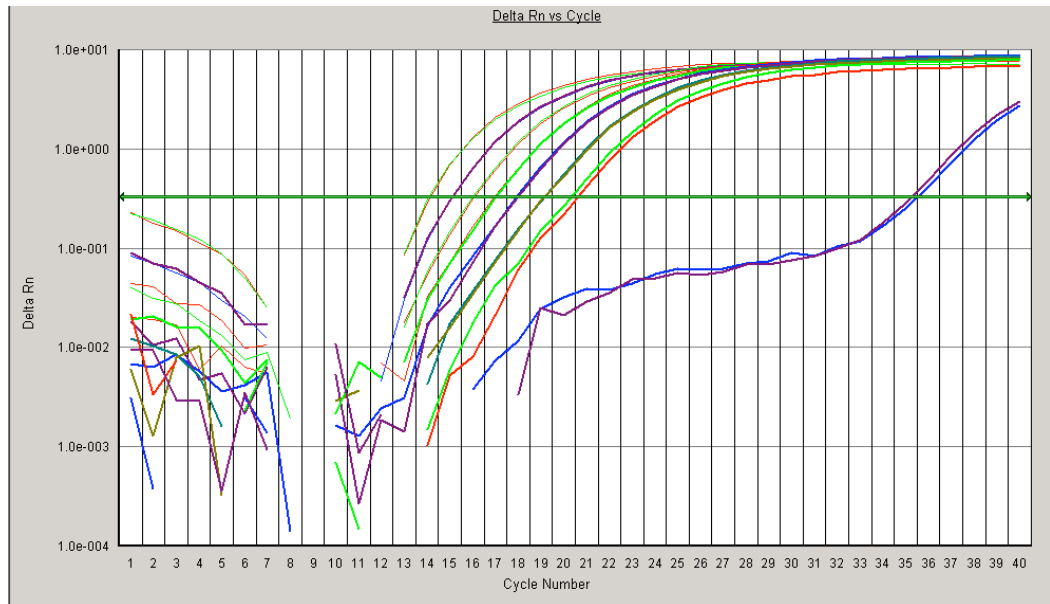


**Transkripsjon av komplementfaktor tre (C3) og  
komplementfaktor sju (C7) i atlantisk laks (*Salmo salar L.*)  
etter vaksinerings mot *Aeromonas salmonicida* og infeksiøs  
pankreas nekrose virus (IPNV)**



**Masteroppgave i fiskehelse (30 studiepoeng)  
Torstein Gaard  
15. Mai 2007**

Institutt for marin bioteknologi  
Norges fiskerihøgskole  
Universitetet i Tromsø



---

## Forord

Tusen takk til mine veiledere professor Jarl Bøgwald og forsker Roy A. Dalmo for god veiledning under arbeidet med min hovedoppgave og for avsluttende tur til Skottland.

Takk til personellet ved Havbruksstasjonen i Kårvika og Fiskehelselaboratoriet i Kårvika for hjelp med fisk og bakteriestamme.

En stor takk til Marie Løvoll for fantastisk hjelp på laben og for svar på alle tusen spørsmål. Hadde ikke kommet en meter videre uten deg.

Takk til Børge Nilsen Fredriksen for gjennomlesing av oppgaven og slumpen med akevitt jeg fikk hos deg. Takk til Grim Sand Mathisen for god komplement diskusjon, mange ølkvelder og mye latter på laben.

Takk til mamma og pappa for alle pengene jeg har fått til å gjøre andre ting enn å studere i studietiden.

Til slutt en takk til Mari Nilsen for å ha gitt meg en grunn til å holde meg i Tomsø når jeg har kjedet meg her.

Torstein Gaard

Tromsø, Mai 2007

---

## Sammendrag

Den femkomponents vaksinen som i dag er vanlig på atlantisk laks (*Salmo salar L.*) i norsk fiskeoppdrett gir forskjellig beskyttelse mot de respektive sykdommene. Spesielt dårlig er beskyttelsen mot infeksøs pankreas nekrose virus (IPNV). Komplementsystemet regnes som en svært viktig del av immunforsvaret hos teleoster (beinfisk), og det er foreslått at et bedre utviklet komplementsystem kompensere for et dårligere utviklet adaptivt immunforsvar. For å få en bedre forståelse av hvorfor vaksinerer gir en dårligere beskyttelse mot IPNV enn mot andre sykdommer er to sentrale komponenter i komplementsystemet (C3 og C7) studert nærmere med hensyn på kvantifisering av mRNA nivå. Atlantisk laks ble vaksinert med to monoklonale vaksiner mot henholdsvis *Aeromonas salmonicida* og IPNV. Prøver av lever og milt ble tatt 1, 2, 5 og 7 dager etter vaksinerer. C3 mRNA nivå i lever etter vaksinerer mot *A. salmonicida* viste seg bli oppregulert, mens i milt viste C3 mRNA nivå seg å bli nedregulert. Like store forandringer ble ikke observert etter vaksinerer mot IPNV i lever, mens i milt viste C3 mRNA nivå seg å bli nedregulert ytterligere. C7 mRNA nivå etter vaksinerer mot *A. salmonicida* viste seg å oppreguleres både i milt og lever. En liten oppregulering viste seg også etter vaksinerer mot IPNV i lever. Resultatene indikerer at transkripsjon av komplementfaktorer stimuleres bedre av vaksinen mot *A. salmonicida* enn vaksinen mot IPNV. I tillegg ser det ut som transkripsjon av komplementfaktor C7 er viktig i forbindelse med en infeksjon.

Det ble gjort et smitteforsøk med *A. salmonicida* for å verifisere funksjonen av vaksinen. Det ble her observert lav dødelighet i den vaksinerte gruppen, og høy dødelighet i de uvaksinerte gruppene. Resultatene viser at vaksinen fungerer mot *A. salmonicida*.

**Nøkkelord:** Atlantisk laks, monoklonale vaksiner, C3, C7, real-time PCR, smitteforsøk.

---

# Innholdsfortegnelse

<b>1.0 Innledning</b>	<b>1</b>
1.1 Bakgrunn for oppgaven	1
1.2 Komplementsystemet	1
1.3 Komplementfaktor C3	5
1.4 Komplementfaktor C7	6
1.5 Hensikt	7
<b>2.0 Material og metode</b>	<b>9</b>
2.1 Forsøksdyr	9
2.2 RNA-isolering	9
2.3 Sann-tids revers transkripsjon polymerase kjede reaksjon (Q-realtime RT-PCR)	10
2.4 Smitteforsøk	12
<b>3.0 Resultater</b>	<b>13</b>
<b>4.0 Diskusjon</b>	<b>17</b>
<b>Referanseliste</b>	<b>23</b>



## 1.0 Innledning

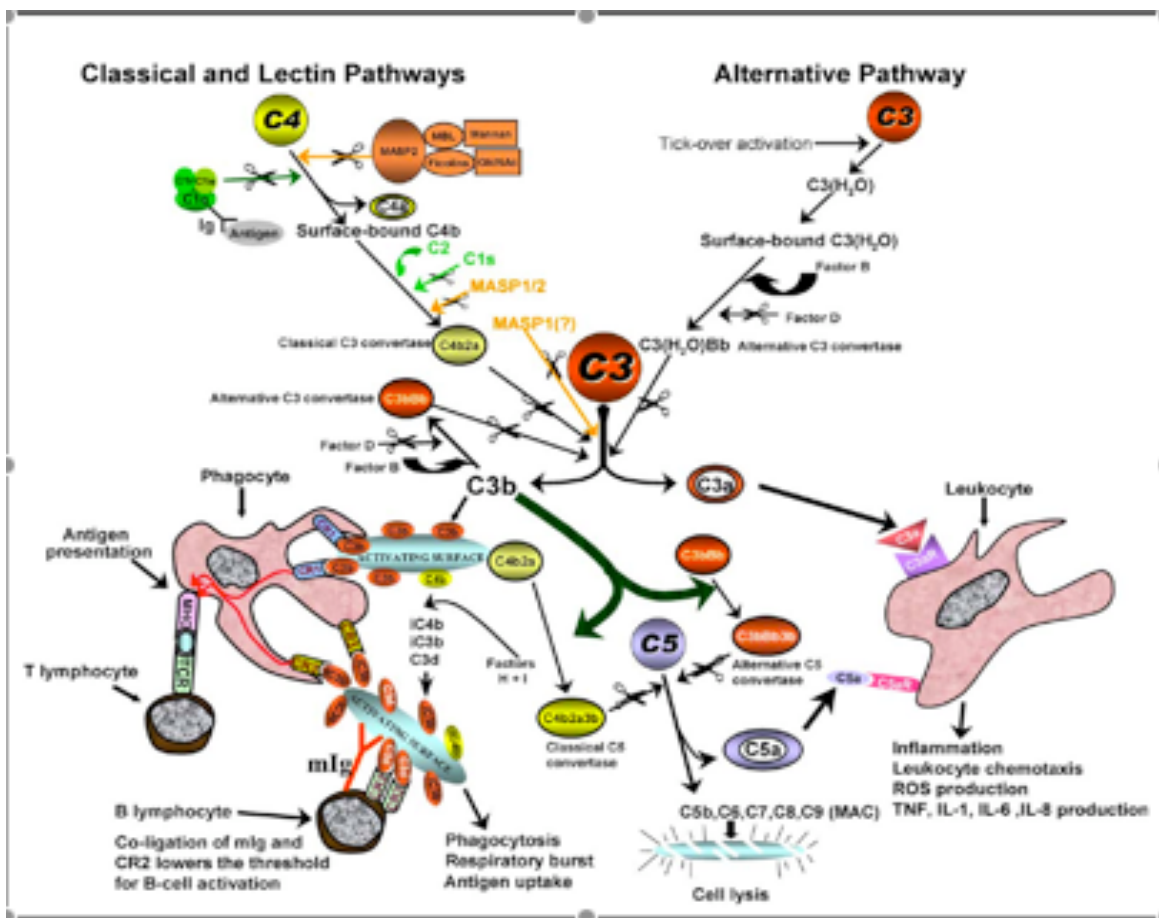
### 1.1 Bakgrunn for oppgaven

Vaksinasjon er et av de viktigste enkelttiltakene for å forebygge utbrudd av infeksjøs sykdommer hos både dyr og mennesker. I norsk fiskeoppdrett har vaksinasjon hatt stor betydning for å gjøre næringen lønnsom, både ved å begrense tapene som følge av dødelighet i forbindelse med sykdomsutbrudd, og ved å redusere bruken av medisiner.

