



UIT

THE ARCTIC  
UNIVERSITY  
OF NORWAY

Norges fiskerihøgskole

## Antiviralt forsvar i hjertet hos atlantisk laks (*Salmo salar*)

Uttrykk av type I interferoner *in vivo* og i primære cellekulturer *in vitro*

**Astrid- Elisabeth Christiansen Hanssen**

*Masteroppgave i Fiskehelse (60 stp)*

*August 2014*





## Forord

---

Denne oppgaven ble utarbeidet ved fakultet for biologi, fiskeri og økonomi, ved Norges fiskerihøgskole, Universitetet i Tromsø. Oppgaven ble påbegynt april 2013 og avsluttet i august 2014. Oppgaven er siste del av et femårig profesjonsstudium i fiskehelse.

Først og fremst vil jeg takke min hovedveileder Ingvill Jensen for å ha gitt meg mulighet til å arbeide med et interessant og spennende fagområde. Tusen takk for ditt enorme engasjement og all støtte underveis. Din dør har alltid stått åpen og du har vært en faglig dyktig og trygg veileder. Det har selvfølgelig vært opp og nedturer, men med god veiledning og konstruktiv tilbakemelding har jeg kommet i mål, til slutt.

En stor takk rettes også til min biveileder og professor Børre Robertsen, for faglig innspill og gode tilbakemeldinger. Jeg ønsker også å rette en takk til alle de flinke folkene på labben som har svart på spørsmål og hjulpet meg underveis.

Takk til Silje Lauksund for god opplæring på lab og for at du har gitt meg svar på mange spørsmål.

Tusen takk til alle mine medstudenter for en fantastisk studietid på NFH. Takk for at vi har kunnet dele våre gleder og frustrasjoner sammen i løpet av de siste fem årene, men også en stor takk for alle faglige diskusjoner og problemstillinger som vi har møtt på. Det har vært en stor glede å få ta del i det sosiale og faglige miljøet vi har hatt blant oss, både oss studenter imellom og lærere/veiledere.

Helt til slutt vil jeg takke min kjære familie og venner for omsorg og støtte underveis. Og til min kjære og personlige hushjelp gjennom eksamenstidene, Stian, takk for at du har stått ved min side og vært den du er.

Tromsø 15. august 2014

Astrid-Elisabeth Christiansen Hanssen

## Sammendrag

Virussykdommer som rammer hjertet er utbredt i norsk lakseoppdrett, og de få virusvaksinene som finnes i dag er ikke optimale. I det medfødte immunforsvaret er type I IFN en av hovedkomponentene som beskytter verten mot virusinfeksjoner (Robertsen 2006). Type I IFN inducerer uttrykk av antivirale proteiner som kan hemme ulike trinn av virusreplikasjonen. En forståelse av hvordan interferon-systemet fungerer i laksehjertet vil dermed være viktig for å kunne utvikle profylaktiske tiltak mot virussykdommene som rammer hjerte.

I denne oppgaven har vi undersøkt genuttrykket av type I IFN i hjerte og hodenyre til atlantisk laks (*Salmo salar*) etter poly I:C injisering (*in vivo*) og i primære hjertecellekulturer etter poly I:C stimulering (*in vitro*). I tillegg ønsket vi å undersøke lokaliseringen av celler som uttrykte IFN $\gamma$  mRNA med fluorescens *in situ* hybridisering (FISH). Vi har også undersøkt genuttrykket av type I IFN etter infisering av primære cellekulturer fra hjerte med ILAV. Det ble i tillegg undersøkt om ILAV replikerer i primære cellekulturer fra hjerte.

Ut fra våre resultater så vi en økning i uttrykket av IFN $\alpha$ , IFN $\beta$  og IFN $\gamma$  i både hodenyre og hjerte 12 timer etter injisering av poly I:C *in vivo*. Tidligere forsøk (Svingerud *et al.*, 2012) har kun vist en økning i uttrykket av IFN $\alpha$  og IFN $\gamma$  i hjerte og hodenyre, mens genuttrykket av IFN $\beta$  var svært lavt.

*In vitro* stimulering med poly I:C av primære cellekulturer fra hjerte til atlantisk laks viste økt genuttrykk av IFN $\alpha$ , IFN $\beta$  og IFN $\gamma$  i alle våre forsøk. Tidligere *in vitro* studier har ikke vist økning i uttrykk av IFN $\gamma$  i laksecellelinjer eller leukocytter ved stimulering med poly I:C (Svingerud *et al.*, 2012). Fluorescerende *in situ* hybridisering (FISH)- resultatene viste at enkeltceller spredt i hjertevevet, særlig ventrikkelen, uttrykker IFN $\gamma$  og det er sannsynlig at denne celletypen er en del av våre hjertecellekulturer. Dette kan åpne opp for å studere og identifisere hvilken reseptor og signalvei som inducerer IFN $\gamma$ -responsen i det medfødte immunforsvaret.

Myocyttkulturer og endotelcellekulturer ble infisert med ILAV, isolat Glesvær. Resultatene våre tyder på at ILAV replikerer i både endotel- og myocyttkulturene etter *in vitro* infisering. Det relative genuttrykket av IFN $\alpha$ , IFN $\beta$  og IFN $\gamma$  økte i endotelcellene og myocytterne etter infisering med ILAV *in vitro*. Vi kunne også se en økning i genuttrykket av TLR3. Å kunne etablere en infeksjonsmodell for ILAV i endotelceller fra laksehjerte ville gi et unikt verktøy for å studere virus-vert interaksjoner i naturlige vertsceller for viruset.

## Innholdsfortegnelse

1	Innledning.....	4
1.1	Virussykdommer i lakseoppdrett.....	5
1.1.1	Pankreassykdom (PD).....	5
1.1.2	Hjerte og skjelettmuskelbetennelse (HSMB) .....	6
1.1.3	Infeksiøs pankreasnekrose (IPN) .....	6
1.1.4	Kardiomyopatisyndrom (CMS).....	7
1.2	Infeksiøs lakseanemi (ILA).....	7
1.3	Det medfødte immunforsvaret hos atlantisk laks .....	9
1.4	Interferonsystemet.....	9
1.5	Induksjon av type I interferon etter virus gjenkjennelse .....	11
1.6	IFN medierte signaler.....	13
1.7	Laksefiskens hjerte.....	14
1.8	Problemstilling.....	15
2	Material og metode .....	16
2.1	IFN uttrykk hos atlantisk laks i hjerte og hodenyre etter poly I:C injeksjon <i>in vivo</i> .....	16
2.1.1	Forsøksfisk.....	16
2.1.2	Prøveuttak og forsøksoppsett .....	16
2.1.3	Analyser som ble utført.....	18
2.2	Lokalisering av IFN $\alpha$ produserende celler i hjerte med fluorescerende <i>in situ</i> hybridisering (FISH).....	19
2.2.1	Dehydrering .....	20
2.2.2	Innstøping i parafinblokk.....	21
2.2.3	Snitting .....	21
2.2.4	Tillaging av prober .....	21
2.2.5	Rehydrering av snitt.....	24
2.2.6	Blokkering av endogen peroksidase.....	25
2.2.7	Preparering av snittene med RNase frie løsninger .....	25
2.2.8	Hybridisering .....	26
2.2.9	Vasking .....	26
2.2.10	Behandling med RNase A .....	27
2.2.11	Blokkering.....	27
2.2.12	Merking med antistoff .....	28
2.2.13	Amplifisering med TSA- fluorescein .....	28

2.2.14	Motfarging med DAPI .....	28
2.2.15	Montering.....	28
2.2.16	Mikroskopering.....	28
2.3	Primær cellekultur isolert fra hjerte til Atlantisk laks ( <i>Salmo salar</i> ) .....	29
2.3.1	Forsøksfisk:.....	30
2.3.2	Forsøksoppsett og prøveuttak.....	30
2.3.3	Celleisolering fra hjertet til laks .....	32
2.3.4	Celleutbytte og utsæd i celledyrkningsbrett.....	33
2.3.5	Poly I:C stimulering av mikskultur .....	34
2.3.6	Poly I:C stimulering av endotelceller og myocytter .....	34
2.3.7	Infisering av endotelceller og myocytter med ILAV .....	35
2.3.8	Høsting av celler i celledyrkningsbrett til RNA isolering.....	36
2.3.9	Utstryk fra hodenyre på agarskåler .....	36
2.3.10	Analyser som ble utført.....	36
2.4	Isolering av RNA fra organer og primære cellekulturer.....	37
2.5	cDNA- syntese .....	39
2.6	Kvantitativ real- time PCR.....	40
2.6.1	Databehandling.....	43
2.7	Titring av ILAV i supernatanter .....	44
3	Resultater.....	45
3.1	IFN uttrykk hos atlantisk laks i hjerte og hodenyre etter poly I:C stimulering <i>in vivo</i> . 45	
3.1.1	Endringer i genuttrykket av IFNa, IFNb og IFNc målt med kvantitativ qPCR etter behandling med poly I:C.....	45
3.1.2	Påvisning og lokalisering av celler som uttrykker IFNc mRNA i hjerte og hodenyre hos Atlantisk laks.....	46
3.2	IFN uttrykk i primærceller fra hjerte til Atlantisk laks .....	50
3.2.1	Morfologisk beskrivelse av primære cellekulturer fra laksehjerte .....	50
3.2.2	IFN uttrykk i mikskultur fra hjerte til Atlantisk laks etter <i>in vitro</i> poly I:C stimulering. ....	51
3.2.3	IFN uttrykk i endotelceller og myocytter fra hjerte til Atlantisk laks etter <i>in vitro</i> poly I:C stimulering. ....	53
3.2.4	Infeksjonsforsøk med ILAV i endotelceller og myocytter fra hjertet.....	55
4	Diskusjon.....	60
4.1	IFN uttrykk hos atlantisk laks i hjerte og hodenyre etter poly I:C injeksjon <i>in vivo</i> 60	
4.2	Påvisning og lokalisering av celler med IFNc genuttrykk i hjerte og hodenyre hos Atlantisk Laks.....	61

4.3	IFN uttrykk i primærceller fra hjerte til Atlantisk laks .....	62
4.4	Primære cellekulturer fra laksehjerte .....	63
4.4.1	IFN uttrykk i primære cellekulturer fra hjerte til Atlantisk laks etter in vitro poly I:C stimulering .....	63
4.5	Infeksjonsforsøk med ILAV i endotelcellekulturer og myocyttkulturer fra hjertet 65	
4.5.1	Replikerer ILAV i primærceller fra hjertet? .....	66
4.6	Hva kan resultatene brukes til? .....	68
5	Konklusjon .....	69
6	Litteraturliste .....	70
	Appendiks I - Reagenser .....	77
	Appendiks II- Tillaging av prober .....	79
	Appendiks II – Cellebytte etter isolering .....	82
	Appendiks IV – Løsninger til celleisolering .....	83
	Appendiks V – RNA inn i cDNA reaksjonen .....	85
	Appendiks VI – Avlesning av CPE .....	86
	Appendiks VII – Løsninger til <i>in situ</i> hybridisering .....	89

## 1 Innledning

I 2013 eksporterte Norge 960 000 tonn atlantisk laks (*Salmo salar*) til en verdi på 39,8 milliarder kroner. Laksen ble eksportert til om lag 100 ulike land. Russland, Frankrike og Polen utgjør de viktigste markedene for norsk laks (Aandahl, 2014).

Veksten innen global akvakultur har de senere årene vært i gjennomsnitt på 4 % pr år, men for å kunne møte den globale befolkningsveksten framover vil det reelle behovet være på ca. 5,6 % pr år mener Food and Agriculture Organization (FAO) (Olafsen *et al.*, 2012). Selv om ca. 70 % av jorden er dekket av vann skjer mindre enn fem prosent av verdens matproduksjon i havet. Et stort potensiale til å forsyne en voksende befolkning med animalske proteiner ligger altså i havet (Kvistad, 2014).

Det er mange utfordringer knyttet til dagens akvakulturnæring, og ved økt produksjon vil disse utfordringen bli enda viktigere å løse. Noen av problemområdene er:

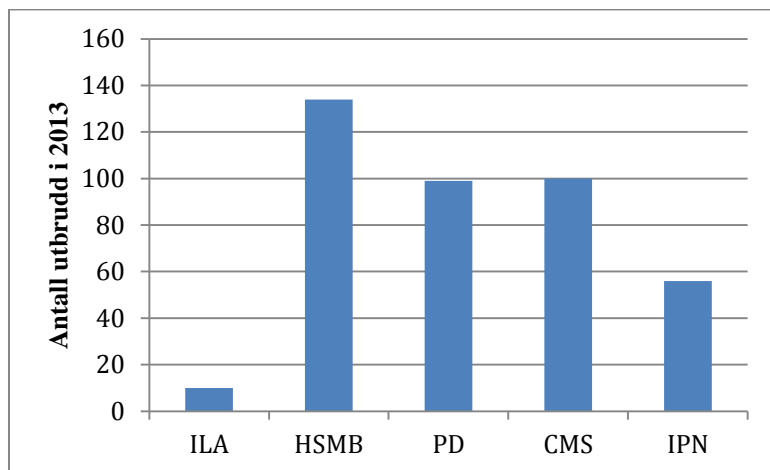
- Forurensning og utslipp
- sykdom
- rømming
- areal begrensninger
- press på ville fiskepopulasjoner som brukes som fôr til carnivore arter i oppdrett

Både forskningsmiljøene og næringen selv jobber med å løse problemer på alle disse områdene, og i årene som kommer vil dette arbeidet bare bli forsterket (Olafsen *et al.*, 2012; FKD, 2009).

Effektive vaksiner har gjort at bakterielle problemer stort sett er under kontroll i norsk lakseoppdrett. De største sykdomstapene i dag skyldes hovedsakelig virussykdommer (Hjeltnes, 2013). Kunnskap om hvilke komponenter i immunsystemet som begrenser virusreplikasjon og er involvert i bekjempelsen er avgjørende for å kunne utvikle gode profylaktiske kontrollstrategier.

## 1.1 Virussykdommer i lakseoppdrett

De største sykdomstapene innen norsk lakseoppdrett skyldes virussykdommer som pankreassykdom (PD), hjerte- og skjelettmuskelbetennelse (HSMB), infeksiøs lakseanemi (ILA), kardiomyopatisyndrom (CMS) og infeksiøs pankreasnekrose (IPN), se figur 1 (Hjeltnes, 2013).



**Figur 1: Antall utbrudd av virussykdommer registrert i norsk lakseoppdrett 2013.** Pankreassykdom (PD), hjerte- og skjelettmuskelbetennelse (HSMB), infeksiøs lakseanemi (ILA), kardiomyopatisyndrom (CMS) og infeksiøs pankreasnekrose (IPN). (Kilde: Hjeltnes, 2013)

Flere av disse sykdommene rammer hjerte. I tabell 1 er det gitt en oppsummering over hvilke organer som i hovedsak rammes ved de ulike fiskesykdommene.

Tabell 1: Oversikt over organer kan rammes ved ulike fiskesykdommer

Sykdom \ Skadet organ	PD- pankreassykdom	IPN- infeksiøs pankreasnekrose	CMS- Kardio- myopatisyndrom	HSMB- Hjerte og skjelettmuskel betennelse
Eksokrin pankreas	+	+	-	-
Hjerte	+	-	+	+
Skjelett muskulatur	+	-	-	+
Lever	-/+	+	-/+	-/+
Tarm	-	+	-	-

### 1.1.1 Pankreassykdom (PD)

PD har utviklet seg til å bli en av de mest alvorlige sykdommene vi har i dag innenfor oppdrettsnæringen. PD forårsakes av et virus som betegnes *salmonid alfavirus* (SAV).



Sykdommen påvises hos regnbueørret og atlantisk laks. Sykdomsutbrudd er til nå bare registrert i sjøvannsfasen. Utbruddene kan være langvarig og dødeligheten kan bli svært høy. Sykdommen har en smittsom opptreden med spredning innen et anlegg, til andre anlegg innen samme fjordsystem og når infisert fisk skal transporteres. Stress kan utløse eller forsterke et utbrudd. Det viktigste smittereservoaret er i dag infisert fisk i sjøanlegg. Det finnes nå seks kjente subtyper av SAV. Diagnostikk av PD baserer seg på histopatologisk undersøkelse med funn av typiske vevsforandringer og påvisning av virus i den syke fisken. Det er utviklet godkjent vaksine mot sykdommen og PD – infeksjon ble i 2013 gjort meldepliktig av Verdens dyrehelseorganisasjon (OIE)([www.vetinst.no/Temasider/Fisk/Pankreassykdom-PD](http://www.vetinst.no/Temasider/Fisk/Pankreassykdom-PD) 15.08.14).

### **1.1.2 Hjerte og skjelettmuskelbetennelse (HSMB)**

HSMB gir sykdom hos atlantisk oppdrettslaks og er en meldepliktig sykdom. Sykdommen er smittsom hos oppdrettslaks. Årsaksforholdene er fortsatt uklare, men det er antatt at sykdommen skyldes et virus. I 2010 ble et reovirus, *piscine orthoreovirus* (PRV) identifisert i vev hos HSMB-syk laks. HSMB er assosiert med funn av store mengder PVR, men viruset er svært vanskelig å dyrke i cellekultur, noe som gjøre at en hittil ikke har hatt en god smittemodell for å undersøke virusets betydning for utvikling av HSMB ([www.vetinst.no/Temasider/Fisk/Hjerte-og-skjelettmuskelbetennelse-HSMB](http://www.vetinst.no/Temasider/Fisk/Hjerte-og-skjelettmuskelbetennelse-HSMB) 15.08.14).

### **1.1.3 Infeksiøs pankreasnekrose (IPN)**

IPN er en virussykdom som i størst grad er knyttet til oppdrett av laksefisk. Viruset som forårsaker sykdommen er globalt utbredt og påvist hos flere andre fiskearter. IPN-viruset tilhører *genus Aquabirnaviridae* i familien *Birnaviridae* og er svært motstandsdyktig, både mot lav pH og høy temperatur og kan overleve utenfor verten i lang tid. Variasjon i dødelighet kan variere fra ubetydelig til opp mot 90%, og yngel og postsmolt ser ut til å være mest mottakelige for IPN-viruset. Diagnosen IPN stilles histopatologisk i formalininfisert vev ved påvisning av vevsdød i lever og/eller eksokrin pancreas. Dette kombineres med positiv immunmerking av IPN-viruset i affisert vev. Det er også mulig å påvise viruset i nyre ved real-time RT-PCR og ved virusdyrking i cellekultur. En stor andel av laks i norge vaksineres mot IPN, men effekten av vaksinasjon er usikker sammenlignet mot andre forbyggende tiltak som bl.a å fjerne ”husstammer” av IPN-virus fra settefiskfasen og fremavling av mer resistent fisk mot IPN([www.vetinst.no/Faktabank/IPN](http://www.vetinst.no/Faktabank/IPN) 15.08.14).

### **1.1.4 Kardiomyopatisyndrom (CMS)**

CMS er en alvorlig hjertelidelse som rammer oppdrettslaks i sjø. Årsaken til CMS har lenge vært ukjent, men i 2007 ble det vist at sykdommen kunne overføres fra syk fisk til frisk fisk ved å injisere hjerte- og nyrevevshomogenat i bukhulen på fisken. Dette gjorde at mistanken om at CMS kunne skyldes et virus ble styrket. I 2009 ble det vist at ikke-injiserte fisk som gikk i samme kar med injiserte fisk også utviklet CMS, såkalt kohabitantsmitte, og sannsynlighetene for smitteoverføring via vann ble bekreftet. I 2010 klarte Veterinærinstituttet og Norges veterinærhøgskole å beskrive et helt nytt virus, *piscint muokardittvirus* (PMCV), som igjen antas å forårsake CMS. Vannbåren smitte fra fisk til fisk ser ut til å være hovedfaktoren for CMS-smitte. CMS- diagnosen stilles i dag basert på klinikk og typiske histopatologiske forandringer. De viktigste differensialdiagnosene til CMS er PD og HSMB. Arbeidet med å utvikle en vaksine mot CMS er igangsatt, men ligger nok noe frem i tid([www.vetinst.no/Faktabank/Kardiomyopatisyndrom-CMS](http://www.vetinst.no/Faktabank/Kardiomyopatisyndrom-CMS) 15.08.14).

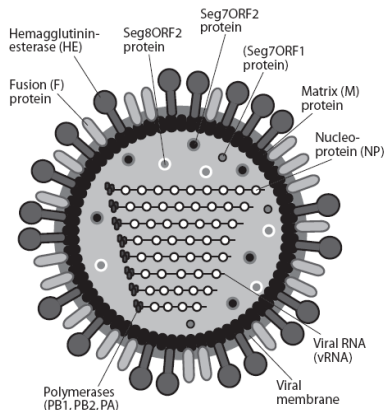
### **1.2 Infeksiøs lakseanemi (ILA)**

I 1984 ble infeksiøs lakseanemi (ILA) for første gang påvist i Norge, og er senere også blitt påvist i land som Canada, Skottland, USA, Færøyene og Chile (Thorud og Djupvik, 1988; Mullins *et al.*, 1998; Rodger *et al.*, 1998; Bouchard *et al.*, 2001; Lyngøy, 2003). ILA er i hovedsak assosiert med atlantisk laks (*Salmo salar*) i sjøvannsfasen, og foreløpig er atlantisk laks den eneste arten som med sikkerhet dør pga. ILA- infeksjon (Ref veterinærinstituttet...). I 2013 ble det påvist ti utbrudd av ILA, og åtte av disse var i Nordland. De to andre utbruddene av ILA ble påvist på en lokalitet i Troms og en i Sogn og Fjordane. ILA er en meldepliktig sykdom på liste 2 ([www.lovdata.no](http://www.lovdata.no), 160514).

ILA forårsakes av et orthomyxovirus, infeksiøs lakse anemi virus. ILAV infiserer og skader endotelet på innsiden av blodkarene. Blodceller og væske vil etterhvert sive ut av de skadede blodkarene og gi anemi. Erytrocyttene degenererer og hemolysere også lettere enn hos frisk fisk. Ved hematokrit-måling må verdien være under 10 % (normalområde 40- 45 %) for å kunne stille ILA-diagnosen (Poppe 2002).

ILAV (100 nm i diameter) er kappekledd med åtte ssRNA segmenter av negativ polaritet (figur 2). På overflaten finnes 10 nm lange “pigger” (hemagglutinin-esterase, HE), som har en funksjon ved gjenkjenning, binding og frigjøring av virus fra celler (segment 6). I tillegg

finnes det et fusjonsprotein (F), som virker inn ved frigjøring av virusgenom fra endosom til cytoplasma. Nukleoprotein (NP) pakker inn og beskytter virusgenomet (segment 3). Selve skjelettet til viruspartikkelen utgjøres av et matriks protein (M1), som segment 8 koder for. Segment 1, 2 og 4 er viktig for produksjon av RNA-polymerase. Det finnes også et ukjent protein og to ikke strukturelle proteiner med ukjent funksjon som virusgenomet koder for (Aamelfot et al., 2014).



**Figur 2:** Oppbygning av ILAV

Selve virulensen til ILAV er assosiert med sekvensen til HE og noen andre gener. Undersøkelser av ILAV fra klassiske ILA-utbrudd har vist at genet som koder for HE inneholder en delesjon i genets HPR (hypervariable region). Varianter av HE-genet uten delesjoner i HPR (HPR0) er påvist hos villaks og oppdrettslaks uten ILA-sykdomsforandring. Det er først og fremst gjellene som affiseres av HPR0-infeksjonene. HPR0 kan trolig mutere til en virulent type. HPR regionen er ikke den eneste regionen som skiller lavvirulente fra høyvirulente ILA-stammer (Aamelfot *et al.*, 2014)

Målculturene for ILAV er endotelceller. Undersøkelse av fisk både fra naturlige utbrudd og etter eksperimentell smitte viser at viruset er lokalisert i endotelceller i ulike organer også i hjertet (Aamelfot *et al.*, 2014). Reseptoren ILAV anvender for å feste seg til celler og starte infeksjon (4-O-acetyl sialin syre) er også hovedsakelig lokalisert på endotelceller (Aamelfot *et al.*, 2014). In vivo ser viruset ut til å frigjøres fra endotelet til blodbanen ved knoppsskyting (Koren & Nylund 1997).

Et sykdomsutbrudd kan ha et akutt eller langtrukket forløp. De første tegn på ILA, og som kan oppstå før fisken virker syk, er blødninger i øyet, svullen milt og buk. Tidlig i forløpet kan også små punktformige blødninger ses i fettvevet i bukhulen. De sikreste makroskopiske forandringene ved ILA er derimot bleke gjeller, blekt hjerte og en mørk lever. Andre symptomer er blødninger i hud og muskulatur, svullen nyre, blodige mørke tarmer, utstående øyne og blødninger/ødem i svømmeblæreveggen. ILA-infisert fisk kan også endre adferden til å få en lav svømmeaktivitet (svime i overflaten, ligge på bunnen, henge i nettkanten etter kjeven) og snappe luft. Appetitten hos infisert fisk kan være god, men svimere spiser gjerne lite. Erfaring med ILA-diagnostikk har vist at selv uten de klassiske patologiske forandringer bør man være oppmerksom på sykdommen (Poppe 2002).

### **1.3 Det medfødte immunforsvaret hos atlantisk laks**

Immunforsvaret hos laks kan inndeles i det medfødte og det adaptive. Det totale immunforsvaret omfatter både et stort antall ulike celletyper og en rekke løselige molekyler.

Det medfødte immunforsvaret har en hurtig respons mot fremmede antigener, men har en kort varighet og ingen hukommelse. Det består av ulike fysiske og kjemiske faktorer som ytterhud, slimhinner, svette, proteolytiske enzymer, pH i tarmsaft, tarmbakterier etc.

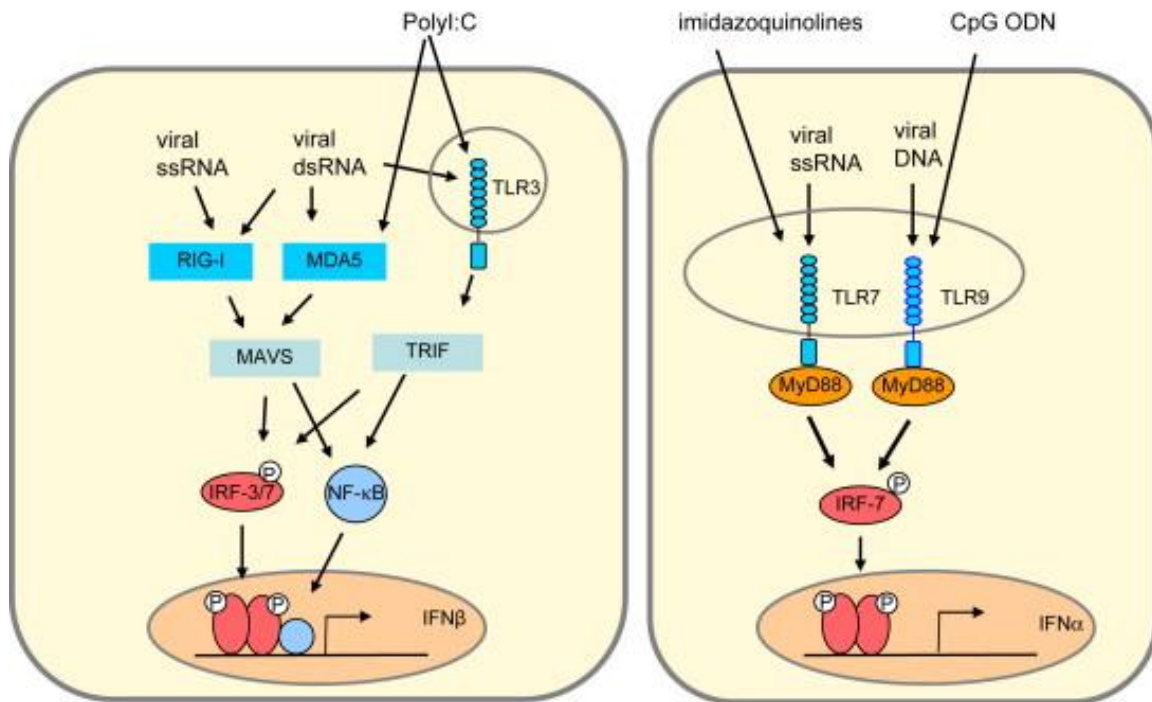
Fagocytterende celler som monocytter, makrofager og granulocytter er også en del av det medfødte immunforsvaret. Naturlige dreperceller (NK-celler) og mastceller ansees også å tilhøre det medfødte immunforsvaret. Det er også en del løselige faktorer (akutte fase proteiner, komplement proteiner, interferoner) som er viktige i førstelinjeforsvaret.

### **1.4 Interferonsystemet**

Interferoner (IFN) er cytokiner som opprinnelig fikk navnet på grunn av deres evne til å *interferere* ved replikasjon av virus (Isaacs og Lindenmann, 1957). Hos pattedyr deles IFN inn i type I, II og III, utfra sekvenslikhet, kromosomal lokalisasjon og hvilket reseptorkompleks som påvirkes til signaltransduksjon (Chelbi-Alix og Wietzerbin, 2007).

