

Steril laks – kartlegging av faktorer sentrale i dannelsen av kjønnsceller hos Atlantisk laks

Samarbeidsprosjekt mellom Nofima og Aqua Gen 2013-2015

Helge Tveiten, Adrijana Skugor, Øivind Andersen, Krasimir Slanchev (Max-Planck Institute/Nofima), Maren Mommens (Aqua Gen) og Nina Santi (Aqua Gen)





Nofima er et næringsrettet forskningsinstitutt som driver forskning og utvikling for akvakulturnæringen, fiskerinæringen og matindustrien.

Nofima har om lag 350 ansatte.

Hovedkontoret er i Tromsø, og forskningsvirksomheten foregår på fem ulike steder: Ås, Stavanger, Bergen, Sunndalsøra og Tromsø

Hovedkontor Tromsø:

Muninbakken 9–13
Postboks 6122 Langnes
NO-9291 Tromsø

Ås:

Osloveien 1
Postboks 210
NO-1431 ÅS

Stavanger:

Måltidets hus, Richard Johnsensgate 4
Postboks 8034
NO-4068 Stavanger

Bergen:

Kjerreidviken 16
Postboks 1425 Oasen
NO-5828 Bergen

Sunndalsøra:

Sjølseng
NO-6600 Sunndalsøra

Felles kontaktinformasjon:

Tlf: 02140

E-post: post@nofima.no

Internett: www.nofima.no

Foretaksnr.:

NO 989 278 835

Rapport

	<i>Rapportnr.:</i> K-36/2015
<i>Tittel:</i> Steril laks – kartlegging av faktorer sentrale i dannelse av kjønnsceller hos Atlantisk laks. Samarbeidsprosjekt mellom Nofima og Aqua Gen 2013-2015	<i>Tilgjengelighet:</i> Åpen
<i>Forfatter(e)/Prosjektleder:</i> Helge Tveiten, Adrijana Skugor, Øivind Andersen, Krasimir Slanchev (Max-Planck Institute/Nofima), Maren Mommens (Aqua Gen) og Nina Santi (Aqua Gen)	<i>Dato:</i> 23. september 2015 <i>Ant. sider og vedlegg:</i> 20
<i>Avdeling:</i> Produksjonsbiologi	<i>Prosjektnr.:</i> 10661
<i>Oppdragsgiver:</i> Fiskeri- og havbruksnæringens forskningsfond (FHF)	<i>Oppdragsgivers ref.:</i> FHF # 900791
<i>Sammendrag/anbefalinger:</i> <p>Kjønnsmodning i oppdrett blir ansett som et problem med hensyn på rømming og interaksjoner med vill fisk, tapt tilvekst og redusert fiskevelferd. Inngående kunnskap om spesifikke gener og proteiner involvert i dannelse og utvikling av kjønn/germceller hos fisk har nå åpnet for å utvikle molekylærbiologiske og immunologiske metoder for produksjon av steril fisk. Prosjektet har undersøkt hvordan ulike gener av avgjørende betydning for etableringen av kjønnscellelinjen uttrykkes gjennom ulike faser av ovarieutviklingen hos laks. Spesielt fokus har vært rettet mot Buc proteinet som tidligere ikke har blitt karakterisert hos laks som har et tetraploid genom. Det ble funnet fire varianter av Buc genet hos laks, Buc1a, Buc1b, Buc2a og Buc2b, der Buc1b er et pseudogen som ikke uttrykkes. De tre aktive Buc-genene ble identifisert både som mRNA og protein i ovulerte og nybefruktede egg. Buc lokaliserer til strukturer under tidlig celledeling (celledelingsfuren) som indikerer at proteinet er involvert i etablering av kjønnscellelinjen hos laks. I tidlige stadier av ovarieutviklingen samlokaliserte Buc med flere andre proteiner involvert i kjønnscelleutvikling til en struktur i oocytten/egget kalt Balbiani legemet. Basert på funn som er gjort i prosjektet er Buc en klar kandidat for å utvikle molekylærbiologiske og immunologiske metoder for produksjon av steril fisk.</p> <i>English summary:</i> Sexual maturation is an unwanted trait in Atlantic salmon aquaculture both because escapees can possibly interact genetically with wild fish but also due to production losses and welfare issues related to this process. Recent knowledge about molecular factors involved in establishment and progression of the germ cell line (progenitors of egg and sperm) in fish has paved the way for development of molecular and immunological methods for fish sterilization. Detailed information about molecular factors involved in germ cell formation is therefore a prerequisite for the development of such methods. The current project has investigated temporal and spatial changes in expression of genes assumed to be important in germ cell development at different stages of ovarian development. Special emphasis has been directed towards the Buc gene/protein which has previously not been characterized in Atlantic salmon. Four different homologs of the Buc gene were found (Buc1a, Buc1b, Buc2a and Buc2b) of which Buc1b is likely a pseudogene and therefore not expressed. Buc was found in unfertilized eggs and early developing embryos both as mRNA and protein. Buc protein localizes to the cleavage furrow during early development which may indicate a function in specification of the germ cell line. During earlier stages of ovarian development, Buc co-localizes with other proteins that are important for germ cell development to an oocyte sub-cellular structure called the Balbiani body. Information obtained in the project, suggests Buc as a candidate target for knock down and sterilization by molecular or immunological methods.	

Innhold

1	Bakgrunn for aktiviteten	1
1.1	Bakgrunn.....	1
1.2	Styringsgruppen.....	2
1.3	Etablering av kjønnscellelinjen	2
1.4	Germ plasm lokalisering - betydning for spesifisering av kjønnscellelinjen.....	2
1.5	Germ plasm lokalisering gjennom oogenesen	3
1.6	FoU-prosjektets mål og betydning	3
2	Gjennomføring	5
2.1	Uttak av prøvemateriale.....	5
2.2	Kloning og uttrykk av kandidatgener.....	5
2.3	Antigen syntese og antistoff.....	5
2.4	Immunohistokjemi (IHC).....	5
2.5	In vivo lokalisering av Buc protein.....	6
3	Resultater.....	7
3.1	Buc gener	7
3.2	Uttrykk av <i>buc1</i> , <i>buc2a</i> og <i>buc2b</i> gjennom tidlig embryogenese	7
3.3	Buc2b proteinet i tidlig celledeling.....	8
3.4	Injeksjon av buc mRNA i lakseembryo	9
3.5	Uttrykk av <i>buc1</i> , <i>buc2a</i> og <i>buc2b</i> i juvenile og adulte ovarier	9
3.6	Uttrykk av <i>vasa</i> og <i>dnd</i>	10
3.7	Buc2b og Vasa protein i ovarier hos juvenil og 2-årig fisk.....	11
3.8	Samlokalisering av Buc2b og Vasa proteiner i juvenile ovarier.....	12
3.9	Lokalisering av Buc1 i ulike stadier av oocytutviklingen	12
3.10	Lokalisering av Dnd og Dazl protein i ulike stadier av oocytutviklingen	13
3.11	Lokalisering av Nanos1, Nanos 3a og Nanos3b protein i ulike stadier av oocytutviklingen.....	14
3.12	Uttrykk av <i>buc1</i> , <i>buc2a</i> , <i>buc2b</i> , <i>dnd</i> og <i>vasa</i> i ovarier og ikke-reproduktive vev.....	14
3.13	Studier av ovarieev ved hjelp av transmisjon elektronmikroskopi (TEM).....	15
4	Diskusjon og oppsummering	17
4.1	Diskusjon	17
4.2	Møter.....	18
4.3	Avvik	18
4.4	Tilleggs kommentarer.....	19
5	Referanser	20

1 Bakgrunn for aktiviteten

1.1 Bakgrunn

Norge har gjennom internasjonale avtaler forpliktet seg til å ta et særlig forvalteransvar for villaksen. Dersom målet er å sikre at havbruk ikke bidrar til varige endringer i de genetiske egenskapene til villfiskbestandene, må en i fremtiden basere seg på produksjon av steril oppdrettslaks. I dag regnes triploidisering der fisken får ett ekstra sett kromosomer, som den mest effektive metode for å sterilisere fisk i akvakultur. Bruk av metoden resulterer imidlertid i en økt frekvens av produksjonslidelser. Eksisterende teknologi for produksjon av steril fisk påvirker derfor fiskevelferden og produksjonsresultatene i negativ retning. Selv om triploid fisk kan komme til å spille en viktig rolle i lakseproduksjonen fremover, er det på lengre sikt et klart behov for å utvikle nye metoder for å hindre kjønnsmodning og reproduksjon hos laks i oppdrett.

