

UiT

NORGES
ARKTISKE
UNIVERSITET

Fakultet for biovitenskap, fiskeri og økonomi, Norges fiskerihøgskole

Produksjonsindusert stress på rogn (*Salmo salar* L.) og effekter på immun- og stressrelaterte gener etter smitte av plommeseekkyngel med *Yersinia ruckeri*

Per Kristian Sætre

Masteroppgave i Akvamedisin (60 STP)

Mai 2016



Forord

Denne masteroppgaven ble utarbeidet i samarbeid med AquaGen AS, Nofima AS og Norges fiskeri høyskole (NFH) ved universitetet i Tromsø.

Først og fremst må jeg takke mine veiledere ved Nofima. Takk til Hanne Johnsen som lot meg bli med på denne utrolige ferden, i en verden som fra før var totalt ukjent for meg. Det har vært utrolig spennende og lærerikt. Takk til Lill-Heidi Johansen, Helge Tveiten og Ingvill Jensen som alle har vist tålmodighet og gitt konstruktive tilbakemeldinger under arbeidsprosessen (ikke minst i innspurten). Takk! Takk for at jeg har fått lov å ta del i dette utrolig spennende arbeidet! jeg håper virkelig at dere får noe igjen for det.

Takk til Erik Burgerhout som har gitt fantastisk veiledning og spennende samtaler om epigenetikk, thank you! Takk til Audny Johansen som har gitt oppmuntrende ord og eminent veiledning på laben, og takk til gledessprederen Elin Kristianne Sandaker som alltid har spredt humor og glede på labben!

Da var mine 19 år på skolebenken kom til en slutt, det er ved vemodighet at jeg sitter her klokken 24:00 på 17. mai å skrive mine siste ord ved universitetet i Tromsø. Jeg har mange jeg vil takke, men er redd for mange vil bli glemt. Derfor vil jeg starte med å takke de gamle og nye fiskehelse, eller «akvamedisin» studentene, takk for alle de utrolige opplevelsene på Kråkeslottet og i kantina på NFH. Takk for vennskapet, samholdet og humøret. Jeg ville aldri klart å fullført studiet uten dere, takk til mine to medstudenter Ola Brandshaug og Andreas Skagøy (Jeg har ikke glemt dere andre), jeg må også rette en stor takk til Renate Andersen som delte mange timer med meg i Kårvika og på Nofima.

Tilslutt må jeg takke min samboer Irmelin Mortensen som har holdt ut med meg de siste månedene, jeg beklager for alle timene jeg har vært vekke fra dere! Og gleder meg til å flytte til Sortland med dere til sommeren!

Per Kristian Sætre



Tromsø 18. Mai 2016

Sammendrag

Under embryogenesen blir cellenes vevsspesifikke «skjebne» bestemt gjennom epigenetiske mekanismer som avgjør cellens uttrykk. Disse epigenetiske modifikasjonen er arvelige, men samtidig potensielt reversible med evne til å respondere på eksogene faktorer som for eksempel stress (Bird, 2007; Li og Leatherland, 2012). I løpet av embryogenesen blir lakselarver utsatt for mekanisk sjokking og transport. Hvordan disse to begivenhetene påvirker langsiktig immun- og stressrelaterte respons er ikke kjent da lite forskning er gjort på tidlige livsstadier til atlantisk laks (*Salmo Salar* L.). I denne oppgaven blir det sett på hvordan produksjonsindusert stress i form av mekanisk sjokking og/eller transport under embryogenesen (300-400 døgngader etter befruktning (dgr)) ville påvirke overlevelse og uttrykk av immun- og stressrelaterte gener på plommesekestadiet (740-900 dgr) etter en immunologisk utfordring - badsmitte med *Yersinia ruckeri*. Utvalgte immun- og stressrelaterte gener ble undersøkt med kvantitativ RT-PCR. Undersøkte immungener var: IFNa, IFNb, IFNc, IFN γ , IL-1b, Mx, SAA, iNOS, IgT og IgM (s). De stressrelaterte genene som ble undersøkt var: HSP70a og HSP90a4. Effektene av tidligere behandling ble i tillegg undersøkt ved å registrere dødelighet og analysere global DNA-metylering i form av en prosentvis 5-metylcytosin analyse.

