

## **Interferon som adjuvant i DNA-vaksine mot ILA-virus hos atlantisk laks (*Salmo salar* L.)**

*- Kinetikk i antistoffrespons, effekt på drap av celler som uttrykker antigen og effekt på vekst*

**Lisa Bratland**

*Masteroppgave i Fiskehelse [BIO-3955] 60stp*



# Forord

---

*Denne masteroppgaven i fiskehelse ble utført ved fakultet for biovitenskap, fiskeri og økonomi (BFE), ved Norges fiskerihøgskole, Universitetet i Tromsø fra januar 2014 til mai 2015.*

*I forbindelse med arbeidet til denne oppgave vil jeg spesielt takke min hovedveileder professor Børre Robertsen for svært god veiledning. Han har vært til stor støtte i denne prosessen og bidratt med mange gode råd og innspill fra start til slutt. Videre vil jeg gi en stor takk til min biveileder og doktorgradsstudent Sami (Chia Chung Chang) for god opplæring både på lab og ute på havbruksstasjonen i Kårvika. I tillegg vil jeg takke han for alle de nyttige svarene på mine utallige spørsmål.*

*Vil også rette en takk til resten av Team Robertsen. Takk til Linn- Greiner Tollersrud for gode instruksjoner til å kjøre RT-qPCR. Takk til Baojian Sun for all småhjelp i forbindelse med ulike labprosedyrer. Jeg vil også takke professor Malcolm Jobling for all hjelp i forhold til å analysere vekstresultater. Takk til alle ved landanlegget i Kårvika som hjalp til med merking av fisk og som gjorde forsøk på fisk enkelt, vil spesielt der takke Jan-Eirik Jensen.*

*Tusen takk til alle på fiskehelsekontoret for kakefredag og artige påfunn. Dagene hadde ikke vært det samme uten dere!*

*Til slutt må jeg takke mine nærmeste Randi, Aina, Martha, Ole og lille Lyra. Hadde aldri kommet i mål uten dere, spesielt med tanke på at vi har mistet en viktig person. Det har vært tungt, men hører livet til. Jeg ser nå fram til å jobbe som fiskehelsebiolog og gleder meg til å ta fatt på nye utfordringer.*

*Tromsø 22.mai 2015*

*Lisa Bratland*

# Sammendrag

---

Virussykdommer forårsaker i dag de største tapene i norsk lakseoppdrett og dagens tilgjengelige virusvaksiner er ikke effektive nok til å bekjempe virussykdommene. Den mest effektive virusvaksinen mot virussykdom hos laks i dag er DNA-vaksine mot rhabdoviruset infeksjøs hematopoetisk nekrose virus (IHNV), men det viruset finnes ikke i europeisk lakseoppdrett. Robertsen's forskningsgruppe jobber med å bruke interferoner (IFN) som adjuvant i DNA-vaksiner mot virussykdommer. De har funnet ut at injeksjon av plasmid som inneholder IFN-gen sammen med plasmid som inneholder hemagglutininesterasegenet (HE) fra infeksjøs lakseanemivirus (ILAV) gir god beskyttelse mot ILAV-infeksjoner hos laks. IFN virker dermed som adjuvant i vaksinen. I dette mastergradsprosjektet skulle adjuvanteffekten av IFNa- plasmid (pIFNa) og IFNc-plasmid (pIFNc) studeres over et lengre tidsrom, opp til 22 uker. Effekten av pIFNa og pIFNc på antistoffresponser ble sammenlignet. Effekten av pIFNc alene eller sammen med pHE på systemisk induksjon av Mx-protein ble målt. Det ble gjort forsøk på å måle om cytotoksiske celler kunne drepe muskelceller som uttrykker HE og det ble målt om vaksinerings av IFN-plasmid alene eller sammen med HE-plasmid hadde hemmende effekt på vekst.

Presmolt ble injisert intramuskulært (i.m.) med pcDNA3.3- plasmid som inneholder gener av enten IFNa fra laks (pIFNa), HE fra ILAV4 (pHE), IFNc fra laks (pIFNc), pIFNa + pHE eller pIFNc + pHE. pcDNA3.3 uten innsatt gen ble brukt som kontrollplasmid. Henholdsvis 7, 10, 16 og 22 uker etter vaksinerings ble det tatt blodprøver for antistoffmåling med ELISA og høstet leverprøver for måling av det antivirale Mx-proteinet med Western blotting. Effekt av cytotoksiske T-celler eller NK-celler ble forsøkt målt hos vaksinert fisk ved å reinjisere HE-plasmid i.m. og 7 dager senere ble muskelprøver høstet fra reinjeksjonsstedet for måling av genuttrykk av HE, CD8 og NK-cellemarkører med RT-qPCR. Ideen var at HE-ekspressjonen ville gå ned hos fisk vaksinert med HE+IFN sammenlignet med fisk injisert med kontrollplasmid. Fisken ble veid 0, 16 og 22 uker etter vaksinerings for å sjekke effekten av vaksinene på vekst.

Resultatene viste en økt antistoffrespons hos fisk vaksinert med pIFNc sammen med pHE 22 uker etter vaksinering. Det var også en overraskende forskjell i kinetikk mellom fisk vaksinert med pIFNc sammen med pHE og pIFNa sammen med pHE. Mx-protein ble detektert i leveren hos fisk vaksinert med pIFNc helt fram til 22 uker etter vaksinasjonen som indikerte at IFNc har en langtidseffekt. Fisk vaksinert med pIFNc sammen med HE hadde en reduksjon i Mx-protein 16 uker etter vaksinering som tydet på at HE er sett på som et fremmed antigen i fisken og at adaptive immunmekanismer deltar i tilintetgjørelsen av transfekterte muskelceller som uttrykker HE. Reinjeksjonen av HE var ikke en god nok modell for å analysere om CTL er involvert i beskyttelsen som pIFNc sammen med pHE gir mot ILAV. Imidlertid, reinjeksjon av pHE viste overraskende nok at IFNc aktiverte immunmekanismer som resulterte i en reduksjon i HE-transkripter. Totalt sett, ble det gjort flere nye oppdagelser om effekten av IFN som adjuvant i DNA-vaksine mot ILAV og dette kan forhåpentlig bidra til å oppnå bedre DNA-vaksiner til fisk.

# Innholdsfortegnelse

<b>FORORD</b> .....	<b>II</b>
<b>SAMMENDRAG</b> .....	<b>III</b>
<b>1. INNLEDNING</b> .....	<b>1</b>
1.1 SITUASJONEN OM VIRUSSYKDOMMER I NORSK LAKSEOPPDRETT .....	1
1.2 UTVIKLINGEN AV VIRUSSYKDOMMER I NORSK LAKSEOPPDRETT FRA 2009-2014.....	1
1.3 DNA-VAKSINER .....	4
1.4 ADJUVANTER I VAKSINER TIL FISK.....	5
1.5 ROLLEN TIL INTERFERONER I DET MEDFØDTE FORSVARET MOT VIRUS HOS LAKS.....	6
1.6 MX-PROTEINET .....	8
1.7 NATURLIGE DREPERCELLER HOS FISK .....	8
1.8 DET ADAPTIVE IMMUNSYSTEMET HOS LAKS.....	10
1.9 ANTISTOFFER HOS FISK .....	11
1.10 T-CELLER HOS FISK.....	13
1.11 HYPOTESER/PROBLEMSTILLINGER .....	15
<b>2. MATERIALER OG METODER</b> .....	<b>17</b>
2.1 FORSØKSFISK.....	17
2.2 PLASMIDER SOM BLE BRUKT TIL INTRAMUSKULÆRE INJEKSJONER .....	17
2.3 INJISERING AV PRESMOLT MED PLASMIDER.....	18
2.4 ELISA .....	19
2.4.1 Adsorpsjon av antigen til ELISA plater (coating) .....	20
2.4.2 Tilsetning av serum (primært antistoff) .....	20
2.4.3 Tilsetning av sekundære og tertiære antistoff.....	20
2.4.4 Tilsetning av TMB-susbrat og avlesning av fargeintensitet.....	21
2.5 WESTERN BLOTTING.....	21
2.5.1 Ekstraksjon og måling av leverproteiner fra fisk.....	22
2.5.2 Gelelektroforese .....	23
2.5.3 Blotting .....	23
2.5.4 Blokking.....	23
2.5.5 Merking ved bruk av primære antistoffer fra kanin spesifikk for Mx og actin. ....	24
2.5.6 Inkubering med sekundære antistoffer spesifikk for primære antistoffer fra kanin.....	24
2.5.7 Bildefremkalling .....	24
2.6 REINJISERING AV DNA PLASMIDER.....	25
2.7 KVANTITATIV RT- PCR.....	25
2.7.1 Ekstraksjon av RNA fra muskelprøver .....	26
2.7.2 Fjerning av genomisk DNA.....	27
2.7.3 cDNA-syntese.....	27
2.7.4 RT-qPCR måling.....	28
2.7.5 Bearbeiding av data.....	30
<b>3. RESULTATER</b> .....	<b>31</b>
3.1 ANTISTOFFRESPONSEN HOS LAKS MOT ILAV 7 TIL 22 UKER ETTER INJEKSJON AV HE-PLASMID SAMMEN MED IFN-PLASMID .....	31

3.2	EFFEKT AV HE-PLASMID SAMMEN MED IFN-PLASMID PÅ PRODUKSJONEN AV Mx I LEVER FRA LAKS 7 TIL 22 UKER ETTER IMMUNISERING .....	33
3.3	FORSØK PÅ Å TESTE OM CTL DREPER MUSKELCELLER SOM UTTRYKKER HE I VAKSINERT FISK .....	35
3.4	SKYLDES NEDGANG AV HE-TRANSKRIPT I MUSKEL HOS FISK VAKSINERT MED pIFNC ANGREP PÅ NATURLIGE DREPERCELLER (NK-CELLER)? .....	37
3.5	EFFEKT AV VAKSINERING MED PLASMIDER PÅ VEKTEN AV FISKEN.....	38
<b>4.</b>	<b>DISKUSJON.....</b>	<b>41</b>
4.1	ADJUVANT EFFEKTEEN AV IFN-PLASMIDENE PÅ ANTISTOFFPRODUKSJONEN MOT ILAV. ....	41
4.2	IFNC- PLASMID GIR VEDVARENDE UTTRYKK AV Mx I MINST 22 UKER ETTER VAKSINERING.....	42
4.3	IFNC PLASMID SAMMEN MED HE-PLASMID GIR REDUSERT UTTRYKK AV Mx-PROTEIN 16 UKER ETTER VAKSINERING.....	43
4.4	REINJEKSJONSSTUDIET AV HE-FORSØK PÅ Å PÅVISE CTL AKTIVITET I DNA-VAKSINERT FISK.....	45
4.5	IFNC PLASMID GIR REDUSERT VEKST AV FISK FRA 16 TIL 22 UKER.....	46
4.6	FRAMTIDSUTSIKTER VED BRUK AV IFNs SAMMEN MED ET ANTIGEN I EN DNA-VAKSINE.....	48
4.7	KONKLUSJON .....	50
<b>5.</b>	<b>REFERANSELISTE.....</b>	<b>51</b>
<b>APPENDIKS I</b>	<b>.....</b>	<b>57</b>
REAGENSER	.....	57
<b>APPENDIKS II</b>	<b>.....</b>	<b>59</b>
OPPFORMERING AV PLASMIDER (STARTFASEN)	.....	59
RENSING AV PLASMIDER	.....	59
<b>APPENDIKS III</b>	<b>.....</b>	<b>61</b>
LØSNINGER TIL ELISA	.....	61
<b>APPENDIKS IV</b>	<b>.....</b>	<b>62</b>
LØSNINGER TIL WESTERN BLOTTING	.....	62
<b>APPENDIKS V</b>	<b>.....</b>	<b>64</b>
LØSNINGER TIL RT-QPCR	.....	64

# 1. Innledning

---

## 1.1 Situasjonen om virussykdommer i norsk lakseoppdrett

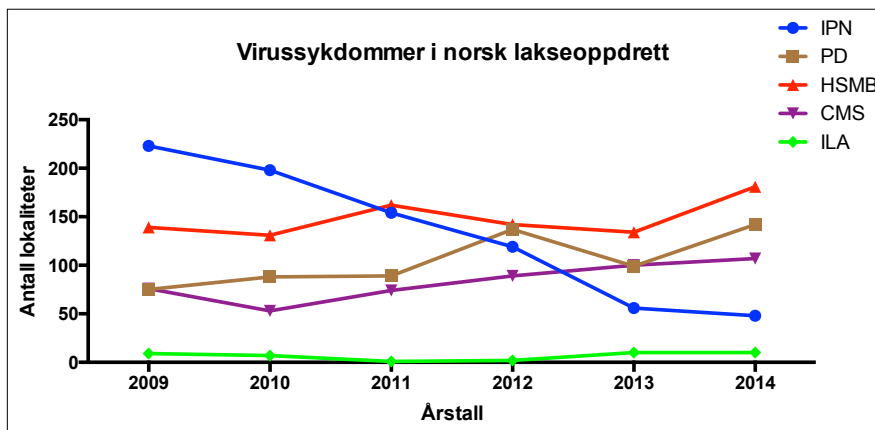
Virussykdommer forårsaker i dag de største tapene i norsk lakseoppdrett i form av økt dødelighet og store lidelser i infisert atlantisk laks (*Salmo salar L.*) (Bornø og Linaker, 2015). De videre fiskevelferdsmessige og økonomiske konsekvensene av dette er betydelige (Jansen et al., 2015). I en landsomfattende undersøkelse av matfiskgenerasjoner høst 2010, vår 2011 og høst 2011 ble det registrerte et samlet svinn på 16,3 % for laks i oppdrett ved undersøkelse av 288 lokaliteter. Omtrent 80 % av all sjøsatt fisk var inkludert i undersøkelsen. En av de mest betydningsfulle årsakene til svinn var infeksjoner som skyldtes virussykdommer (Bleie og Skrudland, 2014). Det beste kontrolltiltaket mot virussykdommer i lakseoppdrett er vaksiner (Evensen og Leong, 2013). De fleste virusvaksinene som er kommersielt tilgjengelig i Norge i dag er basert på inaktiverte virus og har begrenset effekt sammenlignet med beskyttelsen som oppnås med vaksiner mot bakterieinfeksjoner som for eksempel furunkulose. Behovet for bedre virusvaksiner i norsk lakseoppdrett er stort. De mest effektive virusvaksinene hos fisk i dag er DNA-vaksiner mot rhabdovirus, men slike vaksiner er ikke tillatt brukt i Norge (Evensen og Leong, 2013). Robertsens forskningsgruppe jobber med interferoner fra atlantisk laks og har vist at DNA-vaksine med plasmid som uttrykker interferoner har en god evne til å beskytte laks mot virussykdommer. Interferoner er et alarmprotein som produseres av celler hos virveldyr når de blir infisert av et virus. Utskilte interferoner vil sirkulere i kroppen og beskytter uinfiserte celler mot videre virusinfeksjon (Robertsen, 2006). Denne oppgaven handler om effekten av interferoner sammen med et virusantigen i en DNA-vaksine hos laks.

## 1.2 Virussykdommer i norsk lakseoppdrett fra 2009-2014

I 2014 ble det produsert (slaktetall) 1 198 900 tonn atlantisk laks i Norge (Bornø og Linaker, 2015) som er en produksjonsøkning på ca. 40 % fra 2009 da det ble produsert 856 000 tonn oppdrettslaks (Hjeltnes, 2010). Økningen i produksjonsvekst i oppdrett medfører et økt behov for effektive kontrolltiltak mot virussykdommer (Evensen og Leong, 2013).



Årsaken til at utbrudd av virussykdommer vist i Fig 1. har holdt seg relativt jevnt siden 2009 skyldes blant annet utvikling av strenge og til dels dyre offentlige tiltak fra myndighetene som listeføring av sykdommer, der tiltak som øyeblikkelig brakklegging, slakting og sanering av oppdrettslokalitete er noen av virkemidlene mot enkelte alvorlige virussykdommer. I tillegg er inndeling av Norge i soner og krav til flytting av fisk fra utsatte sykdomssoner blitt etablert. Norge har en unik oversikt over fiskehelsesituasjonen i forhold til resten av verden, og dette har vært viktig for å ha muligheten til å se utviklingstrekk og foreta prioriteringer (Bornø og Linaker, 2015). De alvorligste virussykdommene i norsk lakseoppdrett er i dag infeksiøs pankrease nekrose (IPN), pankreassykdom (PD), hjerte skjellettmuskelbetennelse (HSMB), kardiomyopatisyndrom (CMS) og infeksiøs lakseanemi (ILA). I Fig. 1 er det vist utviklingen av påviste virussykdommer ved antall oppdrettslokaliteter fra 2009- 2014 (Bornø og Linaker, 2015).



Figur 1: Antall lokaliteter med påvist virussykdommer fra 2009- 2014. Tallene er hentet fra fiskehelsereporten 2014 (Bornø og Linaker, 2015).

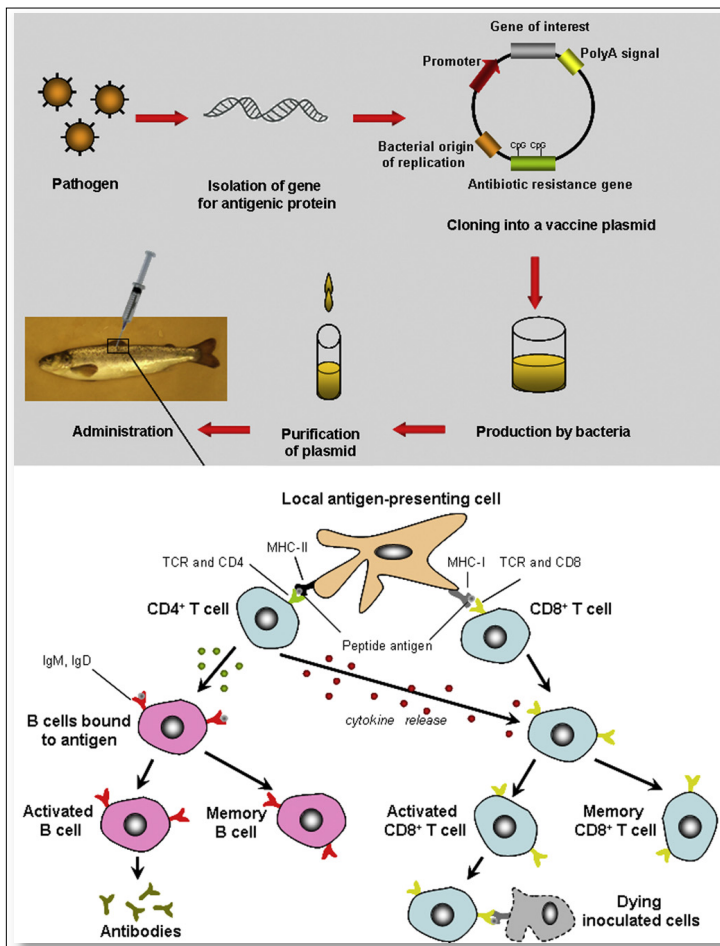
IPN er forårsaket av infeksiøs pankreas nekrosevirus (IPNV), tilhører familien *Birnaviridae* og har et genom som består av to dobbeltrådige RNA-molekyler. IPN gir nekroser i eksokrin pankreas, lever og tarm som kan medføre at fisk slutter å vokse og blir kronisk avmargret (Roberts og Pearson, 2005). IPN var først observert som en dødelig sykdom i klekkeri av laksefiskyngel, men senere har det blitt påvist IPN i større laksefisk spesielt i forbindelsen med smoltifisering og overføring til sjøvann (Mikalsen et al., 2004). IPN ble påvist på 48 lokaliteter for laksefisk i 2014. Antallet utbrudd av IPN de siste årene viser en betydelig nedgang fra 2009 da utbrudd ble registrert på 223 lokaliteter. Mye tyder på at denne nedgang i IPN-utbrudd skyldes utsett av fisk med økt resistens mot IPN (QTL-fisk) sammen med økt innsats for å sanere husstammer av IPN-virus i settefiskanleggene (Bornø og Linaker, 2015).

PD er forårsaket av salmonid alfavirus (SAV) som er et enkeltrådig RNA virus og tilhører familien *Totiviridae* (Karlsen et al., 2012). PD har seks kjente subtyper SAV 1-6 (Jansen et al., 2015) og skader hovedsakelig pankreas (bukspyttkjertelen), hjertet og skjelettmuskulaturen hos fisk. Skadene på pankreas gjør at fisk får redusert evne til å ta opp næringsstoffer fra fôr, og dette medfører at konsekvensene av PD kan vare lenge etter at PD-utbrudd er avsluttet (Larsson et al., 2012). Spredning av PD er i dag ansett som den største utfordringen i fiskehelse (Gjein, 2015). I Norge forårsaker SAV3 utbrudd av PD sør for Hustadvika, mens SAV 2 forårsaker utbrudd av PD nord for Hustadvika til grensen mot Nord-Trøndelag (Jansen et al., 2015). Forekomsten av PD har økt fra 99 utbrudd i 2013 til 142 utbrudd i 2014 (Bornø og Linaker, 2015). Tap assosiert med PD-utbrudd for en standard oppdrettslokalitet med 500.000 smolt er estimert til å være på ca. 14,4 mill norske kroner (Aunsmo et al., 2010). HSMB ble i 2010 vist å være forårsaket av piscine reovirus (PRV) som er et nakent dobbeltrådig RNA virus (Kistoffersen et al., 2013). HSMB rammer primært hjertet hos laks og gir betydelige sirkulasjonsforstyrrelser hos fisken. Ved kliniske utbrudd har fisken ofte betennelser i skjelettmuskulaturen (Bornø og Linaker, 2015). HSMB er ofte rapportert å gi økende dødelighet i forbindelse med sortering, flytting eller andre driftstiltak som kan ha stresset fisken. I 2014 ble det påvist HSMB på 181 lokaliteter. Dette er det høyeste antall utbrudd som er registrert sammenlignet med tidligere år (Bornø og Linaker, 2015).