Ny kunnskap om gener og proteiner involvert i dannelse og utvikling av kjønn/germceller hos fisk har nå åpnet for å ta i bruk molekylærbiologiske og immunologiske metoder for produksjon av steril fisk. Forskning på blant annet sebrafisk viser at det er mulig å produsere steril fisk med genteknologiske metoder gjennom å fjerne kjønnsstamcellene (PGC) hos embryoet i tiden etter befruktningen. PGCene differensieres fra somatiske celler i løpet av de første celledelingene, og (denne utvikling) er avhengig av spesifikke maternelle faktorer som er til stede i rognkornet allerede før eggøsning hos morfisken. Ved å inaktivere én av disse PGC-spesifikke faktorene rett etter befruktning har man vist at sebrafisk ikke utvikler gonader, men vokser ellers normalt uten forstyrrelser i den somatiske utviklingen. Det er sannsynlig at disse faktorene også kan blokkeres ved hjelp av immunologiske metoder.

Hos laks overføres antistoffer fra mordyr til avkom via rognkornet (maternell immunitet), slik at vaksinasjon av stamfisk kan bidra til å beskytte avkommet mot sykdom den første tiden etter klekking. På samme måte kan en forvente at maternelle antistoff mot faktorer nødvendig for PGC-utviklingen vil blokkere dannelsen av kjønns-organer/-celler og gi sterile avkom. Etablering av metodikk der en gjennom immunisering av stamfisken steriliserer alt avkom vil representere et gjennombrudd som sikrer en bærekraftig utvikling av laksenæringen.

Nofima har sammen med næringen (AquaGen) og Havforskningsinstituttet utarbeidet en modell for sterilisering av laks som baserer seg på å fjerne kjønn/germcellenes forløpere (PGC'er) eller stoppe gonadeutvikling gjennom juvenile stadier ved bruk av immunologiske metoder. En immunologisk/vaksine-tilnærming for sterilisering av laks har blitt oppfattet som interessant og akseptabel blant forbrukerne, og Norges Forskningsråd har innvilget et prosjekt (Salmosterile) over fire år for å utvikle metoder for slik sterilisering.

I Salmosterile er hovedstrategiene rettet inn mot å påvirke prosesser i germcellutviklingen *etter* at germcellelinjen er etablert, altså gjennom stadier av PGC-migrering og juvenile stadier av gonadeutviklingen. I det gjeldende FHF prosjektet har vi kartlagt uttrykk av faktorer som er kritiske for dannelse og utvikling av germcellene gjennom ovariets utvikling og vekst, altså *før* dannelsen av germcellene skjer. FHF prosjektet kompletterer derfor Salmosterile prosjektet på en god måte.

1.2 Styringsgruppen

Den FHF oppnevnte styringsgruppen for prosjektet har bestått av:

Harald Sveier, Ocean Forest AS, Lerøy Seafood Group.

Morten Lund, Åsen Settefisk AS.

Eirik Welde, Smolten AS.

Kjell Maroni har vært FHF sin kontaktperson og observatør.

Vi takker styringsgruppen og FHF for konstruktivt og godt samarbeid

1.3 Etablering av kjønnsellelinjen

Kjønnscellenes stamceller, eller primordial germ cells (PGCs) er forløperne til alle gameter, egg og sperm. Spesifisering av PGCene i mange organismer, inkludert teleoster, involverer maternale faktorer som er lagt ned i oocytten/egget før befruktning og spiller på denne måten en kritisk rolle i etablering av kjønnsellelinjen. Disse maternale faktorene er lokalisert i oocytten/eggets cytoplasma og utgjør det en kaller "germ plasm". Etter befruktning aggregeres germ plasm til celledelingsfurene (cleavage furrows) og blir så asymmetrisk inkorporert i noen få celler i det tidlige embryoet (når cellene deler seg er det bare en av dattercellene som beholder germ plasma). Det er disse cellene som gir opphav til PGCene og er på dette stadiet i utviklingen svært begrenset i antall (4-8 celler). Germ plasm består av en rekke mRNA og proteiner som har et varierende uttrykk og lokalisering gjennom ulike stadier av oocytten/eggets utvikling (se under). Disse prosessene er evolusjonært svært godt konserverte og det er antatt at de fleste teleoster har germ plasm. (Yoshizaki, Takeuchi et al. 2002; Extavour and Akam 2003). Maternale faktorer som er involvert i germcelldannelse er Nanos, Dead end (Dnd), Dazl og Vasa som i ulik grad er funnet å være nødvendig for normal PGC migrering og/eller overlevelse både hos zebrafisk og medaka (Kopranner et al. 2001; Raz 2003; Weidinger et al. 2003; Hashimoto et al. 2004). PGCene som blir spesifisert i tiden rett etter befruktning vil i løpet av embryogenesen migrere til den somatiske delen av gonaden (Houston and King 2000). Hos både zebrafisk, medaka og malle (loach) resulterer fjerning av PGCene i en steril fisk (Slanchev et al. 2005; Kurokawa et al. 2007; Fujimoto et al. 2010).

1.4 Germ plasm lokalisering - betydning for spesifisering av kjønnsellelinjen

Hos zebrafisk og laks aggregerer og lokaliserer germ plasm til den første og andre celledelingsfure på embryoets 4-cellestadium). Dersom man hos zebrafisk fysisk fjerner germ plasm, resulterer dette i bortfall av PGC spesifisering, noe som indikerer at aggregeringen av germ plasm komponentene er kritisk for etablering av germcellinjen (Hashimoto et al. 2004). Det er imidlertid svært lite informasjon om hvilke faktorer som er involvert i germ plasm aggregering/lokalisering, også hos modellarter som zebrafisk og medaka.

Buc er et «nytt» vertebrat spesifikt protein som inneholder et godt konservert domene som synes å være viktig i proteinets funksjon (Bontems et al., 2009). Buc genet er kun uttrykt i ovariet og er inntil nå det eneste genet som er funnet å være nødvendig for germ plasm lokalisering/organisering i oocytter hos vertebrater. Buc homozygot mutanter har defekter i germ plasm lokalisering både i oocytter og tidlige embryostadier, samtidig som overuttrykk av proteinet alene kan bidra til å

spesifisere PGCer (Bontems et al., 2009). Proteinet lokaliserer til germ plasm i “cleavage furrows” gjennom tidlige embryonalstadier. Buc opererer trolig via en mekanisme der proteinet aggregerer germ plasm faktorer til en kritisk masse som resulterer i at aggregatet av faktorer tar «kontroll» over cellen og initierer et program for PGC spesifikt genuttrykk. Det er Buc-proteinet, og ikke mRNA transkriptet, som organiserer lokalisering av germ plasm komponentene (Bontems et al., 2009). Om dette er tilfellet også hos laks vil Buc være et egnet mål for vaksinerings og immunonøytralisering vil kunne hindre aggregering av germ plasm og dermed bortfall av PGC spesifisering. Dette vil representere en ny mekanisme for å fjerne PGCene og dermed sterilisering.

1.5 Germ plasm lokalisering gjennom oogenesisen

Gjennom helt tidlige stadier av oogenesisen hos zebrafisk lokaliserer germ plasm til en celle/oocytstruktur som kalles Balbiani body, et aggregat av organeller som også er til stede i oocytter hos laksefisk (Bromage and Cumaranatunga, 1988). Oocytstadiet der en finner Balbiani body vil først opptre på pre-smolt stadier hos laksefisk (Bromage and Cumaranatunga, 1988). Gjennom disse tidlige stadiene har diverse PGC-faktorer (Dazl, Nanos og Vasa) felles lokalisering, men dette endres gjennom oogenesisen og i stadium II oocytter hos zebrafisk har disse faktorene fått ulik og distinkt lokalisering i oocytten (Kosaka et al. 2007). Hos medaka, som evolusjonært står relativt langt fra zebrafisk, har for eksempel Dazl-mRNA og -protein et annet lokaliseringsmønster gjennom oogenesisen enn hos zebrafisk (Xu et al., 2007). Siden laks er en «gammel» art vil en forvente at lokaliseringen av germ plasm faktorer avviker vesentlig fra det mønsteret som er beskrevet for modellartene. Hos zebrafisk ser de ulike germ plasm faktorene ut til å lokaliseres i et forutbestemt og stegvis mønster både i tid og rom (Kosaka et al., 2007). Hos denne arten er det interessant å observere at dersom en germ plasm faktor som f.eks. Dazl (mRNA) forhindres fra å lokaliseres til rett sted gjennom tidlige stadier av oogenesisen, vil videre lokalisering til cleavage furrow og germ plasm aggregatene rette etter befruktning også bli forhindret. Dersom det eksisterer en tilsvarende mekanisme hos laks vil det kunne være mulig å stoppe spesifiseringen av PGCene allerede på et tidlig stadium i oocytutviklingen, med andre ord lenge før befruktning. Det omsøkte FHF prosjektet vil derfor ha stor nytteverdi både i forhold til en tilnærming med stamfiskvaksine og for en tilnærming med smoltvaksine.