Hos mennesker består type I IFN av 13 IFN- alpha ( $\alpha$ ), og en av hver av IFN- beta ( $\beta$ ), IFN- epsilon ( $\epsilon$ ), IFN- kappa ( $\kappa$ ) og IFN- omega ( $\omega$ ) (Pestka, *et al.*, 2004). Type II IFN består av en enkelt IFN- gamma ( $\gamma$ ), mens IFN type III består av tre IFN- lambda ( $\lambda$ ). IFN type I og III

produseres av de fleste celletypene og IFN $\gamma$  produseres i hovedsak av T- celler og NK- celler (Schroder, *et al.*, 2004; Kotenko , *et al.*, 2003; Sheppard, *et al.*, 2003).



Figur 3: A simplified illustration of viral sensors and signalling to IFN promoters in mammalian cells based on the current knowledge . Most nucleated cells recognize viruses through the RNA helicases...

Børre Robertsen , <http://dx.doi.org/10.1016/j.fsi.2008.02.004>

I 2003 ble de første gene for type I IFN klonet fra fisk, inklusiv fra atlantisk laks (Robertsen, *er al.*, 2003). Totalt er det påvist 13 typer IFN I gener hos atlantisk laks (IFNa 1-3, IFNb 1-4, IFNc 1-5 og IFNd). Type I IFNene kan deles inn i to grupper på bakgrunn av om de har to eller fire konserverte cysteiner, som henholdsvis danner en eller to disulfidbindinger. IFNa og IFNd hører til gruppen med en disulfidbinding og IFNc og IFNb tilhører gruppen som inneholder to disulfidbindinger.

IFN I gene hos fisk inneholder fem eksoner og fire introner, mens IFN I gene hos pattedyr ikke har introner i sine type I IFN gener (Robertsen, *et al.*, 2003).

Ingen type III IFN er enda blitt påvist hos fisk. Hos fisk er type II IFN (IFN $\gamma$ ) påvist hos flere arter, inklusiv atlantisk laks. De ligner IFN $\gamma$  hos pattedyr genetisk, og har sammen intron/ekson struktur. I tillegg induserer de samme cellulære responser som hos pattedyr (Sun.,*et al.*, 2011).



## 1.5 Induksjon av type I interferon etter virus gjenkjennelse

Type I interferoner er en viktig del av det medfødte antivirale forsvaret, og kan bli skilt ut fra alle kjerneholdige celler etter virus deteksjon. Type I IFN induserer uttrykk av proteiner som kan hemme ulike trinn av virusreplikasjon (antivirale proteiner). De antivirale proteinene er dermed med på å begrense oppformering og videre spredning av virus. Viralt arvestoff gjenkjennes via ulike reseptorer kalt «pathogen recognition receptor» (PRR). Disse reseptorene gjenkjenner konserverte molekyler assosiert med grupper av patogener, «pathogen associated molecular patterns» (PAMPs). Ved gjenkjennelse av virus er det gjerne nukleinsyrer (RNA og DNA) som fungerer som PAMPs. To viktige grupper av PRR som gjenkjenner PAMPs er Retinoic acid inducible gene-I (RIG- I)- lignende reseptorer (RLR) i cytoplasma og membran bundne toll- lignende reseptorer (TLR) (Yoneyama og Fujita, 2010).

RLR- familien utgjør en gruppe av intracellulære frie reseptorer og består av RIG- I, «Melanoma- Differentiation- Associated gene 5» (MDA5) og «Laboratory of genetics and physiology 2» (LGP2) (Barbalat, *et al.*, 2011). Alle tre inneholder et DEDxD/H box helikase domene og et C- terminal domene som er ansvarlig for binding av RNA. RIG- I og MDA5 inneholder også to «caspase activation and recruitment domains» (CARD) i den N- terminale delen som er viktig for signaloverføringen til «IFN-  $\beta$  promotor stimulator 1» (IPS- 1) (Yoneyama og Fujita, 2009) (Se figur 3). IPS- 1 (også kjent som MAVS, CARDIF, og VISA) er koplet til mitokondrier via et transmembrant C- terminalt domene, og interagerer med CARD- CARD domenet ved binding av en RNA ligand til RIG- I og MDA5 (Seth, *et al.*, 2005). IPS- 1 vil videre assosiere med TRAF (tumor necrosis factor receptorassociated factor) 3 og TRAF6, som så videre rekruterer og aktiverer kinasene TBK1 (TANK- binding kinase 1) og IKK $\epsilon$  (IkB kinase-  $\epsilon$ ). TBK1 og IKK $\epsilon$  vil aktivere og fosforylere henholdsvis IRF3/IRF7 og NF-  $\kappa$ B (se under). c- jun/ATF2 vil også aktiveres via TRAF6 (Fitzgerald, *et al.*, 2003; Oganessian, *et al.*, 2006; Yoshida, *et al.*, 2008). LGP2 er har en negativ effekt på RIG- I, men har også vist å positivt regulere RLR- signalveien (Rothenfusser, *et al.*, 2005; Satoh, *et al.*, 2010).

Hos flere fiskearter, og der i blant laks, er RIG- I, MDA5, LGP2 blitt karakterisert. Det er blant annet vist at IPS- 1 spiller en tilsvarende rolle hos atlantisk laks som hos pattedyr (Chang, *et al.*, 2011; Lauksund, *et al.*, 2009).

Toll- lignende reseptorer (TLR) er en gruppe membranbundne proteiner som er en del av det medfødte immunforsvaret og induserer cytokin utskillelse. De har en N- terminal del som

består av repeterende leuciner (gjenkjenner PAMPs), en transmembran del (i plasmamembranen eller intracellulære endosomale membraner) og et TIR (Toll/IL- 1 reseptor) domene for videre signaloverføring (Zhu, *et al.*, 2013). Til sammen er det er påvist 17 ulike TLR hos fisk. Det er påvist både TLR som er homologe til de hos pattedyrene (TLR3 og TLR9) og noen særegne varianter for fisk (TLR21 og salmonid TLR22) (Rebl, *et al.*, 2010). TLR3, TLR7, TLR8 og TLR9 er hovedsakelig lokalisert intracellulært i endosomale membraner, og er hos pattedyr kjent for å indusere type I IFNer (Barton og Kagan, 2009). Virale nukleinsyrer (PAMPs) som gjenkjennes av de ulike TLRene er dsRNA (TLR3), ssRNA (TLR7/8) og umetylert DNA CpG (cytosin- guanin) (TLR9) (Diebold, 2008). TLR3 kan også gjenkjenne poly I:C (polyinosinic- polycytidylic acid), som er en syntetisk etterligning av dsRNA (Alexopoulou, *et al.*, 2001). TLR22 er lokalisert i cellemembranen, og binder også dsRNA i likhet med TLR3. Det er blitt antydnet at TLR22 muligens kan fungerer som et supplement til TLR3 i akvatiske miljø, som potensielt kan inneholde store mengder med viruspartikler (Matsuo, *et al.*, 2008).

I likhet med RLReene vil også TLRene starte en kaskade av reaksjoner ved binding av nukleinsyrer fra virus. TLR3 assosierer med adaptorproteinet TRIF (TIR- domain- containing adaptor inducing IFN-  $\beta$ ) etter aktivering (Yamamoto, *et al.*, 2003; Yamamoto, *et al.*, 2002). TRIF rekrutterer TRAF6, TRAF3 og IPS- 1. I det neste steget vil kinasene (TBK1 og IKK $\epsilon$ ) bli aktivert, som igjen vil aktivere og fosforylere IRF3, IRF7 og NF-  $\kappa$ B (se under). c- jun/ATF2 vil også aktiveres via TRAF6 (Fitzgerald, *et al.*, 2003; Oganessian, *et al.*, 2006; Yoshida, *et al.*, 2008). Ved signaloverføring fra aktiverte TLR7, TLR8 og TLR9 vil Myd88 (Myeloid differentiation primary response gene 88) benyttes som adaptorprotein. Dette aktiverer IL- 1 reseptor- associated kinase (IRAK)- 4, IRAK- 1 og TRAF6 (Jensen og Thomsen, 2012; Medzhitov, *et al.*, 1998). Kinasene vil deretter fosforylere IRF7, som har et høyt basaluttrykk i pDC (plasmacytoid dendritic cells). IRF7 translokerer til cellekjernen og binder seg til promotorene til IFN $\alpha/\beta$ , og starter transkripsjon av IFN.

Det har blitt identifisert godt konserverte MyD88 strukturer hos fisk, og signalveien ser ut til å være den samme som hos pattedyr (Purcell, *et al.*, 2006; Liu, *et al.*, 2010; Skjaeveland, *et al.*, 2009).

Hos pattedyr er tre familier av transkripsjons faktorer involvert i induksjonen av type I interferoner: **1.** Interferon regulatory transcription factor (IRF) familien, **2.** Nuclear factor kappa B (NF-  $\kappa$ B), **3.** c- jun/ATF2.

IRF3 og IRF7 er viktige regulatorer for induksjon av IFN $\alpha/\beta$ , og ved aktivering av riktig PRR vil de fosforyleres, danne dimere og transporteres fra cytosolen til kjernen. NF- $\kappa$ B og c-jun/ATF2 øker induksjonen av IFN $\beta$ . I ustimulerte celler er NF- $\kappa$ B blokkert av «inhibitor of kappa B» (I $\kappa$ B), men ved forforylering degraderes I $\kappa$ B og NF- $\kappa$ B kan translokere fra cytosolen inn i cellekjernen (Sato, *et al.*, 2000; Lin, *et al.*, 1998; Marie, *et al.*, 1998; Sato, *et al.*, 1998; Wathelet, *et al.*, 1998). Aktiveringen av c-jun/ATF2 kontrolleres av mitogen-activated protein kinase (MAPK) (Whitmarsh og Davis, 1996). I cellekjernen induseres transkripsjon ved at IRF3, IRF7, NF- $\kappa$ B og c-jun/ATF2 binder seg til promotor regionen av IFN- genene. Etter transkripsjon av IFN- genene og translasjon av transkriptet, frigis IFNene fra cellen.

Hos fisk er det funnet IRF ortologer (Zou og Secombes, 2011). Akkurat som hos pattedyr translokere IRF3 og IRF7 hos regnbueørret (*Oncorhynchus mykiss*) også til kjernen etter virus aktivering (Holland, *et al.*, 2008).

## 1.6 IFN medierte signaler

De fleste kjerneholdige celler hos pattedyr har en spesifikk IFN- reseptor (IFNR) i cellemembranen. Den består av to subenheter, IFNAR1 og IFNRA2. IFN som skilles ut fra aktiverte celler vil gjenkjennes av IFNRer på naboceller, og indusere til økt uttrykk av en rekke interferon stimulerede gener (ISG) (de Weerd, *et al.*, 2007; Chill, *et al.*, 2003). Hos pattedyr fører bindingen av type I IFN til aktivering av TYK- 2 og JAK- 1 (tyrosin kinase 2 og janus kinase 1), som videre fosforylerer STAT (signal transducer and activator of transcription) 1 og STAT2. STAT1 og STAT2 danner dimere og interagerer deretter med IRF9 i et transkripsjonsfaktorkompleks (ISGF3, interferon stimulated gene factor 3). ISGF3 translokere til kjernen og fester seg til promotor regionen på ISG (ISRE, interferon stimulated response element) for å stimulere til transkripsjon. Noen av ISGene har antiviral effekt (Platanias, 2005).

Totalt er de fleste komponentene som er med i den IFN medierte signaloverføringen påvist hos fisk, inklusiv TYK2, JAK1, STAT1, STAT2 og IRF9 (Stein, *et al.*, 2007). Hos atlantisk laks er det påvist STAT1 og Tyk2, og studier tyder på at de har samme funksjon som hos pattedyr. STAT1 blir i laksecellene fosforylert, dimerisert, og translokert til kjernen. Overuttrykk av Tyk2 viser oppregulering av ISGer (Sobhkhez, *et al.*, 2013; Skjesol, *et al.*, 2010).

Ved aktivering av JAK/STAT signaloverføringen vil flere hundre ulike antivirale proteiner uttrykkes (Robertsen 2008). Mange ISGer funnet hos fisk er homologe til ISGer hos pattedyr, men fisk har også noen egne fiskespesifikke ISGer (Zhang, *et al.*, 2012). Noen av de viktigste antivirale proteinene identifisert hos pattedyr og fisk er Mx, viperin, ISG15 og PKR (Svingerud, *et al.*, 2012).

## **1.7 Laksefiskens hjerte**

Beinfisk har et hjerte som ligger beskyttet i perikardhulen foran i kroppshulen. Fiskene har et enkelt enveis sirkulasjonssystem. Oksygen- fattig blod fra kroppen kommer inn til hjerte og pumpes via gjellebuearteriene og over gjellenes kapillærnett hvor oksygen tas opp. Blodet ledes deretter gjennom bakre aorta og forgreiner seg ut i kroppen. Når blodet kommer inn til hjerte samles det først i sinus venosus, som leder blodet inn i atrium. Deretter pumpes blodet over i ventrikkelen og videre ut via bulbus til gjellene. Hjertekamrene består av tre lag. Det innerste celledaget består av endotelceller og løst bindevev. Særlig i atriet har endotelcellene fagocytterende aktivitet. Myocardet (mellomlaget) består av hjertemuskulatur som er svampeliknende (atrium) eller kompakt. Hos laksefisk består ventrikkelen av et ytre kompakt lag og et indre spongiøst lag. Ytters er hjerte dekket av et epikardlag (Amin, A.B., Mortensen, L. & Poppe, T 1991).

## 1.8 Problemstilling

Virussykdommer som rammer hjertet er utbredt i norsk lakseoppdrett. Type I interferoner er en av hovedkomponentene i det medfødte immunforsvaret som beskytter verten mot virusinfeksjoner (Robertsen, 2006). For å utvikle profylaktiske tiltak mot disse virussykdommene er det viktig å forstå hvordan interferon-systemet fungerer i laksehjertet. Formålet med denne oppgaven var å studere laksens interferon- respons i hjertet i både en *in vivo* og en *in vitro* modell.

Tidligere forsøk har kartlagt genuttrykk av IFNa, IFNb og IFNc i hjertet og hodenyre hos atlantisk laks etter poly I:C injeksjon (a. Svingerud *et al.*, 2012). Vi ønsket å bekrefte disse *in vivo* resultatene samt undersøke lokalisering av celler i hjertet og hodenyre som uttrykker IFNc mRNA med fluorescens *in situ* hybridisering (FISH).

Stimulering av laksecellelinjer og leukocytter fra blod og hodenyre med poly I:C har i tidligere forsøk ikke gitt økning i genuttrykket av IFNc og det er uklart via hvilken reseptor/signalvei IFNc induseres (a. Svingerud *et al.*, 2012). Siden hjerte er et av organene som har vist høyest uttrykk av IFNc etter poly I:C injeksjon *in vivo* (a. Svingerud *et al.*, 2012) var det derfor interessant å undersøke hvilke subtyper av IFN som ville uttrykkes i primære cellekulturer fra laksehjerte *in vitro*.

### Delmål 1

Undersøke uttrykket av type I interferoner i hjerte og hodenyre hos atlantisk laks etter poly I:C stimulering *in vivo*.

### Delmål 2

Påvise og lokalisere celler som uttrykker IFNc mRNA i hjerte og hodenyre hos atlantisk laks etter poly I:C stimulering *in vivo*.

### Delmål 3

Undersøke uttrykket av type I interferoner i primære cellekulturer fra hjerte til atlantisk laks etter *in vitro* poly I:C stimulering.

### Delmål 4

Undersøke om ILA-virus replikerer i primære cellekulturer fra hjertet til atlantisk laks.



## 2 Material og metode

### 2.1 IFN uttrykk hos atlantisk laks i hjerte og hodenyre etter poly I:C injeksjon *in vivo*

#### 2.1.1 *Forsøksfisk*

Det ble brukt standard atlantisk laks (*Salmo salar*) generasjon 2012 fra Aqua Gen på 35- 65 g. Laksen gikk i en laboratorietank på avdeling D/E ved Havbruksstasjonen i Tromsø (HiT) med ferskvann på 10 °C og 24 timer kontinuerlig lys. Fisken ble fôret med Skretting Nutra Olympic (2,0 mm) 24 timer i døgnet inntil to dager før forsøksoppstart.

Alle forsøksfisk i denne masteroppgaven er behandlet i henhold til «Lov om dyrevelferd» (LOV-2009-06-19-97) og «Forskrift om forsøk med dyr» (FOR 1996-01-15 nr 23).

#### 2.1.2 *Prøveuttak og forsøksoppsett*

Forsøket og prøveuttaket ble utført 4. april 2013 på HiT. Det ble brukt 50 mg/l benzokain (ACD Pharmaceuticals AS) i ferskvann til bedøvelse av fisken. Til bedøvelseskaret overførte vi fire til fem fisk om gangen med håv. 16 fisk ble injisert intraperitonealt (i.p.) med 200 µl poly I:C 1,5 mg/ml, og 16 fisk (kontroll gruppe) ble injisert i.p. med 200 µl fosfat- bufret saltvann (PBS). Alle PBS injiserte fisk ble merket ved å klippe fettfinnen av. Etter injisering ble både poly I:C og PBS behandlet fisk overført til samme kar. Etter 12 timer ble alle fiskene avlivet med en overdose benzokain, samt et slag mot hode og blodtappet fra *Vena caudalis* (figur 4).

Fisken ble åpnet på venstre side lateralt bak gjellelokket og ned mot gattåpningen (figur 4). Hjerte, hodenyre og milt fra åtte poly I:C- og åtte PBS injiserte fisk ble fiksert i nylaget 4 % paraformaldehyde (4 % PFA) ved 4 °C i ca. 18 timer. Deretter ble organene vasket tre ganger med 70 % etanol, før de ble lagret ved 4 °C i 70 % etanol inntil videre prosessering til fluorescerende *in situ* hybridisering (FISH).

Hjerte, hodenyre og milt fra de resterende åtte poly I:C- og åtte PBS injiserte fisk ble lagt på RNAlater (Ambion). Prøvene ble oppbevart ved 4 °C over natt, og deretter ved -80 °C inntil RNA- isolering.

Før oppstart av forsøket ble det også tatt ut organer (hjerte, hodenyre og milt) fra 10 fisk som var ubehandlet (Null- fisk). Fiskene ble avlivet som beskrevet over. I tabell 2 er forsøksoppsettet for *in vivo* forsøket.

**Tabell 2:** Forsøksoppsett – *in vivo*

Fiskegruppe	Behandling	Prøvetaknings- tidspunkt	Kvantitativ Real-Time PCR (qPCR) n =	Fluorescence <i>in situ</i> hybridisering (FISH) n =
<b>Null-fisk</b>	Ubehandlet	0 timer	5	5
<b>PBS</b>	200 µl PBS i.p.	12 timer	8	8
<b>Poly I:C</b>	200 µl Poly I:C 1,5 mg/ml i.p.	12 timer	8	8

Poly I:C - Polyinosinic- polycytidylic acid, PBS- Fosfat- bufret saltvann, i.p.- intraperitonealt



**Figur 4:** Atlantisk laks i (A) bedøvelseskaret under forsøket ved HiT og (B) bedøvet fisk som injiseres intraperitonealt. (C) Avklippet fettfinne på PBS injisert fisk. (D) Blodtapping fra *Vena caudalis*. (E) Uttak av organer (hjerte, hodenyre og milt) fra forsøksfisk.

### 2.1.3 Analyser som ble utført

I *in vivo* forsøket ble genuttrykket av IFNa, IFNb, IFNc undersøkt med qPCR i halvparten av hjerte og hodenyre prøvene. Hver prøve ble analysert i triplikater ved qPCR. De resterende hjerte og hodenyre prøvene ble analysert med FISH for å lokalisere celler som uttrykte IFNc mRNA.

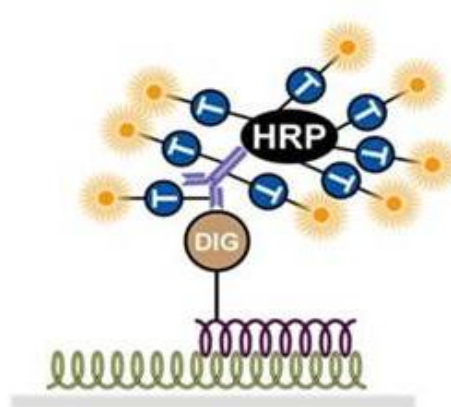
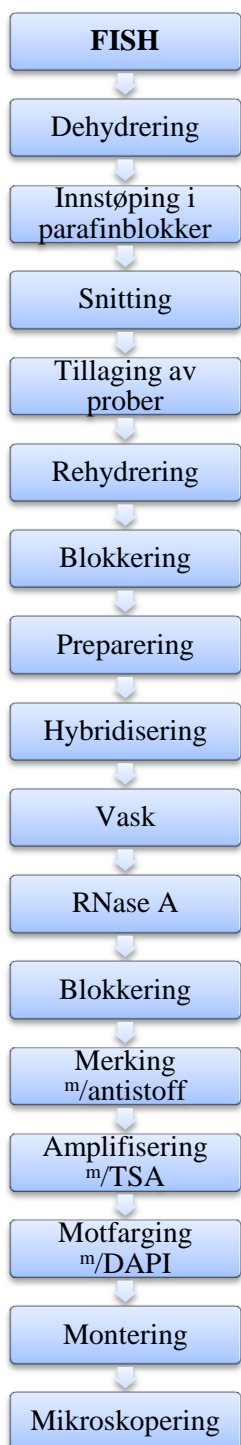
## 2.2 Lokalisering av IFNc produserende celler i hjerte med fluorescerende in situ hybridisering (FISH)

Tidligere forsøk har vist at ikke alle celler i hodenyre, milt, lever og gjeller uttrykker IFNc tolv timer etter poly I:C injeksjon (Svingerud *et al.*, 2012). I *in vivo* forsøket ønsket vi å undersøke lokalisering av celler som uttrykker IFNc i hjerte til laks med FISH etter injisering med poly I:C. Selve FISH prosedyren går over to dager. Dag 1 ble det brukt kun RNase frie løsninger

In situ hybridisering (ISH) er en teknikk som gjør det mulig å lokalisere spesifikke nukleinsyresekvenser (RNA og DNA) i celler og vev. Nukleinsyresekvensene kan detekteres ved å tilsette merkede prober som hybridiserer til sine komplementære sekvenser hvis sekvensene finnes i preparatet (Brown 1998). Ved fluorescerende in situ hybridisering (FISH) brukes fluorophore- merkede prober eller reagens til deteksjon seg ([www.perkinelmer.de](http://www.perkinelmer.de) 21.05.14.).

Tyramide signal amplification (TSA) er en signalforsterkende teknologi som øker sensitiviteten, og gjør det unødvendig med PCR amplifisering ved ISH analysering av gener som er lavt uttrykt. TSA amplifiseringsreagenset vil i nærvær av horseradish peroxidase (HRP) og H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> omdannes til en flyktig og svært reaktiv fri radikal. Den frie radikalen vil raskt binde seg kovalent til elektron- rike regioner i nærliggende proteiner (hovedsakelig tyrosin). Ubundne TSA radikaler vil danne dimerer og vaskes vekk. Binding av mangfoldige TSA radikaler vil altså skje i nærheten der HRP har bundet seg ([www.perkinelmer.de](http://www.perkinelmer.de) 21.05.14.).

Ved bruk av TSA er probene ofte merket med biotin, digoxigenin (DIG), eller fluorescein. I vårt tilfelle brukte vi DIG- merkede RNA prober til å lokalisere celler med IFNc uttrykk i vevssnitt fra hjerte og hodenyre. Når den DIG- merkede proben hadde festet seg på snittet ble horse- radish- peroxidase (HRP) konjugert anti- DIG Fab- fragment tilsatt. Deretter ble fluorophore merket TSA reagens tilsatt. TSA radikalerne som ble dannet festet seg kovalent til tyrosin like ved HRP, og vevssnittene ble deretter mikroskopert med fluorescensmikroskopi. I **figur XX** er prinsippet for FISH med DIG- merket probe illustrert.



Figur 5: **Prinsippet for fluorescerende *in situ* hybridisering (FISH)** med digoxigenin (DIG) merket probe, horse- radish- peroxidase (HRP) konjugert anti- DIG Fab- fragment og tyramide signal amplification (TSA) ([www.perkinelmer.de](http://www.perkinelmer.de) 21.05.14.)

### 2.2.1 *Dehydrering*

Organene lagret ved 4 °C i etanol ble viderebehandlet ved hjelp av fremføringsmaskinen Citadel 1000 (Shandon), program A. Programmet består av 10 steg og var ferdigprogrammert av ansatte ved Norges fiskerihøgskole. I de første stegene av prepareringsprosessen ble organene dehydrert med en økende konsentrasjon av etanol, deretter ble de avfettet med xylene, og til slutt impregnert med oppvarmet flytende parafinvoks. I løpet av ca. 3 timer kan parafinen penetrere et 5 mm tykt vev ([www.helse-mr.no](http://www.helse-mr.no) 21.05.14). Hele

prepareringsprosessen bidrar til å gjøre organene mest mulig homogene i konsistensen, og dermed lettere å snitte. I tabell 3 er program A på fremføringsmaskinen gjengitt.



**Tabell 3:** Program A på fremføringsmaskinen (Citadel 1000) benyttet til dehydrering, avfetting og impregnering av organene fra Atlantisk laks.

Steg	Innhold
1	2 timer 96 % etanol
2	2 timer 96 % etanol
3	2 timer 100 % etanol
4	2 timer 100 % etanol
5	1 time 100 % etanol + xylene (1:1)
6	1 time xylen
7	1 time xylen
8	1 time xylen
9	1 time xylen + parafinvoks (1:1)
10	≥ 3 timer parafinvoks

### 2.2.2 *Innstøping i parafinblokk*

Innstøping av de dehydrerte organene ble utført med Leica EG1150 H (Leica biosystems). Organene orienteres og støpes sammen med parafin i støpeformer til parafinblokker. Til avkjølingen av parafinblokkene ble Axil Johnson Lab System (Leica EG1150 C) benyttet. Hjertene ble delt i to før innstøping. Parafinblokkene ble oppbevart ved romtemperatur (RT) inntil de skulle snittes.

### 2.2.3 *Snitting*

Det ble laget 5 µm tykke snitt (Leica RM2235) av hjerte og hodenyre. Snittene ble strukket ut ved hjelp av Milli- Q vannbad (Leica HI1210) ved 39 °C og montert på SuperFrost® Plus objektglass (Menzel GmbH, Braunschweig, Tyskland). De monterte snittene ble videre inkubert ved 60 °C i varmeskap (Termaks) i 1 time for å øke adherensen til objektglassene.

### 2.2.4 *Tillaging av prober*

Ekspresjonsplasmid (pCR3.1SasaIFN-a1) med åpen leseramme for IFNα1 fra atlantisk laks var tilgjengelig fra tidligere arbeid (Robertsen *et al.*, 2006). Det var også tilgjengelig

ekspresjonsplasmid med åpen leseramme for IFNb og IFNc fra laks, som var utarbeidet av Svingerud og medarbeidere (2012).

Det videre arbeidet med tillaging av antisense og sense RNA prober ble utført i samarbeid med Silje Lauksund. Det ble deretter satt opp seks PCR reaksjoner med ekspresjonsplasmidene for IFNa, IFNb og IFNc som templat. Primerene som ble brukt hadde T3 og T7 RNA polymerase promotor sekvens forlengelse (tabell 4). Antisense revers primerene hadde sekvens forlengelsen for T3 RNA polymerase promotor, og sense forward primerene for T7 RNA polymerase promotor.

**Tabell 4:** Primere brukt til PCR amplifisering av innsatt IFN sekvens i ekspresjonsplasmid for tillaging av prober til FISH

Probe	Navn	Sekvens (5'-3')	Genbank nummer <sup>a</sup>	Bruk
1 Sense	T7 IFNa f	TAATACGACTCACTATAGGGGCAGAGTTGGACGTGTATTTGTCTTATTATTTC	DQ354152.1	FISH
	IFNa r	GATGAGCTCCCATGCCTGTGCACTGTAGTTC		
2 Antisense	IFNa f	GCAGAGTTGGACGTGTATTTGTCTTATTATTTC	EU768890	FISH
	T3 IFNa r	AATTAACCCTCACTAAAGGGGATGAGCTCCCATGCCTGTGCACTGTAGTTC		
3 Sense	T7 IFNb f	TAATACGACTCACTATAGGGGAGCATTTCCTGACTCTGTTCTGCCAAG	EU768890	FISH
	IFNb r	GACTCTGCTGTCAATGAATTTCTTGAAGT		
4 Antisense	IFNb f	GAGCATTTCCTGACTCTGTTCTGCCAAG	EU768890	FISH
	T3 IFNb r	AATTAACCCTCACTAAAGGGGACTCTGCTGTCAATGAATTTCTTGAAGT		
5 Sense	T7 IFNc f	TAATACGACTCACTATAGGAAATGGCACTTCAGACTATCACT	EU768890	FISH
	IFNc r	CCCACAGAAGGCTATCAGAGT		
6 Antisense	IFNc f	AATGGCACTTCAGACTATCACT	EU768890	FISH
	T3 IFNc r	AATTAACCCTCACTAAAGGGCCCACAGAAGGCTATCAGAGT		

Primer T7 IFNc forward har en ekstra **A** i sekvensen (avlest på rør med primer stockløsning) sammenlignet med primer sekvens oppgitt i artikkelen til Svingerud *et al.*, 2012. Ekstra A i primer sekvensen er marker med rødt. T3 primerne brukes til å lage fluorescerende in situ hybridisering (FISH) antisense prober og T7 primers til å lage FISH sense prober. T3 RNA polymerase promotor sekvens forlengelse - blå; T7 RNA polymerase promotor sekvens forlengelse – grønn. f, Forward primer; r, reverse primer.

