.

DNA metylering skjer ved at en metyl gruppe blir festet til nukleotiden cytosine (C). Langs DNA finnes det steder hvor Cytosine blir etterfulgt av og linket via fosfat til nukleotiden guanine (G). Disse blir kalt CpG seter, mens områder i genomet med høy tetthet av CpG seter blir kalt CpG øyer. DNA metylering skjer i hovedsak i disse CpG øyene og er involvert i å regulere gen ekspresjon og dermed celle differensiering og funksjon. For mye eller lite metylering vil påvirke genfunksjonene og føre til uønskede endringer i cellen, noe som igjen kan føre til sykdom.

Histon modifisering: Histoner er globulære proteiner som sammen med DNA utgjør nukleosomene; den strukturelle enheten av kromatin. Histoner regulerer hvor tettpakket kromatin er gjennom fasen når transkripsjon foregår, og vil på denne måten regulere om gener kan bli uttrykt eller ikke. Modifisering av histoner skjer gjennom binding eller fjerning av visse molekyler som metyl eller acetyl grupper, fosfat, eller ubiquitin. Feil i modifiseringen av histoner kan føre til uønsket eller fravær av genekspressjon, noe som igjen kan føre til feilutvikling eller sykdom.

Epigenetikk og miljø: Epigenetiske endringer er ofte små og akkumuleres over tid noe som gjør at de er vanskelige å knytte til spesielle endringer i miljø eller diett. Men både miljø- og ernæringsfaktorer har blitt linket til unormale endringer i epigenetisk regulering. I det siste er det vist at miljøpåvirkning tidlig i livet regulerer kromatinorganiseringen og dermed genuttrykket som overføres fra celle til celle gjennom celledelingen, og til neste generasjon gjennom kjønncellene. På denne måten kan en organisme «huske» miljøpåvirkninger fra tidlig utvikling. Eksempler på faktorer som kan påvirke og endre de epigenetiske nettverkene er:

- Tungmetaller (f.eks. Kadmium) kan forstyrre DNA metylering.
- Sprøytemidler /f.eks. Vinclozolin) kan endre DNA metylering.
- Bisphenol A (BPA) brukt i polykarbonat plastproduksjon fører til redusert DNA metylering og endring i gen ekspresjon.

Mens epigenetikk er stadig mer populært i genetiske studier av kreft og andre sykdommer hos mennesker, har det ennå ikke fått mye oppmerksomhet inne genetiske studier på salmonider og andre akvakultur arter selv om den potensielle nytteverdien inne akvamedisin er stor. I tillegg kan det være viktig å finne ut hvordan ulike miljøpåvirkninger og foringsregimer kan stimulere ulike metyleringsmønstre og hvordan gunstig metyleringsmønstre da kan påvirker sykdomsresistens og andre økonomisk viktige egenskaper i fisk. Ved å finne disse sammenhengene kan en oppdrette fisk under mer egnede betingelser, noe som vil minske de uønskede metyleringsmønstrene.

Fordøyelsessystemet

Fordøyelseskanaalen er et multifunksjonelt organ. Fordøyelse omfatter en rekke nøye regulerte prosesser som er integrert på en måte som antas å optimalisere effektiviteten og maksimere absorpsjonen i fôring av fisk under naturlige forhold. Når fisken har fanget og inntatt maten er rollen til fordøyelsessystemet å redusere den til svært enkle molekyler (absorberbare enheter) som kan transporteres over intestinalepitelet og inn i blodstrømmen. Det å forstå ulike funksjoner og begrensninger i fordøyelsessystemet til laks på ulike livsstadier fôret med plantebaserte ingredienser, er et av nøkkelområdene innen ernæringsforskning på laks.

Fordøyelsessystem har utviklet seg til å maksimere næringsopptak fra mat tilgjengelig under naturlige forhold. Denne prosessen innebærer inntak (inkl. appetitt), sekresjon, fordøyelse, absorpsjon, motilitet, eliminering, regulering og barriere og selvbeskyttelse. Hver av disse prosessene vil trolig bli påvirket av dietter i en direkte eller indirekte måte, særlig når ikke-marine dietter brukes. Det er en rekke studier som fokuserer på effekter i GI-tarmkanaalen av dietter laget av plante-baserte ingredienser. Spesielt har enteritt og andre negative effekter forårsaket av anti-næringsstoffer og andre komponenter i fôret fortsatt å være en stor utfordring for næringen.

Transkriptom og proteom analyser av GI-tarmkanaalen, inkludert organene lever og bukspyttkjertelen, til laks fôret med forskjellige dietter under ulike livsstadier, med prøvetaking før og etter måltidene

vil kunne gi muligheter for dyptgående analyser av alle aspekter av fordøyelsesprosessene inkludert signalveiene. Forsøkene må også omfatte detaljerte funksjonelle og parallelle studier av matforbruket, fylling av magesekk og transport, enzym reaksjoner, absorpsjon, fordøyelse, og en grundig undersøkelse av histologi. Sammen med appetitt dataene vil dette gi en mye bredere og detaljert forståelse av appetitt, matinntak og effekten av kosttilskudd på fordøyelsen og fordøyelseskanalen.

Stressrespons

For høy stressbelastning kan gi redusert produktivitet, fiskehelse og fiskevelferd i lakseoppdrett. Dette inkluderer både redusert vekst, økt sykdomsforekomst samt direkte dødelighet. Laks og andre laksefisk er blitt mye brukt som modeller for å karakterisere de fysiologiske responsene til et bredt spekter av naturlige og menneskeskapte stressfaktorer. Den uspesifikke reaksjonen på stress er inndelt i en primær respons som omfatter frigjøring av katekolaminer fra chromaffin celler, og stimulering av hypothalamus-hypofyse-interrenal (HPI) akselen, noe som resulterer i frigjøring av kortisol fra hodenyre. Den sekundære responsen omfatter endringer som mobiliserer energireserver og øker tilgjengelig energisubstrat i blodet som alle er viktige i fysiologiske justeringer som gjør at dyrene evner å takle stress. Aktivering av de ulike stressaksene involverer en rekke hormoner og hormonreseptorer, som i sin tur modulerer genuttrykket knyttet til mange ulike fysiologiske prosesser, inklusive modulering av immungener. Forståelse av stressreaksjoner, og genetisk variasjon i stressrespons er viktig i oppdrett for å ivareta god fiskevelferd, god helse og høy produktivitet. Nyere forskning har vist at det finnes ulike "personlighetstyper" i fisk, bl.a. i regnbueørret når det gjelder stressrespons, der noen individer ser ut til å være forsiktige og har en kraftig kortisolrespons på stress, mens andre er risikovillige og har en lav kortisolrespons. En kan tenke seg at en i stor grad selekterer fram de risikovillige individene i oppdrett, både gjennom generell domestisering (uintendert seleksjon) og gjennom bevisst seleksjon for høy vekst og høy spisemotivasjon. Kartleggingen av laksens genom åpner mulighetene for å kartlegge det komplekse nettverket av gener som styrer de ulike stressresponsene i laks, og nedstrømsprosessene som blir påvirket, og kan åpne opp for bedre forståelse for hvordan ulike seleksjonsprosesser påvirker stressrespons og utvalg av "personligheter" i oppdrettsfisken. Slik kunnskap kan legge til rette for markørassistert seleksjon for ønsket stressrespons, og også gi en dypere forståelse for endringene som skjer i domestiserings og avlsprosesser. Nyere forskning tyder også på at fisk har muligheter til allostatisk regulering i forbindelse med stress, dvs at tidligere stresserfaring kan modulere seinere stressrespons, og bl.a. legge til rette for læring og økt stressmestring hos oppdrettslaks. Det vil i den sammenheng være aktuelt å studere effekten av en rekke ulike stressfaktorer i kombinasjon med forsøksopplegg som gir ulik grad av stressintensitet, forutsigbarhet, kontrollerbarhet og mulighet for læring med genomvide transkripsjonstudier, samt å lete etter SNPer som er assosiert med ulike "stress-personligheter" i laks

5.3 Sykdomsproblematikk

Sykdomsproblematikk i næringen

Bakterier: Avl på norsk laks begynte på midten av 1970-tallet og fulgte i fotsporene til avl på NRF-kuen (Norsk Rødt Fe). Et utvalg fisk fra ulike elver ble samlet i fire populasjoner og avlet for produksjonsegenskaper som tilvekst, fôrutnyttelse og filetkvalitet. På midten av 1980-tallet begynte en epidemi med bakterielle sykdommer som påførte oppdrettsnæringen betydelige tap. Som motsvar begynte en med vaksineproduksjon som utviklet seg fra en vaksine mot ett patogen (furunkulose) til en vaksine mot seks ulike patogener (Pharmaq; furunkulose, vibriose, kaldvannsvibriose, vintersår og IPN eller flavobakteriose) i løpet av en 10 års-periode. I dag er de fleste norske oppdrettsfisk vaksinert med en slik vaksine og effekten kan måles i få sykdomsutbrudd forårsaket av bakterier i de seneste 10 år.

Virus: Også sykdommer forårsaket av virus oppsto i norsk lakseoppdrett på midten av 1980-tallet dvs både infeksjons lakseanemi (ILA) og infeksjons pankreas nekrose (IPN). I Norge har antall utbrudd grunnet ILA hatt en nedgang siden 1990 (ca.80 utbrudd/ år) til i dag (10-20 utbrudd/ år) dels grunnet en rekke tiltak iverksatt av myndighetene. IPN derimot, har fortsatt å være et betydelig problem i næringen til tross for delvis vaksinerings. I tillegg til disse virus-sykdommene kommer det også andre nye sykdommer på 1990-2000 tallet som en i etterkant ser er forårsaket av virus. Av disse kan nevnes PD (Pancreas Disease), HSMB (1999; Hjerte Skjelett Muskel Betennelse) og CMS (Cardio Myopati Syndrom).