CMS, også kalt hjertesprekk, er vist å være forårsaket av piscine myocarditt virus (PMCV) som er et dobbeltrådig RNA virus og tilhører familien *Totiviridae* (Rodger et al., 2013). CMS er en alvorlig hjertelidelse og gir sykdom hovedsakelig til oppdrettslaks 14 til 18 måneder etter overføring til sjøen og i nærheten av tidspunktet for slakting. Fisk som lider av CMS kan dø plutselig uten noen kliniske tegn på sykdom (Haugland et al., 2011). CMS ble påvist på 107 lokaliteter i 2014 og dette er det fjerde året på rad at antallet påviste utbrudd øker (Bornø og Linaker, 2015). ILA er forårsaket av infeksiøs lakseanemivirus (ILAV) som tilhører familien *Orthomyxoviridae* og er et enkeltrådig RNA virus. ILA utvikler seg langsomt og resultere i anemi og sirkulatoriske forstyrrelser som kan gi høy dødelighet. ILA er en svært alvorlig sykdom i dag og i løpet av de siste 20 årene har det vært grupper av ILA-utbrudd. De økonomiske effektene av ILA er ikke kun relatert til direkte tap av fisk, men mer de forvaltningsmessige kostnadene for å kontrollere sykdommen. Laks med påvist ILA må slaktes og anlegget må saneres og brakklegges i lang tid før utsett av ny fisk (Aamelfot et al., 2014). ILA hadde utbrudd på 10 lokaliteter i 2014, og det er like mange som i 2013 (Bornø og Linaker, 2015).

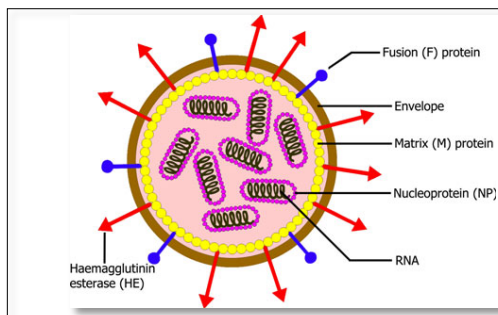
### 1.3 DNA-vaksiner

DNA-vaksiner er plasmider som inneholder genet for virusets overflateprotein styrt av en eukaryot promotersekvens. Plasmidene injiseres intramuskulært (i.m.) noe som resulterer i uttrykk av virusprotein i muskelvevet til den vaksinerte fisken. Dette setter i gang adaptive immunresponser som resulterer i dannelsen av antistoffer og cytotoxiske T-celler mot viruset. DNA-vaksiner mot infeksiøs hematopoietisk nekrose virus (IHNV) har blitt brukt i Canada siden 2005 og så langt er det ikke blitt rapportert utbrudd av IHN i vaksinerte populasjoner (Evensen og Leong, 2013). Også DNA-vaksiner mot viral hemoragisk septikemi virus (VHSV) har vist god beskyttelse mot VHS-infeksjoner (Evensen og Leong, 2013).



**Figur 2:** Et generelt og forenklet bilde av adaptive immunresponser etter intramuskulær (i.m) injeksjon av DNA-vaksiner hos fisk. Muskelceller kan ta opp DNA-vaksiner og videre enten fullstendig nedbryte de eller presentere de på utsiden av cellen. Den transfekterte muskelcellen produserer og frigjør antigenet som plasmidet uttrykker. Disse antigenene vil kunne bli tatt opp av antigenpresenterende celler (APC). APC presentere antigenpeptider på MHC klasse I og II til CD8+ og CD4+ T-celler. Aktivering av CD4+ celler vil medføre cellulære og humorale adaptive immunresponser som aktivering av B-celler til å produsere antistoffer spesifikt mot den antigenet som ble presentert. Aktivering av CD8+ vil medføre en cytotoxisk T-cellerespons (CTL) som eliminerer virusinfiserte celler (Tonheim et al., 2008).

Robertsen's forskningsgruppe har nylig vist at type 1 interferoner fra laks har store evner til å forsterke den beskyttende effekten av DNA-vaksine mot ILA-virus og dermed virker som en adjuvant i vaksinen (Chang et al., 2015). Interferoner (IFN) ble tilført fisken i form av gen i plasmid og ble injisert intramuskulært (i.m.) sammen med plasmid som inneholdt gener for hemagglutininesterase (HE) som er overflateproteinene fra ILAV. IFN-plasmid hadde også evnen til å forsterke antistoffresponsen hos ILAV ved DNA vaksinerings med HE-plasmid (Chang et al., 2015).



**Figur 3: Skjematiske struktur av Infeksiøs lakseanemi virus (ILAV).** ILAV er kappekledd partikkel med en diameter på 100-120 nm. Arvematerialet til ILAV består av åtte enkeltrådede RNA segmenter som koder for ti proteiner, der ni av proteinene er kjent for å utgjøre en del av viruspartiklet. De røde pilene i Fig. representerer hemagglutinin esterase (HE). HE-protein er ansvarlig for bindingen som virus gjør til reseptorer på celleoverflaten til vertsceller og er antatt for å være viktig for virulensenevnen til viruset. ILA-virus som er festet til en vertscelle vil videre gå inn i målcellen ved reseptormediert endocytose til endosomer, der en senkning i pH utløser fusjon av viruset til endosomale membraner (Aamelfot et al., 2014).

#### 1.4 Adjuvanter i vaksiner til fisk

En adjuvant er et stoff brukt til å forsterke immunresponser. Ordet adjuvant stammer fra det latinske ordet: adjuve, som betyr ”å hjelpe.” Adjuvanter er vanligvis blandet og injisert med antigenpreparater som virker for å øke en spesifikk immunaktivitet (Anderson, 1992). I forskrift om drift av akvakulturanlegg (FOR-2008-06-17-822) § 63 ved vaksinerings står det at all settefisk av arten *Salmo salar* skal som minimum vaksineres mot bakteriesykdommene furunkulose, vibriose og kaldtvannsvibriose. På bakgrunn av dette er alle atlantisk laks i norsk oppdrett injisert intraperitoneal (i.p.) på presmolt stadiet med vaksiner som inneholder antigen i en oljeadjuvant. Disse vaksinene forhindrer dyre tilfeller av utbrudd med infeksjøs bakteriesykdommer i oppdrett, som for eksempel furunkulose (Fraser et al., 2015).

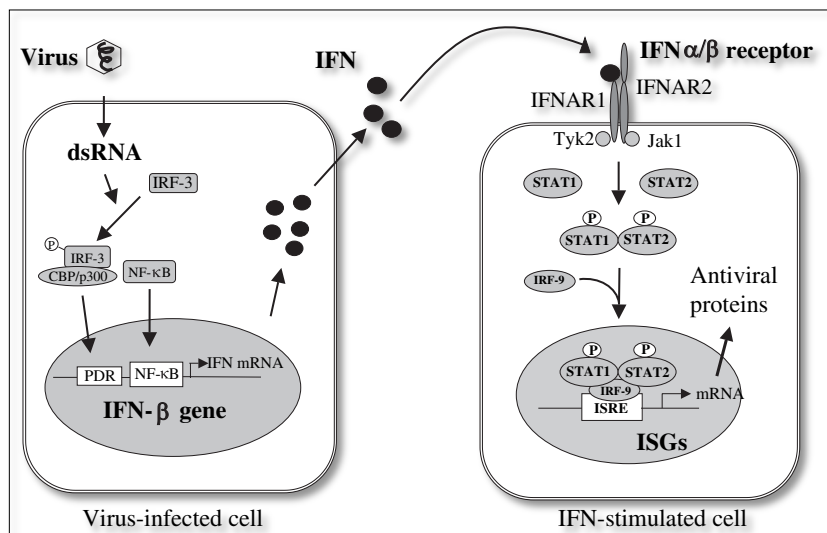
Oljeadjuvanter har en viktig rolle i fiskevaksiner ved å lage et depo (lagerrom) for antigen ved injeksjonsstedet som resulterer i en langsom frigjøring av antigener, i tillegg til at det hjelper til ved presentering av antigener til immunceller og tiltrekning av immunceller til injeksjonsstedet (Evensen et al., 2005). I tillegg bidrar oljeadjuvantene til at man slipper å vaksinere på nytt. Imidlertid, bruk av oljeadjuvanter har også vist å gi bieffekter som betennelser, dannelsen av granulomer, melanin-pigmentering hovedsakelig ved injeksjonsstedet (Mutoloki et al., 2004), men kan også påvirke andre organer og vev. Oljeadjuvantene har også blitt rapportert å gi bieffekter som redusert vekst (Midtlyng og Lillehaug, 1998), dannelser av sår fra injeksjonsstedet som kan være helt til fram til slaktestørrelse. Dette kan ved noen tilfeller resultere i nedgradering av fisk ved slakting eller etter prosessering (Midtlyng et al., 1996).

### **1.5 Rollen til interferoner i det medfødte forsvaret mot virus hos laks**

IFNs er utskilt proteiner (cytokiner) som induserer en antiviral tilstand i celler og har en viktig rolle i førstelinje- forsvaret mot virusinfeksjoner hos vertebrater (Robertsen, 2006). Hos pattedyr er det påvist tre typer IFN: type I IFN, type II IFN og type III IFN (Zhou et al., 2007), mens i beinfisk er det blitt identifisert to typer, type I IFN og type II IFN (Zou og Secombes, 2011). Type I IFN hos pattedyr har strukturelle og funksjonelle likhetstrekk med type I IFN hos fisk. Den primære rollen til type I IFN i pattedyr er å begrense spredning av virus de første dagene etter en virusinfeksjon, før en sterk adaptivt immunrespons mot infeksjonen kan overta.

Type II IFN har noen av de samme antivirale egenskapene til type I IFN, men den dominerende rollen virker å være stimulering av det adaptive immunsystemet, hovedsakelig aktivisering av T-celler (Zhou et al., 2007). Type I IFN og type II IFN kan skilles fra hverandre basert på gen-sekvenser, proteinstruktur og funksjonelle egenskaper (Robertsen, 2006). Type I IFN inkluderer IFN- $\alpha/\beta$  i pattedyr og induseres av virusinfeksjon i de fleste celler. Type II IFN er identisk til IFN- $\gamma$  og er produsert av naturlige dreperceller (NK-celler) og T-lymfocytter som en respons på interleukin-12 (IL-12), IL-18, mitogener (triggerer mitose) eller antigener (Robertsen, 2006). IFN- $\alpha/\beta$  gir en antiviral effekt gjennom en to-trinns signalvei som vist i Fig.4. I det første trinnet vil IFN- $\alpha/\beta$  gener bli induert raskt etter at vertscellen har gjenkjent virus-RNA. Deretter vil IFN bli utskilt fra den virusinfiserte cellen og transportert gjennom blodstrømmen for å varsle andre celler.

I det andre trinnet vil IFN- $\alpha/\beta$  binde seg til IFN- $\alpha/\beta$  -reseptoren som alle celler med en kjerne har. Denne bindingen utløser en signaloverføring gjennom JAKSTAT-veien som fører til transkripsjonen av flere hundre gener, der noen koder for antivirale proteiner som for eksempel Mx-protein (se Fig.4 ) (Robertsen, 2006). Av type I IFN hos laks er det blitt karakterisert fire forskjellige undertyper, IFN $\alpha$ , IFN $\beta$ , IFN $\gamma$  og IFN $\delta$  (Sun et al., 2009; Svingerud et al., 2012).



**Figur 4:** Skjematiske illustrasjoner av to-trinns signalveiene hos type I IFNs fremvist ved IFN- $\beta$ . Virusinfiserte celler gjenkjenner dobbelt trådig RNA og det resulterer i aktivering av transkripsjonsfaktorer IRF-3 og NF $\kappa$ B, som går inn til kjernen og fester seg til spesifikke steder i IFN- $\beta$  promotoren. IRF-3 reagerer med transkripsjon co-aktivator CBP/p300 og aktiverer transkripsjonen av IFN- $\beta$  gen. IFN- $\beta$  sekreseres og binder seg til IFN  $\alpha/\beta$ -reseptorer som er tilstede på de fleste celler i kroppen. Bindingen aktiverer TYK2 og JAK1 kinase som fosforylerer transkripsjonsfaktor STAT1 og STAT2. De aktiverte STATs går inn til cellekjernen og assosierer seg med IRF-9 og fester seg til interferon-stimulerende respons elementer (ISRE) i promotoren hos interferonstimulerende gener (ISGs). Til slutt vil transkripsjonen av ISGs bli induisert og føre til produksjonen av intracellulære antivirale proteiner som Mx-protein, PKR og OAS (Robertsen, 2006).

Interferoner i pattedyr er vist å aktivere makrofager, naturlige dreperceller, dendritiske celler, B-celler, CD8<sup>+</sup> T-celler og CD4<sup>+</sup> T-hjelperceller som en respons på virusinfeksjon (Wang og Fish, 2012). I forsøket av Chang et al. (2015) ble det vist ved RT-qPCR en signifikant økning av IgM, IgT og CD8a i injeksjonsstedet hos laks 7 dager etter injisering av pIFN $\gamma$  sammenlignet med pcDNA 3.3 som tyder på at IFN $\gamma$  gir en økning i tilstrømming av B celler og CTL-celler. I tillegg ble det vist økt uttrykk av perforin 1-2, granzym A, MHC klasse I som støtter at CD8<sup>+</sup> celler er cytotoksiske celler. Derimot, IFN $\gamma$  virket ikke å aktivere dendritiske celler siden det ikke var en økning i transkripsjon av CD83, CD86 og MHC klasse II. (Chang et al., 2015).

## 1.6 Mx-proteinet

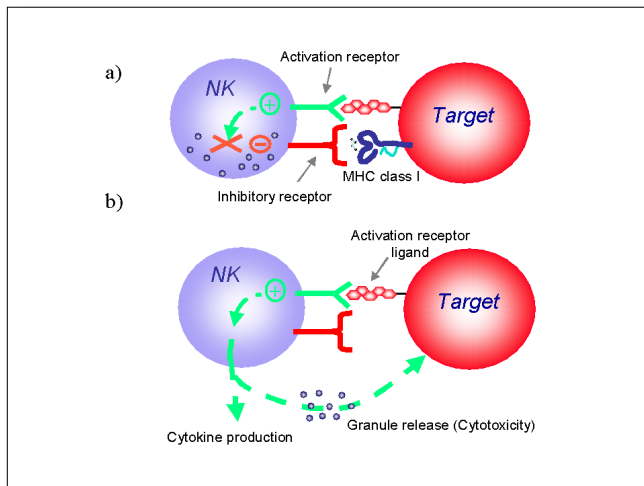
Mx er et antiviralt protein som er induisert av type I IFN. Mx ble først oppdaget som et protein som ga beskyttelse mot influensaviruset som er et myxoviridae (Haller et al., 1979). Mx-proteinet er en guanosine triphosphate-aser (GTPaser) og karakterisert av en stor molekylvekt på 76 kDa (Nygaard et al., 2000). I mus gir defekter i Mx 1-genet fullstendig tap av medfødt immunitet mot influensavirus noe som fører til overveldende infeksjon og rask død (Haller et al., 1998). I mennesker har MxA vist å ha antiviral effekt mot en rekke RNA-virus. Mx akkumulerer i cytoplasma til IFN-behandlede celler. Dette hemmer transporten av nukleokapsidprotein hos Thogotovirus inn i cellekjernen og hemmer dermed virusreplikasjonen. Thogotovirus er enkelttrådet RNA-virus som tilhører familien *Orthomyxoviridae* (Haller et al 2007), i samme familie er ILA-virus. Mx-protein hos laks er også vist å hemme replikasjonen av IPN-virus (Larsen et al., 2004). Hos atlantisk laks er tre Mx-gener blitt identifisert, henholdsvis Mx1, Mx2 og Mx3 (Robertsen et al., 1997). I mennesker har uttrykket av Mx-protein vært brukt som en spesifikk molekylær markør for IFN- $\alpha/\beta$ -produksjon. Flere ulike immunologiske assay har vært utviklet for å måle nivået av Mx-protein i blod eller perifert blod med mononukleære celler. Det at Mx er stabilt, spesifikt, raskt aktivert og dannes i høye konsentrasjoner i cellene etter induksjon fra IFN- $\alpha/\beta$  gjør at Mx er en nyttig markør for type I IFN hos fisk (Jensen et al., 2002).

## 1.7 Naturlige dreperceller hos fisk

Hos beinfisk er det blitt identifisert nonspesifiserte cytotoxic cells (NCC) som er antatt for å være den evolusjonære forløperen av NK-celler i pattedyr (Greenlee et al., 1991). NCC er små agranulære lymfocytter som uttrykker en ny type III membranprotein kalt NCC reseptorprotein (NCCRP) og som spontant uten noen forutgående aktivering dreper ulike fremmede mikrober (som også er tradisjonelle mål for NK-celler hos pattedyr) (Nakanishi et al., 2011). NCCRP er ansvarlig for gjenkjennelsen av målceller. En av konsekvensene ved binding av NCCRP til målantigenet er utløsning av drepersignaler som gir en cytotoxisk respons (Jaso- Friedmann et al., 2001). NCC er ansett for å være de viktigste cytotoxiske cellene i det medfødte immunsystemet hos mallefisk og en rekke andre beinfisk.

NCC har vært identifisert hos channel catfish (*Ictalurus punctatus*) (Graves et al., 1984), regnbueørret (*Oncorhynchus mykiss*) (Greenlee et al., 1991), damshelfisk (*Pomacentrus*

*partitus*) (McKinney og Schmale, 1994), karpe (*Cyprinus carpio*) (Hinuma et al., 1980) og tilapia (*Tilapia mossambica*) (Faisal et al., 1989). NCC samarbeider med andre ikke-spesifikke effektorceller som for eksempel makrofager til å gi medfødt beskyttelse under akutt stressresponser utløst av opportunistiske mikroorganismer. De fleste studier som har beskrevet NCC hos fisk har fokusert på celler fra mallearten, channel catfish (*Ictalurus punctatus*). I maller er NCC vanligvis funnet i lymfoide vev som for eksempel nyre og milt, men sjeldent i blodet (Shen et al., 2002). NK-celler hos pattedyr kan lysere celler ved to mekanismer, granule eksocytosis og Fas Ligand (FasL)/Fas interaksjon. Begge krever membrankontakt med målcellen. Ved granulær eksocytose forårsaker perforin, granulysin og NK-lysin en poredannelse i den ytre membranen til målcellen som tillater transport av granzymmer til cytoplasma hos målcellen og til slutt resulterer i apoptotisk celledød, som vist i Fig. 5b (Fisher et al., 2013).



**Figur 5: Mekanismer for hvordan NK-celles dreper virusinfisert celle hos pattedyr. NK-celler er aktivert ved integrasjon av signaler fra aktivering og hemmende reseptorer. (A) Hemmende NK-celle reseptorer gjenkjenne eget MHC klasse I og hindrer aktivering av NK-celler. (B) Når NK-cellen er uhindret/ upåvirket av hemmende reseptorer vil binding av NK-cellerreseptorer til deres ligander på målcellen resultere i en NK-celle stimulering der NK-cellen skiller ut granulysin (French og Yokoyama, 2003).**

FasL/Fas interaksjoner involverer et inngrep og samling av dødsreseptorer som Fas mot tilhørende Fas Ligand (FasL) på celleoverflaten til målceller. Bindingen av Fas til FasL resulterer i klassisk caspase (også kalt endoproteaser)- avhengig apoptose (Nakanishi et al., 2011). FasL kan være uttrykt i både membranbundet og løselig cytosolisk form i pattedyr, men hos fisk er så langt kun løselige former blitt detektert. Ved FasL/Fas interaksjonen er FasL-proteiner hos tilapia og malle vist å være frigjort fra NCC-celler ved stimulering. På bakgrunn av at antistoffer fra mennesker mot FasL har vist å hemme NCC-mediert lysis av målceller er det antydnet at FasL medierer også drepemekanismer i fisk (Fisher et al., 2013).



## 1.8 Det adaptive immunsystemet hos laks

Komponenter i det adaptive immunsystemet inndeles i cellemedierte (mediert av T-lymfocytter) og humorale faktorer (antistoffer produsert av B-celler). Disse komponentene kan ikke eksistere og virke selvstendige (Fischer et al., 2013). Det adaptive immunsystemet hos fisk har mange likhetstrekk med det hos pattedyr, men også noen forskjeller. Når det gjelder lymfoid vev mangler fisk lymfeknuter og beinmarg, men har milt og thymus. Den fremre delen av fiskens nyre (hodenyren) er ansett som en funksjonell forløper av beinmarg hos pattedyr siden det er der hovedområdet for hematopoetisk (bloddannende) lymfoid vev befinner seg i fisk og det er ansett som å være et immunologisk responsivt organ. I tillegg, beinfisk mangler germinale senter, og selv om de uttrykker cytidine deaminase (activation induced deaminase) AID, mangler de antistoff klasse-skifte rekombinasjon. Tarmen, huden og gjellene hos beinfisk inneholder mucosa assosiert lymfoidvev som spiller en stor rolle i vedlikehold av mukosa homeostasis. Antistoffene hos beinfisk er mindre mangfoldig enn de hos pattedyr, men beinfisk har til gjengjeld et mer mangfoldig utvalg av medfødte immunmolekyler som lektin, komplement og NK-celle reseptorer (Sunyer, 2013). Inntil nylig var det antatt at de fagocytiske cellene i fisk var monocytter, nøytrofile og makrofager som hos pattedyr, men i 2006 ble det vist for første gang at B-celler hos beinfisk også var i stand til fagocyttering og intracellulære dreping. Tiden som kreves for å gi en signifikant antigen-spesifikk respons er generelt mye lengre hos beinfisk enn hos pattedyr. For eksempel, for å gi en signifikant antigenspesifikk antistoffrespons (IgM) etter en i.p. injeksjon trenger regnbueørret og laks minst 3-4 uker, mens pattedyr trenger bare noen få dager (Sunyer, 2012).

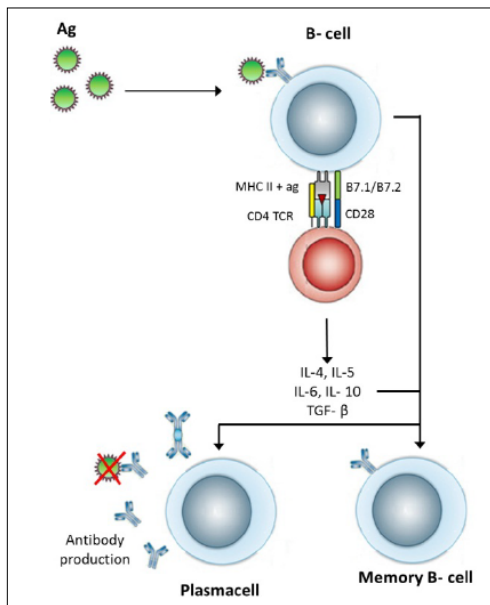
## 1.9 Antistoffer hos fisk

Immunglobuliner (Igs, også kalt antistoffer) er en klasse av proteiner som tilhører det adaptive immunsystemet og som produseres av B-lymfocytter (B-celler). To former av Igs har blitt identifisert. B-cellerreseptor (BCR) og sekreerte Ig (antistoffer). BCR er et membranbundet molekyl på overflaten til B-celler og virker som en antigenreseptor (Uribe et al., 2011). Hos beinfisk utgjør B-cellene i gjennomsnitt ca. 30-60 % av alle de hvite blodcellene i blodet, mens hos pattedyr utgjøre B-cellene kun 2-8 % av alle de hvite blodcellene. På grunn av den store mengende med B-celler i blodet hos beinfisk sammen med B-cellenes evne til å fagocyttere og evne til dreping av intracellulær mikrober er antatt at de har en viktig hovedoppgave i fjerning av mikrober og spesielle antigener hos fisk (Sunyer, 2012).