I dette forsøket ble det vist at mekanisk sjokking under embryogenesen førte til signifikant høyere dødelighet etter senere badsmitte av larver med *Y.ruckeri*. Transport i 48 timer under embryogenesen viste derimot ingen effekt på dødelighet etter *Y.ruckeri* smitten. 740 dgr lakselarver uttrykte noen av de immun- og stressrelaterte genene som ble undersøkt i forsøket, men flere av disse så ikke ut til å til å respondere ved badsmitte med *Y.ruckeri*. Kun HSP70a var signifikant høyere uttrykt sammenlignet med usmittet kontroll 120 timer etter badsmitte med *Y.ruckeri*. Sjokking og/eller transport ble vist å oppregulere iNOS og nedregulere HSP70a og IgM(s) etter badsmitte med *Y. ruckeri*. Sjokking alene eller i kombinasjon med transport under embryogenesen gav økt global 5-metylcytosin 475 dgr etter badsmitte med *Y. ruckeri*. Resultater fra forsøket viser at en kombinasjon av mekanisk sjokking og transport fører til 57 % høyere global 5-metylcytosin, noe som antyder økt inhibering av genuttrykk.

Resultatene i dette forsøket kan bidra til økt forståelse av basalbiologi hos atlantisk laks i tidlige livsstadier og være av interesse for akvakultur og forvaltning.

Innhold

1	Innledning.....	1
1.1	Fra produsent til produsent.....	1
1.2	Stress hos fisk.....	2
1.2.1	Stress og immunrespons.....	3
1.2.2	Cellulære stressresponser.....	4
1.3	Immunsystemet hos fisk.....	5
1.3.1	Det medfødte immunforsvaret.....	5
	Interferonsystemet og interleukin-1.....	6
	Akutt fase respons (APR).....	7
	iNOS.....	7
1.3.2	Det adaptive immunforsvaret.....	8
	Antigen presenterende celler.....	8
	Antistoffene IgM og IgT.....	9
1.4	<i>Yersinia ruckeri</i>	9
1.5	Epigenetikk.....	10
1.6	Problemstilling.....	11
2	Materialer og metoder.....	12
2.1	Forsøksfisk og oppsett.....	12
2.1.1	Sjokking, gruppe 2 og 3.....	13
2.1.2	Transport, gruppe 2 og 4.....	14
2.2	Smitteforsøk med <i>Yersinia ruckeri</i>	14
2.2.1	Oppdyrking av <i>Yersinia ruckeri</i>	15
2.2.2	Badsmitte.....	15
2.3	Prøveuttak.....	16
2.4	Kvantitativ RT-PCR.....	17

2.4.1	Homogenisering av plommesekkclarver.....	17
2.4.2	Isolering av totalt RNA og DNase behandling.....	17
2.4.3	cDNA syntese.....	18
2.4.4	Kvantitativ RT-PCR.....	19
2.5	Global metylering- deteksjon og kvantifisering av 5-metylcytosin	21
2.5.1	DNA ekstraksjon ved etanol utfelling	21
2.5.2	Deteksjon og kvantifisering av 5-metylcytosin med indirekte ELISA	21
2.6	Databehandling.....	22
2.6.1	Kvantifisering av immungener og primer effektivitet.....	22
2.6.2	% 5-mC metylcytosin.....	23
3	Resultater.....	25
3.1	Klekking, dødelighet og vekst.....	25
3.2	Dødelighet etter smitte med <i>Yersinia ruckeri</i>	27
3.2.1	Relativt uttrykk av <i>Yersinia ruckeri</i> 16S rRNA og dødelighet	29
3.3	Relativt uttrykk av immun- og stressrelaterte gen.....	30
3.3.1	Relativt uttrykk av IFN α , IFN γ og IFN γ etter badsmitte med <i>Y. ruckeri</i>	31
3.3.2	Mx, SAA og iNOS	33
3.3.3	Interleukin-1 β , og immunglobulinene (Ig) -M og -T	35
3.3.4	Stressproteinene HSP70a og HSP90a4	37
3.4	Korrelasjonsanalyse.....	39
3.5	DNA-metylering (%) av 5-metylcytosin	40
4	Diskusjon.....	41
4.1	Undersøkelse av behandlingsselektiv dødelighet	41
4.2	Dødelighet etter badsmitte med <i>Y. ruckeri</i>	42
4.2.1	Forventet og faktisk oppstart av dødelighet etter badsmitte med <i>Y. ruckeri</i>	42
4.2.2	Årsak til dødelighet	43