I dag er den viktigste vaksinen til laks en femkomponentvaksine som inneholder antigener fra *Vibrio anguillarum*, *Vibrio salmonicida*, *Aeromonas salmonicida*, *Moritella viscosus* og infeksjøs pankreas nekrose virus (IPNV). Vaksinen viser forskjellig beskyttelse mot de respektive sykdommene, og beskyttelsen mot IPNV er spesielt dårlig. Det er derfor viktig å finne årsaken til hvorfor beskyttelsen er dårlig.

### 1.2 Komplementsystemet

Komplementsystemet er en kaskade med rundt 35 membran- og serumproteiner (komplementfaktorer) som aktiveres av både virus, bakterier og parasitter. Komplementsystemet er en viktig del av det medfødte immunforsvaret med hensyn på å oppdage og drepe patogener (Frank, M.M. and Fries, L.F., 1991). Komplementsystemet sine hovedoppgaver er 1) å kjenne igjen og lysere fremmede mikroorganismer, 2) å merke (opsonisere fremmede mikroorganismer for senere fagocytose, 3) å fremme inflammasjon ved dannelse av anafylatoksiner. Komplementsystemet er også involvert i stimulering av det adaptive immunsystemet, hvor det påvirker antigenpresenterende celler til større opptak og presentering av antigener, og påvirker B-celle proliferasjon (Carroll, M.C., 2000, Dempsey, P.W., *et al* 1996, Morgan, B.P., *et al* 2005, Carroll, M.C., 2004). Tre forskjellige aktiveringsveier for komplementsystemet er beskrevet. Disse er klassisk aktiveringsvei, alternativ aktiveringsvei og lektinveien (se figur 1).



**Figur 1:** De tre aktiveringsveiene på hver sin måte fører til aktivering og kløyving av komplementfaktor C3 ved hjelp av en rekke hjelpemolekyler og hvilke hjelpemolekyler som inngår i disse aktiveringsveiene. C3b binder seg til overflaten av eventuelle mikrober, og interagerer med komplementreseptorer (CR1, CR3) på overflaten av fagocytiske celler (monocytter/makrofager). Dette fører til fagocytose og stimulering av T- og B-celler. C3b aktiverer og kløyver komplementfaktor C5 som fører til aktivering av membrane attack complex (MAC). C3a aktiverer leukocytter som fører til inflammasjon, kjemotaksi og cytokinproduksjon (modifisert fra figur 1 i Sunyer, J.O., *et al* 2003)

Aktivering av den klassiske veien er i utgangspunktet avhengig av interaksjon mellom immunkomplekser (antigen-antistoff komplekser) og C1q-komponenten av komplementfaktoren C1 (Gasque, P., 2004), men kan også aktiveres av andre molekyler som komplement reaktivt protein (CRP), serum amyloid protein komponent (SAP), lipopolysakkarid (LPS), ribonukleotid syre (RNA), deoxyribonukleotid syre (DNA) og andre bakterielle, virale og fungale membranproteiner (Gewurz, H., *et al* 1993). Interaksjonen mellom C1q-komponenten av komplementfaktor C1 og immunkomplekser



fører til autoaktivering av C1r-komponenten av C1, som igjen kløyver C1s-komponenten av C1 til sin aktive form. Dette C1-komplekset aktiverer komplementfaktorene C4 og C2, og danner C4b2a. C4b2a er en C3 konvertase, slik at komplementfaktoren C3 aktiveres (Pangburn, M.K. and Rawal, N., 2002). C4b2a3b dannes og fungerer som C5 konvertase, slik at komplementfaktoren C5 aktiveres. C5b aktiverer membran attack kompleks (MAC) (Muller-Eberhard, H.J., 1986).

Aktivering av den alternative veien er ikke avhengig av immunkomplekser, men skjer direkte av karbohydratsrike partikler som mangler N-acetylneuramin syre (Farries, T.C., 1988). Disse partiklene fungerer som C3 konvertase, slik at C3 aktiveres. Komplementfaktor B binder seg til C3b, og komplementfaktor D kløyver faktor B slik at C3bBb dannes. C3bBb fungerer som C3 konvertase, tilsvarende C4b2a i det klassiske sporet. (Farries, T.C., *et al* 1988). C3bBbC3b dannes og fungerer som C5 konvertase. slik at C5 aktiveres . C5b aktiverer MAC (Muller-Eberhard, H.J., 1986).

Lektinveien aktiveres ved at mannose bindende lektin (MBL) interagerer med MBL-assosiert serin protease 1 (MASP1) og MASP2 etter binding med terminale mannosegrupper hos mikrober (Fujita, T., *et al* 2004, Turner, M.W., 2003). MASP1 fungerer som C3 konvertase direkte, mens MASP2 aktiverer C4 og C2. C4b2a3b dannes, og fungerer som C5 konvertase, slik at C5 aktiveres (Dahl, M.R., *et al* 2001, Stover, C., *et al* 2001, Rossi, V., *et al* 2001). C5b aktiverer MAC (Muller-Eberhard, H.J., 1986).

MAC er en kaskade som består av komplementfaktorene C5b, C6, C7, C8 og C9. Ved aktivering av MAC binder proteinene i kaskaden seg til hverandre, og danner en pore i patogener eller infiserte celler slik at disse lyserer og dør (Morgan, B.P., 1989). Ved aktivering av C5, vil C5b binde seg til C6, og danne en såkalt løselig C5b-6 dimer. C7 binder seg til dimeren, og skaper et C5b-7 kompleks. C5b-7 binder seg til membranen hos målcellen, slik at C8 og C9 kan forme en transmembran pore gjennom fosfolipidmembranen til målcellen (DiScipio, R.G., 1992).

Etter aktiveringen av komplementfaktorene C3, C4 og C5 dannes produktene C3a, C4a og C5a. Disse produktene har egne oppgaver i forbindelse med en infeksjon. Blant annet bidrar de til rekruttering av leukocytter til infeksjonsstedet (Ehrengruber, M.U., *et al* 1994), stimulering til IL-1 $\beta$  produksjon i monocytter (Haeffner-Cavaillon, N., *et al* 1987), som igjen stimulerer C3 produksjon, regenerering av vev (Daveau, M., *et al* 2004, Strey, C.W., *et al* 2003) og kjemotaksis (Daffern, P.J., *et al* 1995, Hartmann, K., *et al* 1997).

I likhet med pattedyr har vertebrater som fugler, amfibier, reptiler og teleoster (beinfisk) et velutviklet komplementsystem. Dette inkluderer alle de tre aktiveringsveiene og MAC (Sunyer, J.O. and Lambris, J.D., 1998).

C1q, som er startpunktet i den klassiske aktiveringsveien, har blitt klonet fra både elvemalle (*Ictalurus punctatus*) og killerfish (*Fundulus heteroclitus*) (Crawford, D.L., *et al* 2004, Kocabas, A.M., *et al* 2002). MBL, som er startpunktet i den alternative aktiveingsveien, er klonet fra karpe (*Cyprinus carpio*), sebrafisk (*Danio rerio*) og gullfisk (*Carassius auratus auratus*) (Vitved, L., *et al* 2000). Funksjonell karakterisering av disse proteinene mangler, og rollen til den klassiske aktiveringsveien og lektinveien er derfor noe spekulative. Andre sentrale molekyler i den klassiske aktiveringsveien og lektinveien som C1r/C1s er klonet fra regnbueørret (*Oncorhynchus mykiss*) og to MASP-lignende molekyler er klonet fra karpe (Nagai, T., *et al* 2000).

Faktor B er viktig i aktiveringen av den alternative aktiveringsveien, og har blitt isolert og karakterisert hos regnbueørret (Sunyer, J.O., *et al* 1998A). En del av den N-terminale siden av Faktor D proteinet er isolert og karakterisert fra både karpe og regnbueørret, men dens rolle i kløyvingen av faktor B er bare demonstrert hos regnbueørret (Sunyer, J.O., *et al* 1998, Yano, T. And Nakao, M., 1994).

Alle de fem komponentene (C5, C6, C7, C8, C9) i MAC er demonstrert fra regnbueørret (Zarkadis, I.K. and Chondrou, M., 2004, Zarkadis, I.K. and Papanastasiou, A.D., 2004, Zarkadis, I.K., *et al* 2005, Kato, Y., *et al* 2003, Tomlinson, S., *et al* 1993). I tillegg er det

klonet enkelte komponenter fra andre teleoster. Eksempelvis er C5 klonet fra havkaruss (*Calamus bajonado*), C9 er klonet fra pinnsvinfisk (*Arothron hispidus*) og C8 $\beta$ -chain og C9 er klonet fra japansk flyndre (*Paralichthys olivaceus*).

Anafylatoksinene C3a, C4a og C5a er alle isolert fra teleoster. Studier viser også at disse proteinene påvirker fagocytose (Li, J., *et al* 2004), og fungerer som kjemoatraktanter på perifere blod- og hodenyreleukocytter hos teleoster.

I motsetning til pattedyr, har teleoster flere isomere former av komplementfaktorene. Det er derfor nærliggende å tro at komplementsystemet hos teleoster kan aktiveres av et bredere spekter mikroorganismer. I tillegg til at komplementsystemet kan aktiveres ved lave temperaturer, er aktiviteten til den alternative aktiveringsveien 5-10 ganger høyere hos teleoster enn hos høyere vertebrater (Sunyer, J.O., *et al* 1998B). Det viser seg også at komplementsystemet hos teleoster har evne til å lysere erythrocytter (røde blodceller) fra en rekke dyrearter (Sunyer, J.O., *et al* 1995), i motsetning til pattedyr som kun kan lysere erythrocytter fra kanin. Det kan se ut som forskjellene i komplementsystemet hos pattedyr og teleoster er med på å kompensere for teleosters begrensede adaptive immunforsvar.

