



Uit

NORGES
ARKTISKE
UNIVERSITET

Norges Fiskerihøgskole

Effekt av interferon, poly I:C og virusmitte på induksjon av nyoppdagede Mx-gener hos atlantisk laks (*Salmo salar* L.)

Lars Gaute Jørgensen

Masteroppgave i Akvamedisin (60 stp)

November 2017



Forord

Dette mastergradsarbeidet ble utført ved Fakultet for biovitenskap, fiskeri og økonomi, ved Norges Fiskerihøgskole, Universitetet i Tromsø. Oppgaven ble påbegynt i september 2016 og avsluttet i november 2017.

En stor takk må rettes til min veileder professor Børre Robertsen for muligheten til å jobbe sammen med en dyktig og kunnskapsrik forskningsgruppe, og for muligheten til å lære mye i et utrolig spennende fagfelt. Takk for uvurderlig veiledning og oppfølging i arbeidet med masteroppgaven. Dine raske tilbakemeldinger på alle spørsmål, faglige veiledning og ikke minst innspill i skriveprosessen har vært til stor nytte. Videre vil jeg takke Mehrdad Sobhkhez for god oppfølging på lab, samt veiledning. Takk for at døren til kontoret ditt alltid har vært åpen, og for alle gode diskusjoner og forklaringer over en kopp kaffe. Ditt gode humør og positivitet har vært viktig i frustrerende øyeblikk både på labben og i skriveprosessen.

Jeg må også takke Linn Greiner-Tollersrud for god opplæring på lab og oppfølging underveis. Uten din hjelp hadde jeg nok fortsatt slitt på labben med celledyrking, RNA-isolering og qPCR. Ellers vil jeg takke alle andre på labben for god hjelp ved store og små utfordringer.

Til slutt vil jeg takke alle medstudenter opp i gjennom årene, både ved NFH og NVH, for å ha bidratt til en morsom og lærerik studietid. Jeg ser fram til å møte dere igjen både i faglige og sosiale sammenhenger.

Tromsø 15. november 2017

Lars Gaute Jørgensen

Sammendrag

Interferonsystemet er den viktigste mekanismen i det medfødte immunforsvaret mot virus hos vertebrater. Celler som blir infisert av virus, produserer og sekreterer proteinet interferon (IFN) som i neste omgang stimulerer produksjon av antivirale proteiner som hemmer virusreplikasjonen. Mx-protein er et av de viktigste IFN-stimulerte antivirale proteinene. I dette mastergradsarbeidet har effekten av interferon, poly I:C og virusmitte på ekspresjon av Mx-gener hos atlantisk laks (*Salmo salar* L.) blitt undersøkt. Tidligere ekspresjonsstudier har blitt gjort av genene SsaMx1, SsaMx2 og SsaMx3 som befinner seg på kromosom 12. I dette studiet er ekspresjon av SsaMx1,2,3 sammenlignet med SsaMx4 og SsaMx5 på kromosom 25 og SsaMx9 på kromosom 9. Disse genene er nylig oppdaget gjennom publisering av laksegenomet i NCBI GenBank. Hovedmålet for oppgaven var å undersøke om de nyoppdagete Mx-genene hos laks også er typiske IFN-induserte gener. Ekspresjon av Mx-gener ble studert ved kvantitativ revers transkriptase PCR (RT-qPCR).

I første del av oppgaven ble induksjon av Mx-gener i SSP-9 celler studert etter 24 og 48 timers extracellulær stimulering med IFN α , IFN γ og poly I:C, et syntetisk tottrådig RNA som imiterer virusinfeksjon. Cellene ble også stimulert med poly I:C intracellulært ved transfeksjon. Alle behandlinger ga induksjon av SsaMx1,2,3, SsaMx2, SsaMx4 og SsaMx5, men ikke av SsaMx9. Ved bruk av kvantitativ RT-PCR ble det vist at ILAV-smitte av ASK-celler induserte ekspresjon av Mx-genene på kromosom 12 og 25, men ikke av SsaMx9. Effekten av IFN α og poly I:C på ekspresjon av Mx1,2,3 hos erytrocytter ble også studert. Dette viste nedregulering av Mx-genene ved inkubasjon av erytrocyttene, og at poly I:C-stimulering ikke hadde noen effekt. Stimulering med IFN α viste seg å gjenopprette ekspresjonen av Mx-genene i erytrocytter. Til sist ble det sett på effekten av intramuskulær injeksjon av IFN γ -plasmid på ekspresjonen av Mx-gener i fornyre, lever og pankreas. Kvantitativ RT-PCR viste at IFN γ -plasmid induserte ekspresjon av SsaMx1,2,3, SsaMx4 og SsaMx5 i fornyre, men det ble ikke observert noen signifikant oppregulering av SsaMx9. Intramuskulær injeksjon av IFN γ -plasmid viste ingen store forskjeller i ekspresjon av det antatt kjernelokaliserte SsaMx2 mellom lever og pankreas. Det ble derimot observert en større økning i relativ ekspresjon av både SsaMx1,2,3 og SsaMx2 i lever enn i pankreas etter injeksjon av IFN γ -plasmid. Resultater fra dette mastergradsarbeidet indikerer at SsaMx1, SsaMx2, SsaMx3, SsaMx4 og SsaMx5 er typiske IFN-induserte gener, mens SsaMx9 ikke er det. Dette kan tyde på at SsaMx9 har utviklet andre funksjoner enn antiviral aktivitet.

Forkortelser

| | | | |
|----------------------|---|---------------|--|
| cDNA | Komplementær DNA | L-15 | Leibovitz medium |
| CMS | Kardiomyopatisyndrom | LGP2 | Laboratory of Genetics and Physiology 2 |
| CpG | Cytosine-phosphate guanine | LRR | Leucinrik repeterende region |
| C _t | Thresholdsyklus | MD | Midtdomene |
| dH ₂ O | Destillert vann | MDA5 | Melanoma Differentiation-Associated protein 5 |
| dsRBD | Dobbeltrådig RNA-bindende domener | MOI | Multiplicity of infection |
| dsRNA | Dobbeltrådig RNA | MyD88 | Myeloid differentiation primary response protein 88 |
| EF1 α β | Elongeringsfaktor 1 α / β | NEAA | Ikke-essensielle aminosyrer |
| FBS | Føtalt bovint serum | NF κ B | Nuclear factor kappa B |
| gDNA | Genomisk DNA | NK-celler | Naturlige dreperceller |
| GED | GTPase effektor domene | PBS | Fosfatbufret saltvann |
| HE | Hemagglutinin-esterase | PD | Pankreassykdom |
| HSMB | Hjerte- og skjelettmuskelbetennelse | pDC | Plasmacytoide dendritiske celler |
| Hz | Hertz | PMV | Piscint myokardittvirus |
| IFN | Interferon | Poly I:C | Polyinosinic: polycytidylic acid |
| IFNR | Interferonreseptor | PRR | Pathogen recognition receptors |
| IHNV | Infeksiøs hematopoetisk nekrosevirus | PRV | Piscint orthoreovirus |
| ILA | Infeksiøs lakseanemi | RIG-I | Retionic acid-inducible gene I |
| ILAV | Infeksiøs lakseanemivirus | RLR | RIG-I-lignende reseptor |
| I.M. | Intramuskulært | RT | Revers transcriptase |
| IPN | Infeksiøs pankreas nekrose | RT-qPCR | Kvantitativ revers transcriptase polymerase chain reaction |
| IPNV | Infeksiøs pankreas nekrosevirus | SAV | Salmonid alphavirus |
| IPS-1 | IFN- β promoter stimulator 1 | SNP | Single nucleotide polymorphisms |
| IRAK | IL-1 Receptor-Associated Kinase | ssRNA | Enkeltrådig RNA |
| IRF | Interferon regularotory factor | TIR | TOLL-IL-1 reseptor |
| ISG | Interferonstimulerte gener | TLR | Toll-lignende reseptor |
| ISGF3 | Interferon stimulated gene factor 3 | TRAF6 | TNF (Tumor necrosis factor α) receptor associated factor 6 |
| ISRE | Interferon stimulated response elements | TRIF | TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- β |
| JAK-STAT | Janus kinase/signal transducers and activators of transcription | | |

Innholdsfortegnelse

| | | |
|-------|---|----|
| 1 | Innledning..... | 1 |
| 1.1 | Bakgrunn..... | 1 |
| 1.2 | Virussykdommer i lakseoppdrett..... | 1 |
| 1.3 | Infeksiøs lakseanemi (ILA) og ILA-virus (ILAV)..... | 3 |
| 1.4 | Iboende immunitet mot virus..... | 4 |
| 1.5 | Hvordan induserer virus IFN-I?..... | 4 |
| 1.5.1 | RLR..... | 4 |
| 1.5.2 | TLR..... | 5 |
| 1.6 | Interferoner..... | 7 |
| 1.6.1 | IFN-signalering – JAK-STAT-signalveien..... | 8 |
| 1.7 | Antivirale proteiner hos fisk..... | 9 |
| 1.8 | Mx-proteiner..... | 10 |
| 1.8.1 | Struktur..... | 11 |
| 1.8.2 | Mx-proteiner hos fisk..... | 12 |
| 1.8.3 | Tidligere studier av Mx-proteiner hos fisk..... | 13 |
| 1.9 | Problemstilling..... | 15 |
| 2 | Materialer og metoder..... | 16 |
| 2.1 | Celler..... | 16 |
| 2.2 | Virus..... | 16 |
| 2.3 | IFN og poly I:C..... | 16 |
| 2.4 | Stimulering av SSP-9 celler med IFN og poly I:C..... | 17 |
| 2.5 | Infeksjon av ASK-celler med ISAV4..... | 18 |
| 2.6 | Stimulering av erythrocytter med IFN og poly I:C..... | 18 |
| 2.6.1 | Forsøksfisk..... | 18 |
| 2.6.2 | Bloduttak..... | 18 |
| 2.6.3 | Isolering og stimulering av erythrocytter..... | 19 |
| 2.7 | Materiale fra tidligere forsøk..... | 20 |
| 2.7.1 | Forsøksfisk..... | 20 |
| 2.7.2 | Effekt av IFN α -plasmid på uttrykk av Mx-mRNA i lever, fornyre og pankreas..... | 20 |
| 2.7.3 | Analyser..... | 20 |
| 2.8 | Kvantitativ RT-PCR (RT-qPCR)..... | 21 |
| 2.8.1 | Primere..... | 24 |
| 2.8.2 | Isolering av RNA..... | 25 |
| 2.8.3 | cDNA-syntese..... | 26 |

| | | |
|-------|---|----|
| 2.8.4 | Kvantitativ RT-PCR (RT-qPCR) | 27 |
| 2.8.5 | Databehandling | 27 |
| 3 | Resultater | 29 |
| 3.1 | Effekt av IFN-I og poly I:C på ekspresjon av Mx-gener i SSP-9 celler | 29 |
| 3.2 | Ekspresjon av Mx-gener i ASK-celler etter infeksjon med ILAV | 33 |
| 3.3 | Ekspresjon av SsaMx1,2,3 i erytrocytter etter inkubasjon | 36 |
| 3.4 | Effekt av IFNc-plasmid på uttrykk av Mx-mRNA i fornyre, lever og pankreas | 38 |
| 4 | Diskusjon | 41 |
| 4.1 | Effekt av stimulering med IFN-I og poly I:C på ekspresjon av Mx-gener | 42 |
| 4.2 | Effekt av ILAV-infeksjon på ekspresjon av Mx-gener i ASK-celler | 44 |
| 4.3 | Ekspresjon av SsaMx1,2,3 i erytrocytter | 44 |
| 4.4 | Ekspresjon av SsaMx2, et mulig kjerne lokalisert Mx-protein | 46 |
| 4.5 | Har Mx-gener på kromosom 9 og 25 utviklet nye funksjoner? | 47 |
| 4.6 | Begrensninger i metodikken som er brukt | 47 |
| 4.7 | Hva bør gjøres videre? | 49 |
| 4.8 | Konklusjon | 50 |
| 5 | Referanser | 51 |
| | Appendix I - Reagenser | 59 |
| | Appendix II – RT-qPCR spesifikasjoner | 60 |
| | Appendix III – Løsninger til RT-qPCR | 62 |
| | Appendix IV – Basal genekspresjon | 63 |
| | Appendix V – Ekspresjon av Mx-gener i ulike celletyper og organer | 65 |

1 Innledning

1.1 Bakgrunn

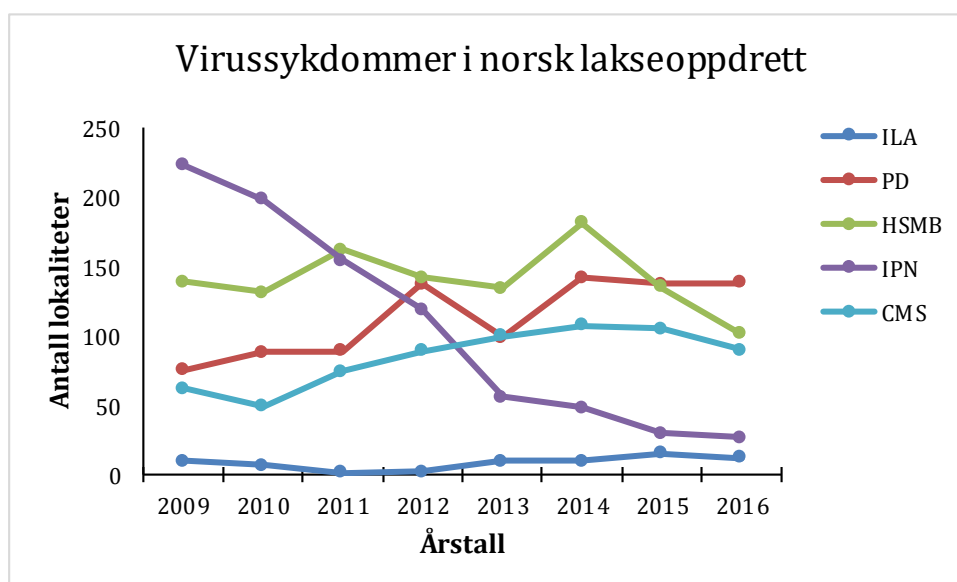
En av de største utfordringene oppdrettsnæringen står ovenfor er virussykdommer, og dette er et av problemene som må løses om næringen skal fortsette å øke sin produksjon på en bærekraftig måte (Hjeltnes, Bornø, Jansen, Haukaas & Walde, 2017). Virusinfeksjoner fører til tap i form av redusert tilvekst og dødelighet, og fører også til lidelse hos fisken. Infeksjonene vil også svekke immunforsvaret og føre til økt risiko for sekundærinfeksjoner, samt at de gir store tap for oppdretterne. Børre Robertsens forskningsgruppe studerer om interferon (IFN) kan bidra til å styrke laksens immunforsvar mot virusinfeksjoner. Ved en virusinfeksjon vil celler respondere ved å produsere og skille ut IFN. IFN stimulerer videre uinfiserte celler til å produsere antivirale proteiner, noe som gir beskyttelse mot virusinfeksjon (Samuel, 2001). I denne oppgaven vil antivirale proteiner være et sentralt tema. Oppgaven omhandler Mx-proteiner hos atlantisk laks (*Salmo salar* L.) og forskjeller i ekspresjon av de ulike Mx-genene man har identifisert.

1.2 Virussykdommer i lakseoppdrett

Figur 1 viser antall årlige utbrudd av de viktigste virussykdommene i norsk lakseoppdrett. Antall utbrudd av hjerte- og skjelettmuskelbetennelse (HSMB), kardiomyopatisyndrom (CMS) og pankreassykdom (PD) har vært høyt og stabilt de siste årene. Man har i de senere år hatt en jevn nedgang i antall tilfeller av infeksjøs pankreas nekrose (IPN), og man ser i dag få tilfeller av IPN. Infeksjøs lakseanemi (ILA) har relativt få utbrudd, men er svært kostnadskrevenende å bekjempe. Av de nevnte sykdommene er det PD og ILA som anses for å være de største virusutfordringene i norsk lakseoppdrett i dag (Hjeltnes et al., 2017). PD er den mest tapsbringende av disse to, noe som henger sammen med et høyt antall utbrudd. I 2016 ble det påvist PD ved så mange som 138 nye lokaliteter til tross for bruk av vaksiner (Hjeltnes et al., 2017). PD forårsakes av salmonid alphavirus (SAV) som er et enkelttrådig (ss) RNA-virus i familien *Totiviridae*. Dette viruset forårsaker høy dødelighet, i tillegg til at det gir redusert tilvekst og slaktekvalitet hos laks i sjøfasen (Karlsen et al., 2012). IPN forårsakes av et dobbeltrådig (ds) RNA-virus, i genus *Aquabirnaviridae* i familien *Birnaviridae*. IPN rammer gjerne tidlig i produksjonsfasen, og kan gi dødelighet hos fisk i settefiskfasen, men også etter smoltutsett i sjø (Roberts & Pearson, 2005). Som tidligere nevnt har det i de siste årene vært en

Innledning

kraftig nedgang i antall tilfeller av IPN. Nedgangen skyldes i hovedsak at avl av laks med økt resistens mot infeksjons pankreas nekrosevirus (IPNV) har vært en stor suksess, samt sanering av husstammer av IPNV og at man benytter vaksiner mot viruset (Hjeltnes et al., 2017). CMS forårsakes av et dsRNA-virus i familien *Totiviridae*, kalt piscint myokardittvirus (PMV). Det største problemet med CMS er at det gir hjertesvikt og dødelighet hos stor, slakteklar fisk. Dette gir store økonomiske tap for oppdretterne (Haugland et al., 2011). HSMB forårsakes av piscint orthoreovirus (PRV), som er et dsRNA-virus i familien *Reoviridae*. Dette viruset angriper hjerte- og skjelettmuskulatur, og kan gi høy dødelighet hos fisk 5-9 måneder etter utsett (Wessel, Moræus Olsen, Rimstad & Krudtaa Dahle, 2015).



Figur 1. Viktige virussykdommer i norsk lakseoppdrett (2009-2016). Figuren viser antall nye lokaliteter med utbrudd av hver sykdom per år i perioden 2009-2016. Infeksiøs lakseanemi (ILA), pankreassykdom (PD), hjerte- og skjelettmuskelbetennelse (HSMB), infeksjons pankreas nekrose (IPN) og kardiomyopati syndrom (CMS). Figuren er basert på tall fra (Hjeltnes, Bornø, Jansen, Haukaas & Walde, 2017).

På 90-tallet ble lakseoppdrettsnæringen revolusjonert ved hjelp av effektive bakterievaksiner, noe som løste mange av datidens store sykdomsproblemer. I dag er vaksinene mot bakteriesykdommer så effektive at bakterieinfeksjoner ikke anses som noe problem i næringen med unntak av vintersår og yersiniose (Hjeltnes et al., 2017). Derimot har det vist seg svært vanskelig å utvikle effektive vaksiner mot virussykdommer. Dette er en av årsakene til at virussykdommer fremdeles er et stort problem i norsk lakseoppdrett i dag (Kibenge, Godoy, Fast, Workenhe & Kibenge, 2012).

Innledning

For å hindre spredning av virussykdommer innen norsk fiskeoppdrett er det utviklet en rekke tiltak fra myndighetenes side. Disse tiltakene er nedfelt i forskrifter, og inkluderer forebygging, begrensning og bekjempelse av smittsomme sykdommer. Tiltak som generasjonsskille, soneinndelinger, utslakting og brakklegging har vist seg å være effektive for å hindre sykdomsspredning. Rengjøring og desinfeksjon av utstyr er også viktig for å hindre overføring av infeksjøs mikrober, og kan dermed bidra til å hindre smitteoverføring til nye lokaliteter. Et annet eksempel på et viktig tiltak er pålagt helsekontroll ved forhøyet dødelighet eller mistanke om listeførte sykdommer. Dette gjør at sykdommer kan påvises raskt, og dermed bekjempes på et tidlig stadium, før de får spredd seg (FKD, 2008a; FKD, 2008b).

1.3 Infeksiøs lakseanemi (ILA) og ILA-virus (ILAV)

ILA er en systemisk sykdom som rammer laksefisk og karakteriseres av kraftig anemi, blødninger og nekroser i flere organer. Sykdommen kan utvikle seg over lang tid med lav mortalitet og uten kliniske tegn i flere måneder, før man kan få et kraftig utbrudd med høy dødelighet (Rimstad, Dale, Dannevig & Falk, 2011).

ILAV er et virus som hører hjemme i familien *Orthomyxoviridae*, og er et enkelttrådig RNA (ssRNA) virus. Influenzavirus tilhører samme familie som ILAV. Virus i denne familien er kappekledd og kjennetegnes ved at genomet har 8 ssRNA-segenter. På overflaten av ILAV finner man glykoproteinet hemagglutinin-esterase (HE) som har en viktig funksjon i gjenkjenning, binding og frigjøring av virus fra cellene. Undersøkelser har vist at ulike isolater av ILAV kan ha ulik virulens, og at forskjellen i virulens blant annet er assosiert med sekvensforandringer i hemagglutinin-esterase (Mjaaland et al., 2005). Det er antatt at den såkalte HPR0-typen av ILAV er utbredt, men avirulent, da den er vist å replikere i gjellene, men uten å gi klinisk sykdom. Virulente virus kan oppstå ved at HPR0-typen kan få en delesjonsmutasjon i hypervariabel region, noe som fører til en økning i virulens (Aamelfot, Dale & Falk, 2014). I denne oppgaven har jeg gjort studier av hvordan infeksjon med ILAV påvirker ekspresjon av Mx-gener i lakseceller.

1.4 Iboende immunitet mot virus

Den iboende immuniteten, eller det medfødte immunforsvaret, er den første forsvarsbarrieren mot infeksjoner hos dyr. Immunresponsene i det medfødte immunforsvaret er raske, men har ikke hukommelse og har kort varighet. (Abbas, Lichtman & Pillai, 2012). Det medfødte immunforsvaret består av en rekke spesialiserte celler og ulike molekyler, slik som fagocytter, dendritiske celler, epitelbarrierer, komplementproteiner, cytokiner og naturlige dreperceller (NK-celler). Det medfødte immunforsvaret mot virus består i hovedsak av interferonsystemet og NK-celler. Ved en infeksjon med et virus vil det medfødte immunsystemet reagere ved å produsere interferon type I (IFN-I), som fungerer ved å hemme virusets replikasjon i vertscellen. NK-celler vil også aktiveres, og disse vil drepe virusinfiserte celler. (Abbas et al., 2012).

1.5 Hvordan induserer virus IFN-I?

Celler hos vertebrater har reseptorer for nukleinsyrer hos virus. Disse omfatter RIG-I-lignende reseptorer (RLR) i cytoplasma og toll-lignende reseptorer (TLR) som er forankret i membranen på celleoverflaten eller inne i endosomer (Zou & Secombes, 2011; Zhu, Nie, Zhu, Xiang & Shao, 2013). Når RLR eller TLR gjenkjenner nukleinsyrer fra virus induseres syntese av IFN-I, som skilles ut og gir økt ekspresjon av antivirale proteiner i andre celler (Akira, Uematsu & Takeuchi, 2006). IFN-I stimulerte celler blir beskyttet mot virusinfeksjon ved at de antivirale proteinene hemmer forskjellige stadier i replikasjon av virus.

1.5.1 RLR

Studier på mus har vist at RLRer er essensielle for å gjenkjenne virusinfeksjoner i de fleste celletyper unntatt plasmacytoide dendritiske celler (pDC), som benytter TLR (Kato et al., 2005). RLR-familien består av RIG-I, MDA5 og LGP2. RIG-I og MDA5 binder dsRNA fra virus, i tillegg til polyinosinic polycytidylic acid (poly I:C), som er et syntetisk dsRNA som induserer IFN-I (Matsumiya & Stafforini, 2010). RIG-I binder i tillegg til dsRNA fra virus også viralt ssRNA.

RIG-I og MDA5 inneholder to N-terminal caspase aktiverings- og rekrutteringsdomener (CARD) som er nødvendige for proteinenes signalaktivitet (Yoneyama & Fujita, 2009). I tillegg inneholder de et internt DExD/H-boks helikase domene, som er ansvarlig for binding av viralt RNA (Kumar, Kawai & Akira, 2011). Når RIG-I og MDA5 bindes til viralt RNA vil de

Innledning

interagere med IFN- β promoter stimulator 1 (IPS-1) gjennom CARD-CARD interaksjoner (Fig. 2) (Kumar et al., 2006). Dette fører til aktivering av interferon regulatory transcription factor (IRF) 3 og IRF7 samt nuclear factor kappa B (NF κ B) (Yoneyama et al., 2004). NF κ B og fosforylerte homo/heterodimere av IRF3/7 vandrer inn i kjernen, binder seg til promotoren hos IFN-I gener og aktiverer dermed transkripsjonen av genene (Kumar et al., 2011).

1.5.2 TLR

TLR uttrykkes i hovedsak hos antigenpresenterende celler slik som dendritiske celler og makrofager, men de uttrykkes også i B-celler og enkelte typer T-celler (Takano et al., 2010).

TLR er type-1 transmembranglykoproteiner, og består blant annet av en extracellulær N-terminal med en leucinrik repeterende region (LRR) (Rebl, Goldammer & Seyfert, 2010). Det er denne N-terminale delen som er ansvarlig for gjenkjenning av spesifikke ligander fra mikrober (Takano et al., 2010). I tillegg har TLR et transmembrandomene og et intracellulært C-terminalt TOLL-IL-1 reseptor (TIR)-domene. Disse domeneene er ansvarlige for henholdsvis forankring i membranen, og signaltransduksjon (Zhu et al., 2013).