1.6 FoU-prosjektets mål og betydning

Det overordnede målet med prosjektet har vært å skaffe basiskunnskap om lokalisering og mengde av ulike germ plasm spesifikke faktorer gjennom ulike faser av oocyt/ovarieuutviklingen hos Atlantisk laks for å utvikle nye, bedre og mer målrettede steriliseringsprotokoller. Dette vil legge grunnlag for å identifisere nye tidspunkt/faser hvor germ plasm spesifikke faktorer, både som protein og mRNA, er tilgjengelige for maternal, vaksinemediert immunonøytralisering og antisens blokkert proteintranslasjon. Informasjon som fremkommer i prosjektet vil også øke den grunnleggende forståelsen av de molekylære mekanismene bak dannelse av kjønnscellelinjen hos Atlantisk laks.

Første trinn i prosjektet vil innebære en kartlegging av faktorer som er regulerer kjønnstamcelleutviklingen hos laks. Basert på tilgjengelige laksegenomdata og informasjon i fra andre arter vil PGC spesifikke gener bli klonet og karakterisert.

Spesifikke mål for prosjektet vil være:

- Undersøke germ plasm spesifikke gener (Buc, Nanos, Dead end, Vasa, Dazl) og deres ekspresjon og lokalisering gjennom definerte stadier av oogenesisen.
- Innhente informasjon om germ plasm spesifikke faktorer er til stede i egget som mRNA eller protein.
- Avklare når germ cell spesifikke mRNA er tilgjengelige for antisens (f.eks. morfolino) mediert blokkering.
- Avklare når proteiner er tilgjengelig for vaksinemediert immunonøytralisering.
- Karakterisere nye immuniserings «target». Buc proteinet er antatt å være sentralt i etablering av kjønnsellelinjen og har blitt inngående undersøkt i dette prosjektet.

2 Gjennomføring

2.1 Uttak av prøvemateriale

Uttak av ovarier gjennom ulike stadier av oogenesis ble utført ved AquaGen sine anlegg på Kyrksæterøra. Prøvematerialet ble behandlet og preservert for ekspresjonsstudier (qPCR) og intercellulær lokalisering av protein (immunohistokjemi). Uttakene ble gjort med utgangspunkt i stadielinndeling av oocytter definert for annen laksefisk (Bromage og Cumaranatunga, 1988) og representerte ulike stadier av både juvenile og modnende ovarier.

Samarbeidet med Aqua Gen har vært svært godt. Fisk/prøvemateriale samt assistanse fra personell i forbindelse med prøvetaking har (alltid) blitt gjort tilgjengelig i tilstrekkelig omfang, og som avtalt for prosjektet.

2.2 Kloning og uttrykk av kandidatgener

Kandidatgener som ble undersøkt i prosjektet var *Buc*, *Vasa*, *Nanos*, *Dead end* og *Dazl*. Karakterisering og lokalisering av *Buc* var hovedfokus i det gjeldende prosjektet. *Nanos*, *Dead end* og *Vasa* har også vært gjenstand for undersøkelser i *Salmosterile* og sekvensinformasjon for disse genene ble hentet herfra.

Homologi kloning ble gjennomført ved bruk av degenererte PCR primere. Full-lengde cDNA for de ulike genene ble opparbeidet ved hjelp av RACE (rapid-amplification of cDNA ends) ved bruk av kommersielle kit. For *Nanos*, *Dead end* og *Vasa* ble primerinformasjon hentet fra *Salmosterile* prosjektet.

2.3 Antigen syntese og antistoff

Peptid konjugater: Basert på opparbeidet sekvensinformasjonen ble ulike syntetiske peptider konjugert til bæreprotein (peptidantigener) og formulert for videre immunisering av kanin hos kommersielle leverandører. En slik tilnærming ble brukt for de ulike *Buc* variantene (se under), *Vasa* og *Nanos*.

Rekombinante proteiner: Basert på opparbeidet sekvensinformasjonen ble syntese av rekombinant protein utført hos en kommersiell tilbyder. Rekombinant protein ble rensset og brukt som antigen for immunisering av kanin. Denne tilnærmingen ble brukt for å lage antistoff mot *Dnd*. Antistoffet mot *Dazl* ble opparbeidet i *Salmosterile* prosjektet.

2.4 Immunohistokjemi (IHC)

Sera fra kanin immunisert med de aktuelle proteinene (se *Antigen syntese og antistoff*) ble brukt til intercellulær lokalisering av germlasm proteiner ved bruk av IHC på fikserte oocytter i h.h.t. etablerte protokoller. Alle de aktuelle antistoffene ble testet med denne metoden.

2.5 In vivo lokalisering av Buc protein

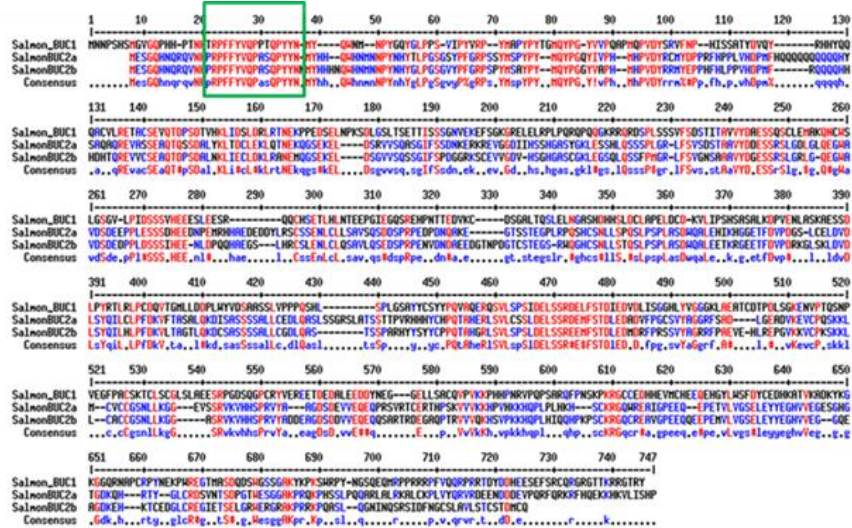
Et plasmid konstruert fra zebrafisk som er basis for syntese av et Buc kimærisk mRNA med grønt fluorescerende protein (GFP) ble benyttet til *in vivo* lokalisering av Buc. Konstruktet var et prosjektbidrag fra Krasimir Slanchev.

Syntetisk *Buc-GFP* mRNA ble syntetisert med et kommersielt kit og injisert intracellulært i 1-celle stadie embryo. Ved bruk av fluorescensmikroskopi ble den intracellulære lokaliseringen av proteinet visualisert i perioden etter befruktning.

3 Resultater

3.1 Buc gener

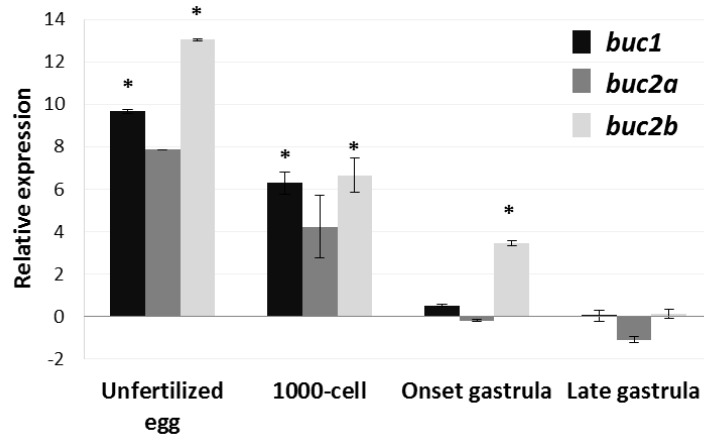
Søk etter Buc sekvenser i laksegenomet resulterte i identifisering av tre ulike gener som koder for tre ulike proteiner: Buc1(a), Buc2a og Buc2b. Det ble også identifisert et fjerde Buc gen (Buc1b), men dette ser ut til å være et pseudogen og er derfor ikke uttrykt. I fortsettelsen angir vi derfor Buc1a som kun Buc1.