Parasitter: På få år har lakselus (*Lepeophtheirus salmonis*) blitt en av oppdrettsnæringens store utfordringer. Gjentatt behandling med kjemikalier har resultert i resistensproblemer, og alternative behandlingsformer er under utforskning slik som for eksempel rensefisk eller andre kjemikalier. Et tiltak er etableringen av senteret "Sea Lice Research Centre (SLRC)" i Bergen som skal bli verdensledende på forskning på lakselus og lignende parasitter, blant annet ved å korte ned på tiden fra forskning og utvikling til anvendbare produkter. Senteret ble etablert i 2010 og disponerer 200 millioner kroner til denne forskningen frem til 2018.

Det finnes også andre parasitter som infiserer laks, som for eksempel amøber og Costia som er assosiert med gjellesykdommer og kan være et problem i oppdrett. *Gyrodactylus salaris* som angriper laks i ferskvannsfasen dvs både ville elve-bestander og ferskvannsanlegg kan også være et problem. Gjeldende tiltak inkluderer strenge regelverk for smittede ferskvannsanlegg samt behandling av angrepne vassdrag med rotenon eller aluminium. *Gyrodactylus* er ikke et problem for saltvannsanlegg.

Andre sykdommer: Det finnes også andre sykdommer forårsaket av for eksempel sopp og alger, og ikke-infeksiøse sykdommer, som mangelsykdommer, fôrintoleranse osv. Også her kan immunforsvaret spille en rolle.

Dagens utfordringer i Næringen: Mhp sykdommer fremkalt av patogener er det, foruten parasitter, primært virus hvor vi ennå ikke har gode nok tiltak til bekjempelse. Så hvorfor har vi ennå ikke klart å utvikle gode vaksiner mot virus sykdommer? Noe av forklaringen ligger nok i at vi ikke vet nok om immunresponser og immunforsvar til å lage vaksiner som stimulerer de riktige immunresponsene. Så hva vet vi om laksens immunforsvar og hva vet vi ennå ikke?

Immunologi hos laks - forskning og status

På slutten av 1980-tallet trodde de færreste at fisk hadde et avansert immunforsvar, men denne holdningen endret seg raskt utover 1990-tallet. Introduksjonen av genteknologi førte til et drastisk oppsving i kunnskapen om immunsystemet hos fisk på 1990-tallet og forskningen har fortsatt på 2000-tallet i takt med videreutviklingen av data- og bioteknologien. Det var en viktig milepæl å konstatere at det adaptive immunsystemet hos beinfisk er basert på tilsvarende komponenter som i pattedyr; dvs immunoglobuliner, vevsforlikelighetsantigener (MHC) og T-celle reseptorer på midten av 1990-tallet.

Forskningsfeltet har vært godt organisert, bl.a. i form av foreningene ISFSI (International Society for Fish and Shellfish Immunology) og ISDCI (International Society for Developmental and Comparative Immunology), som begge gir ut journaler og jevnlig organiserer konferanser. En annen forening; EAFP (European Association of Fish Pathologists) har også vært viktig i skjæringspunktet fiske sykdommer/immunologi. Nasjonalt har strategiske satsninger innen havbruk (kanalisert gjennom Norges forskningsråd), og årlige konferanser omkring fiskehelse betydd mye for utviklingen av forskningsmiljøet.

I fiskeimmunologiforskningen ble det på 1990-tallet fokusert mest på likheter mellom fisk og pattedyr: man lette etter homologe molekyler. Senere har bildet blitt mer nyansert og betydelige forskjeller har blitt avdekket – både mellom fisk og andre virveldyr, og mellom ulike arter av fisk.

Det medfødte immunsystemet. Mikroorganismer har utviklet forskjellige måter å feste seg til bestemte celler og vev, og vil alltid forsøke å nå de områdene hvor de trives best. Fisken oppdager mikroorganismene ved at patruljerende immunceller kommer i kontakt med disse og sender ut faresignaler. Reseptorer på immunceller gjenkjenner typiske molekyler fra mikroorganismer, som for eksempel karakteristiske overflatestrukturer. Egenskapene til reseptorene som gjenkjenner strukturene nedarves fra generasjon til generasjon og har utviklet seg gjennom evolusjonen i et samspill mellom fisken og mikroorganismene i det miljøet den lever i. Noen av cellene som går til angrep på mikroorganismer kalles "eteceller" (makrofager). For øvrig omfatter det medfødte immunforsvaret et stort antall molekyler i blod, vevsvæsker og slim. Eksempler på forsvars-molekyler som er til stede hos fisk generelt er listet i faktaboksen under.

Faktaboks. Sentrale molekyler i det medfødte immunsystemet hos fisk	
Transferrin	Vekstinhibitor som binder opp nødvendig jern for bakteriers vekst
Interferon	Alarmmolekyl som induserer produksjon av anti-virale proteiner
Alfa-makroglobulin	En av protease-inhibitorene som bl.a. inaktiverer proteolytiske enzymer skilt ut av patogener
Lysozym	Ett av mange lytiske enzymer. Lysozym hydrolyserer glykopeptider i bakteriers cellevegg
Komplement	Sirkulerende molekyler som kan aktiveres og være med på å utslette mikroorganismer
C-type lektiner	Binder forskjellige karbohydratmolekyler – som kan lede til opsonisering, fagocytose og komplementaktivering
Pentraxiner	C-reaktivt protein (CRP): lektin som binder til bakterie-celleveggen og Serum amyloid protein (SAP): lektin som også binder lipopolysakkarider (LPS) hos bakterier
Naturlige antistoff	Polyreaktive antistoff som er til stede uten å være stimulert av spesifikke antigener
Cytokiner	Molekyler som skilles ut av celler og virker som et faresignal for andre immunceller
Kjemokiner	Molekyler som tiltrekker immunceller til for eksempel et betent sted i kroppen

Som reaksjon på infeksjon skjer det en akutfase respons, der nivåene av bl.a. pentraxiner kan øke dramatisk. Innen humanmedisinen benytter en seg av tester som måler nivået av bestemte blodkomponenter for å vurdere om pasienter har en infeksjon på gang. Immunsystemet er det første som «ser» sykdomsfrembringende organismer; før tegn på sykdom oppstår. Testene kan gi nyttig informasjon om hvilken type infeksjon det dreier seg om og hvilke tiltak som er hensiktsmessig å gjøre.

En viktig forsvarsmekanisme mot virus er interferonsystemet som aktiveres ved gjenkjenning av to-trådig RNA som produseres av de fleste virus. Når cellene begynner å produsere interferon som sirkulerer rundt i kroppen blir kroppscellene satt i alarmberedskap og begynner å produsere anti-virale proteiner som hemmer formering av viruset.

Adaptivt immunitet. I motsetning til pattedyr har ikke fisk lymfeknuter og benmarg. Det viktigste immunorganet hos fisk er hodenyre som huser mange ulike immunceller, i tillegg til tymus, milt og baktarm. Det finnes også indikasjoner på et lymfoid nettverk hvor naive (ustimulerte) T celler akkumulerer mens de venter på antigen (Yaniv et al. 2006, Nat. Med. 12(6) 711-716) samt et spesialisert gjelleorgan som kan ha en tilsvarende rolle dvs møtepunkt mellom immunceller og antigen (Koppang et al. 2010 J Anat. 217(6):728-39).

Det adaptive immunsystemet gjenkjenner og husker spesifikke patogener slik at neste møte med samme patogen induserer en hurtig og sterk beskyttende respons. Denne minne-responsen er også fundamentet for all vaksinerings dvs. dersom en organisme ikke har disse minne-responsene vil ikke vaksinerings gi en fremtidig beskyttelse. Minneresponsene utføres av spesialiserte celler, såkalte B

eller T celler, hvor andre celler fra det medfødte immunsystemet bidrar til aktivering av hukommelses-cellene.

Antistoffer og B-celler. Antistoffene, produsert av B-celler, bidrar til å isolere og/ eller eliminere fremmede elementer som bakterier. Kroppen produserer B-celler med et utall ulike antistoffer og dersom noen av disse stimuleres av et patogen vil kroppen lage masse antistoff av den riktige typen som da kan bistå i eliminering av patogenet. IgM finnes i relativt store mengder i blod hos fisk. Gjentatt immunisering (vaksinering) av pattedyr resulterer i at noen B-celler som i første omgang produserer IgM skifter til IgG-produksjon (typisk sekundær antistoffrespons i blod) eller IgA-produksjon (mucus-antistoffer). Denne mekanismen, som kalles klasseskift, skjer ikke hos fisk.