Det er det i dag identifisert 23 ulike TLR hos vertebrater, 11 hos pattedyr og 17 hos beinfisk. Signalveiene for TLR hos fisk og pattedyr har store likheter (Rebl et al., 2010).

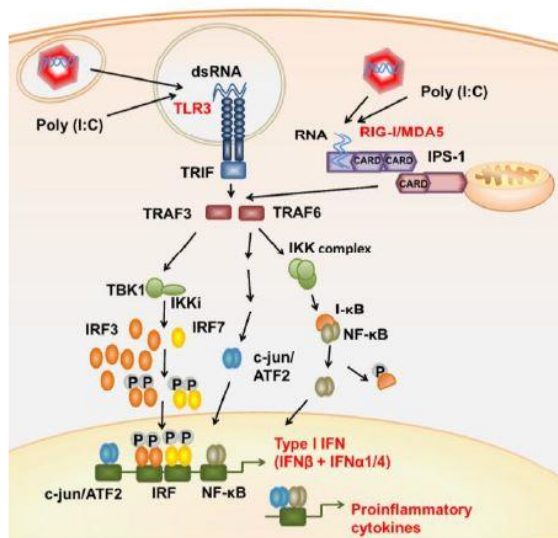
Seks TLR er involvert i gjenkjenning av viralt RNA og induksjon av IFN-I: TLR2, TLR3, TLR7, TLR8, TLR9 som finnes både hos pattedyr og fisk, samt TLR22 som bare finnes hos fisk. TLR3 og TLR22 gjenkjenner dsRNA, og dermed også poly I:C. TLR3 uttrykkes hos dendritiske celler og epitelceller hos pattedyr (Alexopoulou, Holt, Medzhitov & Flavell, 2001). TLR7 og TLR8 er homologe og gjenkjenner ssRNA (Agrawal & Kandimall, 2007). Disse reseptorene er lokalisert i endosomale membraner, og vil dermed for eksempel kunne gjenkjenne ssRNA fra virus som tas opp av fagocytter (Akira et al., 2006). TLR9 gjenkjenner cytosine-phosphate guanine (CpG) rike sekvenser i genomet hos DNA-virus og bakterier (Rebl et al., 2010). TLR2 gjenkjenner virale glykoproteiner, men ikke nukleinsyrer og uttrykkes særlig på overflaten av immunceller (Mogensen, 2009). TLR22 kan i likhet med TLR3, gjenkjenne syntetisk dsRNA i form av poly I:C (Matsuo et al., 2008). Hos fugu (*Takifugu rubripes*) har man vist at TLR22 sitter i plasmamembranen, og kan gjenkjenne extracellulært dsRNA. Ved å stimulere celler som uttrykker TLR22 med poly I:C, har man vist at dsRNA fører til induksjon av IFN-I (Matsuo et al., 2008).

Innledning

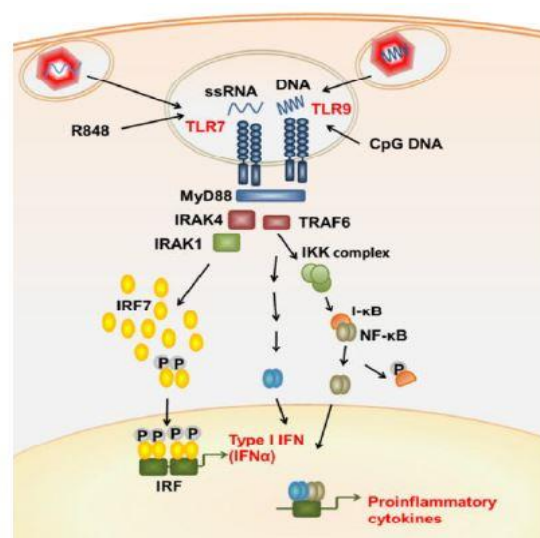
TLR3 og TLR22 vil etter binding til viralt dsRNA assosiere med adaptorproteinet TRIF, som videre fører til rekruttering av TRAF6 og RIP-1 (Yamamoto et al., 2003). Dette vil føre til aktivering av NF- κ B, IRF3 og IRF7, og påfølgende induksjon av IFN-I (Fig.2).

Til forskjell fra TLR3 og TLR22 skjer aktiveringen hos TLR2, TLR7, TLR8 og TLR9 via en Myd88-avhengig signalvei (Akira et al., 2006; Barbalat, Lau, Locksley & Barton, 2009). Ved binding av viralt ssRNA til TLR7, vil Myd88 danne et kompleks med proteiner i IRAK-kinase familien. Dette fører til fosforylering av IRF7 som så translokerer inn i kjernen og binder til promoterne for IFN-I, og aktiverer transkripsjonen av IFN-I (Fig 2.).

A



B



Figur 2. Signaltransduksjon via RLR og TLR. Figuren viser en oversikt over IPS-avhengig signalvei (A), TRIF-avhengig signalvei (A) og MyD88-avhengig signalvei (B). RIG-I og MDA5 uttrykkes i cytoplasma, mens TLR3 finnes i transmembranen til endosomer. Binding av substrat til RIG-I og MDA5 fører til produksjon av IFN-I via den IPS-avhengige signalveien, mens substratbinding til TLR3 (og TLR22) gir induksjon av IFN-I via en TRIF-avhengig-signalvei. Binding av substrat til TLR7 og TLR9 (og TLR2 og TLR8) fører til økt produksjon av IFN-I via den MyD88-avhengige-signalveien. Figuren er lånt av Tina Svingerud (Svingerud, 2013).

1.6 Interferoner

Interferoner er en gruppe cytokiner som er sentrale i førstelinjeforsvaret mot virusinfeksjoner. IFN er involvert i aktivering av immunceller og oppregulering av antigenpresentering til T-celler, i tillegg til at de gir signaler til uinfiserte celler om at de må forberede seg på en infeksjon (Pestka, Krause & Walter, 2004). Som tidligere beskrevet vil binding av viralt RNA til reseptorer som TLR og RLR, føre til økt transkripsjon og produksjon av IFN. IFN vil så skilles ut i blodbanen, og binde til interferonreseptorer (IFNR) på overflaten av celler, noe som fører til produksjon av antivirale proteiner i uinfiserte celler (Samuel, 2001). Bindingen av IFN til IFNR fører til en signaltransduksjon som gir økt transkripsjon av flere hundre interferonstimulerte gener (ISG), og disse koder blant annet for antivirale proteiner som inhiberer replikasjon og spredning av virus (Haller, Kochs & Weber, 2006).

IFN kan deles inn i type I (IFN-I), type II (IFN-II) og type III (IFN-III), definert på grunnlag av sekvenslikhet, hvilke reseptorkomplekser som benyttes, samt proteinenes biologiske aktivitet (Chelbi-Alix & Wietzerbin, 2007). Hos pattedyr består IFN-I av IFN α , IFN β , IFN ω , IFN κ og IFN ϵ , og av disse er IFN α og IFN β de dominerende interferonene i førstelinjeforsvaret mot virus (Pestka et al., 2004). Hos pattedyr består IFN-I av et enkelt exon, IFN-II av fire exoner og et intron, mens IFN-III har fem exoner og fire introner. De ulike typene IFN benytter ulike reseptorkomplekser, bestående av IFNAR1/IFNAR2, IFNGR1/IFNGR2 og IFNLR1/IL-10R2, for henholdsvis IFN-I, IFN-II og IFN-III (Pestka et al., 2004). Viktigheten av IFN er vist ved hjelp av «knockout»-mus, der man ved å fjerne reseptorkomplekset for IFN-I (IFNAR1/IFNAR2), så at musene raskt døde av virusinfeksjoner. Dette til tross for at musene hadde et fungerende adaptivt immunforsvar (Haller et al., 2006).

IFN-I hos fisk skiller seg fra IFN-I hos pattedyr, blant annet ved at genene for IFN-I hos fisk har fire introner og at de har liten sekvenslikhet med IFN-I hos pattedyr. IFN-I hos fisk består forøvrig av minst seks subtyper (IFNa, IFNb, IFNc, IFNd, IFNe og IFNf) (Sun et al., 2011; Zou & Secombes, 2011). Mens IFN-I hos pattedyr kun benytter én reseptor, benytter zebrafisk minst to ulike IFNR (Aggad et al., 2009). Man har dessuten vist at atlantisk laks muligens har flere ulike IFNR enn zebrafisk (Sun, Greiner-Tollersrud, Koop & Robertsen, 2014).

Innledning

IFN-II er identisk med IFN γ , og spiller hovedsakelig en rolle i den adaptive immunresponsen, der den produseres av T-celler. IFN-II produseres også i den medfødte immunresponsen, og da hovedsakelig av NK-celler. Dette i motsetning til IFN-I som produseres av de fleste celletyper (Sun et al., 2011). Man har karakterisert IFN γ i laks, i tillegg til flere andre fiskearter, og vist at det har lik exon/intron struktur som hos pattedyr. Man har også vist at IFN γ har antiviral effekt mot akvatiske virus (Sun et al., 2011).

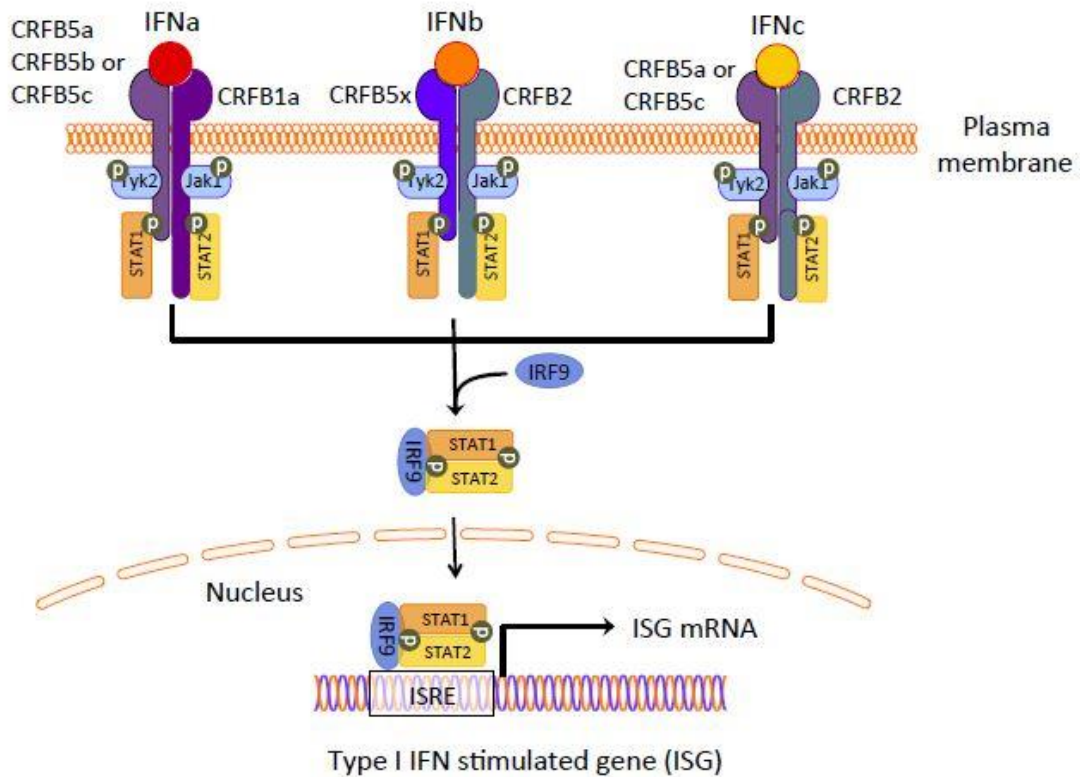
IFN-III er viktig i det medfødte forsvaret mot virus hos pattedyr, men er til dags dato ikke funnet hos fisk. Subtyper som man finner hos pattedyr er IFN λ 1, IFN λ 2 og IFN λ 3 (Sommereyns, Paul & Staehli, 2008).

1.6.1 IFN-signalering – JAK-STAT-signalveien

Reseptorkomplekset for IFN-I, bestående av IFNAR1 og IFNAR2, er uttrykt på de fleste celletyper hos pattedyr (de Weerd & Nguyen, 2012). Dette gir IFN-I mulighet til å alarmere mange celletyper ved en infeksjon, slik at de kan forberede en antiviral respons. Når IFN binder til IFNR på overflaten av en cellemembran aktiverer dette JAK-STAT-signalveien. Ved binding av IFN til IFNR vil kinasene Tyk-2 og Jak-1 aktiveres, og fosforylere transkripsjonsfaktorene STAT1 og STAT2. STAT1 og STAT2 danner så en dimer, før de interagerer med IRF9, og danner transkripsjonsfaktorkomplekset interferon stimulated gene factor 3 (ISGF3). ISGF3 translokeres inn i kjernen, hvor det binder til interferon stimulated response elements (ISRE) i promoterne til ISG. Dette fører til initiering av transkripsjonen av antivirale gener. En oversikt over mulige IFN-reseptorer og JAK-STAT-signalvei hos laks er vist i Figur 3. Det er verdt å merke seg at IFN-I hos fisk og pattedyr ikke er ortologer, og at de har utviklet seg forskjellig (Robertsen, 2006). Det er likevel antatt at de fører til induksjon av antivirale gener gjennom den samme JAK-STAT-signalveien, da STAT1, STAT2, Jak1, Tyk2 og IRF9 er identifisert i fisk (Robertsen, 2017). Det er i tillegg vist at ISRE finnes i blant annet Mx-gen hos regnbueørret (Collet & Secombes, 2001).

I dette arbeidet er effekten av IFN-I i laks på ulike Mx-gener studert.

Innledning



Figur 3. Hypotetisk modell for IFN-reseptorer i JAK-STAT signalveien hos atlantisk laks. Figuren er hentet fra Robertsen, 2017.

1.7 Antivirale proteiner hos fisk

I pattedyr har man identifisert mer enn 500 ISG (Shoggins & Rice, 2011), mens man i et nyere forsøk har vist at man i TO-celler får en oppregulering av 2156 gener ved stimulering med IFN α fra laks (Xu, Evensen & Munang'andu, 2015). Selv om man har identifisert såpass mange ISG er antiviral aktivitet kun påvist hos et liten andel av disse (Shoggins & Rice, 2011). For de fleste antivirale ISG som er identifisert hos pattedyr har man funnet homologer hos fisk, og det er antatt at disse har tilsvarende antivirale funksjoner (Verrier, Langevin, Benmansour & Boudinot, 2011).

Mx-proteiner, IFIT-proteiner, ISG15, PKR, PKZ er blant proteinene som er vist å ha antiviral effekt hos fisk (Robertsen, 2017). IFN induced proteins with tetratricopeptide repeats (IFIT) er uttrykt i cytoplasma, og induseres raskt under virusinfeksjoner. I forsvaret mot virusinfeksjoner virker IFIT ved at de binder virale proteiner og viralt RNA, og de kan også nedregulere initiering av translasjonen. De kan i tillegg hindre virusreplikasjon ved å binde til mRNA som mangler eller bare delvis har fått cap-struktur (Diamond & Farzan, 2013). Hos TO-celler fra

Innledning

atlantisk laks har man vist at man får en oppregulering av IFIT5 (ISG58) ved stimulering med IFN α , IFN β og IFN γ (Svingerud et al., 2012). Det samme ser man i fornyre hos atlantisk laks etter injeksjon med IFN γ -plasmid (Chang, Robertsen, Sun & Robertsen, 2014).

ISG15 er et protein som konjugerer cellulære og virale proteiner, og hos pattedyr induseres det ved stimulering med IFN-I (Dao & Zhang, 2005). Det er tidligere vist at transkripsjon av ISG15 hos atlantisk laks induseres av dsRNA, og også av ILAV og IPNV (Røkenes, Larsen & Robertsen, 2007).

PKR (dobbeltrådig RNA-avhengig protein kinase R) er et antiviralt protein som oppreguleres av IFN α , IFN β og IFN γ hos atlantisk laks (Svingerud et al., 2012). Hos pattedyr er PKR et av de viktigste antivirale proteinene som oppreguleres av IFN-I (Sadler & Williams, 2008). I PKR finner man to regulerende dsRNA-bindende domener (dsRBD), og et kinase domene. Ved binding av dsRNA til PKR får man fosforylering og aktivering av elongeringsfaktor eIF-2 α , noe som fører til hemming av proteinsyntese og virusreplikasjon (Clemens, 2005). Mens pattedyr har to dsRBD-motiver har man hos flere fiskearter, inkludert atlantisk laks, identifisert tre dsRBD-motiver (Rothenburg, Deigendesch, Dey, Dever & Tazi, 2008).

PKZ er et protein som ligner på PKR, men inneholder to Z-DNA-bindende(Z α) domener i stedet for dsRBD (Rothenburg et al., 2005). I likhet med PKR har man vist at PKZ kan fosforylere eIF-2 α , og dermed også inhibere proteinsyntesen og virusreplikasjon (Bergan, Jagus, Lauksund, Kileng & Robertsen, 2008).

I dette arbeidet har Mx-proteiner blitt studert, og disse vil bli nærmere beskrevet i neste kapittel.

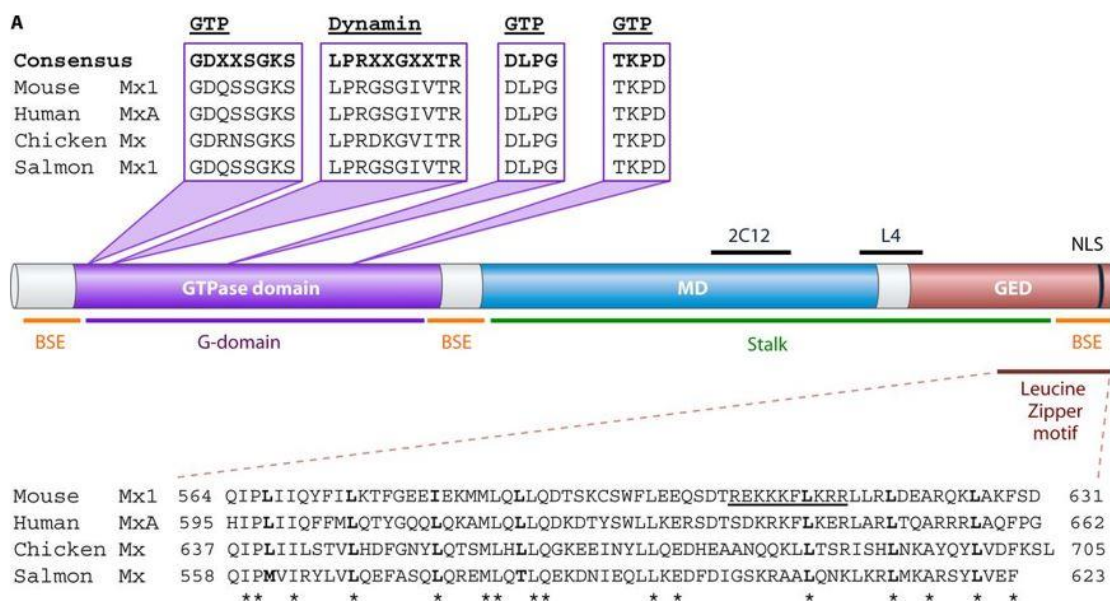
1.8 Mx-proteiner

Mx-proteinene er antivirale proteiner som relativt spesifikt induseres av IFN-I. Mx-proteinene er GTPaser som finnes hos de fleste vertebrater inkludert fisk (Verhelst, Hulpiau & Saelens, 2013). Unntaket er fisk i torskefamilien som mangler Mx-gener (Solbakken, Rise, Jakobsen & Jentoft, 2016). Mx-proteiner ble først identifisert som antivirale proteiner da man oppdaget at de var assosiert med resistens mot influensavirus hos en innavlet laboratoriestamme av mus (Lindenmann, 1962; Lindenmann, Lane & Hobson, 1963). Resistensen mot influensavirus ble nedarvet som et dominant autosomalt trekk, og var kun avhengig av ett enkelt gen, nemlig Mx1 (Staehli, Haller, Boll, Lindenmann & Weissmann, 1986). Senere er det vist at MxA fra menneske har antiviral aktivitet mot en rekke ulike RNA-virus (Haller & Kochs, 2011). Hos

laks er det kjent at Mx-proteiner hemmer replikasjon av IPN-virus (Larsen, Røkenes & Robertsen, 2004).

1.8.1 Struktur

Mx-proteinene er medlemmer av familien av store GTPaser sammen med blant annet dynaminer. Mx-proteinene har et stort N-terminal GTPase-domene, et midtdomene (MD) og et C-terminal GTPase effektordomene (GED) (Fig. 4). GTPase-domenet består av et tredelt GTP-bindende motiv og en dynamin-signatur. GTP-regionen hos Mx proteiner er svært konservert hos vertebrater mens den C-terminale delen varierer i sekvens. Den antivirale effekten til Mx-proteinene er avhengig av MD og GED (Verhelst et al., 2013). MD er viktig med hensyn til oligomerisering og gjenkjenning av målstrukturer i viruset. GED har funksjon som et intramolekylært GTP-aktiverende domene. Dette skjer ved at C-terminal leucin zipper motivet i GED foldes tilbake til det N-terminale GTP-bindende domenet. Dette fører til dannelsen av et enzymatisk aktivt senter i Mx-proteinet. Viktigheten av GED er vist ved at mutanter som mangler dette domenet, heller ikke har noen detekterbar GTPase-aktivitet (Schwemmle, Richter, Nassar & Staehli, 1995). Den antivirale aktiviteten til MxA hos menneske er vist å være avhengig av både oligomerisering og GTPase-aktivitet (Verhelst et al., 2013). Hos mennesker og mus finner vi to ulike Mx-proteiner, hvorav det ene er cytoplasmisk, mens det andre er lokalisert til kjernen (Haller, Stertz & Kochs, 2007).



Figur 4. Illustrasjon av strukturen til Mx-proteiner. Domenene i primærsekvensen inkluderer N-terminal GTPase-domene, et midtdomene (MD) og et C-terminal GTPase effektordomene (GED). Figuren er hentet fra Verhelst, Hulpiau & Saelens, 2013.

1.8.2 Mx-proteiner hos fisk

Staehele et al. identifiserte på 80-tallet et Mx-gen hos abbor, som hadde høy sekvenslikhet med Mx-gen fra mus, samt identiske exonlengder og lignende induksjon av dsRNA *in vivo*. De identifiserte i tillegg et Mx-gen hos regnbueørret ved hjelp av en Mx-probe fra abbor (Staehele, Yu, Grob & Haller, 1989). Dette genet (RBTMx1) ble senere karakterisert, og to andre Mx-gener (RBTMx2 og RBTMx3) hos regnbueørret ble klonet (Trobridge & C. Leong, 1995; Trobridge, Ciou & C. Leong, 1997). Det ble da vist at disse Mx-proteinene hadde en sekvenslikhet på omtrent 50 % med tidligere kjente Mx-proteiner. De hadde også GED og leucine zipper motivet, som kjennetegner Mx-familien. Mens RBTMx1 og RBTMx3 ble vist å ha en cytoplasmatisk lokalisering, ble RBTMx2 vist å ha en nukleær lokalisering (Trobridge et al., 1997).

Hos atlantisk laks ble det først identifisert tre Mx-gener kalt AsMx1, AsMx2 og AsMx3 (Robertsen, Trobridge & Leong, 1997). Men etter sekvenseringen av laksegenomet har man nå kommet fram til at det er 9 ulike Mx-gener, navngitt SsaMx1-SsaMx9 (B. Robertsen, personlig kommunikasjon). Vi finner SsaMx1-SsaMx3 på kromosom 12, SsaMx4-SsaMx8 på kromosom 25, og SsaMx9 på kromosom 9 hos atlantisk laks (B. Robertsen, personlig kommunikasjon). AsMx1 og AsMx2 er alleler av SsaMx1 genet mens SsaMx3 tilsvarende AsMx3. Figur 5 viser sammenligning av sekvensene for Mx-proteinene som kodes av disse genene. Den viser at N-terminal halvpart er sterkt konserverert mens det er store forskjeller i C-terminal halvpart. Som tidligere beskrevet, har SsaMx1 og SsaMx3 svært like sekvenser (Robertsen et al., 1997). SsaMx2 er også svært lik SsaMx1 og SsaMx3 i sekvens, men det som skiller SsaMx2 fra de andre Mx-proteinene hos laks, er at det har en antatt kjernelokaliseringssekvens RKRKR (aminosyre nr. 506-510) samt et insert på 16 aminosyrer (nr. 518-533). SsaMx2 har dermed stor likhet med RBTMx2 hos regnbueørret (Trobridge et al., 1997). Hos andre arter er det vist at de antivirale egenskapene til Mx-proteinene reflekterer deres subcellulære lokalisering (Haller et al., 2007). Det vil dermed være naturlig å anta at SsaMx2 har antiviral effekt mot virus som replikerer i kjernen. Eksempler på slike virus er orthomyxovirus, slik som ILAV.

SsaMx1, 2 og 3 har bare 44-50 % likhet i aminosyresekvens sammenlignet med SsaMx4-SsaMx9 mens SsaMx9 har 45-52 % sekvenslikhet med de andre Mx-proteinene hos laks (Robertsen, pers. komm.).