<sup>a</sup>Accession nummer i GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) (Svingerud *et al.*, 2012.).

Til PCR amplifiseringen ble det benyttet rekombinant DNA polymerase fra *Thermococcus* species *KOD* (Invitrogen) med proofreading (3'→5' eksonuklease) aktivitet. Komponentene

som inngår i PCR reaksjonen er satt opp i tabell 5. AccuPrime™ Pfx DNA Polymerase vil ikke fungere i reaksjoner som inneholder dUTP (deoxyuridine triphosphate). PCR reaksjonen ble startet med oppvarming til 94 °C i 5 minutter for å denaturere plasmid- templatet, og deretter 40 sykluser med PCR amplifisering (GeneAmp® PCR System 2700, Applied Biosystems).

#### Program brukt til PCR amplifiseringen

Denaturering: 94 °C i 5 minutter

#### **40 sykluser**

Denaturering: 95 °C i 20 sekunder

Annealing: 55 °C i 30 sekunder

Elongering: 68 °C i 1 minutt

4 °C over natt

**Tabell 5:** Komponentene som inngår i PCR reaksjonen ved amplifisering av innsatt IFN sekvens i ekspresjonsplasmid (pCR3.1SasaIFN-a1, pcDNA3.3- TOPO vektor).

Komponent	Volum (µl)	Slutt konsentrasjon
10X AccuPrime™ Pfx Reaction mix <sup>m</sup> / dNTP	2	1X
Forward primer 10 µM	0,6	0,3 µM
Revers primer 10 µM	0,6	0,3 µM
Plasmid templat DNA (100 ng)	1	5 ng/µl
AccuPrime™ Pfx DNA Polymerase	0,5	1,25 units
dH <sub>2</sub> O	15,3	
<b>Totalt</b>	<b>20</b>	

Etter amplifisering ble PCR- produktene kjørt på en 1 % agarosegel (SeaKem LG agarose, Lonza) tilsatt etidiumbromid (EtBr) ved 90 volt i 50 minutter. Båndene ble synliggjort med UV- lys og skåret ut av gelen. Båndene ble rensset med QIAquick gel extraction kit (Qiagen) og konsentrasjonen ble målt på Nanodrop.

200 ng av det rensende PCR- produktet ble fortynnet i RNase- fritt vann til et volum på 13 µl, og brukt som templat ved *in vitro* transkripsjon. Digoxigenin (DIG) merking av RNA probene ble utført med DIG RNA Labeling Kit (SP6/T7) og T3 RNA polymerase (Roche).

Digoxigenin er festet til C-5 posisjonen på uridin nukleotidene med en 11 karbonatom lang spacer kjede (DIG-11-UTP) (Roche 2008, s 10). Antisens og sense DIG merkede RNA prober syntetiseres henholdsvis av T3 og T7 polymerase. Tabell 6 viser komponentene i *in vitro* transkripsjonen av PCR- templatene. Komponentene ble tilsatt i et rør på is, blandet forsiktig og sentrifugert. Deretter ble rørene inkubert i 2 timer ved 37 °C i vannbad.

**Tabell 6:** Komponentene som inngår i *in vitro* transkripsjonen av PCR- templatet.

Komponent	Volum (µl)
PCR- templat	13
RNA Polymerase T3 (antisense) eller RNA Polymerase T7 (sense)	2
10x dNTP labeling mixture	2
10x transcription buffer	2
Protector RNase inhibitor	1
<b>Totalvolum</b>	<b>20</b>

DNA- templatet ble fjernet ved inkubering med DNase (2 µl) i 15 min ved 37 °C i vannbad. Reaksjonen ble til slutt stoppet ved tilsetting av 0,8 µl 0,5 M EDTA (pH 8,0). Probene ble rensert på kolonne, Illustra ProbeQuant G-50 Micro Columns (GE Healthcare) ihht spesifikasjonene til kitet. Produktet (probene) ble deretter kjørt på en 1 %- agarosegel med EtBr ved 200V i 12 til 15 minutter

Probe konsentrasjonen bestemmes ved en Dot blot (se appendiks II).

### 2.2.5 Rehydrering av snitt

Snittene ble deparafinisert med xylene og rehydrert med en synkende konsentrasjon av etanol i avtrekksskap. Tabell 7 viser de ulike stegene.

**Tabell 7:** Deparafinisering og rehydrering av snittene fra Atlantisk laks.

Steg	Innhold	Minutter
1	Xylene	15
2	Xylene	15
3	100 % etanol	5
4	100 % etanol	5
5	96 % etanol	5
6	70 % etanol	5

### 2.2.6 *Blokkering av endogen peroksidase*

Endogene peroksidaser er enzymer som kan finnes naturlig i vev (lever, nyre, kar rike områder med erythrocytter etc.), der de katalyserer oksidering av forskjellige substrater. Ved *in situ* hybridiseringen ble horseradish peroksidase (HRP) konjugert antistoff benyttet til signal amplifisering av TSA (thyramid signal amplification), for å visualisere prober som hadde festet seg til snittet. Blokkering av endogen peroksidase ble utført i forkant for å unngå uspesifikk bakgrunnsfluorescens. Endogen peroksidase ble blokkert med en fersk løsning av 1 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> i metanol ved RT i 30 minutter i et tildekket fargegtrau. Snittene ble deretter vasket 10 minutter i RNase fri PBS, og ringet inn med en Dako penn.

### 2.2.7 *Preparering av snittene med RNase frie løsninger*

0,3 % Triton X-100 i DEPC- PBS ble brukt for å øke celle permeabiliteten. Snittene ble inkubert med detergent- løsningen i 15 min ved RT i fuktekammer. Etter to 5 min vask i DEPC- PBS ble snittene behandlet 5 min i fuktekammer med 20 µg/ml Proteinase K (Roche) i 5x TE buffer (pH 7,5) ved 37 °C. Dette vil øke sannsynligheten for inntrenging av prober inn til de cellulære nukleinsyrene. Proteinase K nedbrytningen av proteiner ble stoppet med inkubering i 4 % paraformaldehyd i fosfatbuffer i 5 min ved 4 °C. Snittene ble deretter vasket to ganger med DEPC- PBS i 5 min. Videre ble snittene acetylerert med nylaget 0,1 M triethanolamine med 0,25 % acetic anhydride i 5 minutter med risting. Dette ble etterfulgt med en økning av acetic anhydride til 0,5 % og satt på risting i nye 5 minutter. Acetyleringen skal redusere bakgrunnssignaler ved å fjerne den positive ladningen til både vev og

objektglass, og dermed unngå uspesifikk binding av negativt ladede prober (<http://lade.udec.cl> 21.05.14). To 5 min vask med DEPC- PBS ble utført før en 10 min inkubering med en prehybridiserings- løsning av 50 % deionisert formamid i 2x SSC (saline-sodium citrate), pH 7,5.

### 2.2.8 *Hybridisering*

Til hybridiseringen ble det brukt en hybridiserings- løsning med 10x Denhards løsning, 2x SSC, 0,25 µg/µl calf thymus DNA (Sigma), 10 % dextran sulphate (Sigma-Aldrich, Fluka) og 40 % formamide (Ambion). Denhards løsning og calf thymus DNA vil redusere den uspesifikke bindingen (Sigma), mens dextran sulphate vil øke hybridiserings raten (Roche 2008). Med 2x SSC tilføres monovalente kationer (f.eks. Na<sup>+</sup>) til hybridiserings- løsningen, som vil redusere den elektrostatiske frastøtningen mellom RNA- proben og målsekvensen. Formamiden vil redusere temperaturen hybridiseringen kan foregå ved, og i tillegg minimere problemet med fordampning (Strachan, *et al.*, 1999).

Probene ble fortynnet til 0,5 ng/µl i nylaget hybridiseringsløsning, og deretter denaturert ved koking på varmeblokk i 10 minutter. Enkelt- trådet RNA prober har ofte omfattende sekundære strukturer, som kan interferere ved hybridiseringen. Ved denaturering vil RNA probene få en lineær konformasjon, og dermed kunne hybridisere mer effektivt (Wilk, 2010). Hybridiseringsløsningen med probe ble tilsatt til snittene og RNase frie dekkglass (Grace Biolabs) ble lagt på. Snittene ble satt til inkubering ved 55 °C over natt i fuktekammer i hybridiseringsskapet. Det ble også satt inn 2x SSC og 1x SSC i hybridiseringsskapet, slik at de var temperert til dagen etter.

### 2.2.9 *Vasking*

På dag to av ISH er det ikke nødvendig med RNase frie løsninger. Til vasking av snittene ble det brukt SSC-løsninger med synkende konsentrasjon. Alle SSC- løsningene ble varmet til 55 °C før vasking av snittene. Snittene ble satt på risting med oppvarmet vaskeløsning i fargetrau. Dekkglassene falt av i løpet av første vask. De ulike vasketrinnene som ble utført er gjengitt i tabell 8.

**Tabell 8:** Vasketrinn utført med synkende konsentrasjon av SSC- løsningen.

Vask nummer	Innhold	Minutter
1	2xSSC	10
2	2xSSC	10
3	1xSSC	10
4	1xSSC	10
5	0,5xSSC	5
6	0,5xSSC	5
7	0,1xSSC	5
8	0,1xSSC	5

Etter vask ble Dako Pen ringen fornyet rundt snittene.

#### 2.2.10 *Behandling med RNase A*

RNase A kløyver enkelttrådig RNA og benyttes i *in situ* hybridisering for å fjerne RNA som ikke har hybridisert og er dermed med på å reduserer bakgrunnsfluorescens. Det ble brukt RNase- buffer på snittene i 1 minutt ved 37 °C for å oppnå likevekt, før RNase- buffer med RNase A ble tilsatt. Snittene ble inkubert med 20 µg/ml RNase A i RNase- buffer i 30 minutter ved 37 °C i fuktekammer. Etter dette ble snittene skylt ved å dyppe gjentatte ganger i et fargetrau med RNase- buffer (37 °C), og videre inkubert med RNase- buffer i 5 minutter ved 37 °C i fuktekammer. Snittene ble deretter skylt i 0,1x SSC (37 °C), og videre inkubert med 50 % deionisert formamide i 2x SSC i 15 minutter ved 37 °C i fuktekammer.

#### 2.2.11 *Blokkering*

To 5 minutters vask i TBS (Tris-bufret saltløsning) ved RT ble utført før blokkering av snittene med TNB- buffer (Tris-NaCl-blokke buffer; TBS- buffer med 0,5 % blokkeringsreagens (PerkinElmer Life Sciences). Snittene ble inkubert i fuktekammer med TNB- buffer i 30 minutter ved RT.



### 2.2.12 *Merking med antistoff*

I neste steg av ISH ble det tilsatt horse- radish- peroxidase (HRP) konjugert anti- digoxigenin Fab- fragment (Anti-Digoxigenin-POD, Fab fragments; Roche Diagnostics) fortynnet **1:100** i TNB til snittene. Etter at Anti-Digoxigenin-POD var tilsatt ble snittene inkubert i 30 minutter ved RT i fuktekammer. Snittene ble deretter vasket med risting tre ganger i 5 minutter med TNT buffer (TRIS- NaCl- Tween 20 buffer).

### 2.2.13 *Amplifisering med TSA- fluorescein*

Til amplifisering av ISH- signalet ble det benyttet TSA™ Plus Fluorescein System (PerkinElmer). Fluorescein- tyramid stock løsningen (løst i dimetylsulfoksid) ble fortynnet **1:50** i 1x Plus Amplification Diluent. Bruksløsningen med fluorescein- tyramid ble deretter tilsatt på snittene. Etter 10 minutter inkubering i fuktekammer ved RT ble snittene vasket i TNT buffer med risting tre ganger i 5 minutter.

### 2.2.14 *Motfarging med DAPI*

DAPI, dilactate (4',6-diamidino-2-phenylindole, dilactate; Molecular Probes®) ble brukt som motfarging til fluorescein. DAPI binder til dobbeltrådig DNA og gir en blå fluorescens- farging av cellekjernene. Snittene ble først inkubert med PBS i 1 minutt ved RT for å oppnå likevekt, deretter ble DAPI dilactate fortynnet i PBS til 400 nM tilsatt. Snittene ble inkubert i 5 minutter og deretter vasket i PBS to ganger i 5 minutter.

### 2.2.15 *Montering*

Til montering av snittene ble det brukt *SlowFade*® Gold antifade reagent (Molecular Probes®). En dråpe av monteringsmediet ble dryppet på hvert snitt og dekkglass ble lagt på.

### 2.2.16 *Mikroskopering*

Snittene ble mikroskopert ved hjelp av Leica DM6000 B eller Konfokal Leica TCS SP5. Snitt som ikke ble mikroskopert med en gang ble lagret mørkt ved 4 °C i kjøleskap.

### 2.3 Primær cellekultur isolert fra hjerte til Atlantisk laks (*Salmo salar*)

En cellekultur kan beskrives som *in vitro* dyrkning og vedlikehold av celler isolert fra multicellulære organismer (FAO, 2001). En primær cellekultur er startet fra celler, vev eller organer tatt direkte fra organismen, og de primære cellene vil stort sett opprettholde sine funksjonelle egenskaper slik de var *in vivo*. Over tid vil metabolismen og de vevsspesifikke funksjonene hos en primær cellekultur endres, og til slutt vil kulturen dø ut (Unchern, 1999).

Den ekstracellulære matriksen (ECM; fiberdannende proteiner og polysakkarider) danner et intercellulært nettverk i vev og organer som holder cellene sammen (Medisinsk leksikon, 2009). Celler kan koples sammen med nærliggende celler eller ECM via flere typer transmembrane proteiner. Primært koples celler til ECM via heterodimere reseptorer kalt integriner. Eksempler på ligander for integriner som finnes i ECM er fibronektin, kollagen, entactin og laminin. Integriner kan også mediere celle- celle interaksjoner (Wikipedia, 230714; Freshney, 2005). Transmembrane proteoglykaner utgjør en annen gruppe av celle adhesjonsmolekylene, og de interagerer blant annet med kollagen og andre proteoglykaner i ECM. Blant celle-celle adhesjonsmolekylene finnes det både  $\text{Ca}^{2+}$  avhengige (kadheriner, selektiner) og  $\text{Ca}^{2+}$  uavhengige (immunglobulin-superfamilien (IgSF) celle adhesjonsmolekyler). Kadherinene er de viktigste molekylene for celle-celle adhesjon og medierer først og fremst interaksjoner mellom molekyler av samme type. På kadherinene finnes det ekstracellulære domener med bindingssteder for  $\text{Ca}^{2+}$  som er nødvendig for adhesjon (Alberts *et al.*, 2002; Freshney, 2005; Wikipedia, 230714).

Vev og organer kan deles opp i biter og enkeltceller ved hjelp av mekaniske og/eller enzymatiske behandlinger (Freshney, 2005). Til våre forsøk ble det brukt de proteolytiske enzymene trypsin, kollagenase og thermolysin (nøytral protease). Enzymbehandlingene ble utført ved svak risting. Hjertene ble før den enzymatiske behandlingen inkubert i en kalsium fri buffer på grunn av at trypsin hemmes av kalsium (og magnesium). Trypsinløsningen var også tilsatt et chelateringsmiddel (EDTA) som binder kalsium og magnesium. Et nedsatt  $\text{Ca}^{2+}$ - nivå vil også påvirke  $\text{Ca}^{2+}$ - avhengige celle-celle adhesjonsmolekyler (se over). Ved behandling med kollagenase måtte vi derimot tilsette  $\text{CaCl}_2$ , fordi kalsium er en kofaktor for kollagenasen (Alberts *et al.*, 2002; Freshney, 2005).

Etter enzymbehandling ble den primære cellekulturen fra hjerte til Atlantisk laks sådd ut i celledyrkningsbrett som på forhånd var coatet med laminin. I tidligere forsøk med disse cellene ble ulike typer coating prøvd ut og laminin viste seg å gi best adhesjon av celler til celledyrkningsbrønnene (Moan, 2013). Den primære cellekulturen (mikskultur) ble dominert av tre celletyper: endotelceller, epitelceller og myocytter (Koren *et al.*, 1997). Vi skilte de ulike celletypene ved å utnytte deres evne til å feste seg til matriksproteiner (i vårt tilfelle laminin). De adherente cellene (hovedsakelig endotelceller) festet seg raskt til laminin, mens de non-adherente cellene (hovedsakelig myocytter) brukte lengre tid på å feste seg. Etter at de adherente cellene hadde festet seg til laminin ble de non- adherente cellene overført til nye celledyrkningsbrett.

Til isolering og etablering av primær cellekultur fra hjerte ble det tatt utgangspunkt i en metode beskrevet av Koren, *et al.* (1997), og en tidligere masteroppgave ved NFH ( Moan, 2013).

### **2.3.1 *Forsøksfisk***

Det ble brukt standard laks generasjon 2011 fra Aqua Gen, med en total gjennomsnittsvekt på 1,0 kg over seks forsøk. Laksen gikk i kar på avdeling A eller G ved HiT med naturlig temperert sjøvann (ca. 35 ‰) og 24 timer kontinuerlig lys. Fôret som ble brukt var fra Skretting (4,5 mm, Spirit 150), og ble utfôret via et 48 timer fôringsregime.

### **2.3.2 *Forsøksoppsett og prøveuttak***

De seks forsøkene ble utført mellom oktober 2013 og februar 2014 ved HiT og BFE. Alle fiskene ble avlivet med et slag mot hode. Totalt ble det tatt ut hjerter fra 54 fisk, 6- 11 fisk per gang (se tabell 9).

**Tabell 9:** Forsøksoppsett – *in vitro*

Forsøk	Antall (n= 54)	Isolert celler fra	Cellekultur fra hjerte	Behandling  Stimulering	Høstetidspunkt  (timer)	Kvantitativ RT- PCR  (qPCR)
<b>1</b>	6	Ventrikkel og atrium	Miks	Poly I:C	3 <sup>1</sup> / <sub>2</sub> , 6, 12 og 24	IFNa, IFNb, IFNc
<b>2</b>	8	Atrium	Miks	Poly I:C	3 <sup>1</sup> / <sub>2</sub> , 6 og 12	IFNa, IFNb, IFNc
<b>3</b>	9	Atrium	Miks	Poly I:C	3 <sup>1</sup> / <sub>2</sub> , 6, 12 og 24	IFNa, IFNb, IFNc
<b>4</b>	10	Atrium	Endotelceller	Poly I:C	6 og 12	IFNa, IFNb, IFNc
<b>5</b>	10	Atrium	Myocytter og endotelceller	Poly I:C	3, 6 og 12	IFNa, IFNb, IFNc
<b>6</b>	11	Atrium	Myocytter og endotelceller	ILA	0, 12, 24, 72 timer og 7 dager	IFNa, IFNb, IFNc, ILA segment 8 og TLR3

Ved uttak av hjertene ble det jobbet så raskt og sterilt som mulig. Alt utstyr som ble brukt var enten autoklavert eller sterilt engangsutstyr. Pinsetter ble dyppet i 70 % etanol og brent med gassbrenner mellom hver fisk. Det ble også brukt 70 % etanol til desinfisering av fiskens hudoverflater, og i tillegg ble det byttet skalpellblad mellom ytre og indre overflater. I de to første forsøkene ble fisken åpnet på venstre side lateralt bak gjellelokket og skrått ned mot gattåpningen. Pericardialhulen (hjertehulen) ble deretter åpnet med et lateralt snitt fra bukhulen og fremover. I de fire siste forsøkene ble fisken lagt på rygg og åpnet med et ventralt snitt rett inn i hjertehulen og delvis bukhulen. Faren for kontaminering fra gjellene ble dermed redusert.

Hjertet ble tatt ut ved først å kutte bulbus, for så å kutte i overgangen mellom atrium og sinus venosus. Ved å løfte hjerte med en pinsett forsiktig etter bulbus var det lettere å se hvor atrium måtte løsnes. Eventuelt blod i hjertehulen ble fjernet med en pasteurpipette. Hjerte ble

overført til en petriskål med litt transportmedium (Se appendiks IV), da tørr plast kan skade vevet.

Ved hjelp av en 20 ml sprøyte og en 20- gauge (0,9 mm) kanyle ble hjerte perfundert med ca. 20 ml kaldt transportmedium. Det ble stukket opptil flere plasser i både atrium og ventrikkel. Under perfunderingen fylles hjerte med transportmedium (hjerte blåses opp), som så pumpes ut når hjerte kontraherer. Etter hvert som blodet ble vasket ut av hjerte ble vevet lysere. Det ble jobbet raskt mellom avliving og perfundering av hjerte for å unngå dannelse av blodkoagler i hjertet. Blodkoagler vil forurense cellekulturen med erythrocytter og forstyrre celledellingene.

Resten av celleisoleringen ble utført ved NFH. Overførte derfor 3-4 hjerter til et halvfullt 50 ml rør med transportmedium. Røret ble fraktet liggende på is.

### **2.3.3 Celleisolering fra hjertet til laks**

Ved laboratoriet ved NFH ble det jobbet i et Herasafe KS 15 klasse II (Thermo) kabinet. Hjertene og transportmediumet ble overført til en petriskål på is. Bulbus ble klippet vekk og kastet og atrium og ventrikkel ble klippet fra hverandre. Både atrium og ventrikkel ble åpnet opp ved å klippe fra «hjørne til hjørne» og deretter foldet ut. Eventuelle koageler ble fjernet og hjertevevet ble skylt litt i transportmediet i petriskålen. Atrium og ventrikkel ble videre behandlet adskilt. Det ble isolert celler fra ventrikkel i forsøk 1, men ikke i forsøk 2- 6. Fra atrium ble det isolert celler i alle seks forsøkene (tabell 10).

Overførte 3- 4 atrium (eller ventrikler) til 50 ml rør med ca. 25 ml Ca- fri perfusjonsbuffer (appendiks IV). Rørene ble inkubert liggende med resting (ca. 80 rist/ minutt) i 30 minutter ved 12 °C.

Perfusjonsbufferen ble helt av og vevet ble overført til 50 ml rør med 25 ml trypsinløsning (0,63 mg/ml), se appendiks IV. Inkuberte rørene liggende med resting (ca. 80 rist/ minutt) i 10 min (ventrikkel i 15 min) ved 12 °C.

Trypsinløsningen ble helt av og atrium (eller ventrikkel) ble overført til 50 ml rør med ca. 20 ml kollagenaseløsning. Ved inkubering med kollagenase ble det brukt Liberase TM Research Grade (Thermolysin medium) til atrium og Liberase TH Research Grade (Thermolysin High) til ventrikkel. Begge liberasesene ble fortynnet til en bruksløsning med 0,16 kollagenase

Wünsch units/ml. Thermolysin (nøytral protease) aktiviteten vil derimot være høyere i Liberase TH enn i Liberase TM bruksløsningen. Inkuberte rørene liggende med risting (ca. 80 rist/ minutt) i ca. 30- 40 min (ventrikkel i ca. 40 min) ved 12 °C. Observerte rørene for blakking etter ca. 25- 30 min under inkuberingen, og inkuberte ytterligere 5- 10 min dersom blakking ikke ble observert.

Atrium (eller ventrikkel) ble overført til en petriskål på is sammen med kollagenaseløsningen. Kollagenaseløsningen ble trukket opp i en 20 ml sprøyte, og brukt til å spyle innsiden av atriet/ventrikkelen for å frigjøre cellene. Etter flere spylinger ble cellesuspensjonen overført til et 50 ml rør, og inkubert i 1 min på is for å samle vevsfragmenter i bunnen.

Cellesuspensjonen, uten vevsfragmentene ble deretter overført til et nytt 50 ml sentrifugerør og sentrifugert ved 400g i 5 min ved 10 °C (Heraeus Multifuge 1 S-R). Supernatanten ble sugd av og cellepelletten ble forsiktig resuspendert i 5 ml L- 15 medium med 100 <sup>µg</sup>/ml gentamicin og 10 % FBS (dyrkningsmedium, se appendiks IV).

#### 2.3.4 *Celleutbytte og utsæd i celledyrkningsbrett*

Cellene ble telt i en automatisk celledeteller (Chemometec Nucleocounter YC-100), og fortynnet til ønsket konsentrasjon med dyrkningsmedium. I forsøk 1- 5 ble cellesuspensjonen fortynnet til  $1,2 \times 10^6$  celler/ml og i forsøk 6 til  $9,0 \times 10^5$  celler/ml. Cellesuspensjonen ble deretter sådd ut i 24- brønners celledyrkningsbrett (1 ml/brønn) som på forhånd var coated med laminin (se appendiks III ). Tabell 10 viser antall brønner som ble sådd ut i hvert forsøk. Brettene ble deretter inkubert ved 14 °C.

**Tabell 10:** Antall brønner i 24-brønnersbrett sådd ut med primærceller fra hjerte til atlantisk laks i celledyrkningsbrett coatet med laminin.

Forsøk	Antall brønner sådd ut med primærceller	
	Atrium	Ventrikkel
1	24	15
2	24	-
3	34	-
4	44	-
5	24	-
6	48	-

Primærcellene ble observert i mikroskop de påfølgende dagene. Endotelcellene var vanskelig å se ettersom myocytene lå oppå. I alle tilfellene uten om ett (forsøk 4) kunne vi se myocytene kontrahere.

### 2.3.5 *Poly I:C stimulering av mikskultur*

I forsøk 1- 3 ønsket vi å stimulere cellekulturene fra hjertet med poly I:C. To (forsøk 2 og 3) eller tre (forsøk 1) dager etter uttak ble dyrkningsmediet forsiktig fjernet med en pasteurpipette og 1 ml L-15 medium med 100 µg/ml gentamicin, 2% FBS og 10 µg/ml poly I:C (se appendiks IV) ble tilsatt. Primærcellene ble inkubert ved 14 °C og høstet etter 3½, 6, 12 og 24 timer (forsøk 2 manglet 24 timer tidspunktet). Ustimulerte celler (tilsatt samme medium uten poly I:C) ble høstet etter 3½ timer (3½ og 24 timer, forsøk 1).

### 2.3.6 *Poly I:C stimulering av endotelceller og myocytter*

I forsøk 4 og 5 ønsket vi å stimulere endotelceller og myocytter med poly I:C hver for seg. Dagen etter isolering /utsæd ble cellene vasket og cellene som ikke hadde festet seg til underlaget ble overført til nye brønner. Med vaskingen ønsket vi å oppnå at endotelcellene ble igjen i brønnene, mens myocytene ble vasket bort (oppsamlet i rør).



For å løsne cellene litt ble celledyrkningsbrettet først gitt noen forsiktige bank før vask. Til vaskingen ble det benyttet pasteurpipetter til «kraftig» vasking av hver enkelt brønn. Det ble først vasket med dyrkningsmediet i brønnene, og deretter 3- 4 ganger med 1 ml PBS-. Til slutt ble nytt dyrkningsmedium (1 ml/brønn) tilsatt.

Cellene som ble vasket av (dyrkningsmediet og PBS- som ble brukt til vaskingen) ble samlet i 50 ml rør med 20- 25 ml kjøleskaps temperert L-15 medium m/gentamicin og 10 % FCS. Fulle 50 ml rør ble satt ved 14 °C til vaskingen var ferdig. Rørene ble deretter sentrifugert ved 400 G med sakte akselerasjon og brems i 5 min ved 10 °C. Cellene ble resuspendert og fordelt ut i 24-brønners celledyrkningsbrett coatet med laminin.

To dager etter vasking og separering av cellepopulasjonene ble dyrkningsmediet forsiktig fjernet med en pasteurpipette og 1ml medium med 10 <sup>µg</sup>/ml poly I:C (se appendiks IV) tilsatt. Endotelcellene og myocyttene ble inkubert ved 14 °C og høstet etter 3, 6 og 12 (6 og 12 timer, forsøk 4). Ustimulerte celler (tilsatt dyrkningsmedium uten poly I:C) ble høstet etter 3 timer (6 timer, forsøk 4).

### **2.3.7 Infisering av endotelceller og myocytter med ILAV**

I forsøk 6 ønsket vi å infisere endotelceller og myocytter med ILAV (infeksiøst lakseanemi virus). Alt arbeid med ILAV ble utført på egen viruslab. Endotelceller og myocytter ble skilt på samme måte som ved poly I:C stimulering (se over). ILAV isolat Glesvær hadde en titer på 3,16x10<sup>7</sup> ip/ml og ble dyrket og titrert av stipendiat Chia Jung Chang.

For å beregne MOI ble to brønner endotelceller og to brønner myocytter brukt til å telle cellekjerner. Medium ble fjernet og cellene ble lysert ved å tilsette 100 µl lysisbuffer (0,1 M Citronsyre, 1 % Tween 20, 0,05 % Krystallfiolett). Cellekjerner ble så telt i et Bürker tellekammer. Antall celler per brønn ble beregnet, og antall µl stockløsning ILAV som måtte tilsettes per brønn for en MOI på 1 ble beregnet. ILAV ble fortynnet i L-15 medium uten serum og 400 µl ble tilsatt til hver brønn. Uinfiserte celler ble behandlet likt men ble tilsatt medium uten ILAV. Etter inkubering i 2 timer ved 15 °C ble virusløsningen fjernet forsiktig med en pasteurpipette og 1 ml dyrkningsmedium med 2 % FBS ble tilsatt pr brønn. Dette ble definert som tidspunkt 0 timer.