4.2.3	Effekt av produksjonsindusert stress på dødelighet etter badsmitte med <i>Y. ruckeri</i>	44
4.3	Relativt uttrykk av immun- og stressrelatertegener etter kvantitativ RT-PCR	45
4.3.1	<i>Y. ruckeri</i> 16S rRNA	45
4.3.2	Effekt av badsmitte med <i>Y. ruckeri</i> på immun- og stressproteingener	45
4.3.3	Effekt av produksjonsindusert stress på immun- og stressrelaterte gener etter badsmitte med <i>Y. ruckeri</i>	49
4.4	Effekt av produksjonsstress på prosentvis 5-mC	50
4.5	Videre forskning	50
5	Konklusjoner	51
	Referanser	52
	Appendix I	59
	Appendix II	59
	Appendix III	60
	Instruks, MagMax TM	60
	Appendix IV	61
	Appendix V	62
	Appendix VII	64
	Appendix IIX	65
	Appendix IX	66

1 Innledning

Til tross for flere år med økt fokus på sykdom og fiskehelse i norsk lakseoppdrett har det de siste årene vært en økning i uspesifikke sykdommer (e.g tapersyndrom) som kan knyttes til ferskvannsfasen (Hjeltnes et al., 2016). Under embryogenesen og tidlige larvestadier utvikles alle organene. I løpet av denne perioden kan individet være svært utsatt for eksternt stimuli (Li og Leatherland, 2012). Flere problemer på senere produksjonsstadier kan knyttes til disse utviklingsstadiene i oppdrettssammenheng. Det er generelt gjennomført svært lite forskning på rogn og fiskelarver. Økt kunnskap om effekt og konsekvens av produksjonsmetoder på rogn og larvestadiet, på kort og lang sikt, er derfor av stor interesse for forskning, forvaltning og akvakultur.

1.1 *Fra produsent til produsent*

Atlantisk laks (*Salmo Salar* L.) øyerogn blir produsert og røktet hos rognprodusent. Etter øyerognstadiet fraktes rognen til settefiskprodusent for videre utvikling, klekking og smoltifisering før laksen blir overført til vekst i sjø. Fra rognprodusent til settefiskprodusent er det to vesentlige håndteringsprosesser involvert, sjokking og transport. I denne oppgaven er produksjonsrutinene til AquaGen AS brukt. Fremgangsmåtene som fremgår i denne oppgaven er dermed ikke nødvendigvis universelle for alle rognprodusenter.

Hos AquaGen sjokkes eggene rutinemessig 320-330 døgngader (dgr) etter befruktning. Dette gjøres for å enkelt kunne sortere ut døde, svake og underutviklede individer. Sjokkingen gjennomføres mekanisk med fritt fall, ved å helle rognen fra en bønne med vann til en annen (Pers.kom Maren Mommens, AquaGen). Behandlingen medfører at døde og underutviklede egg koaguleres og dermed blir lettere å skille fra den levedyktige rognen. Under gastruleringen dannes epiboly og den skjøre vitellinmembranen erstattes av det mer robuste mesodermlaget. Når vitellinmembranen sprekker siver vann inn og plommesekken koagulerer (Groot, 1996; Jensen og Collins, 2003). Etter kun noen sekunder kan hvite flekker registreres og etter noen få minutter er hele egget hvitt og sorteringen kan startes (Jensen og Collins, 2003). Under sortering blir uønskede rogn som småøyerogn og bleke (ubefruktede) egg plukket ut i tillegg til de hvite (koagulerte) (Groot, 1996; Pers.kom Maren Mommens, AquaGen).

Innledning

Fra befruktning til gastrulastadiet viser rognen en økt følsomhet overfor eksternt stimuli, og fra dannelsen av epiboly til full øyepigmenter øker toleransen gradvis (Jensen og Alderdice, 1983). Etter 370 dgr transporteres rognen på is til settefiskprodusent i spesiellagede isoporkasser med plass til 12 L rogn (Kapittel 2.1.2, Figur 3). Transportetappen kan ta timer til dager. Under produksjonen hos settefiskprodusenten røktes rognen jevnlig, med sortering av uønskede egg. Klekking inntreffer ved omtrent 500 dgr etter befruktning. Etter klekkingen trekker plommeseckklarvene ned i sedimentet under naturlige forhold. Hos settefiskprodusentene benyttes et substrat som imiterer det naturlige hjemmestedet og hjelper larvene med å holde seg oppreist. Etter 900 dgr er plommesekken omtrent oppbrukt og larven blir mer aktiv i søken etter mat og startfôring initieres (Groot, 1996).