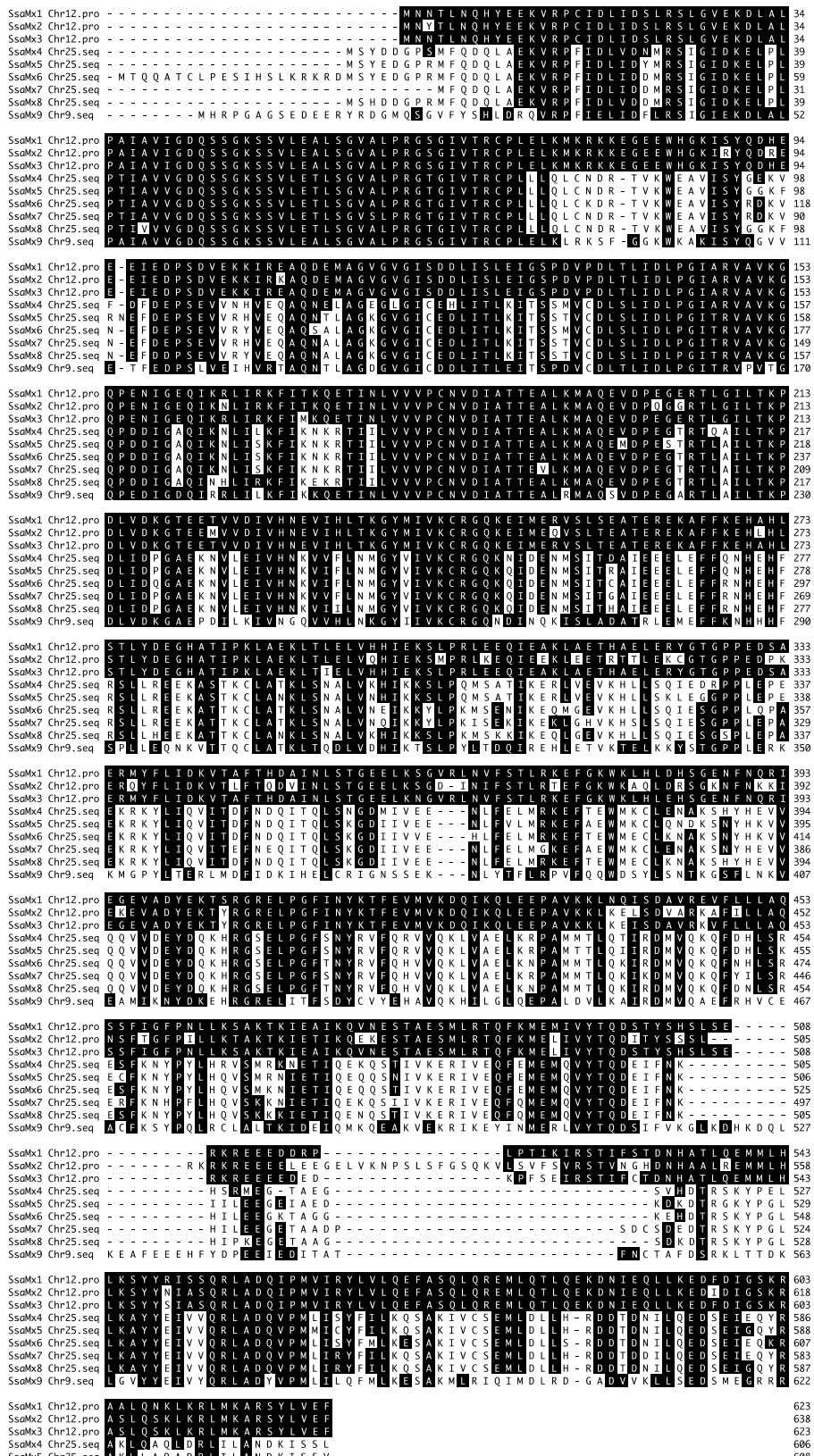
1.8.3 Tidligere studier av Mx-proteiner hos fisk

Det har blitt gjort flere studier hvor man har sett på effekten av IFN-I og Mx ved smitte med ILAV. Stimulering av TO- og SHK1-celler med IFN α 1 ga sterk induksjon av Mx, men ga ikke beskyttelse mot ILAV-indusert CPE (Jensen & Robertsen, 2002; Kileng, Brundtland & Robertsen, 2007). Infeksjon av TO-celler med ILAV har vist at viruset gir en induksjon av Mx-gener (SsaMx1,2,3), men at Mx ikke gir noen god beskyttelse mot viruset, og man får høy celledød (Kileng et al., 2007). Det samme ble observert *in vivo* der smitteforsøk med ILAV ga økt ekspresjon av Mx i fornyre og lever, men høy mortalitet hos den smittede laksen (Kileng et al., 2007). Det er senere vist at IFN α 1 gir en beskyttelse mot ILAV, men at denne beskyttelsen er forbigående, og at den antivirale effekten er sterkest 24-72 timer etter infeksjon (Svingerud, Holand & Robertsen, 2013).

Man har hos regnbueørret sett at Mx1, Mx2 og Mx3 uttrykkes ulikt i forskjellige vev. Mx3 ble høyest uttrykt i muskel, mens ekspresjon av Mx1 og Mx2 hovedsakelig ble observert i fornyre og milt. Dette kan tyde på at uttrykk av de forskjellige isoformene reguleres på ulike måter. (Tafalla, Chico, Pérez, Coll & Estepa, 2007). Man har også sett forskjeller i ekspresjon av fire ulike Mx-proteiner (AaMxA, AaMxB, AaMxC og AaMxD) hos europeisk ål (*Anguilla anguilla*). Ved stimulering med poly I:C ble kun AaMxC induisert ved lav konsentrasjon av poly I:C (0,5 μ g/ml). De andre Mx-proteinene ble induisert ved høyere poly I:C-konsentrasjoner, men AaMxC ble høyest uttrykt også ved høy konsentrasjon (Huang, Huang & Nie, 2013).

Tidligere studier gjennomført av Børre Robertsens forskningsgruppe har også vist økning av Mx-mRNA (SsaMx1,2,3) i lever, hjerte, fornyre, og flere andre organer etter intramuskulær (i.m) injeksjon av IFN γ -plasmid (Chang et al., 2014). Det ville dermed være interessant å se om injeksjon av IFN γ -plasmid ville føre til induksjon av de øvrige Mx-genene også. En økning i ekspresjon av ISG som følge av injeksjon av IFN, skjer ved at IFN induserer transkripsjon av f.eks Mx-proteiner. For at IFN skal indusere transkripsjonen av gener er det viktig at de har ISRE i promoteren sin som transkripsjonsfaktorkomplekset ISGF3 kan binde til (Robertsen, 2006). Man har identifisert flere Mx-gener hos zebrafisk, men ikke alle av disse har ISRE (Li, Zhang, Sun, Wang & Wang, 2009). Mangel på ISRE kan bety at enkelte Mx-gener kan ha utviklet seg til å ha andre funksjoner enn antiviral aktivitet.

Innledning



Figur 5. Alignments av de ulike Mx-genene hos Atlantisk laks. Figuren er lånt av Børre

Robertsen.

1.9 Problemstilling

Hovedmål

Målet med dette arbeidet var å finne ut om de ulike Mx-genene hos laks var typiske IFN-induserte gener ved å studere om de ble oppregulert ved stimulering av lakseceller med IFNa, IFNc eller poly I:C, ved å infisere celler med virus, og *in vivo* ved injeksjon av IFNc plasmid i muskel hos presmolt av laks.

Delmål 1

Undersøke om behandling med IFNa, IFNc og poly I:C i SSP-9 celler fører til forskjeller i ekspresjon av de ulike Mx-genene 24 og 48 timer etter stimulering.

Delmål 2

Undersøke om de forskjellige Mx-genene induseres ulikt ved ILAV-smitte av ASK-celler.

Delmål 3

Undersøke Mx-ekspresjon i erytrocytter ved behandling med poly I:C og IFNa.

Delmål 4

Undersøke om injeksjon av IFNc-plasmid i muskel hos presmolt fører til induksjon av de ulike Mx-genene i fornyre, lever og pankreas.

2 Materialer og metoder

2.1 Celler

Celleforsøkene ble utført med SSP-9 celler og ASK-celler. SSP-9 celler stammer fra fornyre hos atlantisk laks og var gitt til forskningsgruppen av Dr. S.Perez-Prieto (Centro de Investigaciones Biológicas, CSIC, C/Ramiro de Maeztu 9, 28040, Madrid, Spain), og er beskrevet av Rodriguez Saint-Jean et al. (2014). ASK-celler stammer fra fornyre hos laks og ble kjøpt fra ATCC (American Type Culture Collection) (Devold, Krossøy, Aspehaug & Nylund, 2000). ASK-cellene ble dyrket med L-15 (Leibovitz medium) tilsatt 1 % streptomycin/penicillin, 1 % ikke-essensielle aminosyrer (NEAA) og 8 % føtalt bovint serum (FBS). Mediet ble i tillegg tilsatt 50 mg/ml gentamicin.

Celletall ble bestemt ved hjelp av en Nucleocounter® YC-100 (Chemotec). Nucleocounteren bestemmer total cellekonsentrasjon basert på mengde DNA ved deteksjon av signaler fra propidiumiodid som er bundet til DNA (Chemometec, 2014). 100 µl cellesuspensjon ble overført til to rør merket A og B. I rør A blir levende og døde celler telt, og her ble 100 µl av reagens A og B blandet inn før telling. I rør B blir døde celler telt, og her tilsettes ingen reagenser. Siden man i rør A tilsetter 100 µl av reagens A og B, må den målte konsentrasjonen av celler i dette røret multipliseres med tre for å få den reelle konsentrasjonen. Ved å trekke konsentrasjonen av døde celler i rør B fra konsentrasjonen levende og døde i rør A, sitter man igjen med totalkonsentrasjonen av levende celler i cellesuspensjonen.

2.2 Virus

Virusisolatet benyttet i smitteforsøk stammer fra det Norske Veterinærinstituttet i Oslo, og er et ISAV 4 (Glesvær/2/90)-isolat, som stammer fra ILA-utbrudd i Norge. Dette er et høyvirulent ILAV-isolat (Mjaaland et al., 2005). Viruset ble dyrket i ASK-celler av Chia-Jung Chang som tidligere beskrevet (Svingerud et al., 2013). Virustiter ble kalkulert ved hjelp av TCID₅₀-metoden (Reed, 1938), og var på 3.1×10^7 per ml.

2.3 IFN og poly I:C

Poly I:C (polyinosinic polycytidylic acid) var kjøpt fra GE Healthcare. Rekombinant IFN α og IFN γ fra laks ble produsert i HEK293 celler av Linn-Greiner Tollersrud som beskrevet tidligere (Svingerud et al., 2012).

2.4 Stimulering av SSP-9 celler med IFN og poly I:C

1 ml L-15 medium med 150.000 SSP-9 celler ble sådd ut i 24-brønnersbrett (Nunclon™ Delta Surface, Thermo Scientific), og cellene ble inkubert ved 15 °C. Cellene ble så stimulert med poly I:C, IFN α eller IFN γ i triplikater for høsting etter 24 og 48 timer. Det var i tillegg tre kontrollbrønner med ustimulerte celler ved hvert tidspunkt. Disse var kun tilsatt 1 ml L-15.

Intracellulær stimulering av SSP-9 celler med poly I:C ble gjort ved transfeksjon. Transfeksjon ble gjennomført ved hjelp av FuGENE® HD Transfection Reagent etter produsentens protokoll (Promega, 2016). Til transfeksjonsreaksjonen ble det benyttet en ratio mellom transfeksjonsreagens og poly I:C på 3:1. Til hver transfeksjonsreaksjon ble det brukt 1 μ g poly I:C (2 mg/ml), og dermed 3 μ l av FuGENE® HD Transfection Reagent.

Celler ble stimulert extracellulært ved å tilsette 1 ml medium som inneholdt poly I:C (10 μ g/ml), IFN α (1000 U/ml) eller IFN γ (1000 U/ml). Cellene ble så inkubert ved 20 °C fram til høsting etter 24 og 48 timer.

Ved høsting av celler for RNA-ekstraksjon, ble mediet fjernet fra brønnene og vasket ved å tilsette 500 μ l fosfatbufret fysiologisk saltvann (PBS). Videre ble cellene lysert ved å tilsette 350 μ l RLT lysisbuffer fra RNeasy Mini Kit (Qiagen). Lysisbufferen var tilsatt 150 μ l 2-mercaptoetanol (Sigma-Aldrich) til 15 ml RLT lysisbuffer (Qiagen). Prøvene ble homogeniserte ved å sprøyte lysatet gjennom 1 ml sprøyter med 0,9 mm kanyler fem ganger. Lysatet ble så overført til eppendorfrør og fryst ned ved -80 °C.

RNA ble isolert fra cellelysatet som beskrevet i kapittel 2.8.2, mens cDNA-syntese ble gjennomført som beskrevet i kapittel 2.8.3. Relativ ekspresjon og relativ økning i genekspresjon ble målt ved kvantitativ RT-PCR (RT-qPCR) som beskrevet i kapittel 2.8.4. Primere benyttet i dette forsøket var SsaMx1,2,3, SsaMx2, SsaMx4, SsaMx5 og SsaMx9. De benyttede primerne er beskrevet i Tabell 2 i kapittel 2.8.1.

2.5 Infeksjon av ASK-celler med ISAV4

ASK-celler ble sådd ut i 24-brønnersbrett, 1 ml L-15 medium med 110.000 celler per brønn. Cellene ble inkubert ved 15 °C i 24 timer før infeksjon med ILAV. ILAV ble fortynnet i serumfritt medium til en MOI (multiplicity of infection) på 5. Vekstmediet i 24-brønnersbrettet ble fjernet, og 0.5 ml serumfritt medium med ILAV ble tilsatt. Kontrollbrønnene ble tilsatt 0.5 ml kontrollmedium. Brettet ble så inkubert ved romtemperatur i to timer slik at ILAV festet seg til cellene. Etter to timer ble det tilsatt 0,5 ml L-15 med 4 % FBS til hver brønn. De infiserte cellene og kontrollcellene ble så inkubert ved 20 °C fram til høsting. Celler ble høstet for RNA-isolering 24 og 72 timer etter infeksjon med ILAV. Ved høsting ble cellene vasket med 500 µl PBS, før cellene ble lyserte ved å tilsette 350 µl RLT lysisbuffer fra RNeasy Mini Kit (Qiagen) til hver brønn. Lysisbufferen var tilsatt 10 µl 2-mercaptoetanol (Sigma-Aldrich) per 1 ml RLT lysisbuffer (Qiagen). Cellene ble resuspenderte og homogenisert ved hjelp av sprøyte og kanyle, og overført til eppendorfrør, før de ble lagret ved -80 °C fram til RNA-isolering.

RNA ble isolert og cDNA (komplementær DNA) syntetisert som beskrevet i henholdsvis kapittel 2.8.2 og 2.8.3. RT-qPCR ble benyttet til å bestemme relativ genekspressjon og relativ økning i genekspressjon av SsaMx1, SsaMx2, SsaMx1+3, SsaMx1,2,3, SsaMx4, SsaMx5 og SsaMx9. Dette ble gjennomført som beskrevet i kapittel 2.8.4. Primerne som ble benyttet er beskrevet i Tabell 2 i kapittel 2.8.1.

2.6 Stimulering av erytrocytter med IFN og poly I:C

2.6.1 Forsøksfisk

Fisk til forsøket ble hentet fra to presmoltgrupper og en smoltgruppe fra landanlegget i Kårvika, som driftes av Havbruksstasjonen i Tromsø. Presmoltgruppe 1 og smoltgruppen var av stammen Aquagen standard (Aquagen, Kyrksæterøra, Norge), mens presmoltgruppe 2 var av stammen Aquagen IPNV-sensitive (Aquagen, Kyrksæterøra, Norge). Fisken ble holdt i 300 liters kar ved 10 °C, og føret med kommersielt tørrfôr.

2.6.2 Bloduttak

Fisken ble avlivet med en overdose av Benzoak (ACD Pharmaceuticals), samt slag mot hodet, før omtrent 1 ml blod ble tappet ved bruk av sprøyte og kanyle. Blodet ble tappet fra *Vena caudalis* ved innstikk i bakkant av gattfinnen. Blodet ble overført til rør med 10 ml

Materialer og metoder

transportmedium, som besto av L-15, med 2 % FBS, 1 % streptomycin/penicillin og 0.4 ml heparin/100 ml. Heparinet er tilsatt mediet for å forhindre at blodet koagulerer i rørene.

2.6.3 Isolering og stimulering av erythrocytter

Erythrocyttene ble isolert fra andre celler i det hepariniserte blodet ved hjelp av en Percoll-gradient. Metoden er tidligere beskrevet av Strandskog et al. (Strandskog, Ellingsen & Jørgensen, 2007), men er noe modifisert. I metoden ble en Percoll-løsning med en konsentrasjon på 54 % benyttet. Utgangspunktet for denne løsningen er en 90 % Percoll-løsning, som ble forberedt ved at 90 ml Percoll (GE Healthcare) ble tilsatt 3.1 ml 5M NaCl og 6.9 ml destillert vann (dH₂O). 54 %-løsningen ble så lagd ved å benytte 60 ml 90 % Percoll, og tilsette 2 ml FBS, 38 ml L-15 og 0.4 ml heparin. Ved å bruke Percoll kan man utnytte at erythrocyttene sedimenteres ved en likevektstetthet som er ulik andre celler. Ved å bruke 54 % Percoll vil erythrocyttene sedimenteres på bunnen i røret, isolert fra de andre celletypene.

Blod i transportmedium ble fortynnet 10x med L-15 tilsatt 2 % FBS, og ble deretter overført på Percoll-løsningen med konsentrasjon på 54 %. Cellesuspensjonen ble pipettert ut sakte, og på skrå mot innsiden av rørveggen. Dette for å unngå at cellesuspensjonen ikke ble blandet inn i Percoll-løsningen. Gradienten ble så sentrifugert ved 300 x g i Multifuge 1S-R (Heraeus) i 15 min på 4°C, før erythrocytter ble samlet opp fra bunnen av gradienten. Erythrocyttene ble overført til medium med 5 % FBS (47.5 µl L-15 og 2.5 µl FBS). Celletallet ble så bestemt ved hjelp av en Nucleocounter® YC-100, som beskrevet tidligere i oppgaven. Erythrocyttene ble også studert under mikroskop, og ingen forurensning fra andre celletyper ble detektert.

Etter bestemmelse av celletall ble 1 ml medium med to millioner celler sådd ut i hver brønn i et 24-brønnersbrett og inkubert ved 15 °C i 24 timer, før stimulering med 1000 U/ml IFN α eller 1 µg/ml poly I:C (extracellulært). Kontrollceller ble høstet ved nullpunkt, mens stimulerede og ustimulerede celler ble inkubert ved 20 °C, og høstet etter 48 timer. Høsting ble utført ved at medium med celler ble pipettert opp og ned, før overføring til rør og sentrifugering (2000xg i 5 minutter). Medium ble fjernet og cellene ble så vasket med 1 ml PBS pr rør, og sentrifugert som tidligere. Deretter ble PBS fjernet, før 1 ml Trizol (Invitrogen) ble tilsatt hvert rør. Prøvene ble så overført til mikrotuberør med RNase-behandlede metallkuler. Deretter ble prøvene homogeniserte i TissueLyser II (Qiagen), først ved 25 Hz i ett minutt, etterfulgt av 30 Hz i to minutter. Etter homogeniseringen ble prøvene videre behandlet for ekstraksjon av RNA som beskrevet i kapittel 2.8.2. cDNA-syntese og RT-qPCR ble gjennomført som beskrevet i

henholdsvis kapittel 2.8.3 og 2.8.4. I dette forsøket ble primere for SsaMx1,2,3 benyttet, og disse er beskrevet i Tabell 2 i kapittel 2.8.1.

2.7 Materiale fra tidligere forsøk

Materiale til dette studiet ble hentet fra et tidligere gjennomført forsøk i Børre Robertsens forskningsgruppe (Chang, Jenssen & Robertsen, 2016). Prøvene forelå som cDNA fra lever og pankreas, mens fornyre-prøvene var oppbevart som organprøver.

2.7.1 Forsøksfisk

Som beskrevet av Chang og medarbeidere (2016) ble det i dette forsøket benyttet presmolt av atlantisk laks (*Salmo salar* L.) fra stamme Aquagen Standard (Chang et al., 2016). Fisken ble holdt i ferskvann ved 10 °C, og ble føret med kommersielt fôr.

2.7.2 Effekt av IFNc-plasmid på uttrykk av Mx-mRNA i lever, fornyre og pankreas

IFNc-plasmid (pcDNA3.3 med en DNA-sekvens som koder for IFNc) var produsert som beskrevet av Chang et al. (2016). Tre grupper presmolt med en individvekt på 35-45 gram ble injisert intramuskulært. Den ene gruppen fikk en i.m. injeksjon med 15 µg IFNc-plasmid oppløst i 50 µl PBS, mens en kontrollgruppe ble injisert med 15 µg kontrollplasmid (pcDNA3.3) oppløst i 50 µl PBS, og en annen kontrollgruppe med 50 µl PBS. To uker etter injeksjon ble det tatt ut prøver fra lever, fornyre og pankreas til videre bruk. Prøvene ble overført til RNAlater (Ambion), og inkubert over natt ved romtemperatur. Etter inkubering ble prøvene oppbevart ved -20 °C på RNAlater (Ambion) inntil videre ekstraksjon av RNA.

2.7.3 Analyser

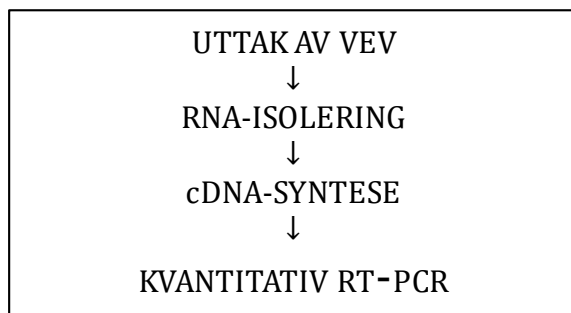
RNA fra lever og pankreas ble ekstrahert og cDNA syntetisert av tidligere masterstudent Iris Jenssen som beskrevet av Chang et al. (2016). Isoleringen av RNA fra fornyre ble gjort ved hjelp av Qiagen RNA mini extraction kit (Qiagen), og produsentens protokoll ble fulgt. Først ble mikrotuberør merket med prøvenummer, og det ble lagt RNase-behandlede metallkuler i rørene til homogeniseringsprosessen. Videre ble det forberedt lysisbuffer av 20 ml RLT lysisbuffer, og 200 µl 2-mercaptoetanol. Det ble så tilsatt 1 ml RLT-buffer i hvert mikrotuberør med metallkule, før vevet ble overført til rørene. Prøvene ble så homogeniserte i Tissuelyser II (Qiagen). Homogeniseringen ble utført ved 25 hertz (Hz) i ett minutt, så 30 Hz i to minutter. Videre ble 1.2 ml RNAase-fritt vann og 20 µl proteinase K tilsatt til hver prøve, før prøvene

ble inkubert ved 55 °C i 10 min. Etter inkubering ble prøverørene sentrifugert ved romtemperatur (10 000xg i 3 min).

Sentrifugerør (15 ml) ble merket med prøvenummer, og 900 µl etanol ble tilsatt til hvert rør. Supernatanten fra rørene med vevsprøven ble pipettert over i sentrifugerørene, og mixet med pipetten. 700 µl ble så overført fra prøvene til merkede spinnkolonner, og sentrifugert i Eppendorf Centrifuge 5417R (USA Scientific) ved 8000xg i 1 min. Denne prosessen ble gjentatt tre ganger fram til all supernatant var overført til spinnkolonnen.

Videre ble RNA-isolering gjennomført som beskrevet i kapittel 2.8.2 fra tilsetting av RW1, og cDNA-syntese utført som beskrevet i 2.8.3. For å bestemme relativ ekspresjon og relativ økning i ekspresjon av Mx-gener ble kvantitativ RT-PCR (RT-qPCR) gjennomført som beskrevet i kapittel 2.8.4. Primerne som ble brukt for å analysere prøvene fra lever og pankreas var SsaMx1,2,3 og SsaMx2. Til å analysere prøvene fra fornyre ble primere for SsaMx1,2,3, SsaMx4, SsaMx5 og SsaMx9 benyttet. Primerne som ble benyttet i forsøket er beskrevet i Tabell 2 i kapittel 2.8.1.

2.8 Kvantitativ RT-PCR (RT-qPCR)



Figur 6. Flytskjema over hovedstegene i RT-qPCR.

Kvantitativ reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-qPCR), ble benyttet for å se om det var ulikheter i ekspresjon av de ulike Mx-genene i stimulerede SSP-9 celler og i ILAV-infiserte ASK-celler. RT-qPCR ble også benyttet for å se om det var ulikheter i ekspresjon av de forskjellige Mx-genene i fornyre, lever og pankreas etter i.m. injeksjon med IFNc-plasmider. Til slutt ble RT-qPCR brukt for å se på ekspresjonen av SsaMx1,2,3 i erytrocytter.