To brønner på hvert celledyrkningsbrett ble tilsatt medium med poly I:C. Dette var for å inkludere en positiv kontroll for uttrykk av IFN og en kontroll på cellekvaliteten. Cellene og mediet (supernatanten) ble deretter høstet hver for seg ved 0, 12, 24, 72 timer og 7 dager etter infeksjon. Uinfiserte celler (tilsatt dyrkningsmedium uten ILAV) ble høstet etter 0 timer og 7 dager. Medium ble høstet ved å overføre medium fra to parallelle brønner til ett rør. Mediet ble videre brukt til titrering av virus. Cellene ble høstet for videre RNA isolering (se avsnitt 2.4.2.6). Ved høsting ble ikke brønnene vasket med PBS etter at supernatanten var sugd av (se under «høsting av celler i celledyrkningsbrett»). Prøvene ble oppbevart ved -70 °C inntil videre analysering.

### **2.3.8 Høsting av celler i celledyrkningsbrett til RNA isolering**

Prøvemateriale fra to brønner ble høstet og slått sammen til en prøve. Dyrkningsmediet ble sugd forsiktig av cellene med en pasteurpipette. Vasket brønnene ved å tilsette ca. 1 ml PBS- (sigma) mot kanten (ble ikke utført ved infisering med ILAV), og sugde deretter PBS- forsiktig av. Tilsatte 300 µl RLT lysisbuffer (Qiagen) med 1 % mercaptoetanol (Sigma-Aldrich) til hver brønn. Skrapet i brønnen med en bøyd pipettespiss for å få med alt i brønnen. Brukte en 20- gauge nål (0,9 mm, BD Microlance) og en 1 ml sprøyte (BD Plastipak) til å sugde lysatet opp og ned i brønnen 4- 5 ganger Dette var med på å ødelegge cellene og homogenisere lysatet. Lysatet ble deretter overført til et eppendorfrør, og ytterligere ført igjennom nåla 8-10 ganger. Prøvene ble oppbevart ved -70 °C inntil RNA isolering.

### **2.3.9 Utstryk fra hodenyre på agarskåler**

Det ble i forsøk 4- 6 tatt utstryk fra hodenyren til alle laksene på blodagarskål tilsatt 2% NaCl. Dette ble gjort fordi petekkier enkelte ganger ble observert på buken til laksen. Vi konkluderte etter hvert med at petekkiene hadde oppstått under avlivningen av fisken, og videre oppfølging av blodagarskålene ble avsluttet.

### **2.3.10 Analyser som ble utført**

I forsøk 1- 5 ble genuttrykket av IFNa, IFNb, IFNc i primærcellene analysert med qPCR. Alle prøvene ble analysert i triplikater, utenom prøvene i forsøk 1 som ble analysert i duplikater.

Cellene (lysatet) fra forsøk 6 ble analysert for mengde ILAV segment 8 og genuttrykket av IFNa, IFNb, IFNc og TLR3 med qPCR. Alle prøvene ble analysert i triplikater, utenom TLR3 fra endotelcellene som ble analysert i duplikater på grunn av lite prøvemateriale. Supernatanten ble brukt til å titrere infeksjøs virus i TO-celler.

## 2.4 Isolering av RNA fra organer og primære cellekulturer

Alle cellene i en organisme (med noen få unntak) inneholder den samme genetiske informasjonen (DNA), men hvilke gener som er aktive avhenger av celletype, vevstype, utviklingstrinn og ytre/indre stimuli. Når et gen aktiveres skjer det først en transkripsjon av DNA til mRNA og deretter en translasjon av mRNA til protein (Ervik.A *et al.* 2004) . Genuttrykk i celler og vev kan undersøkes ved å måle mengden av spesifikke mRNA for et gitt gen.

RNeasy Mini kit (Qiagen) ble brukt til isolering av RNA fra både vev og primære cellekulturer. RNA- isoleringene ble utført i avtrekksskap ved RT. Til sentrifugering ble det benyttet en Heraeus Biofuge Pico sentrifuge. Under hele isoleringen ble det arbeidet så RNase fritt som mulig, og med RNase fritt utstyr.

Ved RNA- isolering fra vevsprøvene på RNAlater ble protokollen til RNeasy Fibrous Tissue Mini kit ( Qiagen 2010) benyttet med enkelte modifikasjoner. Det ble brukt rør fra Precellys 24 Lysing kit (Hard tissue homogenizing CK28, Bertin Technologies) til homogenisering av vevsprøvene. Veide ut like under 30 mg vev fra hodenyre, og overførte vevet til et Precellys 24 Lysing kit rør tilsatt 600 µl RLT lysisbuffer (Qiagen) med 1 % mercaptoetanol (Sigma-Aldrich). Homogeniserte vevet i 2 x 15 sek ved 5900 rpm i Precellys 24 (Bertin Technologies). Utførte en kort spinn for å skille skum og lysat. Overførte deretter lysatet til eppendorfrør tilsatt 590 µl Ultra Pure H<sub>2</sub>O (Biochrom AG) og 10 µl proteinase K (New England Biolabs). Mikset prøvene ved pipettering og inkuberte deretter ved 55 °C (BT3, Grant) i 10 min. Sentrifugerte prøvene i 3 min ved 10 000 G, og overførte supernatanten til 2 ml rør tilsatt 450 µl 99,98 % etanol (Sigma- Aldrich). Mikset prøvene ved pipettering, og overførte deretter 700 µl til spinnkolonnene (Qiagen). Etter sentrifugering (10 000 G i 15 sek) ble prosessen gjentatt inntil alt prøvemateriale var blitt tilsatt på spinnkolonnene. Vasket deretter kolonnene flere ganger. Først en gang med 700 µl RW1 buffer, og deretter to ganger

med 700 µl RPE buffer (Qiagen). Sentrifugerte ved 10 000 G i 15 sek mellom hver vask. Etter siste vask ble spinnkolonnene tørrsentrifugert ved 10 000 G i 1 min. Eluerte til slutt RNA ut i 30 µl RNase fritt vann (Qiagen) ved 10 000 G i 1 min. Prøvene ble satt på is og deretter ble konsentrasjon og renhet målt på Nanodrop<sup>®</sup> ND- 1000 Spektrofotometer (Thermo Scientific). Ratio 260 nm/ 280 nm absorbanse brukes til å vurdere renheten til prøvene, og bør ligge rundt 2 for RNA (ThermoScientific, 2008) Prøvene ble etter måling fortynnet til 100 ng/ µl. Oppbevarte prøvene ved -80 °C inntil cDNA- syntese.

Bulbus ble fjernet før RNA- isolering fra hjerte. Alle hjertene veide > 30 mg, økte derfor mengden RLT lysisbuffer med 1 % mercaptoetanol (økte med ca. 200 µl per 10 mg vev) ved homogenisering. Brukte en mengde lysat tilsvarende like under 30 mg vev videre i RNA- isoleringen. Lysat som ikke ble brukt ble frosset ned ved – 80 °C til evt. senere bruk. Prosedyren videre er ellers lik som RNA- isolering fra hodenyre.

Til RNA- isolering fra primære cellekulturer (hjerte) ble RNeasy Mini Kit (Qiagen) brukt. Fulgte protokollen til «Purification of Total RNA from Animal Cells using Spin Technology» ( Qiagen 2012). Tinte de høstede prøvene (ca. 600 µl lysat). Tilsatte 600 µl 70 % etanol til lysatet. Mikset prøvene ved pipettering, og overførte deretter 600 µl til spinnkolonnene (Qiagen). Etter sentrifugering ved 10 000 G i 15 sek ble prosessen gjentatt inntil alt prøvemateriale var blitt tilsatt på spinnkolonnene. Vasket deretter kolonnene flere ganger. Først en gang med 700 µl RW1 buffer, og deretter to ganger med 500 µl RPE buffer (Qiagen). Sentrifugerte ved 10 000 G i 15 sek mellom hver vask. Etter siste vask ble spinnkolonnene tørrsentrifugert ved 10 000 G i 1 min. Overførte spinnkolonnene til eppendorfrør. Eluerte til slutt RNA ut i 30 µl RNase fritt vann (Qiagen) ved 10 000 G i 1 min. Prøvene ble satt på is og deretter ble konsentrasjon og renhet målt på Nanodrop<sup>®</sup> ND- 1000 Spektrofotometer. Prøvene ble etter måling fortynnet til ønsket konsentrasjon. Oppbevarte prøvene ved -80 °C inntil cDNA- syntese.

## 2.5 cDNA- syntese

Til syntetisering av komplementært DNA (cDNA) ble QuantiTect Reverse Transcription kit (Qiagen) ( Qiagen 2009) benyttet. Fulgte protokollen, “*Reverse Transcription with Elimination of Genomic DNA for Quantitative, Real-Time PCR*”, fra produsenten. Alle inkuberingene ble utført i GeneAmp<sup>®</sup> PCR System 2700 (Applied Biosystems).

RNA prøvene ble tint og holdt på is. Lik mengde RNA fra hver prøve fra samme forsøk ble brukt til cDNA syntese. På grunn av varierende RNA utbytte i de ulike forsøkene, varierte mengden RNA brukt i cDNA syntesen mellom forsøkene (se appendiks V). RNA prøvene ble først behandlet med gDNA wipeout buffer ved 42 °C i 2 min, for å fjerne genomisk DNA (se tabell 11).

**Tabell 11: Genomisk DNA eliminering**

Komponent	Volum
gDNA Wipeout Buffer, 7x	2 µl
Templat RNA ( $\leq 1\mu\text{g}$ ) + RNase fritt vann*	12 µl
<b>Totalt</b>	14 µl

\*Volumet til templat RNA varierte. RNase fritt vann ble brukt til å justere volumet opp til 12 µl.

Prøvene ble satt tilbake på is, og tilsatt en mastermiks av de resterende reagensene (se tabell 12). RNA ble deretter revers transkribert til enkeltrådet cDNA ved 42 °C i 15 min. Inaktiverte til slutt Quantiscript Reverse Transcriptase ved 95 °C i 3 min. Prøvene ble satt på is og cDNA fortynnet til ønsket konsentrasjon (se appendiks V). Prøvene ble oppbevart ved –20 °C inntil qPCR.

**Tabell 12: Komponenter i cDNA reaksjonen**

Komponent	Volum
Quantiscript Reverse Transcriptase	1 µl
Quantiscript RT buffer 5x	4 µl
RT Primer mix	1 µl
Templat RNA etter genomisk DNA eliminering	14 µl
<b>Totalt</b>	<b>20 µl</b>

## 2.6 Kvantitativ real- time PCR

Kvantitativ real- time polymerase chain reaction (qPCR) er en teknikk som kan brukes til å analysere uttrykket av mRNA i celler. Genuttrykket av et bestemt gene kan på denne måten bestemmes (Schmittgen og Livak, 2008). Ved relativ kvantifisering sammenlignes uttrykket av et bestemt gen i en prøve (behandlet, infisert etc.) med uttrykket av samme gen i en annen prøve (ubehandlet, uinfisert etc.). Det brukes også et referansegene (endogen kontroll) som en kontroll til å normalisere eksperimentelle variasjoner (Life Technologies Corporation, 2012).

Ved qPCR blir mengden produkt målt for hver syklus i PCR- reaksjonen ved hjelp av et fluorescerende fargestoff. Fluorescensen vil øke proporsjonalt med genuttrykket. Hver syklus består av tre steg: denaturering, annealing og elongering (se tabell 13). Under denatureringen separeres dsDNA til ssDNA ved høye temperaturer (vanligvis 95 °C). Ved annealing senkes temperaturen (i vårt tilfelle 60 °C) slik at primerene kan binde seg til sine komplementære sekvenser på templatet (mål- DNA). Når primerene har bundet seg skjer det en elongering, der komplementært DNA syntetiseres av DNA polymerase. Etter dette starter prosessen på nytt med denaturering, annealing og elongering (Life Technologies Corporation, 2012). Antall sykluser er vanligvis 40 ved bruk av SYBR<sup>®</sup> Green (Applied Biosystems, 2010).

**Tabell 13: qPCR program med smeltekurve utført med 7500 Fast Real-Time PCR system**

Steg	Temperatur (°C)	Varighet (sekunder)	Antall sykluser
Denaturering	95	20	Hold
Denaturering	95	3	40
Annealing/ elongering	60	30	40
Smeltekurve	95	15	Kontinuerlig
	60	60	
	95	15	
	60	15	

SYBR<sup>®</sup> Green I er et fluorescerende fargestoff som binder seg til dobbel trådet DNA (dsDNA), og vil i bundet form fluorescere mye kraftigere enn i ubundet form. Binding av SYBR<sup>®</sup> Green vil skje til ethvert amplifisert produkt, altså både til produkter som representerer målgenet og produkter som ikke representerer målgenet. På grunn av dette er ikke en amplifiseringskurve ensbetydende med oppformering av målgenet. En smeltekurve kan til en viss grad brukes til å vurdere spesifisiteten, og utføres i en forlengelse av PCR-programmet (se tabell 13). Smeltekurven gir en grafisk fremstilling av den gradvise endringen i fluorescens etter hvert som temperaturen stiger og dsDNA i PCR-produktet dissosierer til ssDNA. Et målgen vil ha en spesifikk smeltepunkts temperatur ( $T_m$ ) og framstilles i PCR-programmet som en smal symmetrisk topp. Uspesifikke PCR-produkter kan vises som anomaliteter som for eksempel en skulder, splittet topp eller topper med annen  $T_m$  (Life Technologies Corporation, 2012).

Ved qPCR ble protokollen «Fast SYBR<sup>®</sup> Green Master Mix Protocol» fra produsent benyttet (Applied Biosystems, 2010). Primerene som ble brukt er vist i tabell 14, og de ulike komponentene i qPCR reaksjonen er vist i tabell 15. I tillegg vises primerkonsentrasjon oppnådd i totalvolumet på 20  $\mu$ l. Alle prøvene ble analysert i triplikater, utenom *in vitro* forsøk 1 og TLR3 (endotellceller, forsøk 6) som ble analysert i duplikater. Til analyseringen



av prøvene ble 7500 Fast Real- Time PCR system (Applied Biosystems) benyttet. Det ble også satt opp ulike kontroller på platene. Alle platene er analysert med en negativ kontroll der cDNA er erstattet med H<sub>2</sub>O. I tillegg er en H<sub>2</sub>O- kontroll fra cDNA syntesen også tatt med. Den ble tilsatt alle komponentene i cDNA syntesen, men RNA ble erstattet med H<sub>2</sub>O. Etter *in vivo* forsøket ble det laget en positiv cDNA pool av cDNA fra hodenyre og hjerte. Denne kontrollen ble analysert på alle qPCR platene i *in vitro* forsøkene. Denne kontrollen ble brukt til å kontrollere inter- assay variasjoner mellom platene. Det ble også plukket ut tilfeldige RNA prøver som var DNase behandlet, for å sjekke at de ikke inneholdt genomisk DNA.

18S ble brukt som referanseggen i *in vivo* forsøket (Svingerud *et al.*, 2012), og EF1 $\alpha$ B ble brukt som referanseggen i *in vitro* forsøkene (Olsvik *et al.*, 2005). Threshold ble satt til 0,2 på alle platene.

**Tabell 14: Primere brukt ved qPCR analysering.** Tabellen viser primersekvenser til qPCR, Genbank nummer og PCR- effektivitet til primere som er benyttet til i forsøkene.

Primer	Genbank nr.	Sekvens (5- 3')	Effektivitet
IFNa fwd	DQ354152.1	5'-TGCAGTATGCAGAGCGTGTG	91,6 % (1,92)
IFNa rw		5'-TCTCCTCCCATCTGGTCCAG	
IFNc fwd	EU768890	5'-ATGTATGATGGGCAGTGTGG	93,9 % (1,94)
IFNc rw		5'-CCAGGCGCAGTAACTGAAAT	
IFNb fwd	EU768890	5'-GCATTGGAGGCTATGCGATAT	109,4 % (2,09)
IFNb rw		5'-TTCCCAAACACCACCTACGACA	
TLR3 fwd	BK008646	5'-TTTGATGAGTCTCCGCCAACTCCA	102,8 % (2,03)
TLR3 rw		5'-AATCTGCGAGGGACACAAAGGTCT	(Robertsen <i>et al.</i> , 2013)
EF1 $\alpha$ B fwd	BG933897	5'-TGCCCCTCCAGGATGTCTAC	94,7 % (1,95)
EF1 $\alpha$ B rw		5'-CACGGCCCACAGGTACTG	
18S fwd (Taq)	AJ427629	5'-CCCCGTAATTGGAATGAGTACACTTT	91,8 % (1,92)
18S rw (Taq)		5'-ACGCTATTGGAGCTGGAATTACC	
ISA (G1e2.90Se8) F	AY151791	5'-CTACACAGCAGGATGCAGATGT	95,0 % (1,95)
ISA (G1e2.90Se8) R		5'-CAGGATGCCGGAAGTCGAT	

**Tabell 15:** Komponenter i qPCR reaksjonen

	Volum	Primerkonsentrasjon oppnådd i hver qPCR reaksjonen (20 µl)				
		IFNa	IFNb	IFNc	ILAV segment 8	TLR3
SYBER® green mastermiks	10 µl					
Forward primer	1 µl	250 nM	250 nM	250 nM	600 nM	188 nM
Revers primer	1 µl	250 nM	250 nM	250 nM	600 nM	188 nM
H <sub>2</sub> O	4 µl					
cDNA templat (20 ng)	4 µl					
<b>Totalt</b>	<b>20 µl</b>					

### 2.6.1 Databehandling

Alle data fra qPCR ble lagt inn og bearbeidet i Microsoft Excel. Relativt genuttrykk ble beregnet etter Delta Delta Ct- metoden ( $\Delta\Delta C_t$ - metoden) etter Livak og Schmittgen (2001).

$$\text{Ratio} = 2^{-\Delta\Delta C_t} \quad (1)$$

$$\Delta\Delta C_t = (C_t(\text{målgen, behandlet}) - C_t(\text{referanseggen, behandlet})) - (C_t(\text{målgen, ubehandlet}) - C_t(\text{referanseggen, ubehandlet}))$$

$\Delta\Delta C_t$ - metoden forutsetter at effektiviteten til referansegnet og målgenet er tilnærmet lik. I metoden antar en at hver PCR syklus doubler mengden materiale i hver prøve. Dette betyr at en antar at amplifiseringseffektiviteten er 100 %. PCR effektiviten bør ligge mellom 90- 110 % for å aksepteres (Life Technologies Corporation, 2012).

En 2- folds fortynningsrekke av en cDNA pool (hodenyre og hjerte) fra *in vivo* forsøket ble satt opp for å beregne effektiviteten til primerene.

Amplifiseringseffektiviteten til hvert primersett ble beregnet ut fra formelen:

$$\text{Effektivitet} = 10^{(1/\text{slope})} \quad (2)$$

Slopen beregnes automatisk i softwaren til 7500 Fast real- time PCR sytemet (Applied Biosystems). I tabell 14 er effektiviteten til de ulike primersettene oppgitt.

## **2.7 Titrering av ILAV i supernatanter**

TO- celler er en cellelinje etablert med utgangspunkt i hodenyre leukocytter fra atlantisk laks. Den er mottakelig for ILAV (Wergeland og Jakobsen, 2001), og ble brukt til å titrere ILAV i supernatanten fra forsøk 6.

Seks 96- bønners celledyrkningsbrett ble sådd ut med TO celler ( $2 \times 10^4$  celler/brønn) av stipendiat Chia Jung Chang. Cellene ble dyrket i celleinkubator (Termaks) ved 20 °C i monolag i Leibovitz's L- 15 medium tilsatt 100 U/ml penicillin, 60 µg/ml streptomycin (Gibco, Life technologies) og 8 % fetal bovine serum (FBS) (Biochrom AG).

Til å infisere TO cellene ble supernatantene (fra cellehøstingen i forsøk 6) fra tidspunktene 0 timer, 72 timer og 7 dager fra både primære myocytter og endotelceller benyttet. To prøver fra hvert tidspunkt ble brukt til titrering. I tillegg ble supernatanten fra uinfisert kontroll høstet etter 7 dager tatt med (brukes ufortynnet). Det ble laget en 10- folds fortyningsserie av supernatanten fra hvert tidspunkt i L- 15 medium tilsatt 100 U/ml penicillin, 60 µg/ml streptomycin, 1x MEM non- essensielle aminosyrer og 2 % FBS.

Mediet i celledyrkningsbrettene med TO celler ble slått ut i vasken. Deretter ble brønnene tilsatt 150 µl av de ulike fortyningsseriene. Hver prøve ble titrert i 4 paralleller. Hvert brett inneholdt negative kontroller hvor det kun ble tilsatt medium uten virus til cellene. Brettene ble inkubert videre ved 15 °C. Cytopatogen effekt ble avlest i mikroskop etter 14 dager, og antall infeksjose partikler ble bestemt.

Beregning se (appendix VI)

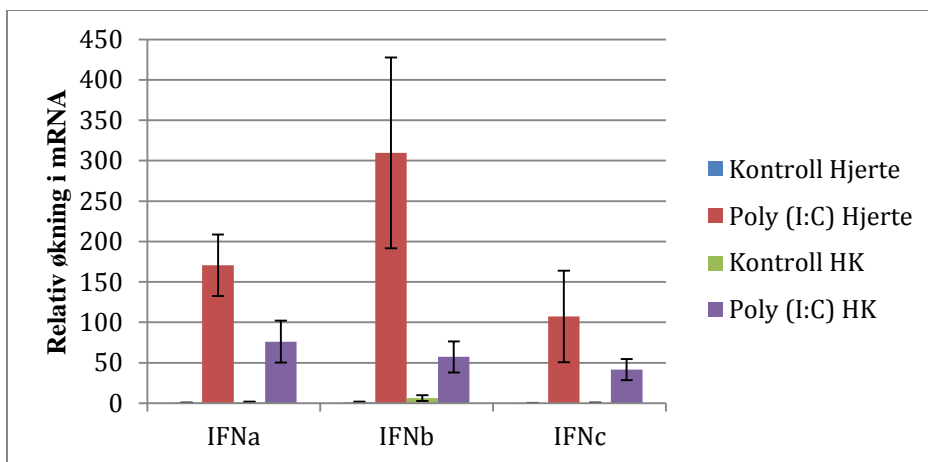
### 3 Resultater

#### 3.1 IFN uttrykk hos atlantisk laks i hjerte og hodenyre etter poly I:C stimulering *in vivo*.

Tidligere forsøk har kartlagt genuttrykk av IFNa, IFNb og IFNc i hjertet hos atlantisk laks etter poly I:C injeksjon (Svingerud *et al.*, 2012). I dette *in vivo* forsøket ønsket vi å bekrefte disse resultatene samt undersøke lokalisering av celler som uttrykker IFNc med FISH.

##### 3.1.1 Endringer i genuttrykket av IFNa, IFNb og IFNc målt med kvantitativ qPCR etter behandling med poly I:C

Atlantisk laks ble injisert i.p. med enten 200  $\mu$ l poly I:C (1,5 mg/ml i PBS) eller 200  $\mu$ l PBS som kontroll (8 individer i hver gruppe). Etter 12 timer ble fiskene avlivet, og hjerte og hodenyre ble tatt ut for ekstraksjon av RNA og syntese av cDNA. Endringer i genuttrykket av IFNa, IFNb og IFNc ble målt med qPCR i forhold til fem ubehandlede fisk (null- fisk). Alle prøvene analyseres i triplikater.



**Figur 16: Relativ økning i genuttrykk av IFNa, IFNb og IFNc i hjerte og hodenyre fra atlantisk laks 12 timer etter poly I:C behandling *in vivo*.** Fiskene ble enten injisert i.p. med 200  $\mu$ l poly I:C (1,5 mg/ml i PBS) eller 200  $\mu$ l PBS (kontroll). Tolv timer etter behandling ble fiskene avlivet, og hjerte og hodenyre ble tatt ut. Forandring i genuttrykk av IFNa, IFNb og IFNc ble analysert med qPCR. Hver søyle representerer gjennomsnittlig relativ økning i genuttrykk ( $n=8$ )  $\pm$  standardavvik. Økningen i genuttrykk ble beregnet i forhold til ubehandlet fisk (null- fisk) som ble satt til 1. Gjennomsnittlig  $C_T$ - verdi til IFNa, IFNb og IFNc hos null- fisk er henholdsvis 26,7 – 37,1 – 28,3 i hjerte og 31,8 – 40 – 31,5 i hodenyre.

Ut fra figur 16 ser vi at det var en økning i genuttrykket av IFNa, IFNb og IFNc hos poly I:C behandlet fisk i både hjerte og hodenyre, men størst i hjerte. Økningen i genuttrykk i hjerte var størst for IFNb 310x, men også IFNa (171x) og IFNc (107x) økte betraktelig. I hodenyre var økningen i genuttrykk noe mindre enn i hjerte. IFNa økte mest (76x) fulgt av IFNb (57x)

og IFNc (42x). C<sub>T</sub>- verdiene for IFNa, IFNb og IFNc i null- fiskene er veldig forskjellige både i hjerte og hodenyre. Gjennomsnittlig C<sub>T</sub>- verdi til IFNa, IFNb og IFNc hos null- fisk var henholdsvis 26,7 – 37,1 – 28,3 i hjerte og 31,8 – 40 – 31,5 i hodenyre.

Endringen i genuttrykk av IFNa, IFNb og IFNc i hjerte og hodenyre hos kontroll fisken (injisert med PBS) var svært liten. Den relative økningen i genuttrykket var størst for IFNb (hjerte 1,2x og hodenyre 6,3x). Økningen i genuttrykk av IFNa og IFNc var lav (< 1,1x) for både hjerte og hodenyre.

### 3.1.2 *Påvisning og lokalisering av celler som uttrykker IFNc mRNA i hjerte og hodenyre hos Atlantisk laks*

Til fluoreserende *in situ* hybridisering (FISH) måtte det lages DIG- merkede RNA prober. Henviser til appendiks II for tillaging og konsentrasjonsbestemmelse av probene.

Totalt ble det utført seks oppsett med FISH. I de to første oppsettene analyserte vi vev som i tidligere FISH- analyser (Svingerud *et al* 2012) hadde vist å inneholde celler som uttrykte IFNc. I tillegg ble det analysert prøver fra muskel intramuskulært (i.m.) injisert med ekspresjonsplasmid for IFNc fra laks (IFNc- plasmid) (Chang *et al.*, 2014; Svingerud *et al.*, 2012). Dette ble gjort for å undersøke om metoden vår fungerte. Det ble i oppsett 2 også tatt med muskel i.m. injisert med ekspresjonsplasmid uten innsatt IFNc- gen som en negativ kontroll (Chang *et al.*, 2014). I FISH oppsett 1 påviste vi tydelige fluorescerende celler i snittene med IFNc antisense probe, men fluorescensen var litt svak. Probekonsentrasjonen ble dermed økt fra 0,1 til 0,5 og 1 ng/μl i oppsett 2. Fluorescensen ble sterkere ved økning av probekonsentrasjonen til 0,5 ng/μl, men en økning til 1 ng/μl forsterket ikke fluorescensen ytterligere. Det ble dermed brukt en probekonsentrasjon på 0,5 ng/μl i FISH oppsett 3- 6. Muskel i.m. injisert med plasmid uten innsatt IFNc- gen viste ingen fluorescerende celler.

Ved FISH oppsett 3 analyserte vi hodenyre prøver fra vårt eget *in vivo* forsøk, men det ble også tatt med en muskelprøve med i.m. injisert IFNc- plasmid som positiv kontroll. Prøvene fra poly I:C injiserte fisk som ble tilsatt IFNc antisense probe viste tydelige enkeltceller som fluorescerte. Hos PBS injisert fisk ble ingen fluorescerende celler påvist. Ved mikroskopering (Leica DM6000 B) av prøvene ble det observert sterk autofluorescens fra røde blodceller (RBC). I et forsøk på å redusere denne autofluorescensen ble det byttet til en annen 30 % hydrogenperoksidløsning (Sigma- Aldrich) i oppsett 4. Dessverre hjalp dette svært lite på autofluorescensen fra RBC. Problemet med autofluorescens ble derimot løst da vi gikk over

fra fluorescence mikroskopet Leica DM6000 B til å bruke Konfokal Leica TCS SP5 med argon laser isteden for. I konfokal mikroskopet ble alle RBC blå, mens fluorescerende celler i positive prøver fluorescerte grønt.

I oppsett 4 og 5 ble det analysert både hodenyre og hjerte fra laks med tilsvarende resultat. Prøvene fra poly I:C injiserte fisk tilsatt IFNc antisense probe viste tydelige spredte enkeltceller som fluorescerte både i hodenyre og hjerte (figur 6). De fleste fluorescerende cellene i hjerte kunne vi påvise i ventrikkel, mens svært få ble påvist i forkammeret. I ventrikkel var de fluorescerende cellene lokalisert i myokardet, både i det spongiøse og kompakte laget. Hos PBS injisert fisk ble ingen fluorescerende celler påvist. Både i hjerte og hodenyre fremsto de fluorescerende cellene som avlange i formen, og de fleste synes å være lokalisert i nærheten av sinusoidene. Det ble ikke lokalisert noen fluorescerende celler tilknyttet endotelcellene i blodåreveggene.

Det ble i FISH oppsett 6 prøvd på å slå ut IFNc antisense proben med sense proben. Til dette ble det brukt en hybridiseringsløsning med IFNc antisense og sense probe i forholdet 1:10. Denne probeløsningen ble testet på et hjerte og en hodenyre prøve fra poly I:C injisert fisk. Det kunne ved avlesning av prøvene påvises fluorescerende celler i både hjerte og hodenyre. Til gjengjeld kunne vi observere en betydelig reduksjon i fluorescens-intensiteten sammenlignet med de samme prøvene kun tilsatt IFNc antisense probe.