Ig produseres av B-celler som har utviklet seg til plasmaceller. Hos fisk er tre typer av funksjonelle Ig blitt funnet, IgD, IgM og IgT. Hos pattedyr er det blitt identifisert fem antistofftyper, IgA, IgE, IgD, IgG og IgM (Zhu et al., 2013). Det dominerende antistoffet i beinfisk er IgM og som danner en tetramer (Uribe et al., 2011). IgM skilles ut av plasmablast og plasmacelle-lignende celler som for det meste er lokalisert i hodenyren og milt (Salinas et al., 2011). IgM er hovedspilleren i systemisk immunitet i fisk (Sunyer, 2012). Tarm og hud er rapportert å ha relativt lavt innhold av IgM. Etter en "boosting" av immunsystemet gjennomgår beinfisk en betydelig økning i IgM titering, en prosess som er temperaturavhengig (Sunyer, 2013). Det andre antistoffet som ble identifisert i fisk er IgD (Zhu et al., 2013). Organisering av gener som koder for IgD er veldig variabel i fisk og rollen til IgD er uklar (Sunyer, 2013). IgT hos beinfisk er spesialisert i tarm-mukosa immunitet. IgT er tilstede i serum som monomerer, mens i tarmen danne de multimerer som i masse ligner IgM (Sunyer, 2013).

Antistoffer gir beskyttende effekt mot patogene organismer som virus, bakterier, sopp eller multicellulære parasitter ved et bredt spekter av direkte og indirekte mekanismer. De direkte mekanismen er mediert av antistoffer uten tillegg av mediatorer eller celler, som for eksempel nøytraliserende antistoffer. Nøytraliserende antistoffer spiller en viktig rolle i immunresponsen mot virus og kan hemme virus i å feste seg til spesifikke reseptorer hos vertscelle, blokkere avkapsling (uncoating) av viruset og hemme virusmontering og frigjøring (Joller et al., 2011).

De indirekte mekanismene er mediert av interaksjoner mellom antistoffer og andre komponenter i immunsystemet, som for eksempel komplement, fagocytiske celler eller effektorceller som NK-celler. Antistoffer kan aktivere komplement- proteiner som resulterer i opsonisering (merking som fremme fagocytoseprosessen) av patogenet, kjemoattraksjon (tiltrekning) av leukocyttter og dannelsen av membran-angrep komplekset (MAC) som gir osmotisk lysis av fremmede celler (Joller et al., 2011).



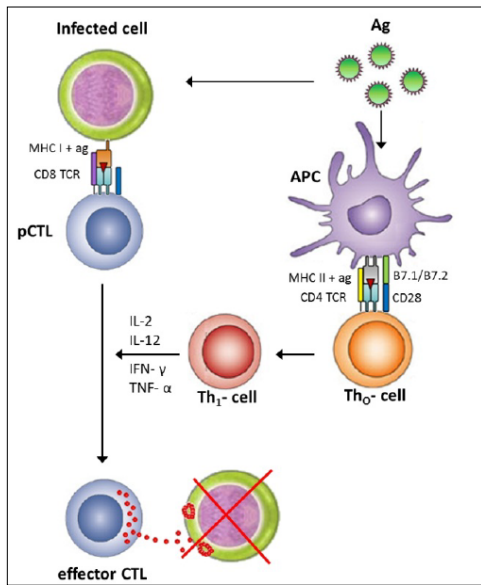
**Figur 6: Generelt overblikk av aktivering av B-celler etter en virusinfeksjon. B-celler kan ta opp fremmede virusantigener (Ag) og presentere de til T-hjelper celler (Th2)-celler. Aktiverte Th2-celler produserer cytokiner som interleukin 4 (IL-4), IL-5, IL-19 og TGF- $\beta$  som aktivere naive B-celler. Dette induserer B-celledifferensiering til hukommelses B-celler og plasmaceller, som produserer store mengder med antistoffer som forhindrer videre virusinfeksjon (De Haes et al, 2012).**

Antistoffer kan aktivere NK-celler ved å feste seg til spesifikke overflateantigener på målceller og dermed merke de som fremmede celler. Fc- reseptoren (FcR) på NK-celler kan gjenkjenne disse antistoffene og binde seg til Fc-delen på antistoffmolekylet. NK-cellene vil videre frigjøre cytotoksiske mediatorer som fører til ødeleggelse av målcellen. Antistoffer kan også aktivere andre medfødte immunceller på denne måten, ettersom de fleste medfødte immunceller har FcR. En sãnn type mekanisme er samlet kalt antistoffavhengig cellemedierte cytotoxicitet (ADCC) som er en viktig effektormekanisme i eliminering av blant annet virusinfiserte celler. Antistoff bundet til FcR-interaksjoner kan også gi induksjonen av reaktive oksygen og nitrogenforbindelser i makrofager, nøytrofile og andre fagocytiske celler. Resultatet av dette er oksidativ burst (sprenging) av målcellen og dette spiller en viktig rolle i kontroll av blant annet virus (Joller et al, 2011).

Hukommelsesceller og plasmaceller hos beinfisk har i hovedsak ikke vært utforsket i stor grad. Hukommelse hos beinfisk er definerte som utvikling av en differensiert forhøyet reaksjonstilstand mot antigener, som mangler en rekke av kjennetegnene som sees hos pattedyr (pga av at de mangler blant annet beinmarg og lymfeknuter) (Ma et al., 2013). Likevel, primær immunisering av beinfisk har vært dokumentert å gi en økt sensitivitet mot immunogener (Arkoosh et al., 1991), forsterket *in vivo* (Avtalion, 1969; O'Dowd et al., 1999) og *in vitro* antistoffreaksjon (Kattari, 1994). og immunologisk hukommelsesresponser mot patogener (Nusbaum et al., 2002).

### 1.10 T-celler hos fisk

T-celler kan detektere tilstedeværelsen av intracellulære patogener ved å gjenkjenne patogene peptider og produkter som blir fremvist av Major histocompatibility complex (MHC)-molekyler på celleoverflaten til infiserte celler. Denne detektaksjonen utløser en adaptiv immunrespons mot cellene som fremviser peptidene. MHC inndeles i to grupper etter hvilke typer T-celler de aktiverer. MHC klasse I aktiverer CD8<sup>+</sup> cytotoksiske T-celler (CTL) og MHC klasse II aktiverer CD4<sup>+</sup> hjelper T-celler (Th). CTL gir en cellulær immunrespons ved å frigjøre molekyler eller aktivere Fas ligand til å indusere apoptose som dreper infiserte celler. Th stimulerer skiller hovedsakelig ut cytokiner som koordinerer aktiviteten til andre immunceller og gir en passende respons mot infiserte celler (Laing og Hansen, 2011). For eksempel kan Th stimulere B-celler til å produsere antistoffer som øker den humorale immunresponsen. Th kan også stimulere CTL. De to MHC- klassene har ulik struktur, uttrykksmønster og funksjoner *in vivo*. Nesten alle vertsceller kan uttrykke MHC klasse I, mens kun profesjonelle antigenpresenterende celler (APC) kan uttrykke MHC klasse II (Zhu et al., 2013). APC inkluderer dendrittiske celler (DC), makrofager og B-celler (Iliev et al., 2013).



**Figur 7: Overblikk av T-celle aktivering etter en virusinfeksjon. Virusantigener (Ag) kan infisere en celle og den infiserte cellen vil deretter presenterer viruspeptidet sammen med Major histocompatibility complex (MHC) klasse I på plasmamembranen. MHC klasse I med peptidet vil bli gjenkjent av forløper cytotoksiske CD8+ T-celler (pCTL). pCTL vil deretter utviklet seg til effektor CTL eller hukommelses CTL. Effektor CTL kan direkte drepe infiserte celler ved produksjonen av perforiner og granzymmer. I tillegg, kan virusantigener bli tatt opp av antigenpresenterende celler (APC) som presenterer antigenpeptidet sammen med MHC klasse II. CD4+ T hjelperceller (Th<sub>0</sub>-celler) kan gjenkjenne peptidet som er fremvist på MHC klasse II og utvikle seg til Th<sub>1</sub>-celler som produserer interleukin 2 (IL-2), IFN-γ og TNF-α. Disse cytokinene kan bidra til aktivering av effektor eller hukommelses CTL (De Haes et al, 2012).**

Gjenkjennelsen av infiserte celler av T-celler er svært spesifikk og kun spesielle typer av T-cellerreseptorer (TCR) gjenkjenner spesielle peptider, noe som krever et svært mangfold av TCRs. Dette mangfoldet er basert på rearrangering av V, D og J regionene i TCR-genene. Th-celler er assosiert med celler som fremviser peptider med ekstracellulær opprinnelse som for eksempel bakterier, mens CTL er assosiert med celler som fremviser peptider med intracellulær opprinnelse som for eksempel virus (Fisher et al., 2013). Aktiverte CTL hos pattedyr kan virke ved to effektormekanismer, cytolytisk aktivitet som dreper den infiserte cellen eller cytokinsekresjon der sekreterte cytokiner som IFN $\gamma$  eller tumor nekrose faktor alfa (TNF $\alpha$ ) reduserer muligheten for videre celleinfeksjoner og virus-produksjon. Begge disse mekanismene kan virke sammen (se Fig. 7) (Elemans et al., 2012). CTL-relaterte molekyler som MHC klasse I og II, CD8+ og T-cellerreseptor (TCR) har blitt identifisert i mange fiskearter, som tyder på at fisk også har cytotoksiske celler som er funksjonelt like med pattedyr. Likevel, selv om T-celle lignende aktivitet har lenge vært rapportert i fisk, mangler de fysiske karakteriseringene av undergrupper fra T-celletypene som er sett hos pattedyr. Når det gjelder kontrollen av virusinfeksjoner er det mye som er ukjent når det gjelder rollen til T-celler hos beinfisk (Somamoto, 2014).

## 1.11 Hypoteser/problemstillinger

Studier i Børre Robertsens forskningsgruppe har nylig vist at atlantisk laks som ble injisert intramuskulært (i.m.) med plasmid som kodet for HE fra ILAV samme med plasmid som koder for IFNa, IFNb eller IFNc hadde en svært god beskyttelse mot ILAV infeksjon sammenlignet med laks som var injisert med HE plasmid alene (Chang et al., 2015). Laks som var injisert med IFNc plasmid alene viste også meget god beskyttelse mot ILAV infeksjon, mens laks som var injisert med IFNa-plasmid eller IFNb-plasmid ikke var beskyttet mot ILAV-infeksjon (Chang et al., 2014). For å forstå mer av hvorfor disse plasmidene hadde så godt beskyttelsen mot ILAV infeksjoner ble det i dette mastergradsprosjektet gjennomført fem eksperimenter for å undersøke hvilke effekter plasmidene har på atlantisk laks over lengre tid.

### **Eksperiment 1: Antistoffrespons**

I dette eksperimentet skulle det undersøkes om det er en fortsatt stigende økning i antistoffrespons mot ILAV i form av IgM i serum hos fisk 16 og 22 uker etter at de var vaksinert med IFN+ HE plasmider. Vi ville også finne ut om de var en forskjell i kinetikken for antistoffproduksjonen med IFNa+HE sammenlignet med IFNc+HE siden IFNa bare har effekt i muskel ved injeksjonsstedet mens IFNc har systemisk antiviral effekt.

### **Eksperiment 2: Systemisk antiviral respons**

I dette eksperimentet skulle det undersøke varigheten av den systemiske antivirale responsen i som indueres av IFNc-plasmid alene sammenlignet med IFNc-plasmid sammen med HE-plasmid. Systemisk antiviral respons måles med immunoblotting av Mx-protein i leveren. Hypotesen i dette eksperimentet består av to deler som henger sammen. Den første hypotesen er at fisk injisert med IFNc-plasmid vil produsere Mx lenge, fordi IFNc er laksens eget protein. Dermed blir ikke cellene som er transfektert med IFNc ødelagt av immunsystemet. Den andre hypotesen er at fisk injiserte med IFNc-plasmid sammen med HE-plasmid vil ha en redusert produksjon av Mx i leveren etter hvert, fordi celler som uttrykker IFNc + HE blir sett på som fremmede celler av kroppens immunsystem og dermed vil bli tilintetgjort av forsvarsceller.

### **Eksperiment 3: Forsøk på å måle om CTL dreper celler som uttrykker HE-antigen**

I dette eksperimentet skulle det undersøkes om det var mulig å måle om CTL var involvert i beskyttelsen mot ILAV som var immunisert ved injeksjon med HE-plasmid sammen med IFN-plasmid. Hypotesen er at CTL dreper muskelceller som fremviser HE-peptider sammen med MHC klasse I. Dersom laks immunisert med HE + IFN plasmider blir reinjisert med HE-plasmider etter en immuniseringsperiode på 7 uker eller mer, burde derfor muskelceller som uttrykker HE bli drept av CTL. Denne hypotesen skulle testes ved å måle ekspresjon av HE mRNA i muskel en uke etter reinjeksjon av HE-plasmid i den immuniserte fisken.

### **Eksperiment 4: Forsøk på å måle om NK-celler dreper celler som uttrykker HE-antigen**

I dette eksperimentet skulle det undersøkes om det var en økning i NK-celler i muskel hos fisk som var injisert med IFNc-plasmid og reinjisert med HE-plasmid 1 uke senere. Hypotesen var at IFNc øker produksjonen av NK-celler som så vil ankomme reinjeksjonsstedet og drepe celler som fremviser HE.

### **Eksperiment 5: Effekt på vekst hos fisk**

I dette eksperimentet skulle det undersøkes om de ulike injiserte plasmidvaksinene har en effekt på vekst av fisk ved å sammenligne vekt av fisk 0, 16 og 22 uker etter at de var injisert med plasmider. Hypotesen er at IFNc-plasmid alene eller HE-plasmid sammen med IFN eller IFNc plasmid vil stimulere immunsystemet hos fisken så kraftig at det fører til en energetisk merbelastning som gir reduksjon i vekst hos fisken over tid.

## 2. Materialer og metoder

---

For å bekrefte/avkrefte hypotesene som ble stilt i dette mastergradsprosjektet ble det gjennomført et *in vivo* forsøk der grupper av presmolt ble injisert intramuskulær (i.m.) med et eller to plasmider som angitt i tabell 1. Prøver av fisk ble tatt 7, 10, 16 og 22 uker etter plasmidinjeksjon. Forsøk og metoder er beskrevet nedenfor, mens reagenser og løsninger er vist i appendiks.

### 2.1 Forsøksfisk

Atlantisk laks (*Salmo salar*) presmolt av stammen Standard Atlantic QTL-innova IPN generasjon 2014 ble holdt i ferskvann ved 8-10 grader i 300 liters kar i et landanlegg i Kårvika, som tilhører Havbruksstasjonen i Tromsø. Forsøk på fisk ble gjennomført i tidsrommet 19.08.14-23.01.15. Fiskene ble føret med 2 mm Nutra olympic. Alle fiskene ble sultet to dager før injisering av plasmider og bedøvd med benzoak (A.C.D.) før de ble håndtert og behandlet. Fiskene ble avlivet ved en overdose av benzoak og et slag i hodet før innhøsting av organer. All håndtering av fiskene var i følge forskrift om forsøk med dyr (FOR-1996-01.15.23) i dyrevelferdsloven (LOV 2009-06-19- 97) og det ble søkt og godkjent om fiskeeksperimenter fra Havbruksstasjonen i Kårvika.

### 2.2 Plasmider som ble brukt til intramuskulære injeksjoner

Alle plasmidene som ble brukt i eksperimentene i denne masteroppgaven var tilgjengelig fra tidligere studier i Robertsens forskningsgruppe (Chang et al., 2015; Chang et al., 2014; Svingerud et al., 2013; Sun et al., 2009). Plasmidvektoren som ble brukt var pcDNA 3.3 TOPO- vektor (Invitrogen). I dette plasmidet var det satt inn en åpen leseramme (ORF) av gen for enten hemagglutinin esterase (HE) fra ILAV Glesvær /2/90 eller IFNa1 fra laks eller IFNc fra laks, nedstrøms for en CMV-promotor (Cytomegalovirus-promotor) (Chang et al., 2014). Disse plasmidene ble kalt henholdsvis pHE, pIFNa1 og pIFNc. pcDNA 3.3 uten innsatt gen ble brukt som kontrollplasmid. Plasmidene ble oppformert i One shot TOP 10 *Escherichia coli* (Invitrogen). Deretter ble plasmidene rensset med Endorfreen plasmid purification kit (Qiagen).



En nærmere beskrivelse av hvordan dette ble gjort er vist i appendiks II. pHE sin evne til å uttrykke hemagglutinin esterase (HE) i celler ble testet ved transfeksjon av HEK-213 celler (Human embryo kidney cells) og CHSE-214 celler (Chinook salmon embryo cells). Cellene var sådd ut i 24-brønnplater og transfektert den etterfølgende dagen av hvert plasmid med HE ved hjelp av TransIT-LT1 Transfection reagent i henhold til produsentens protokoll (Mirus).

### 2.3 Injisering av presmolt med plasmider

Grupper av presmolt med en snittvekt på ca. 34 gram ble injisert intramuskulært (i.m.) ca. 1 cm under dorsalfinnen med 50 µl PBS phosphate buffered saline ved pH 7,4 som inneholdt et eller to plasmider (15 µg for hvert plasmid) og plassert i kar. Organiseringen av hvilke typer plasmider som ble injisert i fiskene og antallet av fisk i hvert kar står i tabell 1.

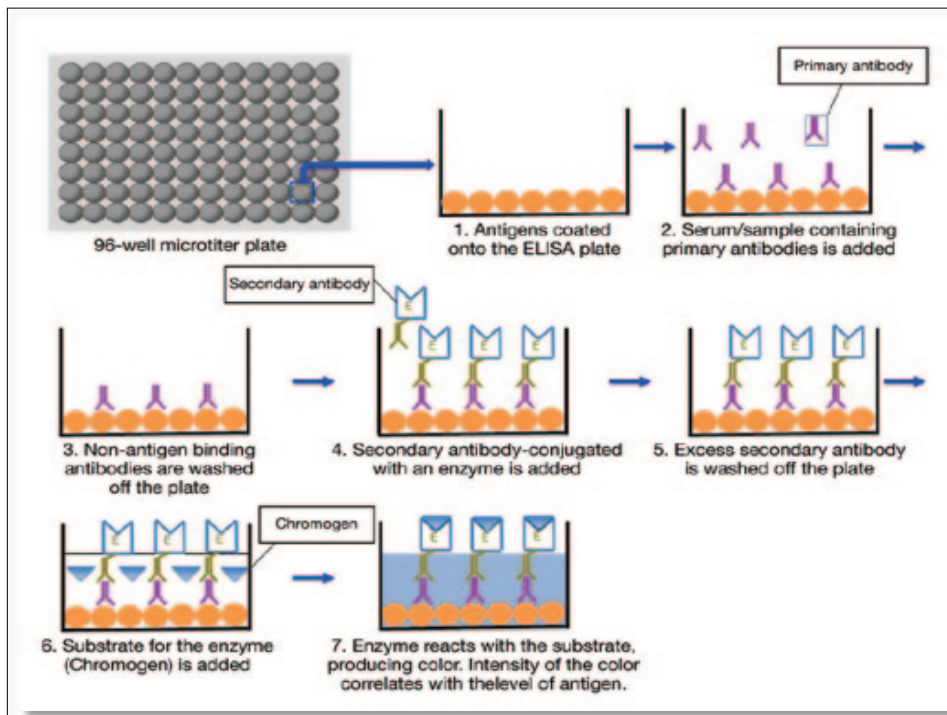
**Tabell 1: Oversikt over hvilke plasmider som ble injisert intramuskulært (i.m.) i presmolt laks i dette forsøket og antallet av fisk som ble injisert med hver av plasmidtypene fordelt i kar 1, kar 2 og kar 3.**

Fiskegrupper	Injiserte plasmider	Antall fisk			
		Kar 1	Kar 2	Kar 3	Totalt
1	pcDNA3.3	20	20	30	70
2	pIFNa	20	20	30	70
3	pHE	20	20	30	70
4	pIFNa +pHE	20	20	30	70
5	pIFNc	20	20	30	70
6	pIFNc + pHE	20	20	30	70
Totalt antall fisk		120	120	180	420

Det ble tatt prøver av fiskene 7, 10, 16 og 22 uker etter injisering av plasmider. Dette ble ordnet slik at kar 1 ble høstet etter 7 uker, kar 2 etter 10 uker og kar 3 etter 16 og 22 uker. Forsøksfiskene i kar 1 og 2 ble merket med tatoveringsblekk (2 % alcian blue, Panjet inoculator), mens fiskene i kar 3 ble PIT-tag-merket. Årsaken til at fiskene i kar 3 er merket med PIT-tag er at denne fisken skal holdes lengre enn 15 uker i karet og tatoveringsblekk vil trolig forsvinne (bli mindre synlig) etter så lang tid. Forsøksfiskene som hadde PIT-tag ble også veid 0, 16 og 22 uker etter injisering av plasmider. SGR (spesifikk growth rate) i % per dag ble beregnet for individuelle fisk med følgende likning  $SGR = [(\ln W_2 - \ln W_1) / t] \times 100$ , der  $W_1$  er vekten av fisken ved start av eksperimentet,  $W_2$  er vekten av fisk ved slutten av eksperimentet og  $t$  er varigheten av eksperimentet i dager (Koskela et al., 2004).

## 2.4 ELISA

Enzyme linked immosorbent assay (ELISA) ble brukt til å kvantiere ILAV4-spesifikke IgM antistoffer i lakseserum. Metoden er skissert i Fig. 8 og består av følgende trinn som er nærmere beskrevet nedenfor: 1. Antigen absorbert til 96-brønners ELISA plate. 2. Tilsetning av serum som inneholder primære antistoffer. 3. Vasking av brønnene vil fjerne de antistoffene som ikke har bundet seg til antigener. 4. Tilsetning av sekundære antistoffer som vil binde seg til de primære antistoffene og har et enzym festet til seg. I dette trinnet har vi i vårt forsøk tilsatt et ekstra tertiært antistoff som vil binde seg til det sekundære antistoffet og som har et enzym festet til seg. 5. Vasking vil fjerne de antistoffene som ikke har festet seg. 6. Substratet til enzymet blir tilsatt. 7. Enzymet reagerer med substratet og produserer en farge. Intensiteten til fargen tilsvarer mengden av antigener i brønnene (Gan og Patel, 2013).