Hendelsesforløp under rognproduksjon fra befruktning til startfôring. Tall i parentes indikerer antall døgngader etter befruktning. Inspirert av Renate Andersen.

1.2 Stress hos fisk

Stress kan beskrives som en tilstand hvor individets homeostase er forstyrret, og kan fremstå i form av fysiske, kjemiske og mentale reaksjoner. Homeostasen betegner individets evne til å opprettholde ulike biologiske prosesser i likevekt (Bonga, 1997; McEwen, 1998). Stressrespons hos fisk kan deles inn i tre deler etter varighet: primær, sekundær og tertiær respons (Bonga, 1997; Barton, 2002).

I den primære fasen blir den umiddelbare reaksjonen til en stressor uttrykt i form av en «fight or flight» respons (Adamo, 2014). Under denne fasen hos fisk, aktiveres afferente sympatiske nervefibre mellom hypothalamus og kromaffine vev i hodenyren (HK). Når de kolinerge reseptorene i det kromaffine vevet stimuleres skiller kromaffincellene raskt ut de lagrede katekolaminene noradrenalin og adrenalin (Barton, 2002). Katekolaminene blir tatt opp i kardinal venen som leder hormonene direkte til hjertet som fører til en rask og effektiv transport

Innledning

via sirkulasjonssystemet (Reid et al., 1998; Bonga, 1997). Nevroner fra hypothalamus frakter neuropeptider til adenohipofysen som stimulerer til produksjon og sekresjon av adrenokortikotropiske hormon (ACTH) til sirkulasjonssystemet. I det interrenale vevet i HK stimulerer ACTH til produksjon og sekresjon av kortisol. Denne tette koblingen mellom hypothalamus og utskillelse av ACTH og kortisol produksjon blir ofte omtalt som hypothalamus-pituitary-interrenal axis (HPI-aksen) (Bonga, 1997).

De primære responsfaktorene utløser et bredt spekter av biokjemiske og fysiologiske endringer som indirekte eller direkte reduserer effekten av stressoren (Chrousos og Gold, 1992). I den akutte fasen er det et økt behov for oksygen og energi. Katekolaminene sørger for at oksygentilgangen blir opprettholdt ved å øke blodgjennomstrømmingen og perfusjonen gjennom gjellene (Bonga, 1997). Adrenalin og kortisol sørger for mobilisering av respiratoriske substrater ved stimulering av henholdsvis glykogenolysen og glukoneogenesen (Chrousos og Gold, 1992). Kronisk stress medfører maladaptive responser og kan manifestere seg som redusert immunforsvar, nedsatt appetitt og fruktbarhet (Tort, 2011).

1.2.1 Stress og immunrespons

Glukokortikoide hormoner som kortisol har vist nedregulerende effekt på immunforsvaret (Pickering og Pottinger, 1985) og kan gi økt mottakelighet for sykdom (Fast et al., 2008). Glukokortikoidene stabiliserer inflammasjonsresponsen ved økt lipocortin-I produksjon som inhiberer flere inflammasjonsprosesser (Li og Leatherland, 2012) som for eksempel hemmet «induserbar nitrogenholdig oksyd syntetase» (iNOS) uttrykk i lever hos rotter (Wu et al., 1995). I fisk har kortisol dempende effekt ovenfor: fagocytterende aktivitet i leukocytter, proliferasjon av makrofager, cytokinene IL-8 og IL-6, det prostaglandin katalyserende enzymet, COX-2 og plasma konsentrasjon av IgM (Li og Leatherland, 2012). I atlantisk laks har kortisol implantert gitt nedregulert uttrykk av IFN α , Mx, serum amyloid-a (SAA), glukokortikoid-reseptor (GR), og heat-shock proteinene HSP70 og HSP90 etter smitte med infeksiøs pankreas nekrose virus (IPNV) (Gadan et al., 2012). Ackerman og Iwama (2001) fant i sitt forsøk korrelasjon mellom HSP70 og kortisol nivå i plasma etter intraperitoneal smitte med *Vibrio anguillarum*. Kortisol har også vist å øke IL-1b uttrykket (Fast et al., 2008). Stress kan også forsterke lokal immunrespons ved å mobilisere leukocytter til hud i en akutt respons (Dhabhar, 2000). Forsøk har også vist at effekten av stressoren varierer om individet har vært eksponert for stress

Innledning

tidligere (Dhabhar, 2002) og Hunter et al. (1980) viste i deres forsøk at stress kan øke smittepresset i populasjoner med bærerfisk (Regnbueørret) av *Y. ruckeri*.