I alle FISH oppsettene som ble utført ble det også analysert tre forskjellige negative kontroller. En amplifiserings kontroll (ingen probe tilsettes, men TSA tilsettes), en ikke amplifiserende kontroll (inkluderer IFNc antisense probe, men TSA tilsettes ikke) og en kontroll der IFNc sense proben tilsettes. Kontrollene ble i alle seks ISH oppsettene negative, uten unntak.

Totalt ble det analysert hodenyre og hjerte fra fire poly I:C-injiserte fisk fra *in vivo* forsøket. I tillegg ble det analysert to hjerter og tre hodenyrer fra PBS injisert fisk. I tabell 17 er det gitt en kort oppsummering av resultatene fra alle seks FISH oppsettene.

**Tabell 17:** Oppsummering av resultatene fra *in situ* hybridisering med IFNc-probe på vev fra laks injisert med poly I:C eller PBS.

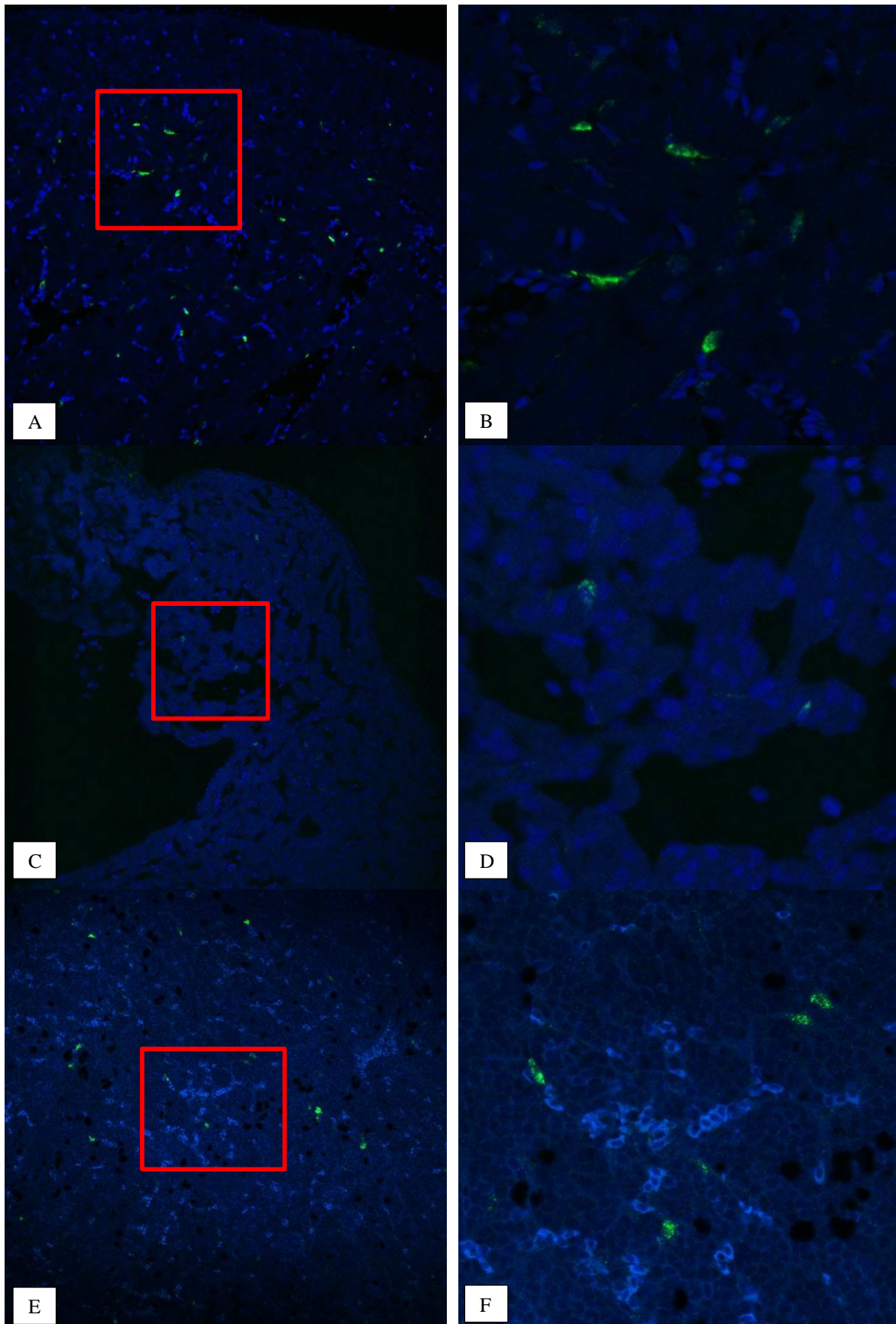
FISH	Prøver analysert	Resultat	Kommentar
1	Hodenyre, gjelle, milt, lever fra Svingerud <i>et al.</i> , 2012	+	Probekonsentrasjon
	Muskel i.m. injisert med IFNc- plasmid	+	0,1 ng/µl
2	Hodenyre, gjelle, milt, lever fra Svingerud <i>et al.</i> , 2012	+	Probekonsentrasjonen økt til 0,5 ng/µl
	Muskel i.m. injisert med IFNc- plasmid	+	
	Muskel i.m. injisert med plasmid uten IFNc- gen	-	
3	HK fra poly I:C injisert fisk	+	RBC har høy autofluorescens i snittene
	HK fra PBS injisert fisk	-	
	Muskel i.m. injisert med IFNc- plasmid	+	
4	HK fra poly I:C injisert fisk	+	- Byttet H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> løsning. - Bruker Konfokal mikroskop
	HK fra PBS injisert fisk	-	
	Hjerte fra poly I:C injisert fisk	+	
	Hjerte fra PBS injisert fisk	-	
5	HK fra poly I:C injisert fisk	+	Utført som oppsett 4
	HK fra PBS injisert fisk	-	
	Hjerte fra poly I:C injisert fisk	+	
	Hjerte fra PBS injisert fisk	-	
6	HK fra poly I:C injisert fisk (IFNc antisense probe)	+	Bruker sense probe for å slå ut antisense probe
	Hjerte fra poly I:C injisert fisk (IFNc antisense probe)	+	
	HK fra poly I:C injisert fisk (IFNc antisense og sense probe 1:10)	(+)	
	Hjerte fra poly I:C injisert fisk (IFNc antisense og sense probe 1:10)	(+)	

-: ingen fluorescerende celler påvist.

+: fluorescerende celler påvist.

(+): svakt fluorescerende celler påvist.

i.m.- intramuskulært. HK- hodenyre. RBC- røde blodceller.



**Figur 6:** Fluorescens *in situ* hybridisering med IFN $\epsilon$  antisense RNA probe (grønn fluorescens) utført på snitt fra hjerte og hodenyre fra Atlantisk laks (n=4) 12 timer etter poly I:C injeksjon. Motfarging DAPI (blå fluorescens). Alle bildene er tatt med Konfokal Leica TCS SP5 (20x). Rød firkant markerer et område som zoomes inn, bilde vises til høyre. A og B ventrikkel, C og D atrium, E og F hodenyre.



### 3.2 IFN uttrykk i primærceller fra hjerte til Atlantisk laks

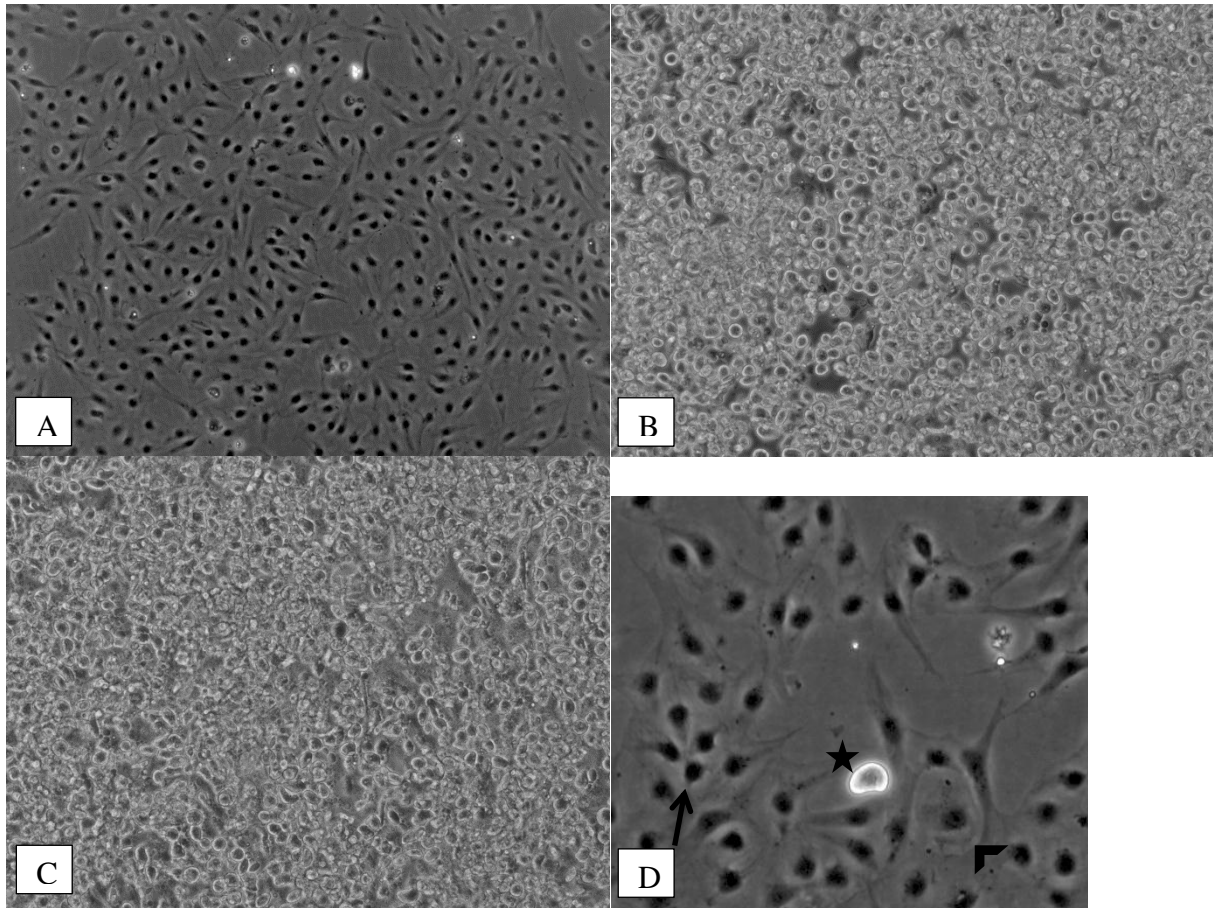
I tidligere forsøk har poly I:C stimulering av cellelinjer (TO og ASK) og leukocytter fra blod og hodenyre ikke gitt økning i genuttrykket av IFN $\alpha$ . Hjerte er et av organene som har vist høyest uttrykk av IFN $\alpha$  hos atlantisk laks etter poly (I:C) injeksjon (Svingerud *et al.*, 2012). Ønsket derfor å undersøke om primærceller fra hjerte kunne brukes til å studere uttrykket av IFN $\alpha$ .

#### 3.2.1 *Morfologisk beskrivelse av primære cellekulturer fra laksehjerte*

Cellene som ble isolert fra hjerte besto av flere celletyper som ble identifisert i henhold til beskrivelsen i Koren *et al.* (1997) Tre celletyper dominerte: endotelceller, epitelceller og myocytter. Endotelcellene festet seg raskt til underlaget (matriksproteinet laminin), mens myocytterne brukte lengre tid på å feste seg. Dagen etter utsæd var cellekulturene dominert av adherente endotelceller i bunnen og myocytter som lå løse oppå endotelcellene.

Endotelcellene var mindre enn myocytterne, hadde en mørk kjerne og lite synlig cytoplasma, og dannet etterhvert kontakt med nærliggende celler med tynne utløpere. Myocytterne fremstod som store, lyse og runde/ ovale i formen. I tillegg kontraherte myocytterne spontant ved mikroskopering. Epitecellene var også adherente. De hadde samme størrelse som endotelcellene, men hadde en mer diffus cellekjerne. De dannet seg etterhvert øyer med flere epitelceller sammen, som tydelig kunne skilles fra endotelcellene. Andelen epitelceller i cellekulturene syntes å være liten. I figur 7 D er de ulike celletypene angitt.

Siden cellene viste ulik evne til å feste seg til underlaget kunne vi dagen etter utsæd skille de non-adherente cellene (hovedsakelig myocytter, se figur 7B) fra de adherente cellene (hovedsakelig endotelceller, se figur 7A). Dette ble gjort ved å vaske cellene kraftig og så overføre de non-adherente cellene til nye celledyrkningsbrett. I denne oppgaven ble det brukt tre forskjellige varianter av primærcelekkulturer fra hjertet. Adherente celler – heretter betegnet som endotelceller, non-adherente celler – heretter betegnet som myocytter og hele cellepopulasjonen – heretter betegnet som mikskulturer (se figur 7C).

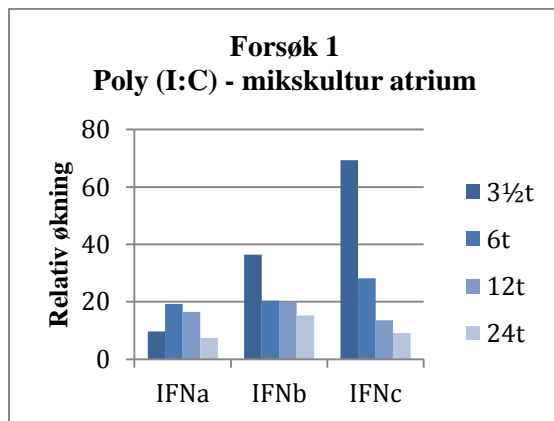


**Figur 7: Bilder av primærceller i celledyrkningsbrett tatt to dager etter uttak av hjerte fra atlantisk laks.** Ett bilde representerer en brønn i 24-brønnersbrett. **A.** Endotelceller (10X), **B.** Myocytt (10X), **C.** Mikskultur (10X) **D.** Utsnitt av en brønn med endotelceller, som inneholder små mengder av de andre celletypene (10X). ↑ = endotelceller, ★ = myocyt, ▲ = epitelceller.

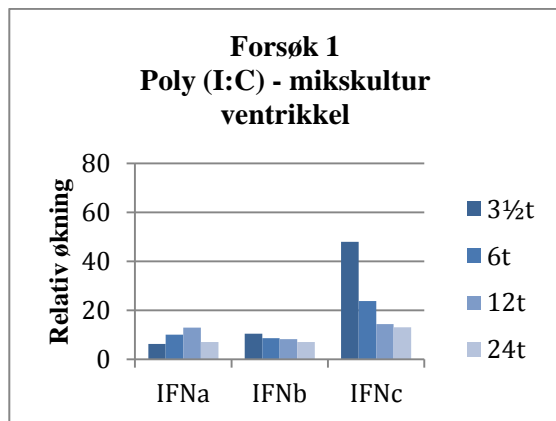
### 3.2.2 *IFN uttrykk i mikskultur fra hjerte til Atlantisk laks etter in vitro poly I:C stimulering.*

Det ble utført tre separate forsøk med poly I:C stimulering av mikskulturer. I forsøk 1 isolerte vi primærceller fra både atrium og ventrikkel, mens i de påfølgende forsøkene ble det kun isolert celler fra atrium. På dag 3 ble primærcellene stimulert med poly I:C og høstet etter 3<sup>1/2</sup>, 6, 12 og 24 timer. Endringer i genuttrykket av IFNa, IFNb og IFNc ble målt med qPCR i forhold til ustimulerte celler fra 3<sup>1/2</sup> og 24 time (figur 8A).

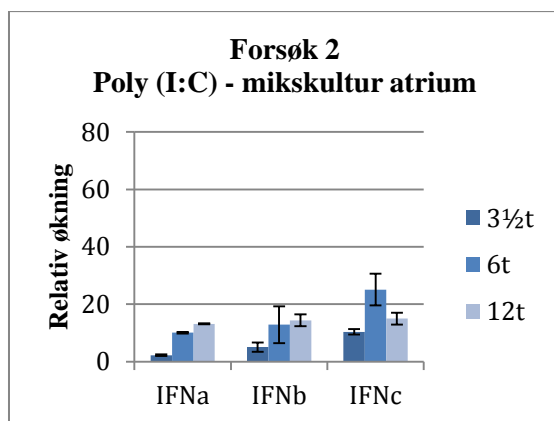
A.



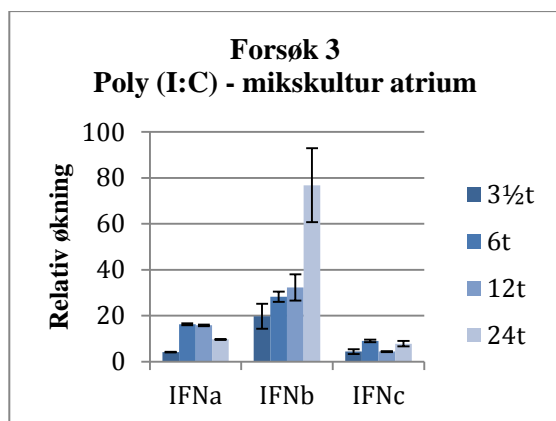
B.



C.



D.



**Figur 8: Relativ økning i genuttrykk av IFNa, IFNb og IFNc i mikskulturer fra hjerte til atlantisk laks etter *in vitro* stimulering med poly (I:C).** Primærceller fra atrium (og ventrikkell, forsøk 1) ble stimulert med  $10^{10}$   $\mu\text{g/ml}$  poly (I:C) i 3½, 6, 12 og 24 timer (forsøk 2 mangler 24 timer tidspunktet). Forandring i genuttrykk av IFNa, IFNb og IFNc ble målt med qPCR i forhold til ustimulerte celler høstet ved 3½ timer (3½ og 24 timer, forsøk 1). I forsøk 1 (A, B) representerer hver søyle to brønner som er slått sammen til en prøve ved høsting og analysert i duplikat med qPCR. I forsøk 2 og 3 (C, D) representerer hver søyle gjennomsnittlige verdier og standardavvik fra tre prøver (6 brønner) høstet på samme tidspunkt. Prøvene er analysert i triplikater med qPCR. **A.** Primærceller fra atrium (forsøk 1), **B.** Primærceller fra ventrikkell (forsøk 1). **C.** Primærceller fra atrium (forsøk 2). **D.** Primærceller fra atrium (forsøk 3).

Genuttrykk av alle tre subtype av IFN ble induisert ved poly I:C stimulering av mikskulturene, men med noe ulike kinetikk og mengde. Resultatene varierte også mellom de tre forsøkene.

Resultatene fra forsøk 1 (Figur 8 A og B) viste en relativ økning i genuttrykk av IFNa i primærcellene fra atrium fram til 6 timer (19x) og i ventrikkell fram til 12 timer (13x). Etter det gikk uttrykket ned igjen. Det relative genuttrykket av IFNb var høyest etter 3½ time i både atrium (36x) og ventrikkell (10x). IFNb uttrykket gikk deretter nedover. Genuttrykket av IFNc steg raskt og var høyest i både atrium (69x) og ventrikkell (48x) etter 3½ time. Deretter ble uttrykket av IFNc lavere i de påfølgende timene.

Resultatene fra forsøk 2 (Fig XX 8) er ulik de resultatene vi oppnådde i forsøk 1. Den relative endringen i genuttrykket av IFNa og IFNb var stigende helt fram til 12 timer (13x og 14x). Uttrykket av IFNc økte fram mot 6 timer (25x), og gikk deretter ned. Den største forskjellen mellom forsøk 1 og 2 er for IFNc etter 3½ timer. Den relative økningen for IFNc var 69x og 10x etter 3½ time i henholdsvis forsøk 1 og 2

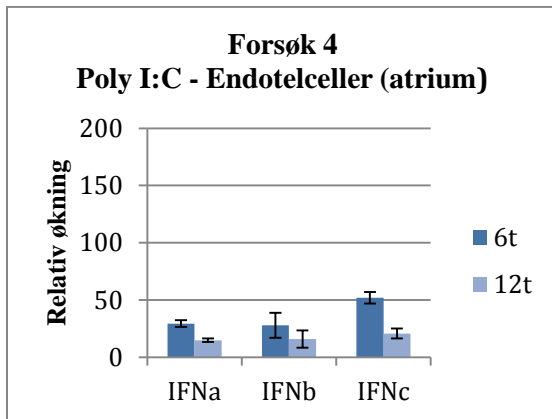
Resultatene i forsøk 3 lignet resultatene fra forsøk 2. Genuttrykket av IFNa, IFNb og IFNc fulgte det samme mønsteret i forsøk 2 og 3, men den relative økningen var ulik (Fig 8, D). I forsøk 3 var den relative økningen etter 12 timer høyere for IFNa og IFNb (16x og 32x), sammenlignet med IFNa og IFNb (13x og 14x) i forsøk 2. I forsøk 3 har vi også med et 24 timers tidspunkt. Etter 24 timer ser vi at genuttrykket til IFNb (77x) fortsetter å stige, mens IFNa (9x) går ned. Den relative økningen av IFNc er lavere i forsøk 3 enn den er i forsøk 2. Uttrykket av IFNc har etter 6 timer i forsøk 2 og 3 økt henholdsvis 25x og 9x. Etter 12 timer går IFNc uttrykket ned igjen. I forsøk 3 ved 24 timer kan vi se en oppgang igjen i uttrykket av IFNc (8x) etter nedgangen vi så ved 12 timer (4x).

### ***3.2.3 IFN uttrykk i endotelceller og myocytter fra hjerte til Atlantisk laks etter in vitro poly I:C stimulering.***

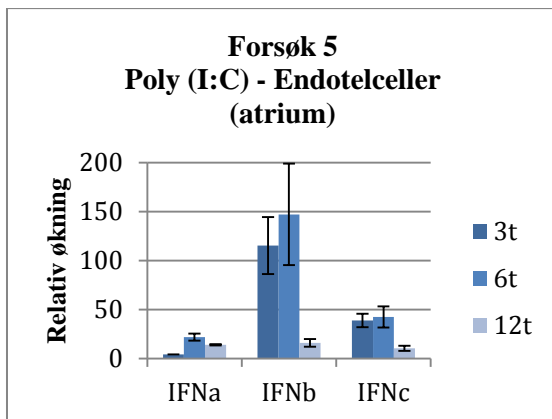
I de neste to forsøkene ønsket vi å undersøke om uttrykket av IFN var forskjellig i ulike cellepopulasjoner. Dag en etter uttak ble endotelceller og myocytter separert ved å vaske mikskulturen og overføre de non-adherente myocytene til nye brønner.

Dag 3 ble cellene stimulert med poly I:C. Høsting av celler ble gjort 3- 12 timer etter stimulering. I forsøk 4 ble det observert at mange myocytter ble vasket vekk under høsting av cellene. Det ble dermed bestemt kun å analysere videre på endotelcellene fra forsøk 4. Endringer i genuttrykket av IFNa, IFNb og IFNc ble målt med qPCR i forhold til ustimulerte celler.

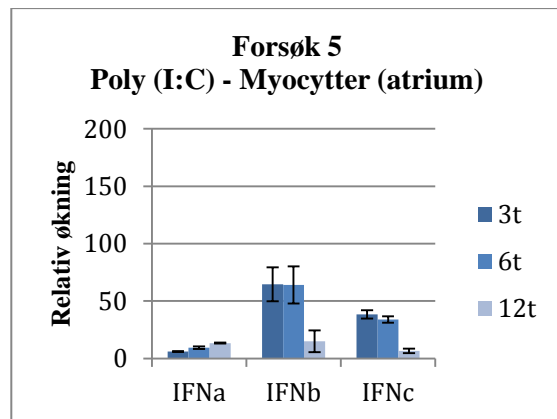
A.



B.



C.



Figur 9: **Relativ økning i genuttrykk av IFNa, IFNb og IFNc i endotelceller og myocytytter fra hjerte til Atlantisk laks etter *in vitro* stimulering med poly I:C.** Endotelceller og myocytytter fra atrium ble stimulert med  $10^6$   $\mu$ g/ml poly I:C i 3, 6 og 12 timer (6 og 12 timer, forsøk 4). Forandring i genuttrykk ble målt med qPCR i forhold til ustimulerte celler (3 timer eller 6 timer) som ble satt til 1. Hver søyle i stolpediagrammet representerer gjennomsnittlige verdier og standardavvik fra tre prøver (6 brønner) høstet på samme tidspunkt. **A.** Endotelceller (forsøk 4), **B.** Endotelceller (forsøk 5), **C.** Myocytytter (forsøk 5).

Resultatene viser at de ulike subtypene av IFN ble uttrykt både i endotelceller og i myocytytter etter poly I:C stimulering (Fig 9). I begge forsøkene med endotelceller var den relative økningen i genuttrykket av IFNa, IFNb og IFNc (29x, 28x og 52x) høyest etter 6 timer. Etter 12 timer var uttrykk av alle IFN redusert. IFNb er den som skiller seg ut mellom de to forsøkene, med en kraftigere økning i genuttrykket i forsøk 5.

I myocyttene var det relative genuttrykket av IFNa stigende fram til 12 timer (13x). Uttrykket av IFNb var likt ved 3 og 6 timer (64x), men gikk deretter ned. Det relative genuttrykket av IFNc var høyest etter 3 timer (38x) og gikk deretter nedover de påfølgende timene.

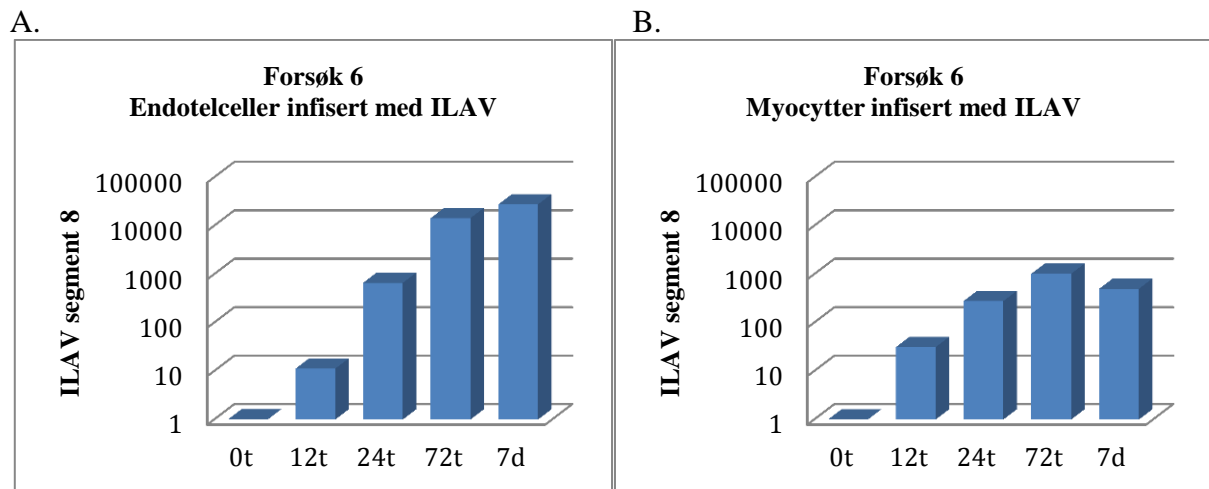
#### 3.2.4 *Infeksjonsforsøk med ILAV i endotelceller og myocytter fra hjertet*

*In vivo* er endotelceller en vertscelle for ILAV (Aamelfot *et al.*, 2014). Vi ønsket å undersøke om ILAV kunne infiserer endotelceller og myocytter fra hjerte til atlantisk laks *in vitro*, og om det var forskjell i virusreplikasjon mellom de to cellepopulasjonene. I tillegg ville vi undersøke om uttrykk av de ulike subtypene av IFN og TLR3 ble induisert av ILAV i disse cellekulturene.

Endotelceller og myocytter ble infisert *in vitro* med ILAV (MOI= 1) tre dager etter uttak. Cellene og mediet ble deretter høstet hver for seg ved 0, 12, 24, 72 timer og 7 dager etter infeksjon. Cellene ble analysert for mengde ILAV segment 8 med qPCR og mediet ble brukt til å titrere infeksjøs virus i TO- celler.

### 3.2.4.1 Kvantifisering av ILAV med qPCR

Genuttrykket av ILAV segment 8 i endotelceller og myocytter ble undersøkt med qPCR. En økning vil indikere oppformering av ILAV segment 8.