Faktaboks. B-celler og antistoffer hos fisk

Implementering av genteknologi i fiskeimmunologiforskningen førte til et stort løft for dette fagfeltet på begynnelsen av 1990-tallet. Genene som koder for antistoffene (immunglobulinene) var blant de første immungenene som ble karakterisert hos fisk. I likhet med menneske og pattedyr viste det seg at fisk hadde gener som koder for IgM og IgD. I tillegg har det nå blitt funnet en tredje klasse av immunglobuliner hos fisk; IgT (som bare finnes hos beinfisk), mens man med stor sikkerhet kan si at klassene IgG, IgA og IgE (kjent fra pattedyr) ikke er tilstede hos fisk. Hele immunglobulin-genkomplekset hos laks og andre arter av fisk er nå sekvensert. Selv om man vet noe om uttrykkingsmønsteret og funksjonen til disse molekylene i dag, gjenstår det svært mye før vi forstår den biologiske betydningen av antistoffdiversiteten hos fisk. Økt kunnskap på dette feltet er svært relevant i forhold til vaksineutvikling; f.eks. med hensyn på utvikling av dypp og bad-vaksiner og forståelsen av immunresponser i slimlag (mucus-antistoffer). Det er mye som tyder på at IgT hos fisk er spesialisert for immunresponser i slimlag (Salinas et al., 2011. Dev Comp Immunol. 35(12):1346-65.), men mengdeforholdene av IgT hos fisk kan ikke sammenlignes med IgA hos pattedyr. Utvikling og migrasjon av B-celler, samt transportmekanismer for antistoff, er følgelig meget aktuelle forskningsområder på fisk, ettersom vi ikke kan overføre kunnskap fra pattedyr direkte. Et annet forhold som må tas i betraktning er at B-celler hos fisk har evne til fagocytose (Li et al.2006), noe som setter kommunikasjon og antigenpresentasjon mellom B- og

Antigen presenterende celler og MHC. Patogener som virus eller bakterier brytes ned i cellene og presenteres som småbiter på overflaten av profesjonelle antigen presenterende celler (APC) som makrofager eller dendrittiske celler ved hjelp av molekyler som kalles Major Histocompatibility Kompleks molekyler (MHC). T cellene har reseptorer som bindes til MHC og dersom cellen er infisert av et patogen iverksettes det en immunreaksjon. Patogener tas opp av celler via to ulike mekanismer og induserer immunrespons avhengig av om de entrer ved egen hjelp (eg.virus) eller taes opp av cellene (eg. bakterier). Det finnes to klasser MHC molekyler hos de fleste fisk med unntak av torskefisk, som ikke har MHC klasse II. MHC klasse I finnes på de aller fleste celler og er viktige mhp beskyttelse mot intracellulære patogener som virus. Den andre klassen, MHC klasse II, uttrykkes kun på spesialiserte antigen-presenterende celler slik som B-celler, makrofager eller dendrittiske celler og er viktige i beskyttelsen mot ekstracellulære parasitter eller bakterier. Vi har bare så vidt begynt å forstå hvilke typer celler som finnes og hvordan de samspiller hos fisk.

Faktaboks. MHC hos laks

Hos laks, som hos pattedyr, finnes begge klasser MHC molekyler i mange forskjellige kopier (gener) og vi kjenner kun funksjonen til noen av disse genene. De klassiske MHC klasse I og klasse II molekylene kodes av ett gen hver som kommer i mange ulike varianter (alleler) i en populasjon hvor hver variant har evne til å binde og presentere ulike grupper med antigener. Både MHC klasse I og kanskje særlig MHC klasse II er hos laks vist å ha noen alleler som gir bedre beskyttelse mot enkelte bakterier enn andre (Kjøglum et al.2008, Scan.J.Immunol. 67(2):160-168). Analogt med pattedyr uttrykkes det klassiske MHC klasse I genet i de aller fleste vev mens de klassiske MHC klasse II molekylene uttrykkes primært i organer ansett for å ha immunologisk viktige funksjoner slik som milt, gjeller, hodenyre samt

T-celler. T celler har henholdsvis CD8 eller CD4 molekyler, i tillegg til en T-celle reseptor, på overflaten som gjenkjenner enten MHC klasse I eller MHC klasse II på en antigen presenterende celle. Dersom MHC presenterer et fragment fra et patogen vil T-cellen frigjøre faktorer for å koordinere responser av andre celler eller uttrykke toksiske faktorer som kan drepe de infiserte eller unormale cellene. Det er store likheter mellom B- og T-celler i måten de spesifikke reseptorene dannes på og hvordan utvalgte celler kan overleve i lang tid (såkalte «memory» eller huskeceller). Vi vet at fisk har de samme T-celle molekylerne som pattedyr og fordi vi har laget antistoffer mot noen av overflatemolekylerne er vi nå istand til å studere cellene nøyere.

Faktaboks. T-celler hos laks

Både gen-sekvensene og et antistoff mot deler av T-celle reseptoren har vist sin nytteverdi i oppdagelsen av et lymfoid vev i gjellene hos laks (Koppang et al.2010. J Anat. 217(6):728-39). Gjellene var studert i mange tiår, men det lymfoide vevet var oversett fordi man ikke hadde verktøy for å identifisere T-cellene. Funnet av det lymfoide vevet i gjellene har satt mange nye spørsmål på dagsordenen, og økt kunnskap på dette området vil utvilsomt ha stor nytteverdi i forhold til anvendelse (vaksineutvikling) og videre forskning på immunsystemet hos laks.

Selv om forskningen på T-celler i fisk er i sin spede barndom ser det ut til at de store trekkene ligner på det vi kjenner fra pattedyr, og mange andre molekyler med hypotetisk lik funksjon til pattedyr har blitt identifisert. På den andre siden blir bildet mer komplisert på grunn av unike gen-duplikasjoner i fisk. Hos laks finnes det f.eks. to molekyler, CD4-2A og CD4-2B, i tillegg til CD4-1, med likhet til CD4 i pattedyr.

Hva vet vi ennå ikke?

Til tross for at vi har betydelig kunnskap om de sentrale molekylerne i laksens immunforsvar, er det fortsatt mange hull og mangler i vår forståelse. Vi vet lite om minne-responser dvs hvilke celler som er involvert, hvor antigen møter B og T celler og hvor hukommelsescellene lagres. Derfor vet vi også lite om hvordan vi skal stimulere disse responsene. Ulike patogener induserer ulike immunresponser og en trenger detaljert kunnskap om sykdomsmekanismene for hvert enkelt patogen for å kunne lage gode vaksinestrategier.

Sekvensen til laksens genom er et viktig skritt i riktig retning mhp forståelsen av laksens immunforsvar. I tillegg trenger vi verktøy for å studere immunresponser på et cellulært plan og et sentralt verktøy er antistoffer rettet mot cellulære overflatemarkører. Av ukjente årsaker har en enkel oppgave som å lage antistoffer mot overflatemolekyler på levende celler vist seg å være en stor utfordring. Ett eksempel hvor antistoff har gitt resultater hos laks er identifiseringen av det immunologiske gjelleorganet (Koppang et al.2010, J Anat. 217(6):728-39), som ikke finnes hos pattedyr.

Et internasjonalt samarbeid mhp etablering av et antistoff-panel ville derfor gi fagfeltet et vesentlig løft fremover.

Funksjonell forståelse innebærer kunnskap om enkeltgener, genuttrykk, genregulering og molekylære nettverk og samspill. Det innebærer også forståelse av genene på protein-nivå, et fagfelt som er under etablering for benfisker, men hvor det fortsatt gjenstår mye arbeid.

Det er også et betydelig antall gen som finnes hos benfisker, men ikke hos pattedyr. Disse genene vil forbli definert som ukjent i det publiserte lakse-genomet, og en trenger antagelig modellorganismer som sebrafisk for å kunne definere funksjonen til disse.

Hvordan utnytte laksens genom til bekjempelse av sykdommer i oppdrettsnæringen

Finne nye patogener: Det er mange eksempler på sykdommer i lakseoppdrettsnæringen hvor en i etterkant har påvist patogenet. Ved å ha tilgang til hele laksens genom, kan en sekvensere prøver av smittet fisk og ved å trekke fra laksens genom, sitter en da igjen med sekvenser som tilhører patogenet.

Forbedret forståelse av immunresponser:

1. Systematisering og navnsetting: Laksens genom vil også utgjøre et rammeverk med knagger vi kan henge de immune genene vi allerede kjenner på. Fordi laksen har mange immungener i dobbel dose eller gen som tilhører komplekse genfamilier, er det viktig å definere hvilke gen som kommer i flere utgaver og gi enhetlige navn slik at en kan skille variantene fra hverandre. En enhetlig nomenklatur for immun gener generelt hos salmonider vil forenkle sammenligning både innen og mellom arter. Dette krever en internasjonal enighet mhp nomenklatur og systematisering.

2. Identifisere ukjente immungen: Til tross for at vi kjenner mange av immungenene hos laks er det fortsatt mange aktører vi ikke har undersøkt. Laksens genom vil derfor gi oss mulighet til å finne nye immun gener.

3. Brukervennlig tilgang og analyse av data: Dagen sekvenseringsteknologi gjør det enkelt å lage masse sekvensdata, men analyse av slike data er en større utfordring. Det vil være formålstjenlig for både forskning og næring å lage brukervennlige databaser som muliggjør enkel analyse av sekvensdata. Dersom en i tillegg lager referansetranskriptomer fra ymse vev og stadier av normal fisk kan forskjeller mellom forsøksfisk og referansefisk synliggjøres enten i tabellform eller i nettverksformat.

4. Økt forståelse av laksens immunsystem: Gjennom en systematisering og rydding av eksisterende immundata samlet med ny kunnskap gjennom genom koblet til transkriptom analyse kan en få en bedre forståelse av laksens immunforsvar, dvs. hvilke immun-mekanismer virker beskyttende mot gitte patogener og evt. finne indikatorgener som muliggjør tidlig diagnose og derved behandling. En bedre forståelse vil også muliggjøre utvikling av mer effektive vaksiner da en kan målstyre vaksinene mot de immunresponsene som virker beskyttende for de ulike patogenene.

5. Fra sekvens til biologisk forståelse: Kjennskap til sekvens er ofte ikke tilstrekkelig til å forstå biologisk funksjon. Mange immungen finnes i to eller flere utgaver og de funksjonelle forskjellene mellom variantene må studeres for å oppnå en mer helhetlig biologisk forståelse. Dette krever tilgang til antistoffer og funksjonelle assays. For å stimulere til en raskere overgang fra genom til biologisk forståelse bør en etablere antistoff-paneler mot mange av de sentrale immunmolekylene og stille disse til rådighet for interesserte forskere på et internasjonalt plan.