### **1.3 Komplementfaktor C3**

C3 er den best karakteriserte komplementfaktoren hos fisk, og har vist seg å spille en sentral rolle i alle de tre aktiveringsveiene for komplementsystemet (Lambris, J.D., 1990). C3 bidrar blant annet også til kontroll av celleadhesjon, celle-celle kommunikasjon, beindannelse og regenerering av vev (Del Rio-Tsonis, K., *et al* 1998, Sato, T., *et al* 1993, Daveau, M., *et al* 2004, Strey, C.W., *et al* 2003). I likhet med pattedyr er C3-molekylet et typisk tokjedet molekyl bestående av en  $\alpha$ -kjede og en  $\beta$ -kjede linket sammen av en disulfidbinding. Hos pattedyr blir C3 hovedsakelig produsert i lever, men det er også registrert produksjon av C3 i andre organer og celler som sentralnervesystemet, nyre, monocytter/makrofager, fibroblaster, leukocytter og endotelceller (Morgan, B.P. and Gasque, P., 1996). Avhengig av fiskeart produseres også C3 hos fisk i forskjellige organer og celler. Studier av torsk (*Gadus morhua*) og kveite

(*Hippoglossus hippoglossus*) viser at C3 transkriberes i et vidt spekter av organer (Lange, S., *et al* 2004A, Lange, S., *et al* 2004B) I flekkesteinbit (*Anarhichas minor*) derimot, begrenser transkripsjonen seg til leveren (Abelseth, T.K., *et al* 2003). I regnbueørret viser det seg at hovedproduksjonen av C3 er i lever, selv om C3 også produseres i andre organer (Lovoll, M., *et al* 2007A). I atlantisk laks viser mRNA studier at lever står for den største transkripsjonen av C3 (Lovoll, M., *et al* 2007B). Enkelte fiskearter har flere isoformer av C3. Det antas at karpe har fem forskjellige isoformer (Nakao, M., *et al* 1997), havkaruss har fem isoformer (C3-1-5), mens regnbueørret har fire isoformer av C3 (C3-1-4) (Sunyer, J.O. and Tort, L., 1995). Gendatabasen BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>) viser at atlantisk laks (*Salmo salar*) sannsynligvis har lignende isoformer som regnbueørret, men hele gensekvenser er foreløpig ikke tilgjengelig. Cytokiner (IL-1 $\alpha$ , IL-6 og TNF- $\alpha$ ) viser seg å oppregulere syntesen av C3 protein i mammalske celler (Falus, A., *et al* 1990, Berge, V., *et al* 1996). Hos regnbueørret viser det seg at ekspresjonen av C3 mRNA kan påvirkes både av LPS og  $\beta$ -glucan. Hos atlantisk laks kan ekspresjonen påvirkes av LPS (Løvoll, M., *et al* 2007C)

### **1.4 Komplementfaktor C7**

C7 er en av de fem komplementfaktorene som inngår i MAC (Muller-Eberhard, H.J., 1986). C7 vil på denne måten inngå i enhver aktivering av C5, og er derfor en viktig del av komplementsystemet. C7 protein hos regnbueørret er på størrelse med C7 protein hos menneske og japansk flyndre. C7 protein i regnbueørret inneholder likeledes alle de strukturelle domenene som er karakteristiske hos terminale komplement komponenter (Zarkadis, I.K., *et al* 2004). Hos pattedyr produseres C7 hovedsakelig ekstrahepatisk som i monocytter/makrofager, trombocytter, fibroblaster og slimvev (Wurzer, R., *et al* 1994). Det viser seg imidlertid også at endotelceller står for store deler (20%) av produksjonen av ekstracellulært C7 (Langeeggen, H., *et al* 2000). Det er detektert både transkripsjon av C7 mRNA og C7 protein i karpe og regnbueørret. Hos regnbueørret er det registrert to forskjellige isoformer av C7 (C7-1 og C7-2). Transkripsjon av C7-1 og C7-2 mRNA er detektert fra forskjellige vev i regnbueørret. C7-2 er detektert fra hjerne, hjerte, tarm, nyre, milt og lever, mens C7-1 ikke er detektert i milt og nyre (Papanastasiou, A.D. and Zarkadis, I.K., 2005). Nyere studier derimot viser at det er lav basaltranskripsjon av C7-1

i hodenyre og milt, men transkripsjon av C7-2 i de samme organene er mye større (Lovoll, M., *et al* 2007A). Interferon- $\lambda$  (INF- $\lambda$ ) er vist å kunne påvirke syntesen av C7 i pattedyr (Ripoche, J., *et al* 1988).

### **1.5 Hensikt**

Dette studiet har til hensikt å undersøke transkripsjon av mRNA for komplementfaktorene C3 og C7 i lever og milt etter vaksinerings med monovalente vaksiner mot henholdsvis *A. salmonicida* og IPNV.



## 2.0 Material og metode

### 2.1 Forsøksdyr

Fiskene som ble brukt i forsøket var parr fra atlantisk laks med en gjennomsnittsvikt på 50 g. Lysregimet til fisken var 12 timers lys/døgn, og vanntemperatur var 5°C. Fiskene ble fôret med 3 mm pellet av Skretting Nutra parr LB (Skretting A/S). På forhånd ble fiskene delt i tre grupper à 90 fisk hvorav gruppe 1 ble injisert med 0.1 ml saltvannsløsning, gruppe 2 ble injisert med 0.1 ml oljeemulsjon, gruppe 3 ble vaksinert med 0.1 ml antigen fra *Aeromonas salmonicida* i oljeemulsjon (Pharmaq AS). Gruppe 4 besto av 20 fisk, og ble vaksinert med 0.1 ml antigen fra IPNV i oljeemulsjon (Pharmaq AS). All injeksjon var intraperitonell.

### 2.2 RNA-isolering

Lever og milt ble tatt ut av tre fisk fra hver gruppe ved henholdsvis 1, 2, 5, og 7 dager etter injeksjon. De respektive organene fra hver gruppe ble slått sammen på RNA-later. Til RNA isolering ble cirka 30 mg vev homogenisert med Ultra-turrax T25 basic crusher (IKA®-WERKE) i 1 ml Trizol® (Invitrogen). Isolering av total RNA ble gjort etter metoden beskrevet av Chomczynski, P. and Sacchi, N., 1987 med enkelte modifikasjoner. For ytterligere fjerning av protein og DNA ble det tilsatt en andre runde med Trizol®/kloroform. Kvalitet på RNA ble verifisert ved bruk av gelelektroforese med POWER PAC 300 (BIO-RAD). Gelen besto av 1 % Multi ABgarose (ABgene) i tris-acetate-EDTA og 0.35 % etidiumbromide. Båndene ble visualisert med GeneGenius Bio Imagine System (Syngene). Konsentrasjon og renhet ( $A_{260}/A_{280}$ ) av RNA ble målt med ND-1000 Spectrophotometer (NanoDrop®). Total RNA ble DNase behandlet med TURBO DNase Treatment and Removal Reagents, TURBO DNA-free™ kit (Ambion) etter protokoll fra produsent for fjerning av eventuell genomisk DNA.

### **2.3 Sann-tids revers transkripsjon polymerase kjede reaksjon (Q-realtime RT-PCR)**

cDNA ble syntetisert ved bruk av TaqMan RT-reagents (Applied Biosystems) etter protokoll fra produsent i en GeneAmp PCR System 2700 (Applied biosystems). Følgende termiske parametere ble benyttet: 25°C i 10 min, 37°C i 60 min og 95°C i 5 min. I hver amplifiseringsreaksjon ble 50 ng total-RNA i 50 µl reaksjonsvolum benyttet.

Real-time polymerase chain reaction (Q-realtime RT-PCR) ble gjort i duplikater og avlest med en 7500 Fast Real-Time PCR system (Applied Biosystems). Følgende sykluser ble benyttet: 95°C i 20 sek og 40 sykluser av 95°C i 3 sek og 60°C i 30 sek. Hver PCR-reaksjon besto av 2X TaqMan Fast Universal PCR-mix 2x (Applied Biosystems), spesifikke forward og reverse primere og prober (henholdsvis 900nM og 250nM sluttkonsentrasjon) for C3 (ASC3-ANY 20x mix), C7 (ASC7-B 20 x mix) og 18S som referansegen (ASRT 18S-1A 20x mix) (Applied Biosystems), 2.5µl cDNA templat og milliQ-vann i et samlet volum på 25 µl. Templatet som ble brukt til 18S primere var fortynnet 1:10000. Primere og prober ble designet etter sekvenser fra GenBank, og syntetisert av Applied Biosystems. Primerene og prober er listet i tabell 1. Amplifikasjonseffektiviteten for hvert primerpar ble beregnet ved hjelp av en tofoldsfortynning av lever cDNA etter formelen  $E = 10^{(-1/\text{slope})}$  (Amplifikasjonseffektiviteten for hver primer er listet i tabell 2).  $E=2$  indikerer 100 % primereffektivitet og korresponderer med en slope på -3.32 (standardkurver og kalkulerter slope-verdier er vist i figur 2), slik at det etter 3.32 sykluser er syntetisert en 10-folds økning av produktet (Bogerd, J., *et al* 2001). Den relative ekspresjonsratioen (R) til målgenet er kalkulert ut fra primereffektiviteten og  $C_t$ -verdien til den ukjente prøven versus den respektive prøven av referansegenet (18S) etter formelen  $R = (E_{\text{target}})^{\Delta C_t \text{ target (calibrator-sample)}}$  /  $(E_{\text{reference}})^{\Delta C_t \text{ target (calibrator-sample)}}$  (Pfaffl, M.W., 2001). 18S ble i dette forsøket funnet å være det mest stabile referansegenet for *in vivo* eksperiment.