1.2.2 Cellulære stressresponser

I tillegg til de neuroendokrine responsene finner vi også cellulære stressresponser. Generelt responderer celler på stress via endret genuttrykk i form av oppregulering av svært konservative stressproteiner kalt heat-shock proteiner (HSP) (Roberts et al., 2010). Selv om disse proteinene øker sin transkripsjon i tidlig-fase av stress, utøver de også viktige funksjoner ved kroniske infeksjoner og neoplasia (Wei et al., 1995; Ciocca og Calderwood, 2005). HSPene kan kategoriseres i familier etter egenskaper og molekylær masse (kDa). Familiene er HSP110, HSP100, HSP90, HSP70, HSP60, HSP40 og HSP10 i tillegg til de «små» HSPene (Deane og Woo, 2011; Song et al., 2016). HSP responsen på ulike stressorer er universal for alle eukaryote celler. Som navnet tilsier opp-reguleres proteinene ved varmesjokk, men er også påvirket av andre stressorer som toksiner, hypertrofi, hypoxia, acidose, og mikrobielle skader (Welch, 1993; Deane og Woo, 2011). Håndtering og prøvetakning påvirker ikke HSP respons i regnbueørret (*Oncorhynchus mykiss*) (Vijayan et al., 1997). HSP70 og HSP90 spiller en viktig rolle i foldingen og oppbygging av proteiner (Gething og Sambrook, 1992). I tillegg til å beskytte og reparere skadde proteiner har HSPene funksjoner ovenfor regulering av immunrespons, inflammasjon og apoptose (Jacquiersarlin et al., 1994; Wieten et al., 2007; Deane og Woo, 2011). Hos pattedyr har HSPene en viktig funksjon i regulering av T-celle mediert respons, der de fungerer som intercellulære signalmolekyler og kan indusere ulike celletyper til å endre aktivitet og produsere inflammatoriske cytokiner. HSPene kan også forsyne antigen presenterende celler (APC) med modningssignaler gjennom reseptor mediert interaksjon (Wieten et al., 2007). HSP-stimulerende faktorer tilsatt i flasker med melke fra atlantisk laks gjør at melkens levelengde dobles i forhold til kontroll (Sandilands et al., 2010).

1.3 *Immunsystemet hos fisk*

Immunsystemet er et nettverk av en rekke vev, celler og molekyler som sammen bekjemper sykdom og infeksjon. Hos vertebrater deles immunsystemet i to kategorier, det uspesifikke medfødte immunsystemet og det spesifikke adaptive immunsystemet. Det medfødte immunsystemet blir ofte betegnet som førstelinjeforsvaret mot patogener med et vidt arsenal av virkemidler. Førstelinjeforsvaret består først og fremst av en ytre barriere, nemlig huden som både fysisk og kjemisk hindrer patogener inngang. I tillegg kommer en rekke cellulære og ikke-cellulære komponenter som virker uspesifikt mot fremmede mikroorganismer. Det adaptive immunforsvaret er langsomt og mindre effektivt hos poikiloterme vertebrater sammenlignet med de homeoterme. Til gjengjeld er responsen målrettet mot spesifikke patogener, samtidig som det gir en immunologisk hukommelse (Uribe et al., 2011; Abbas et al., 2014)

1.3.1 Det medfødte immunforsvaret

Det medfødte immunsystemet består av en rekke mønstergjenkjenneresreptorer (MGR), antimikrobielle molekyler og immunceller. Gjenkjenning av patogen assosierte molekyl mønster (PAMP) av MGR initierer effektormolekyler i cellen og utskillelse av cytokiner (Kawai og Akira, 2010). Cytokinene er en stor og mangfoldig familie av celle-signaliserende molekyler. Deres rolle er å modulere immunrespons i form av regulering av; fagocyttenes evne til å ødelegge patogener, antigen presenterende celler (APC) og transport til lymfatisk vev for initiering av adaptiv immunrespons (Wang og Secombes, 2013). Blant de mest studerte cytokinene hos fisk finner vi interferoner (IFN-) og interleukiner (il-) (Uribe et al., 2011).