Figur 1 Alignment av aminosyresekvensene for de tre uttrykte Buc genene hos atlantisk laks. Den grønne ruten indikerer et område av proteinet som er konservert hos vertebrater.

3.2 Uttrykk av *buc1*, *buc2a* og *buc2b* gjennom tidlig embryogenese

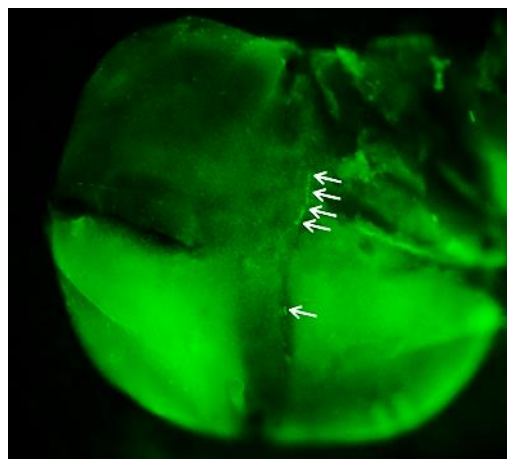
Alle de tre genene hadde sitt høyeste uttrykk i ubefruktede egg noe som også tilsier en maternal deponering av disse transkriptene. Uttrykket avtok gradvis utover i embryonalutviklingen og det laveste uttrykket i vårt materiale ble funnet hos embryo i sent gastrula stadiet (Fig. 2)



Figur 2 Uttrykk av tre *buc* gener i egg og embryo av Atlantisk laks. Uttrykk av målgenene ble bestemt med qPCR og normalisert til *eEf1- α* ; alle stadier er sammenliknet med segmenteringsstadiet (304 døgnggrader (d°)) som etterfølger sent gastrula stadiet. Data er presentert som $-\Delta\Delta Ct \pm SE$ ($n=3$). Signifikante forskjeller er merket med *, $p < 0.05$.

3.3 Buc2b proteinet i tidlig celledeling

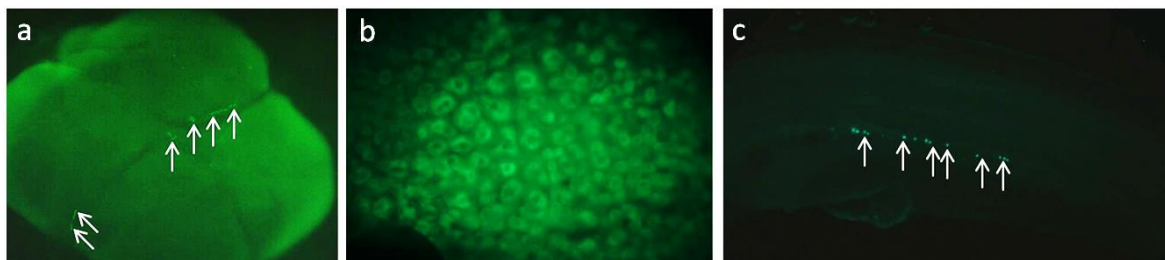
Immunohistokjemisk lokalisering (detekterer tilstedeværelse av protein) av Buc2b hos tidlige embryo (4-celle stadiet) ble utført med et antistoff spesifikt for dette proteinet hos Atlantisk laks (utviklet i dette prosjektet - se over). Buc2b ser ut til å være den ovariespesifikke varianten av de ulike Buc proteinene (*buc1* og *buc2a* er også uttrykt i andre organer/vev – se senere i resultatdelen), samtidig som vi fant at *buc2b* hadde det høyeste uttrykket av de ulike variantene gjennom tidlige embryonalstadier. Figur 3 viser at Buc2b lokaliserer og aggregerer i celledelingsfuren hos embryo ved 4-celle stadiet. Tilstedeværelse av proteinet på et så tidlig stadiet tilsier også at Buc2b er maternalt deponert.



Figur 3 Immunofluorescens som viser endogent Buc2b i celledelingsfuren hos et 4-celle stadiet embryo av Atlantisk laks. Hvite piler indikerer immunofluorescens.

3.4 Injeksjon av *buc* mRNA i lakseembryo

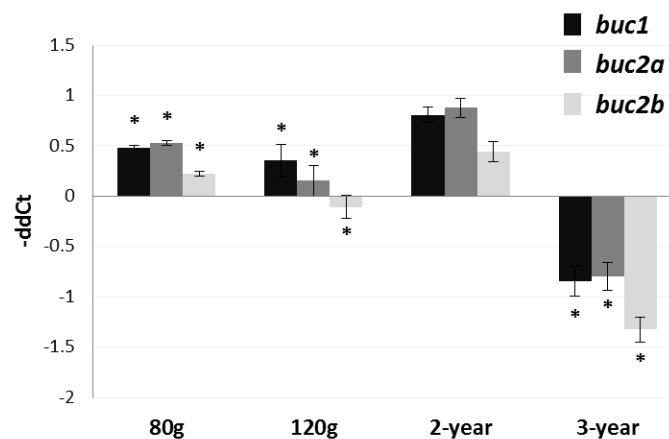
For ytterligere å studere lokalisering av *Buc* gjennom embryogenesen ble 1-celle embryo injisert med *buc* mRNA fra sebrafisk koblet til en sekvens for grønt fluorescerende protein (GFP). Det injiserte mRNAet viste seg å bli translateret og lokalisering av *Buc* (egentlig *Buc*+GFP) ble bestemt ved tre ulike tidspunkter gjennom embryogenesen (Fig. 4). Signalet i celledelingsfuren hos 4-celle embryo (Fig. 4a) var svært likt det som ble funnet for antistoffmerking av *Buc2b* (Fig. 3). Ved zygotisk genomaktivering (ZGA, en periode i utviklingen på ca. 500-1000-cellestadiet) hvor embryoets eget genom aktiveres ble det funnet fluorescerende signal i alle celler (Fig. 4b), men senere gjennom somitogenesen (c. 200 d°) ble proteinet funnet å være lokalisert til kjønnsstamcellene (PGCs) som på dette stadiet har en posisjon tilsvarende der hvor en vil finne den fremtidige gonaden (Fig. 4c).



Figur 4 a) Lakseembryo med *Buc*/GFP protein lokalisert til celledelingsfuren ved 4-celle stadiet. b) Fluorescerende celler ved 500-1000 cellestadiet. c) Embryo (c. 200 d°) som viser uttrykk av *Buc*/GFP protein i celler med tilsvarende lokalisering som kjønnsstamceller. Hvite piler indikerer lokalisering av *Buc* proteinet

3.5 Uttrykk av *buc1*, *buc2a* og *buc2b* i juvenile og adulte ovarier

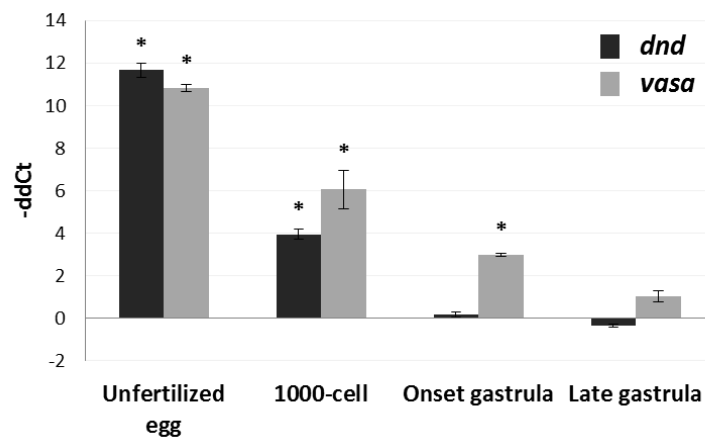
Buc genene viste et høyere uttrykk i ovarier hos juvenile og 2-årig hunnfisk sammenliknet med det som ble funnet hos 3-årig fisk (modnende fisk) (Fig. 5). Den observerte ned-reguleringen er antatt å være påvirket av et økende ovarie/oocyt volum (fortynningseffekt) som følge av modningen, men kan også være en følge av oocytens utvikling.