For å forsikre oss om at RNA var fri for genomisk DNA, ble det gjort real-time PCR på duplikater av RNA fra enkelte prøver uten at det på forhånd var syntetisert cDNA. Dette



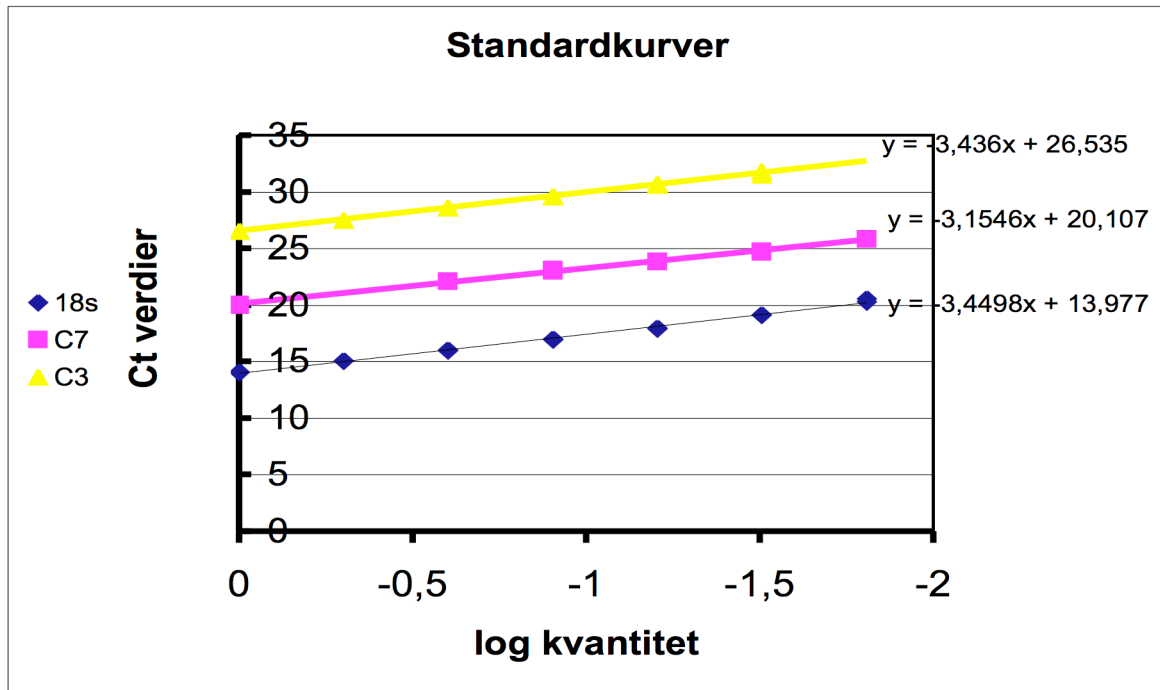
ble gjort under like forhold som ved real-time PCR på cDNA og primere for C3 ble brukt. Det ble ikke detektert genomisk DNA i RNA-prøvene (data ikke vist).

**Tabell 1:** Funksjon, primersekvens og amplikonlengde (bp) for genene som ble brukt i qPCR. Access nummeret til genene i GenBank er også vist.

Gen	Funksjon		Primersekvens	(bp)	Acc. number
C3	Sentral komplementfaktor	Forward	5`-gcagtagcgtacctcgagaag-3	74	BI468074
		Reverse	5`-agagcataggagggtcatagct acag-3		
		Probe	FAM-ccccacctgactaacc		
C7	MAC komponent	Forward	5`-gggctcggaggtgtca-3	59	BQ036509
		Reverse	5`-gcagaacaggccttgatgct-3`		
		Probe	FAM-cacatcaaactgctcccc		
18S	Referanse gen	Forward	5'-gatccattggagggaagtct-3'	89	AJ427629
		Reverse	5'-cgagcttttaactgcagcaacttt-3'		
		Probe	FAM-ttgagctggaattac		

**Tabell 2:** Slope,  $r^2$  og % effektivitet for primerenparene til genene kalkulert ut fra standardkurvene (log cDNA input vs Ct sykluser).

Gen	Slope	$r^2$	%E
18s	-3,4498	0,996	1,95
C3	-3,4312	0,998	1,96
C7	-3,1564	0,997	2,07



**Figur 2:** Standardkurvene til primerene for hvert av de genene som ble detektert og referansegnet. Figuren viser også formelen til trendlinjen for hver av kurvene.

## 2.4 Smitteforsøk

*A. salmonicida* (FHL01) fra Fiskehelselaboratoriet i Kårvika ble strøket ut på blodagarplate fra ampulle og inkubert ved romtemperatur. Etter 24 timer ble det observert oppvekst av kolonier. Bakterier ble overført til 25 ml flytende "brain heart infusion" medium (BHI, 3,7%, Gibco, Invitrogen) og inkubert ved romtemperatur uten omrysting. Optisk tetthet av bakteriesuspensjonen ble målt ved 600 nm til 0.7 etter 24 timers inkubasjon. Bakteriene ble sentrifugert ved 1882 xg (Heraeus multifuge) og resuspendert i 0.9 % NaCl til en OD 600 på 0.5.

Førti fisk fra henholdsvis gruppen injisert med PBS, gruppen injisert med olje og gruppen vaksinert mot *A. Salmonicida* ble fordelt på to kar og utsatt for kohabitantsmitte med *A. salmonicida*. Det var 10 % kohabitanter i hvert kar som hver var injisert intraperitonellt med  $10^8$  bakterier og det ble registrert dødelighet i en periode på 24 dager. Akkumulert dødelighet (%) ble kalkulert ut fra gjennomsnittet av de to gruppene. Standardavvik er vist på kurven i figur 4.

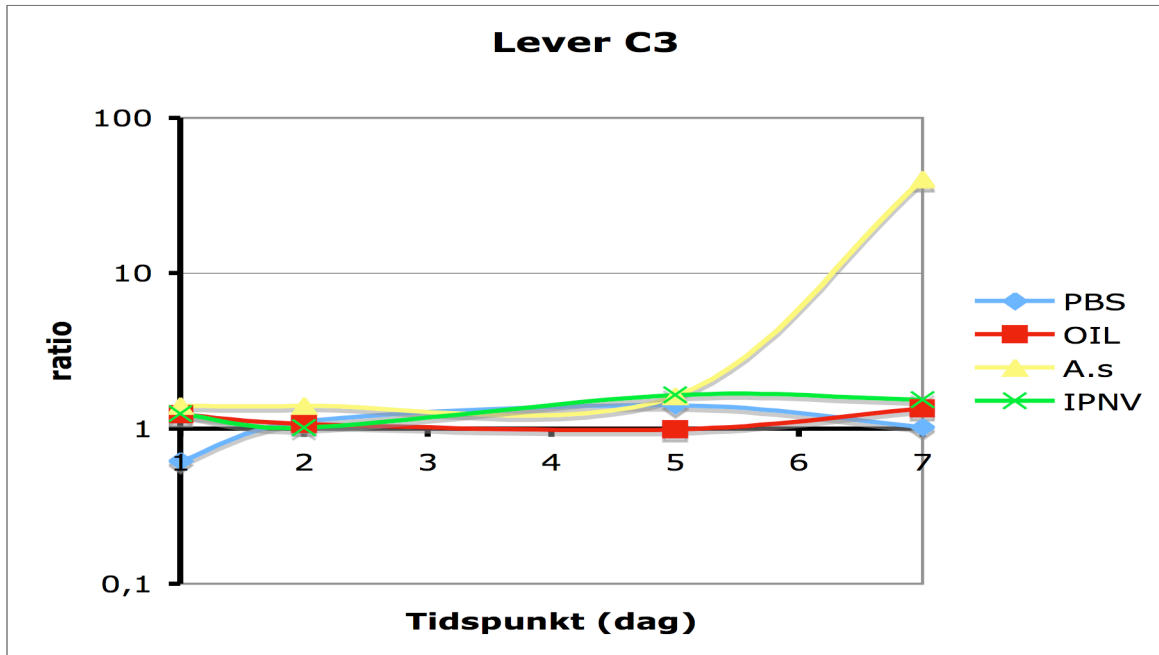
## 3.0 Resultater

Det relative ekspresjonsnivået til C3 og C7 i lever og milt hos atlantisk laks ble detektert ved real-time RT-PCR og er kalkulert i forhold til referansegenet 18S.

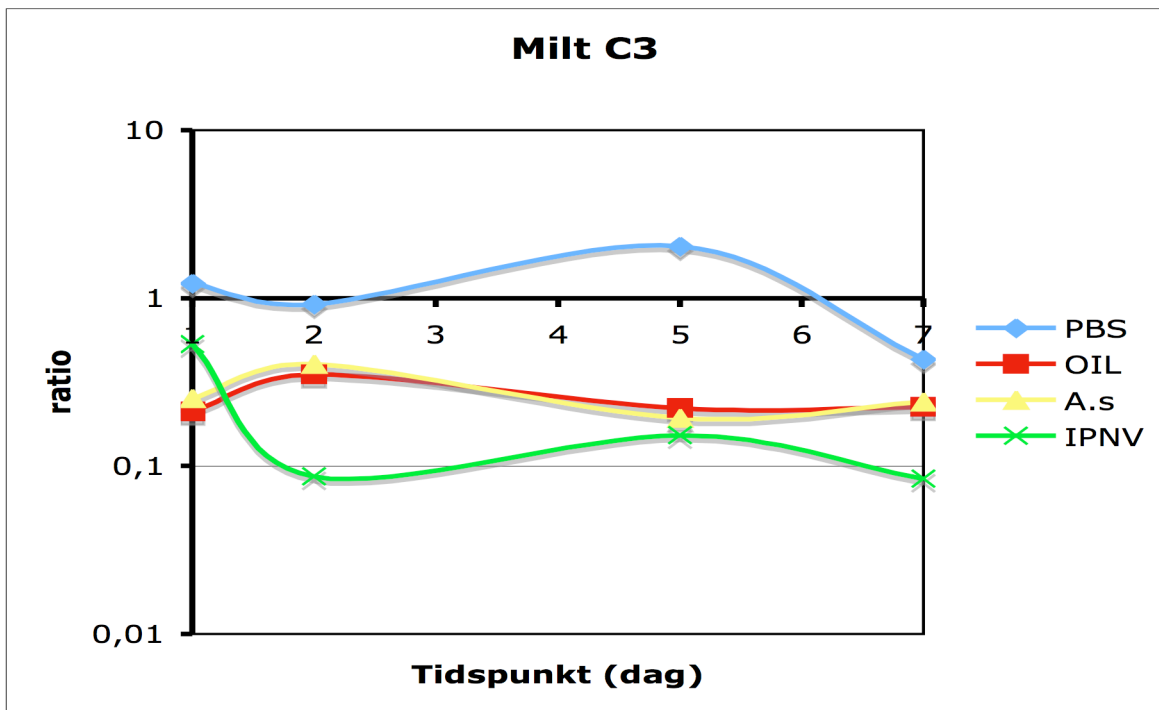
C3 mRNA ble oppregulert svakt i lever ved dag fem etter vaksinerings mot både IPNV og *A. salmonicida*. Nivået av C3 mRNA økte kraftig fra dag 5 og utover mot dag 7 etter vaksinerings med *A. salmonicida* (opp mot 40 fold i forhold til PBS gruppa) (Figur 3 A). I milt ble C3 mRNA nedregulert i begge de vaksinererte gruppene. Etter vaksinerings med IPNV ble C3 mRNA nedregulert ytterligere og så mye som 10 fold i forhold til PBS-gruppa to dager etter injisering. Oljeadjuvansen viste lik tendens som vaksinen mot *A. Salmonicida* i milt (Figur 3 B).