Figur 8: Oversikt over enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) teknikk brukt til å detektere antigen i en gitt prøve. Antigenet er tilsatt til brønnene der det fester seg til veggene i brønnene. Primære antistoffer vil binde seg spesifikt til antigenet. Et enzymbundet sekundært antistoff er tilsatt og vil reagere med substratenzymet, kromogen som skaper en fargeendring. Fargeintensiteten kan kvantitativt eller kvalitativt detektere antigenet (Gan og Patel, 2013). Merk at i denne figuren er det kun tilsatt primær og sekundære antistoffer. I mitt forsøk ble det også tilsatt et tertiært antistoff som har et enzym kalt peroxidase festet til seg og vil reagere med substratenzymet ultra tetramethylbenzidine (TMB) og gi fargeendring. TMB inneholder peroxidase substrat.

#### **2.4.1 Adsorpsjon av antigen til ELISA plater (coating )**

Som antigen ble det brukt rensset ILAV (beskrevet av Chang et al., 2015). Hver brønn i en ELISA-plate (Nunc- Immuno 96-brønnplate, Sigma- Aldrich) ble adsorbert med 200 ng ILAV i 100 µl 0,1M karbonatbuffer (pH 9,6) og inkubert over natten ved 4°C med en fleksibel forseglingssteip for å forhindre fordampning. Brønnene ble så vasket 3x med 200 µl Tris buffered saline tween (TBST) (Appendiks III). Det ble deretter tilsatt 100 µl TBST med 5 % tørrmelk (Appendiks III) til hver av brønnene og ELISA-platen ble inkubert i 1 time ved 4°C. Etter 1 time ble brønnene vasket 3x med 200 µl TBST. Tilsatt deretter 30 µl TBST i hver av brønnene for at innholdet i brønnene ikke skulle bli tørt.

#### **2.4.2 Tilsetting av serum (primært antistoff)**

Det ble tatt ut blodprøver fra vena caudalis hos femten fisk per gruppe og som ble overført til merkede eppendorfrør. Blodprøvene ble sentrifugert ved 1000x g og serumet ble lagret ved -80 °C i en fryseboks. Lakseserumet ble fortynnet 1:500 i TBST med 0,5 % tørrmelk (appendiks III) i merkede eppendorfrør. Tilsatt deretter 100 µl av disse serumfortynningene som duplikater til hver av brønnene i ELISA-platen og platen ble lagret ved 4°C i kjøleskapet over natten. Antistoffene som er spesifikke for ILAV vil da binde seg til ILAV i brønnene.

#### **2.4.3 Tilsetting av sekundære og tertiære antistoff**

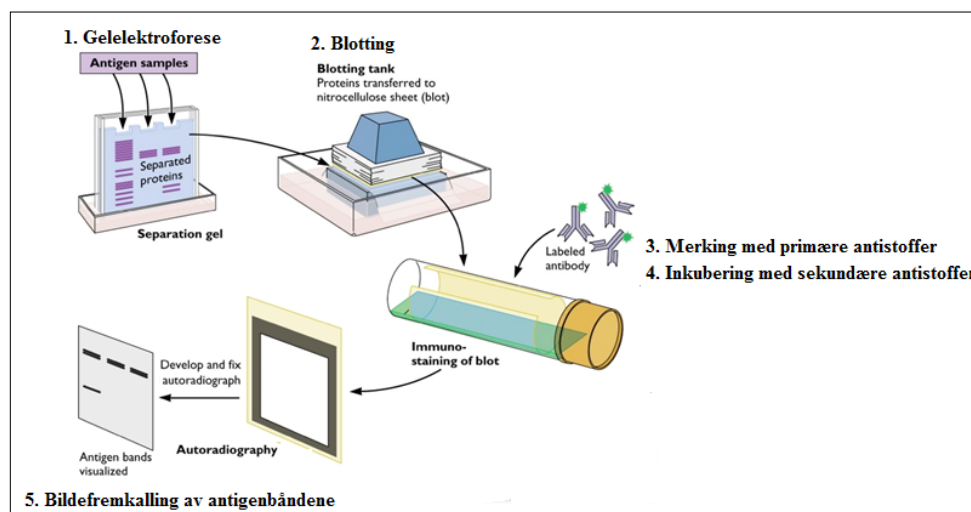
Dagen etter at serumet var tilsatt i 96-brønnplaten ble brønnene vasket 3 x 10 min med 200 µl TBST. Sekundært antistoff var monoclonal mouse anti-salmon Ig (H) (Cedarlane laboratories Ltd) og det ble fortynnet 1:300 med TBST. Tilsatte deretter 100 µl av disse antistofffortynningene til hver av brønnene i 96-brønnplaten og inkuberte brønnplaten ved romtemperatur i 2 timer. Etter 2 timer ble brønnene vasket 3 x 10 min med 200 µl TBST. Tertiært antistoff var polyclonal goat-anti mouse Ig (Invitrogen) og det ble fortynnet 1:2000 med TBST. Tilsatte deretter 100 µl av disse antistofffortynningene til hver av brønnene i 96-brønnplaten og inkuberte platen ved romtemperatur i 2 timer.

### 2.4.4 Tilsetning av TMB-susbrat og avlesning av fargeintensitet

Etter 2 timers inkubering med tertiære antistoffer ble 96-brønnplaten vasket 3 x 10 min med 200 µl TBST. Deretter ble 100 µl av Ultra tetramethylbenzidine (TMB, Pierce) tilsatt i hver av brønnene i 96 brønnplaten og de ble øyeblikkelig deretter plassert i et skap uten lys. Etter ca. 5 min ble det tilsatt 100 µl 2 M svovelsyre (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) som gjorde at brønnene ble gule og dette stoppet reaksjonen. Optisk tetthet (OD) i brønnene ble avlest ved 450 nm i VersaMax™ mikroplateleser (Molecular Devices) og dataene ble videre overført til Soft Max Pro 4.3 dataprogram.

## 2.5 Western blotting

Western blotting (eller immunoblotting) ble brukt til å detektere Mx-proteiner i levervev fra fisk som beskrevet fra Chang et al (2014). Protokollen fra NuPage Novex Bis Tris Mini Gels (Invitrogen) ble fulgt for å gjennomføre dette. Metoden består av fem forskjellige trinn som er vist i Fig 9. 1. Elektroforetisk separasjon av proteiner ved deres isoelektriske punkt. 2. Overføring til en nitrocellulose eller polyvinylidene difluoride (PVDF) membran. 3. Merking med primært antistoffer spesifikt for målproteinet. 4. Inkubering med sekundære antistoffer spesifikk for de primære antistoffene. 5. Visualisering av båndene med proteiner (Eaton et al., 2014). Reagenser og konsentrasjoner i bufferløsninger er vist i appendiks V.



Figur 9: Overblikk av Western blotting prosedyre (Virology, 2010). Merk at det i denne figuren er brukt autoradiografi for visualisering av protein-bånd på gelen. I mitt forsøk ble det brukt chemiluminensens for visualisering av protein-bånd på gelen.

### 2.5.1 Ekstraksjon og måling av leverproteiner fra fisk

Leverprøver ble tatt ut fra fem fisk per gruppe, pakket inn i aluminiumsfolier og lagret ved -80°C i en fryseboks. For å ekstrahere ut proteiner fra leverprøvene ble først ca. 0,05 gram fra hver av leverprøvene tatt ut og lagt i hver sine eppendorfrør med tre keramikkuler, 1 ml lysisbuffer med tissue protein extraction reagent (T-PER) og homogenisert i Precellys 24<sup>®</sup> homogenisatoren (Bertine Technologies) ved 2 x 5900 g i 10 sek. Deretter ble dette homogenatet sentrifugert ved 10 000 g i 5 min ved 4 °C. Supernatanten som nå var blitt dannet ble pipettert ut i nye eppendorfrør og var ansett som ferdig ekstraherte proteinprøver. Proteinprøvene ble fortynnet 1:10 med lysisbuffer, og deretter ble 25 µl av proteinprøvene og BSA (Bovine serum albumin) standardprøver fra A til I (Pierce Ltd) tilsatt som duplikater i hver sine brønner i en 96-brønners plate (Nunc-Immuno, Sigma-Aldrich). Tilsatt så 200 µl med BCA-buffer (bicinchoninic acid, Life Technologies) til hver av brønnene med proteinprøver og standardprøver. Festet en fleksibel forseglingssteip på brønnplaten, og satt den inn på en ristepate i ca. 30 sek og deretter i et varmeskap ved 37°C i 30 min. Så ble proteinkonsentrasjonene målt i VersaMax<sup>™</sup> mikroplateleser (Molecular Devices) og ved hjelp av standardprøvene som dannet en standardkurve ble de ukjente proteinkonsentrasjonen i proteinprøvene beregnet i Soft Max Pro 4.3 dataprogrammet. Inntil prøvene skulle brukes i gelelektroforese ble de lagret ved -80°C .

### 2.5.2 Gelelektroforese

Fra hver av proteinprøvene ble 10 µg tilsatt i stripsrør (Thermo-Scientific). Deretter ble det tilsatt 5 µl NuPage LDS sample buffer (Novex® Life Technologies) og 2 µl NuPage reducing agent (Novex® Life Technologies). RNase fritt vann (Biochrome AG) ble tilsatt slik at totalvolumet i hvert stripsrør ble 20 µl. Deretter ble prøvene i stripsene varmebehandlet ved 70 °C i 10 min i en Gene Amp® PCR-maskin (Applied Biosystems). Også ble de lagt på is i en isoporboks inntil de skulle gjennom gelelektroforesen. Gelelektroforesen ble utført i en 15-brønners NuPage 4-12 % Bis-Tris Gel med NuPAGE runningbuffer (Novex®). Det ble applisert 10 µl fra hver av proteinprøvene i brønnene. Som størrelsesmarkør ble det tilsatt 5 µl Magic Mark XP Western standard (Invitrogen™) og SeedBlue® Plus 2 Pre-stained Protein Standard (Novex® Life Technologies). Elektroforesen ble kjørt ved 200 volt i 60 min i XCell Sure Lock™ Mini-Cell (Invitrogen).

### 2.5.3 Blotting

Gelen med proteiner ble lagt over et polyvinylidene fluoride (PVDF) membranpapir (GE Healthcare Life Science), som på forhånd var vasket 10 sek i metanol, destillert vann og blottebuffer. Deretter ble det lagt flere fuktige matter med blottebuffer både under og over dette, som i en sandwich. Kjørte blotting ved 30 volt i 60 min i XCell Sure Lock™ Mini-Cell (Invitrogen).

### 2.5.4 Blokking

PVDF- membranen ble vasket i en boks med Tris buffered saline tween (TBST) på en VXR Vibrax ristemaskin (IKA®) i ca. 10 min. Deretter ble membranpapiret lagt i en boks med 20 ml blokkebuffer tilsatt 5 % tørrmelk og inkubert på en ristemaskinen i ca. 30 min ved romtemperatur.

### **2.5.5 Merking ved bruk av primære antistoffer fra kanin spesifikk for Mx og actin.**

Membranen ble lagt i et 50 ml sentrifugerør med 1 ml blokkebuffer, 4 ml TBST, 2,5 µl kaninantistoffer mot actin (Sigma-Aldrich) og 1,6 µl kanin antistoffer mot Mx fra laks (laget i Robertson´s laboratorium) og satt på kontinuerlig rotasjon over natten ved 4°C.

### **2.5.6 Inkubering med sekundære antistoffer spesifikk for primære antistoffer fra kanin**

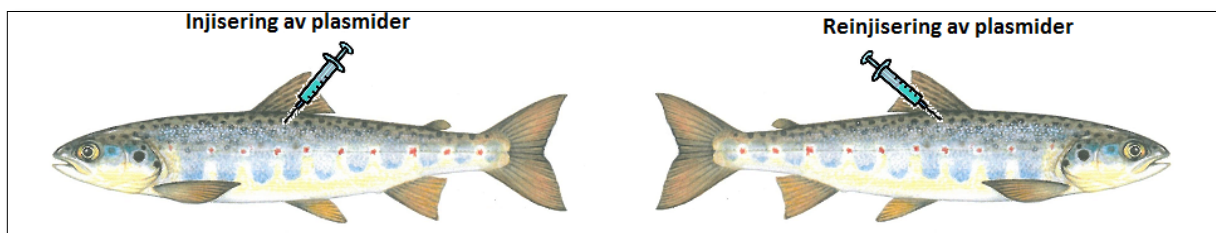
Membranen ble vasket 3 x 10 min i en boks med TBST. Deretter ble membranen lagt i et 50 ml sentrifugerør i 10 ml TBST med 1 % tørrmelk og 1 µl goat anti rabbit IgG (Invitrogen) og inkubert ved romtemperatur på en SB2 rotator (Stuart<sup>®</sup>) i ca. 2 timer.

### **2.5.7 Bildefremkalling**

Membranen ble vasket 3x 10 min med TBST. Deretter ble membranen inkubert med 3 ml Supersignal<sup>™</sup> West Pico Chemiluminescent Substrat (Life Technologies) i 5 min i mørket, før det ble tatt et bilde av membranen etter 1 min, 3 min og 10 min i et Western blot Molecular Imaging System (Carestream Health, Inc).

## 2.6 Reinjisering av DNA plasmider

Reinjisering av HE-plasmider skulle imitere ILAV infeksjon av immunisert fisk. Presmolt ble immunisert med pcDNA 3.3, pIFNa, pHE, pIFNa + pHE, pIFNc eller pIFNc+ pHE. 10 uker etter denne immuniseringen ble fem fisk per gruppe reinjisert med pHE ca. 1 cm under dorsalfinnen på motsatt side av kroppen der de ble immunisert, som vist i Fig.10. 7 dager etter reinjiseringen ble det skjært ut en muskelprøver fra reinjeksjonsstedet hos fem fisker per gruppe og lagt i rør med 1,5 ml RNA later<sup>®</sup> solution (Ambion<sup>®</sup>).



Figur 10: Områdene for intramuskulær (i.m) injisering og reinjisering av plasmider i fisk som ble brukt i forsøket.

## 2.7 Kvantitativ RT- PCR

cDNA syntese av mRNA fulgt av kvantitativ PCR (RT-qPCR) ble brukt til å oppformere og kvantifisere genuttrykket av elongeringsfaktor 2a (Elf2a), hemagglutininesterase (HE), CD8 alfa, Novel immunoglobulin lignende transkript (NILT) 4.1, NILT4.2 og Non- spesifik cytotoxisk cellereseptor protein (NCCRP) i muskelvev tatt fra reinjeksjonsstedet av pHE hos fisk. Elf2a ble brukt som referansegen. NILT 4.1, NILT 4.2 og NCCRP er NK-cellemarkører hos laks. Kort foregikk RT-qPCR på følgende måte. 1. Ekstraksjon av RNA fra muskelvevet. 2. Fjerning av genomisk DNA fra RNA-prøvene. 3. cDNA-syntesen, der RNA ble omdannet til cDNA. Siden RNA kan være sensitivt til eksterne stimulus som ikke er relatert til prosessen som skal studeres var det viktig å arbeide under kontrollerte og veldefinerte forhold. 4. qPCR.



### 2.7.1 Ekstraksjon av RNA fra muskelprøver

Muskelprøvene ble ekstrahert for RNA som beskrevet i protokollen for RNeasy Mini Kit (Qiagen). Fra hver av muskelprøvene ble en vevsbit på ca. 0,2 x 0,5 cm skjært ut, lagt i et eppendorfrør og deretter homogenisert ved hjelp av fire keramikkuler og 600 µl bufferløsning i en Precellys 24<sup>®</sup> lysis og homogenization (Bertine Technologies) ved 2 x 5900 rpm i 10 sek. Bufferløsningen var laget i et 50 ml falconrør og inneholdt 10 ml buffer RLT (Qiagen) og 100 µl 2-mercaptoethanol (Sigma-Aldrich). Homogenatet ble videre sentrifugert ved 5000 xg i 5 min. Deretter ble det tilsatt 1,2 ml RNase fritt vann (Biochrome AG) og 20 µl proteinase K (Invitrogen) og inkubert ved 55 °C i 10 min. Prøvene ble så sentrifugert ved 15000 x g i 3 min ved 20 grader. Supernatanten (lysatet) ble overført til nye eppendorfrør med 900 µl etanol og vortekset i 2 sekunder. I en RNeasy spin column (Qiagen) med et tilhørende samlerør ble det tilsatt 700 µl av lysatet, 700 µl buffer RW1 (Qiagen) og 2x 500 µl buffer RPE (Qiagen). Mellom hver tilsetning av disse løsningene ble spinnekolonnen sentrifugert ved 8000x g i 1 min ved 20 °C, gamle samlerør ble kastet og nye samlerør ble satt under kolonnen. Deretter ble 60 µl med RNase fritt vann tilsatt i kolonnen og sentrifugert ved 19000x g i 1 min ved 20°C. Dette gjorde at RNA ble eluert ut fra spinnekolonnen og i samlerøret. Samlerørene med RNA ble øyeblikkelig etter elueringen plassert i en -80 °C fryseboks.

Konsentrasjonen av eluert RNA ble målt med Nano Drop<sup>®</sup> ND-1000 Spectrophotometer (Thermo Scientific). Ekstraksjon av RNA ble ansett som vellykket og å ha en god kvalitet uten protein (eller fenol-kontaminering) dersom det hadde OD 260/280 var på 1,8- 2,0 og en RNA-konsentrasjon mellom ca. 500-1500 ng/µl. RNA-konsentrasjonen av prøvene ble brukt til å beregne hvor mye hver prøve måtte fortynnes med RNase fritt vann (Biochrome AG) for å få 1 µg RNA (1000 ng RNA) av hver prøve til cDNA-syntesen.

## 2.7.2 Fjerning av genomisk DNA

For å fjerne eventuelt genomisk DNA-forurensninger i RNA-prøvene ble det tilsatt gDNA Wipeout (Qiagen) og RNase fritt vann til RNA-prøvene i stripsrør (Thermo Scientific). Konsentrasjonen av disse løsningene står i appendiks V og totalvolumet i hvert stripsrør ble 14 µl. Varmebehandlet deretter prøvene ved 42 °C i 2 min i en PCR-maskin (Gene Amp<sup>®</sup> PCR system 2700, Applied Biosystems).

## 2.7.3 cDNA-syntese

For å lage cDNA fra RNA-prøvene ble det tilsatt 6 µl av en mastermiks som inneholdt Quantiscript Revers Transkriptase, Quantiscript RT-buffer og RT-primer mix (Qiagen) til RNA-prøvene som var fjernet for genomisk DNA. Det var nå totalt 20 µl med løsninger i hvert stripsrør. For å undersøke om det var DNA i RNA-prøvene ble det laget negative kontroller av revers transkriptase (No-RT) der det ble tilsatt 6 µl RNase fritt vann i stedet for 6 µl mastermiks med RT til noen brønner med 14 µl RNA-løsninger. Dersom det ble sett amplifikasjonsprodukter i No-RT kontroll reaksjoner, tydet det på at forurenset DNA var amplifisert og ikke cDNA. Dette kan øke kunstige ekspresjonsnivåer i eksperimentelle prøver (Life technologies). Stripsrørene med prøver ble deretter varmebehandlet i PCR-maskinen i 15 min ved 42°C og deretter 3 min ved 95°C. Varmebehandling ved 42°C aktiverer transkriptase til å omdanne RNA til cDNA, mens ved 95 °C ble transkriptasen inaktivert. Etter disse varmebehandlingene inneholdt prøvene cDNA som kan brukes videre som templat for amplifisering i RT-qPCR.

## 2.7.4 RT-qPCR måling

I RT-qPCR måling ble mengden av målgenet i cDNA-prøver målt av et instrument som måler DNA-konsentrasjonen etter hver amplifiseringssyklus ved å måle signalstyrken fra et stoff som fluoriserer når det binder seg til DNA. I dette eksperimentet ble det brukt fargestoffet Fast SYBR<sup>®</sup> Green Master Mix (Applied Biosystems).

cDNA ble fortynnet 1:10 med RNase fritt vann, vortekset og sentrifugert ned. Laget deretter en mastermix som inneholdt revers og forward primer for genet som skulle undersøkes, Fast SYBR<sup>®</sup> Green Master Mix (Applied Biosystems) og det fortynnede cDNA. Konsentrasjonene av disse løsningene står i appendiks V. For å undersøke om det var DNA-forurensinger i RNase fritt vann eller andre løsninger ble det laget negative kontroller (Non templated control, NTC) for hvert primerpar der det ble tilsatt 6 µl RNase fritt vann, i stedet for 6 µl DNA-prøver i mastermixen. Dersom disse kontrollene viser amplifikasjonsprodukter ved RT-qPCR måling er det et tegn på at de er forurenset. Primere som ble brukt i mastermixen var for elongeringsfaktoren, hemagglutininesterase fra ILAV4, CD8 og to NK-cellemarkører NILT 4 og NCCRP. Primersekvensene og GenBank nr er vist i tabell 2.

## Primersekvenser

**Tabell 2: Primersekvenser og genbank nr for alle primerpar brukt under forsøket. Alle primerene er fra Sigma-Aldrich. Bruksløsning av hver av primerene ble fortynnet med 1:20 med RNase fritt vann.**

Gen	Sekvens (5-3')	Genbank nr.
Elf2a FW	TGCCCTCCAGGATGTCTAC	NM_001141909.1
Elf2a RW	CACGGCCCACAGGTAAGT	NM_001141909.1
HE FW	ATGGCACGATTCATAATTTTA	HQ259676.1
HE RW	AGGCCTAGTAAAAAATGCACTTT	HQ259676.1
CD8+ FW	CGTCTACAGCTGTGCATCAATCAA	NM_001123583.1
CD8+RW	GGCTGTGGTCATTGGTGTAGTC	NM_001123583.1
NILT4 FW1	TGGTCCCCACACTGAAGATTGTCC	GU552297
NILT4 RW1	CCCCCTCATATCCTTCCACTGTGAT	GU552297
NILT4 FW2	CCCACACTGAAGATTGTCCTC	GU552297
NILT4 RW2	GCATCTGATCTCTGCTTTGC	GU552297
NCCRP FW	TATGGGACGAGCTTTTGGATGGTT	HBG099012
NCCRP RW	CCCGCAGCTGGTAGATGGACTC	HBG099012

Både revers og forward primeren ble vortekset før bruk, mens Fast SYBR<sup>®</sup> Green Master Mix ble blandet med de andre løsningene ved pipettering. Det ble pipettert ut 15 µl av mastemiksen som duplikater til hver av brønnene i et 96-brønners Micro Amp Fast Optikal brett (Life technologies). Fra mastermiksen med de negative kontrollene No-RT og NTC ble det også pipettert ut 15 µl som duplikater til noen utvalgte brønner. Festet deretter en fleksibel gjennomiktig tape (MicroAmp Optical Adhesiv Film PCR Compatible, Life Technologies) over 96-brønnerplaten, sentrifugerte platen ned i en Mini plate spinner MPS 1000 (Labnet International, Inc) i 30 sekunder og satte den inn i en 7500 Fast Real-Time PCR systems maskin (Life technologies).