6. Nasjonal og Internasjonal koordinering av ressurser; Et immunom bør være integrert med andre funksjonelle aspekter av laksens genom i en Nasjonal Lakse Genom database. Foruten den skisserte norske laksedatabasen og Immunomdatabasen, finnes det lakse-ressurser både i Norge (eg.lakselus ressurser) og andre steder i verden eg. i Canada (cGRASP; B.Koop) og Chile (<http://genomicasalmones.dim.uchile.cl/>). En samkjøring av ressursene vil være formålstjenelig.

6. Andre bruksområder; Mange immungener er også knyttet til andre produksjonsegenskaper som generell robusthet, embryoutvikling, førutnyttelse, tilvekst etc. så en brukervennlig tilgang til immunomet er også viktig for andre fagområder samt for næringen.

5.4 Modellfisk

Siden alle levende organismer har et felles opphav er det mulig å bruke modellorganismer til å forenkle forskning. Til grunn for dette ligger en evolusjonær konservering av det genetiske materialet, samt metabolske nettverk og utviklingsmekanismer.. Historisk sett har slike modellorganismer blitt brukt i over 75 år for å studere arvelige mekanismer og tidlig utvikling. I dag blir de også benyttet til å få økt kunnskap om molekylærbiologi, biokjemiske prosesser og om funksjonen til enkeltgener. Modellarter er svært attraktive i forskning av en rekke årsaker som bl.a. rask og rimelig utførelse av genetiske studier, samt en stor mengde tilgjengelig data og kunnskap akkumulert gjennom årtier av forskning.

FAKTABOKS: Modellorganismer

Genetiske modellorganismer er arter det er lett å gjøre genetiske studier på; dvs de gir høyt antall avkom og har kort generasjonstid, noe som gjør at en kan utføre storskala krysningsforsøk som kan følges i flere generasjoner. Eksempler på slike genetiske modeller er gjær, nematoder og bananfluer. Høyere opp i hierarkien kommer virveldyrene der mus har dominert lenge, men etter hvert med økende konkurranse fra små modellfisk med sebrafisk i fronten. Disse har til felles at genomene ble tidlig detaljert kartlagt og er nå ferdigsekvensert. Det er nå tilgjengelig et stort utvalg kjente mutanter..

Eksperimentelle modeller er organismer som produserer robuste og lett tilgjengelige avkom/embryo som lar seg lett studere og manipulere. Flere arter tilhører denne gruppen. Mus, sebrafisk, medaka, kylling og frosk (*Xenopus laevis*) er noen. Det mest kjente eksempelet er mus som blir mye brukt innen farmasøytisk forskning og embryonale studier. Andre, i økende grad brukte eksperimentelle arter er sebrafisk og medaka. Disse blir mye brukt for å studere funksjonen til enkeltgener ("functional genomics") og i økende grad for å kartlegge sykdomsmekanismer med tilhørende forskning for å finne behandlingsterapier ("drug screening"). Når det gjelder testing av substanser med potensiale som legemidler, kreves et stort antall individer. Her har de små laboratoriefiskene et viktig fortrinn. Foruten om høy fekunditet og kort generasjonstid, finnes det omfattende dokumentert og tilgjengelig kunnskap om genomikk ("genomics"), embryologi og molekylærbiologi (inkludert "transcriptomics", "proteomics" etc "omics"), som sammen muliggjør skreddersydde mutanter og transgene

linjer med designede egenskaper.. Det er innlysende at dette har stor verdi i prosessen ved å forstå ulike/underliggende (biologiske)mekanismer, samt teste ut nye tiltak for foredling og behandling (av hva?).

Genomiske modellerarter blir valgt på bakgrunn av hvor de befinner seg i det evolusjonære tre, eller fordi genomet har en egenskap som gjør det attraktivt/interessant å studere. Et eksempel på dette er «pufferfish» (*Fugu rubripes*, *Tetraodon nigroides*) som har et lite og kompakt genom på 400 mill basepar (Mb), sammenlignet med 900 Mb i torsk og ca 4500 Mb i laks. Modellartene sebrafisk og medaka har henholdsvis 1500 og 700 Mb store genomer. Hovedårsaken til denne størrelsesforskjellen ligger i mengden av repetert DNA, større DNA segment mellom genene og lengre intronsekvenser, mens antall genfamilier og gener er omtrent den samme. Dette betyr at det i all hovedsak er liten variasjon i antall gener blant virveldyr, og genomstørrelsen sier lite om antall gener eller om genetisk kompleksitet. Blant artene ovenfor har laksens genom gjennomgått en genomduplisering (25-100 mill. år siden) mer enn de andre beinfiskartene som sammen med laksen gjennomgikk en genomduplisering etter at de skilte lag med landvirveldyr og pattedyr (450 mill. år siden). I evolusjonsprosessen etter de to genomdupliseringene er genomene langsomt i ferd mot den opprinnelige diploide status som pattedyrene har. Fortsatt er imidlertid 30-40 % fortsatt duplisert en eller to ganger. Dette medfører at deler av genomene fortsatt er tetraploide, eller for laks kanskje oktoploide med enkelte gener tilsvarende mange paraloge gener. De sistnevnte har hatt varierende grad av divergerende utvikling med alt fra konservert, til endret eller til tapt funksjon (pseudogen). Av dette er det innlysende at laks med det desidert største genomet og med en ekstra genomduplisering bak seg, byr på den største utfordringen å kartlegge. Det kan også uttrykkes slik at behovet for mindre komplekse modellfisk kan gjøre kartleggingen av relasjonen geno- og fenotype relasjonen lettere.

I det siste tiåret har sebrafisk blitt en av de mest brukte modellorganismene for virveldyr, særlig for biologer som studerer genetiske kontroll av tidlig utvikling, fysiologi og sykdom. Dette skyldes, i stor grad, at sebrafisk kombinerer en rekke sentrale embryologiske og eksperimentelle fordeler. De er bl.a. lett å avle, og de har robuste avkom som tåler eksperimentelle manipulasjoner slik som mikroinjeksjon og celle transplantasjon eksperimenter. Dette gjør at denne lille akvariefisken blir mye brukt innen forskning og undervisning i biologi og biomedisin, og er blitt brukt til å kartlegge ulike sykdomsmekanismer, ernæring, toksikologi mm. Ved å overføre slik kunnskap og utnytte sebrafiskmodellen innen akvakulturnæringen, kan en få økt forståelse av ulike fysiologiske og biologiske prosesser også i laks. I tillegg vil bruk av sebrafisk som forskningsverktøy gi anledning til parallell screening av mange faktorer i forskjellige kombinasjoner og konsentrasjoner (high-throughput analyser) og vil dermed kunne redusere antall gode kandidater til et minimum før videre utprøving i laks.

Komparativ genomikk vil si å sammenligne forskjellige organismers genom, både når det gjelder genenes sekvens, regulering, funksjon og relative plassering på kromosomene. Teknikken blir stadig mer aktuell innen human biomedisin, hvor sebrafisk i økende grad blir valgt som modellorganisme. Omtrent 70% av sebrafiskgenene har en motpart (ortolog) i det humane genom. Mulighetene for komparativ genomikk er også på plass mellom fiskearter. Dette, på tross av at laks har gjennomgått en ekstra helgenom duplisering i forhold til sebrafisk, og at den delvise tetraploiditeten hos sebrafisk utgjør en stor forskjell.. Så selv om det til dels er store forskjeller i genomstørrelse og struktur mellom teleostarter, er det også store likheter. Siden det er disse likhetene som benyttes til sammenligninger, vil ulikheten være av underordnet betydning. Den ekstra helgenom dupliseringen til laksegenomet har gitt en økt kompleksitet relativt til mange andre teleostarter ved at

laksegenomet inneholder flere kopier/varianter av samme gen (paraloge gener). I studier av geners funksjon har man behov til å skille funksjonen til slike paraloge gener, og dette er et område der komparativ genomikk mellom laks og sebrafisk vil ha stor betydning.

Analyse av genfunksjon i sebrafisk

I snart 30 år har sebrafisk blitt brukt som modell for å studere ulike biologiske prosesser og tidlig fosterutvikling. I løpet av denne tiden har det blitt utviklet stadig flere molekylærbiologiske verktøy, teknikker og protokoller for å studere disse prosessene. Grunnet den raske utviklingen til sebrafisk-embryoer er det relativt enkelt å undersøke effekten av mutasjoner og endringer i genfunksjon (**funksjonell genomikk**) på tidlig utvikling. I de gjennomsiktige embryoene er det enkelt å følge fosterutviklingen under lupe. Ved å etablere transgene sebrafisk hvor fluorescerende proteiner (eks. GFP) drives med gen/vevs-spesifikke promotorer, er det mulig å merke ulike celletyper. Dette tillater direkte visualisering av vev og organdannelse, samt å følge vandringen til ulike migrerende celler mens dette skjer i et levende embryo. På sebrafisk har en nylig startet et prosjekt kalt "**the zebrafish phenome**" hvor en systematisk muterer hvert protein-kodende gen, for deretter å karakterisere morfologiske, fysiologiske og atferdsmessige fenotyper som følger av dette. Dette vil ha stor betydning for forståelsen av ulike geners funksjon, også i andre arter som laks. Flere tilnærminger blir brukt for å kartlegge sebrafisks «phenome» og noen av de mest sentrale teknikkene er nevnt bakerst/til slutt i rapporten. Resultatene fra «phenome» prosjektet vil være en svært nyttig resurs som vil generere mye kunnskap relevant både for human biomedisinsk forskning og for akvakulturnæringen. I tillegg til å overføre konkrete resultater av sebrafisk genomikk og utviklingsbiologi til akvakulturarter, kan også mange av de teknologiske og metodologiske tilnærmingene etablert i sebrafisk i fremtiden overføres til laks og andre salmonider.