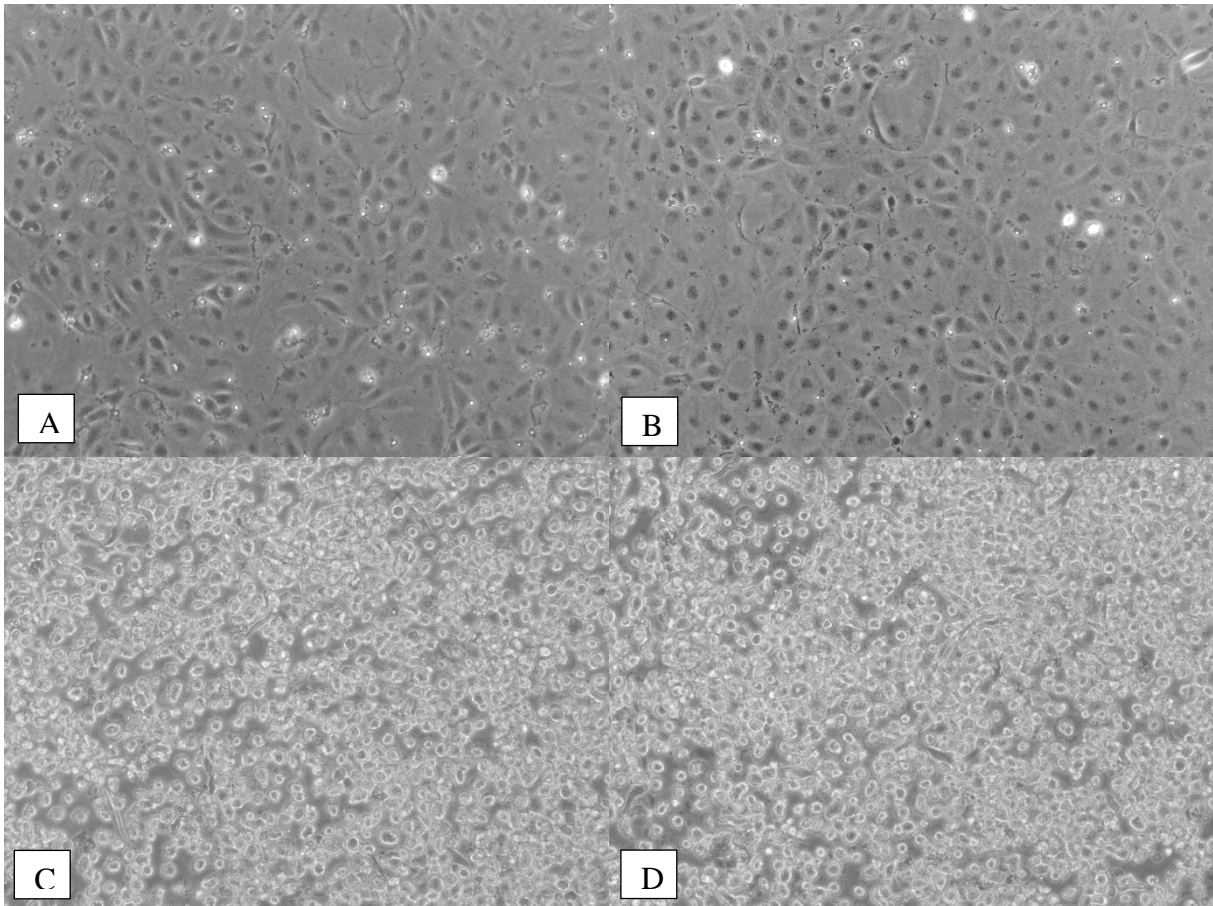


**Figur 10: Relativ økning av ILAV segment 8 i endotelceller og myocytter fra hjerte (atrium) til Atlantisk laks etter *in vitro* infisering.** Endotelceller og myocytter ble infisert med ILAV (MOI=1) i 0, 12, 24, 72 timer og 7 dager. Den relative økningen av ILAV segment 8 ble målt med qPCR i forhold til infiserte celler ved 0 timer. Hver søyle i stolpediagrammene representerer gjennomsnittlige verdier fra to eller tre prøver (4 eller 6 brønner) høstet på samme tidspunkt. **A.** Endotelceller, **B.** Myocytter. ILAV, Infeksiøs lakseanemi virus; MOI, Multiplicity of infection.

Figur 10 viser at endotelcellene fra 12, 24, 72 timer og 7 dager etter infeksjon har en relativ økning av ILAV segment 8 i forhold til infiserte celler ved 0 timer. Denne økningen er stigende helt frem til dag 7 (27555x).  $C_t$ - verdien til referansegenet (EF1 $\alpha$ B) økte litt i fra 0 timer ( $C_t$  16,4) til dag 7 ( $C_t$  18,4) hos endotelcellene. På grunn av dette ble det gjort et forsøk på å beregne den relative økningen av ILAV segment 8 med kun verdiene oppnådd for referansegenet ved 0 timer. Disse utregningene gir noe lavere resultat for den relative økningen av ILAV, og er ved 72 timer økt 7208x og etter 7 dager 7092x.

Den relative økningen av ILAV segment 8 er lavere hos myocytterne enn hos endotelcellene. Prøvene høstet fra de ILAV infiserte monocytterne viste en økning frem til 24 timer (1480x) og 72 timer (1467x), for så å gå ned igjen (7 dager, 75x). Referansegenet varierte mindre i  $C_t$ - verdi fra 0 timer ( $C_t$  17,9) til 7 dager ( $C_t$  17,8) hos myocytterne enn hos endotelcellene. Ny beregninger ble dermed ikke utført for myocytterne.

De siste endotelcellene og myocytterne i forsøk 6 ble høstet på dag 7. Figur 11 viser bilder fra celledyrkningsbrettene tatt rett før høstingen. Det ble ikke observert noen forskjell i morfologi mellom de infiserte og uinfiserte brønnene.



**Figur 11: Bilder av primærceller fra atlantisk laks (atrium) i celledyrkningsbrett tatt syv dager etter ILAV infisering (MOI=1).** Det ble isolert primærceller fra 11 atlantiske laks. Ett bilde representerer en brønn i 24-brønnersbrett. **A.** ILAV infiserte endotelceller (10X), **B.** Uinfiserte endotelceller (10X). **C.** ILAV infiserte myocytter (10X). **D.** Uinfiserte myocytter (10X). ILAV, Infeksiøs lakseanemi virus; MOI, Multiplicity of infection.

For å undersøke om endotelcellene og myocytterne produserte infeksiøse viruspartikler ble mediet (supernatantene) høstet fra de infiserte cellene titrert ved en standard titrerings assay på TO-celler. Medium fra to infiserte brønner høstet ved hvert tidspunkt ble titrert separat i fire paralleller. Ut fra tabell 18 ser vi at mengden ILAV (pfu/ml) økte fra 0 og til 72 timer i både endotelceller og myocytter. Fra 72 timer til 7 dager etter infeksjon indikerer resultatene en reduksjon i mengde ILAV i myocytterne og en fortsatt økning i endotelcellene.



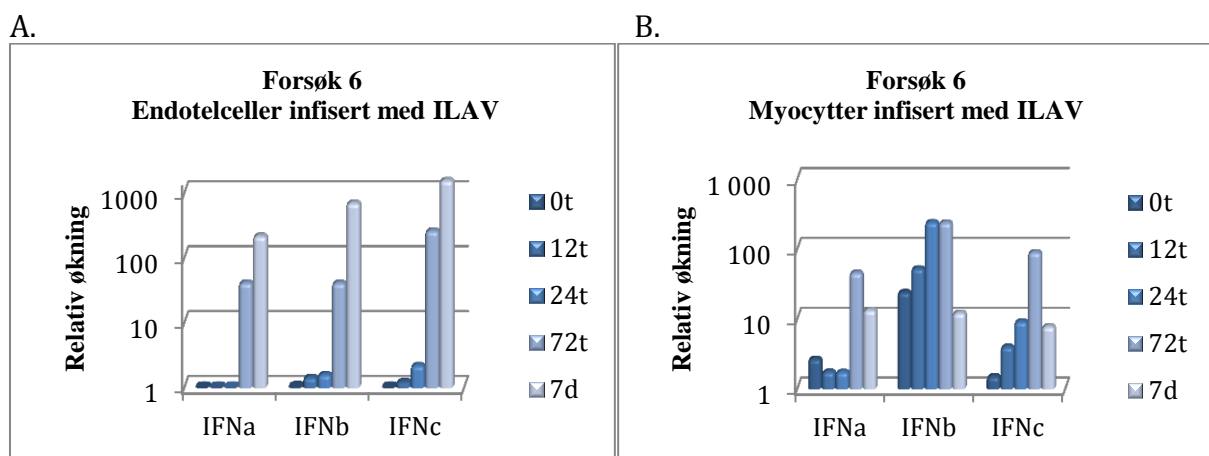
Tabell 18. **Titrering av ILAV i supernatanter fra infiserte endotelceller og myocytter.**

ILAV ble titrert i TO- celler infisert med en ti-fold fortynningsrekke i fire paralleller. Prøvene som ble brukt var fra tidspunktene 0 og 72 timer og 7 dager etter infeksjon. Cytopatogen effekt ble avlest etter 14 dager.

Endotelceller	Plaque forming units (pfu)		
	0 timer	72 timer	7 dager
Prøve 1	$2,17 \times 10^2/\text{ml}$	$2,17 \times 10^5/\text{ml}$	$5,17 \times 10^5/\text{ml}$
Prøve 2	$2,17 \times 10^3/\text{ml}$	$2,17 \times 10^5/\text{ml}$	$5,17 \times 10^5/\text{ml}$
Gjennomsnitt	$1,19 \times 10^3/\text{ml}$	$2,17 \times 10^5/\text{ml}$	$2,84 \times 10^6/\text{ml}$
Myocytter	0 timer	72 timer	7 dager
Prøve 1	$5,17 \times 10^3/\text{ml}$	$6,67 \times 10^5/\text{ml}$	$5,17 \times 10^5/\text{ml}$
Prøve 2	$5,17 \times 10^3/\text{ml}$	$6,67 \times 10^5/\text{ml}$	$3,67 \times 10^5/\text{ml}$
Gjennomsnitt	$5,17 \times 10^3/\text{ml}$	$6,67 \times 10^5/\text{ml}$	$4,42 \times 10^5/\text{ml}$

### 3.2.4.2 Uttrykk av IFN og TLR3

Hvilke subtyper av IFN som blir induisert av ILAV i atlantisk laks vet en lite om. Vi ønsket derfor å undersøke genuttrykket av IFNa, IFNb og IFNc hos endotelceller og myocytter infisert med ILAV *in vitro*.

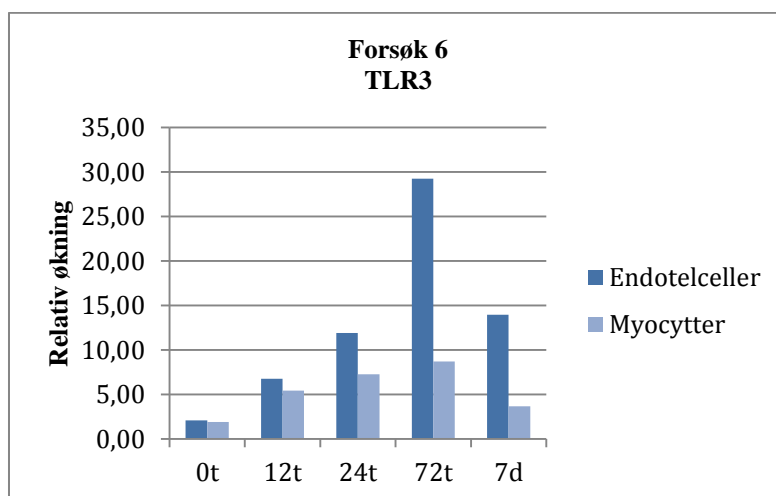


**Figur 19: Relativ økning i genuttrykk av IFNa, IFNb og IFNc i endotelceller og myocytter fra hjerte (atrium) til Atlantisk laks etter infisering med ILAV *in vitro*.** Endotelceller og myocytter ble infisert med ILAV (MOI=1). Etter 0, 12, 24, 72 timer og 7 dager ble cellene høstet og forandring i genuttrykk ble målt med qPCR i forhold til uinfiserte celler (tre prøver fra 0 timer og 2- 3 prøver fra 7 dager). Hver søyle i stolpediagrammene representerer gjennomsnittlige verdier fra to eller tre prøver (4 eller 6 brønner) høstet på samme tidspunkt. **A.** Endotelceller, **B.** Myocytter. ILAV, Infeksiøs lakseanemi virus; MOI, Multiplicity of infection.

Ut fra figur 19 A ser vi at hos endotelcellene var den relative økningen i genuttrykk av IFNa, IFNb og IFNc ganske lav de første 24 timene (< 2,2x). Etter 72 timer var uttrykket for IFNa og IFNb økt ca. 40x og for IFNc 257x. Ved dag 7 var genuttrykket økt ytterligere. Den relative økningen i genuttrykk av IFNa, IFNb og IFNc var da henholdsvis på 214x, 690x og 1549x.

Hos myocytterne var resultatene noe annerledes (figur 19 B). IFNa hadde en relativ økning i genuttrykk som lignet på uttrykket hos endotelcellene frem til 72 timer (45x). Ved dag 7 var derimot uttrykket gått betydelig ned for IFNa (13x). Genuttrykket av IFNb økte raskt og var ved 24 og 72 timer økt 238x. På dag 7 var det relative genuttrykket av IFNb gått ned igjen (12x). IFNc uttrykket økte litt mer hos myocytterne (9x) enn hos endotelcellene (0,8x) de første 24 timene. Det relative genuttrykket av IFNc i myocytterne fortsatte å øke frem til 72 timer (89x), men gikk deretter ned igjen på dag 7 (7,7x).

TLR3 gjenkjenner dsRNA molekyler og er en del av det medfødte immunforsvaret mot virus (Collet, 2014). Fra mennesker er det kjent at aktivering av TLR3 induserer genuttrykk av IFN.



**Figur 20: Relativ økning i genuttrykk av TLR3 i endotelceller og myocytter fra hjerte (atrium) til Atlantisk laks etter infisering med ILAV *in vitro*.** Endotelceller og myocytter ble infisert med ILAV (MOI=1). Etter 0, 12, 24, 72 timer og 7 dager ble cellene høstet og forandring i genuttrykk ble målt med qPCR i forhold til uinfiserte celler (tre prøver fra 0 timer og 2- 3 prøver fra 7 dager). Hver søyle i stolpediagrammene representerer gjennomsnittlige verdier fra to eller tre prøver (4 eller 6 brønner) høstet på samme tidspunkt. (n=11). **A.** Endotelceller, **B.** Myocytter. ILAV, Infeksiøs lakseanemi virus; MOI, Multiplicity of infection.

Ut fra figur 20 ser vi at genuttrykket av TLR3 øker hos både endotelceller (29x) og myocytter (9x) fram mot 72 timer, for deretter å gå ned igjen på dag 7.

## 4 Diskusjon

Virussykdommer som rammer hjertet er utbredt i norsk lakseoppdrett, og de få virusvaksinene som finnes i dag er ikke optimale. Kunnskap om hvilke komponenter i immunsystemet som begrenser virusreplikasjon, og er involvert i bekjempelsen er avgjørende for å kunne utvikle gode profylaktiske kontrollstrategier. I det medfødte immunforsvaret er type I IFN en av hovedkomponentene som beskytter verten mot virusinfeksjoner (Robertsen 2006). Type I IFN inducerer uttrykk av antivirale proteiner som kan hemme ulike trinn av virusreplikasjonen. De antivirale proteinene er dermed med på å begrense oppformering og videre spredning av virus. En forståelse av hvordan interferon-systemet fungerer i laksehjertet vil dermed være viktig for å kunne utvikle profylaktiske tiltak mot virussykdommene som rammer hjerte.

### 4.1 IFN uttrykk hos atlantisk laks i hjerte og hodenyre etter poly I:C injeksjon *in vivo*

Tidligere forsøk har kartlagt genuttrykk av IFNa, IFNb og IFNc i hjertet og hodenyre hos atlantisk laks etter poly I:C injeksjon (Svingerud *et al.*, 2012). Det ble her gjort et lignende forsøk hvor hovedhensikten var å ta ut organer for å analysere med FISH. Før FISH-analysene ble startet var det viktig å undersøke om injeksjon av poly I:C hadde fungert som forventet. Dette ble gjort ved qPCR analyser av genuttrykk av IFNa, IFNb og IFNc. Ut fra våre resultater så vi en økning i uttrykket av IFNa, IFNb og IFNc i både hodenyre og hjerte 12 timer etter injisering av poly I:C *in vivo*. Svingerud og medarbeidere (2012) kunne kun se en økning i uttrykket av IFNa og IFNc i hjerte og hodenyre, mens genuttrykket av IFNb var svært lavt.

Svingerud og medarbeidere (2012) utførte en absolutt kvantifisering av IFN uttrykkene i sine forsøk, og brukte Pfaffl-metoden (Pfaffl 2001) til utregning. I våre forsøk ble det utført en relativ kvantifisering av IFN genuttrykkene, og vi brukte  $\Delta\Delta C_t$ -metoden (Livak og Schmittgen, 2001) til utregning av resultatene.

Forskjellen mellom de to forsøkene må sees ut ifra ulike metoder for kvantifisering. Nivået av IFNa/IFNc og IFNb i både hjerte og hodenyre er svært forskjellig i ubehandlet fisk med  $C_t$ -verdier på hhv 26-31 for IFNa/IFNc og 37-40 for IFNb. En relativ kvantifisering vil dermed

gi en svært stor økning i fold induksjon av IFNb, men dette betyr ikke at det faktiske nivået av IFNb er kvantitativt større enn IFNa/c.

En forskjell som også bør påpekes mellom de to forsøkene er at fiskene ble injisert med ulike doser av poly I:C. Svingerud og medarbeidere (2012) injiserte fiskene med 500 µg poly I:C/ 50 g fisk, mens vi injiserte med 300 µg poly I:C/ 50 g fisk. Det er tidligere også gjort et tilsvarende forsøk på hodenyre (Sun *et al.*, 2009) der det totalt ble injisert ca. 1000 µg poly I:C/ 50 g fisk. Resultatene fra disse forsøkene på hodenyre stemmer overens med resultatene fra Svingerud og medarbeidere (2012).

#### **4.2 Påvisning og lokalisering av celler med IFNc genuttrykk i hjerte og hodenyre hos Atlantisk Laks**

Tidligere forsøk har lokalisert celler i ulike organer som uttrykker type I IFN (Svingerud *et al.*, 2012). Ettersom dette ikke var blitt utført på hjerte ønsket vi å undersøke lokaliseringen av celler som uttrykte IFNc mRNA med fluorescens *in situ* hybridisering (FISH).

Det ble i de første oppsettene av FISH også analysert prøver fra et tidligere forsøk (Svingerud *et al.*, 2012). Disse var til hjelp for å få metoden validert og gjorde det mulig å få sammenlignet den tidligere metoden som var brukt med vår metode.

FISH- resultatene for uttrykk av IFNc fra våre hodenyre prøver og tidligere analyserte hodenyre prøver ble de samme. Altså tidligere hodenyre prøver og våre hodenyre prøver ga samme resultat med vår metode. Ser vi på tidligere oppnådde resultat fra Svingerud og medarbeidere (2012) med den metoden de brukte, så gir den et noe annet bilde enn vår metode gjorde. Med vår metode observerer vi et lavere antall fluorescerende celler som uttrykker IFNc mRNA i hodenyre. Cellene ligger dermed også mer spredt i vevet enn det Svingerud og medarbeidere (2012) hadde observert. Protokollen for FISH som ble brukt i denne studien ble utviklet basert på protokollen til Svingerud og medarbeidere (2012), men noen endringer ble gjort basert på hvilke reagenser/kits som var tilgjengelig nå. Dette kan ha gjort metoden noe mindre sensitiv som dermed kan ha ført til færre IFNc-positive celler sammenlignet med tidligere.

Ved FISH- analyser av hjerte kunne det i ventrikkel observeres fluorescerende enkeltceller som uttrykte IFNc mRNA spredt rundt i vevet. Antall fluorescerende enkeltceller vi observerte i hjerte kunne sammenlignes med det vi observerte i hodenyre. Både i hjerte og hodenyre fremstod de fluoreserende cellene som avlange i formen, og i hodenyre syntes de fleste å være lokalisert i nærheten av sinusoidene. Det ble ikke lokalisert noen fluorescerende celler tilknyttet endotelcellene i blodåreveggene.

Det ble nesten ikke observert fluorescerende celler som uttrykte IFNc mRNA i atrium. Ser vi på resultatet vi oppnådde ved relativ kvantifisering av type I IFN etter poly I:C injisering, så kunne det også vært interessant og undersøkt lokaliseringen av celler som uttrykker IFNb mRNA.

Det ble i FISH oppsett 6 prøvd på å slå ut de positive signalene fra IFNc antisense proben med sense proben. Dette gjøres som en kontroll for å teste spesifisiteten til binding av antisense proben. Til dette ble det brukt en hybridiseringsløsning med IFNc antisense og sense probe i forholdet 1:10. Denne probeløsningen ble testet på et hjerte og en hodenyre prøve fra poly I:C injisert fisk. Det kunne ved avlesning av prøvene påvises fluorescerende celler i både hjerte og hodenyre. Til gjengjeld kunne vi observere en betydelig reduksjon i fluorescens intensiteten sammenlignet med de samme prøvene kun tilsatt IFNc antisense probe. Dette resultatet kan tyde på at sense proben har bundet opp noe av antisense proben og dermed redusert fluorescens-intensiteten. Årsaken til at fluorescenssignalet ikke ble slått helt ut kan være at det trengtes en større mengde sense probe. Dot blot ble brukt for å bestemme konsentrasjonen på probene, og konsentrasjonen bestemmes manuelt etter vurdering av fargeintensitet, og vil til en viss grad bare kunne bli en omtrentlig konsentrasjonsverdi.

Ved oppsett av FISH ble det arbeidet etter RNase frie prosedyrer. Dette er spesielt viktig når det brukes RNA-prober som det ble gjort her. Dette kan være utfordrende, og krever godt innarbeidede rutiner.

### **4.3 IFN uttrykk i primærceller fra hjerte til Atlantisk laks**

Stimulering av laksecellelinjer og leukocytter fra blod og hodenyre med poly I:C har i tidligere forsøk ikke gitt økning i genuttrykket av IFNc, og det er uklart via hvilken reseptor/signalvei IFNc induseres (Svingerud *et al.*, 2012). Siden hjerte er et av organene som

har vist høyest uttrykk av IFN $\alpha$  etter poly I:C injeksjon *in vivo* (Svingerud *et al.*, 2012) var det derfor interessant å undersøke hvilke subtyper av IFN som ville uttrykkes i primære cellekulturer fra laksehjerte *in vitro*.

#### 4.4 Primære cellekulturer fra laksehjerte

Vi identifiserte de ulike celletypene i de primære cellekulturene morfologisk ut fra beskrivelser i Koren *et al.* (1997). For en sikker identifikasjon av celletyper hadde det ideelle vært identifisering ved bruk av cellespesifikke markører. Det er svært få studier av cellekulturer fra laksehjertet og det er ikke tilgjengelig slike markører per dags dato for laks. Myocytene i cellekulturene kontraherte, og det gjør identifiseringen av denne celletypen forholdsvis sikker. I tillegg viser kontraksjon av myocytene at disse cellene er levende. Manglende kontraksjon hos myocytene i forsøk 4 førte til at det ikke ble utført videre analyser på primær cellekultur av myocytter og mikskultur. Det kan også være andre celletyper i hjertevevet i tillegg til myocytter, endotelceller og epitelceller. Spesielt ved betennelsesinfiltrasjon kan mengden lymfocytter og makrofager øke i vevet, men hos frisk fisk vil dette ikke være dominerende. Ved mikroskopering av hjertecellekulturene vil disse celletypene trolig ikke kunne observeres og/eller skilles fra andre celler.

I dette arbeidet brukte vi de ulike cellenes evne til å feste seg til underlaget laminin som en måte å skille adherente og non-adherente celler fra hverandre. Endotelcellene festet seg raskt til laminin, mens myocytene lå forholdsvis løst oppå. Ut ifra dette etablerte vi to kulturer, en med de adherente endotelcellene og en kultur med de løse myocytene. Disse kulturene var ikke absolutt ren- kulturer. I endotelcellekulturene så en lett at de hadde svært lite innslag av myocytter og variasjonen i utseende mellom brønnene var liten. Myocyttkulturene derimot inneholdt en viss andel adherente endotelceller. Dette kunne eventuelt vært forbedret ved å skille myocytter og endotelceller enda en gang for å redusere innslaget av endotelceller.

##### 4.4.1 *IFN uttrykk i primære cellekulturer fra hjerte til Atlantisk laks etter in vitro poly I:C stimulering*

De første forsøkene med hjertecellekulturene ble utført med mikskulturer – det vil si hele cellepopulasjonen som var utbyttet etter isolering. Hovedhensikten med disse forsøkene var å undersøke om cellene ville respondere på poly I:C stimulering og hvilke subtyper av IFN som

ble uttrykt. Det ble utført tre separate forsøk med celler fra atrium som ga varierende resultater med hensyn til genuttrykk av IFN. Ved isolering av cellene benyttes enzymløsning for å frigjøre cellene fra vevet. Det varierte noe fra forsøk til forsøk hvor lenge vevet ble inkubert i enzymløsningen, avhengig av når det ble observert blakking av løsninga og dermed frigjorte celler. Dette sammen med den etterfølgende «spyling» av vevet kan ha ført til at den eksakte sammensetninga av cellekulturene varierte fra gang til gang. Ved identifisering av celler som uttrykte IFNc mRNA i hjerte med FISH, ble det observert få og spredte IFNc- positive celler rundt i vevet. Dette betyr at dersom andelen av de cellene som uttrykker IFNc mRNA varierer litt per gang i cellekulturen, kan dette gi store utslag på qPCR. Det ble jobbet parallelt med FISH og primærceller i denne oppgaven. Dette gjorde også at de vurderingene vi i utgangspunktet gjorde, med tanke på hva som kunne være interessant eller mulig, kunne endre seg underveis. Blant annet gjelder dette isolering av primære cellekulturer fra ventrikkel. Ved isolering fra ventrikkel oppnådde vi et lavere celleutbytte, enn ved isolering fra atrium. Dette kan ha sammenheng med at ventrikkel har et mer kompakt vev enn atrium hos laks (Moan 2013; Koren *et al.*, 1997). I tillegg festet et lavere antall av cellene seg i brønnen, og generelt så cellene mer «rufsete» ut morfologisk og var av dårligere kvalitet. Det ble derfor bestemt å ikke jobbe videre med celler fra ventrikkel. Ved FISH ble det påvist flest IFNc-positive celler i ventrikkel og færre i atrium. I ettertid kan vi se at det hadde vært viktig å videreutvikle metoden for celleisolering fra ventrikkel.

Det var kun i forsøk 1 av det ble isolert primærceller fra både ventrikkel og atrium. Resultatene viser at det er en økning i genuttrykket av både IFNa, IFNb og IFNc. Det samme viser forsøk 2 og 3 fra atrium. Forskjellen mellom ventrikkel og atrium er ikke tydelig, men kanskje kan en antyde en noe større økning i genuttrykket av type I IFN hos atrium. Dette til tross for at FISH analysene viste flest IFNc- positive celler i ventrikkel. qPCR resultatene fra ventrikkel kan ha vært påvirket av at disse cellene hadde dårlig kvalitet.

I videre forsøk ble uttrykket av type I IFN studert i endotel- og myocyttkulturer. Vi ønsket her å se om de ulike subtypene av IFN ble uttrykt i begge disse cellekulturene eller om det var forskjeller. Sammenligner vi resultatene fra forsøk 4 og 5 mellom primærceller fra myocytterne og endotelcellene, kan det ikke observeres en klar forskjell i uttrykk av IFN mellom de to ulike cellepopulasjonene. I både myocyt- og endotel- cellekulturene øker uttrykket av alle type I IFN. Resultatene tyder på at den/de cellepopulasjonen/celletypen som uttrykker IFNa, IFNb og IFNc er tilstede i begge disse cellekulturene.

Til forskjell fra Svingerud og medarbeidere (2012) som undersøkte uttrykket av type I IFN i laksecellelinjer og leukocytter fra blod og hodenyre med 20 µg/ml poly I:C, så brukte vi 10 µg/ml poly I:C ved stimulering av våre primære cellekulturer. De observerte en økning av genuttrykket til IFNa i alle cellekulturene, en svak økning av uttrykket til IFNb i primære leukocytter fra blod og hodenyre, men ingen økning i genuttrykket av IFNc.

Alle våre resultater viser at uttrykket av IFNa, IFNb og IFNc i de primære cellekulturene øker ved stimulering med poly I:C. Tidligere *in vitro* studier har ikke vist økning i uttrykk av IFNc i laksecellelinjer eller leukocytter ved stimulering med poly I:C (Svingerud *et al.*, 2012). Dette tyder på at primære hjertecellekulturer uttrykker reseptoren og signalkomponentene som IFNc induseres via. FISH-resultatene viser at enkeltceller spredt i hjertevevet, særlig ventrikkelen, uttrykker IFNc og det er sannsynlig at denne celletypen er en del av våre hjertecellekulturer. Dette kan åpne opp for å kunne studere og identifisere hvilken reseptor og signalvei som induserer IFNc-responsen i det medfødte immunforsvaret.

#### **4.5 Infeksjonsforsøk med ILAV i endotelcellekulturer og myocyttkulturer fra hjertet**

Virus tropisme er definert som 'kapasiteten et virus har til å infisere eller skade spesifikke celler, vev eller organer' (Aamelfot *et al.*, 2014). Tilstedeværelse av spesifikke reseptorer kan avgjøre om verten er mottagelig eller ikke (Haywood 1994). Mållcellene for ILAV er endotelceller i blodårene i alle organer. Dette inkluderer blant annet sinusoider, endokardium, glomerulære endotelceller i nyre og pillarceller i gjellene. Undersøkelse av fisk både fra naturlige utbrudd og etter eksperimentell smitte viser at viruset er lokalisert i endotelceller i ulike organer, også i hjertet (Aamelfot *et al.*, 2014). Reseptoren ILAV anvender for å feste seg til celler og starte infeksjon (4-O-acetyl sialin syre) er også hovedsakelig lokalisert på endotelceller (Aamelfot, *et al.*, 2014). *In vivo* ser viruset ut til å frigjøres fra endotelet til blodbanen ved knoppskyting (Koren og Nylund, 1997).