Innledning

Interferonsystemet og interleukin-1

IFN-er kan deles inn i tre kategorier etter strukturelle og biologiske egenskaper, Type I, II og III. Type I og III interferonene er spesielt kjent for sine antivirale responser, hvor de også er best studert. Men flere studier hos både pattedyr og fisk har også vist økt type I IFN produksjon ved bakterielt stimuli (Bogdan et al., 2004; Monroe et al., 2010; Pereiro et al., 2014). Hos atlantisk laks er det beskrevet 13 type I IFN gener fordelt i 4 underkategorier: IFN1a1-a3, IFNb1-b4, IFNc1-c5 og IFNd1. Underkategoriene kan igjen deles inn i to grupper etter antall disulfidbroer hvor IFNa og IFNd har én og IFNb og IFNc har to disulfidbroer. De ulike underkategoriene har vist å ha ulik antiviral respons (Svingerud et al., 2012). Type I IFN kan også deles inn etter hvor fort de blir sekret. Hvor IFN β tilhører de tidlig-fase IFN ene og IFN α hører til de senere-fase IFN ene (Juang et al., 1998; Levy et al., 2002). Type II interferon IFN γ er godt konserverert hos atlantisk laks, og har vist lignende egenskaper som hos pattedyr, inkludert evnen til å aktivere makrofager (Sun et al., 2011).

IFN produseres og sekreses av infiserte celler, slik at andre celler blir varslet. Når IFN er binder seg til IFN-reseptorer på cellen starter en signal kaskade som resulterer i økt transkripsjon av flere hundre IFN-stimulerende gener (ISG) med antivirale og regulatoriske egenskaper (Uribe et al., 2011; Schneider et al., 2014). Hos laks er ISGene Mx, ISG15, viperin og protein kinase R (PKR) vist (Workenhe et al., 2009; Svingerud et al., 2012). I likhet med type I IFN ene kan også IFN γ indukere transkripsjon av ISGer, men gir en svakere respons enn type I (Sun et al., 2011).

Interleukin-1 (IL-1) familien består av 11 ligander og 10 reseptor protein hos pattedyr (Barksby et al., 2007; Boraschi og Tagliabue, 2013). I fisk er det funnet kun homologer til pattedyrs IL-1 og IL-18, og hvor det for IL-1b er funnet tre gen (IL-1b1,2 og 3) (Husain et al., 2012). Hos atlantisk laks har IL-1 reseptorer blitt klonet og er vist konstitutivt uttrykt i hodenyre (HK), milt, lever og gjeller etter stimulering med LPS (Uribe et al., 2011). IL-1b har vist å øke uttrykket av seg selv, COX-2 og MHC-II i makrofager *in vitro* og ved injeksjon i bukhulen forsterkes fagocytosen hos leukocytene (Secombes et al., 2011). IL-1b er oppregulert i milt etter smitte med *Y. ruckeri* (Raida og Buchmann, 2008) og i makrofager stimulert med LPS *in vitro* (Wei et al., 2015).

Innledning

Akutt fase respons (APR)

Akutfase proteiner (APP) består av et mangfold av proteiner med ulike funksjoner, som uskadeliggjør mikrober og andre potensielle patogener, inaktiverer proteaser, bidrar i vevsreparasjon og gjenoppreiser homeostasen. APR blir induert av pro-inflammatoriske signalmolekyler som cytokinene IL-1, IL-6 og TNF- α . De pro-inflammatoriske cytokinene inducerer syntese av APP i hepatocytter, hjernen og leukocytter. Blant de mest studerte APPene finner vi pentraxinene, C-reaktiv protein og serum amyloid pentraxin (Bayne og Gerwick, 2001).