Polymerase chain reaction (PCR) benyttes for å oppformere spesifikke DNA-sekvenser, og RT-qPCR er en metode som benyttes for å mengdebestemme DNA-sekvenser fra vev eller celler. I

Materialer og metoder

RT-qPCR bruker man et fluoriserende fargestoff for å detektere mengden av det spesifikke gentranskriptet. Det fluoriserende fargestoffet vil binde til dobbeltrådig DNA (dsDNA), og vil øke i farge proporsjonalt med mengden av PCR-produkter. Fluorensens måles etter hver enkelt amplifiseringssyklus, og øker dermed når uttrykket av genet øker. Dette gjør at man kan følge oppformeringen av genuttrykket mens reaksjonene foregår, derav navnet "real-time". Dette til forskjell fra en konvensjonell PCR, som kun fungerer som en endepunkt-detektering. Mengden fluoresens gir en indikasjon om mengden gentranskript i realtime. I løpet av den eksponentielle fasen av amplifiseringen vil fluorescensen på et tidspunkt overstige en bestemt terskelverdi (threshold), der man har en signifikant økning i fluorescens sammenlignet med bakgrunnsstøyen. Den amplifiseringssyklusen der man får en overstigning av thresholdet defineres som thresholdsyklusen (C_t), og C_t -verdien vil dermed kunne relateres til mengden cDNA i prøven. En høy C_t -verdi indikerer at konsentrasjonen av cDNA i prøven er lav, mens en lav C_t -verdi betyr at cDNA-konsentrasjonen i prøven er høy (Bio-Rad, 2017).

For å måle mengden mRNA i celler og vev ble det i dette arbeidet benyttet to-steps RT-qPCR. Her ble mRNA transkribert ved hjelp av enzymet revers transcriptase til cDNA. Videre ble cDNA benyttet til å kjøre qPCR. En oversikt over hovedstegene i RT-qPCR er gitt i Figur 6.

Normalt består en qPCR-reaksjon av 40 amplifiseringssykluser hvor cDNA oppformes. Hver syklus i qPCR-reaksjonen består av tre trinn – disse er denaturering, herding og ekstensjon. I denatureringsfasen benyttes høy temperatur, vanligvis 95 °C, for å splitte dsDNA til ssDNA. I neste trinn senkes temperaturen til 60 °C, og spesifikke primere binder til ssDNA, dette er herdefasen. Til slutt kommer ekstensjonsfasen, som også skjer ved 60 °C, der DNA-polymerase syntetiserer en ny DNA-tråd. Denne syklusen gjentas flere ganger, slik at man får oppformert gensekvensen man er ute etter. Gitt optimale betingelser vil mengden cDNA fordobles for hver syklus (Life Technologies, 2014). En oversikt over antall sykluser, temperatur og varighet av de ulike trinnene qPCR-reaksjonen er gitt i Tabell 1.

I forsøkene ble SYBR®Green (Applied Biosystems) benyttet for å detektere økning i genekspressjon. SYBR®Green fungerer ved at det binder til «minor grooves» (fordypninger) i dsDNA. Fargestoffet avgir mye sterkere farge når det er bundet til disse fordypningene enn når det er i fri form. SYBR®Green sier dermed noe om mengden dsDNA som er tilstede, og kan brukes til å måle mengden oppformert DNA. Det som er verdt å merke seg er at SYBR®Green kan brukes med alle primerpar, og kan binde til alt dsDNA, dette kan dermed også føre til

Materialer og metoder

uspesifikk binding (Life Technologies, 2014). For å ha kontroll på hvorvidt dette har oppstått kan man benytte seg av smeltekurveprogram. Dette gjør at man kan få PCR-reaksjonen framstilt i en smeltekurve/dissosiasjonskurve etter ferdigstilt PCR-reaksjon. Smeltekurven viser grafisk den endringen i fluorescens som oppstår når dsDNA med tilheftet SYBR®Green smelter til enkeltrådig DNA (ssDNA) under denatureringsfasen. En uspesifikk binding vil kunne oppdages ved at den har en smeltekurve som er ulik smeltekurven til de andre prøvene.

Relativ kvantitering ble benyttet for å observere endring i ekspresjon av målgener. Ekspresjon av målgener normaliseres da i forhold til et referansegene, som optimalt sett bør uttrykkes stabilt under ulike forhold (Pfaffl, 2001). I denne oppgaven ble elongeringsfaktor $1/\beta$ (EF1 α β) benyttet som referansegene ved måling av Mx-mRNA. EF1 α β er et stabilt gen som er vist å uttrykkes i relativt konstante mengder under ulike forhold og i ulike vev hos atlantisk laks (Olsvik, Lie, Jordal, Nilsen & Hordvik, 2005). Dette gjør genet velegnet som referansegene, og forskningsgruppen har positive erfaringer med å benytte det.

Tabell 1. Steg, temperatur, varighet og antall sykluser i hver qPCR-reaksjon.

| Steg | Temperatur (°C) | Varighet (sek) | Antall sykluser |
|-----------------------------|-----------------|----------------|-----------------|
| Denaturering | 95 | 20 | Hold |
| Denaturering | 95 | 3 | 40 |
| Amplifisering og ekstensjon | 60 | 30 | 40 |
| Smeltekurve | 95 | 15 | Kontinuerlig |
| | 60 | 60 | |
| | 95 | 15 | |
| | 60 | 15 | |

Materialer og metoder

2.8.1 Primere

Primerne som er benyttet i forsøkene er designet av Børre Robertsen. En oversikt over primersekvensene finnes i Tabell 2.

Tabell 2. Oversikt over primersekvenser for gener undersøkt i RT-qPCR. Tabellen viser primersekvens, accessionnr., effektivitet og genspesifisitet. Alle primere er fra Sigma-Aldrich, og sekvensene er gitt i 5'-3' retning. Stockløsninger til de ulike primerne ble fortynnet til en bruksløsning på 5 µM. R=reverse, F= forward.

| Navn | Sekvens | Accessionnr. | Effektivitet | Genspesifisitet |
|-----------|-------------------------------------|--|--------------|-----------------|
| SsaMxl23F | TGCAACCAACAGAGGCTTTGAA | NM_001123690, NM_001139918, NM_001123675 | 2,13 | SsaMxl |
| SsaMxl23R | GGCTTGGTCAGGATGCCTAAT | | | SsaMx2 |
| | | | | SsaMx3 |
| SsaMxl3F | AGGACAGCACCTACAGCCACAGTC TGAG | NM_001123690, NM_001123675 | 1,91 | SsaMxl |
| SsaMxl3R | GGTGGCATGGTTGTCTGTGCTAAA G | | | SsaMx3 |
| SsaMxl1F | ACGACCGACCCCTTACCGACCATTA | NM_001123690 | 1,96 | SsaMxl |
| SsaMxl1R | AATCTGATCAGCCAACGTTGACT GG | | | |
| SsaMx2F | CTGAGGAAGAGGAAGAGGGA | NM_001139918 | 1,99 | SsaMx2 |
| SsaMx2R | CAGATAACACTTTCTGACTCCCA | | | |
| SsaMx4F | CAGTGAAATGCTGGATCTGCTACA CAG | XM_014174614 | 1,86 | SsaMx4 |
| SsaMx4R | GATCCAATTGGCCTGCAACTTTG | | | |
| SsaMx5F | ATTCTGGAGGAGGGGAAATAGC AG | XM_014174615 | 1,92 | SsaMx5 |
| SsaMx5R | CAGCCAGTCTTTGCACCACAATCT CATA | | | |
| SsaMx9F | ATGTTGTCAAACCTGCTGAGCGAAG ACTCTA | XM_014214722 | 1,89 | SsaMx9 |
| SsaMx9R | CACTAAGTTTTTCTGGCCTTTTT CAGA | | | |
| EF1αBF | TGCCCCTCCAGGATGTCTAC | BG933853 | 1,98 | EF1αB |
| EF1αBR | CACGGCCCACAGGTA CTG | | | |

2.8.2 Isolering av RNA

mRNA ble isolert ved hjelp av RNeasy® Mini Kit fra Qiagen ut fra produsentens protokoll. RNA-isoleringen ble gjort i avtrekkskap, og alle sentrifugeringer ble gjennomført i Eppendorf Centrifuge 5417R (USA Scientific).

De nedfryste prøvene (volum 350 µl) ble tint i isoporbokser med is. Prøvene ble homogenisert ved hjelp av sprøyte og kanyle, og overført til eppendorfrør. De homogeniserte prøvene ble så tilsatt 350 µl 70 % etanol, før de ble mikset godt. Videre ble 700 µl (hele volumet) fra hvert enkelt eppendorfrør pipettert over på merkede RNeasy-spinnkolonner (Qiagen), før prøvene ble sentrifugert ved 8000xg i 1 min. Oppsamlingsrørene ble byttet ut i nye rør og membranen ble vasket med 700 µl RW1-buffer (Qiagen) tilsatt ved reverspipettering, før kolonnene igjen ble sentrifugert ved 8000xg i 1 min. Oppsamlingsrørene ble på nytt byttet, og 700 µl RPE-buffer (Qiagen) tilsatt til hver spinnkolonne, også dette ved reverspipettering. Kolonnene ble så sentrifugert ved 8000xg i 1 min, før oppsamlingsrørene ble byttet i nye rør. Deretter ble 500 µl av RPE tilsatt, før en påfølgende sentrifugering ved 8000xg i 2 minutter. Oppsamlingsrørene ble igjen skiftet ut, og spinnkolonnen tørrsentrifugert ved 18000xg i 1 minutt. Dette trinnet er for å forsikre at ingen RPE blir tatt med videre i RNA-isoleringen.

Spinnkolonnene ble satt over i nye oppsamlingsrør, og 40 µl RNase-fritt vann (Biochrom AG) ble så tilsatt direkte over filteret for eluering av RNA. Dette fikk virke i 1 minutt, før kolonnene ble sentrifugert ved 8000xg i 1 min. Etter isolering ble RNA oppbevart på is.

RNA-konsentrasjonen ble målt ved hjelp av Nanodrop® ND-1000 spektrofotometer (ND-1000, Thermo Fisher Scientific). A_{260} og A_{280} angir lysabsorpsjonen ved henholdsvis 260nm og 280 nm, denne absorpsjonen gjenspeiler RNA- og proteinkonsentrasjonen, og man kan dermed finne forholdet mellom disse konsentrasjonene. Hvis forholdet mellom disse er større enn eller lik 1,8, tilsier dette at det ikke er proteinkontaminasjon av prøven. RNA-løsningen ble videre overført til merkede PCR-strips, og fortynnet til ønsket konsentrasjon, med utgangspunkt i de målte konsentrasjonene ved NanoDrop spektrofotometer. I de tilfeller der cDNA-syntese ikke ble gjennomført like etter RNA-isolering, ble prøvene alikvotert og frosset ned ved -80 °C fram til cDNA-syntese.

2.8.3 *cDNA-syntese*

For å kunne kvantifisere mengden mRNA ved hjelp av RT-qPCR, må dette først reverstranskriberes til en komplementær DNA-tråd (cDNA). Dette blir gjort ved å benytte seg av enzymet revers transcriptase. Enzymet danner en komplementær DNA-tråd ved å binde RNA-tråden med korte oligonukleotider (random examer primere). cDNA-syntesen består av tre trinn; herding, ekstensjon og denaturering. Disse trinnene styres av endringer i temperatur, og ved optimale vilkår vil cDNA-syntesen gi et forhold mellom syntetisert cDNA og utgangsmengde av mRNA på 1:1. Her ble QuantiTect® Reverse Transcriptase kit (Qiagen) benyttet, og metoden ble utført i henhold til produsentens protokoll.

Dersom RNA ble nedfrost mellom RNA-isolering og cDNA-syntese, ble prøvene tint på is og RNA-konsentrasjonen i prøvene målt på nytt. PCR-strips ble nummerert med prøvenummer, og 2 µl genomisk DNA(gDNA)-wipeout buffer (Qiagen) tilsatt til det samme antall brønner som det var prøver. gDNA-wipeout bufferen ble benyttet for å fjerne eventuell gDNA i prøvene før revers transkripsjon. Videre ble multikanalpipette benyttet for å tilsette RNase-fritt H₂O (Biochrom AG) og RNA til brønnene med gDNA-wipeout buffer. Korrekt volum RNase-fritt H₂O ble tilsatt til rørene før beregnet mengde RNA ble tilsatt til de ulike brønnene. Volumet av RNase-fritt dH₂O og RNA var tilsammen 12 µl tilsatt i hver brønn, og fordelingen av vann og prøve var avhengig av RNA-konsentrasjonen prøven hadde ved måling i Nanodrop. Oversikt over total mengde RNA benyttet i cDNA-syntesen for hver prøve er gitt i Appendix II. Etter tilsetning av vann og RNA ble stripsene inkubert i to minutter ved 42 °C, før de ble satt på is.

Mastermix for revers transkripsjon ble videre gjort klar for alle prøvene. Mastermixen ble forberedt på is, og alle reagensene blandet. 6 µl av mastermixen ble tilsatt til hver brønn i PCR-stripsene, noe som ga et totalvolum i hver brønn på 20 µl. Mengden av de ulike reagensene i mastermixen foreligger i Appendix III.

Alle inkubasjoner ble gjennomført i GeneAmp® PCRsystem 2700 (Applied Biosystems). Ved revers transcriptase-reaksjonen var denne programmert til å inkubere prøvene ved 42 °C i 15 minutter, før revers transcriptasen ble inaktivert ved å inkubere prøvene ved 95 °C i 3 minutter. cDNA ble så fortynnet 1:5, før prøvene ble alikvoterte og oppbevart ved -20 °C inntil videre analyser.

2.8.4 Kvantitativ RT-PCR (RT-qPCR)

Kvantitativ RT-PCR ble utført i henhold til protokoll fra produsent (Quantitect® SYBR®Green RT-PCR), og alle analysene ble gjennomført i 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems).

Mastermix ble lagd for alle prøvene for hvert enkelt primerpar, før 9 µl ble tilsatt til brønner i et MicroAmp® Fast Optical 96-brønners brett (Life Technologies). En oversikt over benyttede primerpar finnes i Tabell 2 i kapittel 2.8.1. Videre ble 6 µl av cDNA tilsatt i brønnene, med duplikater for hver prøve. Brettene ble sentrifugert i MPS mini plate spinner 1000 (Labnet), før det ble kjørt qPCR. Samtlige brett inneholdt i tillegg negativ kontroll («No Template Control») for hvert primerpar på brettet, hvor cDNA var erstattet med 6 µl ultrapure H₂O. Dette ble gjort for å avdekke eventuell uspesifikk binding som følge av kontaminering av SYBR®Green, cDNA, primere eller vann.

Etter qPCR-analysene ble dataene behandlet i Excel.

2.8.5 Databehandling

Data fra qPCR-analysene ble analysert i Microsoft Excel. For å beregne relativ endring i ekspresjonen av de ulike genene ble Pfaffl-metoden (Pfaffl, 2001) benyttet.

$$\text{Ratio} = \frac{(E_{\text{mål}})^{\Delta C_{\text{tmål}}(\text{kontroll-prøve})}}{(E_{\text{ref}})^{\Delta C_{\text{tref}}(\text{kontroll-prøve})}} \quad (1)$$

Beregninger ble gjort ved hjelp av den matematiske modellen vist i ligning 1. Denne modellen gir relativ endring i ekspresjon av et målgen i den stimulerede gruppen sammenlignet med en kontrollgruppe, normalisert til endring i ekspresjon av et referansegene (EF1αB). I Pfaffl-metoden tar man hensyn til primereffektiviteten, ved at $E_{\text{mål}}$ og E_{ref} i ligning 1, er henholdsvis effektiviteten for primerparet for målgenet og effektiviteten for primerparet for referansegene. ΔC_{t} -verdien forteller differansen mellom C_{t} -verdien for en enkeltprøve i den stimulerede gruppen, og gjennomsnittet av C_{t} -verdiene for kontrollgruppen (Pfaffl, 2001).

Primereffektiviteten til referansegene og de ulike målgenene ble funnet ved å lage en 2-folds fortynningsserie med cDNA. Fortynningsserien besto av syv fortynninger. For å bestemme effektiviteten (E) benyttet man stigningstallet i kurven, og følgende formel:

$$E = 10^{(-\frac{1}{\text{slope}})} \quad (\text{Pfaffl, 2001}) \quad (2)$$

Materialer og metoder

Videre ble også $2^{-\Delta C_t}$ -metoden (Schmittgen & Livak, 2008) benyttet. Her blir hver C_t -verdi normalisert i forhold til referansegenet, men man tar ikke hensyn til forholdet til ustimulerte kontrollprøver. For at denne metoden skal fungere optimalt forutsettes tilnærmet 100 % primereffektivitet. Likningen for utregning av relativ ekspresjon i $2^{-\Delta C_t}$ -metoden er gitt i likning 3.

$$\text{Relativ ekspresjon} = 2^{-(\text{Gjennomsnitt } C_t \text{ målgen} - \text{Gjennomsnitt } C_t \text{ referansegen})} \quad (3)$$

Uparet t-test ble benyttet for å beregne om forskjeller i relativ ekspresjon av SsaMx9 i behandlede celler eller fisk sammenlignet med kontrollgrupper var signifikante. P-verdier under 0,05 ble ansett å være signifikante.

3 Resultater

3.1 Effekt av IFN-I og poly I:C på ekspresjon av Mx-gener i SSP-9 celler

Karakteristisk for Mx-gener er at de induseres spesifikt av IFN-I hos mus og mennesker. Mx induseres også av totrådig RNA i form av poly I:C da totrådig RNA induserer IFN-I (Robertsen et al., 1997; Jensen, Albuquerque, Sommer & Robertsen, 2002). Det er tidligere vist at Mx hos laks også induseres av IFN-I og poly I:C, men primerparet som ble brukt viste seg å være spesifikt for både SsaMx1, SsaMx2 og SsaMx3 på kromosom 12 (Robertsen, personlig kommunikasjon). I dette forsøket ønsket vi å undersøke ekspresjon av Mx-gener fra både kromosom 9, 12 og 25 etter stimulering med IFN-I og poly I:C.

Effekten av rekombinant IFN α og IFN γ , samt poly I:C ble studert på SSP-9 celler, som stammer fra fornyre hos laks. Disse cellene ble benyttet da TO-celler ikke lengre er tilgjengelig for forskning.

SSP-9 celler ble enten stimulert extracellulært ved å tilsette 1000 U/ml IFN eller 10 μ g/ml poly I:C i mediet, eller stimulert intracellulært ved å transfektere cellene med 1 μ g/ml poly I:C. RNA ble ekstrahert fra cellene 24 og 48 timer etter stimulering for å studere ekspresjon av Mx-gener. Det ble brukt ett primersett som er spesifikt for både SsaMx1, SsaMx2 og SsaMx3 (SsaMx1,2,3), ett primersett for SsaMx2, ett for SsaMx4, ett for SsaMx5, og ett for SsaMx9 (Tabell 2).

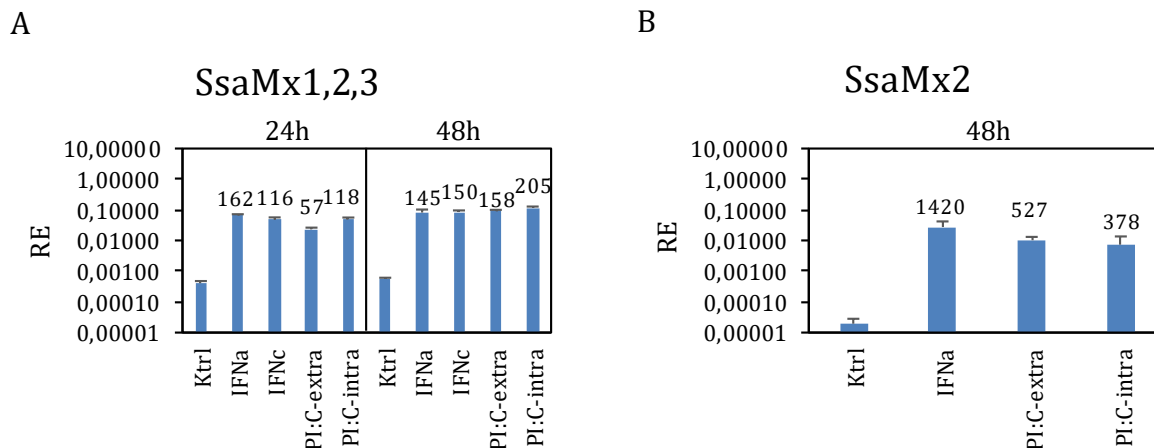
Figur 7 viser at SsaMx1,2,3 ble oppregulert ved stimulering med både IFN α , IFN γ og poly I:C som forventet fra tidligere arbeider (Nygaard, Husgard, Sommer, C. Leong & Robertsen, 2000; Jensen & Robertsen, 2002). Etter 24 timer ble sterkest oppregulering observert for IFN α og svakest for extracellulær stimulering med poly I:C. For IFN γ , extracellulær og intracellulær poly I:C var oppreguleringen høyere etter 48 timer enn etter 24 timer. Dette var forventet for poly I:C som antakelig hovedsakelig stimulerer Mx-ekspresjon via induksjon av IFN-I. Ekspresjon av SsaMx2 ble bare målt 48 timer etter stimulering med IFN α , extracellulær og intracellulær poly I:C, og viste sterk oppregulering ved alle tre behandlinger (Fig. 7).

Resultater

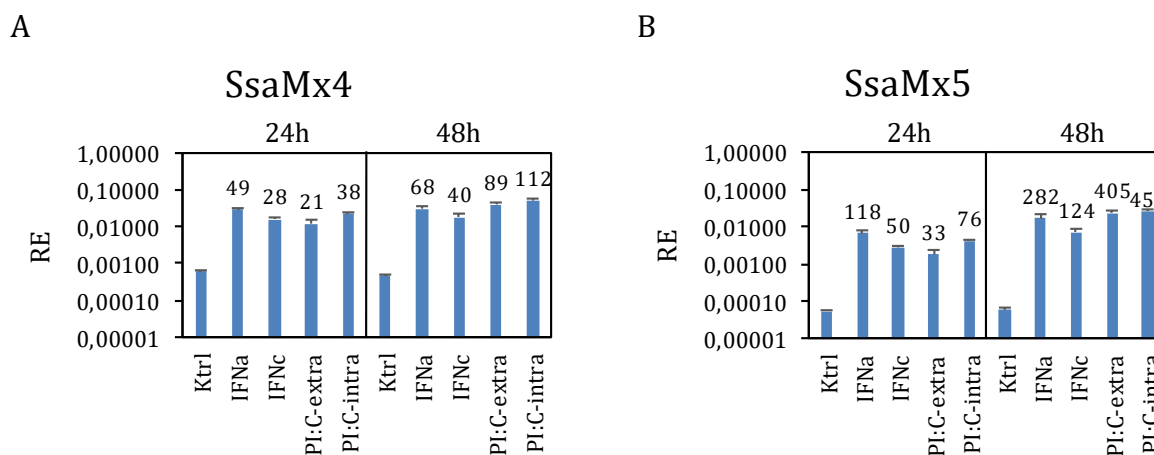
Også SsaMx4 og SsaMx5 (Fig. 8) ble oppregulert ved alle behandlinger. Trenden vi ser hos SsaMx1,2,3 med høyere oppregulering etter 48 timer enn ved 24 timer, ser vi også hos SsaMx4 og SsaMx5. Denne trenden er enda tydeligere enn hos SsaMx1,2,3, spesielt for extracellulær stimulering med poly I:C.

Ut fra Figur 9 kan vi se at ekspresjonen av SsaMx9 i liten grad ble påvirket av behandlingene, og det ble ikke observert noen signifikante endringer i relativ ekspresjon ($p > 0.05$). Vi observerte heller ingen forskjell i oppregulering mellom 24 timer og 48 timer.

Resultater

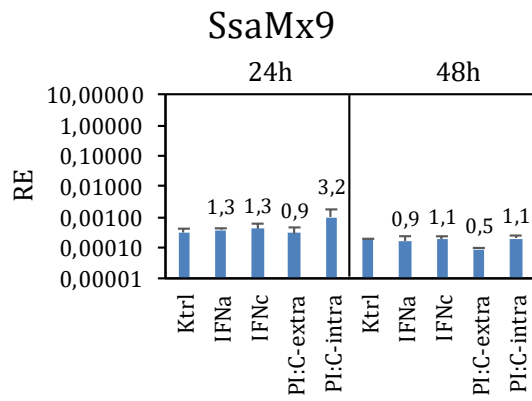


Figur 7. Effekt av IFNa, IFNc og poly I:C på ekspresjon av SsaMx1, SsaMx2 og SsaMx3 i SSP-9 celler. Cellene ble stimulert i triplikater med 1000 U/ml rekombinant IFNa, 1000 U/ml rekombinant IFNc, 10 ug/ml poly I:C extracellulært (PI:C-extra) eller 1ug/ml poly I:C intracellulært (PI:C-intra). Celler ble høstet 24 eller 48 timer etter stimulering. Genekspresjon ble målt med RT-qPCR, og resultatene er presentert som gjennomsnittlig relativ ekspresjon (RE) av (A) SsaMx1,2,3 og (B) SsaMx2 i forhold til EF1 α beregnet etter $2^{-\Delta Ct}$ -metoden + standardavvik (n=3). Tallene oversyøylene angir relativ endring i ekspresjon, beregnet etter Pfaffl-metoden. C_t-verdier for kontroll (ustimulerte celler) var 26,7 (24t) og 25,8(48t) for A og 30,8 (48t) for B.