Et tidligere forsøk med ILAV infisering av primær cellekultur med gjelle epitelceller viste også virus tropisme for pillarcellene (Weli *et al.*, 2013). Vi kan per dags dato ikke se at det har vært gjort tidligere *in vitro* infeksjonsforsøk med ILAV i primærceller fra hjerte. Å etablere en infeksjonsmodell for ILAV i endotelceller fra laksehjerte ville gi et unikt verktøy for å studere virus-vert interaksjoner i naturlige vertsceller for viruset.



#### 4.5.1 *Replikerer ILAV i primærceller fra hjertet?*

Myocyttkulturer og endotelcellekulturer ble infisert med ILAV, isolat Glesvær.

Virusproduksjon ble kvantifisert på to måter: cellelysate ble brukt til RNA isolering og videre qPCR for ILAV segment 8, mens cellemedium fra de samme cellene ble analysert for infeksjøs virus ved titrering.

Resultatene fra qPCR indikerer en økning i uttrykket av segment 8 i både endotelceller og myocytter. Den relative økningen av ILAV segment 8 er lavere hos myocytterne enn hos endotelcellene.

Ved titrering ser vi også en økning av ILAV i både endotelceller og myocytter fra 0 til 72 timer. Sett under ett tyder resultatene på at ILAV replikerer i både endotel- og myocyttkulturene.

Hvorfor vi ser en produksjon av ILAV i de primære cellekulturene med myocytter, dersom de er svært lite mottagelige for ILAV er usikkert. Økningen vi ser av ILAV i myocyttkulturene kan eventuelt være et resultat av urene cellekulturer. Altså den økningen vi ser av ILAV kan skyldes endotelceller som fulgte med de non-adherente cellene da adherente og non-adherente celler ble splittet.

I qPCR analysene for ILAV økte  $C_t$ - verdien til referansegnet (EF1 $\alpha$ B) litt i fra 0 timer ( $C_t$  16,4) til dag 7 ( $C_t$  18,4) hos endotelcellene. Dette kan tyde på at endotelcellekulturene blir påvirket av infiseringen med ILAV, og den økte  $C_t$ - verdien vi observerer på dag 7 kan være en effekt av virusinfeksjonen. Referansegnet varierte mindre i  $C_t$ - verdi fra 0 timer ( $C_t$  17,9) til 7 dager ( $C_t$  17,8) hos myocytterne enn hos endotelcellene. Dette kan også tyde på at myocyttkulturene ikke blir påvirket i like stor grad av viruset som endotelcellekulturene er.

Ser vi på resultatene fra titreringen sammen med resultatene fra qPCR for ILAV segment 8, kan dette indikere at det er en større økning av ILAV i endotelcellekulturen enn i myocyttkulturen. Imidlertid ble det utført kun ett infeksjonsforsøk med ILAV i disse cellekulturene med et begrenset antall paralleller, og nye forsøk må gjøres for å kunne konkludere her.

##### 4.5.1.1 *Virusindusert uttrykk av type I IFN og TLR3*

Hvilke subtyper av IFN som blir indusert av ILAV i atlantisk laks vet en lite om. Prøvene fra infeksjonsforsøket med ILAV ble derfor også analysert for genuttrykk av type I IFN med qPCR.

Det relative genuttrykket av IFN $\alpha$ , IFN $\beta$  og IFN $\gamma$  økte i endotelcellene og myocytterne etter infisering med ILAV *in vitro*. Genuttrykket av IFN $\alpha$ , IFN $\beta$  og IFN $\gamma$  i endotelcellene stiger helt fram til dag 7, mens hos myocytterne er genuttrykket begynt å gå ned igjen på dag 7. Dette er samsvarende med qPCR analysene for segment 8, som viser et lignende forløp med en økning fram til dag 7 i endotelcellekulturene og en reduksjon på dag 7 i myocyttkulturene.

TLR3 gjenkjenner dsRNA molekyler og er en del av det medfødte immunforsvaret mot virus (Collet 2014). Fra pattedyr er det kjent at aktivering av TLR3 induserer genuttrykk av type I IFN (Alexopoulou *et al.*, 2001).

Vi ser en økning i genuttrykket av TLR3 ved infisering av endotelceller og myocytter med ILAV. Den største økningen ser vi etter 72 timer hos både endotelceller og myocytter. Dette betyr at TLR3 uttrykkes i endotel- og myocyttkulturene og at genuttrykket øker i cellene ved *in vitro* infisering med ILAV. En slik økning av TLR3 i primære cellekulturer fra hjerte har ikke vært vist tidligere. Hvilken funksjonell betydning TLR3 har ved en ILAV infeksjon i hjertecellene er derimot ukjent. Det ble også gjort forsøk på å analysere uttrykk av TLR22 i de samme prøvene. På grunn av at qPCR assayen ikke fungerte optimalt var det umulig å avgjøre om TLR22 uttrykkes i hjertecellekulturene.

#### 4.6 Hva kan resultatene brukes til?

Ser vi på resultatet vi oppnådde ved relativ kvantifisering av type I IFN etter poly I:C injisering av atlantisk laks *in vivo*, så kunne det vært interessant og undersøkt lokaliseringen av celler i hjerte som uttrykker IFNb mRNA ved FISH- analysering også. Lokalisering av celler som uttrykker IFNa mRNA i hjerte er heller ikke undersøkt før, så det kunne også vært interessant.

Tidligere forsøk med stimulering av laksecellelinjer og leukocytter fra blod og hodenyre med poly I:C har ikke gitt økning i genuttrykket av IFNc (Svingerud *et al.*, 2012). Dette har gjort det tilnærmet umulig å kunne undersøke *in vitro* hvordan IFNc skrues på. Primærceller fra hjerte vil være en god modell for å kunne undersøke videre hvordan IFN skrues på.

Måcellene for ILAV er endotelceller i blodårene i alle organer (Aamelfot *et al.*, 2014). Å etablere en infeksjonsmodell for ILAV i endotelceller fra laksehjerte vil gi et unikt verktøy til å kunne studere virus- vert interaksjoner i naturlige vertsceller for viruset.

## 5 Konklusjon

- Atlantisk laks injisert *in vivo* med poly I:C viste økt genuttrykk av IFNa, IFNb og IFNc i både hodenyre og hjerte.
- Påvisning og lokalisering av celler som uttrykte IFNc mRNA i hjerte og hodenyre etter poly I:C injisering av atlantisk laks viste spredte enkelt celler i vevet som uttrykte IFNc mRNA. Cellene med sterkt uttrykk av IFNc mRNA syntes å være lokalisert i nær kontakt med blodstrømmen. I hjertet var cellene hovedsakelig lokalisert i ventrikkel.
- Genuttrykket av type I IFN økte etter *in vitro* poly I:C stimulering av primære cellekulturer fra hjerte til atlantisk laks.
- *In vitro* stimulering med poly I:C av primære endotelcellekulturer, myocyttkulturer eller mikskulturer fra hjerte til atlantisk laks viste ingen klare forskjeller i genuttrykket av type I IFNer.
- ILAV replikerte i primære endotelcelle- og myocyttkulturer fra hjertet til atlantisk laks etter infeksjon *in vitro*.
- Genuttrykket av type I IFN og TL3 økte etter *in vitro* ILAV infisering av primære cellekulturer fra hjerte til atlantisk laks.
- Primære cellekulturer fra hjerte til atlantisk laks vil være en god modell for å kunne videre undersøke hvordan de ulike type I IFN induseres og hvilken rolle de har i forsvaret mot virus.

## 6 Litteraturliste

- Amelfot, M., Dale, O. B., & Falk, K. (2014). Infectious salmon anaemia - pathogenesis and tropism. *J Fish Dis*, 37(4), 291-307. doi: 10.1111/jfd.12225
- Aandahl, P.T., 2014. Norges sjømatråd. (<http://seafood.no/Nyheter-og-media/Nyhetsarkiv/Pressemeldinger/Rekordhøy-verdi-for-lakseeksporten2>)15.08.14
- Alberts B, Johnson A, Lewis J, et al. Molecular Biology of the Cell. 4th edition. New York: Garland Science; 2002. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK21054/>
- a. Alberts B, Johnson A, Lewis J, et al. Molecular Biology of the Cell. 4th edition. New York: Garland Science; 2002. Cell-Cell Adhesion. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK26937/>
  - b. Alberts B, Johnson A, Lewis J, et al. Molecular Biology of the Cell. 4th edition. New York: Garland Science; 2002. Isolating Cells and Growing Them in Culture. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK26851/>
- 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. doi: 10.1038/35099560
- Barbalat, R., Ewald, S. E., Mouchess, M. L., & Barton, G. M. (2011). Nucleic acid recognition by the innate immune system. *Annu Rev Immunol*, 29, 185-214. doi: 10.1146/annurev-immunol-031210-101340
- Barton, G. M., & Kagan, J. C. (2009). A cell biological view of Toll-like receptor function: regulation through compartmentalization. *Nat Rev Immunol*, 9(8), 535-542. doi: 10.1038/nri2587
- Bouchard, D. A., Brockway, K., Giray, C., Keleher, W., & Merrill, P. L. (2001). First report of Infectious Salmon Anaemia (ISA) in the United States. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists*, 21(2), 86- 88.
- Brown, C. (1998). In situ hybridization with riboprobes: an overview for veterinary pathologists. *Vet Pathol*, 35(3), 159-167.
- Chang, M., Collet, B., Nie, P., Lester, K., Campbell, S., Secombes, C. J., & Zou, J. (2011). Expression and functional characterization of the RIG-I-like receptors MDA5 and LGP2 in Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *J Virol*, 85(16), 8403-8412. doi: 10.1128/jvi.00445-10
- Chang, C. J., Robertsen, C., Sun, B., & Robertsen, B. (2014). Protection of Atlantic salmon against virus infection by intramuscular injection of IFN $\gamma$  expression plasmid. *Vaccine*. doi: 10.1016/j.vaccine.2014.05.059
- Chelbi-Alix, M. K., & Wietzerbin, J. (2007). Interferon, a growing cytokine family: 50 years of interferon research. *Biochimie*, 89(6-7), 713-718. doi: 10.1016/j.biochi.2007.05.001
- Chill, J. H., Quadt, S. R., Levy, R., Schreiber, G., & Anglister, J. (2003). The human type I interferon receptor: NMR structure reveals the molecular basis of ligand binding. *Structure*, 11(7), 791-802.
- Collet, B. (2014). Innate immune responses of salmonid fish to viral infections. *Dev Comp Immunol*, 43(2), 160-173. doi: 10.1016/j.dci.2013.08.017
- de Weerd, N. A., Samarajiwa, S. A., & Hertzog, P. J. (2007). Type I Interferon Receptors: Biochemistry and Biological Functions. *Journal of Biological Chemistry*, 282(28), 20053-20057. doi: 10.1074/jbc.R700006200
- Diebold, S. S. (2008). Recognition of viral single-stranded RNA by Toll-like receptors. *Adv Drug Deliv Rev*, 60(7), 813-823. doi: 10.1016/j.addr.2007.11.004
- Ervik, A., Oppedal, F., Agnalt, A.-L., Kristiansen, T. S., & Havforskningsinstituttet. (2004). *Havbruksrapport 2004*. Bergen: Havforskningsinstituttet.

- Fillatreau, S., Six, A., Magadan, S., Castro, R., Sunyer, J. O., & Boudinot, P. (2013). The astonishing diversity of Ig classes and B cell repertoires in teleost fish. *Front Immunol*, 4, 28. doi: 10.3389/fimmu.2013.00028
- Fitzgerald, K. A., McWhirter, S. M., Faia, K. L., Rowe, D. C., Latz, E., Golenbock, D. T., . . . Maniatis, T. (2003). IKKepsilon and TBK1 are essential components of the IRF3 signaling pathway. *Nat Immunol*, 4(5), 491-496. doi: 10.1038/ni921
- Freshney, R.I. 2005. Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique, Fifth Edition, John Wiley & Sons, Inc.
- Haywood, A. M. (1994). Virus receptors: binding, adhesion strengthening, and changes in viral structure. *J Virol*, 68(1), 1.
- Hikima, J., Jung, T. S., & Aoki, T. (2011). Immunoglobulin genes and their transcriptional control in teleosts. *Dev Comp Immunol*, 35(9), 924-936. doi: 10.1016/j.dci.2010.10.011
- Hjeltnes, B. (red) Fiskehelse rapporten. (2013). Oslo: Veterinærinstituttet; 2014.
- Holland, J. W., Bird, S., Williamson, B., Woudstra, C., Mustafa, A., Wang, T., . . . Secombes, C. J. (2008). Molecular characterization of IRF3 and IRF7 in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*: Functional analysis and transcriptional modulation. *Mol Immunol*, 46(2), 269-285. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.molimm.2008.08.265>
- Isaacs, A., & Lindenmann, J. (1957). Virus interference. I. The interferon. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B-Biological Sciences*, 147(927), 258-267.
- Jensen, S., & Thomsen, A. R. (2012). Sensing of RNA viruses: a review of innate immune receptors involved in recognizing RNA virus invasion. *J Virol*, 86(6), 2900-2910. doi: 10.1128/jvi.05738-11
- Koren, C., & Nylund, A. (1997). Morphology and morphogenesis of infectious salmon anaemia virus replicating in the endothelium of Atlantic salmon *Salmo salar*. *Dis Aquat Organ*, 29(2), 99-109.
- Koren, C. W. R., Sveinbjørnsson, B., & Smedsrød, B. (1997). Isolation and culture of endocardial endothelial cells from Atlantic salmon (*Salmo salar*) and Atlantic cod (*Gadus morhua*). *Cell and Tissue Research*, 290(1), 89-99. doi: 10.1007/s004410050911
- Kotenko, S. V., Gallagher, G., Baurin, V. V., Lewis-Antes, A., Shen, M., Shah, N. K., . . . Donnelly, R. P. (2003). IFN-lambdas mediate antiviral protection through a distinct class II cytokine receptor complex. *Nat Immunol*, 4(1), 69-77. doi: 10.1038/ni875
- Kvistad, A., 2014. Laks.no (<http://laks.no/Informasjon/Artikler/Verden-trenger-mer-mat/>) 26.06.14
- Lauksund, S., Svingerud, T., Bergan, V., & Robertsen, B. (2009). Atlantic salmon IPS-1 mediates induction of IFN $\alpha$ 1 and activation of NF-kappaB and localizes to mitochondria. *Dev Comp Immunol*, 33(11), 1196-1204. doi: 10.1016/j.dci.2009.06.012
- Lin, R., Heylbroeck, C., Pitha, P. M., & Hiscott, J. (1998). Virus-dependent phosphorylation of the IRF-3 transcription factor regulates nuclear translocation, transactivation potential, and proteasome-mediated degradation. *Molecular and cellular biology*, 18(5), 2986-2996.
- Liu, Y., Li, M., Fan, S., Lin, Y., Lin, B., Luo, F., . . . Xu, A. (2010). A unique feature of Toll/IL-1 receptor domain-containing adaptor protein is partially responsible for lipopolysaccharide insensitivity in zebrafish with a highly conserved function of MyD88. *J Immunol*, 185(6), 3391-3400. doi: 10.4049/jimmunol.0903147
- Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT Method. *Methods*, 25(4), 402-408. doi: <http://dx.doi.org/10.1006/meth.2001.1262>

- Lyngøy, C. (2003). *Infectious salmon anaemia in Norway and the Faeroe Islands: An industrial approach*. Paper presented at the International response to infectious salmon anaemia: prevention, control, and eradication: proceedings of a symposium. Tech Bull 1902.
- Marie, I., Durbin, J. E., & Levy, D. E. (1998). Differential viral induction of distinct interferon- $\alpha$  genes by positive feedback through interferon regulatory factor-7. *EMBO J*, 17(22), 6660-6669.
- 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. *J Immunol*, 181(5), 3474-3485.
- Medzhitov, R., Preston-Hurlburt, P., Kopp, E., Stadlen, A., Chen, C., Ghosh, S., & Janeway, C. A., Jr. (1998). MyD88 is an adaptor protein in the hToll/IL-1 receptor family signaling pathways. *Mol Cell*, 2(2), 253-258.
- Moan, I. (2013). Studier av Hjerter- og skjelettmuskelbetennelse (HSMB) i Atlantisk laks (*Salmo salar* L.). *Masteroppgave i fiskehelse, Universitetet i Tromsø, Norges fiskerihøgskole*.
- Mullins, J. E., Groman, D. B., & Wadowska, D. (1998). Infectious salmon anaemia in salt water Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) in New Brunswick, Canada. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists*, 18(4), 110- 114.
- Oganessian, G., Saha, S. K., Guo, B., He, J. Q., Shahangian, A., Zarnegar, B., . . . Cheng, G. (2006). Critical role of TRAF3 in the Toll-like receptor-dependent and -independent antiviral response. *Nature*, 439(7073), 208-211. doi: 10.1038/nature04374
- Olafsen T, Winther U, Olsen Y, Skjermo J. 2012 Verdiskapning basert på produktive hav i 2050. Sintef ([http://www.sintef.no/upload/Fiskeri\\_og\\_havbruk/Publikasjoner/Verdiskapning%20basert%20p%c3%a5%20produktive%20hav%20i%202050.pdf](http://www.sintef.no/upload/Fiskeri_og_havbruk/Publikasjoner/Verdiskapning%20basert%20p%c3%a5%20produktive%20hav%20i%202050.pdf)) Dato 23.11.12
- Olsvik, P. A., K. K. Lie, A. E. O. Jordal, T. O. Nilsen, and I. Hordvik. (2005). Evaluation of potential reference genes in real-time RT-PCR studies of Atlantic salmon. *Bmc Mol Biol* 17:6 – 21
- Olsvik Pål A. Kai Kristoffer Lie, Anne-Lise Olderbakk Jordal, Tom Ole Nilsen, Ivar Hordvik (2005) Evaluation of potential reference genes in real-time RT-PCR studies of Atlantic salmon *BMC Molecular Biology*; Volum 6 (21) s. 1-9
- Pestka, S., Krause, C. D., & Walter, M. R. (2004). Interferons, interferon-like cytokines, and their receptors. *Immunological Reviews*, 202(1), 8-32. doi: 10.1111/j.0105-2896.2004.00204.x
- Pfaffl, M. W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res*, 29(9), e45-e45.
- Platanias, L. C. (2005). Mechanisms of type-I- and type-II-interferon-mediated signalling. *Nat Rev Immunol*, 5(5), 375-386. doi: 10.1038/nri1604
- Poppe, T., (2002). Fiskehelse og fiskesykdommer. Universitetsforlaget, opplag 2.
- Purcell, M. K., Smith, K. D., Aderem, A., Hood, L., Winton, J. R., & Roach, J. C. (2006). Conservation of Toll-like receptor signaling pathways in teleost fish. *Comparative Biochemistry and Physiology Part D: Genomics and Proteomics*, 1(1), 77-88. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cbd.2005.07.003>
- Rebl, A., Goldammer, T., & Seyfert, H. M. (2010). Toll-like receptor signaling in bony fish. *Vet Immunol Immunopathol*, 134(3-4), 139-150. doi: 10.1016/j.vetimm.2009.09.021
- Robertsen, B., Bergan, V., Rokenes, T., Larsen, R., & Albuquerque, A. (2003). Atlantic salmon interferon genes: cloning, sequence analysis, expression, and biological activity. *J Interferon Cytokine Res*, 23(10), 601-612. doi: 10.1089/107999003322485107

- Robertsen, B. (2006). The interferon system of teleost fish. *Fish & Shellfish Immunology*, 20(2), 172-191. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fsi.2005.01.010>
- Robertsen, B. (2008). Expression of interferon and interferon-induced genes in salmonids in response to virus infection, interferon-inducing compounds and vaccination. *Fish & Shellfish Immunology*, 25(4), 351-357. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fsi.2008.02.004>
- Robertsen, C. (2013). Induksjon av antivirale gener hos atlantisk laks (*Salmo salar* L.) ved intramuskulær injeksjon av ekspresjonsplasmid for interferon c (IFNc). Masteroppgave 2013.
- Rodger, H. D., Turnbull, T., Muir, F., Millar, S., & Richards, R. H. (1998). Infectious salmon anaemia (ISA) in the United Kingdom. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists*, 18(4), 115- 116.
- Roth Charles M. 2002. Quantifying Gene Expression. *Curr. Issues Mol. Biol.* (2002) 4: 93-100. (<http://www.horizonpress.com/cimb/v/v4/09.pdf>) 30.06.14
- Rothenfusser, S., Goutagny, N., DiPerna, G., Gong, M., Monks, B. G., Schoenemeyer, A., . . . Fitzgerald, K. A. (2005). The RNA helicase Lgp2 inhibits TLR-independent sensing of viral replication by retinoic acid-inducible gene-I. *J Immunol*, 175(8), 5260-5268.
- Sato, M., Hata, N., Asagiri, M., Nakaya, T., Taniguchi, T., & Tanaka, N. (1998). Positive feedback regulation of type I < i> IFN </i> genes by the IFN-inducible transcription factor IRF-7. *FEBS Lett*, 441(1), 106-110.
- Sato, M., Suemori, H., Hata, N., Asagiri, M., Ogasawara, K., Nakao, K., . . . Taniguchi, T. (2000). Distinct and essential roles of transcription factors IRF-3 and IRF-7 in response to viruses for IFN-alpha/beta gene induction. *Immunity*, 13(4), 539-548.
- Satoh, T., Kato, H., Kumagai, Y., Yoneyama, M., Sato, S., Matsushita, K., . . . Takeuchi, O. (2010). LGP2 is a positive regulator of RIG-I- and MDA5-mediated antiviral responses. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107(4), 1512-1517. doi: 10.1073/pnas.0912986107
- Schmittgen, T. D., & Livak, K. J. (2008). Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. *Nat. Protocols*, 3(6), 1101-1108.
- Schroder, K., Hertzog, P. J., Ravasi, T., & Hume, D. A. (2004). Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions. *J Leukoc Biol*, 75(2), 163-189. doi: 10.1189/jlb.0603252
- Seth, R. B., Sun, L., Ea, C.-K., & Chen, Z. J. (2005). Identification and Characterization of MAVS, a Mitochondrial Antiviral Signaling Protein that Activates NF-κB and IRF3. *Cell*, 122(5), 669-682. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2005.08.012>
- Sheppard, P., Kindsvogel, W., Xu, W., Henderson, K., Schlutsmeyer, S., Whitmore, T. E., . . . Klucher, K. M. (2003). IL-28, IL-29 and their class II cytokine receptor IL-28R. *Nat Immunol*, 4(1), 63-68. doi: 10.1038/ni873
- Skjaeveland, I., Iliev, D. B., Strandkog, G., & Jorgensen, J. B. (2009). Identification and characterization of TLR8 and MyD88 homologs in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Dev Comp Immunol*, 33(9), 1011-1017. doi: 10.1016/j.dci.2009.04.007
- Skjesol, A., Hansen, T., Shi, C.-Y., Thim, H., & Jorgensen, J. (2010). Structural and functional studies of STAT1 from Atlantic salmon (*Salmo salar*). *BMC Immunology*, 11(1), 17.
- Sobhkhhez, M., Hansen, T., Iliev, D. B., Skjesol, A., & Jørgensen, J. B. (2013). The Atlantic salmon protein tyrosine kinase Tyk2: Molecular cloning, modulation of expression and function. *Developmental & Comparative Immunology*, 41(4), 553-563. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.dci.2013.07.008>



- Stein, C., Caccamo, M., Laird, G., & Leptin, M. (2007). Conservation and divergence of gene families encoding components of innate immune response systems in zebrafish. *Genome Biol*, 8(11), R251. doi: 10.1186/gb-2007-8-11-r251
- Strachan T, Read AP(1999). Human Molecular Genetics. 2nd edition. New York: Wiley-Liss; 1999. Chapter 5, Nucleic acid hybridization assays. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK7567/>
- Sun, B., Robertsen, B., Wang, Z., & Liu, B. (2009). Identification of an Atlantic salmon IFN multigene cluster encoding three IFN subtypes with very different expression properties. *Dev Comp Immunol*, 33(4), 547-558. doi: 10.1016/j.dci.2008.10.001
- Sun, B., Skjæveland, I., Svingerud, T., Zou, J., Jorgensen, J., & Robertsen, B. (2011). Antiviral activity of salmonid gamma interferon against infectious pancreatic necrosis virus and salmonid alphavirus and its dependency on type I interferon. *J Virol*, 85(17), 9188-9198. doi: 10.1128/jvi.00319-11
- Svingerud, T., Solstad, T., Sun, B., Nyrud, M. L., Kileng, O., Greiner-Tollersrud, L., & Robertsen, B. (2012). Atlantic salmon type I IFN subtypes show differences in antiviral activity and cell-dependent expression: evidence for high IFN $\beta$ /IFN $\gamma$ -producing cells in fish lymphoid tissues. *J Immunol*, 189(12), 5912-5923. doi: 10.4049/jimmunol.1201188
- Thorud, K. E., & Djupvik, H. O. (1988). Infectious salmon anaemia in Atlantic salmon (*Salmo salar* L). *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists*, 8(5), 109- 111.
- Unchern, S. (1999). *Basic techniques in animal cell culture*. Paper presented at the Drug Deliv. Syst. Workshop.
- Wathelet, M. G., Lin, C. H., Parekh, B. S., Ronco, L. V., Howley, P. M., & Maniatis, T. (1998). Virus infection induces the assembly of coordinately activated transcription factors on the IFN- $\beta$  enhancer in vivo. *Mol Cell*, 1(4), 507-518.
- Weli, S., Aamelfot, M., Dale, O., Koppang, E., & Falk, K. (2013). Infectious salmon anaemia virus infection of Atlantic salmon gill epithelial cells. *Virology*, 44(1), 5.
- Wergeland, H. I., & Jakobsen, R. A. (2001). A salmonid cell line (TO) for production of infectious salmon anaemia virus (ISAV). *Dis Aquat Organ*, 44(3), 183-190. doi: 10.3354/dao044183
- Wilk, R., Murthy, S. U., Yan, H., & Krause, H. M. (2010). In situ hybridization: fruit fly embryos and tissues. *Current Protocols Essential Laboratory Techniques*, 9.3. 1-9.3. 24.
- Whitmarsh, A., & Davis, R. (1996). Transcription factor AP-1 regulation by mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways. *Journal of Molecular Medicine*, 74(10), 589-607.
- Yamamoto, M., Sato, S., Mori, K., Hoshino, K., Takeuchi, O., Takeda, K., & Akira, S. (2002). Cutting edge: a novel Toll/IL-1 receptor domain-containing adapter that preferentially activates the IFN- $\beta$  promoter in the Toll-like receptor signaling. *J Immunol*, 169(12), 6668-6672.
- 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(5633), 640-643. doi: 10.1126/science.1087262
- Yoneyama, M., & Fujita, T. (2009). RNA recognition and signal transduction by RIG-I-like receptors. *Immunological Reviews*, 227(1), 54-65. doi: 10.1111/j.1600-065X.2008.00727.x
- Yoneyama, M., & Fujita, T. (2010). Recognition of viral nucleic acids in innate immunity. *Reviews in Medical Virology*, 20(1), 4-22. doi: 10.1002/rmv.633

- Yoshida, R., Takaesu, G., Yoshida, H., Okamoto, F., Yoshioka, T., Choi, Y., . . . Kobayashi, T. (2008). TRAF6 and MEKK1 play a pivotal role in the RIG-I-like helicase antiviral pathway. *J Biol Chem*, 283(52), 36211-36220. doi: 10.1074/jbc.M806576200
- Zhang, Y. B., & Gui, J. F. (2012). Molecular regulation of interferon antiviral response in fish. *Dev Comp Immunol*, 38(2), 193-202. doi: 10.1016/j.dci.2012.06.003
- 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. *Dev Comp Immunol*, 39(1-2), 39-62. doi: 10.1016/j.dci.2012.04.001
- Zou, J. & Secombes, C. J. (2011). Teleost fish interferons and their role in immunity. *Developmental & Comparative Immunology*, 35(12), 1376-1387. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.dci.2011.07.001>

## Internetthenvisinger/ andre henvisninger:

- Applied Biosystems. (2010). *Fast SYBR® Green Master Mix Protocol*.
- FAO. 2001. Glossary of biotechnology for food and agriculture. Benyttet: 23. April 2008. <http://www.fao.org/DOCREP/004/Y2775E/y2775e07.htm#bm07.1>
- Fiskeri- og kystdepartementet (FKD). (2009). Strategi for en miljømessig bærekraftig Havbruksnæring. ([http://www.regjeringen.no/upload/FKD/Vedlegg/Brosjyrer/2009/Brosjyre\\_strategi\\_baerekraftig\\_havbruk.pdf](http://www.regjeringen.no/upload/FKD/Vedlegg/Brosjyrer/2009/Brosjyre_strategi_baerekraftig_havbruk.pdf)) Dato: 10.11.12
- Helse Møre og Romsdal, ([www.helse-mr.no](http://www.helse-mr.no)) 21.05.14
- LADE *in situ* hybridization protocol, 2012. (<http://lade.udc.no>) 21.05.14
- Landbruks- og matdepartementet. FOR-1996-01-15-23: Forskrift om forsøk med dyr (<http://lovdata.no/forskrift/1996-01-15-23>) 06.08.14
- Landbruks- og matdepartementet. LOV-2009-06-19-97: Lov om dyrevelferd (<http://lovdata.no/lov/2009-06-19-97>) 06.08.14
- Life Technologies Corporation. (2012). *Real-time PCR handbook*. (<http://www.lifetechnologies.com>)
- Life Technologies. 2012. Real-time PCR handbook. Basics of real-time PCR. ([http://find.lifetechnologies.com/Global/FileLib/qPCR/RealTimePCR\\_Handbook\\_Update\\_FLR.pdf](http://find.lifetechnologies.com/Global/FileLib/qPCR/RealTimePCR_Handbook_Update_FLR.pdf)) 130614
- Lovdata: ([www.lovdata.no](http://www.lovdata.no), 160514).
- Medisinsk leksikon: Fossum, Sigbjørn. (2009, 13. februar). Ekstracellulær Matriks. I Store medisinske leksikon. Hentet 10. juni 2014 fra [http://sml.snl.no/ekstracellul%C3%A6r\\_matriks](http://sml.snl.no/ekstracellul%C3%A6r_matriks). eller <http://sml.snl.no>
- Perkin Elmer, ([www.perkinelmer.de](http://www.perkinelmer.de)) 21.05.14
- Qiagen. 2010. RNeasy Fibrous Tissue Handbook. (<http://www.qiagen.com/resources/resourcedetail?id=8039840d-4815-4375-8933-bc09247e47c0&lang=en>) 20.06.14
- Qiagen. 2012. RNeasy Mini Handbook, fourth edition. Side 23- 28. (<http://www.qiagen.com/resources/resourcedetail?id=14e7cf6e-521a-4cf7-8cbc-bf9f6fa33e24&lang=en>). 31.10.13
- Qiagen. (2009). *QuantiTect® reverse transcription handbook*.