C7 mRNA ble oppregulert i lever hos begge de vaksinererte gruppene ved dag 7 etter vaksinerings. Etter vaksinerings mot *A. salmonicida* startet oppreguleringen allerede ved dag 1 i tillegg til at den generelt var mye høyere enn hos fisken vaksinerert mot IPNV. (Figur 3C). I milt ble den samme tendensen observert, men her startet oppreguleringen to dager etter vaksinerings. IPNV vaksinen hadde derimot ingen innvirkning på C7 mRNA i milt. Oljeadjuvansen viste en liten tendens til oppregulering av C7 mRNA dag 7 etter injisering i lever. I milt vistes oppreguleringen dag 2 etter injisering (Figur 3 D).

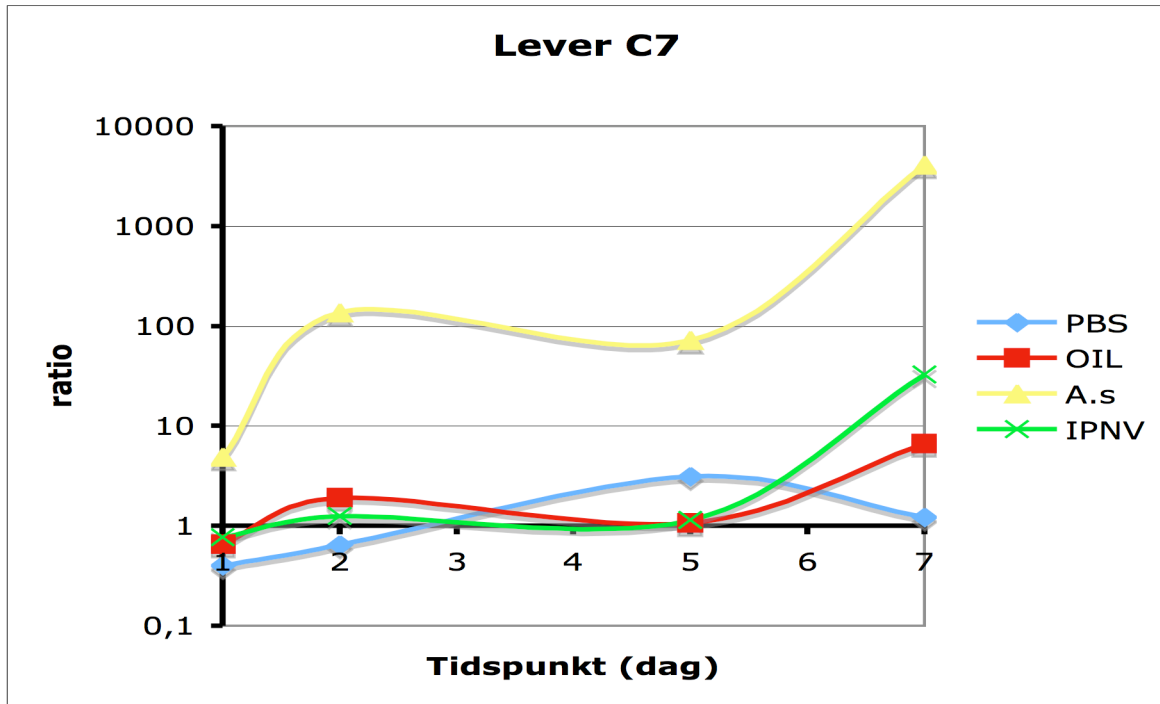
Smittforsøket viste en forhøyet dødelighet i gruppen injisert med olje. Det var også dødelighet i gruppen injisert med PBS, mens gruppen vaksinerert mot *A. salmonicida* viste lav dødelighet.



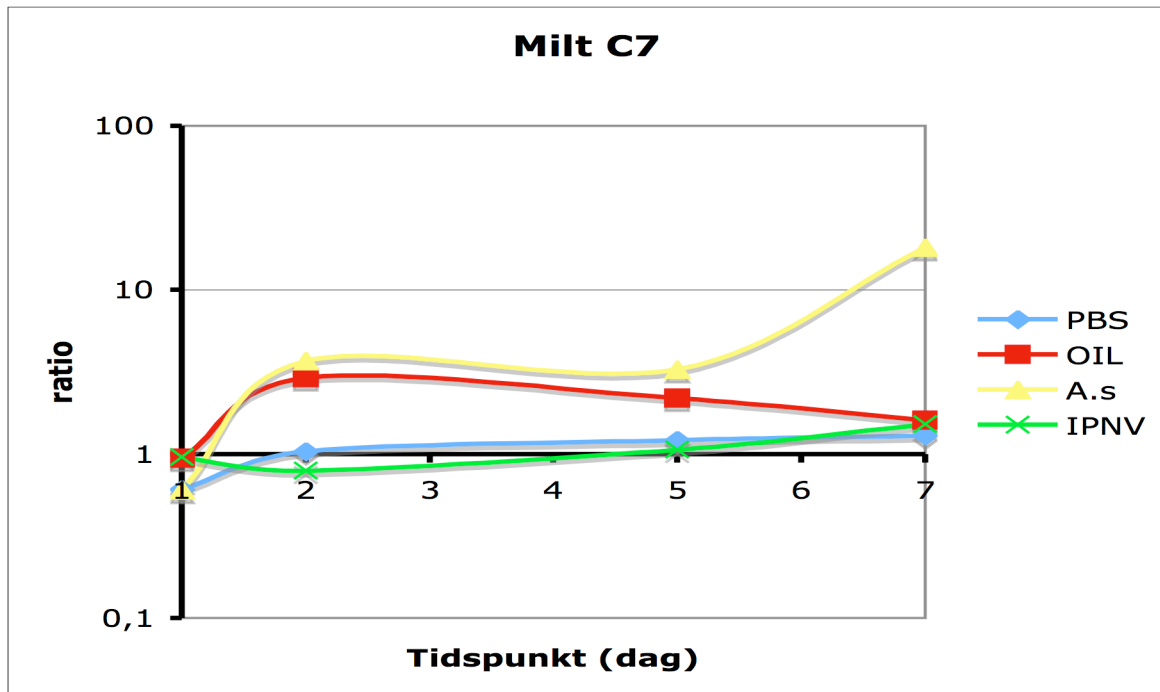
A



B

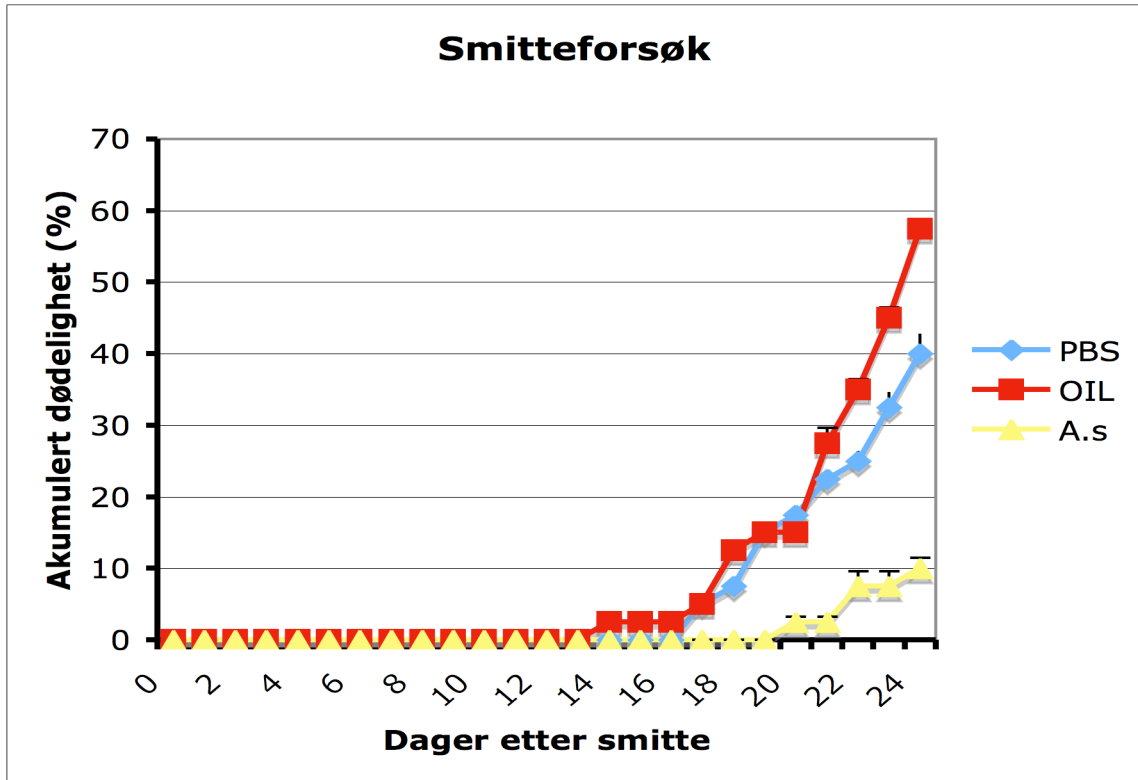


C



D

**Figur 3:** Utvikling av relativ ekspressionsratio av (A) C3 i lever, (B) C3 i milt, (C) C7 i lever og (D) C7 i milt hos de fire forskjellige gruppene injisert med henholdsvis PBS, oljeemulsjon, vaksine mot *Aeromonas salmonicida* og vaksine mot IPNV fra første organuttak (dag 1) til siste organuttak (dag 7).



**Figur 4:** Akumulert dødelighet (%) utviklet seg etter smitte med *A. salmonicida* fra dag 0 til 24 etter smitte i henholdsvis gruppen injisert med PBS gruppen injisert med olje og gruppen vaksinert mot *A. salmonicida*.