Faktaboks: Funksjonell genomforskning:

Funksjonell genom forskning er å forstå funksjonen til gener og hvordan disse blir regulert i et helt genomperspektiv. Her prøver en å integrere de store mengdene av data som blir generert fra et genomprosjekt til å beskrive genfunksjon og de nettverk genproduktene er involvert i. Målet med funksjonell genomforskning blir altså å oversette genomsekvens informasjon (genotype) til en organismes egenskap (fenotype) under gitte betingelser. Dette oppnås ved å tildele spesifikke funksjoner til gener, ikke-kodende RNA og regulatoriske elementer noe som gir en bedre forståelse av hvordan genomet enten indirekte eller direkte påvirker en organismes ulike fysiologiske prosesser som utvikling, vekst, metabolisme, immunitet osv. En har startet et slikt storstilt prosjekt på det humane genom kalt ENCODE (Encyclopedia of DNA elements) hvor målet er å identifisere alle funksjonelle elementer i både kodende og ikke kodende regioner av genomet.

Test av genfunksjon: «Knockdown» og «knockout» teknikker i sebrafisk: Testing av genfunksjon begynner ofte med en DNA-sekvens hvor utfordringen blir å omdanne sekvensinformasjon til funksjon. En tilnærming er å søke databaser for godt karakteriserte proteiner som har lignende aminosyresekvenser til proteinet kodet av genet, samt ekstrapolere funksjonen ut fra struktur og kjent funksjon i andre arter. Men for å finne ut hvilken rolle et gen har i en celle eller organisme, vil den mest effektive tilnærmingen være å studere mutanter som enten mangler genet eller uttrykker en endret versjon eller mengde av det. En vil da kunne fastslå hvilke cellulære prosesser som har blitt endret, noe som igjen vil si oss hvilken biologisk rolle og funksjon genet har.

Mutagenese screening – kjemisk mutagenese: En av de første metodene som ble tatt i bruk på sebrafisk for å studere genfunksjon var kjemisk mutagenese. Denne metoden baserer seg på å introdusere tilfeldige

mutasjoner i genomet som kan endre genfunksjon for deretter å undersøke individuelle avkom for fenotypiske trekk. Denne metoden har den fordelen at den er objektiv i forhold til tidligere genetisk kunnskap, og kan dermed føre til at man identifiserer nye og ukjente gener. En ulempe med denne metoden er at det kan være tidkrevende å identifisere de affekteerte genene v.h.a. posisjons kloning.

Spesifikk «knock-down» eller «knock-out» av gener

Morfolino: Flere metoder for å endre/reducere genaktiviteten til spesifikke gener er etablert i sebrafisk. I en metode benytter en antisens morfolino (kjemisk modifiserte oligonukleotider) som er designet til å sterisk blokkere spesifikke mRNA, vanligvis ved START kodon (ATG) eller ved pre-mRNA splicing steder. Når disse injiseres i et embryo (vanligvis i eggeplomme av én-celle embryo), vil morfolinoen binde seg til og umiddelbart blokkere translasjonen av mRNA til funksjonelt protein, og en vil få en fenotype som ligner eller er identisk med en tap-av-funksjons mutant. En har brukt denne metoden i sebrafisk ved flere studier relatert til human biomedisin slik som tidlig utvikling av nervesystemet, hjerte/kar systemet, bukspyttkjertelen mm. Bruk av knockdown teknikker interfererer med gen aktiviteten på mRNA nivå, og blir derfor ikke nedarvet til neste generasjon. For å lage arvbare mutasjoner i spesifikke gener på genom nivå har det i de siste årene blitt utviklet flere metoder inkludert TILLING, bruk av Zinc Finger Nucleaser og TALENs.

Zinc Finger Nucleaser (ZFN) og “Transcription Activator-Like Effector Nucleases” (TALENs) medierte mutagenese: Dette er metoder som kan generere skreddersydde mutasjoner («genome editing») i genomet til sebrafisk og i prinsippet mange andre arter inkludert laks. Disse metodene baserer seg på konstruerte DNA bindende proteiner linket til katalytiske domener som kutter DNA. Slike ZFN og TALENs blir injisert i sebrafisk egg i form av mRNA konstrukt. Disse konstruerte enzymene kan kutte spesifikt i gener, og det genereres mutasjoner gjennom feilreparasjoner av det dobbeltrådede DNA kuttet gjennom homolog rekombinasjon. Disse mutantene kan videre krysses for å studere mer komplekse signalveier og interaksjoner innen og mellom gennettverk.

Transgen teknologi: Med sin korte generasjonstid, og høyt antall avkom, er sebrafisk meget godt egnet for transgen manipulering, og flere metoder har blitt utviklet for å lage transgene sebrafisk linjer med høy effektivitet. Mens en tidligere injiserte nakent DNA, bruker en nå transposon-medierte integrasjon. Spesielt har det Tol2 transposable elementet vist seg å være svært effektivt til å integrere fremmed DNA i sebrafisk genomet. Tol2 elementer er plassert 5' og 3' av en minimal promotor etterfulgt av et fluorescerende protein. Dette blir injisert sammen med mRNA som koder for en transposase genet direkte inn i embryoer på én-celle stadiet. Med denne teknologien kan en gjøre sofistikerte analyser og blandt annet introdusere ulike systemer for kontroll av gen ekspresjon, samt bruke fluoriserende proteiner til å merke spesifikke celletyper og følge disse gjennom embryogenesen.

Bruk av sebrafisk som modell innen akvakultur forskning

Selv om mye kunnskap er generert direkte fra laks, regnbueørret og andre matfisk-arter, har fortsatt modellartene stort potensiale for å utvide forståelsen av hvordan hormoner, vekstfaktorer og de involverte gen-nettverkene funksjonelt regulerer produksjonsegenskaper som f.eks. vekst og fertilitet. Et viktig fortrinn ved å bruke sebrafisk er alle de etablerte metodene (se appendiks) for å manipulere og studere effekten av endret genuttrykk. Nedenfor er noen eksempler fra modellfisklitteraturen som viser ulike vinklinger av studier på molekylære mekanismer som regulerer fysiologiske egenskaper med relevans for oppdrettsfisk.

Sykdom og profylakse: Fiskesykdommer er blant de store begrensende faktorene for akvakulturnæringen. Dagens metoder for kontroll av smittsomme sykdommer består av hygiene, vaksiner, behandling med medisiner og utrydding av infiserte populasjoner. Suksessen med å avle frem en IPN resistent laks og identifisering av en QTL som alene forklarte ca. 80 % av den genetiske variasjonen for egenskapen IPN resistens, og bruk av molekylærbiologiske metoder åpner for helt nye tilnæringsmåter i avlsarbeidet på dette området. Forbedret sykdomsmotstand med avlsarbeid og genetiske metoder er attraktivt på grunn av utsiktene til langvarig beskyttelse. En rekke sykdomsmodeller med virus- (IHN, IPNV, NN, SVCV, SHR, VHSV) og bakreiepatogener (*Aeromonas salmonicida*, *Edwardsiella tarda*, *Flavobacterium columnare*, *Listeria spp.*, *Listonella anguillarum*, *Mycobacterium haemophilum*, *M. marinum*, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus spp.*) er etablert i sebrafisk og beskrevet i litteraturen (Sullivan & Kim (2008). *Fish Shellfish Immunol.* **25**, 341–350). Mange sykdomsmodeller består i karakteriserte mutanter eller transgene linjer som er designet til å være mer følsomme for sykdom og/eller til å endre fenotype som respons på patogenese på en lett registrerbar og målbar måte (ved bruk av reporter gener). I tillegg kan nanoteknologi fører til mange nye anvendelsesområder med bl.a. nanopartikkelmediert delivery av vaksiner og antibiotika med relevans for akvamedisin (forskes på ved NVH (Øystein Evensen) og UiO (Gareth Griffiths: “Nanobead therapy against tuberculosis in zebrafish model”). Nye nukleinsyrabaserte vaksinestrategier kan også bli viktig (Mikalsen *et al.* 2004. *Dis. Aquat. Org.* **60**, 11–20; Gomez-Casado 2011. *Vaccine* **29**, 2657–267). Andre GM-relaterte metoder er bruk av RNAi for å hemme uttrykk av nøkkelgener til patogene organismer. Det er f.eks. blitt produsert en transgen fugleinfluenza resistent kylling v.h.a. denne strategien (Lyall *et al.* 2011. *Science* **331**, 223–226). Bruk av modellfisk er et svært nyttig verktøy for å oppklare sykdomsprosesser og for å forhindre dem i å oppstå noe som vil komme oppdrettsnæringen til gode i årene som kommer.