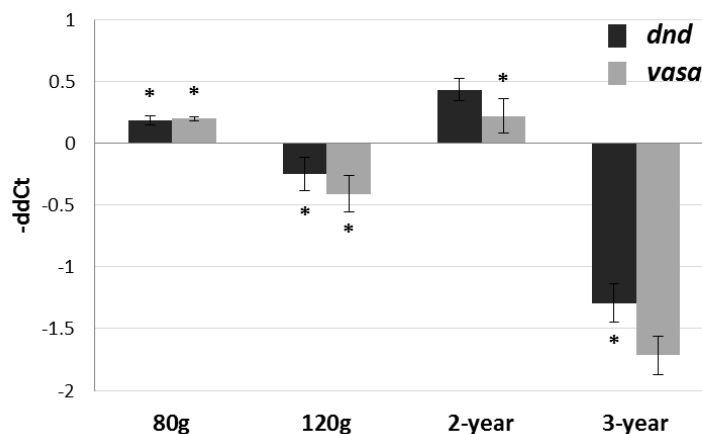
Figur 5 Uttrykk av tre *buc* gener (*buc1*, *buc2a* og *buc2b*) i ovarier fra juvenil (80g, 120g og 2-år) og modnende (3-år) Atlantisk laks. Uttrykk av målgenene ble bestemt med qPCR og normalisert til *eEf1-a*; alle stadier er sammenliknet med tilsvarende uttrykk i 25g fisk. Data er presentert som $-\Delta\Delta Ct \pm SE$ ($n=6$). Signifikante forskjeller er merket med *, $p < 0.05$.

3.6 Uttrykk av *vasa* og *dnd*

Vasa og *dnd*, som også er viktige for utvikling av kjønncellelinjen, viste et uttrykksmønster tilsvarende det som ble funnet for *buc* genene gjennom den tidlige embryonalutviklingen (Fig. 6). *Vasa* og *dnd* mRNA var også maternalt deponert i ubefruktede egg og falt gradvis fram mot sent gastrula stadiet. *Vasa* og *dnd* uttrykk ble igjen registrert i ovarier hos 80g fisk og det var små endringer i uttrykk mellom 80g, 120g og 2-års fisk (Fig. 7). Hos modnende (3-års fisk) var det en tilsynelatende nedregulering av *vasa* og *dnd* (Fig. 7). Årsakene til dette er antatt å være som angitt for *buc* og er diskutert over.



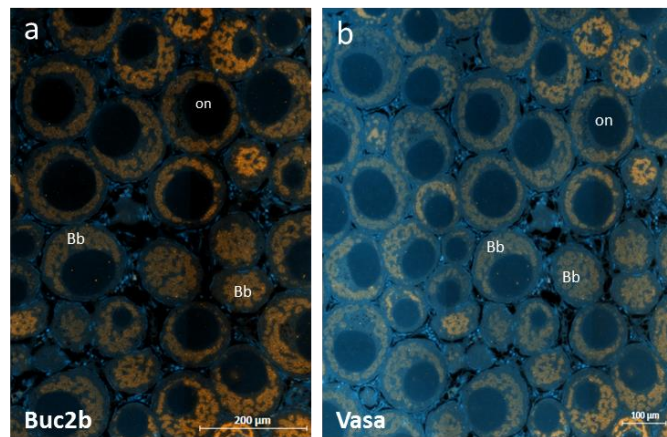
Figur 6 Uttrykk av *vasa* og *dnd* i egg og embryo av Atlantisk laks. Uttrykk av målgene ble bestemt med qPCR og normalisert til *eEf1- α* ; alle stadier er sammenliknet med segmenteringsstadiet (304 d \varnothing grader (d \varnothing)) som etterfølger sent gastrula stadiet. Data er presentert som $-\Delta\Delta Ct \pm SE$ (n=3). Signifikante forskjeller er merket med *, $p < 0.05$.



Figur 7 Uttrykk av *vasa* og *dnd* i ovarier fra juvenil (80g, 120g og 2-år) og modnende (3-år) Atlantisk laks. Uttrykk av målgene ble bestemt med qPCR og normalisert til *eEf1- α* ; alle stadier er sammenliknet med tilsvarende uttrykk i 25g fisk. Data er presentert som $-\Delta\Delta Ct \pm SE$ (n=6). Signifikante forskjeller er merket med *, $p < 0.05$.

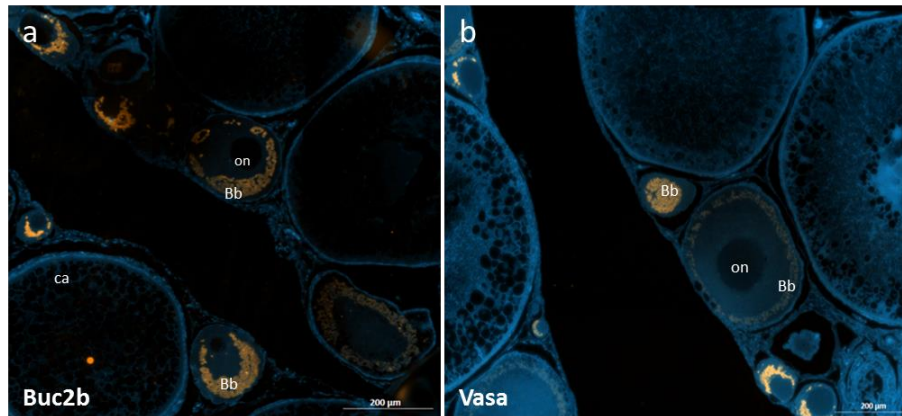
3.7 Buc2b og Vasa protein i ovarier hos juvenil og 2-årig fisk

Immunohistokjemi for Buc 2b og Vasa av ovarier fra juvenil 80g og 2-årig fisk er vist i figur 8 og figur 9. Hos 80g fisk var ovariet dominert av stadiet 2a og 2b oocytter (klassifisert i h.h.t. Bromage og Cumaranatunga, 1988) hvor både Buc2b og Vasa protein viste seg å lokalisere til en sub-cellulær struktur som in form og utstrekning ligner svært på Balbiani legemet (Balbiani body (Bb)) beskrevet for regnbueørret (Bromage og Cumaranatunga, 1988) (Fig. 8a og 8b).



Figur 8 Immunohistokjemi av juvenile ovarier hos atlantisk laks som viser uttrykk av a) Buc2b protein (gult/oransje) og b) Vasa protein (gult/oransje). Nucleus (cellekjernen) er farget med DAPI (blå); Bb- Balbiani body, on-oocyte nucleus.

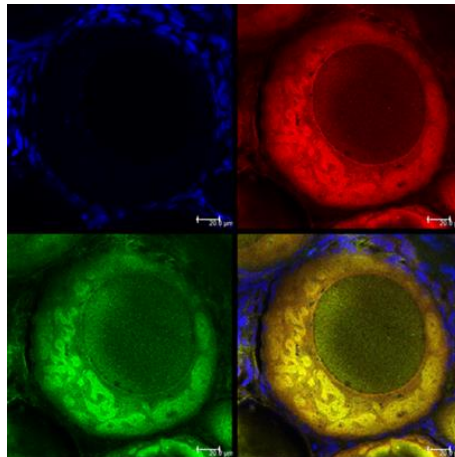
Lokaliseringen av Buc2b and Vasa proteinene endret seg med oocytutviklingen og i 2-årige ovarier ble både Buc2b og Vasa funnet perifert i stadiet 2c oocytter og var fremdeles knyttet til en Bb liknende struktur. I stadiet 3 og 4 oocytter ble det ikke funnet noe immunologisk signal hverken for Buc2b eller Vasa (Fig. 9). Det er ikke klart om dette skyldes at proteinene har distribuert så vidt utover slik at det faller under deteksjonsgrensen for denne metoden eller at disse oocytene reduserer uttrykket av disse proteinene. I ubefruktede egg fant vi imidlertid både mRNA (Buc2b og Vasa) og protein (Buc2b) noe som tilsier at proteinene har vært uttrykt også i modnende oocytter (oocytter som modner rekrutteres fra stadiet 4 oocytter) men muligens i mindre grad (Fig 9a and 9b). Den sub-cellulære lokaliseringen hos Buc2b og Vasa proteinene lignet for øvrig mye på Buc1 positive oocytter (se lenger ned). Tilsvarende lokalisering av germ plasm mRNA og proteiner til Bb strukturen har også blitt observert hos stør (Zelazowska et al., 2007) og kan med dette se ut til å være typisk også for laksefisk.



Figur 9 Immunohistokjemi av ovarier fra 2-årig atlantisk laks som viser uttrykk av a) Buc2b protein (gult/oransje) og b) Vasa protein (gult/oransje). Nucleus (cellekjernen) er farget med DAPI (blå); Bb-Balbiani body, on-oocyte nucleus.