## 4.0 Diskusjon

Som en essensiell komplementfaktor i alle tre aktiveringsveiene av komplementsystemet var det naturlig å studere C3 som et ledd i en immunrespons. For enhver aktivering av MAC vil alle komponenter inkludert C7 være essensiell. C7 var dermed også naturlig å studere som et ledd i en immunrespons. Lever- og miltvev ble valgt til eksperimentet fordi de største forandringene i forbindelse med en immunreaksjon skjer blant annet i disse organene.

Den relative ekspresjonsratioen ble kalkulert ut fra referansegene 18S. 18S viste seg å være stabilt uttrykt og dermed en god kandidat som referansegene. Gjennomsnittet av ratioen til tidsstudiet av PBS-gruppa ble brukt som kontroll. PBS- gruppa ble tatt med for å vise at det er variasjon også etter injeksjon av PBS. Om variasjonen skyldtes PBS eller individuelle forskjeller er riktignok usikkert. Det er velkjent at responser hos fisk utvikler store individuelle variasjoner. Dette må også tas i betraktning ettersom prøveuttakene var en "pooling" av tre individer. "Poolingen" kan forårsake at "outliners" påvirket resultatet i positiv eller negativ retning. "Poolingen" gjorde også sitt til at vi ikke hadde mulighet til å kalkulere standardavvik for hvert prøveuttak.

Videre må det nevnes at uttrykket av C3/C7 transkripter ikke uten videre kan antas å sammenfalle med en forandring i C3/C7 proteinnivå etter stimulering i fisk (Gygi, S.P., *et al* 1999). Det ble ikke gjort målinger på proteinuttrykk i dette studiet som viser sammenfallende resultater mellom transkripsjonsekspresjon og proteinuttrykk. Gener kan være potente i større eller mindre grad, slik at et høyt ekspresjonsnivå ikke nødvendigvis gir et høyt proteinuttrykk. Individuelle forskjeller kan også spille inn her.

Liksom RNA transkribering er degradering av mRNA en svært regulert og kompleks prosess. Halveringstiden kan variere kraftig mellom mRNA fragmenter fra forskjellige gener. Real-time RT-PCR detekterer kun mengde mRNA transkripter, ikke mengde syntetiserte mRNA transkripter i forbindelse med stimuleringen (Bevilacqua, A., *et al* 2003, Roca, F.J., *et al* 2007). Det vil derfor være vanskelig å si om mengden transkripter

er bestemt av eksempelvis en økning i transkripsjon eller en nedgang i degradering etter stimulering.

I lever ble det vist en tendens til svak oppregulering av C3 fem dager etter vaksinerings mot IPNV. Oppreguleringen av C3 startet også 5 dager etter vaksinerings mot *A. salmonicida* for så i motsetning til etter vaksinerings mot IPNV å øke kraftig mot 7 dager etter vaksinerings (Figur 3 A). Ved prøveuttakene ble det observert en immunreaksjon i buken i form av væskedannelse (resultat ikke vist). Denne reaksjonen preget fisken som var vaksinert mot *A. salmonicida* i større grad enn resten av fisken, og var mest hyppigst 5 og 7 dager etter vaksinerings. Denne reaksjonen kan være sammenfallende med det høye nivået av C3 etter vaksinerings mot *A. salmonicida*. C3 er derimot regnet som et akutfase protein, og studier på sebrafisk viser en topp på C3 mRNA nivået 15 timer etter infeksjon med *A. salmonicida* (Lin. B., *et al* 2006). Primerparet vi har brukt ble syntetisert i forhold til C3-1  $\alpha$ -kjeden. Man regner med at atlantisk laks har tilsvarende subtyper av C3 som regnbueørret. Det er mulig at primerene vi har brukt bandt seg bedre til en subtype av C3 som transkriberes senere i immunreaksjonen. At det er usikkert hvilken subtype primerene binder seg best til er også viktig i forbindelse med at fisken som ble vaksinert mot *A. salmonicida* fikk en mye større økning i C3 mRNA nivået enn fisken som ble vaksinert mot IPNV. Pharmaq AS har ikke oppgitt hva vaksinen mot de respektive mikroorganismene inneholdt. Tidligere studier har vist at de forskjellige subtypene av C3 (C3-1, C3-3 og C3-4) har større eller mindre affinitet mot forskjellige partikulære overflater (Sunyer, J.O. and Tort, L., 1995). Kanskje har primerene vi har brukt bundet seg bedre til en av subtypene som har stor affinitet mot *A. salmonicida* og liten affinitet mot IPNV. Tidligere studier foreslår at komplementsystemets mulighet til å nøytralisere virus er avhengig av overflaten på kappen til viruset. IPNV er et nakent virus, og virusnøytralisering av IPNV er dermed ikke avhengig av komplementsystemet (Ellis, A.E., 2001). I tillegg kan det være slik at vaksinen mot IPNV bare inneholdt et protein fra IPNV, mens vaksinen mot *A. salmonicida* inneholdt hele bakterieceller. Hele bakterieceller består av en kombinasjon av en rekke stimulanter, blant annet LPS som i tidligere studier har vist å oppregulere nivået av C3 mRNA (Lovoll, M., *et al* 2007C).



Det bør i denne sammenhengen også nevnes at av figur 3 A kan man se at oljeadjuvans ikke hadde noen effekt på transkripsjonen av C3.

I milt så vi en tendens til nedregulering av C3 mRNA nivået både etter vaksinerings mot *A. salmonicida* og etter vaksinerings mot IPNV. Det viste seg også en tendens til at oljeadjuvansen påvirket nedreguleringen av C3 mRNA nivået i milt (se figur 3 B). I regnbueørret er det rapportert et svært lavt transkripsjonsnivå av både C3-1, C3-3 og C3-4 i milt i forhold til lever (under 0.5 % av levernivået) (Lovoll, M., *et al* 2007C). Når vi så på Ct-verdiene for seg selv i dette studiet (resultat ikke vist), sammenfalt de med studiene gjort på regnbueørret. Tidligere studier på regnbueørret viser også at både C3-1 og C3-3 mRNA blir oppregulert i milt etter stimulering med LPS og  $\beta$ -glucan. C3-4 mRNA derimot blir nedregulert (Lovoll, M., *et al* 2007). I dette studiet kunne det dermed være nærliggende å tro at primerene vi har brukt bandt seg bedre til C3-4 enn til C3-1 og C3-3. Det er likevel vanskelig å trekke en konklusjon fordi C3-4 også blir nedregulert i lever hos regnbueørret. Hvorfor nivået av C3 mRNA var så lite induert etter vaksinerings mot IPNV, er vanskelig å si noe om. Det er ikke gjort studier på C3 og IPNV. Studier på C3 og infeksjøs hematopoetisk nekrose virus (IHNV) er derimot gjort på regnbueørret (Overturf, K. and LaPatra, S., 2006). Her vises det en kraftig oppregulering av C3 mRNA i milt. I denne sammenheng må det nevnes at IHNV er et kappekledd virus, og i motsetning til IPNV som er et nakent virus vil kappekledd virus kunne nøytraliseres av komplementsystemet. Det er dermed mulig at transkripsjonen av C3 ble nedregulert, slik at andre immunologiske prosesser som fungerer bedre mot IPNV kunne oppreguleres.

Nivået av C7 mRNA i lever viste seg å være kraftig oppregulert, faktisk opp mot 4000 ganger etter vaksinerings mot *A. salmonicida* i forhold til fisken som var injisert med PBS. Også fisken som var vaksinert mot IPNV viser en tendens til oppregulering av C7 mRNA. Det så ut som oljeadjuvansen også påvirket nivået av C7 mRNA (Figur 3C). Oljeadjuvansen inneholder ingen immunstimulerende stoffer, men kan forårsake en inflammasjon som kan påvirke transkriberingen av komplementfaktorer. Oppreguleringen etter vaksinerings mot *A. salmonicida* så ut til å starte bare et døgn etter vaksinerings (Figur 3 C). Det er nærliggende å tro at atlantisk laks i likhet med

regnbueørret har to isoformer av C7. Det må derfor også her tas i betraktning at primerene vi har brukt kan ha større affinitet for én av subtypene. Igjen er det ikke oppgitt hva vaksinene inneholder. Et C5-7 kompleks er kompatibel til å binde til en rekke membrankomponenter (Niculescu, F., *et al* 1994), og en kan dermed tro at tilstedeværelsen av mange slike membrankomponenter vil øke transkripsjonen av C7 mer enn tilstedeværelsen av få membrankomponenter. Om C7 regnes som et akutfase protein på fisk er usikkert. Studier på mammalia viser at C7 ikke regnes som et akutfase protein (Wurzner, R., 2000), mens studier på regnbueørret derimot viser en oppregulering av C7 mRNA bare 24 timer etter vaksinerings (Gerwick, L., *et al* 2006). Disse resultatene er sammenfallende med dette eksperimentet, hvor økningen av C7 mRNA nivået også startet etter ett døgn. Få studier er derimot gjort på C7 i fisk, men det er nærliggende å tro at C7 kan regnes som et akutfaseprotein i fisk.

I milt så vi et lignende mønster i C7 mRNA nivået som i lever etter vaksinasjon mot *A. salmonicida*. Nivået var derimot ikke like stor i milt som i lever i forhold til PBS gruppa (Figur 3 D). Tidligere studier på atlantisk laks viser at C7 mRNA ikke transkriberes i milt etter smitte med *A. salmonicida* (Ewart, K.A., *et al* 2004). Andre metoder er derimot brukt til å detektere C7, og i tillegg var det et kohabitant smitteforsøk, hvor det er usikkert om all fisken ble smittet. I dette eksperimentet ble all fisken stimulert, og det er da større sjans for å detektere en forandring i mRNA nivå i alle fisk. Studier på regnbueørret viser deteksjon av begge subtypene av C7 i milt. Av en rekke organer ser det til og med ut som om milt transkriberer mest C7-2, faktisk 25 ganger mer enn lever (Lovoll, M., *et al* 2007A). Det er ikke sammenfallende med dette eksperimentet, hvor Ct-verdiene i seg selv (resultat ikke vist) viste lavere ekspresjon i milt.