Figur 8. Effekt av IFNa, IFNc og poly I:C på ekspresjon av SsaMx4 og SsaMx5 i SSP-9 celler. Cellene ble stimulert i triplikater med 1000 U/ml rekombinant IFNa, 1000 U/ml rekombinant IFNc, 10 ug/ml poly I:C extracellulært (PI:C-extra) eller 1ug/ml poly I:C intracellulært (PI:C-intra). Celler ble høstet 24 eller 48 timer etter stimulering. Genekspresjon ble målt med RT-qPCR, og resultatene er presentert som gjennomsnittlig relativ ekspresjon (RE) av (A) SsaMx4 og (B) SsaMx5 i forhold til EF1 α beregnet etter $2^{-\Delta Ct}$ -metoden + standardavvik (n=3). Tallene over søylene angir relativ endring i ekspresjon, beregnet etter Pfaffl-metoden. C_t-verdier for kontroll (ustimulerte celler) var 26,1 (24 t) og 26,1 (48t) for A; og 29,5 (24t) og 29,1 (48t) for B.

Resultater



Figur 9. Effekt av IFNa, IFNc og poly I:C på ekspresjon av SsaMx9 i SSP-9 celler. Cellene ble stimulert i triplikater med 1000 U/ml rekombinant IFNa, 1000 U/ml rekombinant IFNc, 10 ug/ml poly I:C extracellulært (PI:C-extra) eller 1ug/ml poly I:C intracellulært (PI:C-intra). Celler ble høstet 24 eller 48 timer etter stimulering. Genekspresjon ble målt med RT-qPCR, og resultatene er presentert som gjennomsnittlig relativ ekspresjon (RE) av SsaMx9 i forhold til EF1 α beregnet etter $2^{-\Delta C_t}$ metoden + standardavvik (n=3). Tallene over søylene angir relativ endring i ekspresjon, beregnet etter Pfaffl-metoden. C_t verdier for kontroll (ustimulerte celler) var 27,1 (24t) og 27,5(48t).

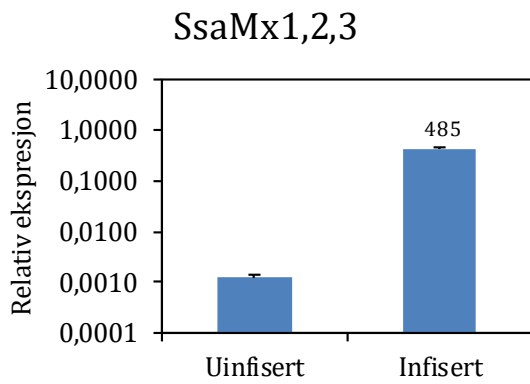
3.2 Ekspresjon av Mx-gener i ASK-celler etter infeksjon med ILAV

Det ble gjennomført et smitteforsøk for å se hvordan de ulike Mx-genene blir induisert ved virusinfeksjon. Dette kan gi et annet bilde enn ved celleforsøk hvor man stimulerer med IFN og poly I:C, da celler kanskje gjenkjenner genomisk ssRNA fra viruset, dsRNA som genereres under virusreplikasjon, og det er også mulig at virus kan hemme IFN- og Mx-produksjon. Det ble valgt å studere infeksjon med ILAV, da det tidligere er vist at ILAV gir en økning i ekspresjon av Mx. Studier har vist at TO-celler får en økning i ekspresjon av Mx-mRNA (SsaMx1,2,3) etter infeksjon med ILAV (Kileng et al., 2007). Det ble der vist at man hadde høyest ekspresjon av Mx-mRNA 72 timer etter infeksjon med 5 MOI ILAV. For å studere hvordan ILAV-infeksjon påvirker ekspresjon av de øvrige Mx-genene, gjorde vi her et lignende forsøk ved å infisere ASK-celler med 5 MOI ILAV for deretter å høste RNA 72 timer etter infeksjon. RT-qPCR av Mx-gener ble utført som beskrevet i kapittel 2.8. Her ble det også brukt primere som er spesifikke for SsaMx1, for SsaMx2 og for SsaMx1/SsaMx3. (Det viste seg vanskelig å lage spesifikke primere for SsaMx3 alene).

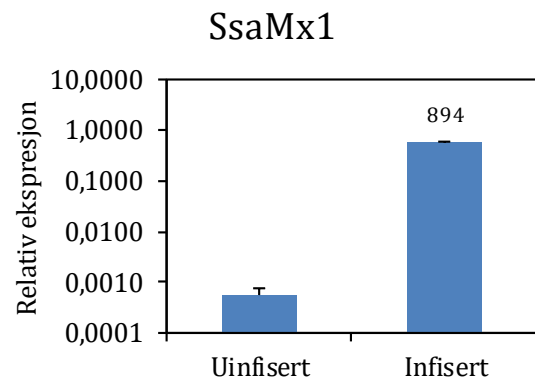
SsaMx1, SsaMx2 og SsaMx3 er de genene som ble uttrykt i størst grad etter infeksjon med ILAV (Fig. 10). SsaMx4 og spesielt SsaMx5 viste høy oppregulering ved infeksjon (Fig. 11), men basalnivåene i uinfiserte celler var så lavt at mRNA-nivået av disse genene i infiserte celler var mye mindre enn mRNA-nivået for SsaMx1, 2 og 3. Mens de andre Mx-genene viste en klar oppregulering ved smitte med ILAV, ble det ikke observert noen signifikant økning ($p > 0.05$) i ekspresjon av SsaMx9 (Fig. 12). SsaMx9 uttrykkes også i mye mindre grad enn Mx-genene på kromosom 12 i uinfiserte celler.

Resultater

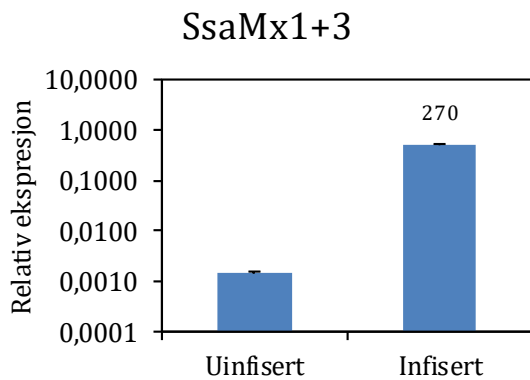
A



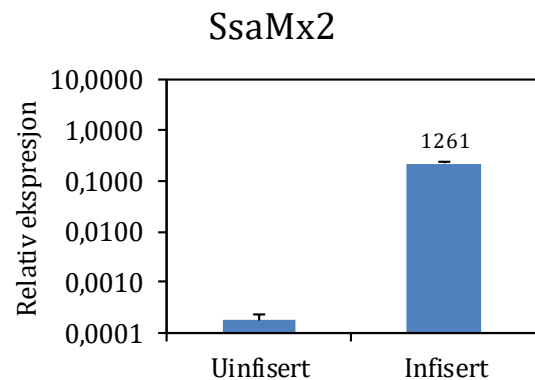
B



C



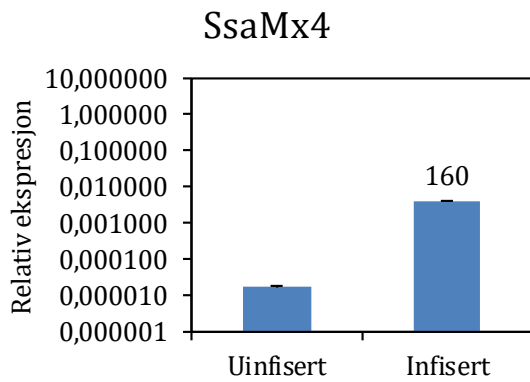
D



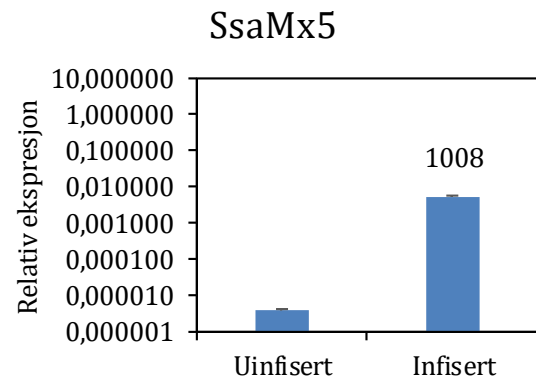
Figur 10. Relativ ekspresjon av Mx-gener på kromosom 12 hos ASK-celler etter smitte med ILAV (5 MOI). Cellene ble infisert med ILAV med MOI på 5, og høstet 72 timer etter smitte. Genekspressjon ble målt med RT-qPCR, og resultatene er presentert som gjennomsnittlig relativ ekspresjon av (A) SsaMx1,2,3, (B) SsaMx1, (C) SsaMx1+3 og (D) SsaMx2 i forhold til EF1 α beregnet etter $2^{-\Delta Ct}$ -metoden + standardavvik (n=3). Tallene over søylene angir relativ endring i ekspresjon, beregnet etter Pfaffl-metoden. C_t -verdien for kontroll (uinfisert) var 27,9 for A; 29,1 for B; 27,7 for C og 30,7 for D.

Resultater

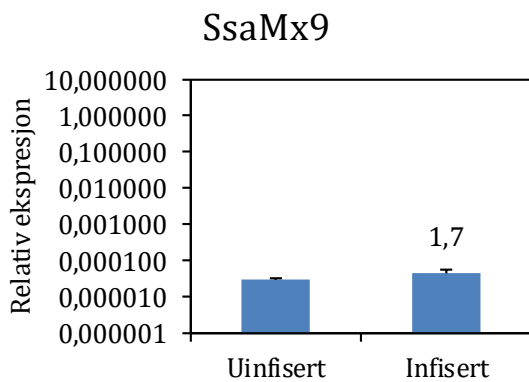
A



B



Figur 11. Relativ ekspresjon av Mx-gener på kromosom 25 hos ASK-celler etter smitte med ILAV (5 MOI). Cellene ble infisert med ILAV med MOI på 5, og høstet 72 timer etter smitte. Genekspresjon ble målt med RT-qPCR, og resultatene er presentert som gjennomsnittlig relativ ekspresjon av (A) SsaMx4 og (B) SsaMx5 i forhold til EF1 α beregnet etter $2^{-\Delta C_t}$ -metoden + standardavvik (n=3). Tallene over søylene angir relativ endring i ekspresjon, beregnet etter Pfaffl-metoden. C_t -verdien for kontroll (uinfisert) var 34,1 for A og 36,2 for B.



Figur 12. Relativ ekspresjon av SsaMx9 (kromosom 9) hos ASK-celler etter smitte med ILAV (5 MOI). Cellene ble infisert med ILAV med MOI på 5, og høstet 72 timer etter smitte. Genekspresjon ble målt med RT-qPCR, og resultatene er presentert som gjennomsnittlig relativ ekspresjon av SsaMx9 i forhold til EF1 α beregnet etter $2^{-\Delta C_t}$ -metoden + standardavvik (n=3). Tallene over søylene angir relativ endring i ekspresjon, beregnet etter Pfaffl-metoden. C_t -verdien for kontroll (uinfisert) var 33,2.

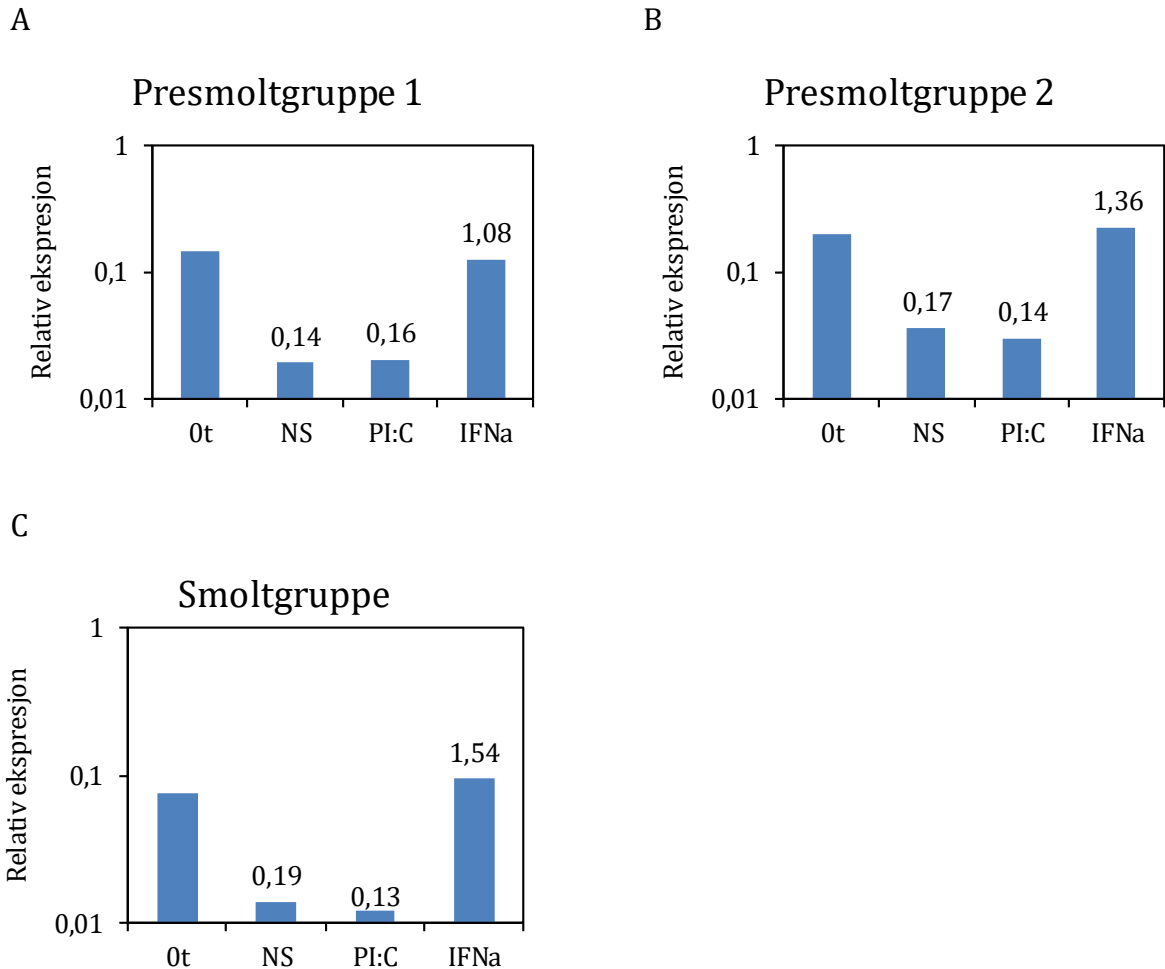
3.3 Ekspresjon av SsaMx1,2,3 i erythrocytter etter inkubasjon

Piscine orthoreovirus (PRV) er tidligere vist å indukere ekspresjon av Mx-gener i erythrocytter (Wessel et al., 2015), og man har i tillegg observert en svak oppregulering av Mx i erythrocytter ved stimulering med poly I:C (Workenhe et al., 2008). I dette forsøket ønsket vi derfor å se om også IFNa, samt poly I:C kan føre til induksjon av SsaMx1,2,3 i erythrocytter.

Cellene ble stimulert med 1000 U/ml IFNa eller 10 µg/ml poly I:C (extracellulært), en gruppe var i tillegg ustimulert og det ble tatt nullprøver. Etter stimulering ble cellene inkubert i 48 timer før de ble høstet.

Figur 13 viser relativ ekspresjon av SsaMx1,2,3 i forhold til referansegenet EF1αβ i erythrocytter fra to ulike presmoltgrupper og én smoltgruppe. Vi observerte et relativt likt bilde mellom de to ulike presmoltgruppene, samt mellom smoltgruppen og presmoltgruppene. Nullprøvene og IFNa-stimulerte celler hadde en høyere ekspresjon av SsaMx1,2,3 enn hva de poly I:C-stimulerte og de ustimulerte cellene hadde. Dette kan tyde på at erythrocytter konstitutivt uttrykker SsaMx1,2,3. Denne ekspresjonen avtok ved inkubasjon i medium i 48 timer, og extracellulær stimulering med poly I:C ga heller ingen økning i ekspresjon. Ved stimulering med IFNa fikk vi gjenopprettet ekspresjonen av SsaMx1,2,3 til det opprinnelige, og det ser dermed ut som om IFNa har en liten stimulerende effekt på ekspresjon av SsaMx1,2,3 i erythrocytter.

Resultater



Figur 13. Relativ ekspresjon av SsaMx1,2,3 i erythrocytter etter stimulering med IFNa og poly I:C. Relativ ekspresjon av SsaMx1,2,3 i erythrocytter fra (A) Presmoltgruppe 1, (B) Presmoltgruppe 2 og (C) Smoltgruppen. Det ble høstet ustimulerte blodceller ved 0 timer, mens celler stimulert med 1000 U/ml IFNa, stimulert (extracellulært) med 1 µg/ml poly I:C (PI:C) og ustimulerte celler (NS) ble høstet etter 48 timer. Ekspresjon av SsaMx1,2,3 ble målt med RT-qPCR, og resultatene er presentert som gjennomsnittlig relativ ekspresjon i forhold til EF1 αβ beregnet etter $2^{-\Delta C_t}$ -metoden (n=2). Tallene over søylene angir økning/relativ endring i ekspresjon, beregnet etter Pfaffl-metoden. Gjennomsnittlige C_t -verdier for kontroll (0 timer) var 27,7 for A; 25,6 for B og 29,0 for C.

3.4 Effekt av IFNc-plasmid på uttrykk av Mx-mRNA i fornyre, lever og pankreas

Tidligere studier gjennomført ved UiT har vist en økning av mRNA for SsaMx1,2,3 i fornyre, lever, hjerte og pankreas etter i.m. injeksjon av IFNc-plasmid (Chang et al., 2014; Chang et al., 2016). På bakgrunn av dette ville vi se om i.m. injeksjon av IFNc-plasmid gir induksjon av de øvrige Mx-genene i fornyre, lever og pankreas. Forsøket ble gjort med cDNA og organer fra forsøket som er beskrevet i Chang et al. (2016). I dette forsøket var presmolt blitt injisert med PBS, IFNc-plasmid (pcDNA3.3 med en DNA-sekvens som koder for IFNc) eller kontrollplasmid (pcDNA3.3) som beskrevet i Materialer og metoder. Forandring i genekspressjon i fornyre for de ulike Mx-genene ble så målt i forhold til fisk injisert med kontrollplasmid ved hjelp av RT-qPCR. Forandringer i ekspresjon for de ulike Mx-genene i lever og pankreas ble målt på samme måte, men her med PBS-injisert fisk som kontrollgruppe. Det er tidligere ikke observert forskjell i ekspresjon av Mx i indre organer hos presmolt injisert med PBS eller kontrollplasmid.

Fornyre

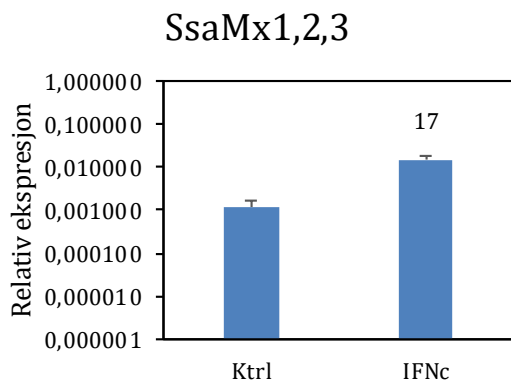
I fornyre observerte vi at SsaMx1,2,3 (Fig. 14) og SsaMx4 (Fig. 15) hadde en basalekspressjon som er flere ganger høyere enn SsaMx5 (Fig. 15) og SsaMx9 (Fig. 16). I fornyre så vi også at SsaMx1,2,3 oppreguleres i høyere grad enn de andre Mx-genene. SsaMx5 og SsaMx9 hadde en lavere ekspresjon i kontrollprøvene enn SsaMx4, men hadde en like stor relativ økning i ekspresjon som SsaMx4 i de behandlede fiskene. Det er likevel verdt å merke seg at økningen i relativ ekspresjon av SsaMx9 etter i.m. injeksjon av IFNc-plasmid ikke var signifikant ($p > 0.05$).

Lever og pankreas

I en tidligere masteroppgave er det blitt målt ekspresjon av SsaMx1,2,3 i pankreas og lever hos fisk injisert med IFNc-plasmid (Jenssen, 2015). Immunhistokjemi av Mx indikerte at Mx var uttrykt sterkere i cellekjerner i pankreas enn lever hos fisk injisert med IFNc-plasmid. For å undersøke dette nærmere, ble cDNA-prøver fra Chang et al. (2016) målt for ekspresjon av SsaMx2 sammenlignet med SsaMx1,2,3. I dette forsøket så vi en økning i ekspresjon av både SsaMx1,2,3 og SsaMx2 både i lever og i pankreas etter injeksjon av IFNc-plasmid (Fig. 17). Tilsynelatende viste SsaMx2 høyere ekspresjon enn SsaMx1,2,3 både i lever og pankreas hos fisk injisert med IFNc-plasmid, og SsaMx2 hadde høyere basalekspressjon enn SsaMx1,2,3. Primerparet for SsaMx1,2,3 burde ha gitt større økning enn SsaMx2 siden det skal amplifisere

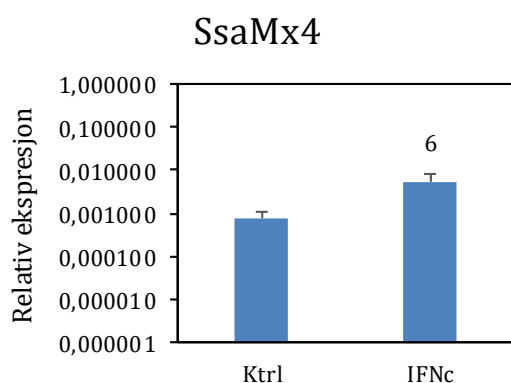
Resultater

både SsaMx1, SsaMx2 og SsaMx3. Dette kan skyldes forskjell hos de to primer-parene i forhold til å amplifisere andre transkripter uspesifikt eller andre forhold som er ukjente for oss.

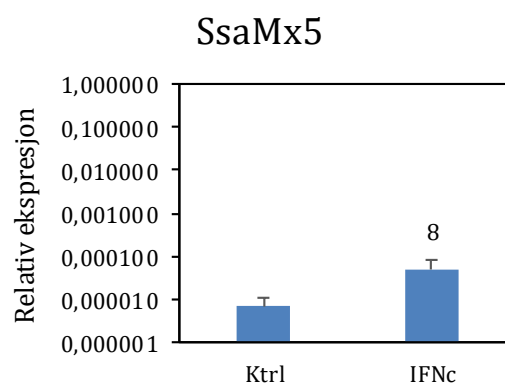


Figur 14. Relativ ekspresjon av Mx-gener på kromosom 12 fra fornyre hos fisk injisert med IFNc-plasmid. Fisk ble injisert intramuskulært med 15 µg IFNc-plasmid oppløst i 50 µl PBS eller 15 µg kontrollplasmid (pcDNA3.3) oppløst i 50 µl PBS. Fisken ble tatt ut to uker etter injeksjon. Genekspresjon ble målt med RT-qPCR, og resultatene er presentert som gjennomsnittlig relativ ekspresjon av SsaMx1,2,3 i forhold til EF1αβ beregnet etter $2^{-\Delta Ct}$ -metoden + standardavvik (n=3). Tallene over søylene angir relativ endring i ekspresjon, beregnet etter Pfaffl-metoden. Fisken ble tatt ut to uker etter injeksjon. Ktrl betyr fisk injisert med kontrollplasmid (pcDNA3.3). C_t -verdiene for kontroll (ktrl) var 26,8.