Vekst og pubertet: I tillegg til seleksjonsavl for å fremme vekst, har mange ulike fiskearter blitt genmodifisert med veksthormongener (GH). AquAdvantage laks (<http://www.aquabounty.com>) er den mest kjente, men den er i godt selskap med GH-transgene linjer fra bl.a. tilapia, karpe og channel catfish (Maclean 2003. *Trends in Food Science & Technology* **14**, 242–252). Størst effekt er oppnådd med transgen “mud loach” (*Misgurnus mizolepis*), der ekstra kopier av mud loach GH-genet resulterer i en 35-foldig raskere vekst (Nam *et al.* 2001. *Transgenic Res* **10**, 353–362). Studier av GH-transgen sebrafisk for å kartlegge korrelasjon mellom gener involvert i somatotrof akse og myogenese viser at de transgene fiskene har muskelcellhypertrofi som er mest uttalt hos hunnfisk (Kuradomi *et al.* 2010. *Transgenic Res* **20**, 513–521). Det er også vist at hemming av myostatin-uttrykk fører til “Belgium Blue” sebrafisk (Lee *et al.* 2009. *BBRC* **387**, 766–771). Forskeren Bob Devlin fra West Vancouver i Canada har gjort flere studier av sine transgene GH-laks og har bl.a. kunnet vise at dagens ikke-transgene oppdrettslaks som har en doblett vekst etter ca 10 generasjoners seleksjons avl, ikke stimuleres til økt vekst ved ekstra tilførsel av GH slik villlaksen kan (Raven *et al.* 2012. *General and Comparative Endocrinology* **177**, 143–152). I en studie av proteomet fra laksehypofyse, etter +/- GH stimulering, er det vist at prolaktin øker 2,3 foldig og at somatolactin blir nedregulert, noe som kan tyde på at også endringer i PRL- og SL-nivåer medvirker til veksteffekten som oppnås i genmodifisert GH-laks (Kurata *et al.* 2012. *J Proteomics* **75**, 1718–1731).

Ved å hemme syntesen av det overordnede sexhormonet GnRH, som kontrollerer hypothalamus-hypofyse-gonadeaksen, blokkeres produksjon av kjønnssteroider og gonadeutvikling noe som resulterer i infertilitet. Selv om strategien kan brukes til å lage steril fisk (Alestrom *et al.* 1992. *Mol.*

Marine Biol. Biotechnol. **1**, 376–379; Uzbekova, S. et al. 2000. *J. Mol. Endocrinol.* **25**, 337–350), så kan det være en ugunstig kobling mellom GnRH og negativ regulering av vekst. Bruk av grønt fluoreserende protein (GFP) som reporter gen er en mye brukt transgen strategi for å studere temporal og spatial genuttrykk, og dette er også blitt brukt innen GnRH-forskning (Torgersen et al. 2002. *BMC Genomics* **3**, 25; Hildal et al. 2012. *Dev. Dyn.* **241**, 1665–1677).

Økologisk hensyn - steril oppdrettsfisk: Biologisk innestenging (“biological containment”) har lenge vært et delmål innen fiskeoppdrett, i hovedsak for å forhindre rømt oppdrettsfisk fra å “spre sine gener” etter etablering i elver og vassdrag. En annen mulighet er å kontrollere kjønnsmodningen og benytte dette til å gjøre oppdrettsfisken infertil. Hemming av GnRH-syntese kan gi steril fisk som beskrevet ovenfor. En tilsvarende strategi består i å hemme syntesen av proteinet Dead end (Dnd1) som sikrer syntesen av proteinet Nanos som er nødvendig for at “Primordial germ cells (PGCs)” kan utvikles videre til “germ line” og kjønnsceller. Dette er beskrevet i detaljert i sebrafisk (Slanchev et al. 2005. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **102**, 4074–4079; Kedde et al. 2007. *Cell* **131**, 1273–1286).

Sceening av biologiske effekter, toksiske bivirkninger og miljøpåvirkning: Sebrafisk brukes i økende grad sammen med “high-throughput (HTP) screening” til å avdekke eventuelle toksiske effekter av ulike doser av medikamenter eller miljøgifter (“drug screening”). Denne screeningen foregår ved eksponering av fiskelarver i 96 og 384 brønners-plater, med påfølgende analyser av fenotypiske og genetiske effekter. Sekvensering av laksegenomet sammen med komparativ genomikk vil i tillegg gjøre det mulig å identifisere og karakterisere repertoaret av cytokrom P450 genene som finnes i laks, noe som vil være nyttig i forhold til å bestemmes den videre effekten av og toksisiteten til medikamenter og miljøgifter på ulike fysiologiske prosesser.

Med den pågående globale klimaendringen har en fått en økning av temperaturen i havet som er med å påvirke vannets kjemi med økt CO₂ og senket pH noe som påvirker livet i havet inkludert virus, prokaryote organismer, encellede plante- og dyreceller. Sebrafisk blir i økende grad brukt til screening av effekten av både slik miljøpåvirkning og virkningen av miljøgifter. Eksempler fra Norge omfatter kartleggingen av POP’s (Persistent organic pollutants) ekstrahert fra lever i lake fanget i Mjøsa (Nourizadeh-Lillabadi et al. 2009. *J Toxicol Environ Health A.* **72**:112-30; Lyche et al. (2012. *Aquatic Toxicology*, Doi: 10.1016/j.aquatox.2012.08.019). Kartlegging og risikovurdering av radioaktiv stråling er et annet område med relevans til klima og miljø der sebrafisk er brukt (Simon et al. 2011. *J Environ Radioact* **102**, 1039–1044). En rekke studier kartlegger også effektene fra ulike typer av stress (Fuzzen et al 2010. *Zebrafish* **7**, 349–358).

Fôrutnyttelse: Det er et økende behov for å finne ut hvordan ulike fôrtyper virker inn på bl.a. tarmhelse, fôrutnyttelse og vekst. Dette er et område hvor en kan bruke sebrafisk til bla, å identifisere hvilke gener og reaksjonsveier som blir påvirket av ulike fôr og fôr-ingredienser. Utnyttelse av nye fôrtyper og teknologi vil bidra til å utvikle næringen videre. Et klassisk eksempel på fisk med bedret forutnyttelse er den genmodifiserte GH-laksen AquAdvantage® Salmon (AAS) med rapportert ca 10 % bedret “gross feed conversion efficiency rate” i forhold til ikke-transgen fisk (Cook et al. 2000. *Aquaculture* **188**, 15–32).

Zebrafish Network Norway: "Norwegian Zebrafish Platform" ble etablert ved NVH som en av FUGE-programmets teknologiplattformen i oktober 2007 med prof. Peter Aleström som leder. Plattformen og AZLab fikk akkreditering (AAALAC International) i februar 2008. Plattformen koordinerer "Zebrafish Network Norway (ZNN)" som samler 13 norske forskergrupper (hvorav to bruker medaka som modell) og er oppkoblet mot over 350 i EU som alle benytter sebrafisk (et mindretall bruker medaka) som modellorganisme. Det europeiske sebrafisknettverket bærer en akronym, EUFishBioMed, med tydelig adresse på sebrafiskmodellens bruk innen human biomedisinsk forskning.

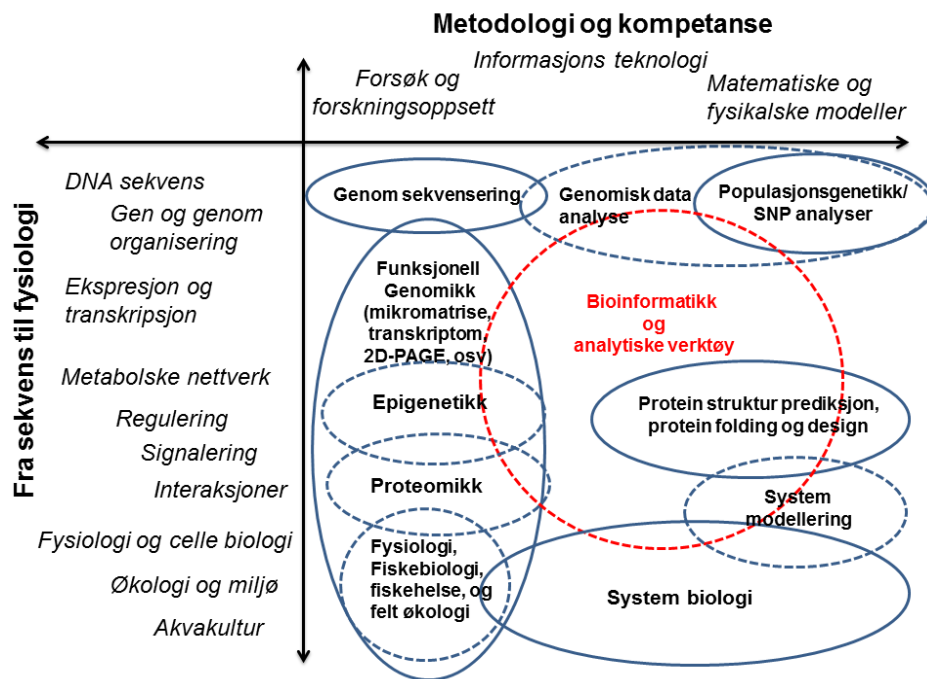
5.5 Kompetanse

De siste årene har en sett en dramatisk økning i genomiske og proteomiske data fra ulike stor-skala eksperiment som blir gjort offentlig tilgjengelig, noe som igjen har gitt en ny dimensjon til moderne biologisk og biomedisinsk forskning. Nå som den komplette genomsekvensen til laks og andre arter er kartlagt vil detaljerte analyser utvilsomt bedre vår forståelse av ulike biologisk systemer. Men en genomsekvens alene avslører ikke selv funksjonen til genene, men er snarere et utgangspunkt for å forstå gen og gen produkters roller, som for eksempel uttrykksmønstre i vev og organer, protein syntese og struktur eller hvordan ulike prosessene endres og reguleres. En genomsekvens forteller oss heller ikke om hvilke funksjonelle prosesser et gen eller protein er involvert i, som for eksempel om de er med ulike i signaltransduksjonsveier eller om de er med i transkripsjon, mRNA prosessering, mRNA stabilisering, translasjon, eller post-translasjonelle modifikasjoner. Disse oppgavene blir overlatt til den «moderne biologen», som må dekode og kartlegge de aktive genene, og bestemme de nevnte funksjonene. Gjennom forsøk og forsøksoppsett må en bruke moderne teknologi og kompetanse, som sammen med sekvensinformasjon kan brukes til å kartlegge ulike fysiologiske problemstillinger for å forstå laksens biologi og som er til nytte for næringen. For å utnytte de store informasjonsmengdene som avansert bioteknologi og genomikk genererer må en altså ha kompetanse innen ulike disipliner som biologi, cellebiologi, molekylærbiologi, biokjemi og ikke minst bioinformatikk (Figur 3). For å forstå denne komplekse genomiske informasjonen kreves det altså en helhetlig (holistisk) tilnærming. Det endelige nivå av integrasjon av slik genetisk informasjon blir kalt systembiologi, der mRNA, proteiner og metabolitter blir analysert parallelt med et komplett sett av analytiske teknikker. Informasjon samles inn, analyseres, integreres, linkes til kjent informasjon og blir deretter beskrevet i nettverk og systemer

Faktaboks: Bioinformatikk

Ordet bioinformatikk er bygd opp fra to komponenter, "bio-" og "informatikk". "Bio-" delen refererer til molekylærbiologi, genetikk og transkriptomikk (dvs. studier av sekvenser og strukturer av DNA, RNA og proteiner, samt evolusjon og interaksjon av disse makromolekylene), og "informatikk" delen som refererer til informatikk (dette inkluderer utvikling og design av praktiske algoritmer, organisering og lagring av data, samt henting og visualisering av disse dataene). En bruker altså bioinformatikk for å modellere, organisere og forstå molekylærbiologiske forsøk og funksjonell genomikk, samt til å gjøre analyser og søk i biologiske databaser forut for biologiske eksperimenter.