Denaturering, amplifisering og ekstensjon og utgjør hver syklus i en RT-PCR reaksjon. Reaksjonen ble kjørt ved 40 sykluser. Ved denaturering vil høy temperatur medføre at dobbeltrådig DNA blir smeltet til enkeltrådig DNA og sekundære strukturer i enkeltrådig DNA vil bli løst opp. Gjennom amplifisering ble det brukt en temperatur som er 5 °C lavere enn smeltetemperaturen for primere og det vil medføre at komplementære sekvenser kan ha muligheten til å hybridisere til cDNA. Ekstensjonen er kombinert med amplifisering fordi det amplifiserte DNA (amplicon) er så lite. Ved ekstensjon vil primerutvidelse forekommer ved en rate på 100 basepar per sekund (Life technologies).

**Tabell 3: RT-qPCR program for SYBR Green (Life technologies).**

Trinn	Temperatur (°C)	Varighet (sek)	Antall sykluser
<b>Denaturering</b>	95	20	Hold
<b>Denaturering</b>	95	3	40
<b>Amplifisering og ekstensjon</b>	60	30	
<b>Smeltekurve</b>	95	15	Kontinuerlig
	60	60	
	95	15	
	60	15	

For å sjekke RT-PCR reaksjoner for primer-dimer artefakter og for å sikre reaksjonsspesifisitet ble en smeltekurve kjørt som vist i tabell 3 (Life technologies). RT-PCR maskinen vil vise et amplifiseringsplott med relativ fluorescens på y-aksen og syklusantall på x-aksen. Data samlet i den eksponentiale fasen i amplifiseringsplottet gir info om startmengden av målgenet som er undersøkt. Dette kvantifiserbare sluttrinnet i RT-qPCR er threshold cycle (Ct) som inverst relatert til mengden amplifiseringsprodukter i reaksjonen (dvs jo lavere Ct jo høyere er mengden av amplifiseringsprodukter) (Schmittgen og Livak, 2008). Vi valgte Ct-verdier ved en threshold på 0,2.

### 2.7.5 Bearbeiding av data

Ettersom effektivitet til både elongeringsfaktoren (normaliseringsgen) og målgenene (HE og CD8+) som ble brukt i dette forsøket var veldig like ble det vedtatt å bruke  $\Delta\Delta C_t$  metoden for å analysere  $C_t$ -verdiene fra RT-qPCR (Schmittgen og Livak, 2008). Kravet til denne metoden er at effektivitet for normaliseringsgenet og målgener er tilnærmet identisk.  $\Delta\Delta C_t$  metoden sammenligner resultater fra eksperimentelle prøver med både en kalibrator (ubehandlet prøve) og en normaliserer (husholdningsgen). Med denne metoden blir  $C_t$ -verdier for genet som er interessant (GOI) i både testprøvene og kalibratorprøvene justert i forhold til  $C_t$  fra normaliseringsgen i de samme to prøvene. De resulterende  $\Delta\Delta C_t$ -verdien er inkorporert for å bestemme fold-forskjellen i uttrykk.  $\Delta\Delta C_t$  beregnes etter følgende likninger 1-4 (Life technologies):

$$\text{Likning 1: } C_{t \text{ GOI}}^{\text{sample}} - C_{t \text{ norm}}^{\text{sample}} = \Delta C_{t \text{ sample}}$$

$$\text{Likning 2: } C_{t \text{ GOI}}^{\text{calibrator}} - C_{t \text{ norm}}^{\text{calibrator}} = \Delta C_{t \text{ calibrator}}$$

$$\text{Likning 3: } \Delta C_{t \text{ sample}} - \Delta C_{t \text{ calibrator}} = \Delta\Delta C_t$$

$$\text{Likning 4: } 2^{\Delta\Delta C_t} = \text{Fold induction}$$

$(C_{t \text{ GOI}}^{\text{sample}})$  er  $C_t$ -verdien for genet som er interessant (gene of interest, GOI) i testprøven, mens  $(C_{t \text{ norm}}^{\text{sample}})$  er  $C_t$ -verdien for normaliseringsgenet (elongeringsfaktor) i testprøven.  $C_t$  ( $C_{t \text{ GOI}}^{\text{calibrator}}$ ) er  $C_t$ -verdien for GOI i kalibratorprøven (ubehandlet prøve) som i vårt tilfelle er pcDNA3.3.  $(C_{t \text{ norm}}^{\text{calibrator}})$  er  $C_t$ -verdien for normaliseringsgenet i kalibratorprøven.

For å undersøke om forskjellene mellom de ulike prøvene i  $2^{\Delta\Delta C_t}$  er signifikant forskjellig fra hverandre ble det utført en uparret student t-test av verdiene og det ble ansett som at verdien var signifikant forskjellig når en  $p < 0,05$

## 3. Resultater

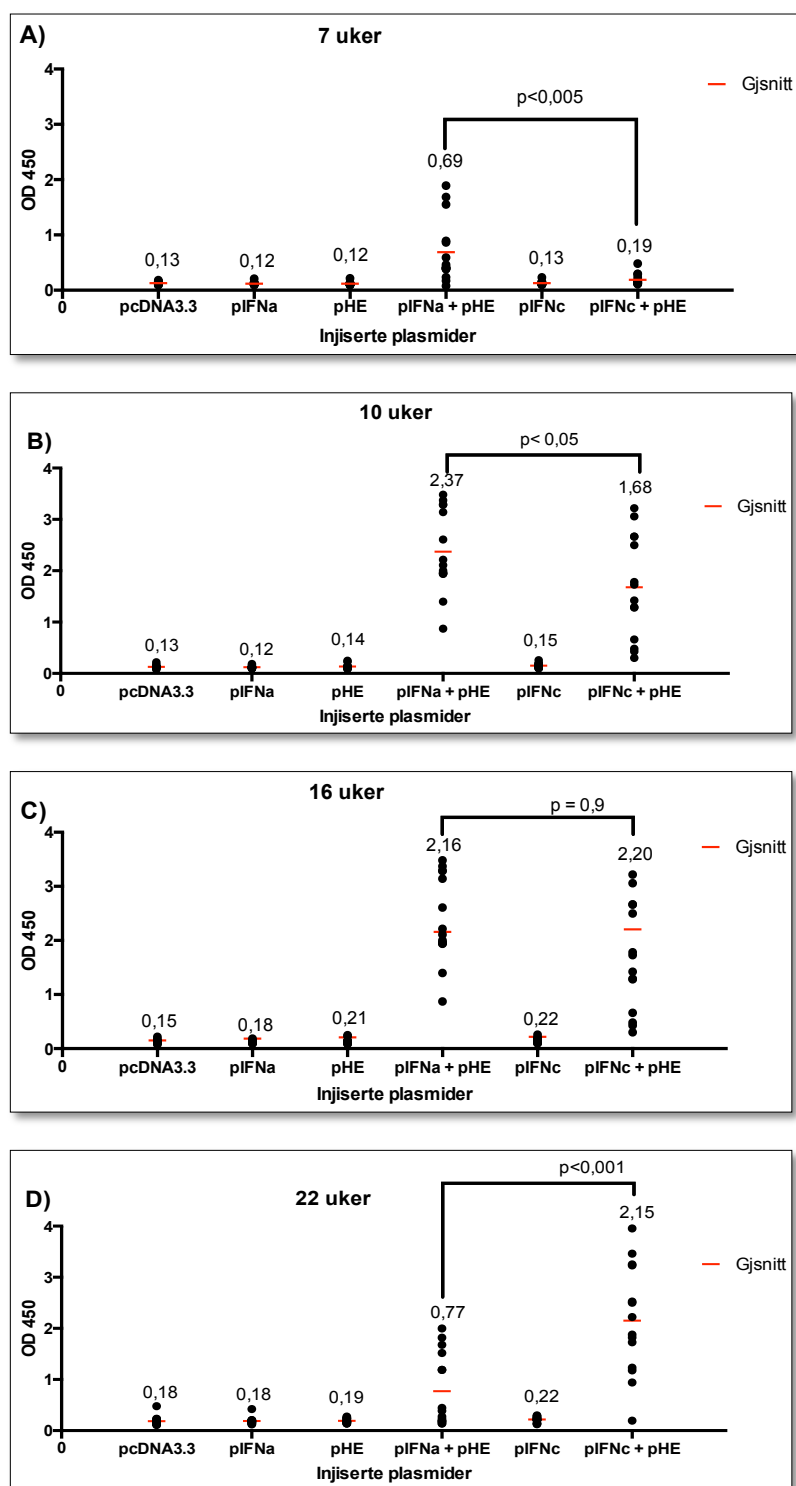
---

### 3.1 Antistoffresponser hos laks mot ILAV 7 til 22 uker etter injeksjon av HE-plasmid sammen med IFN-plasmid

Tidligere forsøk har vist at injeksjonen av IFN-plasmid (pIFNa, pIFNb eller pIFNc) sammen med HE-plasmid (pHE) gir økt IgM antistoffrespons mot ILAV 8-10 uker etter vaksinerings (Chang et al., 2015). Her ville vi undersøke antistoffresponsen over et lengre tidsrom og valgte da å sammenligne adjuvanteffekten av pIFNa og pIFNc. Grupper av fisk ble injisert i.m. med henholdsvis pcDNA 3.3, IFNa, HE, IFNa +HE, IFNc og IFNc+HE. IgM antistoffrespons mot ILAV ble målt med ELISA med inaktivert ILAV som antigen som vist i Fig. 11. Som observert av Chang et al. (2015) var det kun vaksinerings med pHE sammen med pIFNa eller pIFNc som resulterte i økt antistoffrespons. Forsøket viste imidlertid en påfallende forskjell i antistoffproduksjonen som funksjon av tid ved bruk av pIFNa og pIFNc som adjuvant.

Ved 7 og 10 uker etter injeksjonen av pIFNa+pHE var antistoffresponsen signifikant høyere enn etter injeksjonen av pIFNc+pHE. Ved 16 uker etter injeksjonen var det imidlertid ikke en signifikant forskjell i adjuvanteffekt mellom pIFNa og pIFNc sammen med pHE. Ved 22 uker etter injeksjonen var antistoffresponsen hos fisk injisert med pIFNa +pHE signifikant lavere enn hos fisk injisert med pIFNc + pHE. Forsøket tyder altså på at antistoffresponsen hos fisk injisert med pIFNa +pHE begynner tidligere enn hos fisk injisert med pIFNc+pHE og har en topp 10-16 uker etter vaksinerings for deretter å avta. Antistoffresponsen hos fisk injisert med pIFNc +pHE starter etter 7 uker og fortsetter deretter å øke og er størst i uke 16 og uke 22. En kan ikke avgjøre om det er forskjell i antistoffrespons for denne gruppen ved uke 16 og uke 22 ut fra disse målingene.

## Resultater

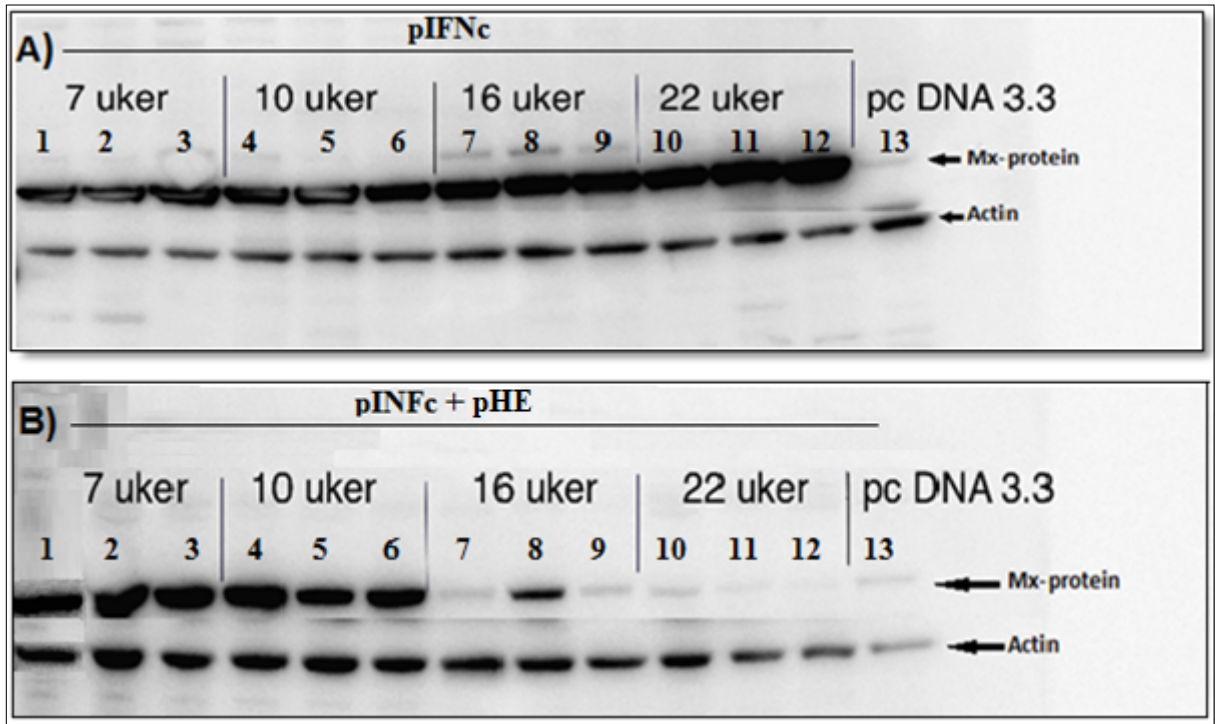


Figur 11: Optisk tetthet (OD) av antistoffer mot HE fra ILAV i serum hos presmolt laks ved ulike tidspunkter etter injeksjon i.m. av pcDNA, pIFNa, pHE, pIFNa+pHE, pIFNc eller pIFNc+ pHE. (A) 7 uker, (B) 10 uker, (C) 16 uker og (D) 22 uker etter injeksjon. IgM antistoffrespons ble målt med ELISA ved bruk av renset ILAV som adsorpsjonsantigen. Antall individer per gruppe med plasmider var n= 15. Tallene over punktene er gjennomsnittlig OD av antistoffene. Statistisk signifikante forskjeller mellom pIFNa + pHE og pIFNc+ pHE ( $p < 0,05$ ) er vist direkte i Fig og er regnet ut ved bruk av uparet student t-test i excel.

### **3.2 Effekt av HE-plasmid sammen med IFN-plasmid på produksjonen av Mx i lever fra laks 7 til 22 uker etter immunisering**

I et tidligere forsøk er det detektert Mx-protein i lever fra laks 1 uke etter injeksjon av INFc som videre økte 3 og 8 uker etter injeksjonen. I samme forsøket ble Mx-proteinet nesten ikke detektert i lever fra laks injisert med kontrollplasmid ved noen av tidspunktene (Chang et al., 2014). I dette forsøket ble uttrykket av Mx i leveren hos laks undersøkt over et lengre tidsrom. Hypotesen var at laks injisert med pIFNc ville gi et vedvarende uttrykk av Mx, mens laks injisert med pIFNc sammen med pHE ville gi en reduksjon i uttrykk av Mx over tid. Dette fordi vi forventet at celler som uttrykker HE blir eliminert av den adaptive immunresponsen som er induert ved vaksinerings med HE-plasmid. Grupper av fisk (5 individer i hver) ble injisert med pcDNA3.3, pIFNa, pHE, pIFNa+pHE, pIFNc eller pIFNc +pHE. Uttrykket av Mx-protein ble undersøkt med Western blotting som vist i Fig.12. Resultatene støttet hypotesen. Injeksjon av pIFNc resulterte i et vedvarende uttrykk av Mx-protein i minst 22 uker etter vaksinerings, mens injeksjon av pINFc +pHE resulterte i et redusert uttrykk av Mx 16 uker etter vaksinerings og 22 uker etter vaksinerings ble det ikke funnet uttrykk av Mx. I tillegg virker det som at injiseringen av pIFNc ga et økende uttrykk av Mx utover i forløpet, men det er vanskelig å si helt sikkert fordi intensiteten i Mx-båndene ikke ble kvantifisert. Det ble ikke detektert Mx i lever fra fisk som var injisert med pcDNA 3.3, pIFNa, pHE eller pIFNa+pHE.



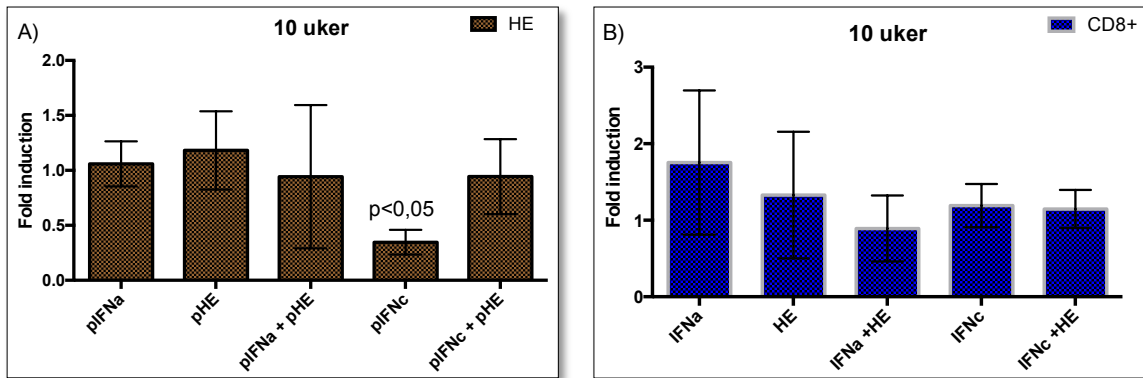


Figur 12: Tidsstudium av Mx- proteinuttrykk i lever hos presmolt laks injisert i.m. med (A) pIFNc og (B) pIFNc+pHE. Leverprøvene var høstet 7, 10, 16 og 22 uker etter injisering og analysert for Mx-protein ved immunoblotting. Gelen var ladet med 10 µg protein fra hver av tre fisker ved 7 uker (bånd 1-3), 10 uker (bånd 4-6), 16 uker (bånd 7-9), 22 uker (bånd 10-12). Ved pcDNA3.3 er det ett individ (bånd 13) av presmolt laks 7 uker etter vaksinering, og dette er brukt som negativ kontroll. Blottemembranen var inkubert med antistoff mot Mx og actin. Actin er bruk som en positiv kontroll.

### **3.3 Forsøk på å teste om CTL dreper muskelceller som uttrykker HE i vaksinert fisk**

Laks vaksinert med pHE sammen med et IFN-plasmid gir god beskyttelse mot ILAV-infeksjoner (Chang et al., 2015). Robertsens gruppe arbeider videre med å finne ut om CTL er involvert i beskyttelsen. Hypotesen er at CTL dreper muskelceller som fremviser HE sammen med MHC I i vaksinert fisk. Følgelig burde reinjeksjonen av pHE i vaksinert fisk føre til at celler som uttrykker HE bli ødelagt på grunn av angrep av CTL. Min oppgave var å teste denne hypotesen ved å måle om mRNA av HE vil være mindre hos vaksinert fisk enn hos uvaksinert fisk som reinjiseres med pHE. Vi ville samtidig undersøke om CD8 mRNA i injeksjonsstedet var forskjellig hos vaksinert og uvaksinert fisk etter reinjeksjon med pHE. I det første forsøket ble presmolt vaksinert på følgende måte. Grupper av fisk ble injisert i.m. med henholdsvis pcDNA 3.3, pIFNa, pHE, pIFNa+pHE, pIFN eller pINFc +pHE. Ti uker senere ble fisken reinjisert med pHE i muskelen på motsatt side og muskelprøver fra reinjeksjonsstedet ble høstet 1 uke etter reinjeksjonen. pHE ble injisert for å indusere en inflammasjon som ved en virusinfeksjon. Uttrykket av HE og CD8 i muskelprøver fra reinjeksjonsstedet ble målt med RT-qPCR som vist i Fig. 13. Forsøket viste at det var en signifikant nedgang av HE transkript hos fisk 10 uker etter at de var injisert med pINFc og reinjisert med pHE sammenlignet med fisk injisert med pcDNA 3.3. Det ble ikke funnet signifikante forskjeller i CD8 transkript mellom fisker som var injisert med de ulike plasmidene og deretter reinjisert med pHE. Utgangshypotesen ble altså ikke støttet av disse resultatene.

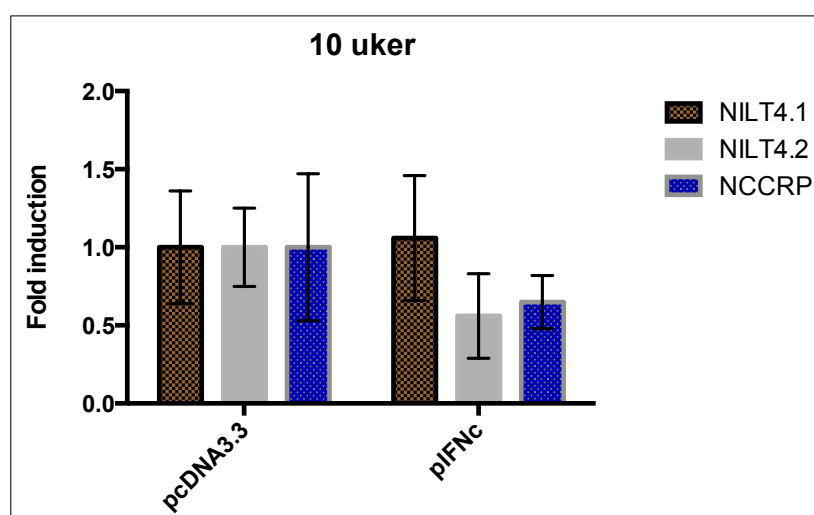
## Resultater



Figur 13: Gjennomsnittlig induksjon av (A) HE og (B) CD8+ i injeksjonsstedet hos presmolt laks 10 uker etter injeksjon i.m. av pcDNA3.3, pIFNa, pHE, pIFNa + pHE, pIFNc eller pIFNc+pHE og 7 dager etter reinjisering av pHE. Fem grupper av presmolt (n=5) var injisert med de overnevnte plasmidene. Uttrykket av HE og CD8 hos fisk injisert med pcDNA3.3 er satt til 1 og derfor er pcDNA3.3 ikke vist i figuren. Ved hjelp av en uparet student t-test der  $p < 0,05$  er ansett som signifikant fra pcDNA3.3 er det vist direkte i figuren. Stolpene representerer stdav.