A

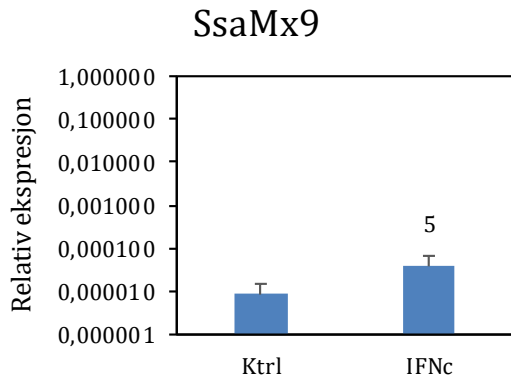


B

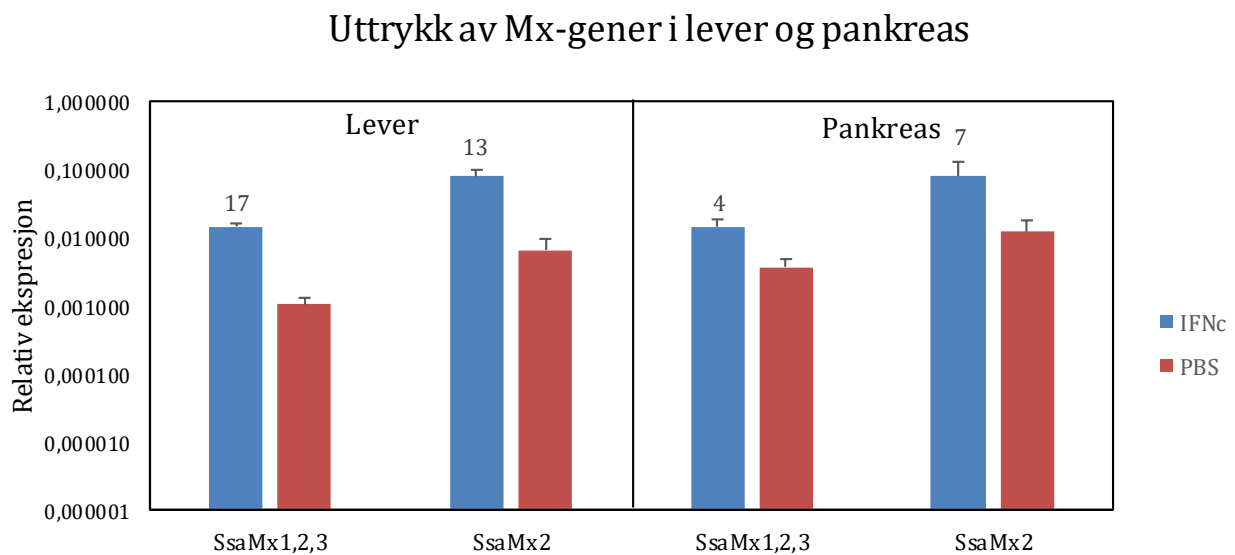


Figur 15. Relativ ekspresjon av Mx-gener på kromosom 25 fra fornyre hos fisk injisert med IFNc-plasmid. Relativ ekspresjon av (A) SsaMx4 og (B) SsaMx5 i fornyre. Fisk ble injisert intramuskulært med 15 µg IFNc-plasmid oppløst i 50 µl PBS eller 15 µg kontrollplasmid (pcDNA3.3) oppløst i 50 µl PBS. Fisken ble tatt ut to uker etter injeksjon. Genekspresjon ble målt med RT-qPCR, og resultatene er presentert som gjennomsnittlig relativ ekspresjon av (A) SsaMx4 og (B) SsaMx5 i forhold til EF1αβ beregnet etter $2^{-\Delta Ct}$ -metoden + standardavvik (n=4). Tallene over søylene angir relativ endring i ekspresjon, beregnet etter Pfaffl-metoden. Fisken ble tatt ut to uker etter injeksjon. Kontroll (ktrl) som i Fig. 14. C_t -verdiene for kontroll (pcDNA3.3) var 27,4 for A og 34,5 for B.

Resultater



Figur 16. Relativ ekspresjon av SsaMx9 (kromosom 9) fra fornyre hos fisk injisert med IFNc-plasmid. Fisk ble injisert intramuskulært med 15 µg IFNc-plasmid oppløst i 50 µl PBS eller 15 µg kontrollplasmid (pcDNA3.3) oppløst i 50 µl PBS. Fisken ble tatt ut to uker etter injeksjon. Genekspresjon ble målt med RT-qPCR, og resultatene er presentert som gjennomsnittlig relativ ekspresjon av SsaMx9 i forhold til EF1αβ beregnet etter $2^{-\Delta Ct}$ -metoden + standardavvik (n=4). Tallene over søylene angir relativ endring i ekspresjon, beregnet etter Pfaffl-metoden. Fisken ble tatt ut to uker etter injeksjon. Kontroll (ktrl) som i Fig. 14. C_T -verdiene for kontroll (pcDNA3.3) var 34,2.



Figur 17 Relativ ekspresjon av SsaMx1,2,3 og SsaMx2 i lever og pankreas hos fisk injisert med IFNc-plasmid. Fisk ble injisert intramuskulært med 15 µg IFNc-plasmid oppløst i 50 µl PBS eller 50µl PBS. Fisken ble tatt ut to uker etter injeksjon. Genekspresjon i lever og pankreas ble målt med RT-qPCR, og resultatene er presentert som gjennomsnittlig relativ ekspresjon av SsaMx1,2,3 og SsaMx2 i forhold til EF1αβ beregnet etter $2^{-\Delta Ct}$ -metoden + standardavvik (n=4).. Tallene over søylene angir relativ endring i ekspresjon, beregnet etter Pfaffl-metoden. Fisken ble tatt ut to uker etter injeksjon. C_T -verdiene for kontroll (PBS) var for SsaMx1,2,3 27,8 (lever) og 25,1 (pankreas), mens de for SsaMx2 var 25,2 (lever) og 23,5 (pankreas).

4 Diskusjon

Virussykdommer har utviklet seg til å bli en av norsk oppdrettsnærings største utfordringer. Disse sykdommene fører til redusert tilvekst, dårligere slaktekvalitet, samt at det går utover fiskens velferd. Det har vist seg vanskelig å utvikle effektive virusvaksiner, og virussykdommer blir i dag i all hovedsak kontrollert ved hjelp av smitteforebyggende tiltak. Børre Robertsens forskningsgruppe studerer hvorvidt IFN kan benyttes til å styrke laksens immunforsvar mot virusinfeksjoner. IFN inducerer en rekke immunresponser i det medfødte immunforsvaret, og ansees som en viktig bestanddel i førstelinjeforsvaret mot virusinfeksjoner (Robertsen, 2006). Et nyere studie på TO-celler har vist at en rekke gener oppreguleres ved stimulering med IFN α , og Mx-gener er blant de som induseres (Xu et al., 2015). Mx-proteinene er antivirale proteiner som relativt spesifikt induseres av IFN-I, og det er blant annet vist at Mx inhiberer replikasjon av IPNV (Larsen et al., 2004).

Det er også tidligere vist at Mx hos atlantisk laks induseres av poly I:C og IFN-I (Robertsen et al., 1997; Jensen et al., 2002). Man har i tillegg vist at infeksjon med ILAV i TO-celler fører til en oppregulering i ekspresjon av Mx (Kileng et al., 2007). Tidligere studier i Robertsens forskningsgruppe har også vist at injeksjon av IFN α -plasmid fører til økt ekspresjon av Mx (Chang et al., 2014; Chang et al., 2016). Primerparet som er benyttet i disse tidligere studiene har senere vist seg å være spesifikt for både SsaMx1, SsaMx2 og SsaMx3 på kromosom 12 (Robertsen, personlig kommunikasjon).

Mens tidligere studier har sett på ekspresjonen av SsaMx1,2,3 er det ikke tidligere gjort studier på de nyoppdagede Mx-genene på kromosom 9 og 25. På kromosom 25 finner vi SsaMx4, SsaMx5, SsaMx6, SsaMx7, og SsaMx8, mens SsaMx9 befinner seg på kromosom 9. Hovedprioriteten i dette mastergradsarbeidet var derfor å se på hvorvidt også de øvrige Mx-genene virker å være typisk IFN-induserte Mx-gener. Det var derfor interessant å se på om de nyoppdagede Mx-genene induseres av IFN-I, poly I:C og ved virusmitte, slik som man har observert hos SsaMx1,2,3. Det ble undersøkt om stimulering med IFN-I og poly I:C inducerer ekspresjon av SsaMx1,2,3, SsaMx2, SsaMx4, SsaMx5 og SsaMx9 i SSP-9 celler, og SsaMx1,2,3 i erytrocytter. Det ble også satt opp et smitteforsøk der det ble undersøkt hvorvidt det var forskjeller i ekspresjon av Mx-genene i ASK-celler etter smitte med ILAV. Videre ble det undersøkt om i.m. injeksjon av IFN α -plasmid fører til induksjon av SsaMx4, SsaMx5 og SsaMx9 i fornyre, slik som man tidligere har sett hos SsaMx1,2,3, og hvorvidt SsaMx1,2,3 og

SsaMx2 er sterkere uttrykt i cellekjerner i pankreas enn i lever hos fisk etter i.m. injeksjon med IFNc-plasmid.

4.1 Effekt av stimulering med IFN-I og poly I:C på ekspresjon av Mx-gener

Hos SsaMx1,2,3, SsaMx2, SsaMx4 og SsaMx5 fikk man en tydelig oppregulering både ved stimulering med IFNa, IFNc og med poly I:C i SSP9-celler. Det ble også observert at denne oppreguleringen var større ved høsting etter 48 timer enn etter 24 timer, spesielt for poly I:C-behandlingen. Prøvene ble analysert for SsaMx2 kun etter 48 timer, og ikke på IFNc-stimulerte celler. Det var klare forskjeller i ekspresjon mellom SsaMx9 og de resterende Mx-genene i SSP-9 celler etter stimulering med IFN-I og poly I:C. Ekspresjon av SsaMx9 ble i motsetning til de øvrige Mx-genene ikke påvirket av noen av behandlingene, hverken etter 24 eller 48 timer.

Forsøket med i.m. injeksjon av IFNc-plasmid førte til en kraftigere induksjon av SsaMx1,2,3 og SsaMx2 i lever enn i pankreas. I fornyre ble det observert en oppregulering av SsaMx1,2,3, SsaMx4 og SsaMx5 etter injeksjon av IFNc-plasmid. Den kraftigste induksjonen i fornyre ble observert for SsaMx1,2,3. I motsetning til i de øvrige forsøkene i mastergradsarbeidet ble SsaMx9 her tilsynelatende oppregulert i samme størrelsesorden som SsaMx4 og SsaMx5, men denne oppreguleringen var ikke signifikant ($p > 0.05$).

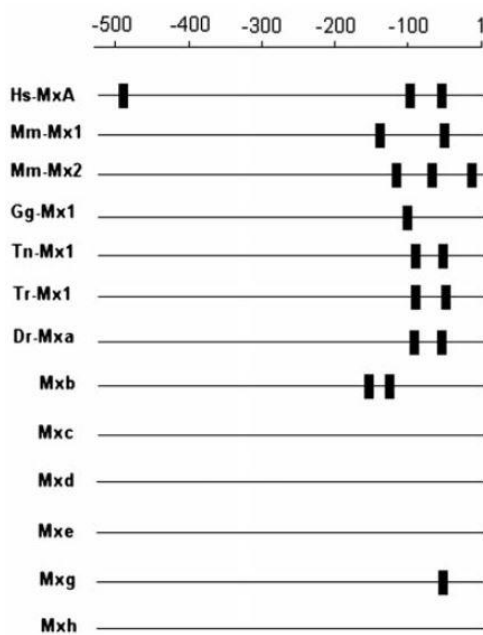
Årsaken til at Mx-gener induseres av IFN-I er at de har ISRE i promotoren. Som nevnt i innledningen er det viktig at gener har ISRE i promoteren for at de skal kunne oppreguleres av IFN-I. Dette fordi IFN-I stimulerer dannelse av transkripsjonsfaktorkomplekset ISGF3 som så binder til ISRE og induserer transkripsjon av IFN-oppregulerte gener (Robertsen, 2006). ISRE er konserverte hos ISGer i vertebrater, og er blant annet beskrevet i promoteren til Mx1 hos regnbueørret (Collet & Secombes, 2001). Hos zebrafisk er det identifisert 7 ulike Mx-gener, men det er vist at kun tre av disse har ISRE i promoteren (Fig. 18.) (Li et al., 2009). Fjerning av ett ISRE-element i promoteren til Mxa hos zebrafisk, førte til en betydelig reduksjon i induksjon av Mxa med poly I:C og IFN-I. En mulig årsak til at man ikke observerer noen oppregulering av SsaMx9 ved stimulering med IFN-I og poly I:C kan dermed være at promoteren til SsaMx9 mangler ISRE.

Mx-gener på kromosom 25 kan også ha endringer i ISRE sammenlignet med Mx-genene på kromosom 12, siden Mx-gener på kromosom 25 oppreguleres svakere med IFN-I og poly I:C enn Mx-gener på kromosom 12. En bør derfor sammenligne promoterregionene til alle Mx-

Diskusjon

genene hos laks for å se om de inneholder ISRE eller ikke. At SsaMx9 ikke blir induisert av IFN-I, kan altså bety at det ikke har ISRE i promoteren og kan ha utviklet andre funksjoner enn antiviral aktivitet. Mx-gener på kromosom 25 kan muligens også ha endret antiviral funksjonalitet med hensyn til virusspesifisitet sammenlignet med Mx-gener på kromosom 12.

Oppregulering av Mx-gener med dsRNA (poly I:C) kan skyldes enten at dsRNA induserer transkripsjon direkte ved aktivering av IRF α og NF κ B eller at dsRNA induserer transkripsjon av IFN-I. Siden økningen i transkripsjon for SsaMx1,2,3, SsaMx4 og SsaMx5 var størst ved 48 timer for poly I:C i forsøket på SSP-9 celler, kan dette være en effekt av IFN-I induksjon.



Figur 18. ISRE i promoterregionen hos ulike Mx-gener. Kun tre av de sju undersøkte Mx-genene hos zebrafisk har ISRE. Mxa og Mxb har to ISRE-sekvenser, mens Mxg kun har én. Figuren er hentet fra (Li, Zhang, Sun, Wang & Wang, 2009).

4.2 Effekt av ILAV-infeksjon på ekspresjon av Mx-gener i ASK-celler

Alle de undersøkte Mx-genene, unntatt SsaMx9, viste en kraftig oppregulering i ASK-celler ved infeksjon med ILAV. Økt ekspresjon av SsaMx1,2,3 etter infeksjon med ILAV har tidligere blitt vist i TO-celler (Kileng et al., 2007).

Denne økningen i geneekspresjon kan skyldes at ILAV induserer Mx-gener gjennom at vertscellene responderer på genomisk ssRNA fra viruset eller dsRNA dannet ved virusreplikasjonen. Som for poly I:C kan virus RNA muligens inducere Mx-gener direkte eller via IFN-I.

Mx-genene på kromosom 12 hadde høyere ekspresjon både basalt og etter ILAV-infeksjon, enn hva vi så hos Mx-genene på kromosom 25 og 9. Den relative økningen i ekspresjon var dog i samme størrelsesorden hos Mx-genene på kromosom 25 som hos genene på kromosom 12. SsaMx9 viste derimot ingen signifikant økning ($p > 0.05$) i ekspresjon i infiserte celler sammenlignet med kontrollene. Dette støtter at SsaMx9 mangler ISRE eller IRF-bindende elementer i promoteren.

En mulig årsak til at Mx-genene uttrykkes ulikt ved ILAV-infeksjon kan være at enkelte gener er mer spesifikke i responsen mot ulike virus. Det er tidligere vist at SNPer (single nucleotide polymorphism) i dupliserte Mx-gener kan oppstå i områder av genet som koder for antiviral spesifisitet (Kjærner-Semb et al., 2016). I regnbueørret har man blant annet vist at genetisk variasjon i exon 3-6 i Mx-gener kan ha betydning for mottakeligheten for infeksjons hematopoetisk nekrose virus (IHNV) (Trobridge, LaPatra, Kim & Leong, 2000). Man har også observert missense-mutasjoner i exon 6 i Mx-gener på kromosom 25 hos atlantisk laks, noe som kan indikere at også laks kan ha adaptert til infeksjon med spesielle virustyper (Kjærner-Semb et al., 2016). Det er foreløpig gjennomført lite forskning på området, og det vil måtte gjøres flere studier før man kan konkludere noe om eventuell vert-virus adaptasjon (Daugherty, 2012; Kjærner-Semb et al., 2016).

4.3 Ekspresjon av SsaMx1,2,3 i erytrocytter

Det at erytrocytter hos fisk har kjerne gjør at de kan ha en del andre funksjoner enn hos pattedyr der de mangler kjerne. Tradisjonelt tenker man at funksjonen til erytrocytter er gasstransport og -utveksling, men kjernen gjør at de også kan ha funksjoner i andre biologiske prosesser. Dette betyr blant annet at de kan ha immunologiske funksjoner, og kan respondere på

Diskusjon

virusinfeksjoner. Det er tidligere vist at erytrocytter hos regnbueørret har blant annet TLR3 og TLR9, og at stimulering med poly I:C fører til induksjon av Mx i erytrocytter etter 12 timers inkubering (Morera et al., 2011). Det samme er tidligere observert hos atlantisk laks der man får en svak oppregulering av Mx i erytrocytter ved stimulering med poly I:C (Workenhe et al., 2008). Man har også sett at PRV-infeksjon av erytrocytter gir en signifikant oppregulering av Mx-uttrykk, og at erytrocytter dermed kan ha en antiviral respons (Wessel et al., 2015).

Våre forsøk viste at ekspresjonen av SsaMx1,2,3 i erytrocytter fra laks kan synes å være annerledes enn i de andre celletypene og vev som er studert i mastergradsarbeidet. Ekspresjonen av Mx avtok i ustimulerte celler og poly I:C-stimulerte celler sammenlignet med prøver tatt ved nullpunkt. Både i dette arbeidet og tidligere arbeider har man sett at stimulering med dsRNA i form av poly I:C, har gitt en oppregulering i ekspresjonen av SsaMx1,2,3 i andre celletyper (Nygaard et al., 2000). Det er i tillegg i tidligere studier av erytrocytter fra laks vist at man får en induksjon av SsaMx1,2,3 ved stimulering med poly I:C, men at denne er mye svakere enn hva man ser i andre celletyper (Workenhe et al., 2008). Det at ekspresjonen av SsaMx1,2,3 avtok også i ustimulerte erytrocytter, viser at inkuberingen kan ha påvirket ekspresjonen av Mx i erytrocytter. Om dette skyldes at levedyktigheten til cellene går ned ved inkubasjon vet vi ikke. Imidlertid viste forsøkene til Wessel og medarbeidere (2015) at det er mulig å inkubere erytrocytter i medium, samt at også Workenhe og medarbeidere (2008) inkuberte erytrocytter i L-15 medium med suksess (Workenhe et al., 2008; Wessel et al., 2015).

Mens ekspresjonen av Mx avtok ved stimulering med poly I:C og i ustimulerte celler, førte stimulering med IFN α til en gjenoppretting av genekspresjonen, slik at ekspresjonen var relativt lik som hos nullpunktprøvene. Dette tyder på at Mx i erytrocytter stimuleres av IFN-I, noe som er typisk for Mx-gener. Poly I:C simulerer en virusinfeksjon, og har i andre studier vist å aktivere IFN-produksjon via PRRer. Slik sett skulle en stimulering med poly I:C ha ført til en oppregulering av IFN-I, slik som man har observert hos regnbueørret (Morera et al., 2011). Denne oppreguleringen av IFN-I skulle videre gitt en induksjon av SsaMx1,2,3, men dette ser ikke ut til å ha vært tilfelle i mitt forsøk. Årsaken til hvorfor det ikke observeres noen induksjon av SsaMx1,2,3 er usikker. En mulig forklaring kunne være at erytrocytter hos laks mangler reseptorer for dsRNA, men dette er mindre sannsynlig da TLR3 finnes hos erytrocytter hos regnbueørret, og at man tidligere har sett en induksjon i ekspresjonen av Mx i erytrocytter ved stimulering med poly I:C (Workenhe et al., 2008; Morera et al., 2011). En annen mulighet er at stimuleringen med poly I:C ikke har vært helt vellykket.

Et annet interessant funn er at erythrocytter virker å ha en høyere basal ekspresjon av SsaMx1,2,3 sammenlignet med de andre celletypene og vev vi har sett på (Appendix IV). Dette ble også observert i en enkel pilotstudie på erythrocytter gjennomført tidligere i mastergradsarbeidet. Her var den basale ekspresjonen av SsaMx1,2,3 så høy at det ble valgt å også sjekke prøvene for PRV. Dette da infeksjon med PRV har vist at viruset kan replikere i erythrocytter, og føre til oppregulering av Mx i disse cellene (Wessel et al., 2015). RT-qPCR detekterte ingen forekomst av PRV i erythrocyttene, og det ble dermed antatt at erythrocyttene har høy basal ekspresjon av Mx.

4.4 Ekspresjon av SsaMx2, et mulig kjernelokalisert Mx-protein

I tidligere forsøk har immunhistokjemi indikert at Mx (SsaMx1,2,3) var sterkere uttrykt i cellekjerner i pankreas enn i lever hos fisk etter i.m. injeksjon med IFNc-plasmid (Jenssen, 2015). Siden SsaMx2 er en kjernevariant av Mx, skulle man på bakgrunn av dette derfor forvente at SsaMx2 uttrykkes sterkere i pankreas enn i lever.

I dette arbeidet observeres det imidlertid ingen store forskjeller i relativ ekspresjon av hverken SsaMx1,2,3 eller SsaMx2 i lever og pankreas etter injeksjon med IFNc-plasmid (Fig. 17). Dette indikerer at det ikke er noen sterkere ekspresjon av Mx i cellekjerner i pankreas enn i lever, i motsetning til hva man tidligere har observert (Jenssen, 2015). Det som dog er verdt å nevne er at en immunhistokjemi angir forekomsten av Mx på proteinnivå, mens en RT-qPCR-analyse angir forekomsten av mRNA. Det er ikke nødvendigvis slik at det er en perfekt match mellom mRNA-nivå og proteinnivå. Det er også en mulighet for at den tidligere observerte fargingen av Mx-protein ved immunhistokjemi skyldes uspesifikk bakgrunnsfarging.

Ved å sammenligne den relative økningen i genekspresjon av SsaMx1,2,3 og SsaMx2 i lever og pankreas kan det forøvrig se ut som om at Mx induseres kraftigere i lever enn i pankreas ved i.m. injeksjon av IFNc plasmid. Et annet interessant funn i dette arbeidet er at man ved RT-qPCR-analyser får betydelig lavere relativ ekspresjon av SsaMx1,2,3 enn SsaMx2, og dette gjelder både i lever og pankreas. Siden primer-paret SsaMx1,2,3 har spesifisitet for SsaMx1, SsaMx2 og SsaMx3 ville det vært naturlig at man fikk en høyere ekspresjon av dette enn ved bruk av primer-paret som er spesifikt for kun SsaMx2. Dette resultatet kan muligens henge sammen med forskjeller i primereffektivitet eller med forskjeller i spesifisitet mellom primerparene. Det siste kan bety at et av primerparene amplifiserer andre transkripter uspesifikt.

4.5 Har Mx-gener på kromosom 9 og 25 utviklet nye funksjoner?

I studiet som er presentert ser vi store forskjeller i hvorvidt de ulike Mx-genene oppreguleres av IFN-I, poly I:C, og ved virusinfeksjon. Studiet er dermed assosiert med Mx-geners klassiske antivirale effekt. Det som går igjen i alle forsøk er at SsaMx9 induseres svakere både ved ulike stimuleringer, og ved infeksjon med ILAV. I stimuleringsforsøkene på SSP-9 celler ser man ingen økning av SsaMx9 ved noen stimuleringer eller tidspunkter, og vi ser heller ingen signifikant oppregulering av SsaMx9 ved ILAV-infeksjon ($p > 0.05$). Det kan dermed være interessant å få undersøkt om SsaMx9 kan ha en annen funksjon enn antiviral beskyttelse.

Andre funksjoner enn antiviral beskyttelse er blant annet observert i Mx-proteiner hos mennesker. Her har man påvist at ekspresjon MxB kan bidra til å hindre infeksjon med humant immunosvikt virus type 1 (HIV-1) (Liu et al., 2013; Opp, Vieira, Schulte, Chanda & Diaz-Griffero, 2015). Men man har også vist at MxB muligens spiller en rolle i cellulære prosesser, slik som proteintransport via kjerneporer og cellesyklus-progresjon (King, Raposo & Lemmon, 2004).

I disse forsøkene har vi kun sett på ekspresjonen av Mx-genene, og ikke gått videre og undersøkt de ulike proteinenes funksjon. Dette gjør også at det er mulig at noen av genene uttrykkes, men i virkeligheten ikke har noen funksjon. Disse kan i så fall ha oppstått ved duplikasjon og påfølgende mutasjoner av funksjonelle Mx-gener.

4.6 Begrensninger i metodikken som er brukt

En av begrensningene i forsøksoppsettene er at ikke alle primerpar er benyttet i alle forsøk. Det er kun i forsøket med ILAV-smitte av ASK-celler at alle primerparene ble undersøkt. Dette burde også blitt gjort i stimuleringsstudiet med SSP-9 celler og på fornyreprøvene etter i.m. injeksjon med IFNc-plasmid, men på det tidspunktet disse forsøkene ble gjennomført var ikke alle primere tilgjengelige. I erytrocytter var man først og fremst interessert i å se på hvorvidt inkubasjon og behandling med IFNa og poly I:C påvirker ekspresjonen av Mx, og det var derfor mest interessant å se på de genene som har hatt høyest ekspresjon i tidligere forsøk i mastergradsarbeidet (SsaMx1,2,3). I videre arbeid med erytrocytter vil det være naturlig å også se på ekspresjon av de øvrige Mx-genene, for å se etter eventuelle forskjeller. Når det gjelder undersøkelsen av ekspresjon av ulike Mx-gener i lever og pankreas etter i.m. injeksjon av IFNc-plasmid ble dette først og fremst gjort for å følge opp tidligere studier (Jenssen, 2015). Her ble det ved immunhistokjemi observert sterkere farging av Mx i cellekjernen i pankreas enn i lever.

Diskusjon

Siden SsaMx2 har kjernelokalisering, var dette det genet som var mest interessant å se på for å finne eventuelle forskjeller i ekspresjon i pankreas og lever. Primerparet for SsaMx1,2,3 ble i tillegg undersøkt da dette også amplifiserer SsaMx2.