Roche (2008). DIG Application Manual for Nonradioactive In Situ Hybridization, 4th Edition.

ThermoScientific. (2008). NanoDrop 1000 Spectrophotometer v3.7 user' manual.  
(<http://www.nanodrop.com/library/nd-1000-v3.7-users-manual-8.5x11.pdf>) 300614

Veterinærinstituttet. ([www.vetinst.no/Temasider/Fisk/Pankreassykdom-PD](http://www.vetinst.no/Temasider/Fisk/Pankreassykdom-PD) 15.08.14)

Veterinærinstituttet. ([www.vetinst.no/Temasider/Fisk/Hjerte-og-skjelettmuskebetennelse-HSMB](http://www.vetinst.no/Temasider/Fisk/Hjerte-og-skjelettmuskebetennelse-HSMB) 15.08.14).  
Veterinærinstituttet. ([www.vetinst.no/Faktabank/IPN](http://www.vetinst.no/Faktabank/IPN) 15.08.14).

Veterinærinstituttet. ([www.vetinst.no/Faktabank/Kardiomyopatisyndrom-CMS](http://www.vetinst.no/Faktabank/Kardiomyopatisyndrom-CMS) 15.08.14).

Wikipedia. Integrin: [http://en.wikipedia.org/wiki/Integrins#cite\\_note-lodish-19](http://en.wikipedia.org/wiki/Integrins#cite_note-lodish-19). 230714

## Appendiks I - Reagenser

Reagenser	Produsent	Katalognr.
0,25 % Trypsin-EDTA (1X), phenol red	Gibco	25200-056
2-Mercaptoethanol, ≥99.0%	Sigma- Aldrich	M6250
Acetic anhydride	Fluka	45840
Anti- Digoxigenin- POD, Fab fragments	Roche Diagnostics	11207733910
Blokkeringsreagens	PerkinElmer	FP1020
Bovine Serum Albumin (tørstoff)	Sigma	A3294
Calcium chloride solution 1 M	Sigma	21115
Dako Pen	Dako	52002
Deoxyribonucleic acid solution from calf thymus (Calf Thymus DNA)	Sigma	D-8661
Dextran sulfat Sodium salt from Leuconostoc ssp.	Fluka	31403
Diethyl pyrocarbonate (DEPC)	Sigma	D5758
Dimetylsulfoksid (DMSO)		
DPBS, Dulbecco's phosphate buffered saline (PBS-)	Sigma	D8537
Ethanol puriss. p.a., absolute, ≥99.8% (GC)	Sigma- Aldrich	32221
FBS Superior (Fetal Bovine Serum)	Biochrom AG	S 0615
Ficoll <sup>®</sup> PM 400, type 400	Sigma	F- 4375
Formamide (Deionized)	Ambion	AM9342
Gentamicin solution 10 mg/ml	Sigma	G1272
Gentamicin solution 50 mg/ml	Sigma	G1397
Heparin LEO 5000 IE/ml	Orifarm AS	06 49 27
HEPES NB! Må sjekkes mot hva vi har brukt!	Sigma	H3375
Hydrogen peroxide 30%	Merck	107209
Hydrogen peroxide solution, 30 wt. % in H <sub>2</sub> O	Sigma- Aldrich	216763
Laminin from Engelbreth-Holm-Swarm murine sarcoma basement membrane	Sigma	L2020

Liberase TH Research Grade (Thermolysin High)	Roche	05401135001
Liberase TM Research Grade (Thermolysin medium)	Roche	05401119001
Leibovitz's L-15 medium (1×)	Gibco	11415- 049
Methanol ≥99.8% (GC)	Sigma- Aldrich	32213
NucleoCassette™ 10x10 units	Chemometec	941-0002
1x MEM Non essential Amino Acid Solution	Gibco	11140-050
Paraformaldehyde	Fluka	76240
Penicilin/ Streptomycin	Gibco	15140-122
Poly (I)·Poly(C)- double strand	GE Healthcare Life sciences	27-4732-01
Polyvinylpyrrolidone K30	Fluka	81420
Precellys 24 Lysing kit,Hard tissue homogenizing CK28	<i>Bertin</i> Technologies	03961-1-002
Proteinase K	New England Biolabs	P8107S
Proteinase K, recombinant, PCR Grade	Roche Diagnostics	03115887001
QuantiTect Reverse Transcription Kit (50)	Qiagen	205311
RNAlater®Solution	Ambion	AM7021
RNeasy Fibrous Tissue Mini Kit (50)	Qiagen	74704
RNeasy Mini Kit (250)	Qiagen	74106
SeaKem LE AGAROSE 1KG	Lonza	50005
Sodium chloride (NaCl)	Sigma- Aldrich	71380
SuperFrost®Plus objektglass	Menzel Gläser	J1800AMNZ
Triethanolamine	Sigma	90278
Triton™ X-100	Sigma	T8787
TSA™ Plus Fluorescein System	PerkinElmer	NEL741001KT
TWEEN® 20	Sigma	93773
Ultra Pure Water, sterile	Biochrom AG	L 0015
UltraPure™ 1 M Tris-HCl Buffer, pH 7.5	Invitrogen	15567-027
Xylenes	Sigma- Aldrich	33817

## Appendiks II

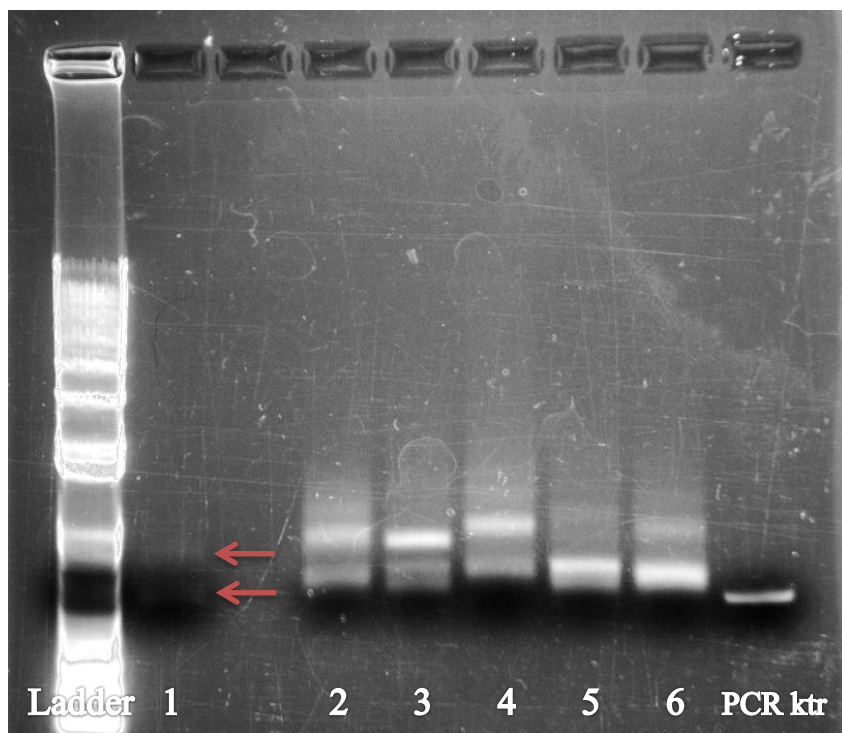
### *Tillaging av prober*

(Se «1.2.4 Tillaging av prober» i material og metode)

Til *in situ* hybridiseringen måtte det lages DIG merkede RNA prober. Konsentrasjonen til probene ble bestemt utfra dot blot. Det ble totalt utført seks oppsett med *in situ* hybridisering.

Det ble ved tillaging av prober utført en gelelektroforese etter PCR amplifiseringen av innsatt IFN sekvens i ekspresjonsplasmid (pCR3.1SasaIFN-a1, pcDNA3.3- TOPO vektor). PCR-produktene ble synliggjort ved hjelp av EtBr i gelen og UV- lys, og viste klare tydelige bånd. Båndene ble skåret ut av gelen og rensset med QIAquick gel extraction kit fra Qiagen.

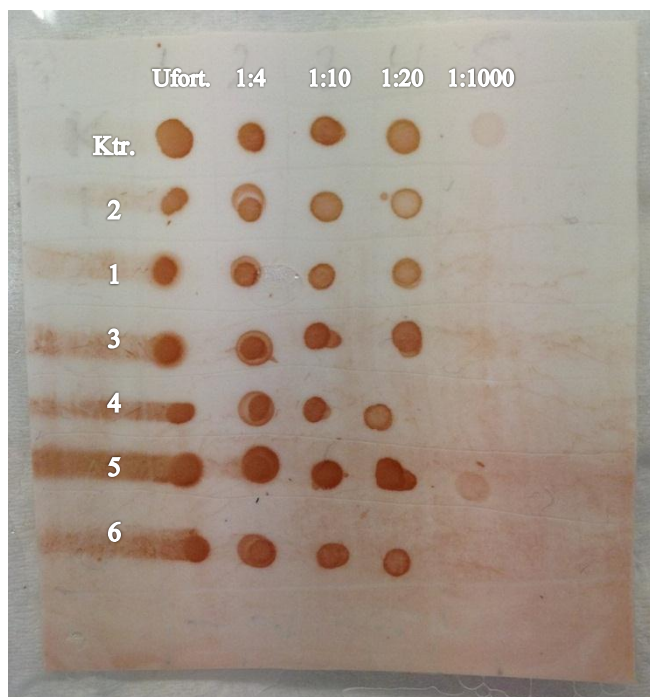
Det rensede PCR- produktet ble videre brukt som templat ved en *in vitro* transkripsjon der RNA probene DIG merkes. Renset probene på kolonne (Illustra ProbeQuant G-50 Micro Columns) og kjørte deretter produktet (probene) på en 1 %- agarosegel med EtBr (**Bilde A**). Gelbildet er noe overeksponert for å få frem båndet til prøve 1. Ved applisering av prøve 1 ble en del av prøvemateriale igjen i pipettespissen, og dette vises tydelig med et mye svakere bånd sammenlignet med prøve 2- 6. Prøve 2- 6 viser tydelige kraftige bånd rund ca 700- 750 bp. PCR- produkt før DIG merking fra prøve 6 ble tatt med som en positiv kontroll, og viser også et tydelig bånd.



**Bilde A:** Gelelektroforese av digoxigenin (DIG) merkede RNA prøber. Til venstre er det kjørt en 1 Kb ladder og helt til høyre er det satt opp PCR- produkt fra prøve 6 før DIG- merking som kontroll. Det er en tom brønn mellom prøve 1 og 2 på gelen. Rød pil markerer svakt bånd, og skyldes en feil ved tilsetning av proben. DIG merket RNA probe **1- 2:** IFN $\alpha$  sense og antisense, **3- 4:** IFN $\beta$  sense og antisense, **5- 6:** IFN $\gamma$  sense og antisense.

### Bestemmelse av probe konsentrasjonen

Konsentrasjonen til probene ble bestemt med dot blot. Fulgte protokollen DIG RNA Labeling Kit (SP6/ T7) (Roche). Det ble utført dot blot to ganger, og probe konsentrasjonene ble vurdert til det samme i begge oppsettene. Bilde B viser siste Dot blot som ble utført, og i tabell II er konsentrasjonen til de DIG merkede RNA probene vurdert. Prøve 1, 4 og 6 vurderes til å være ganske lik kontrollen og settes til 100 ng/ $\mu$ l. Prøve 2 sin 1:10 fortynning er ganske lik fortynning 1:20 av kontrollen. Ut fra dette vurderes prøve 2 å ha en konsentrasjon som tilsvarer halvparten av kontrollen, altså 50 ng/ $\mu$ l. Prøve 3 sin 1:20 fortynning er ganske lik fortynning 1:10 av kontrollen. Konsentrasjonen til prøve 3 settes derfor til 200 ng/ $\mu$ l, altså det dobbelte av kontrollen. Prøve 5 sin 1:1000 fortynning er kraftigere enn kontrollen sin 1:1000 fortynning (0,1 ng/ $\mu$ l), men svakere enn prøve 2 sin 1:20 fortynning (2,5 ng/ $\mu$ l). Dette betyr at 1:1000 fortynningen av prøve 5 er mellom 0,1- 2,5 ng/ $\mu$ l. Prøve 5 sin 1:1000 fortynning settes til 1 ng/ $\mu$ l, som ufortynnet blir 1000 ng/ $\mu$ l.



**Bilde B:** Dot blot av digoxigenin (DIG) merkede RNA prober. Ufortynnet kit kontroll fra Roche er 100 ng/ $\mu$ l (DIG RNA Labeling Kit (SP6/ T7)). Merk at prøve 2 er satt opp før prøve 1. DIG merket RNA probe **1- 2:** IFNa sense og antisense, **3- 4:** IFNb sense og antisense, **5- 6:** IFNc sense og antisense.

**Tabell II:** Probekonsentrasjon vurdert ut fra dot blot.

Prøve	Ufortynnet (ng/ $\mu$ l)	1:4 (ng/ $\mu$ l)	1:10 (ng/ $\mu$ l)	1:20 (ng/ $\mu$ l)	1:1000 (ng/ $\mu$ l)	Probekonsentrasjon (ng/ $\mu$ l)	Probe
Kontroll	100	25	10	5	0,1		
<b>2</b>	50	12,5	5	2,5	-	50	T3 IFNa r (antisense)
<b>1</b>	100	25	10	5	-	100	T7 IFNa f (sense)
<b>3</b>	200	50	20	10	-	200	T7 IFNb f (sense)
<b>4</b>	100	25	10	5	-	100	T3 IFNb r (antisense)
<b>5</b>	1000	250	100	50	1	1000	T7 IFNc f (sense)
<b>6</b>	100	25	10	5	-	100	T3 IFNc r (antisense)

Probekonsentrasjonen til digoxigenin merkede RNA prober bestemt ut fra dot blot (bilde 3): **Prøve 1, 4 og 6:** 100 ng/ $\mu$ l, **Prøve 2:** 50 ng/ $\mu$ l, **Prøve 3:** 200 ng/ $\mu$ l, **Prøve 5:** 1000 ng/ $\mu$ l. Merk at prøve 1 og 2 kommer i omvendt rekkefølge. f, Forward primer; r, reverse primer.



## Appendiks III

### *Celleutbytte etter isolering av primærceller fra hjerte til atlantisk laks*

Det totale celleutbytte etter isolering av primærceller fra hjerte til Atlantisk laks ble målt ved hjelp av NucleoCounter YC-100 (Chemomtec). I tabell III er celleutbytte fra de seks uttakene vist. Celleutbytte per fisk var størst i forsøk 3 og 4. Det laveste celleutbytte per fisk oppnådde vi i forsøk 2, som er ca. halvparten av hva vi oppnådde i forsøk 3 og 4.

**Tabell III:** Celleutbytte etter isolering av primærceller fra hjerte til Atlantisk laks

Forsøk	Antall fisk (n= 54)	Isolert celler fra	Totalt celleutbytte (automatisk)	Celleutbytte per fisk (gjennomsnitt)	Antall celler sådd ut per brønn
1	6	Atrium Ventrikkel	$3,25 \times 10^7$ $1,80 \times 10^7$	$5,42 \times 10^6$	$1,21 \times 10^6$
2	8	Atrium	$2,20 \times 10^7$	$2,75 \times 10^6$	$1,21 \times 10^6$
3	9	Atrium	$4,80 \times 10^7$	$5,33 \times 10^6$	$1,21 \times 10^6$
4	10	Atrium	$5,30 \times 10^7$	$5,30 \times 10^6$	$1,21 \times 10^6$
5	10	Atrium	$3,06 \times 10^7$	$3,06 \times 10^6$	$1,21 \times 10^6$
6	11	Atrium	$4,52 \times 10^7$	$4,11 \times 10^6$	$9,00 \times 10^5$

## Appendiks IV

### *Løsninger:*

#### **Transportmedium hjerteceller** (ble laget i sterilt avtrekk)

- 500 ml Leibovitz's L-15 medium (1×)
- 1 ml Heparin LEO 5000 IE/ml → slutt kons. 10 IE/ml
- 1 ml Gentamicin 50 mg/ml eller 5 ml Gentamicin 10 mg/ml → slutt kons. 100 µg/ml

#### **25x Perfusjonsbuffer hjerteceller (Ca- fri buffer)**

- 103,8 g NaCl
- 6,2 g KCl
- 28,7 g HEPES

Løses i ca. 350 ml destillert H<sub>2</sub>O.

Tilsett:

- 75 ml 1 M NaOH
- Destillert H<sub>2</sub>O til totalt 500 ml

Sterilfiltreres gjennom 0,22 µm filter.

Lagres ved – 20 °C.

*Bruksløsning:*

- 4 ml 25x perfusjonsbuffer
- 96 ml destillert H<sub>2</sub>O

#### **Trypsinløsning hjerteceller**

Lager en 1:4 fortykning av 0,25 % Trypsin-EDTA

- 12,5 ml 0,25 % Trypsin-EDTA (1X) → slutt kons. 0,63 mg/ml trypsin og 0,095 mg/ml EDTA
- 37,5 ml PBS- (Dulbecco's phosphate buffered saline uten CaCl<sub>2</sub> og MgCl<sub>2</sub>)

### **Kollagenaseløsning hjerteceller**

Liberase TH eller TM stockløsning 2,5 mg/ml (13 Wünsch units/ml):

- 5 mg Liberase TH eller Liberase TM
- 2 ml H<sub>2</sub>O (sterilt)

Løses på is. Lagres som aliquots ved – 20 °C.

Kollagenase bruksløsning:

- 39,5 ml Leibovitz's L-15 medium (1×) m/ 100 µg/ml Gentamicin
- 0,5 ml Liberase TH eller TM stockløsning 13 Wünsch units/ml → 0,16 Wünsch units/ml
- 190,5 µl 1 M CaCl<sub>2</sub> → slutt kons. 4,76 mM

### **Dyrkningsmedium hjerteceller**

- 500 ml Leibovitz's L-15 medium (1×)
- 1 ml Gentamicin 50 mg/ml eller 5 ml Gentamicin 10 mg/ml → slutt kons. 100 µg/ml
- 10 % FBS (Fetal Bovine Serum)<sup>(\*)</sup>,<sup>(\*\*)</sup>

\*Ved stimulering av hjertecellene med Poly I:C ble FBS redusert til 2 %. Ustimulerte hjerteceller som ble inkludert i de ulike forsøkene fikk også 2 % FBS for å behandle hjertecellene likt.

\*\* Ved 2 timer infisering av hjertecellene med ILAV ble FBS ikke tilsatt til dyrkningsmediet. Fra tidspunkt 0 ble 2 % FBS tilsatt i dyrkningsmediet. Uinfiserte hjerteceller som ble inkludert i forsøket ble behandlet på samme måte.

### **Coating av celledyrkningsbrett (24 brønner) med Laminin:**

Laminin fortynnes 1:50 fra 1 mg/ml til 20 µg/ml i PBS-. Lagres som aliquots ved – 20 °C.

- Vasket brønnene en gang med 1 ml PBS-.
- Tilsatte 250 µl laminin 20 µg/ml (gir 2,5 µg/cm<sup>2</sup>).
- Inkuberte platene i 1,5 time ved 37 °C.
- Vasket brønnene tre ganger med 1 ml PBS-.
- Ferdig coatede plater kan lagres tørt i kjøleskap i ca. 1 måned.
- ↓
- Vasket brønnene en gang med 1 ml PBS- rett før bruk.

## APPENDIKS V

### *Total mengde RNA inn i hver cDNA reaksjon, og videre fortynning av cDNA til qPCR.*

Forsøk		Behandling	Total mengde RNA inn i hver cDNA reaksjon på 20 $\mu$ l	cDNA fortynning*	
<b><i>In vivo</i></b> <b>Organ</b>					
<b>1</b>	Hjerte	Poly I:C	1 $\mu$ g	1:10	
	Hodenyre	Poly I:C	1 $\mu$ g	1:10	
<b><i>In vitro</i></b> <b>Primær cellekultur fra hjerte</b>					
<b>1</b>	Ventrikkel/ atrium	Miks	Poly I:C	400 ng	1:5
<b>2</b>	Atrium	Miks	Poly I:C	400 ng	1:5
<b>3</b>	Atrium	Miks	Poly I:C	400 ng	1:5
<b>4</b>	Atrium	Endotelceller	Poly I:C	250 ng	1:2½
<b>5</b>	Atrium	Myocytter og endotelceller	Poly I:C	250 ng	1:2½
<b>6</b>	Atrium	Myocytter og endotelceller	ILA	250 ng	1:2½

\*cDNA fortynningen vil gi en cDNA konsentrasjon på 5 ng/ $\mu$ l, forutsatt at mengde RNA inn i cDNA reaksjonen er lik mengden cDNA syntetisert.

## Appendiks VI

Avlesning av CPE etter infisering av TO- celler med ILAV (fra supernatant) og beregning

### Endotelceller 0t

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	+	+	-	-	-	-						-	1 Endo 0t
B	+	+	+	-	-	-						-	
C	+	+	-	-	-	-						-	
D	+	+	-	-	-	-						-	
E	+	+	+	-	-	-						-	2 Endo 0t
F	+	+	+	-	-	-						-	
G	+	+	+	-	-	-						-	
H	+	+	+	+	-	-						-	

Rad 3:  $13 \times 10^0 / 0,15 \text{ml} \times 4 \text{brønner} = 2,17 \times 10^2 / \text{ml}$

Rad 4:  $13 \times 10^2 / 0,15 \text{ml} \times 4 \text{brønner} = 2,17 \times 10^3 / \text{ml}$

### Endotelceller 72 timer

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	+	+	+	+	+	-	-					-	1 Endo 72t
B	+	+	+	+	+	-	-					-	
C	+	+	+	+	+	-	-					-	
D	+	+	+	+	+	+	-					-	
E	+	+	+	+	+	-	-					-	2 Endo 72t
F	+	+	+	+	+	-	-					-	
G	+	+	+	+	+	+	-					-	
H	+	+	+	+	+	-	-					-	

Rad 6:  $13 \times 10^4 / 0,15 \text{ml} \times 4 \text{brønner} = 2,17 \times 10^5 / \text{ml}$

Rad 6:  $13 \times 10^4 / 0,15 \text{ml} \times 4 \text{brønner} = 2,17 \times 10^5 / \text{ml}$

### Endotelceller 0t

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	+	+	+	+	+	+	-	-				-	1 Endo 7d
B	+	+	+	+	+	+	-	-				-	
C	+	+	+	+	+	-	-	-				-	
D	+	+	+	+	+	+	-	-				-	
E	+	+	+	+	+	+	+	-				-	2 Endo 7d
F	+	+	+	+	+	+	-	-				-	
G	+	+	+	+	+	+	+	-				-	
H	+	+	+	+	+	+	+	-				-	

Rad 6:  $31 \times 10^4 / 0,15 \text{ml} \times 4 \text{brønner} = 5,17 \times 10^5 / \text{ml}$

Rad 7:  $31 \times 10^5 / 0,15 \text{ml} \times 4 \text{brønner} = 5,17 \times 10^6 / \text{ml}$

### Myocytter 0t

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	+	+	+	+	-							-	1 Myo 0t
B	+	+	+	+	-							-	
C	+	+	+	-	-							-	
D	+	+	+	+	-							-	
E	+	+	+	+	-							-	2 Myo 0t
F	+	+	+	+	-							-	
G	+	+	+	-	-							-	
H	+	+	+	+	-							-	

Rad 4:  $31 \times 10^2 / 0,15 \text{ml} \times 4 \text{brønner} = 5,17 \times 10^3 / \text{ml}$

Rad 4:  $31 \times 10^2 / 0,15 \text{ml} \times 4 \text{brønner} = 5,17 \times 10^3 / \text{ml}$

### Myocytter 72t

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	+	+	+	+	+	+	-					-	2 Myo 72t
B	+	+	+	+	+	+	-					-	
C	+	+	+	+	+	+	-					-	
D	+	+	+	+	+	+	-					-	
E	+	+	+	+	+	+	-					-	3 Myo 72t
F	+	+	+	+	+	+	-					-	
G	+	+	+	+	+	+	-					-	
H	+	+	+	+	+	+	-					-	

Rad 7:  $4 \times 10^5 / 0,15 \text{ml} \times 4 \text{brønner} = 6,67 \times 10^5 / \text{ml}$

Rad 7:  $4 \times 10^5 / 0,15 \text{ml} \times 4 \text{brønner} = 6,67 \times 10^5 / \text{ml}$

### Myocytter 7d

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	+	+	+	+	+	+	-					-	2 Myo 7d
B	+	+	+	+	+	+	-					-	
C	+	+	+	+	+	-	-					-	
D	+	+	+	+	+	+	-					-	
E	+	+	+	+	+	+	-					-	3 Myo 7d
F	+	+	+	+	+	-	-					-	
G	+	+	+	+	+	-	-					-	
H	+	+	+	+	+	+	-					-	

Rad 6:  $31 \times 10^4 / 0,15 \text{ml} \times 4 \text{brønner} = 5,17 \times 10^5 / \text{ml}$

Rad 6:  $22 \times 10^4 / 0,15 \text{ml} \times 4 \text{brønner} = 3,67 \times 10^5 / \text{ml}$

## Appendiks VII – løsninger til *in situ* hybridisering

### **10 x PBS løsning (0,2 M fosfatbuffer, 1,5 M NaCl, pH 7,3)**

- 27,38 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$  ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12 \text{H}_2\text{O} \rightarrow 55,09 \text{ g}$ )
- 7,18 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$
- 88 g NaCl
- 1000  $\mu\text{l}$  DEPC
- pH ble justert til 7,3. Volum ble justert til 1 liter med destillert vann. DEPC ble til slutt tilsatt i avtrekk og løsningen stod til røring over natt og ble så autoklavert.

### **3 % Triton**

- 300  $\mu\text{l}$  Triton x -100 ble løst i 10 ml DEPC-PBS. En 1:10 fortynning av 10 x PBS

### **1 % $\text{H}_2\text{O}_2$**

- 4,5 ml 30%  $\text{H}_2\text{O}_2$  ble løst i 145,5 ml metanol

### **4 % paraformaldehyd fosfat-buffer, pH 7,2-7,4**

- 4,53g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$  Boks 75 (Fluka, Lind)
- 7,52g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$  Boks 628 (Sigma-Aldrich)
- pH ble justert til 7,3 og løsningen ble varmet til  $80^\circ\text{C}$  og tilsatt 40 g paraformaldehyd i avtrekk. Volumet ble justert til 1 liter med destillert vann.

### **100 x denhardt`s løsning (I fryser)**

- 10 g ficoll 400
- 10 g 0,02% BSA (el 2% W/V)
- 10 g polyvinylpyrrolidone
- Volum ble justert til 500 ml med DEPC-vann

**50 % Dextran sulfate** – må løses. (hybridisering øker 10 fold ifølge Merck Millipone)

### **Hybridiseringsløsning (200 ) ca. 13 snitt/10-15 $\mu\text{l}$ pr. snitt**

- 20 100 Denhardt`s løsning
- 20  $\mu\text{l}$  20 x SSC
- 10  $\mu\text{l}$  (50  $\mu\text{g}$ ) calf Thymus DNA
- 40  $\mu\text{l}$  50% Dextrane sulfate
- 30  $\mu\text{l}$  DEPC-vann
- 80  $\mu\text{l}$  formamide (ble tilslutt tilsatt i avtrekk)

### **20 x SSC, pH 7,5 – laget 500 ml i stedet**

- 17,5 g NaCl (3M)
- 8,8 g  $\text{Na}_3\text{citrat} \times \text{H}_2\text{O}$  (0,3M)



- pH ble justert til 7,0 og volum ble justert til 100 ml med destillert vann. 100 DEPC ble tilsatt i avtrekk, løsningen stod til røring over natt og ble så autoklavert.

***1M Tris-HCl, pH 7,5***

- 121 g Tris-base
- pH ble justert til 7,5 med konsentrert HCl (mye behøves!) og volumet ble justert til 1 liter med destillert vann