For å videre utnytte laksegenomet og nyttiggjøre seg funksjonell genomikk er det viktig at det bygges opp sterke faglig kompetanse miljøer innen de nevnte disipliner noe som vil gi grobunn for kunnskapsdrevet innovasjon.

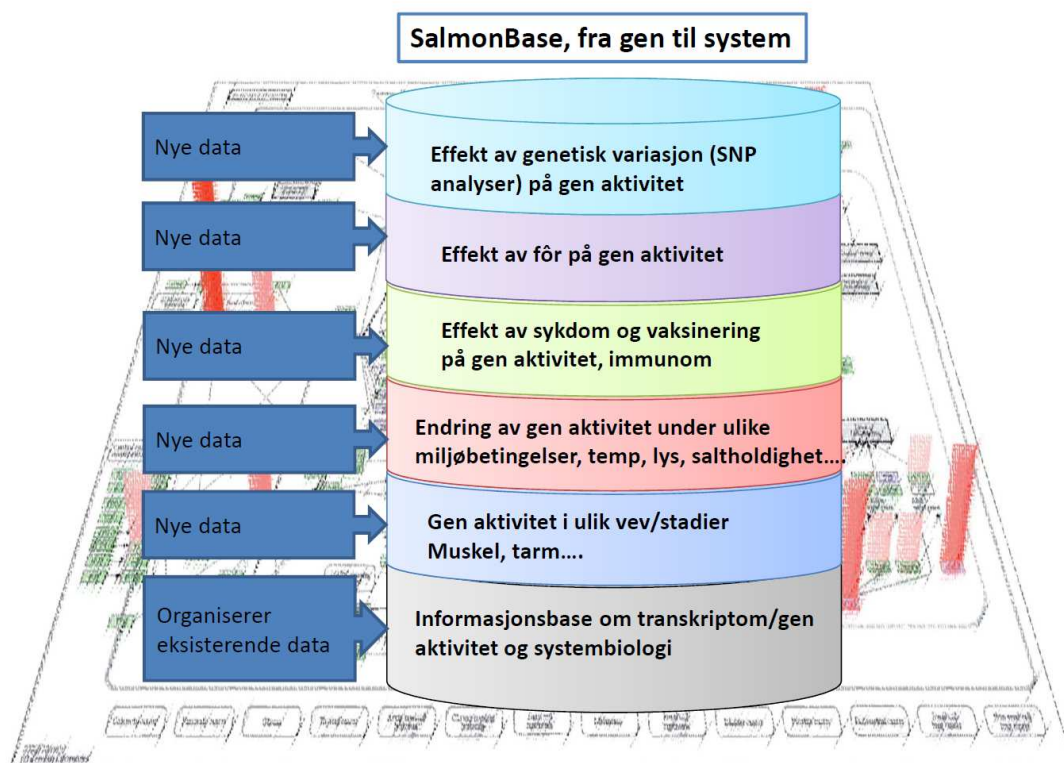


Figur 3. Moderne biologisk forskingskompetanse

Flere aktører innen havbruksnæringen har allerede i dag opparbeidet seg god faglig kompetanse innen sine respektive områder og driver i tillegg et utstrakt prosjektsamarbeid med universitet og institutt sektoren. Utfordringen blir da å opprettholde og ivareta samarbeidet også etter at prosjektene er avsluttet. Bruk og rekrutering av nærings PhDer fra slike samarbeidsprosjekt kan være med å bygge forbindelser mellom næringen og Fou sektoren. De ulike sektorene trenger også ulike kompetanse, slik at avlsindustrien ikke nødvendigvis har behov for samme kompetanse som fôr-vaksine eller lakseproduksjons aktørene.

5.6 Laksebasen, en informasjonsbase om genaktivitet bygget på RNAseq

En informasjonsbase om hvilke gener som er aktive i ulike vev, organer og utviklingsstadier vil være et viktig bidrag til å forstå ulike biologiske prosesser hos laks. Ved å analysere hvordan genaktiviteten blir påvirket av faktorer i oppdrettsmiljø (bl.a. lys, temperatur og oksygen nivå), fôr, patogener og liknende ved hjelp av RNAseq, vil en få en dynamisk oversikt over hvordan fisken (organ, vev, og celler) responderer på ulike abiotiske og biotiske faktorer (Figur 4). I tillegg kan en ved hjelp av systembiologiske verktøy få en oversikt over hvilke genetiske nettverk som blir påvirket av de ulike faktorene. Ved å bruke fisk av ulike genetisk bakgrunn i de samme forsøkene («common garden experiments») vil en også kunne analysere genetiske effekter og bestandsforskjeller.



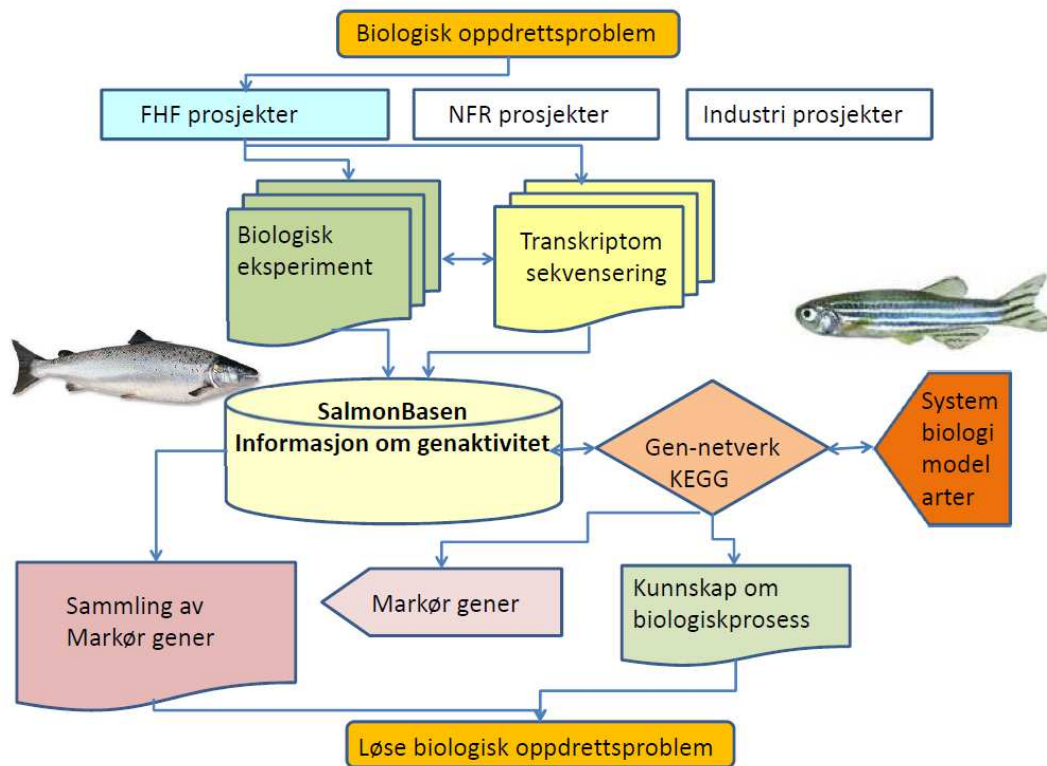
Figur 4. Forslag til hvordan en kan systematisere og bygge opp en informasjonsbase om gen aktivitet knyttet til ulike biologiske områder som er viktig for lakseoppdrett.

Laksebasen må inneholde kvalitetssikret data som har god biologisk annotering, systematisert prøvetaking og hvor de biologiske eksperimentene har relevante kontroller og tidsuttak. For å bygge opp en slik informasjonsbase kreves følgende pipeline.

- 1) Annotering av hvert eksperiment (utviklingstadium/fenotype/kjønn/vev/miljø/ ect)
- 2) Lagring av alle RNAseq reads
- 3) En annotasjon mot genomsekvens, telle opp antall «reads» for hvert gen (evt hver annotert spleiseform) og beregne mål på uttrykk (aktivitet) ut fra antall «reads» per lengde på gen/spleiseform og antall «reads» totalt. Disse målene må videre normaliseres mellom eksperiment og mellom gen/spleisevariant.
- 4) Gjøre data tilgjengelig gjennom en «browser» - eller på andre vis- der man kan visualisere mengde uttrykk per gen/vev/utviklingstadium/alder/kjønn etc. og evt trekke ut gen-uttrykksmatriser som kan analyseres ved hjelp av passende verktøy f.eks. J-Express eller R - inkludert annotasjon av gener, f.eks. GO, KEGG etc.