3.8 Samlokalisering av Buc2b og Vasa proteiner i juvenile ovarier

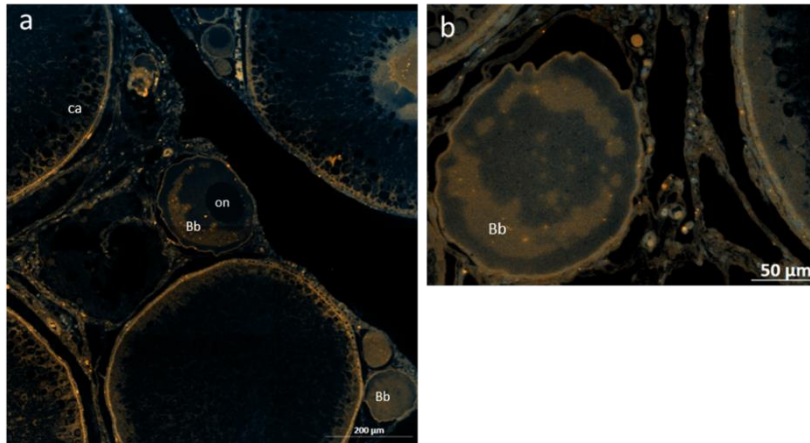
Samlokalisering av Buc2b og Vasa ble også undersøkt i juvenile ovarier som i dette stadiet er dominert av stadie 2 oocytter. Immunodeteksjon viste et sterkt signal for begge proteinene i granulært ooplasma (antatt Bb) hos stadie 2 oocytter (Fig. 10)



Figur 10 Lokalisering av Balbiani body (Bb) og Buc2b protein (rød) og Vasa protein (grønt) i juvenile stadie 2 oocytter. Buc2b og Vasa er begrenset til det granulære ooplasma. Nucleus (cellekjernen) er farget med DAPI (blå).

3.9 Lokalisering av Buc1 i ulike stadier av oocytutviklingen

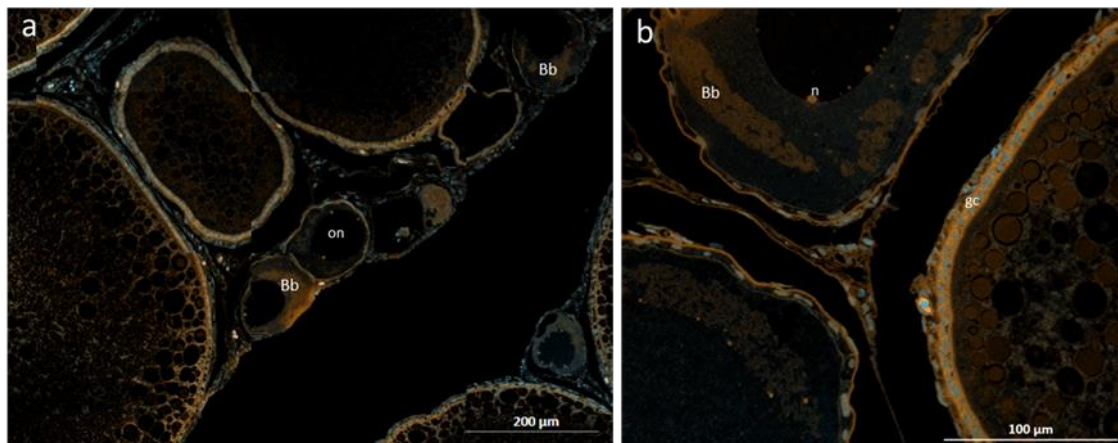
Lokalisering av Buc1 proteinet i oocytter fra ovarier til 2-årig fisk er vist i Figur 11. Immunohistokjemi viste at også Buc1 lokaliserer til en Bb liknende struktur i tidlige oocytstadier (stadie 2) (Fig 11a). Buc1 ble funnet i granulært ooplasma, noe som er svært likt det en finner for Buc2b og Vasa (Fig. 9).



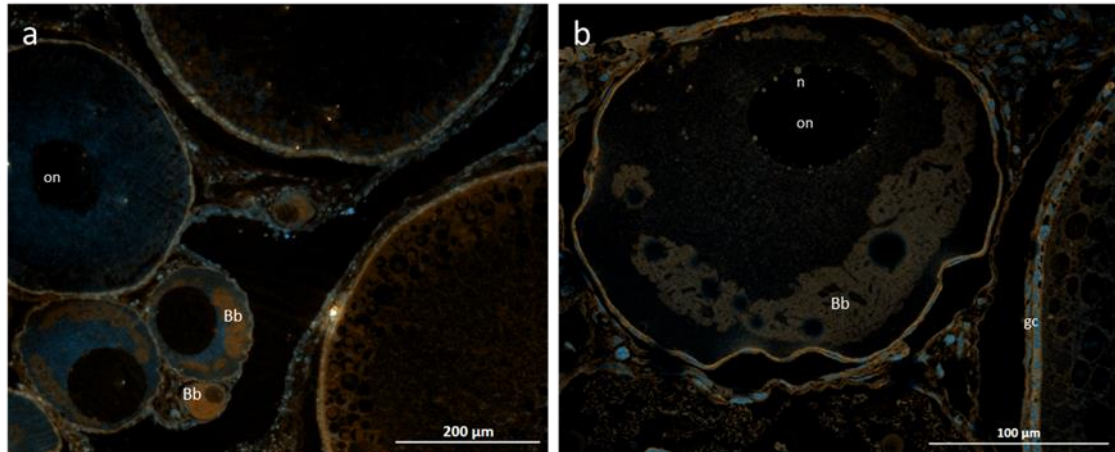
Figur 11 Immunohistokjemi som viser uttrykk av Buc1 protein (gult/oransje) i ovarier fra 2-årig atlantisk laks: a) oocytter i ulike utviklingsstadier (stadie 2-4) - bare stadie 2 oocytter var positive for Buc1 b) forstørrelse av en stadie 2 oocytt som viser immunodeteksjon av Buc1 protein. Nucleus (cellekjernen) er farget med DAPI (blå). Bb-Balbiani body, ca-cortical alveoli, on-oocytt nucleus.

3.10 Lokalisering av Dnd og Dazl protein i ulike stadier av oocytutviklingen

Granulært ooplasm og nucleoli i tidlige oocyttstadier var immunopositive for Dnd og Dazl (Fig. 12 og 13). I tillegg ble begge proteinene funnet i cytoplasmaet hos granulocellene som omkranser stadie 4 oocytter (Fig. 12 og 13). Hos pattedyr finner en også at Dazl uttrykkes i granuloceller gjennom ulike faser av dannelsen av corpus luteum (Pan et al., 2002). I stadie 4 oocytter omslutes oocytten av granuloceller (kjønnsormonproduserende celler) som utgjør en del av follikkelen. Det er så langt vi kjenner til ikke vist at Dnd uttrykkes i disse cellene hos noen art.



Figur 12 Immunohistokjemi som viser uttrykk av Dnd protein (gult/oransje) i ovarier fra 2-årig atlantisk laks: a) oocytter i stadie 2 viser positivt signal for Dnd i Bb, b) forstørrelse av to stadie 2 oocytter som viser immunodeteksjon av Dnd protein i Bb og nucleoli (n) og en stadie 4 oocytt (høyre i bildet) som viser immunodeteksjon av Dnd i granulosa cellene (gc). Nucleus (cellekjernen) er farget med DAPI (blå). Bb-Balbiani body, ca-cortical alveoli, on-oocytt nucleus.



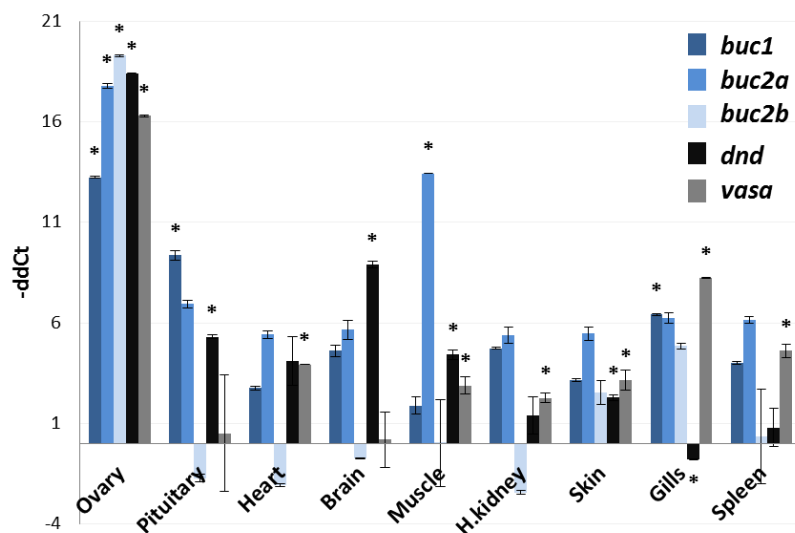
Figur 13 Immunohistokjemi som viser uttrykk av *Dazl* protein (gult/oransje) i ovarier fra 2-årig atlantisk laks: a) oocytter i stadie 2 viser positivt signal for *Dazl* i Bb mens stadie 4 oocytter er positive for *Dazl* perifert i follikkelen, b) forstørrelse av en stadie 2 oocytt som viser immunodeteksjon av *Dazl* protein i Bb og nucleoli (n) og en stadie 4 oocytt (høyre i bildet) som viser immunodeteksjon av *Dazl* i granulosa cellene (gc). Nucleus (cellekjernen) er farget med DAPI (blå). Bb-Balbani body, ca-cortical alveoli, on-oocytt nucleus.