### 3.4 Skyldes nedgang av HE-transkript i muskel hos fisk vaksinert med pIFNc angrep på NK-celler?

I forrige forsøket ble det funnet en signifikant reduksjon i uttrykk av HE 10 uker etter injisering av pIFNc og 1 uke etter reinjisering av pHE. Dette dannet grunnlaget for å sjekke om årsaken til denne reduksjonen kunne være NK-celler, ettersom det ikke ble observert en økning i CD8+ i dette forsøket. Uttrykk av to mulige markørgener for NK-celler hos laks ble målt med RT-qPCR. Hypotesen er at pIFNc stimulerer NK-celler til å tilintetgjøre celler som fremviser HE, derfor vil det være en økning av disse NK-cellene ved injeksjonsstedet. Forsøket viste imidlertid ingen forskjell i uttrykk av de to NK-lignende genene hos fisk vaksinert med pIFNc eller pcDNA 3.3 og reinjisert med pHE, som vist i Fig 14. Dette kan bety at enten er NK-celler ikke involvert i reduksjonen av HE transkript eller så er de undersøkte genene ikke markører for NK-celler hos fisk.



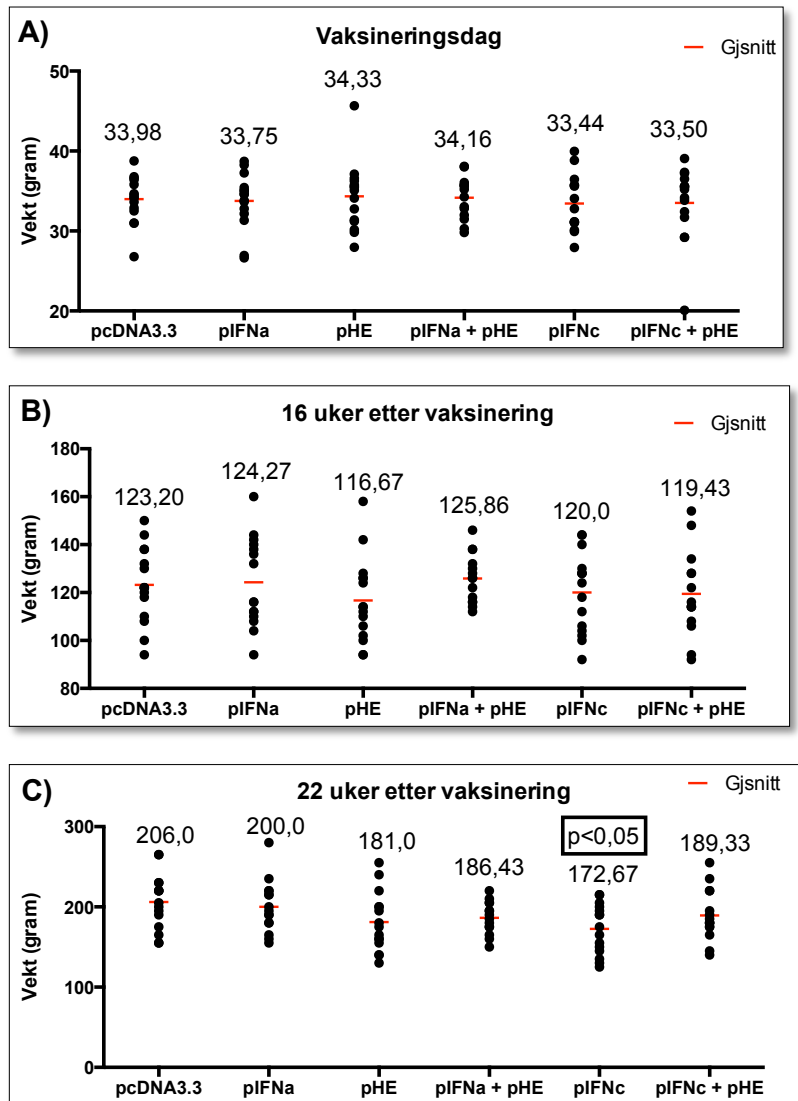
Figur 14: Gjennomsnittlig induksjon av NK-celle markørene, NILT 4.1, NILT 4.2 og NCCRP i injeksjonsstedet hos presmolt laks 10 uker etter injeksjon i.m. av pcDNA3.3 eller pIFNc og 7 dager etter reinjisering av pHE. Fem grupper av presmolt (n=5) var injisert med de overnevnte plasmidene. Uttrykket av NILT4.1, NILT4.2 og NCCRP hos fisk injisert med pcDNA3.3 er satt til 1. Ved hjelp av en uparet student t-test der  $p < 0,05$  er ansett som signifikant fra pcDNA3.3 er det vist direkte i figuren. Stolpene representerer stdav.

### 3.5 Effekt av vaksinerings med plasmider på vekten av fisken

Det er kjent at vaksinerings av fisk ved i.p. injeksjon av vaksiner formulert i oljeadjuvant gir reduksjon i vekst av fisk (Aunsmo et al., 2008). Dette kan skyldes adhesjoner og granulomer som kan hemme fordøyelsen og/eller enegetiske merkostnader gjennom immunreaksjonen som vaksinen induseres. DNA-vaksiner burde bare ha energetiske merkostnader siden de injiseres i muskel. I immuniseringsforsøket (pk 3.2) ville vil samtidig undersøke om i.m. injeksjon med pIFNa eller pIFNc alene eller sammen med pHE påvirket veksten hos fisken. Grupper av fisker ble her injisert i.m. med pcDNA 3.3, pIFNa, pHE, pIFNa + pHE, pIFNc eller pIFNc + pHE. Hver av fiskene ble PIT-tag merket. Vekten av fisk i gram ble målt 0, 16 og 22 uker etter vaksinerings. Hypotesen i dette forsøket er at fisk som er injisert med pIFN sammen med pHE vil ha en redusert vekst sammenlignet med fisk som er injisert med kontrollplasmidet fordi pIFN sammen med pHE vil øke de antigene interaksjonene i fiskene.

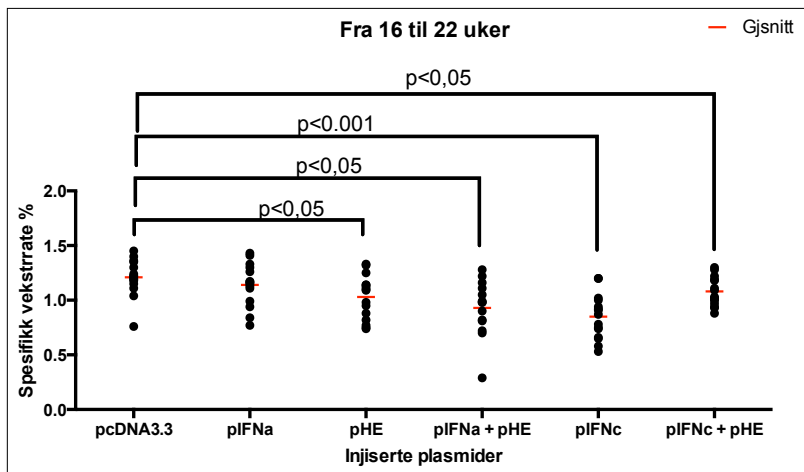
Som vist i Fig 15. var det ikke signifikante forskjeller i vekt (gram) ved 0 eller 16 uker etter vaksinerings hos fisk injisert med pcDNA 3.3 sammenlignet med fisk injisert med pIFNa, pHE, pIFNa +pHE, pIFNc eller pIFNc+pHE. Derimot, 22 uker etter vaksinerings er det en signifikant forskjell ( $p < 0,05$ ) i vekt hos fisk injisert med pIFNc sammenlignet med fisk injisert med pcDNA 3.3.

## Resultater



Figur 15: Gjennomsnittsvekt (g) av presmolt laks etter i.m. injisering av pcDNA 3.3, pIFNa, pHE, pIFNa+pHE, pIFNc eller pIFNc + pHE. (A) 0 uker etter vaksineringsdag. (B) 16 uker etter vaksineringsdag. (C) 22 uker etter vaksineringsdag. Antallet av fisk veide 0, 16 og 22 uker etter vaksineringsdag var n=15. Statistisk signifikante forskjeller mellom pIFNs + pHE og pcDNA 3.3 er beregnet ved en uparet student t-test ( $p < 0,05$ ). I figuren er det vist hvor  $p < 0,05$ .

Det var det heller ingen signifikante forskjeller i spesifikk vekstrate (SGR %) 112 dager etter vaksinerings mellom fisk injisert med pcDNA 3.3, pIFNa, pHE, pIFNa +pHE, pIFNc eller pIFNc +pHE. Derimot, fra 112 til 156 dager ble det registrert en svært signifikant ( $p < 0,001$ ) lavere SGR hos fisk injisert med IFNc sammenlignet med fisk injisert med pcDNA 3.3, som det er vist i Fig. 16. I tillegg ble det funnet en signifikant lavere SGR ( $p < 0,05$ ) hos fisk injisert med pHE, pIFNa+ pHE og pIFNc+ pHE sammenlignet med fisk injisert med kontrollplasmidet. SGR hos fisk injisert med pcDNA 3.3 holdt seg relativt stabilt rundt 1,2 både 112 og 154 dager etter vaksinerings.



Figur 16: Spesifikke vekstrate i % (SGR) hos fisk fra 16 til 22 uker etter at de var injisert med pcDNA 3.3, pIFNa, pHE, pIFNa +pHE, pIFNc og pIFNc +pHE. SGR er uttrykket for den daglige vektøkningen beregnet ved hjelp av likningen  $SGR = (\ln wt_2 - \ln wt_1) \times 100 / (T_2 - T_1)$ , der  $wt_2$  er sluttvekten,  $wt_1$  er startvekten,  $T_1$  er starttid i dager og  $T_2$  er sluttid i dager for eksperimentet. Signifikante forskjeller er beregnet ved bruk av uparet student t-test der  $p < 0,05$ .

---

## 4. Diskusjon

---

### 4.1 Adjuvant effekten av IFN-plasmidene på antistoffproduksjonen mot ILAV.

At pHE sammen med pIFN gir forhøyede antistoffresponser sammenlignet med pHE alene tyder på at type I IFN fungerer godt som adjuvant i DNA-vaksine mot ILAV hos laks (Chang et al., 2015). Dette ble bekreftet gjennom disse resultatene. Tidsstudiet viste imidlertid en interessant forskjell i adjuvanteffekt mellom pIFNa og pIFNc. Det viste seg nemlig at pIFNa og pIFNc sammen med pHE ga ulik kinetikk i antistoffresponser hos fisken. Antistoffresponser hos fisk injisert med pIFNa økte fra 7 til 16 uker etter vaksinerings og ble redusert 22 uker etter vaksinerings. Antistoffresponser hos fisk injisert med pIFNc var veldig lav 7 uker etter vaksinerings, det var nesten like lavt som hos fisk injisert med pcDNA3.3, mens 10 og 16 uker etter vaksinerings økt antistoffresponser, og 22 uker etter vaksinerings var antistoffresponser omtrent som ved 16 uker. Det kan være flere årsaker til dette, men den mest påfallende forskjellen i aktivitet mellom i.m. injeksjon av pIFNa og pIFNc er at pIFNc gir en systemisk oppregulering av antivirale gener i levende atlantisk laks, mens pIFNa kun oppregulerer antivirale gener ved injeksjonsstedet (Chang et al., 2014). I muskel ved injeksjonsstedet gir pIFNa og pIFNc lignende oppregulering av antivirale gener og av IgM, IgT og CD8+ (Chang et al., 2014; Chang et al., 2015). At plasmider med IFNa+HE resulterte i en signifikant lavere antistoffresponser enn IFNc+HE etter 22 uker kan skyldes at IFNc aktiverer en del mer antivirale gener enn det IFNa kan gjøre, siden IFNc har vist å ha en systemiske effekt. Disse ekstra aktiverte antivirale genene kan videre føre til en økt produksjon av antistoffer.

Injeksjonen av pIFNc sammen med pHE resulterte i en antistoffproduksjon som varte i minst 22 uker etter injeksjonen. I et studium av DNA-vaksine som inneholdt et plasmid med G-proteinet fra infeksjøs hematopoietisk nekrose virus (IHNV) ble en økt antistoffproduksjon målt 3 måneder etter vaksinerings, mens etter 6 og 12 måneder hadde antistoffproduksjonen gått ned og etter 25 måneder var det ingen detekterbare nivåer av antistoffer (Kurath et al., 2006). Likevel, selv om antistoffresponser hadde gått ned var fisken motstandsdyktig mot IHNV infeksjoner hele 2 år etter vaksinerings (Kurath et al., 2006). Til forskjell fra våre studier ble antistoffresponser i arbeidet til Kurath et al. (2006) målt som virusnøytraliserende antistoff og ikke med ELISA.



## 4.2 IFNc- plasmid gir vedvarende uttrykk av Mx i minst 22 uker etter vaksinerings

At uttrykket av Mx-protein i lever hos fisk injisert med IFNc varte i minst 22 uker, tyder for det første på at muskelcellene som har tatt opp IFNc-plasmid fortsetter å produsere IFNc i lang tid i fisken. For det andre blir de IFNc-produserende cellene følgelig heller neppe angrepet av det adaptive immunsystemet. Dette skyldes sannsynligvis at IFNc ikke blir oppfattet som fremmed av immunsystemet fordi proteinet finnes naturlig hos laks. Dette indikerer at i.m. injeksjon av pIFNc alene kan gi systemisk induksjon av antivirale proteiner relativt lenge hos laks. Lignende observasjoner er gjort med laks som ble injisert i.m. med plasmid som uttrykker luciferase. Luciferase- transkript ble vist å være uttrykt ved injeksjonsstedet 535 dager etter i.m. injeksjon av plasmidet i atlantisk laks (*Salmo salar*) (Tonheim et al, 2007). Luciferase- transkrip ble uttrykt i 2 år i glass malle (*Kryptopterus bicirrhus*) (Dijkstra et al., 2001) og 112 dager i sebrafisk (*Danio rerio*) etter i.m. injeksjon av luciferase (Heppell et al., 1998). Årsaken til langvarig uttrykk av luciferase har vært forklart med at immunsystemet ikke klarer å oppdage det eller gi en sterk nok immunrespons mot dette proteinet, siden luciferase uttrykkes intracellulært i peroxisomer (Davis et al., 1997).

### **4.3 IFNc plasmid sammen med HE-plasmid gir redusert uttrykk av Mx-protein 16 uker etter vaksinerings**

At uttrykket av Mx-proteinet i lever hos fisk injiserte med pIFNc sammen med HE ble kraftig redusert 16 og 22 uker etter injeksjon, indikerer at muskelceller tar opp pIFNc og pHE samtidig og at de dermed blir angrepet og ødelagt av det adaptive immunsystemet fordi celler som uttrykker HE blir oppfattet som virus-infiserte celler. Dermed synker IFNc-produksjonen og den systemiske induksjonen av Mx i fisken synker. Det at dette ikke inntreffer før 16 og 22 uker etter vaksinerings tyder på at det adaptive immunsystemet er involvert. Faktisk korrelerer nedgangen i Mx i lever med antistoffproduksjonen mot HE selv om dette ikke beviser at antistoffer er involvert i drap av muskelceller som uttrykker HE.

I forsøk med DNA-vaksinerings av regnbueørret med plasmid som uttrykker G-proteinet fra viral hemoragisk septikemi virus (VHSV) ble det vist ved immunhistokjemi at de transfekterte muskelcellene forsvant gradvis 16-23 dager etter vaksinerings, og 31-38 dager etter vaksinerings var det nesten ikke mulig å detektere G-positive muskelceller i injeksjonsstedet (Lorenzen et al., 2005). I andre forsøk med DNA-vaksiner er det også vist at injiserte plasmider som uttrykker antigen sammen med luciferasemarkør forsvinner etter 14 dager i regnbueørret (Heppel et al., 1998) og etter 14-21 dager i mus (Payette et al., 2001). Vi kan dermed ikke utelukke at muskelceller som hadde tatt opp pHE og pIFNc i vårt forsøk kan ha blitt angrepet tidligere enn 16 uker etter vaksinerings. Langvarig uttrykk av Mx-protein i leveren kan også skyldes at Mx-protein er ganske stabilt (Ronnie et al., 1993; Horisberger et al., 1992). Hvilke mekanismer som er involvert i eliminasjonen av celler som uttrykker virusantigener etter DNA-vaksinerings er foreløpig ikke klarlagt. At en betennelsesreaksjon i fisk oppstår i injeksjonsstedet like etter i.m. injeksjon av DNA-vaksiner er vist i flere forsøk (McLAuchlan et al., 2003; Lorenzen et al., 2005). For eksempel, i et forsøk med DNA-vaksiner med plasmid som uttrykket G-protein mot VHSV ble det vist ved immunhistokjemi fra injeksjonsstedet at muskelceller med G-protein på overflate var omgitt av makrofager som utøvede økt fagocytiske aktivitet mot cellene. I tillegg ble det også observert lymfocyttilignende celler som utførte cytolytisk aktivitet (Lorenzen et al., 2005).

Hos mus er det vist at MHC klasse II positive profesjonelle antigenpresenterende celler (APC) som makrofager, dendrittiske celler og B-celler er svært viktige deltakere i ødeleggelsen og tilintetgjørelsen av muskelceller som uttrykker virusantigen etter i.m. injeksjon av DNA-vaksine (Payette et al., 2001). I et annet forsøk av DNA-vaksine injisert i.m. i mus er det vist at CD8<sup>+</sup> cytotoksiske T-celler blir aktivert og angriper og til slutt eliminerer eller deltar i eliminering av celler som uttrykker vaksineantigenene (Yokoyama et al., 1997). CD8<sup>+</sup> celler rekrutteres til muskelinjeksjonsstedet både ved injeksjon av IFN-plasmider (Chang et al., 2015) og ved injeksjon av plasmid som uttrykker G-protein fra VHSV (Cuesta et al., 2010). På bakgrunn av dette kan CTL også ha bidratt til reduksjonen av muskelceller som uttrykker HE og IFN $\gamma$  i vårt forsøk.

Selv om muskelcellene med HE og IFN $\gamma$  virker å bli eliminert av immunsystemet, er produksjonen av antistoffer fremdeles tilstede 22 uker etter vaksinerings. I tillegg som vist av Chang et al (2015) er beskyttelsen mot ILAV tilstede 8 uker etter vaksinerings. Dette kan tyde på at fisken har hukommelse for HE fra vaksinen og når den møter HE fra ILAV igjen gir den et godt spesifikk forsvar mot HE. I tillegg/eller så kan dette skyldes at antigenuttrykket er på et lavere nivå i andre celler, men det må undersøkes nærmere (Davis et al., 1996). For å vite helt sikkert hvilke celler som er årsaken til reduksjonen av muskelceller med IFN $\gamma$  og HE kunne det blitt utført en immunhistokjemi der spesifikke celler ble farget og at det ble gjort ved ulike tidspunkter. På denne måten kunne immunmekanismene i injiseringsstedet bli mer kartlagt. At det ble detektert Mx-protein 7 og 10 uker etter vaksinerings hos fisk vaksinert med IFN $\gamma$  sammen med HE kan også forklare hvorfor det tok tid før antistoffresponser av fisk vaksinert med IFN $\gamma$  sammen med HE økte (som er vist i avsnitt 3.1). Fisken kan ha brukt mer energi til Mx-produksjon som videre medførte en sen start på antistoffproduksjonen.

#### **4.4 Reinjeksjonsstudiet av HE-forsøk på å påvise CTL aktivitet i DNA-vaksinert fisk**

Dersom CTL er involvert i den adaptive immunresponsen som induseres hos fisk vaksinert med IFN-plasmid og HE-plasmid, forventet vi en reduksjon i HE-transkript ved reinjeksjon av pHE sammenlignet med fisk som var vaksinert med kontrollplasmid. Det ble imidlertid ikke detektert en reduksjon i HE transkript hos fisk 10 uker etter vaksinerings med pIFNc samme med pHE og 7 dager etter reinjeksjonen av pHE. Dette indikerer at CTL ikke dreper muskelceller som uttrykker HE ved reinjeksjon av pHE, men det betyr ikke at CTL ikke er involvert i den adaptive immunresponsen som induseres ved vaksinerings med pIFN + pHE. Det var overraskende at fisk vaksinert med pIFNc og reinjisert med pHE resulterte i en signifikant nedgang av HE-transkript i injeksjonsstedet hos fisk 10 uker etter immunisering. Dette indikerer at IFNc aktiverer forsvarsmekanismer som eliminerer muskelceller som fremviser HE. Muligens aktiverer IFNc naturlige dreper celler og/eller fagocytiske celler. Men det kan også hende at IFNc nedregulerer HE transkripsjonen. På bakgrunn av resultatene i 4.4.2 ble det gjort forsøk på detektere nivåer av NK-celler eller CTL i muskel ved reinjeksjon av pHE i fisk vaksinert med pIFNc. Det ble imidlertid ikke observert en økning av NK-celle markørene NILT4 eller NCCRP eller CTL-markøren CD8. Dette kan tyde på at andre celler/mekanismer er involvert i dreping av HE-uttrykkende celler eller at nedgangen i HE-transkript skyldes at IFNc nedregulerer genuttrykket.

#### 4.5 IFNc plasmid gir redusert vekst av fisk fra 16 til 22 uker

Det var ingen signifikante forskjeller i vekt hos fisk 16 uker etter vaksinerings med pIFNa, pHE, pIFNa + pHE, eller pIFNc + pHE. Det var heller ingen signifikante forskjeller i vekt hos fisk 22 uker etter vaksinerings med pIFNa, pHE, pIFNa, pIFNa+pHE eller pIFNc+ pHE. Derimot, var det en signifikant forskjell i vekt (gram) hos fisk injisert med pIFNc sammenlignet med fisk injisert med pcDNA3.3 22 uker etter vaksinerings. I tillegg, ble det fra 16 til 22 uker etter vaksinerings registrert en svært signifikant ( $p < 0,001$ ) lavere spesifikk veksthastighet (SGR) hos fisk injisert med pIFNc sammenlignet med fisk injisert med pcDNA3.3. Fra 16 til 22 uker ble det også registrert signifikant ( $p < 0,05$ ) lavere SGR hos fisk injisert med pHE, pIFNa +pHE eller pIFNc +pHE. Dette tyder på at plasmidene gir en negativ effekt på veksten hos fisken fra 16 til 22 uker etter vaksinerings. Dette kan skyldes kontinuerlig systemisk induksjon av antivirale gener hos fisk vaksinert med pIFNc alene eller induksjon av antistoff og T-celle respons hos fisk injisert med pHE +/- pIFN.