Optimalt sett skulle man hatt et primerpar for hvert enkelt Mx-gen, men dette har vist seg vanskelig å utvikle. Dette henger blant annet sammen med stor sekvenslikhet mellom de ulike Mx-genene, noe som gjør at det er stor fare for at en primer binder til flere av genene. Et eksempel på dette er primerparet SsaMx1,2,3, som har spesifisitet både for SsaMx1, SsaMx2 og SsaMx3. Man har klart å designe primere som er spesifikke for SsaMx1, SsaMx2, SsaMx4, SsaMx5 og SsaMx9. Det er likevel en fare for at også disse binder uspesifikt til andre gener. Dette kan for eksempel være tilfelle for primerparet for SsaMx2, som vi jo har sett har gitt høyere relativ ekspresjon i enkelte forsøk enn primerparet SsaMx1,2,3 (som vi vet binder to gener, i tillegg til SsaMx2). En bør derfor sekvensere DNA-produktet som blir oppformert av de ulike primerparene for å være sikre på at de har forventet spesifisitet. Det ville dessuten være ønskelig å finne primerpar som er spesifikke for SsaMx3, SsaMx6, SsaMx7 og SsaMx8 for å få et mer fullstendig bilde av ekspresjonen av Mx-genene hos laks som respons på IFN, poly I:C og ILAV-infeksjon.

I dette mastergradsarbeidet er det kun sett på genuttrykk ved hjelp av RT-qPCR. Dette gir et godt bilde på hvorvidt ekspresjonen av Mx-genene oppreguleres ved de ulike behandlingene, men har sine begrensninger. Transkripsjon fra DNA til mRNA er bare første skritt i proteinsyntesen, som fullføres med translasjon av mRNA til protein. RT-qPCR sier dermed ikke noe om mengden av sluttprodukt, og kan sies å være en kvantifisering av et mellomprodukt. Regulering i prosessen fra mRNA til protein kan gjøre at det ikke er 100 % korrelasjon mellom genuttrykk og proteinuttrykk. For å se hvor vidt Mx-proteinene uttrykkes kunne man benytte western blot, og på denne måten sett om Mx-genene uttrykkes som protein. Det er utviklet antistoff for Mx hos laks som gjenkjenner SsaMx1, SsaMx2 og SsaMx3, men antakelig ikke de andre Mx proteinene hos laks.

I forsøkene gjort på fornyre, lever og pankreas etter i.m. injeksjon med IFN α -plasmid kunne det med fordel vært kontrollgrupper med lik behandling for alle organer. Dette ble dessverre ikke funnet nedfrosset, og dermed var kontrollgruppen fra fornyre hentet fra fisk injisert med pcDNA3.3, mens kontrollgruppen for lever og pankreas stammet fra fisk injisert med PBS. Dette har for så vidt ingen betydning når vi ser på forskjeller i relativ ekspresjon, fordi tidligere

studier har vist at verken PBS eller pcDNA3.3 gir systemisk induksjon av ISG hos laks. Men det er ugunstig for å eventuelt kunne sammenligne relativ økning i genekspresjon mellom de ulike organene. Ved et eventuelt senere forsøk vil det være en fordel om man benytter samme kontroll gjennom hele forsøket.

Generelt er alle analyser i oppgaven basert på et begrenset antall individer eller prøver (n=2 til 4). Det at datasettene var så små, gjorde at det ikke framsto hensiktsmessig å kjøre statistikk på alle resultatene fra forsøkene. På tross av dette ble statistikk kjørt for å se om de små endringene som ble observert i ekspresjon av SsaMx9 kunne anses som signifikante. Ved større datasett med flere prøver eller individer ville det vært mer hensiktsmessig å kjøre statistikk på alle resultatene, samt at større datasett ville gitt mer robuste data. Dette er verdt å merke seg for eventuelt videre arbeid på området.

4.7 Hva bør gjøres videre?

Ved videre undersøkelser av Mx-genenes ekspresjon og eventuelt funksjon bør man utvikle primere som spesifikt oppformerer SsaMx3, SsaMx6, SsaMx7 og SsaMx8. En bør også vurdere å gjøre absolutt kvantitering av Mx-transkripter med qPCR. En bør dessuten lage antistoff som er spesifikt for Mx-proteinene som kodes av gener på kromosom 25 og for SsaMx9. Dermed kan en studere proteinkspresjonen av disse genene med for eksempel Western blotting eller immunhistokjemi. Sistnevnte kan brukes til å se om det er spesielle celler som uttrykker Mx-proteiner kodet av kromosom 9, 12 og 25.

Det er også viktig å studere ekspresjon av Mx-genene på kromosom 9 og 25 ved stimulering av celler med IFN- γ , altså IFN-II, som virker via en annen reseptorer enn IFN-I, og aktiverer en annen JAK-STAT signalvei. Tidligere er det vist at IFN- γ induserer ekspresjon av SsaMx1,2,3 i TO-celler, men at denne induksjonen ikke er like kraftig som ved stimulering med IFN-I (Sun et al., 2011). Det vil også være interessant å gjøre studier der man benytter for eksempel DNA, for å se på om dette kan indusere noen av de nyoppdagede Mx-genene. I et slikt arbeid vil det også være aktuelt å se på promotersekvensene i de ulike Mx-genene, for å undersøke om alle faktisk har ISRE.

4.8 Konklusjon

- Behandling av SSP-9 celler med IFNa, IFNc og poly I:C viste at SsaMx1,2,3 og SsaMx2 på kromosom 12, og SsaMx4 og SsaMx5 på kromosom 25, ble oppregulert ved alle behandlinger. SsaMx9 på kromosom 9 ble derimot ikke oppregulert. Dette indikerer at SsaMx1,2,3, SsaMx2, SsaMx4 og SsaMx5 har ISRE i promoteren, men at SsaMx9 ikke har dette elementet i sin promoter.
- ILAV-smitte av ASK-celler viste induksjon av Mx-gener på kromosom 12 og kromosom 25 mens SsaMx9 på kromosom 9 ikke ble oppregulert. Dette støtter at SsaMx9 mangler ISRE og andre virusresponsive elementer i promoteren.
- Undersøkelser av ekspresjon av SsaMx1,2,3 i erytrocytter viste at disse har en høy basal ekspresjon av Mx-genene sammenlignet med andre undersøkte celletyper. Forsøket viste også at ekspresjonen avtar ved inkubering, mens IFNa-stimulering fører til at ekspresjonen gjenopprettes til opprinnelig nivå.
- Intramuskulær injeksjon av IFNc-plasmid hos presmolt førte til induksjon av SsaMx1,2,3, SsaMx4 og SsaMx5 i fornyre. Dette var forventet ut fra at IFNc virker systemisk og at IFNc oppregulerte disse genene i SSP-9 celler. Det er likevel verdt å merke at den relative ekspresjonen var høyere hos SsaMx1,2,3 og SsaMx4, enn hos SsaMx5 og SsaMx9. Økningen i ekspresjon av SsaMx9 var ikke signifikant ($p > 0.05$).
- Undersøkelser av lever og pankreas fra presmolt injisert intramuskulært med IFNc-plasmid viste ingen store forskjeller i ekspresjon av SsaMx2 mellom organene. SsaMx2 antas å være lokalisert til kjernen. Det ble observert en større økning i relativ ekspresjon av både SsaMx1,2,3 og SsaMx2 i lever enn i pankreas etter injeksjon av IFNc-plasmid.
- Resultater fra forsøkene i dette mastergradsarbeidet indikerer at SsaMx1, SsaMx2, SsaMx3, SsaMx4 og SsaMx5 er typiske IFN-induserte gener mens SsaMx9 ikke er det. Dette kan tyde på at SsaMx9 har utviklet andre funksjoner enn antiviral aktivitet.

5 Referanser

- Aamelfot, M., Dale, O. B. & Falk, K. (2014). Infectious salmon anaemia - pathogenesis and tropism. *Journal of Fish Diseases*, 37(4), 291-307.
- Abbas, A. K., Lichtman, A. H. & Pillai, S. (2012). *Basic immunology - Functions and disorders of the immune system (Fourth Edition)*. Philadelphia: Elsevier Saunders.
- Aggad, D., Mazel, M., Boudinot, P., Mogensen, K. E., Hamming, O. J., Hartmann, R., Levraud, J.-P. (2009). The two groups of zebrafish virus-induced interferons signal via distinct receptors with specific and shared chains. *Journal of Immunology*, 183, 3924-3931.
- Agrawal, S. & Kandimall, E. R. (2007). Synthetic agonists of Toll-like receptors 7, 8 and 9. *Biochemical Society Transactions*, 35(6), 1461-1467.
- Akira, S., Uematsu, S. & Takeuchi, O. (2006). Pathogen recognition and innate immunity. *Cell*, 124, 783-801.
- Alexopoulou, L., Holt, A. C., Medzhitov, R. & Flavell, R. A. (2001). Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3. *Nature*, 413(6857), 732-738.
- Altmann, S. M., Mellon, M. T., Johnson, M. C., Paw, B. H., Trede, N. S., Zon, L. I. & Kim, C. H. (2004). Cloning and characterization of an Mx gene and its corresponding promoter from the zebrafish, *Danio rerio*. *Developmental & Comparative Immunology*, 28(4), 295-306.
- Barbalat, R., Lau, L., Locksley, R. M. & Barton, G. M. (2009). Toll-like receptor 2 on inflammatory monocytes induces type I interferon in response to viral but not bacterial ligands. *Nature Immunology*, 10, 1200-1207.
- Bergan, V., Jagus, R., Lauksund, S., Kileng, Ø. & Robertsen, B. (2008). The Atlantic salmon Z-DNA binding protein kinase phosphorylates translation initiation factor 2 alpha and constitutes a unique orthologue to the mammalian dsRNA-activated protein kinase R. *The FEBS Journal*, 275, 184-197.
- Bio-Rad. (2006). *Real-Time PCR Applications Guide*. Hentet 20. september, 2017 fra: <http://www.gene-quantification.de/real-time-pcr-guide-bio-rad.pdf>
- Chang, C. J., Jenssen, I. & Robertsen, B. (2016). Protection of Atlantic salmon against salmonid alphavirus infection by type I interferons IFN α , IFN β and IFN γ . *Fish & Shellfish Immunology*, 57, 35-40.
- Chang, C. J., Robertsen, C., Sun, B. & Robertsen, B. (2014). Protection of Atlantic salmon against virus infection by intramuscular injection of IFN γ expression plasmid. *Vaccine*, 32, 4695-4702.
- Chelbi-Alix, M. K. & Wietzerbin, J. (2007). Interferon, a growing cytokine family: 50 years of interferon research. *Biochimie*, 89, 713-718.
- Chemometec. (2014). *The Nucleocounter NC-100*. Hentet 22. september, 2017 fra Chemometec: <https://chemometec.com/wp-content/uploads/2015/03/990-0002-NC-100-Application-flyer.pdf>

Referanser

- Clemens, M. J. (2005). Translational control in virus-infected cells: models for cellular stress responses. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, 16, 13-20.
- Collet, B. & Secombes, C. J. (2001). The rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) Mx1 promoter. Structural and functional characterization. *European Journal of Biochemistry*, 268, 1577-1584.
- Dao, C. T. & Zhang, D. E. (2005). ISG15: a ubiquitin-like enigma. *Frontiers in Bioscience*, 10, 2701-2722.
- Daugherty, M. M. (2012). Rules of engagement: molecular insights from host-virus arms races. *Annual Review of Genetics*, 46, 677-700.
- de Weerd, N. A. & Nguyen, T. (2012). The interferons and their receptors distribution and regulation. *Immunology & Cell Biology*, 90, 483-491.
- Devold, M., Krossøy, B., Aspehaug, V. & Nylund, A. (2000). Use of RT-PCR for diagnosis of infectious salmon anemia virus (ISAV) in carrier sea trout *Salmo trutta* after experimental infection. *Diseases of Aquatic Organisms*, 40, 9-18.
- Diamond, M. S. & Farzan, M. (2013). The broad-spectrum antiviral functions of IFIT and IFITM proteins. *Nature Reviews Immunology*, 13, 46-57.
- Fiskeri- og kystdepartementet. (2008a). *FOR-2008-06-17-819: Forskrift om omsetning av akvakulturdyr og produkter av akvakulturdyr, forebygging og bekjempelse av smittsomme sykdommer hos akvatiske dyr*. Hentet September 25, 2017 fra <https://lovdata.no/dokument/SF/forskrift/2008-06-17-819>.
- Fiskeri- og Kystdepartementet. (2008b). *FOR:2008-06-17-822: Forskrift om drift av akvakulturanlegg (akvakulturdriftsforskriften)*. Hentet September 25, 2017 fra <https://lovdata.no/dokument/SF/forskrift/2008-06-17-822>
- Solbakken, M., Rise, M. L., Jakobsen, K. S. & Jentoft, S. (2016). Successive losses of central immune genes characterize the Gadiformes' alternate immunity. *Genome Biology and Evolution*, 8(11), 3508-3515.
- Haller, O. & Kochs, G. (2011). Human MxA protein. An interferon-induced dynamin-like GTPase with broad antiviral activity. *Journal of Interferon & Cytokine Research*, 31, 79-87.
- Haller, O., Kochs, G. & Weber, F. (2006). The interferon response circuit: induction and suppression by pathogenic viruses. *Virology*, 344, 119-130.
- Haller, O., Stertz, S. & Kochs, G. (2007). The Mx GTPase family of interferon-induced antiviral proteins. *Microbes and Infection*, 9, 1636-1643.
- Haugland, Ø., Mikalsen, A. B., Nilsen, P., Lindmo, K., Thu, B. J., Eliassen, T. M., Evensen, Ø. (2011). Cardiomyopathy syndrome of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) is caused by a double-stranded RNA virus of the *Totiviridae* family. *Journal of Virology*, 85, 5275-5286.
- Hayden, M. S. & Ghosh, S. (2004). Signaling to NF-kappaB. *Genes & Development*, 18, 2195-2224.

Referanser

- Hjeltnes, B., Bornø, G., Jansen, M. D., Haukaas, A. & Walde, C. (2017). *Fiskehelse rapporten 2016*. Veterinærinstituttet.
- Huang, B., Huang, W. S. & Nie, P. (2013). Characterization of four Mx isoforms in the European eel, *Anguilla anguilla*. *Fish & Shellfish Immunology*, *35*, 1048-1054.
- Jensen, I., Albuquerque, A., Sommer, A.-I. & Robertsen, B. (2002). Effect of poly I:C on the expression of Mx proteins and resistance against infection by infectious salmon anaemia virus in Atlantic salmon. *Fish & Shellfish Immunology*, *13*, 311-326.
- Jensen, I. & Robertsen, B. (2002). Effect of double-stranded RNA and interferon on the antiviral activity of Atlantic salmon cells against infectious salmon anemia virus and infectious pancreatic necrosis virus. *Fish & Shellfish Immunology*, *13*, 221-241.
- Jensen, S. & Randrup Thomsen, A. (2012). Sensing of RNA viruses: a review of innate immune receptors involved in recognizing RNA virus invasion. *Journal of Virology*, *86*(6), 2900-2910.
- Jenssen, I. (2015). *Effekt av interferon-plasmider på ekspresjon av antiviralt Mx-protein i pankreas og beskyttelse mot SAV3-infeksjon hos atlantisk laks (Salmo salar L.)*. Masteroppgave. Universitetet i Tromsø.
- Jørgensen, J. B. (2014). The innate immune response in fish. *Fish Vaccination*, 85-103.
- Karlsen, M., Tingbø, T., Solbakk, I. T., Evensen, Ø., Furevik, A. & Aas-Eng, A. (2012). Efficacy and safety of an inactivated vaccine against Salmonid alphavirus (family *Togaviridae*). *Vaccine*, *30*(38), 5688-5694.
- Kato, H., Sato, S., Yoneyama, M., Yamamoto, M., Uematsu, S., Matsui, K. & Akira, S. (2005). Cell type-specific involvement of RIG-I in antiviral response. *Immunity*, *23*, 19-28.
- Kibenge, F. S., Godoy, M. G., Fast, M., Workenhe, S. & Kibenge, M.J. (2012). Countermeasures against viral diseases of farmed fish. *Antiviral Research*, *95*(3), 257-281.
- Kileng, Ø., Brundtland, M. I. & Robertsen, B. (2007). Infectious salmon anemia virus is a powerful inducer of key genes of the type I interferon system of Atlantic salmon, but is not inhibited by interferon. *Fish & Shellfish Immunology*, *23*, 378-389.
- King, M. C., Raposo, G. & Lemmon, M. A. (2004). Inhibition of nuclear import and cell-cycle progression by mutated forms of the dynamin-like GTPase MxB. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *101*(24), 8957-8962.
- Kjærner-Semb, E., Ayllon, F., Furmanek, T., Wennevik, V., Dahle, G., Niemelä, E. & Edvardsen, R. B. (2016). Atlantic salmon populations reveal adaptive divergence of immune related genes - a duplicated genome under selection. *BMC Genomics*, *17*, 610.
- Kollewe, C., Mackensen, A. C., Neumann, D., Knop, J., Cao, P. & Li, S. (2004). Sequential autophosphorylation steps in the interleukin-1 receptor-associated kinase-1 regulate its availability as an adapter in interleukin-1 signaling. *The Journal of Biological Chemistry*, *279*, 5227-5236.
- Kumar, H., Kawai, T. & Akira, S. (2011). Pathogen recognition by the innate immune system. *International Reviews of Immunology*, *30*, 16-34.

Referanser

- Kumar, H., Kawai, T., Kato, H., Sato, S., Takahashi, K., Coban, C. & Akira, S. (2006). Essential role of IPS-1 in innate immune responses against RNA viruses. *The Journal of Experimental Medicine*, 203(7), 1795-1803.
- Larsen, R., Røkenes, T. P. & Robertsen, B. (2004). Inhibition of infectious pancreatic necrosis virus replication by atlantic salmon Mx1 protein. *Journal of Virology*, 78(15), 7938-7944.
- Li, G., Zhang, J., Sun, Y., Wang, H. & Wang, Y. (2009). The evolutionarily dynamic IFN-inducible GTPase proteins play conserved immune functions in vertebrates and cephalochordates. *Molecular Biology and Evolution*, 26(7), 1619-1630.
- Life Technologies. (2014). *Real-time PCR handbook*. Hentet 9. mai, 2017 fra <http://www.lifetechnologies.com/no/en/home/global/forms/real-time-pcr-handbook-lt.html>
- Lin, S. C., Lo, Y. C. & Wu, H. (2010). Helical assembly in the MyD88-IRAK4-IRAK2 complex in TLR/IL-1 R signalling. *Nature*, 465(7300), 885-890.
- Lindenmann, J. (1962). Resistance of mice to mouse-adapted influenza A virus. *Virology*, 16, 203-204.
- Lindenmann, J., Lane, C. A. & Hobson, D. (1963). The resistance of A2G mice to myxoviruses. *Journal of Immunology*, 90, 942-951.
- Liu, Z., Pan, Q., Ding, S., Qian, J., Xu, F., Zhou, J. & Liang, C. (2013). The interferon-inducible MxB protein inhibits HIV-1 infection. *Cell Host & Microbe*, 14, 398-410.
- Matsumiya, T. & Stafforini, D. M. (2010). Function and regulation of retinoic acid-inducible gene-I. *Critical Reviews in Immunology*, 30, 489-513.
- Matsuo, A., Oshiumi, H., Tsujita, T., Mitani, H., Kasai, H., Yoshimizu, M. & Seya, T. (2008). Teleost TLR22 recognizes RNA duplex to induce IFN and protect cells from birnaviruses. *Journal of Immunology*, 181, 3474-3485.
- Mjaaland, S., Markussen, T., Sindre, H., Kjøglum, S., Dannevig, B. H., Larsen, S. & Grimholt, U. (2005). Susceptibility and immune responses following experimental infection of MHC compatible Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) with different infectious salmon anemia virus isolates. *Archives of Virology*, 150, 2195-2216.
- Mogensen, T. H. (2009). Pathogen recognition and inflammatory signaling in innate immune defenses. *Clinical Microbiology Reviews*, 22, 240-273.
- Morera, D., Roher, N., Ribas, L., Balasch, J. C., Doñate, C., Callol, A. & MacKenzie, S. A. (2011). RNA-Seq Reveals an Integrated Immune Response in Nucleated Erythrocytes. *PLOS ONE*, 6(10), e26998.
- Nakajima, E., Morozumi, T., Tsukamoto, K., Watanabe, T., Plastow, G. & Mitsuhashi, T. (2007). A naturally occurring variant of porcine Mx1 associated with increased susceptibility to influenza virus *in vitro*. *Biochemical Genetics*, 45, 11-24.
- Nygaard, R., Husgard, S., Sommer, A.-I., C. Leong, J.-A. & Robertsen, B. (2000). Induction of Mx protein by interferon and double-stranded RNA in salmonid cells. *Fish & Shellfish Immunology*, 10, 435-350.

Referanser

- Olsvik, P. A., Lie, K. K., Jordal, A. E., Nilsen, T. O. & Hordvik, I. (2005). Evaluation of potential reference genes in real-time RT-PCR studies of Atlantic salmon. *BMC Molecular Biology*, 6, 21.
- Opp, S., Vieira, D. A. S. A., Schulte, B., Chanda, S. K. & Diaz-Griffero, F. (2015). MxB is not responsible for the blocking of HIV-1 infection observed in alpha interferon-treated cells. *Journal of Virology*, 90(6), 3056-3064.
- Pestka, S., Krause, C. D. & Walter, M. R. (2004). Interferons, interferon-like cytokines and their receptors. *Immunological Reviews*, 202, 8-32.
- Pfaffl, M. W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research*, 29(9), 45.
- Promega. (2016). *Technical Manual - FuGENE HD Transfection Reagent*. Hentet 20. oktober, 2017 fra Promega: <https://www.promega.com/-/media/files/resources/protocols/technical-manuals/101/fugene-hd-transfection-reagent.pdf>
- Rebl, A., Goldammer, T. & Seyfert, H.-M. (2010). Toll-like receptor signaling in bony fish. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 134(3), 139-150.
- Reed, L. H. (1938). A simple method for estimating fifty percent endpoints. *American Journal of Hygiene*, 27, 493-497.
- Rimstad, E., Dale, O. B., Dannevig, B. H. & Falk, K. (2011). Infectious salmon anemia. I P. T. Woo & D. W. Bruno, *Fish diseases and disorders. Volume 3: Viral, bacterial and fungal infections*. (ss. 143-165). Wallingford: CABI.
- Roberts, R. J. & Pearson, M. D. (2005). Infectious pancreatic necrosis in Atlantic salmon, *Salmo salar* L. *Journal of Fish Diseases*, 28, 383-390.
- Robertsen, B. (2006). The interferon system of teleost fish. *Fish & Shellfish Immunology*, 20, 172-191.
- Robertsen, B. (2017). The role of type I interferons in innate and adaptive immunity against viruses in Atlantic salmon. *Developmental and Comparative Immunology*, 1-12.
- Robertsen, B., Trobridge, G. & Leong, J.-A. (1997). Molecular cloning of double-stranded RNA inducible MX genes from atlantic salmon. *Developmental & Comparative Immunology*, 21(5), 397-412.
- Rodriguez Saint-Jean, S., Gonzáles, C., Monrás, M., Romero, A., Ballesteros, N., Enríquez, R. & Perez-Prieto, S. (2014). Establishment and characterization of a new cell line (SSP-9) derived from Atlantic salmon *Salmo salar* that expresses type I IFN. *Journal of Fish Biology*, 85(5), 1526-1545.
- Rothenburg, S., Deigendesch, N., Dey, M., Dever, T. E. & Tazi, L. (2008). Double-stranded RNA-activated protein kinase PKR of fishes and amphibians: varying the number of double-stranded RNA binding domains and lineage-specific duplications. *BMC Biology*, 6, 12.
- Rothenburg, S., Deigendesch, N., Dittmar, K., Koch-Nolte, F., Haag, F., Lowenhaupt, K. & Rich, A. (2005). A PKR-like eukaryotic initiation factor 2alpha kinase from zebrafish