Det er imidlertid vanskelig å se på transkripsjonen av mRNA i seg selv og konkludere ut i fra det. Studier i forbindelse med stress viser at fisk kan ha lagre av komplementproteiner som pøses ut i forbindelse med en stressituasjon (Bayne, C.J. and Gerwick, L., 2001). Dette vil selvsagt også ha stor betydning i forbindelse med vaksinerings. Om det er tidlig eller sen opp- eller nedregulering av komplementtranskripsjon har dermed ikke nødvendigvis direkte med vaksinerings å gjøre. Regulering av komplementfaktorer er

dessuten svært kompleks og påvirkes av en rekke andre faktorer som proinflammatoriske cytokiner (IL-1 $\beta$ 1, IL-1 $\beta$ 2 og IL-6) og interferon- $\lambda$  (Lovoll, M., *et al* 2007C). I tillegg deltar komplementfaktorer i en rekke andre biologiske prosesser som opprettholdelse av organhomeostase og regenerering av skadet vev (Andrades, J.A., *et al* 1996, Kimura, Y., *et al* 2003, Mastellos, D., *et al* 2001). Store individuelle forskjeller både mellom grupper og enkeltindivider av fisk er velkjent. Opp- og nedregulering av komplementfaktorer kan derfor være resultat av forskjell mellom hvilke deler av immunforsvaret enkeltindivider benytter seg av. En nedregulering av komplement kan være forårsaket kun av at det skjer en oppregulering av andre immunologiske prosesser.

Smitteforsøket ble tatt med for å verifisere at vaksinen mot *A. salmonicida* fungerte *in vivo*. Grunnen til at vaksinen mot IPNV ikke ble testet, var at det ikke finnes like gode og enkle smittemodeller for IPNV. Resultatene av smitteforsøket viste at vaksinen fungerer (Figur 4) ettersom gruppen som er vaksinert viser lav dødelighet. Det viste seg at gruppen som er injisert med olje, hadde høyere dødelighet enn gruppen injisert med PBS. Oljen i seg selv skulle i utgangspunktet ikke stimulere til immunresponser. En inflammasjonsreaksjon grunnet oljen kunne likevel gjort at dødeligheten skulle vært lavere i denne gruppa enn i gruppa injisert med PBS. Andre faktorer som stress og individuelle forskjeller kunne derimot ha innvirkning på resultatet. Dessuten viste ikke resultatene fra transkripsjonsekperimentet stor generell påvirkning av oljeadjuvans i forhold til hvordan vaksinen mot *A. salmonicida* påvirket transkripsjonen av komplementfaktor C3 og C7.

For å få en bedre oversikt over komplementresponsen, vil det i framtiden være viktig å gjøre et lengre tidsstudium. Transkripsjonsnivået av C3 i lever og C7 i både milt og lever er alle oppadgående etter vaksinerings mot *A. salmonicida* (Figur 3). Et lengre tidsstudium vil derfor gi et mer helhetlig bilde av utviklingen av transkripsjonsnivået til C3 og C7. Studier på transkripsjon av proinflammatoriske cytokiner som påvirker komplement er i gang. Dette vil også gi et større bilde av responsen. I tillegg burde det ha vært gjort undersøkelse av C3 og C7 på proteinnivå, slik at man bedre kunne klargjøre om opp- og

nedreguleringen av C3 og C7 er forårsaket av stimuleringen med vaksine. Hodenyre, som også er et viktig organ med tanke på immunresponser, burde også vært undersøkt.

## Referanseliste

- Abelseth, T.K., Stensvag, K., Espelid, S., Nygaard, L., Ellingsen, T., Bogwald, J., 2003. The Spotted wolffish (*Anarhichas minor*) complement component C3 isolation, characterisation and tissue distribution. *Fish and Shellfish Immunology*. 15, 13.
- Andrades, J.A., Nimini, M.E., Becerra, J., Eisenstein, R., Davis, M., Sorgente, N., 1996. Complement proteins are present in developing endochondral bone and may mediate cartilage cell death and vascularization. *Experimental Cell research*. 227, 208-213.
- Bayne, C.J., Gerwick, L., 2001. The acute response and innate immunity of fish. *Developmental and Comparative Immunology*. 25, 725-743.
- Berge, V., Johnson, E., Brege, K.E., 1996. Interleukin-1 $\alpha$ , interleukin-6 and tumor necrosis factor  $\alpha$  increase the synthesis and expression of the functional alternative and terminal complement pathways by human umbilical vein endothelial cells in vitro. *APMIS*. 104, 213-219.
- Bevilacqua, A., Ceriani, M.C., Capaccioli, S., Nicolin, A., 2003. Post-transcriptional regulation of gene expression by degradation of messenger RNAs. *Journal of Cellular Physiology*. 195, 356-372.
- Bogerd, J., Blomenrohr, M., Andersson E., van der Putten H.H.A.G.M., Tensen, C.P., Vischer, H.F., 2001. Discrepancy between molecular structure and ligand selectivity of a testicular follicle-stimulating hormone receptor of the African catfish (*Clarias gariepinus*). *Biological Reproduction*. 64(6), 1633-1643.
- Carroll, M.C., 2000. The role of complement in B-cell activation and tolerance. *Advanced Immunology*. 74, 61-88.
- Carroll, M.C., 2004. The complement system in B cell regulation. *Molecular Immunology* 41, 141-146.
- Chomczynski, P., Sacchi, N., 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical Biochemistry*. 162, 156-159.
- Crawford, D.L., Oleksiak, M.F., Kolell, K.J., Paschall, J., Vanwye, J., Roach, J.L., 2004. Fundulus functional genomics: EST database for teleost fish (Genbank accession number CN 981576)
- Daffern, P.J., Pfeifer, P.H., Ember, J.A., Haugli, T.E., 1995. C3a is a chemotaxin for human eosinophils but not for neutrophils. I. C3a stimulation of neutrophils is secondary to eosinophil activation. *Journal of Experimental Medicine* 181, 2119-2127.
- Dahl, M.R., Thiel, S., Matsushita, M., Fulita, T., Willis, A.C., Christensen, T., Vorup-Jensen, T., Jensenius, J.C., 2001. MASP-3 and its association with distinct complexes of the mannan-binding lectin complement activation pathway. *Immunology* 15, 127-135
- Daveau, M., Benard, M., Scotte, M., Schouft, M.T., Hiron, M., Francois, A., Salier, E.P., Fontaine, M., 2004. Expression of a functional C5a receptor in regenerating hepatocytes and its involvement in a proliferative signaling pathway in rat. *Journal of Immunology*. 173, 3418-3424.
- Del Rio-Tsonis, K., Tsonis, P.A., Zarkadis, I.K., Tsagas, A.G., Lambris, J.D., 1998. Expression of the third component of complement, C3, in regenerating limb blastema cells of urodels. *Journal of Immunology*. 161, 6819-6824.
- Dempsey, P.W., Allison, M.D.D., Akkaraju, S., Goodnow, C.C., Fearon, D.T., 1996. C3d of complement as a molecular adjuvant: bringing innate and acquired immunity. *Science* 271, 348-350.

- DiScipio, R.G., 1992. Formation and structure of the C5b-7 complex of the lytic pathway of complement. *Journal of Biological Chemistry* 263, 549.
- Ehrengruber, M.U., Geiser, T., Deranleau, D.A., 1994. Activation of human neutrophils by C3a and C5A. Comparison of the effects on shape changes, chemotaxis secretion and respiratory burst. *FEBS Letters* 346, 181-184.
- Ellis, A.E., 2001. Innate host defence mechanisms of fish against viruses and bacteria. *Developmental and Comparative Immunology* 25, 827-839.
- Ewart, K.A., Belanger, J.C., Williams, J., Karakach, T., Penny, S., Tsoi, S.C.M., Richards, R.C., Douglas, S.C., 2004. Identification of genes differentially expressed in Atlantic salmon (*Salmo salar*) in response to infection by *Aeromonas salmonicida* using cDNA microarray technology. *Developmental and Comparative Immunology* 29, 333-347.
- Falus, A., Rokita, H., Walcz, E., Brozik, M., Hidvegi, T., Meretey, K., 1990. Hormonal regulation of complement biosynthesis in human cell lines—II. Upregulation of the biosynthesis of complement components C3, factor B and C1 inhibitor by interleukin-6 and interleukin-1 in human hepatoma cell line. *Molecular Immunology* 27, 197-201.
- Farries, T.C., Lachmann, P.J., Harrison, R.A., 1988. Analysis of the interaction between properdin, the third component of complement (C3) and its physiological activation products. *Biochemical Journal* 252, 47-54.
- Frank, M.M., Fries, L.F., 1991. The role of complement in inflammation and phagocytosis. *Immunology Today* 12, 322-326.
- Fujita, T., Matsushita, M., Endo, Y., 2004. The lectin complement pathway—its role in innate immunity and evolution. *Immunological Reviews* 198, 185.
- Gaque, P., 2004. Complement: a unique innate immune sensor for danger signals. *Molecular Immunology* 41, 1089.
- Gerwick, L., Corley-Smith, G., Bayne, C.J., 2006. Gene transcript in individual rainbow trout livers following an inflammatory stimulus. *Fish and Shellfish Immunology* 22, 157-171.
- Gewurz, H., Ying, S.C., Jiang, H., Lint, T.F., 1993. Nonimmune activation of the classical complement pathway. *Behring Inst. Mitt* 93, 138-147.
- Gygi, S.P., Rochon, Y., Franza, B.R., Aebersold, R., 1999. Correlation between protein and mRNA abundance in yeast. *Molecular Cell Biology* 19, 1720-1730.
- Haeffner-Cavaillon, N., Cavaillon, J.M., Laude, M., Kazatchkine, M.D., 1987. C3a (C3adesArg) induces production and release of interleukin 1 by cultured human monocytes. *Journal of Immunology* 139, 794-799.
- Hartmann, K., Henz, B.M., Kruger-Krasagakes, S., Kohl, J., Burger, R., Guhl, S., Haase, I., Lippert, U., Zuberbier, T., 1997. C3a and C5a stimulate chemotaxis of human mast cells. *Blood* 89, 2863-2870.
- Kato, Y., Nakao, M., Mutsuro, J., Zarkadis, I.K., Yano, T., 2003. The complement component C5 of the common carp (*Cyprinus carpio*): cDNA cloning of two distinct isoforms that differ in a functional site. *Immunogenetics* 54(11), 807-815.
- Kimura, Y., Madhavan, M., Call, M.K., Santiago, W., Tsonis, P.A., Lambris, J.D., et al, 2003. Expression of complement 3 and complement 5 in newt limb and lens regeneration. *Journal of Immunology* 170, 2331, 2339.