3.11 Lokalisering av *Nanos1*, *Nanos 3a* og *Nanos3b* protein i ulike stadier av oocytutviklingen

Antistoff ble også utviklet mot *Nanos1*, *Nanos3a* og *Nanos3b*. Immunohistokjemiske undersøkelser gav imidlertid ingen deteksjon av noen av disse proteinene.

3.12 Uttrykk av *buc1*, *buc2a*, *buc2b*, *dnd* og *vasa* i ovarier og ikke-reproduktive vev

For å bestemme om de undersøkte genene hadde et ovariespesifikt uttrykk ble mRNA nivået av de ulike genene bestemt ved hjelp av qPCR i ulike vev fra 2-år gamle hunnfisk. Alle de tre *buc* genene, *vasa* og *dnd* hadde sitt høyeste uttrykk i ovariet (Fig. 14). Varierende uttrykk av alle genene, utenom *buc2b*, ble imidlertid funne i alle de undersøkte vevene. For eksempel viste *buc1* og *buc2a* et betydelig uttrykk i hypofysen og i gjeller. Relativt høye nivå av *vasa* og *dnd* mRNA ble også funnet i henholdsvis gjeller og hjerne. Tidligere har også uttrykk av *vasa* blitt funnet i gjeller hos atlantisk laks (Nagasawa et al., 2013). Uttrykk av *dnd* har blitt funnet i hjernen hos flere arter pattedyr, men så langt vi vet er ikke tilsvarende observasjoner gjort hos fisk.

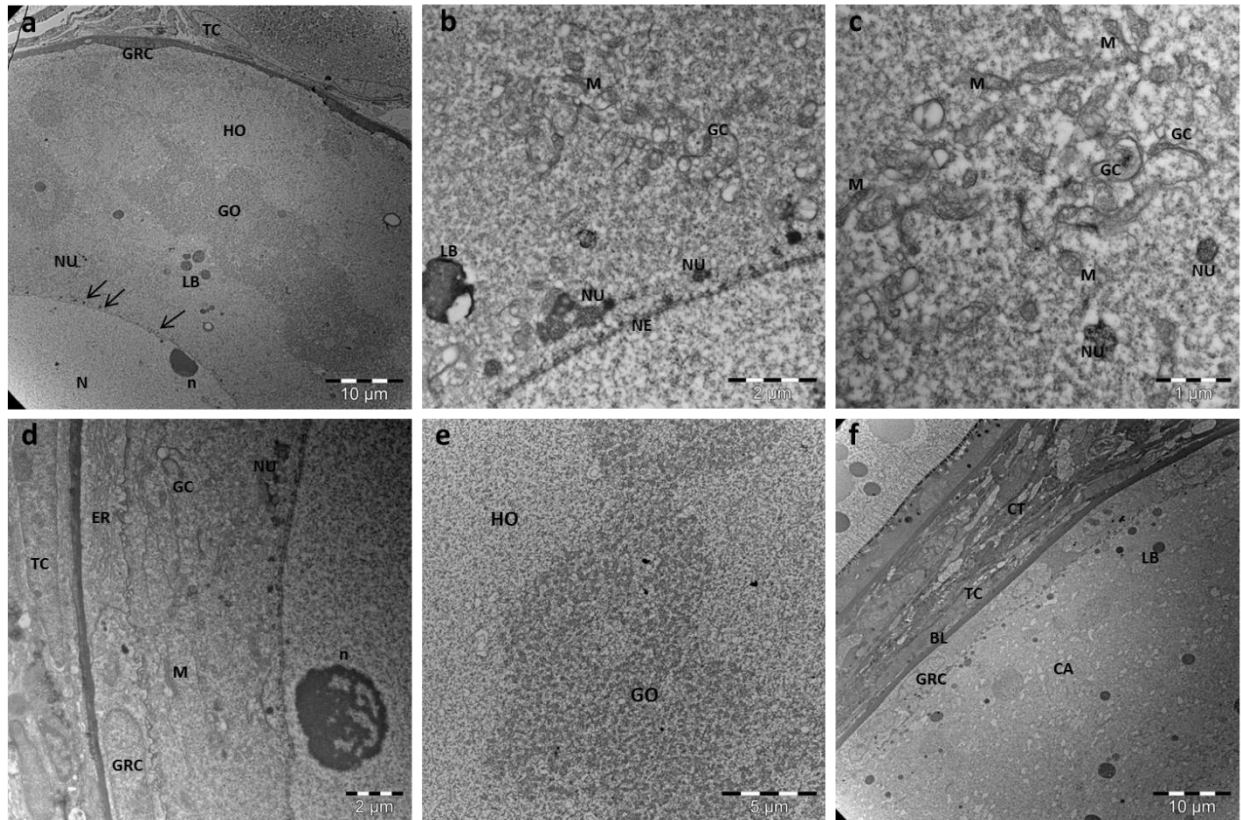


Figur 14 Uttrykk av *buc1*, *buc2a*, *buc2b*, *dnd* og *vasa* i utvalgte organer hos 2-årig atlantisk laks. Uttrykk av målgene ble normalisert til 18s. Uttrykk i alle vev ble sammenliknet med tilsvarende uttrykk i vev fra lever. Data er presentert som $-\Delta\Delta Ct \pm SE$ ($n=2$); signifikante forskjeller er markert med *, $p < 0.05$.

3.13 Studier av ovarieev ved hjelp av transmisjon elektronmikroskopi (TEM)

Balbani body (Bb) strukturen er karakteristisk med en høy forekomst av mitokondrier. For så langt mulig å få bekreftet at de immunlokalisererte proteinene også lokaliserer til mitokondrierike strukturer i oocytten ble oocytter i ulike utviklingsstadier undersøkt ved bruk av TEM.

TEM studiene viste et område i stadie 2 oocytter (granulært ooplasma (GO) med høy tetthet av mitokondrier som hadde en form og utstrekning tilsvarende det som ble funnet for de immunohistokjemiske undersøkelsene (Fig. 15). En tilsvarende mitokondrietett struktur hos stadie 2 oocytter er histologisk karakterisert som Bb hos regnbueørret (Bromage og Cumaratunga, 1988). Det er derfor rimelig å anta at *Buc1*, *Buc2b*, *Vasa*, *Dnd* og *Dazl* proteinene alle lokaliserer til Bb i stadie 2 oocytter hos laks.



Figur 15 Ultrastruktur hos oocytter fra atlantisk laks. **a)** Stadie 2 oocytter med granulært ooplasma/Balbani body. NU-nuage; N-nucleus/kjerne; n-nucleole; GO-granulært ooplasma; HO-homogent ooplasma; TC-theca celler; GRC-granulosa celler; LB-lipid **b)** Detaljer av kjernemembranen assosiert med nuage og ansamling celleorganeller. NE-kjernemembran; NU-nuage; LB-lipid; M-mitokondrie; GC-Golgi kompleks; **c)** Område med ansamling av nuage og høy tetthet av mitokondrier. NU-nuage; M-mitokondrie; GC-Golgi kompleks **d)** Ooplasma hos stadia 2 oocytt med endoplasmatisk reticulum og Golgi kompleks nært til kjernemembranen. TC-theca celler; GRC-granulosa celler; ER-endoplasmatisk reticulum; GC-Golgi kompleks; M-mitokondria; NU-nuage; n-nucleole **e)** Sub-cellulære strukturer i ooplasma hos stadia 2 oocytter. GO-granulært ooplasma; HO-homogent ooplasma **f)** Stadie 4 oocytter omgitt av follikkelceller. CA-cortical alveoli; LB-lipid; TC-theca celler; GRC-granulosa celler; BL-basal membran; CT-bindevev.