At IFNc gir en mer signifikant reduksjon i vekt kan forklares med at det er vist tidligere i dette forsøket at fisk som er injisert med pIFNc har en langtidseffekt på produksjonen av Mx minst 22 uker etter vaksinerings, men som ikke er tilfellet hos fisk injisert med pIFNc sammen med pHE. At fisk vaksinert med pIFNa ikke gir en signifikant reduksjon i vekst eller SGR kan skyldes at IFNa holder seg i injeksjonsstedet og har vist å liten systemisk effekt. Ettersom det kun er undersøkt 15 individer per gruppe kan det ikke bli fastslått at dette resultatet er 100 % riktig, men det gir en indikasjon. Alle fiskegrupper har stått i samme kar med samme livsbetingelser gjennom hele forsøket. I tidligere forsøk av DNA-vaksiner med G-protein mot IHNV ble det ikke funnet signifikant forskjell i SGR mellom fisk injisert med DNA-vaksiner og kontrollplasmid 106, 201, 296 eller 413 dager etter vaksinerings (Skinner et al., 2008). Det ble imidlertid funnet en signifikant forskjell mellom kontrollfisk og fisk injisert med adjuvant olje vaksiner, men når alle fiskene ble satt ut i sjøen ble vekten av fiskene utjevnet og det var ingen signifikant forskjell mellom vaksinerte fisk og kontrollfisk (Skinner et al., 2008). Dette tyder på at fisk kan gjenopprette tapt vekt i ferskvannsfasen.

For å undersøke effekten av pHE+/- pIFN på vekst av laks nærmere burde det for det første vaksineres flere fisk, for eksempel 60 fisk per gruppe der det blir brukt PIT-tag merking av individuelle fisk. Dersom det ikke blir brukt PIT-tag for individuelle fisk burde det anvendes mye mer fisk som for eksempel hos Cook et al (2000) ble det brukt 660 transgene laks og 660 kontroll-laks. For det andre burde alle fiskegruppene bli holdt i et samlet stort kar selv om det undersøkes flere fisk enn det som ble gjort i vårt forsøk. Dette vil hindre potensielle kareffekter som kan skje dersom de ulike behandlingsgruppene blir holdt separat. For det tredje burde fiskene undersøkes over en lengre periode fra ferskvannsfasen til sjøfasen, som hos Skinner et al (2008). Dersom alt dette blir gjort kan man mye sikrere si effekten som vaksinerne har på fisken.

#### **4.6 Framtidsutsikter ved bruk av IFNs sammen med et antigen i en DNA-vaksine**

At adjuvanteffekten av IFN-plasmid i DNA-vaksine mot ILA-virus varer i minst 22 uker etter vaksineringsindikerer at slike vaksiner kan gi relativt langvarig beskyttende effekt. Dette er viktig siden kun DNA-vaksine med rhabdovirus basert på G-protein har vist tilfredsstillende beskyttelse mot virusinfeksjoner. Dette bør i framtiden også testes ut mot andre virus som forårsaker PD, CMS og HSMB. At IFN $\alpha$  virker å være uttrykt minst 22 uker etter vaksineringsindikerer at det har en langtidseffekt og dette er svært viktig når den nåværende produksjonsplanen for Atlantisk laks består av 8-18 måneder i ferskvann (Dale et al., 2013) og 18-20 måneder i sjøvann (Aunsmo et al., 2013). Om uttrykket av IFN $\alpha$  vil gå ned etter 22 uker vet vi ikke. For å forstå mer av langtidseffekten til vaksinen er dette viktig å vite og det vil hjelpe videre mot utviklingen av en god vaksine som inneholder interferoner.

At pIFN $\alpha$  sammen med pHE gir reduksjon i Mx protein 16 uker etter vaksineringsindikerer på at adaptive immunmekanismer er involvert i elimineringen av celler som har tatt opp og uttrykker HE. Hvilke adaptive mekanismer dette kan være ble ikke avdekket i dette forsøket. Det vil være viktig å finne ut hvilke mekanismer som er involvert fordi det kan gi ny måter å måle beskyttende effekt av vaksine. Modellen for å undersøke om CTL var involvert i beskyttelse mot ILAV-infeksjoner virket ikke, og det er fremdeles ukjent om CTL bidrar til den gode beskyttelse mot ILAV etter vaksineringsindikerer sammen med pHE. Andre metoder som microarray og immunhistokjemi kan kanskje bidra mer til å finne ut av dette. Fisk vaksinert med pIFN $\alpha$  og reinjisert med pHE hadde lavere uttrykk av HE-transkripter enn fisk vaksinert med kontrollplasmid og reinjisert med pHE. Dette kan bety at IFN $\alpha$  inducerer produksjon av celler som dreper muskelceller som uttrykker fremmed protein. En bør eventuelt forsøke å finne ut hvilke type celler dette er. At IFN $\alpha$  alene og sammen med HE tyder på å gi en reduksjon i vekst sammenlignet med kontrollfisk må også undersøkes nærmere.

I løpet av de siste tiårene har DNA-vaksiner blitt fremhevet som en av de mest lovende og virkningsfulle av vaksiner til fisk, hovedsakelig mot viruspatogener (Cuesta et al., 2010). Fordelene med DNA-vaksiner er at de induserer både humoral og cellemedierte immunresponser (Alonso og Leong, 2012), rask og billig å produsere og høy stabilitet i tørrpulver eller i løsning sammenlignet med andre vaksiner som for eksempel må oppbevares kjølig (Garcia-Sastre et al., 2013). DNA-vaksiner injisert intramuskulært (i.m.) er ikke påvirket av immunitet mot vektoren (Garcia-Sastre et al., 2013), som ofte er sett hos virusbaserte oljeadjuvantvaksiner i form av vevsskader og eller betennelsesresponser (Mutoloki et al., 2004). Den viktigste grunnen for bruk av DNA-vaksiner til fisk er at det gir beskyttelse mot virussykdommer der tradisjonelle vaksiner ikke er effektive nok (Tonheim et al., 2008).

Hovedargumenter mot bruk av DNA-vaksiner har vært relatert til sikkerhet og at det er et usikkerhetsmoment når det gjelder potensialet for at plasmid-DNA kan inkorporeres inn i arvematerialet til det vaksinert dyret og gå videre i arv til neste generasjon. Imidlertid, det er ingen eksperimentelle bevis for at intergrasjon av plasmider kan forekomme i fisk etter DNA-vaksinering. I tillegg er det usikkert om predatorer som spiser fisk kan spre DNA-vaksinen i miljøet. Dette må i framtiden undersøkes nærmere. Forbedret sikkerhet ved kontinuerlig utvikling av trygge vaksineringsstrategier til fisk og et bredere offentlig aksept vil bidra til at DNA-vaksiner kan bli brukt i USA og Europa (Alonso og Leong, 2012).

Hos pattedyr er DNA-vaksiner feltet stort og det vil antagelig fortsette å vokse med utvikling av nye metoder for å forsterke immuniteten til DNA-vaksiner. Nå om dagen er DNA-vaksiner i den tidlige fasen, men det er antatt at DNA-vaksiner vil bli viktigere i de kommende årene (Kumar et al., 2013). I løpet av de siste årene har en rekke cytokin-gener blitt identifisert i mange fiskearter. Likevel, til tross for at bruk av cytokiner som adjuvanter har blitt mye utforsket i pattedyr har ikke mange studier fokusert på bruk av cytokin-gener som adjuvant i vaksiner til fisk. Dette er antatt å skyldes at for hoveddel av disse molekylene er mange av detaljene når det gjelder deres immunologiske roller ukjent (Tafalla et al., 2013) Forhåpentligvis vil resultatene i denne oppgaven bidra til veien videre i utviklingen av mer kunnskap om rolle til cytokinet interferon hos fisk og videre til bruk som adjuvant i DNA-vaksiner.



## 4.7 Konklusjon

- ❖ Atlantisk laks injisert intramuskulært (i.m) med plasmid som koder for interferon sammen med et plasmid som koder for hemagglutininesterase (pHE) gir forhøyede antistoffresponser sammenlignet med pHE alene bekrefter at type I IFN fungerer godt som en adjuvant i DNA-vaksine mot ILAV. Dette ble vist helt fram til avslutningstidspunktet av forsøket som var 22 uker etter vaksinerings.
- ❖ Kinetikken i antistoffresponser hos fisk injisert intramuskulært (i.m) med et plasmid som koder for IFNa (pIFNa) sammen med pHE er forskjellig fra fisk injisert i.m. med plasmid som koder for IFNc (pIFNc) sammen med pHE. pIFNa gir redusert antistoffrespons over tid fra 10 til 22 uker etter vaksinerings, mens pIFNc gir vedvarende høy antistoffrespons fra 10- 22 uker etter vaksinerings.
- ❖ pIFNc gir systemisk uttrykk av antiviralt Mx-protein i lever hos fisk minst 22 uker etter vaksinerings. Dette indikerer at pIFNc har langtidsvirkning.
- ❖ pIFNc sammen med pHE gir redusert uttrykk av Mx-protein i leveren 16 uker etter vaksinerings noe som indikerer at adaptive immunmekanismer er involvert i eliminering av muskelceller som uttrykker HE.
- ❖ pIFNc aktiverer immunologiske mekanismer 10 uker etter vaksinerings til å redusere uttrykk av HE 7 dager etter reinjisering av pHE.
- ❖ pIFNc gir redusert vekst hos fisk 16-22 uker etter vaksinerings sammenlignet med kontrollfisk. pIFNc sammen med pHE gir også en reduksjon i spesifikk vekstrate 16-22 uker etter vaksinerings.

## 5. Referanseliste

- Aamelfot, M., O. B. Dale and K. Falk (2014).** "Infectious salmon anaemia - pathogenesis and tropism." *Journal of Fish Diseases* 37(4): 291-307.
- Alonso, M. and J. A. Leong (2013).** "Licensed DNA Vaccines against Infectious Hematopoietic Necrosis Virus (IHNV)." *Recent Pat DNA Gene Seq* 7(1): 62-65.
- Aunsmo, A., P. S. Valle, M. Sandberg, P. J. Midtlyng and T. Bruheim (2010).** "Stochastic modelling of direct costs of pancreas disease (PD) in Norwegian farmed Atlantic salmon (*Salmo salar* L.)." *Preventive Veterinary Medicine* 93(2-3): 233-241.
- Anderson, D. P. and G. Jeney (1992).** "Immunostimulants Added to Injected *Aeromonas-Salmonicida* Bacterin Enhance the Defense-Mechanisms and Protection in Rainbow-Trout (*Oncorhynchus-Mykiss*)." *Veterinary Immunology and Immunopathology* 34(3-4): 379-389.
- Aunsmo, A., E. Skjerve and P. J. Midtlyng (2013).** "Accuracy and precision of harvest stock estimation in Atlantic salmon farming." *Aquaculture* 396: 113-118.
- Aunsmo, A., R. B. Larssen, P. S. Valle, M. Sandberg, O. Evensen, P. J. Midtlyng, A. Ostvik and E. Skjerve (2008).** "Improved field trial methodology for quantifying vaccination side-effects in farmed Atlantic salmon (*Salmo salar* L.)." *Aquaculture* 284(1-4): 19-24.
- Arkoosh, M. R. and S. L. Kaattari (1991).** "Development of Immunological Memory in Rainbow-Trout (*Oncorhynchus-Mykiss*) .1. An Immunochemical and Cellular Analysis of the B-Cell Response." *Developmental and Comparative Immunology* 15(4): 279-293.
- Avtalion, R. R. (1969).** "Temperature Effect on Antibody Production and Immunological Memory, in Carp (*Cyprinus-Carpio*) Immunized against Bovine Serum Albumin (Bsa)." *Immunology* 17(6): 927-&.
- Bleie, H og Skrudland, A. (2014)** Tap av Laksefisk i Sjø. Rapport fra mattilsynet. s.1-36. Tilgjengelig fra: [http://www.mattilsynet.no/fisk\\_og\\_akvakultur/fiskevelferd/tap\\_av\\_laksefisk\\_i\\_sjo\\_rapport.15430/binary/Tap%20av%20laksefisk%20i%20sjo%20rapport](http://www.mattilsynet.no/fisk_og_akvakultur/fiskevelferd/tap_av_laksefisk_i_sjo_rapport.15430/binary/Tap%20av%20laksefisk%20i%20sjo%20rapport) Nedlastet: 04.04.15
- Bornø, G og Linaker, M (red) (2015).** Fiskehelse rapporten 2014, Harstad: Veterinærinstituttet.
- Chang, C. J., B. Sun and B. Robertsen (2015).** "Adjuvant activity of fish type I interferon shown in a virus DNA vaccination model." *Vaccine*.
- Chang, C. J., C. Robertsen, B. J. Sun and B. Robertsen (2014).** "Protection of Atlantic salmon against virus infection by intramuscular injection of IFNc expression plasmid." *Vaccine* 32(36): 4695-4702.
- Cook, J. T., M. A. McNiven, G. F. Richardson and A. M. Sutterlin (2000).** "Growth rate, body composition and feed digestibility/conversion of growth-enhanced transgenic Atlantic salmon (*Salmo salar*)." *Aquaculture* 188(1-2): 15-32.
- Cuesta, A., E. Chaves-Pozo, A. I. de Las Heras, S. R. Saint-Jean, S. Perez-Prieto and C. Tafalla (2010).** "An active DNA vaccine against infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) with a different mode of action than fish rhabdovirus DNA vaccines." *Vaccine* 28(19): 3291-3300.
- Dale, T., Dkhar, N.B., Goswami, D., Weber Smit, A og Åtland, Å (2013).** Pre- project: Climate Change as an Opportunity towards Adaptive Sustainable Aquaculture (CADINAL). NIVA. Report no. 6563-2013. 1-33.

- Davis, H. L., C. L. Millan and S. C. Watkins (1997).** "Immune-mediated destruction of transfected muscle fibers after direct gene transfer with antigen-expressing plasmid DNA." *Gene Ther* 4(3): 181-188.
- De Haes, W., Pollard, C., Vanham, G and Rejman, J.(2012).** "Wrapped Up" Vaccines in the Context of HIV-1 Immunotherapy, Immunodeficiency, Prof. Krassimir Metodiev (Ed.), ISBN: 978-953-51-0791-0, InTech, DOI: 10.5772/51583. Available from: <http://www.intechopen.com/books/immunodeficiency/-wrapped-up-vaccines-in-the-context-of-hiv-1-immunotherapy>.
- Dijkstra, J. M., H. Okamoto, M. Ototake and T. Nakanishi (2001).** "Luciferase expression 2 years after DNA injection in glass catfish (*Kryptopterus bicirrhus*)." *Fish Shellfish Immunol* 11(2): 199-202.
- Eaton, S. L., M. L. Hurtado, K. J. Oldknow, L. C. Graham, T. W. Marchant, T. H. Gillingwater, C. Farquharson and T. M. Wishart (2014).** "A guide to modern quantitative fluorescent western blotting with troubleshooting strategies." *J Vis Exp*(93): e52099.
- Elemans, M., N. K. S. al Basatena and B. Asquith (2012).** "The Efficiency of the Human CD8+T Cell Response: How Should We Quantify It, What Determines It, and Does It Matter?" *Plos Computational Biology* 8(2).
- Evensen, O. and J. A. C. Leong (2013).** "DNA vaccines against viral diseases of farmed fish." *Fish & Shellfish Immunology* 35(6): 1751-1758.
- Evensen, O., B. Brudeseth and S. Mutoloki (2005).** "The vaccine formulation and its role in inflammatory processes in fish--effects and adverse effects." *Dev Biol (Basel)* 121: 117-125.
- Faisal, M., I. I. Ahmed, G. Peters and E. L. Cooper (1989).** "Natural Cyto-Toxicity of Tilapia Leukocytes." *Diseases of Aquatic Organisms* 7(1): 17-22.
- Fischer, U., E. O. Koppang and T. Nakanishi (2013).** "Teleost T and NK cell immunity." *Fish Shellfish Immunol* 35(2): 197-206.
- Fiskeri- og kystdepartementet.** LOV 2009-06-19-97: Lov om dyrevelferd (Dyrevelferdsloven). Tilgjengelig fra: <https://lovdata.no/dokument/NL/lov/2009-06-19-97>. Nedlastet: 02.04.2015.
- Fiskeri- og kystdepartementet.** FOR 2008-06-17-822. Forskrift om drift av akvakulturanlegg (akvakulturforskriften). Tilgjengelig fra: <https://lovdata.no/dokument/SF/forskrift/2008-06-17-822>. (Nedlastet 03.04.2015).
- Fiskeri- og kystdepartementet.** FOR-1996-01-15-23. Forskrift om forsøk med dyr. Tilgjengelig fra: <https://lovdata.no/dokument/SF/forskrift/1996-01-15-23>. (Nedlastet: 03.04.2015)
- French, A. R. and W. M. Yokoyama (2003).** "Natural killer cells and viral infections." *Current Opinion in Immunology* 15(1): 45-51.
- Fraser, T. W., I. Mayer, T. Hansen, T. T. Poppe, J. E. Skjaeraasen, E. O. Koppang and P. G. Fjelldal (2015).** "Vaccination and triploidy increase relative heart weight in farmed Atlantic salmon, *Salmo salar* L." *J Fish Dis* 38(2): 151-160.
- Gan, S. D. and K. R. Patel (2013).** "Enzyme Immunoassay and Enzyme-Linked Quantitative Fluorescent Western Blotting with Troubleshooting Strategies." *Jove-Journal of Visualized Experiments*(93). Immunosorbent Assay." *Journal of Investigative Dermatology* 133(9): E10-E12.
- Garcia-Sastre, A. and I. Mena (2013).** "Novel vaccine strategies against emerging viruses." *Curr Opin Virol* 3(2): 210-216.
- Gjein, H. (2015).** Årsrapport 2014- Mattilsynet. 1-83. Tilgjengelig fra: [http://www.mattilsynet.no/sletting/mattilsynets\\_aarsrapport\\_for\\_2014.18716/binary/Mattilsynets%20aarsrapport%20for%202014](http://www.mattilsynet.no/sletting/mattilsynets_aarsrapport_for_2014.18716/binary/Mattilsynets%20aarsrapport%20for%202014). Nedlastet: 04.04.2015

- Graves, S. S., D. L. Evans, D. Cobb and D. L. Dawe (1984).** "Nonspecific cytotoxic cells in fish (*Ictalurus punctatus*). I. Optimum requirements for target cell lysis." *Dev Comp Immunol* **8**(2): 293-302.
- Greenlee, A. R., R. A. Brown and S. S. Ristow (1991).** "Nonspecific Cytotoxic-Cells of Rainbow-Trout (*Oncorhynchus-Mykiss*) Kill Yac-1 Targets by Both Necrotic and Apoptic Mechanisms." *Developmental and Comparative Immunology* **15**(3): 153-164.
- Haller, O., P. Staeheli and G. Kochs (2007).** "Interferon-induced Mx proteins in antiviral host defense." *Biochimie* **89**(6-7): 812-818.
- Haller, O., M. Frese and G. Kochs (1998).** "Mx proteins: mediators of innate resistance to RNA viruses." *Rev Sci Tech* **17**(1): 220-230.
- Haller, O., H. Arnheiter, I. Gresser and J. Lindenmann (1979).** "Genetically determined, interferon-dependent resistance to influenza virus in mice." *J Exp Med* **149**(3): 601-612.
- Haugland, O., A. B. Mikalsen, P. Nilsen, K. Lindmo, B. J. Thu, T. M. Eliassen, N. Roos, M. Rode and O. Evensen (2011).** "Cardiomyopathy syndrome of atlantic salmon (*Salmo salar* L.) is caused by a double-stranded RNA virus of the Totiviridae family." *J Virol* **85**(11): 5275-5286.
- Heppell, J., N. Lorenzen, N. K. Armstrong, T. Wu, E. Lorenzen, K. Einer-Jensen, J. Schorr and H. L. Davis (1998).** "Development of DNA vaccines for fish: vector design, intramuscular injection and antigen expression using viral haemorrhagic septicaemia virus genes as model." *Fish & Shellfish Immunology* **8**(4): 271-286.
- Hinuma, S., T. Abo, K. Kumagai and M. Hata (1980).** "The potent activity of fresh water fish kidney cells in cell-killing. I. Characterization and species-distribution of cytotoxicity." *Dev Comp Immunol* **4**(4): 653-666.
- Hjeltnes, B (2010).** Fiskehelse rapporten 2009. In: HJELTNES, B. (ed.).
- Horisberger, M. A., O. Haller and H. Arnheiter (1980).** "Interferon-dependent genetic resistance to influenza virus in mice: virus replication in macrophages is inhibited at an early step." *J Gen Virol* **50**(1): 205-210.
- Iliev, D. B., H. Thim, L. Lagos, R. Olsen and J. B. Jorgensen (2013).** "Homing of Antigen-Presenting Cells in Head Kidney and Spleen - Salmon Head Kidney Hosts Diverse APC Types." *Front Immunol* **4**: 137
- Jaso-Friedmann, L., J. H. Leary and D. L. Evans (2001).** "The non-specific cytotoxic cell receptor (NCCRP-1): molecular organization and signaling properties." *Developmental and Comparative Immunology* **25**(8-9): 701-711.
- Jansen, M. D., B. B. Jensen and E. Brun (2015).** "Clinical manifestations of pancreas disease outbreaks in Norwegian marine salmon farming - variations due to salmonid alphavirus subtype." *J Fish Dis* **38**(4): 343-353.
- Jensen, I., A. Albuquerque, A. I. Sommer and B. Robertsen (2002).** "Effect of poly I : C on the expression of Mx proteins and resistance against infection by infectious salmon anaemia virus in Atlantic salmon." *Fish & Shellfish Immunology* **13**(4): 311-326.
- Joller, N., S. S. Weber and A. Oxenius (2011).** "Antibody - Fc receptor interactions in protection against intracellular pathogens." *European Journal of Immunology* **41**(4): 889-897.
- Kaattari, S. L. (1994).** "Development of a Piscine Paradigm of Immunological Memory." *Fish & Shellfish Immunology* **4**(6): 447-457.
- Karlsen, M., T. Tingbo, I. T. Solbakk, O. Evensen, A. Furevik and A. Aas-Eng (2012).** "Efficacy and safety of an inactivated vaccine against Salmonid alphavirus (family Togaviridae)." *Vaccine* **30**(38): 5688-5694.