- Kocabas, A.M., Li, P., Cao, D., Karsi, A., He, C., Patterson, A., 2002. Expression profile of the channel catfish spleen: analysis of genes involved in immune functions. *Marine Biotechnology (NY)* 4, 526.
- Lambris, J.D., 1990. *The third component of complement: Chemistry and Biology*. Springer, Berlin.
- Lange, S., Bambir, S., Dodds, A.W., Magnadottir, B., 2004A. The ontogeny of complement component C3 in Atlantic cod (*Gadus Morhua* L.) – an immunohistochemical study. *Fish and Shellfish Immunology*. 16, 359.
- Lange, S., Bambir, S., Dodds, A.W., Magnadottir, B., 2004B. An immunohistochemical study on complement component C3 in juvenile Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.) . *Developmental and Comparative Immunology*. 28, 593.
- Langeeggen, H., Pausa, M., Johnson, E., Casarsa, C., Tedesco, F., 2000. The endothelium is an extrahepatic site of synthesis of the seventh component of the complement system. *Clinical and Experimental Immunology*. 121, 69-76.
- Li, J., Peters, R., LaPatra, S.E., Vazzna, M., Sunyer, J.O., 2004. Anaphylatoxin-like molecules generated during complement activation induce a dramatic enhancement of particle uptake in rainbow trout phagocytes. *Developmental and Comparative immunology*. 28, 1005-1021.
- Lin, B., Chen, S., Cao, Z., Lin, Y., Mo, D., Zhang, H., Gu, J., Dong, M., Liu, Z., Xu, A., 2006. Acute phase response in zebrafish upon *Aeromonas salmonicida* and *Staphylococcus aureus* infection: Striking similarities and obvious differences with mammals. *Molecular Immunology*. 44, 295-301.
- Lovoll, M., Dalmo, R.A., Bogwald, J., 2007A. Extrahepatic synthesis of complement components in the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Fish and Shellfish Immunology*. xx, 1-11.
- Lovoll, M., Johnsen, H., Boshra, H., Bogwald, J., Sunyer, J.O., Dalmo, R.A., 2007B. The ontogeny and extrahepatic expression of complement factor C3 in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Fish and Shellfish Immunology*.
- Lovoll, M., Fisher, U., Mathisen, G.S., Bogwald, J., Ototake, M., Dalmo, R.A., 2007C. The C3 subtypes are differentially regulated after immunostimulation in rainbow trout, but head kidney macrophages do not contribute to C3 transcription. *Veterinary Immunology and Immunopathology*
- Mastellos, D., Papadimitriou, J.C., Franchini, S., Tsonis, P.A., Lambris, J.D., 2001. A novel role of complement: mice deficient in the fifth component of complement (C5) exhibit impaired liver regeneration. *Journal of Immunology*. 166, 2479- 2486.
- Morgan, B.P., 1989. Complement membrane attack on nucleated cells-resistance, recovery and non-lethal effects. *Biochemical Journal*. 264, 1-14.
- Morgan, B.P., Gasque, P., 1996. Expression of complement in the brain: role in health and disease. *Immunology Today*. 17, 461-466.
- Morgan, B.P., Marchbank, K.J., Longhi, M.P., Harris, C.L., Gallimore, A.M., 2005. Complement: central to innate immunity and bridging to adaptive responses. *Immunology Letters* 97(2), 171-179.
- Muller-Eberhart, H.J., 1986. The membrane attack complex of complement. *Annual Review of Immunology* 4, 503.
- Nagai, T., Mutsuro, J., Kimura, M., Kato, Y., Fujiki, K., Yano, T., 2000. A novel truncated isoform of the mannose-binding lectin-associated serine protease (MASP) from the common carp (*Cyprinus carpio*). *Immunogenetics* 51, 193.

- Nakao, M., Mutsuro, J., Obo, R., Fujiki, K., Nonaka, M., Yano, T., 2000. Molecular cloning and protein analysis of divergent forms of the complement component C3 from a bony fish the common carp (*Cyprinus carpio*): presence of variants lacking the catalytic histidine. *European Journal of immunology*. 30, 858-866.
- Niculescu, F., Rus, H., Shin, M.L., 1994. Receptor-independent activation of guanine nucleotide-binding regulatory proteins by terminal complement complexes. *Journal of biological Chemistry* 269, 4417-4423.
- Overturf, K., LaPatra, S., 2006. Quantitive expression (Walbaum) of immunological factors in rainbow trout, *Onchorhynchus mykiss* (Walbaum), after infection with either *Flavobacterium psychrophilium*, *Aeromonas salmonicida* or infectious haematopoietic necrosis virus. *Journal of Fish Diseases*. 29, 215-224.
- Pangburn, M.K., Rawal, N., 2002. Structure and function of complement C5 convertase enzymes. *Biochem Society Transactions* 30, 1006.
- Papanastasiou, A.D., Zarkadis, I.K., 2005. Gene duplication of the seventh component of complement in rainbow trout. *Immunogenetics*. 57, 703-708.
- Rossi, V., Cseh, S., Bally, I., Thielens, N.M., Jensenius, J.C., Arlaud, G.J., 2001. Substrate specificities of recombinant mannan-binding lectin-associated serine-proteases-1 and -2. *J. Biological Chemistry*. 276, 40880-40887.
- Pfaffl, M.W., 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research*. 29(9), 45.
- Ripoche, J., Mitchell, J.A., Erdei, A., 1988. Interferon- $\lambda$  induces synthesis of complement alternative pathway proteins by human endothelial cells in culture. *Journal of Experimental Medicine*. 168, 1917-1922.
- Roca, F.J., Cayuela, M.L., Secombes, C.J., Meseguer, J., Mulero, V., 2007. Post-transcriptional regulation of cytokine genes in fish: A role for conserved AU-rich elements located in the 3'-untranslated region of their mRNAs. *Molecular Immunology*. 44, 472-478.
- Rossi, V., Cseh, S., Bally, I., Thielens, N.M., Jensenius, J.C., Arlaud, G.J., 2001. Substrate specificities of recombinant mannan-binding lectin-associated serine protease-1 and -2. *Biological Chemistry*. 276, 40880-40887.
- Sato, T., Abe, E., Jin, C.H., Hong, M.h., Katagiri, T., Kinoshita, T., Amizuka, N., Ozawa, H., Suda, T., 1993. The biological roles of the third component of complement in osteoclast formation. *Endocrinology*. 133, 397-404.
- Strey, C.W., Markiewski, M., Mastellos, D., Tudoran, R., Spruce, L.A., Greenbaum, L.E., Lambris, J.D., 2003. The proinflammatory mediators C3a and C5a are essential for liver regeneration. *Journal of Experimental Medicine* 198, 913-923.
- Stover, C., Endo, Y., Takahashi, M., Lynch, N.J., Constantinescu, C., Vorup-Jensen, T., Thiel, S., Friedl, H., Hankeln, T., Hall, R., Gregory, S., Fujita, T., Schwaeble, W., 2001. The human gene for mannan-binding lectin-associated serine protease-2 (MASP-2), the effector component of the lectin route of complement activation, is part of a tightly linked gene cluster on chromosome 1p36.2-3. *Genes and Immunity* 2, 119-127.
- Sunyer, J.O., Tort, L., 1995. Natural hemolytic and bactericidal activities of sea bream (*Sparus aurata*) serum are effected by the alternative complement pathway. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 45, 333
- Sunyer, J.O., Zarkadis, I.K., Sahu, A., Lambris, J.D., 1995. Multiple forms of complement C3 in trout that differ in binding to complement activators. *Immunology*. 93, 8546-8551.



- Sunyer, J.O., Lambris, J.D., 1998. Evolution and diversity of the complement system of poikilothermic vertebrates. *Immunology Reviews*. 166, 39.
- Sunyer, J.O., Zarkadis, I.K., Sarrias, M.R., Hansen, J.D., Lambris, J.D., 1998A. Cloning, structure and function of two rainbow trout Bf molecules. *Journal of Immunology* 161, 4106.
- Sunyer, J.O., Zakadis, I.K., Lambris, J.D., 1998B. Complement diversity: A mechanism for generating immune diversity? *Immunology Today*. 11, 519-523.
- Sunyer, J.O., Boshra, H., Lorenzo, G., Parra, D., Freedman, B., Bosch, N., 2003. Evolution of complement as an effector system in innate and adaptive immunity. *Immunology Research* 27, 549.
- Tomlinson, S., Stanley, K.K., Esser, A.F., 1993. Domain structure, functional activity, and polymerization of trout complement protein C9. *Developmental and Comparative Immunology* 17, 67.
- Turner, M.W., 2003. The role of mannose-binding lectin in health and disease. *Molecular Immunology* 40, 423.
- Vitved, L., Holmskov, U., Koch, C., Teisner, B., Hansen, S., Skjoldt, K., 2000. The homologue of mannose-binding lectin in the carp family Cyprinidae is expressed at high level in spleen, and the deduced primary predicts affinity for galactose. *Immunogenetics* 51, 955.
- Wurzer, R., Joysey, V.C., Lachmann, P.J., 1994. Complement component C7. Assasment of in vitro synthesis after liver transplantation reveals that hepatocytes do not synthesize the majority of human C7. *Journal of Immunology*. 152, 4624-4629.
- Wurzner, R., 2000. Modulation of complement membrane attack by local C7 synthesis. *Clinical and Experimental Immunology*. 121, 8-10.
- Yano, T., Nakao, M., 1994. Isolation of a carp complement protein homologous to mammalian factor D. *Molecular Immunology*. 31, 337.
- Zarkadis, I.K., Sarrias, M.R., Sfyroera, G., Sunyer, J.O., Lambris, J.D., 2003. Cloning and structure of three rainbow trout C3 molecules: a plausible explanation for their functional diversity. *Developmental and Comparative Immunology*. 25, 11.
- Zarkadis, I.K., Chondrou, M., 2004. Cloning of the sixth component of complement in trout. (Genbank accession number CAF22026)
- Zarkadis, I.K., Papanastasiou, A.D., 2004. Cloning of C8 alpha component in rainbow trout. (Genbank accession number CAH65481)
- Zarkadis, I.K., Duraj, S., Chondrou, M., 2004. Molecular cloning of the seventh component of complement in rainbow trout. *Developmental and Comparative Immunology*. 29, 95.