Dersom man tar vare på alle reads, vil vi kunne kjøre denne «pipelinen» på nytt for nye genom-assembly og for nye annotasjoner av genomet. RNAseq data er også verdifulle i selve annoteringen av genomet fordi de kan støtte prediksjon av gener (evt svekke dersom det ikke er noen reads for et predikert gen).

En slik informasjonsbase vil være viktig i arbeidet med å få oversikt over ulike gen-nettverk involvert i ulike prosesser, og for å gå over fra en fase hvor en studerer effekter på enkelt gener til å forstå helhetlige systemer i den hensikt å finne markører/predikatorer for biologiske prosesser med betydning for oppdrett (Figur 5)



Figur 5. Flytdiagram over hvordan satsing på forskningsprosjekter med fokus på utfordringer innen havbruk kan bidra med informasjon om gen aktivitet (transkriptom sekvensering) som lagres i en felles database og hvor dataene blir koblet til gen-nettverk og systembiologi. Dette vil gi et godt grunnlag for å finne markører/predikatorer for ulike og viktige mekanismer som bl.a. sykdomsrespons, smoltifisering etc.

Appendiks

Analyser av gen ekspresjon og funksjon: Alle vertebrater inkludert fisk består av ulike celletyper, vev og organer med spesifikke funksjoner. Disse funksjonene kommer til uttrykk ved at gitte sett av gener blir transkribert til et nivå slik at rett mengede protein blir dannet til å utøve funksjonen. Genuttrykk profilering, dvs måling av aktiviteten (uttrykket) av tusenvis av gener på en gang, vil gi et globalt bilde av den cellulære funksjonen. Vanligvis måler man det relative genuttrykket under to eller flere eksperimentelle forhold. Det vil si at en måler den relative mRNA mengden i en behandlet mot en normal prøve for å kunne påvise hvilke gener som blir påvirket av behandlingen. På denne måten kan man tilegne gener gitte egenskaper og funksjoner

Det finnes flere metoder for å måle genuttrykket på, både i hele organisme eller i spesifikke vev til gitte tidspunkt. Disse er enten hybridiserings baserte (cDNA microarray, oligoarray) eller sekvensbaserte tilnærminger (EST, SAGE eller RNA-seq). Det mest vanlige i dag er å bruke micromatrise analyser eller RNA – seq ved hjelp av Neste generasjons DNA sekvensering.

Micromatriser: Hovedprinsippet med DNA microarray (mikromatriser) er at en fester tusenvis av DNA sekvenser/prober til en glassplate (DNA chip). En hybridiserer så med fluorescens merkede cDNA prøver og vasker vekk ubundet DNA. Visualiseringen og kvantifisering skjer ved hjelp av en laser som måler den relative mengden probe som er bundet. Det finnes to typer microarray for deteksjon av gen aktivitet. I cDNA micromatriser inneholder hver spot en klon fra et kjent gen (PCR produkt), noe som gir bedre resolusjon i hybridisering da disse probene er relativt lange. Oligo mikromatriser er prefabrikerte eller syntetiserte enkeltrådige oligoer basert på informasjon fra kjente databaser. Siden disse oligoene er korte kan en ha høyere tetthet av prober på chipen.

RNA-seq: Ved RNA sekvensering (RNA-Seq) bruker en de nyutviklede dypsekvensering teknologiene. Her blir en populasjon av RNA (total eller fraksjonerte slik som poly (A) +) omdannet til et bibliotek av cDNA-fragmenter med adaptore festet til en eller begge ender. Hvert molekyl, blir deretter sekvensert ved hjelp av NGS teknologi fra den ene enden (single-end sekvensering) eller fra begge sider (par-end sekvensering). En får da sekvens lengder på 30-400 bp, avhengig av hvilken DNA-sekvensering metode som benyttes. I prinsippet kan hvilken som helst av de nye sekvenserings teknologiene brukes til RNA-Seq. Etter sekvensering finnes det to måter å analysere RNA-seq dataene. Dersom en kjenner genomsekvensen til arten er studerer, kan en enten sammenstille sekvensene med referanse genomet eller et referanse transkriptom. Alternativt kan man sette sammen transkripsjons dataene uten referanse genom, hvor en da lager et transkripsjons kart bestående av både den transkripsjonelle strukturen og mengden av hvert gen som er uttrykt. En fordel med RNA-seq i forhold til hybridiserings baserte teknikker er at en kan skille transkripter ned til enkeltbase nivå, og en kan få full oversikt over hvordan exon strukturen til et gen er. Dette gjør at RNA-seq er svært nyttig i studier av ukjente og komplekse transkriptom og til å finne sekvensvariasjoner (f. eks. SNPs) i transkriberte regioner.

En annen fordel med RNA-Seq i forhold til DNA mikromatriser er at RNA-Seq har et meget lavt, om noe, bakgrunns signal siden DNA sekvenser enkelt kan tilbakeføres til unike regioner av genomet. I tillegg har ikke RNA-Seq noen øvre grense for detektering, og mengden vil korrelere med antall sekvenser funnet i dataen. Følgelig, har RNA-seq et stort og dynamisk område over hvilke uttrykksnivåer som kan oppdages.

Neste generasjons DNA sekvensering: De siste årene har det foregått en rivende utvikling innen sekvenseringsteknologi og denne utviklingen har nå ført til at sekvensering av hele genomer og andre store sekvenseringsprosjekter nå kan utføres til en noenlunde overkommelig pris. Disse fremskrittene har åpnet opp for nye studier innen komparativ genomikk, stor skala assosiasjons studier, metagenomikk og analyser av historiske DNA prøver. I tillegg blir disse metodene mye brukt innen kvantitativ analyse av gen ekspresjon og funksjonell genom forskning.

Neste- generasjons DNA sekvensering referer til teknologier som ikke bruker tradisjonell dideoxy-nukleotid (Sanger) sekvensering hvor merkede DNA fragmenter blir fysisk adskilt ved hjelp av elektroforese. Disse nye teknologiene benytter seg av andre strategier som i all hovedsak består av sanntidsdeteksjon av baseinkorporasjon i et høyt antall av parallelle sekvensreaksjoner (massive parallell sequencing). Det er i hovedsak tre plattformer/leverandører innen massive parallell DNA sekvensering som blir mest brukt i dag: 454/Roche Diagnostics, illumina (tidligere solexa) og SOLiD. Nylig har i tillegg to nye systemer blitt tilgjengelig: Helicos Heliscope og Pacific Bioscience SMRT.

454 Pyrosekvensering: I 454 plattformen fra Roche Diagnostics blir DNA eller genomisk DNA fragmentert til 300-800bp og adaptorer blir så festet til hver ende av fragmentene. Disse fragmentene utgjør nå et adaptor ligert DNA bibliotek og adaptorene kan bli brukt både til amplifisering og sekvensering av DNA fragmentene. En av adaptorene inneholder en 5'-biotin tag som gjør at disse kan bindes til streptavidin belagte perler. Den ikke-biotinylerte tråden blir brukt som templat for amplifisering av biblioteket ved hjelp av emulsjons PCR inntil et optimalt antall kopier er nådd per perle. Dette resulterer i perle bundne amplifiserte DNA fragmenter som brukes til pyrosekvensering.

Prinsippet ved pyrosekvensering er at når et nukleotid inkorporeres av DNA polymerase, vil et pyrofosfat-(difosfat)molekyl frigjøres. Dette molekylet omdannes til ATP av sulphurylase, som deretter anvendes av luciferase til å oksydere luciferin til oxyluciferin. Ved denne reaksjonen produseres det lys. Mengde lys er proporsjonalt til antall nukleotider som bygges inn, og måles av et sensitivt CCD kamera. T-basen blir tilsatt de perlebundne DNA fragmentene først, og bare de brønnene som inneholder en kule hvor en T kan inkorporeres vil lyse opp. Deretter vaskes platen, og så tilsettes neste base, A- deretter gjentas den samme prosedyre til C og så G er tilsatt. For hver syklus blir det tatt et bilde av platen som viser alle kulene der den aktuelle base ble bygget inn.

Illumina: Illumina har utviklet en sekvensteknologi som er basert på reversible farge-terminatorer. Her blir DNA fragmenter festet til primere på en glassplate og amplifisert. Fire typer fluorescerende terminator baser blir tilsatt under amplifiseringen og hver terminator blir avbildet etterhvert som hver dNTP blir lagt til og fjernet for å tillate inkorporeringen av neste base, noe som resulterer i en base for base sekvensering.

SOLiD Sekvensering: SOLiD teknologien bruker et sekvensering ved ligerings prinsipp. Her blir DNA fragmentert og en universell adapter (P1) blir satt på som igjen festes til in perle. Amplifisering av biblioteket skjer ved emulsjons PCR slik at DNA fragmentene som er festet til en perle er identiske. Perlene blir så bundet til en glassplate hvor sekvenseringsreaksjonen blir utført. Sekvensreaksjonen utføres ved at en primer hybridiseres til adapter sekvens P1 og et sett av fire fluorescerende di-baseprober konkurrerer om å liggeres til sekvensieringsprimeren. Flere sykluser med ligering, deteksjon og fjerning og antall sykluser avgjør leselengden. Etter flere runder med ligeringer, blir produktet fjernet og templatet blir tilsatt en ny primer i posisjons n-1 for en ny runde med ligeringer. I alt blir det utført 5 runder med ligeringer slik at hver base blir undersøkt i 2 uavhengige ligerings reaksjoner ved hjelp av 2 ulike primere.