4 Diskusjon og oppsummering

4.1 Diskusjon

Informasjonen som har blitt opparbeidet har så langt vi oppfatter det gitt svar på de oppsatte mål for prosjektet (se pkt. 1.6)

Resultatene som er fremkommet har klart identifisert faser av ovarieutviklingen hvor og når viktige faktorer i utviklingen av kjønnscellene, både som protein og mRNA, er tilgjengelige for vaksinemediert immunonøytralisering og antisens blokkert proteintranslasjon. Slik informasjon er avgjørende for å utvikle nye og effektive steriliserings modeller og protokoller for laks.

Spesielt viktig har det vært å avklare/oppnå:

- Sekvensinformasjon for ulike varianter av buc genet
- Vevsspesifikt uttrykk av ulike buc varianter
- Opparbeidelse av antistoff mot ulike Buc proteiner
- Lokalisering av Buc protein til celledelingsfuren hos tidlige embryo og til Balbiani strukturen

Hos zebrafisk blir Buc proteinet funnet i celledelingsfuren gjennom tidlige embryonalstadier og er her involvert i lokalisering av germ plasm (Bontems et al. 2009). I det gjeldende prosjektet fant vi at også hos laks lokaliserer Buc proteinet til celledelingsfuren gjennom tidlig celledeling (4-celler) tilsvarende det en finner hos zebrafisk. Hos laks finner en videre at *vasa* mRNA også lokaliserer i tilsvarende posisjon (Nagasawa et al., 2010). Samlokalisering av Buc og *vasa* mRNA indikerer derfor at Buc kan ha en funksjon i germ plasm aggregering også hos laks. Det er Buc proteinet, og ikke transkriptet/mRNA, som organiserer lokalisering av germ plasm komponentene (Bontems et al., 2009). Da det kan se ut til å kunne være en tilsvarende mekanisme for germ plasm lokalisering/aggregering hos laks, vil Buc være et egnet mål for vaksinerings og immunonøytralisering. Videre undersøkelser vil kunne avklare dette. Dersom det f.eks. gjennom immunonøytralisering av Buc er mulig å hindre aggregering av germ plasm, og gjennom dette bortfall av PGC spesifisering, vil dette representere en ny mekanisme for å fjerne PGCene og dermed sterilisering. Svært interessant i denne sammenhengen er at Buc inneholder et godt konserverte proteindomene som synes å være viktig i proteinets funksjon (Bontems et al., 2009). Et tilsvarende konserverte område ble funnet i Buc hos laks (se Fig.1), og videre studier kan avgjøre hvilken funksjon denne delen av proteinet har. En stamfiskvaksine er antatt å være den beste tilnærming for å immunonøytraliserer Buc og dermed germ plasm aggregering. Tilstedeværelsen av Buc i helt tidlige oocytstadiet (se under) tilsier imidlertid at en vaksine på smoltstadiet kan være aktuell. For at en eventuell smoltvaksine skal være anvendbar er det nødvendig med mer informasjon om og i hvilken grad Buc er involvert i utviklingen av testis.

Hos zebrafisk lokaliserer germ plasm komponenter som *Vasa* og *Dazl* til en mitokondrietett struktur kalt Balbiani body gjennom tidlige stadier av oogenesisen (Kosaka et al. 2007). Et tilsvarende aggregat av organeller, men med ulik utbredelse og lokalisering, er til stede i tidlige stadier av oocytter hos laksefisk (Bromage and Cumaranatunga, 1988). Våre resultater viser klart at Buc1, Buc2b, *Vasa*, *Dnd* og *Dazl* lokaliserer til en tilsvarende struktur i stadie 2 oocytter hos laks. Våre TEM studier viste også

høy mitokondrietetthet i denne strukturen. Vi konkluderer derfor med at viktige germ plasm komponenter lokaliserer til Balbiani legemet gjennom tidlige oosyttstadiet hos atlantisk laks. Så langt vi vet, er dette første gang en slik observasjon er gjort. Immunohistokjemi og TEM resultatene viste også at både Balbiani legemet og det immunologiske signalet forsvant i stadiet 3 og 4 oocytter. En slik observasjon er i overensstemmelse med bortfall av denne strukturen i stadiet 3 og 4 oocytter hos regnbueørret (Bromage and Cumaranatunga, 1988). Hos zebrafisk finner en også at lokaliseringen av viktige germ plasm komponenter endres gjennom oogenesen og i senere stadier av utviklingen har Dazl og Vasa fått en helt ulik og distinkt lokalisering i oocytten (Kosaka et al. 2007).

Oocytstadiet 2 vil være tilstede allerede på pre-smolt stadiet hos laks (dette studiet) og hos annen laksefisk (Bromage and Cumaranatunga, 1988). Hos zebrafisk ser de ulike germ plasm faktorene ut til å lokalisere i et forutbestemt og stegvis mønster både i tid og rom (Kosaka et al., 2007). Hos denne arten er det interessant å observere at dersom en germ plasm faktor som f.eks. Dazl (mRNA) forhindres fra å lokalisere til rett sted gjennom tidlige stadier av oogenesen vil videre lokalisering til cleavage furrow og germ plasm aggregatene rett etter befruktning også bli forhindret. Dersom det eksisterer en tilsvarende mekanisme hos laks vil det kunne være mulig å stoppe spesifiseringen av PGCene allerede på et tidlig stadium i oocytutviklingen, med andre ord lenge før befruktning. Resultatene i prosjektet vil derfor ha stor nytteverdi både i forhold til en tilnærming med stamfiskvaksine og for en tilnærming med smoltvaksine.

4.2 Møter

- Prosjektet og prosjektresultater har vært presentert på møter i regi av prosjektet Salmosterile i februar og september 2014, samt i april 2015 (Salmosterile finansieres av Norges Forskningsråd).
- Prosjektresultater har blitt presentert på *Norwegian Biochemical Society Contact Meeting (NBS)* i februar 2015.

4.3 Avvik

I løpet av prosjektperioden har vi ikke funnet at møter arrangert i regi av FHF har vært særlig aktuelle for å presentere den gjeldende tematikken. Vi har imidlertid, som indikert over, gjort resultatene tilgjengelig for de mest aktuelle nasjonale aktørene som arbeider inn mot steril fisk problematikken. Vi vil i ettertid, i regi av FHF og i et passende fora, selvfølgelig kunne presentere resultater fra prosjektet.

Alle planlagte styringsgruppemøter har ikke blitt avholdt. Dette har vært i forståelse med styringsgruppen og dens medlemmer, og prosjektleder. Styringsgruppen har jevnlig mottatt framdriftsrapporter som har vært oppfattet å være tilstrekkelige for å evaluere progresjonen i prosjektet.

Et manuskript klart til innsendelse (Molecular Reproduction & Fertility) er under bearbeiding og vil bli gjort tilgjengelig innen kort tid. En forsinkelse i manuskriptleveringen skyldes at det ble gjort svært interessante funn mot slutten av prosjektperioden (karakterisering av Buc antistoffene), noe som også utløste og nødvendiggjorde en del tilleggs analyser, inkl. TEM for å komplettere dataene.

4.4 Tilleggs kommentarer

- Progresjonen i prosjektet har i all hovedsak vært som planlagt. Det har imidlertid vært lagt ned et betydelig arbeid i å lage og teste ut ulike antistoff. Utvikling av spesifikke antistoff mot de ulike Buc variantene har vært spesielt krevende siden det her er stor grad av homologi (svært like) hos de ulike proteinvariantene. I prosjektet ble det laget ikke mindre enn seks ulike antistoff bare mot Buc. Etter flere runder med testing ble det funnet at ett av disse var spesifikt for Buc1 og ett var spesifikt for Buc2b. Tilsvarende ble laget tre ulike antistoff mot ulike varianter av Nanos (Nanos1, Nanos3a og Nanos3b). Testing av Nanos antistoffene avdekket dessverre ingen kryssbinding i det undersøkte materialet. Arbeid som er skissert over gjør lite av seg i rapport sammenheng men har likevel vært av stor betydning for resultatene som er opparbeidet. Den endelige karakteriseringen av Buc antistoffene lyktes først mot slutten av prosjektet og har gjort denne fasen spesielt arbeidskrevende.
- Samarbeidet med Aqua Gen må fremheves som svært godt.

5 Referanser

Referanser oppgis ved henvendelse til forfatterne.