Referanser

- contains Z-DNA binding domains instead of dsRNA binding domains. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102, 1602-1607.
- Røkenes, T. P., Larsen, R. & Robertsen, B. (2007). Atlantic salmon ISG15: expression and conjugation to cellular proteins in response to interferon, double-stranded RNA and virus infections. *Molecular Immunology*, 21, 950-959.
- Sadler, A. J. & Williams, B. R. (2008). Interferon-inducible antiviral effectors. *Nature Reviews / Immunology*, 8, 559-568.
- Samuel, C. E. (2001). Antiviral actions of interferons. *Clinical Microbiology Reviews*, 14, 778-809.
- Sasaki, K., Yoneda, A., Ninomiya, A., Kawahara, M. & Watanabe, T. (2013). Both antiviral activity and intracellular localization of chicken Mx protein depend on a polymorphism at amino acid position 631. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 430, 161-166.
- Schmittgen, T. D. & Livak, K. J. (2008). Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nature Protocols*, 3(6), 1101-1108.
- Schoggins, J. W., Wilson, S. J., Panis, M., Murphy, M. Y., Jones, C. T., Bieniasz, P. & Rice, C. M. (2011). A diverse range of gene products are effectors of the type I interferon antiviral response. *Nature*, 472, 481-485.
- Schwemmle, M., Richter, M. F., Nassar, N. & Staehli, P. (1995). Unexpected structural requirements for GTPase activity of the interferon-induced MxA protein. *Journal of Biology*, 270, 13518-13523.
- Sen, G. C. & Peters, G. A. (2007). Viral stress-inducible genes. *Advances in Virus Research*, 70, 233-263.
- Shoggins, J. W. & Rice, C. M. (2011). Interferon-stimulated genes and their antiviral effector functions. *Current Opinion in Virology*, 1, 519-525.
- Sommereyns, C. S., Paul, S. & Staehli, P. M. (2008). IFN-lambda (IFN λ) is expressed in tissue-dependent fashion and primarily act on epithelial cells *in vivo*. *PLOS Pathogens*, 4, 1-11.
- Staehli, P., Haller, O., Boll, W., Lindenmann, J. & Weissmann, C. (1986). Mx protein: constitutive expression in 3T3 cells transformed with cloned Mx cDNA confers selective resistance to influenza virus. *Cell*, 44, 147-158.
- Staehli, P., Yu, Y., Grob, R. & Haller, O. (1989). A double-stranded RNA-inducible fish gene homologous to the murine influenza virus resistance gene Mx. *Molecular and Cell Biology*, 9, 3117-3121.
- Strandskog, G., Ellingsen, T. & Jørgensen, J. B. (2007). Characterization of three distinct CpG oligonucleotide classes which differ in ability to induce IFN α/β activity and cell proliferation in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) leukocytes. *Developmental & Comparative Immunology*, 31(1), 39-51.
- Sun, B., Greiner-Tollersrud, L., Koop, B. F. & Robertsen, B. (2014). Atlantic salmon possesses two clusters of type I interferon receptor genes on different chromosomes, which allows

Referanser

- for a larger repertoire of interferon receptors than in zebrafish and mammals. *Developmental and Comparative Immunology*, 47, 275-286.
- Sun, B., Skjæveland, I., Svingerud, T., Zou, J., Jørgensen, J. B. & Robertsen, B. (2011). Antiviral activity of salmonid gamma interferon against infectious pancreatic necrosis virus and salmonid alphavirus and its dependency of type I interferon. *Journal of Virology*, 85, 9188-9198.
- Svingerud, T. (2013). Atlantic salmon type I interferons - Induction and antiviral activity. A dissertation for the degree of Philosophiae Doctor. Universitetet i Tromsø.
- Svingerud, T., Holand, J. K. & Robertsen, B. (2013). Infectious salmon anemia virus (ISAV) replication is transiently inhibited by Atlantic salmon type I interferon in cell culture. *Virus Research*, 177, 163-170.
- Svingerud, T., Solstad, T., Sun, B., Nyrud, M.L., Kileng, Ø., Greiner-Tollersrud, L. & Robertsen, B. (2012). Atlantic salmon type I subtypes show differences in antiviral activity and cell-dependent expression: evidence for high IFN β /IFN γ -producing cells in fish lymphoid tissues. *The Journal of Immunology*, 189(12), 5912-5923.
- Workenhe, S. T., Kibenge, M. J. T, Wright, G. M., Wadowska, D. W., Groman, D. B. & Kibenge, F. S. B. (2008). Infectious salmon anaemia virus replication and induction of alpha interferon in Atlantic salmon erythrocytes. *Virology Journal*, 5, 36.
- Tafalla, C., Chico, V., Pérez, L., Coll, J. M. & Estepa, A. (2007). *In vitro* and *in vivo* differential expression of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) Mx isoforms in response to viral haemorrhagic septicaemia virus (VHSV) G gene, poly I:C and VHSV. *Fish & Shellfish Immunology*, 23, 210-221.
- Takano, T., Hwang, S. D., Kondo, H., Hirono, I., Aoki, T. & Sano, M. (2010). Evidence of molecular Toll-like receptor mechanisms in teleosts. *Fish Pathology*, 45(1), 1-16.
- Trobridge, G. D., Ciou, P. P. & C. Leong, J.-A. (1997). Cloning of the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) Mx2 and Mx3 cDNAs and characterization of trout Mx protein expression in salmon cells. *Journal of Virology*, 71(7), 5304-5311.
- Trobridge, G. D., LaPatra, S. E., Kim, C. H. & Leong, J. C. (2000). Mx mRNA expression and RFLP analysis of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* genetic crosses selected for susceptibility or resistance to IHNV. *Diseases of Aquatic Organisms*, 40, 1-7.
- Trobridge, G. D. & C. Leong, J.-A. (1995). Characterization of a rainbow trout Mx gene. *Journal of Interferon and Cytokine Research*, 15, 691-702.
- Verhelst, J., Hulpiau, P. & Saelens, X. (2013). Mx proteins: Antiviral gatekeepers that restrain the uninvited. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 77(4), 551-566.
- Verrier, E. R., Langevin, C., Benmansour, A. & Boudinot, P. (2011). Early antiviral response and virus-induced genes in fish. *Developmental and Comparative Immunology*, 35, 1204-1214.
- Wessel, Ø., Moræus Olsen, C., Rimstad, E. & Krudtaa Dahle, M. (2015). Piscine orthoreovirus (PRV) replicates in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) erythrocytes *ex vivo*. *Veterinary Research*, 46, 26.

Referanser

- Xu, C., Evensen, Ø. & Munang'andu, H. M. (2015). De novo assembly and transcriptome analysis of Atlantic salmon macrophage/dendritic-like TO cells following type I IFN treatment and salmonid alphavirus subtype-3 infection. *BMC Genomics*, 16(1), 96.
- Yamamoto, M., Sato, S., Hemmi, H., Hoshino, K., Kaisho, T., Sanjo, H. & Akira, S. (2003). Role of adaptor TRIF in the MyD88-independent toll-like receptor signaling pathway. *Science*, 301, 640-643.
- Yoneyama, M. & Fujita, T. (2009). RNA recognition and signal transduction by RIG-I-like receptors. *Immunological Reviews*, 227, 54-65.
- Yoneyama, M., Kikuchi, M., Natsuwaka, T., Shinobu, N., Imaizumi, T., Miyagishi, M., Taira, K., Akira, S. & Fujita, T. (2004). The RNA helicase RIG-I has an essential function in double-stranded RNA-induced innate antiviral responses. *Nature Immunology*, 5, 730-737.
- Zhu, L.-Y., Nie, L., Zhu, G., Xiang, L.-X. & Shao, J.-Z. (2013). Advances in research of fish immune-relevant genes: a comparative overview of innate and adaptive immunity in teleosts. *Developmental & Comparative Immunology*, 39(1), 39-62.
- Zou, J. & Secombes, C. J. (2011). Teleost fish interferons and their role in immunity. *Developmental and Comparative Immunology*, 35, 1376-1387.

Appendix I - Reagenser

| Reagenser | Produsent |
|--------------------------------------|---------------------------------------|
| Benzoak | ACD Pharmaceuticals |
| Cell counting lysis buffer | Chemometec |
| Cell counting stabilizing buffer | Chemometec |
| Etanol (>99,8 %) | Sigma-Aldrich |
| Fast SYBR®Green Master Mix | Applied Biosystems |
| Fetal bovine serum, FBS | Biochrom AG |
| Heparin | LEO Pharma AS |
| Leibovitz's L-15 medium, L-15 | Gibco®, Life Technologies |
| Fosfatbufret saltvann (PBS) | NFH |
| Percoll | GE Healthcare |
| Poly I:C | GE Healthcare |
| Primere | Sigma-Aldrich |
| Proteinase K | New England Biolabs |
| Quantitect Reverse Transcription Kit | Qiagen |
| RLT-lysisbuffer | Qiagen |
| RNA-later® | Ambion®, Life Technologies |
| RNeasy® Mini Kit | Qiagen |
| SYBR®Green PCR Master Mix | Applied biosystems, Life Technologies |
| Trizol | Invitrogen |
| Ultra Pure Water | Biochrom AG |
| 2-Mercaptoetanol | Sigma-Aldrich |

Appendix II – RT-qPCR spesifikasjoner**RT-qPCR spesifikasjoner for de ulike forsøk****Tabell 1. Totalt input av RNA i hver cDNA-reaksjon og fortykning av cDNA for videre qPCR-analyser.**

| Delforsøk | Total input av RNA | Fortynning |
|---|---------------------------|-------------------|
| Ekspresjon av Mx-gener i SSP-9 celler stimulert med IFNa, IFNc og poly I:C | 600 ng | 1:5 |
| Ekspresjon av Mx-gener i ASK-celler smittet med ILAV | 200 ng | 1:5 |
| Ekspresjon av SsaMx1,2,3 i erytrocytter stimulert med IFNa og poly I:C | 600 ng | 1:5 |
| Ekspresjon av Mx-gener i fornyre etter i.m. injeksjon av IFNc-plasmid | 600 ng | 1:5 |
| Ekspresjon av Mx-gener i lever og pankreas etter i.m. injeksjon av IFNc-plasmid | 1000 ng | 1:10 |

Tabell 2. Volum cDNA benyttet i hvert enkelt forsøk.

| Delforsøk | cDNA volum i 15 µl- reaksjon | qPCR assay |
|---|---------------------------------|------------|
| Ekspresjon av Mx-gener i SSP-9 celler stimulert med IFNa, IFNc og poly I:C | 6 µl | SYBR®Green |
| Ekspresjon av Mx-gener i ASK-celler smittet med ILAV | 6 µl | SYBR®Green |
| Ekspresjon av Mx-gener i erythrocytter stimulert med IFNa og poly I:C | 6 µl | SYBR®Green |
| Ekspresjon av Mx-gener i fornyre etter i.m. injeksjon av IFNc-plasmid | 6 µl | SYBR®Green |
| Ekspresjon av Mx-gener i lever og pankreas etter i.m. injeksjon av IFNc-plasmid | 5 µl (14 µl total reaksjon) | SYBR®Green |

Appendix III – Løsninger til RT-qPCR

Løsninger til RT-qPCR

Tabell 1. Reagenser i trinn 1 av cDNA-syntesen av RNA. Genomisk DNA ble fjernet ved å inkubere miks på 42°C i 2 min.

| gDNA wipeout reagenser | Volum |
|------------------------------|--------------|
| gDNA wipeout-buffer | 2 µl |
| dH ₂ O | Varies |
| RNA | Varies |
| Totalt reaksjonsvolum | 14 µl |

Tabell 2. Reagenser i trinn 2 av cDNA-syntesen. Reagensene ble overført til strips med reagenser fra trinn 1, og inkubert ved 42°C i 15 min, og 95°C i 3 min.

| Reverstranskripsjons reagenser | Volum |
|--------------------------------|--------------|
| RT-primer | 1 µl |
| RT-buffer | 4 µl |
| RT-REV | 1 µl |
| RNA fra trinn 1 | 14 µl |
| Totalt | 20 µl |

Tabell 3. Reagenser benyttet i kvantitativ RT-PCR for å måle ekspresjon av Mx-gener.

| Master mix for RT-qPCR | Volum (per reaksjon) |
|------------------------|----------------------|
| FW-primer | 0,8 µl |
| RW-primer | 0,8 µl |
| SYBR®green | 7,5 µl |
| cDNA templat | 6 µl |
| Totalt | 15 µl |

Appendix IV – Basal genekspressjon

Basal genekspressjon av Mx-gener i ulike celletyper og organer relativt til EF1 α B.

Tabell 1. Relativ basal genekspressjon for SsaMx1,2,3, SsaMx2, SsaMx4, SsaMx5 og SsaMx9 i SSP-9 celler. Tabellen angir Ct-verdi for EF1 α B i ustimulerte SSP-9 celler etter 24 og 48 timers dyrking, og ekspressjon av Mx-gener relativt til dette.

| Gen | Ekspressjon relativt til EF1 α B | |
|---------------------------|---|----------|
| | 24 timer | 48 timer |
| EF1 α B (Ct-verdi) | 15,38 | 15,02 |
| SsaMx1,2,3 | 0,00041 | 0,00057 |
| SSaMx2 | – | 0,000019 |
| SsaMx4 | 0,00059 | 0,00046 |
| SsaMx5 | 0,00005 | 0,00006 |
| SsaMx9 | 0,00031 | 0,00018 |

Tabell 2. Relativ basal genekspressjon for SsaMx1,2,3, SsaMx1, SsaMx1+3, SsaMx2, SsaMx4, SsaMx5 og SsaMx9 i ASK-celler. Tabellen angir Ct-verdi for EF1 α B i ustimulerte ASK-celler etter 72 timers dyrking, og ekspressjon av Mx-gener relativt til dette.

| Gen | Ekspressjon relativt til EF1 α B |
|---------------------------|---|
| EF1 α B (Ct-verdi) | 18,18 |
| SsaMx1,2,3 | 0,0012 |
| SSaMx1 | 0,00056 |
| SsaMx1+3 | 0,0014 |
| SsaMx2 | 0,00018 |
| SsaMx4 | 0,000017 |
| SsaMx5 | 0,0000039 |
| SsaMx9 | 0,000030 |

Tabell 3. Relativ basal genekspressjon for SsaMx1,2,3 i erythrocytter. Tabellen angir Ct-verdi for EF1 α B i ustimulerte erythrocytter etter 72 timers inkubasjon, og ekspressjon av Mx-gener relativt til dette.

| Gruppe | Gen | Ekspressjon relativt til EF1 α B |
|------------|---------------------------|---|
| Presmolt 1 | EF1 α B (Ct-verdi) | 24,8 |
| | SsaMx1,2,3 | 0,145 |
| Presmolt 2 | EF1 α B (Ct-verdi) | 23,2 |
| | SsaMx1,2,3 | 0,199 |
| Smolt | EF1 α B (Ct-verdi) | 25,3 |
| | SsaMx1,2,3 | 0,076 |

Appendix IV – Basal genekspressjon

Tabell 4. Relativ basal genekspressjon for Mx-gener i fornyre. Tabellen angir Ct-verdi for EF1 α β i fornyre fra fisk injisert med kontrollplasmid (pcDNA3.3), og ekspressjon av Mx-gener relativt til dette.

| Gen | Ekspressjon relativt til EF1 α B |
|---------------------------|---|
| EF1 α B (Ct-verdi) | 16,95 |
| SsaMx1,2,3 | 0,0012 |
| SSaMx4 | 0,00076 |
| SsaMx5 | 0,0000067 |
| SsaMx9 | 0,0000085 |

Tabell 5. Relativ basal genekspressjon for SsaMx1,2,3 og SsaMx2 i lever og pankreas. Tabellen angir Ct-verdi for EF1 α β i lever og pankreas fra fisk injisert i.m. med PBS, og ekspressjon av Mx-gener relativt til dette.

| Gen | Ekspressjon relativt til EF1 α B | |
|---------------------------|---|----------|
| | Lever | Pankreas |
| EF1 α B (Ct-verdi) | 17,8 | 17,0 |
| SsaMx1,2,3 | 0,001 | 0,0037 |
| SSaMx2 | 0,0065 | 0,012 |

Appendix V – Ekspresjon av Mx-gener i ulike celletyper og organer

Tabell 1. Ct-verdier for SSP9-celler ved ulik stimulering. Tabellen viser Ct-verdier (laveste og høyeste verdi) samt gjennomsnitt mellom alle verdier for ekspresjon av EF1 α β , SsaMx1,2,3, SsaMx2, SsaMx4, SsaMx5, SsaMx9 i SSP-9 celler høstet 24 og 48 timer etter stimulering. (A) Kontroll og celler stimulert med IFNa, (B) IFNc og poly I:C (extracellulært), (C) poly I:C (intracellulært). Verdier for kontrollceller og ILAV infiserte celler, cellene er høstet 72 timer etter infeksjon.

A.

| Gen | Kontroll | | | | IFNa | | | |
|----------------|-----------|-------|-----------|-------|-----------|-------|-----------|-------|
| | 24 timer | | 48 timer | | 24 timer | | 48 timer | |
| | Variasjon | Snitt | Variasjon | Snitt | Variasjon | Snitt | Variasjon | Snitt |
| EF1 α B | 15,2-15,5 | 15,4 | 14,9-15,2 | 15,0 | 15,8-16,4 | 16,2 | 15,2-16,0 | 15,6 |
| SsaMx1,2,3 | 26,3-27,1 | 26,7 | 25,6-25,9 | 25,8 | 19,7-20,5 | 20,1 | 18,8-19,6 | 19,2 |
| SsaMx2 | – | – | 30,1-31,4 | 30,8 | – | – | 20,5-21,2 | 20,9 |
| SsaMx4 | 25,8-26,5 | 26,1 | 25,8-26,4 | 26,1 | 20,9-21,6 | 21,3 | 20,4-20,7 | 20,6 |
| SsaMx5 | 28,4-29,7 | 29,5 | 29,0-29,2 | 29,1 | 23,0-24,1 | 23,5 | 21,4-21,8 | 21,6 |
| SsaMx9 | 26,5-27,8 | 27,1 | 27,4-27,5 | 27,5 | 27,0-27,9 | 27,5 | 27,9-28,3 | 28,2 |

B.

| Gen | IFNc | | | | Poly I:C (extracellulært) | | | |
|----------------|-----------|-------|-----------|-------|---------------------------|-------|-----------|-------|
| | 24 timer | | 48 timer | | 24 timer | | 48 timer | |
| | Variasjon | Snitt | Variasjon | Snitt | Variasjon | Snitt | Variasjon | Snitt |
| EF1 α B | 15,2-15,8 | 15,4 | 15,0-15,6 | 15,3 | 14,9-15,6 | 15,2 | 14,7-15,3 | 15,1 |
| SsaMx1,2,3 | 19,8-19,9 | 19,9 | 18,8-19,0 | 18,9 | 20,5-20,9 | 20,7 | 18,2-19,0 | 18,6 |
| SsaMx2 | – | – | – | – | – | – | 21,5-22,0 | 21,7 |
| SsaMx4 | 21,2-21,5 | 21,4 | 21,0-21,2 | 21,1 | 21,6-21,7 | 21,6 | 19,5-19,9 | 19,7 |
| SsaMx5 | 23,8-24,1 | 23,9 | 22,4-22,5 | 22,5 | 24,3-24,5 | 24,4 | 20,3-20,8 | 20,5 |
| SsaMx9 | 25,8-27,7 | 26,8 | 27,6-27,8 | 27,7 | 26,6-27,7 | 27,2 | 28,1-28,8 | 28,5 |

C.

| Gen | Poly I:C (intracellulært) | | | |
|----------------|---------------------------|-------|-----------|-------|
| | 24 timer | | 48 timer | |
| | Variasjon | Snitt | Variasjon | Snitt |
| EF1 α B | 16,3-16,9 | 16,6 | 16,5-16,7 | 16,6 |
| SsaMx1,2,3 | 20,6-21,5 | 21,0 | 19,6-19,7 | 19,7 |
| SsaMx2 | – | – | 22,6-25,0 | 24,0 |
| SsaMx4 | 21,7-22,5 | 22,0 | 20,8-20,9 | 20,9 |
| SsaMx5 | 24,2-24,9 | 24,5 | 21,8-21,9 | 21,8 |
| SsaMx9 | 25,4-28,4 | 26,8 | 28,6-29,0 | 28,8 |

Appendix V – Ekspresjon av Mx-gener i ulike celletyper og organer

Tabell 2. Ct-verdier for ASK-celler etter ILAV-infeksjon. Tabellen viser Ct-verdier (laveste og høyeste verdi) samt gjennomsnitt for alle verdier for ekspresjon av EF1 α β , SsaMx1,2,3, SsaMx1+3, SsaMx1, SsaMx2, SsaMx4, SsaMx5, SsaMx9 i ASK-celler infisert med ILAV, samt kontrollceller.

| Gen | Kontroll | | ILAV infisert | |
|----------------------|-----------|-------|---------------|-------|
| | Variasjon | Snitt | Variasjon | Snitt |
| EF1 α β | 18,1-18,2 | 18,2 | 21,0-21,5 | 21,3 |
| SsaMx1,2,3 | 27,6-28,1 | 27,9 | 22,1-22,8 | 22,5 |
| SsaMx1+3 | 27,4-27,9 | 27,7 | 21,9-22,6 | 22,3 |
| SsaMx1 | 28,5-29,7 | 29,1 | 21,8-22,4 | 22,1 |
| SsaMx2 | 30,1-31,2 | 30,7 | 23,1-23,8 | 23,5 |
| SsaMx4 | 34,0-34,2 | 34,1 | 28,9-29,6 | 29,3 |
| SsaMx5 | 36,1-36,3 | 36,2 | 28,6-29,1 | 28,8 |
| SsaMx9 | 33,0-33,4 | 33,2 | 35,5-36,3 | 35,8 |

Tabell 3. Ct-verdier for erythrocytter fra atlantisk laks ved ulik stimulering. Tabellen viser Ct-verdier (laveste og høyeste verdi) samt gjennomsnitt for alle verdier for ekspresjon av EF1 α β og SsaMx1,2,3 i erythrocytter stimulert med poly I:C, IFNa, samt kontrollceller (0 timer) og ustimulerte celler. (A) 0-timers kontroll og ustimulerte celler, (B) poly I:C og IFNa.

A.

| Gruppe | Gen | 0 timer (kontroll) | | Ustimulert | |
|------------|----------------------|--------------------|-------|------------|-------|
| | | Variasjon | Snitt | Variasjon | Snitt |
| Presmolt 1 | EF1 α β | 23,8-25,9 | 24,8 | 22,6-22,9 | 22,7 |
| | SsaMx1,2,3 | 27,2-28,2 | 27,7 | 28,2-28,7 | 28,4 |
| Presmolt 2 | EF1 α β | 22,6-23,7 | 23,2 | 23,5-23,7 | 23,6 |
| | SsaMx1,2,3 | 25,6-25,7 | 25,6 | 28,3-28,5 | 28,4 |
| Smolt | EF1 α β | 25,2-25,4 | 25,3 | 22,6-22,8 | 22,7 |
| | SsaMx1,2,3 | 28,8-29,2 | 29,0 | 28,7-29,1 | 28,9 |

B.

| Gruppe | Gen | Poly I:C | | IFNa | |
|------------|----------------------|-----------|-------|-----------|-------|
| | | Variasjon | Snitt | Variasjon | Snitt |
| Presmolt 1 | EF1 α β | 21,2-22,7 | 22,0 | 22,4-22,9 | 22,7 |
| | SsaMx1,2,3 | 26,7-28,4 | 27,6 | 25,6-25,7 | 25,7 |
| Presmolt 2 | EF1 α β | 22,8-23,3 | 23,0 | 22,2-22,5 | 22,4 |
| | SsaMx1,2,3 | 27,9-28,3 | 28,1 | 24,3-24,7 | 24,5 |
| Smolt | EF1 α β | 25,8-26,0 | 25,9 | 22,5-22,7 | 22,6 |
| | SsaMx1,2,3 | 32,0-32,5 | 32,2 | 25,8-26,1 | 26,0 |

Appendix V – Ekspresjon av Mx-gener i ulike celletyper og organer

Tabell 4. Ct-verdier for fornyre hos atlantisk laks etter i.m. injeksjon med IFNc-plasmid. Tabellen viser Ct-verdier (laveste og høyeste verdi) samt gjennomsnitt for alle verdier for ekspresjon av EF1 $\alpha\beta$, SsaMx1,2,3, SsaMx4, SsaMx5 og SsaMx9 i fornyre etter i.m. injeksjon med IFNc-plasmid, samt kontrollplasmid.

| Gen | Kontrollplasmid (pcDNA3.3) | | IFNc-plasmid | |
|-------------------|----------------------------|-------|--------------|-------|
| | Variasjon | Snitt | Variasjon | Snitt |
| EF1 $\alpha\beta$ | 16,7-17,7 | 17,0 | 16,6-18,6 | 17,4 |
| SsaMx1,2,3 | 26,2-27,3 | 26,8 | 22,6-25,1 | 23,5 |
| SsaMx4 | 26,7-28,0 | 27,4 | 23,6-27,3 | 25,1 |
| SsaMx5 | 33,8-36,1 | 34,5 | 30,7-34,1 | 32,0 |
| SsaMx9 | 32,6-37,0 | 34,3 | 30,3-36,0 | 32,6 |

Tabell 5. Ct-verdier for lever og pankreas hos atlantisk laks etter i.m. injeksjon med IFNc-plasmid. Tabellen viser Ct-verdier (laveste og høyeste verdi) samt gjennomsnitt for alle verdier for ekspresjon av EF1 $\alpha\beta$, SsaMx1,2,3 og SsaMx2 i lever og pankreas etter i.m. injeksjon med IFNc-plasmid, samt PBS.

| Gen | Organ | Kontroll (PBS) | | IFNc-plasmid | |
|-------------------|----------|----------------|-------|--------------|-------|
| | | Variasjon | Snitt | Variasjon | Snitt |
| EF1 $\alpha\beta$ | Lever | 17,6-17,9 | 17,8 | 18,3-18,8 | 18,6 |
| | Pankreas | 16,4-17,6 | 17,0 | 17,6-18,5 | 18,0 |
| SsaMx1,2,3 | Lever | 27,3-28,5 | 27,8 | 24,5-25,0 | 24,7 |
| | Pankreas | 24,8-25,3 | 25,1 | 23,7-24,7 | 24,1 |
| SsaMx2 | Lever | 24,7-26,6 | 25,2 | 22,1-22,5 | 22,3 |
| | Pankreas | 22,8-24,1 | 23,5 | 21,3-22,3 | 21,8 |