- Koskela, J., R. Rahkonen, M. Pastenack and H. Knuutinen (2004).** "Effect of immunization with two commercial vaccines on feed intake, growth, and lysozyme activity in European whitefish (*Coregonus lavaretus* L.)." *Aquaculture* 234(1-4): 41-50.
- Kumar, U., Kumar, S., Varghese, S., Chamoli, R. and Barthwal, P. (2013).** DNA Vaccine: a modern biotechnological approach towards human welfare and clinical trials. *International Journal of Research in Biomedicine and Biotechnology* 3(1):17-20.
- Kurath, G., K. A. Garver, S. Corbeil, D. G. Elliott, E. D. Anderson and S. E. LaPatra (2006).** "Protective immunity and lack of histopathological damage two years after DNA vaccination against infectious hematopoietic necrosis virus in trout." *Vaccine* 24(3): 345-354.
- Kristoffersen, A. B., B. B. Jensen and P. A. Jansen (2013).** "Risk mapping of heart and skeletal muscle inflammation in salmon farming." *Preventive Veterinary Medicine* 109(1-2): 136-143.
- Laing, K. J. and J. D. Hansen (2011).** "Fish T cells: recent advances through genomics." *Dev Comp Immunol* 35(12): 1282-1295.
- Larsen, R., T. P. Rokenes and B. Robertsen (2004).** "Inhibition of infectious pancreatic necrosis virus replication by atlantic salmon Mx1 protein." *J Virol* 78(15): 7938-7944.
- Larsson, T., A. Krasnov, J. Lerfall, T. Taksdal, M. Pedersen and T. Morkore (2012).** "Fillet quality and gene transcriptome profiling of heart tissue of Atlantic salmon with pancreas disease (PD)." *Aquaculture* 330: 82-91.
- Lester, K., M. Hall, K. Urquhart, S. Gahlawat and B. Collet (2012).** "Development of an in vitro system to measure the sensitivity to the antiviral Mx protein of fish viruses." *J Virol Methods* 182(1-2): 1-8.
- Life Technologies.** Real time PCR handbook. Basics of real- time PCR. Tilgjengelig fra: <http://www.gene-quantification.de/real-time-pcr-handbook-life-technologies-update-flr.pdf> (Nedlastet: 02.02.2015).
- Lorenzen, E., N. Lorenzen, K. Einer-Jensen, B. Brudeseth and O. Evensen (2005).** "Time course study of in situ expression of antigens following DNA-vaccination against VHS in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum) fry." *Fish & Shellfish Immunology* 19(1): 27-41.
- Lorenzen, N. and S. E. LaPatra (2005).** "DNA vaccines for aquacultured fish." *Revue Scientifique Et Technique-Office International Des Epizooties* 24(1): 201-213.
- Ma, C., J. Ye and S. L. Kaattari (2013).** "Differential compartmentalization of memory B cells versus plasma cells in salmonid fish." *Eur J Immunol* 43(2): 360-370.
- McKinney, E. C. and M. C. Schmale (1994).** "Damsel fish with neurofibromatosis exhibit cytotoxicity toward tumor targets." *Dev Comp Immunol* 18(4): 305-313.
- McLauchlan, P. E., B. Collet, E. Ingerslev, C. J. Secombes, N. Lorenzen and A. E. Ellis (2003).** "DNA vaccination against viral haemorrhagic septicaemia (VHS) in rainbow trout: size, dose, route of injection and duration of protection-early protection correlates with Mx expression." *Fish & Shellfish Immunology* 15(1): 39-50.
- Midtlyng, P. J. and A. Lillehaug (1998).** "Growth of Atlantic salmon *Salmo salar* after intraperitoneal administration of vaccines containing adjuvants." *Dis Aquat Organ* 32(2): 91-97.
- Midtlyng, P. J., L. J. Reitan and L. Speilberg (1996).** "Experimental studies on the efficacy and side-effects of intraperitoneal vaccination of Atlantic salmon (*Salmo salar* L) against furunculosis." *Fish & Shellfish Immunology* 6(5): 335-350.

- Mikalsen, A. B., J. Torgersen, P. Alestrom, A. L. Hellemann, E. O. Koppang and E. Rimstad (2004).** "Protection of Atlantic salmon *Salmo salar* against infectious pancreatic necrosis after DNA vaccination." *Diseases of Aquatic Organisms* **60**(1): 11-20.
- Mutoloki, S., S. Alexandersen and O. Evensen (2004).** "Sequential study of antigen persistence and concomitant inflammatory reactions relative to side-effects and growth of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) following intraperitoneal injection with oil-adjuvanted vaccines." *Fish Shellfish Immunol* **16**(5): 633-644.
- Nakanishi, T., H. Toda, Y. Shibasaki and T. Somamoto (2011).** "Cytotoxic T cells in teleost fish." *Dev Comp Immunol* **35**(12): 1317-1323.
- Nusbaum, K. E., B. F. Smith, P. DeInnocentes and R. C. Bird (2002).** "Protective immunity induced by DNA vaccination of channel catfish with early and late transcripts of the channel catfish herpesvirus (IHV-1)." *Vet Immunol Immunopathol* **84**(3-4): 151-168.
- Nygaard, R., S. Husgard, A. I. Sommer, J. A. Leong and B. Robertsen (2000).** "Induction of Mx protein by interferon and double-stranded RNA in salmonid cells." *Fish Shellfish Immunol* **10**(5): 435-450.
- O'dowd, A. M., I. R. Bricknell, C. J. Secombes and A. E. Ellis (1999).** "The primary and secondary antibody responses to IROMP antigens in Atlantic salmon (*Salmo salar* L) immunised with A(+) and A(-) *Aeromonas salmonicida* bacterins." *Fish & Shellfish Immunology* **9**(2): 125-138.
- Payette, P. J., R. D. Weeratna, M. J. McCluskie and H. L. Davis (2001).** Immune-mediated destruction of transfected myocytes following DNA vaccination occurs via multiple mechanisms. *Gene Therapy*. **8**: 1395-1400.
- Roberts, R. J. and M. D. Pearson (2005).** "Infectious pancreatic necrosis in Atlantic salmon, *Salmo salar* L." *Journal of Fish Diseases* **28**(7): 383-390.
- Robertsen, B. (2008).** "Expression of interferon and interferon-induced genes in salmonids in response to virus infection, interferon-inducing compounds and vaccination." *Fish*
- Robertsen, B. (2006).** "The interferon system of teleost fish." *Fish Shellfish Immunol* **20**(2): 172-191. *Shellfish Immunol* **25**(4): 351-357.
- Robertsen, B., G. Trobridge and J. A. Leong (1997).** "Molecular cloning of double-stranded, RNA inducible MX genes from Atlantic salmon (*Salmo salar* L.)." *Developmental and Comparative Immunology* **21**(5): 397-412
- Rodger, H. D., S. J. McCleary and N. M. Ruane (2014).** "Clinical cardiomyopathy syndrome in Atlantic salmon, *Salmo salar* L." *J Fish Dis* **37**(10): 935-939.
- Ronni, T., K. Melen, A. Malygin and I. Julkunen (1993).** "Control of IFN-inducible MxA gene expression in human cells." *J Immunol* **150**(5): 1715-1726.
- Salinas, I., Y. A. Zhang and J. O. Sunyer (2011).** "Mucosal immunoglobulins and B cells of teleost fish." *Developmental and Comparative Immunology* **35**(12): 1346-1365.
- Schmittgen, T. D. and K. J. Livak (2008).** "Analyzing real-time PCR data by the comparative C-T method." *Nature Protocols* **3**(6): 1101-1108.
- Shen, L., T. B. Stuge, H. Zhou, M. Khayat, K. S. Barker, S. M. Quiniou, M. Wilson, E. Bengten, V. G. Chinchar, L. W. Clem and N. W. Miller (2002).** "Channel catfish cytotoxic cells: a mini-review." *Dev Comp Immunol* **26**(2): 141-149.
- Skinner, L. A., P. M. Schulte, S. E. LaPatra, S. K. Balfry and R. S. McKinley (2008).** "Growth and performance of Atlantic salmon, *Salmo salar* L., following administration of a rhabdovirus DNA vaccine alone or concurrently with an oil-adjuvanted, polyvalent vaccine." *J Fish Dis* **31**(9): 687-697
- Somamoto, T., E. O. Koppang and U. Fischer (2014).** "Antiviral functions of CD8(+) cytotoxic T cells in teleost fish." *Dev Comp Immunol* **43**(2): 197-204.

- Sunyer, J. O. (2013).** "Fishing for mammalian paradigms in the teleost immune system." *Nature Immunology* **14**(4): 320-326.
- Sunyer, J. O. (2012).** "Evolutionary and functional relationships of B cells from fish and mammals: insights into their novel roles in phagocytosis and presentation of particulate antigen." *Infect Disord Drug Targets* **12**(3): 200-212.
- Sun, B. J., B. Robertsen, Z. Q. Wang and L. Bin (2009).** "Identification of an Atlantic salmon IFN multigene cluster encoding three IFN subtypes with very different expression properties." *Developmental and Comparative Immunology* **33**(4): 547-558.
- Svingerud, T., J. K. Holand and B. Robertsen (2013).** "Infectious salmon anemia virus (ISAV) replication is transiently inhibited by Atlantic salmon type I interferon in cell culture." *Virus Res* **177**(2): 163-170.
- Svingerud, T., T. Solstad, B. Sun, M. L. Nyrud, O. Kileng, L. Greiner-Tollersrud and B. Robertsen (2012).** "Atlantic salmon type I IFN subtypes show differences in antiviral activity and cell-dependent expression: evidence for high IFNb/IFNc-producing cells in fish lymphoid tissues." *J Immunol* **189**(12): 5912-5923.
- Tafalla, C., J. Bogwald and R. A. Dalmo (2013).** "Adjuvants and immunostimulants in fish vaccines: current knowledge and future perspectives." *Fish Shellfish Immunol* **35**(6): 1740-1750
- Tonheim, T. C., J. Bogwald and R. A. Dalmo (2008).** "What happens to the DNA vaccine in fish? A review of current knowledge." *Fish & Shellfish Immunology* **25**(1-2): 1-18.
- Tonheim, T. C., J. Leirvik, M. Lovoll, A. I. Myhr, J. Bogwald and R. A. Dalmo (2007).** "Detection of supercoiled plasmid DNA and luciferase expression in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) 535 days after injection." *Fish & Shellfish Immunology* **23**(4): 867-876.
- Uribe, C., H. Folch, R. Enriquez and G. Moran (2011).** "Innate and adaptive immunity in teleost fish: a review." *Veterinarni Medicina* **56**(10): 486-503.
- Virology (2010).** Virology toolbox: the western blot. Tilgjengelig fra: <http://www.virology.ws/2010/07/07/virology-toolbox-the-western-blot> (Nedlastet: 07.02.15)
- Yokoyama, M., D. E. Hassett, J. Zhang and J. L. Whitton (1997).** "DNA immunization can stimulate florid local inflammation, and the antiviral immunity induced varies depending on injection site." *Vaccine* **15**(5): 553-560.
- Zhou, Z., O. J. Hamming, N. Ank, S. R. Paludan, A. L. Nielsen and R. Hartmann (2007).** "Type III interferon (IFN) induces a type I IFN-like response in a restricted subset of cells through signaling pathways involving both the Jak-STAT pathway and the mitogen-activated protein kinases." *J Virol* **81**(14): 7749-7758.
- Zhu, L. Y., L. Nie, G. Zhu, L. X. Xiang and J. Z. Shao (2013).** "Advances in research of fish immune-relevant genes: A comparative overview of innate and adaptive immunity in teleosts." *Developmental and Comparative Immunology* **39**(1-2): 39-62.
- Zou, J. and C. J. Secombes (2011).** "Teleost fish interferons and their role in immunity." *Developmental and Comparative Immunology* **35**(12): 1376-1387.
- Ostergaard, A. E., K. P. Lubieniecki, S. A. Martin, R. J. Stet, W. S. Davidson and C. J. Secombes (2010).** "Genomic organisation analysis of novel immunoglobulin-like transcripts in Atlantic salmon (*Salmo salar*) reveals a tightly clustered and multigene family." *BMC Genomics* **11**: 697.
- Wang, B. X. and E. N. Fish (2012).** "The yin and yang of viruses and interferons." *Trends Immunol* **33**(4): 190-197

# Appendiks I

---

## Reagenser

---

<b>Reagenser</b>	<b>Produsent</b>
Ampicillin (antibiotika)	Sigma-Aldrich
Benzoak (Vet 200 mg benzokain/ml 20%)	ACD Pharmaceuticals
BCA Protein Assay Reagent Kit	Pierce Ltd
Ethanol (>99,8 %)	Sigma-Aldrich
Fast SYBR Green Master Mix	Applied Biosystems
gDNA Wipeout	Qiagen
Karbonatbuffer 0,1 M, pH 9,6	Sigma-Aldrich
Luria Broth	Sigma-Aldrich
Magic Mark XP Western Standard	Invitrogen
Methanol 99,8 %	Sigma- Aldrich
Monoclonal mouse anti-salmon Ig	Cedarlane Lab. Ltd
NuPAGE antioxidant	Novex Life Technologies
NuPAGE LDS Sample buffer	Novex Life Technologies
NuPAGE MOPS Running buffer	Novex Life Technologies
NuPAGE reducing agent	Novex Life Technologies
NuPAGE Transfer buffer (20x)	Novex Life Technologies
Phosphate buffered salin (PBS)	Sigma-Aldrich
Primere	Sigma-Aldrich
Proteinase K	Invitrogen
Polyclonal goat anti mouse Ig	Invitrogen
Quantiscript Revers transkriptase	Qiagen
Quantiscript RT-buffer	Qiagen
Quantiscript RT-primer	Qiagen
Rabbit anit Aktin	Sigma-Aldrich
Rabbit anti Mx antibody	Dr Hilde Hansen
RNA-later	Ambion, Life Technologies
SeeBlue Plus 2 Pre-stained protein standard	Novex, Life Technologies

---



---

<b>Reagenser</b>	<b>Produsent</b>
Tris (hydroxylmethyl) aminomethane	Sigma-Aldrich
Tissue Protein Extraction reagent	Thermo Scientific
TransIT- LT1 Transfection reagent	Mirus
Tween 20	Sigma-Aldrich
Tørrmelk (non fat dried milk powder)	AppliChem
Ultra pure water	Biochrome AG
Ultra TMB ELISA	Pierce Ltd
2- Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich

---

# Appendiks II

---

## Oppformering av plasmider (startfasen)

Ved hjelp av protokollen fra EndoFree® Plasmid Purification Handbook (Qiagen) november 2005, s. 24-27 ble bakteriecellene oppformert og rensert for plasmider. One shot top 10 Escherichia coli, E.coli (Invitrogen) med plasmider var lagret ved -80 grader og ble sådd ut og dyrket på hver sin agarskåler. For hver plasmidtype som var i E.coli ble følgende gjort:

En koloni av E.coli ble tatt med en podeøse fra agarskålen og plassert i en glasskolbe med 4 ml Luria broth (LB)-medium (Sigma-Aldrich). Tilsatt deretter 4 µl av en stamløsning som inneholdt 100 µg/ml Ampicillin (antibiotika) til kolben. Deretter ble kolben inkubert i ca. 10 timer med kontinuerlig risting (300 rpm) ved 37 grader i et inkuberingskap. Overførte 2,0 ml fra den lille kolben til hver av to store kolber med 2 liter LB-media og 2 ml amp. Inkuberte deretter de to store kolbene med bakterier i ca. 16-20 timer med kontinuerlig risting (300 rpm) ved 37 grader. Overførte alt av E.coli-løsningen fra de to store kolbene til sentrifugerør med lokk og sentrifugerte de ved 6000 g i 15 min ved 4 grader. Hellet ut supernatanten og frøs ned bakteriepelleten i sentrifugerør ved -20 grader i et kjølerom. Antallet bakterieceller hadde nå økt betydelig og det betyr også mengden av plasmider, som var klar for rensing.

## Rensing av plasmider

I sentrifugerør med bakteriepellet ble det tilsatt 125 ml av buffer P1 og deretter ble det homogenisert ved hjelp av en sprøyte. Overførte deretter alt fra sentrifugerøret i en 500 ml begerflaske med lokk. Tilsatte så 125 ml av buffer P2 og inkuberte flasken i 5 min. Deretter ble det tilsatt 125 ml av buffer P3 og flasken ble ristet til innholdet var grøtete. Overførte deretter den grøtete løsningen til et QIAfilter Mega-Giga Catridge (Qiagen) festet til en 500 ml begerflaske. Lot alt av væsken fra den grøtete løsningen renne gjennom filteret vha trykk fra en vakuumslange. Tilsatte 50 ml buffer FWB2 til filteret og lot alt av væske renne gjennom. Tok bort filteret, tilsatt 30 ml av buffer ER til glassflasken og inkuberte løsningene i glassflasken på is i ca. 30min.

Festet et Qiagen-tip 10000 filter til en 500 ml begerglass. Tilsatt så 75 ml buffer QBT, alt av plasmidløsningen fra is og 600 ml buffer QC til filteret og lar det renne igjennom hver sin gang ved hjelp av tyngdekraften. Festet deretter filteret på en ny tom flaske og tilsatt 100 ml buffer QN som deretter fikk renne igjennom filteret ved hjelp av tyngdekraft. Når alt av løsningen hadde rent igjennom ble filteret kastet og 70 ml isopropanol ble tilsatt til flasken. Overførte deretter løsningen fra flasken til sentrifugerør og sentrifugerte det ved 20 000g i 30 min ved 4 grader. Hellet forsiktig ut supernatanten som hadde oppstått fra sentrifugerøret og lot det gjennomsiktige DNA plasmidet bli igjen i røret. Tilsatte deretter 3 ml endotoxin fri med 70 % etanol til sentrifugerørene. Sentrifugerte løsningene deretter ved 20 000 g i 10 min ved 4 grader. Hellet forsiktig ut supernatanten fra sentrifugerøret og lot det gjennomsiktige plasmidet bli igjen i rørene. Lufttørket deretter pelletene i 10 min under LAF-benk. Tilsatte 5 ml endotoxin fri buffer TE til sentrifugerørene. Overførte deretter alt av løsninger fra sentrifugerøret i et reagensrør av glass. Målte deretter plasmidkonsentrasjonen i Nano Drop® ND-1000 spektrofotometer (Thermo Scientific). Konsentrasjoner av plasmidene på rundt 1,5 mg/ml til 2 mg/ml og en renhet (260/280) på rundt 2 ble ansett som en optimal rensing av plasmidene.

# Appendiks III

---

## Løsninger til ELISA

---

### Karbonatbuffer (0,1 M) pH 9,6

---

Natriumkarbonat (Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> )	0,795 g
Natriumbikarbonat (NaHCO <sub>3</sub> )	1,465 g
Dest vann etterfylles til totalvolumet	500 ml

---

---

### Tris Buffered saline Tween (TBST)

---

Dest vann (dH <sub>2</sub> O)	900 ml
Tris buffer saline (TBS) 10x	100 ml
Tween 20 (detergent)	0,5 ml

---

---

### TBST med 5 % tørrmelk

---

Tørrmelk (fettfri)	5 gram
Tris buffer saline tween (TBST)	100 ml

---

---

### TBST med 0,5 % tørrmelk

---

Tørrmelk (fettfri)	0,25 gram
Tris buffer saline tween (TBST)	50 ml

---

# Appendiks IV

---

## Løsninger til Western blotting

---

### Lysisbuffer med T-PER

---

Protease inhibitor cocktail	10 ml
Tissue protein extraction reagent (T-PER) tilsatt til total volumet	100 ml

---

\*En Protease inhibitor cocktail flaske (Sigma-Aldrich) er på forhånd laget for å gi 100 ml lysisbuffer av produsenten, men siden det er i pulverform i en lukket flaske må det først løses opp i 10 ml T-PER (Thermo Scientific). Deretter ble det overført til en annen beholder og fortynnet med T-PER til totalvolumet var 100 ml. Overførte deretter 1 ml fra lysisbufferen til hvert eppendorfrør og lagret de ved -20 grader. Hver gang det behøves lysisbuffer ble det hentet fra -20 grader fryseboks.

---

### BCA-buffer (for 20 prøver)

---

BCA reagent A	11760 ul
BCA reagent B	240 ul

---

---

### NuPAGE SDS Runningbuffer (MOPS)

---

Dest. Vann (dH2O)	950 ml
NuPAGE SDS Running buffer (MOPS)	50 ml
NuPAGE Antioxidant	1 ml

---

---

### Blottebuffer

---

Dest. Vann (dH2O)	750 ml
Metanol	200 ml
NuPAGE Transferbuffer	50 ml
NuPAGE Antioksidant	1 ml

---

---

**Tris buffered saline tween (TBST)**

---

Dest. vann (dH2O)	900 ml
Tris buffer saline (TBS) 10x	100 ml
Tween (detergent)	0,5 ml

---

---

**Blokkebuffer med 5 % tørrmelk**

---

Tørrmelk (fettfri)	1,5 gram
Tris buffer solution tween (TBST)	30 ml

---

---

**TBST med 1 % tørrmelk**

---

Tørrmelk (fettfri)	0,1 gram
Tris buffer solution tween (TBST)	10 ml

---

# Appendiks V

---

## Løsninger til RT-qPCR

---

### Fjerning av genomisk DNA

---

gDNA Wipeout buffer	2 µl x antall prøver
RNase/Dnase fritt vann	2 µl x antall prøver
Isolert RNA	10 µl x antall prøver

---

Totalt reaksjonsvolum (per strips)	14 µl
------------------------------------	-------

---

---

### cDNA syntesen

---

Quantiscript <sup>®</sup> Revers Transkriptase	1 µl x antall prøver
Quantiscript <sup>®</sup> RT buffer	4 µl x antall prøver
RT primer mix	1 µl x antall prøver

---

Totalt reaksjonsvolum (per strips)	20 µl
------------------------------------	-------

---

---

### RT-qPCR måling

---

Primer FW	0,8 µl x antall prøver
Primer RW	0,8 µl x antall prøver
Fast SYBR <sup>®</sup> Green Master Mix	7,5 µl x antall prøver
cDNA templat	6 µl x antall prøver

---

Totalt reaksjonsvolum (per strips)	15 µl
------------------------------------	-------

---