Akutfase proteinet SAA er lite studert i fisk. Det blir antatt at proteinet er svært konservert hos alle vertebrater (Siegmond et al., 2016) og har i salmonider vist å bli induert av lipopolysakkarider (LPS), CpG nukleotider og *Y.ruckeri* flagellin (YRF) (Jorgensen et al., 2000; Villarroel et al., 2008; Wangkahart et al., 2016). SAA produseres i hepatiske celler og indueres av pro-inflammatoriske cytokiner (IL-1, IL-6 og tumor nekrose faktor (TNF)) (Bayne og Gerwick, 2001). I mus fremkaller SAA inflammasjon, apoptose og proliferasjon i hepatiske stellat celler (vitamin A lager) under fibrose (Wangkahart et al., 2016). I motsetning til pattedyr gir ikke inflammasjon signifikant økt systemisk distribusjon av SAA hos regnbueørret. Villarroel et al. (2008) tolket resultatene til at proteinet har en lokaleffekt. SAA er kraftig oppregulert i lever under septikemi hos røye (*Salvinus alpinus*) etter smitte med *Aeromonas salmonicida*. Uttrykket var 40 folds oppregulert etter 120 timer (Jensen et al., 1997).

iNOS

iNOS katalyserer kløyving av arginin til nitrogenholdig oksyd (NO) i lysosom og fagolysosom (Abbas et al., 2014) og er uttrykt i makrofager, kupfferceller, neutrofiler og endotelceller (Forstermann et al., 1998; Leifeld et al., 2002). Både LPS og flagellin kan øke iNOS uttrykket, men kun i nærvær av cytokiner (IFN α , IFN β og IFN γ) (Saeij et al., 2000; Bogdan et al., 2004). Ved badsmitte med *Y. ruckeri* på regnbueørretlarver (152 dgr etter klekking) viste Chettri et al. (2012) økt iNOS uttrykk etter 24 timer etterfulgt av signifikant nedregulering ved senere tidspunkt.

Innledning

1.3.2 Det adaptive immunforsvaret

Det medfødte immunforsvaret er førstelinjeforsvar mot infeksjon, mens det adaptive immunforsvaret gir en senere, men mer spesifikk respons (Abbas et al., 2014). Lymfocytter spiller en viktig rolle i antigen gjenkjenning og hukommelse. Lymfocytene kan deles inn i tre hovedtyper, B-, T- og natural killer (NK) celler og sirkulerer i blod og lymfeåre. B-lymfocytene modnes i hodenyren og thymusen er viktig for T-celle modning. Fisk mangler flere av de lymfoide organene man finner hos pattedyr, men en ekvivalent til mucosa associated lymphoid tissues (MALT) er antatt å befinne seg i tarm og i gjellbuen er det funnet et lymfoid organ (Koppang et al., 2010; Salinas et al., 2011). Melanomakrofag sentre (MMC) er også funnet i nær tilknytning til hematopoetisk vev i hodenyre og milt. MMC er antatt å være en primitiv variant av kimcentrene hos høyere vertebrater hvor innfangning og prosessering av antigen foregår (Agius og Roberts, 2003).

Antigen presenterende celler

Hos pattedyr blir dendrittiske celler (DC) regnet som de mest allsidige og potente av APCene. I regnbueørret er det identifisert DC-lignende celler med Major histocompatibility complex (MHC) klasse II og ulike ko-stimulerende faktorer (Bassity og Clark, 2012). I den samme studien ble det vist at de DC-lignende cellene hadde høyere evne til å stimulere leukocytter enn andre APCer som B-celler og makrofager. Umodne DC er tilstede i perifere vev til umiddelbar antigen resepsjon. Etter aktivering og under migrasjon til lymfoide organ modnes cellen og evnen å «sample» miljøet erstattes med antigenpresenterende egenskaper (Randolph et al., 2005).

Antistoffene IgM og IgT

Immunkomponenter i det adaptive immunsystemet hos fisk viser flere likhetstrekk med pattedyr som tilstedeværelse av immunoglobuliner, T-celle reseptorer og MHC proteiner. Selv om man finner flere likhetstrekk er det også en del ulikheter. Fisk er i besittelse av kun tre isotyper immunoglobuliner; IgM, IgD og IgT, hvor den sistnevnte ser ut til å være unik for de fleste teleostene (Hansen et al., 2005). De antistoffproduserende B-cellene i fisk har også vist å ha fagocytterende og antimikrobielle egenskaper, i motsetning til pattedyr B-celler (Boehm et al., 2012). Under smitte med virussykdommen IPN reduseres mengden antistoff i atlantisk laks og individ med lavt antistoffnivå i forkant av smitte dør raskere (Munang'andu et al., 2013). Både IgM og IgT er tilstede i det MALT-lignende vevet i tarm og gjeller, IgT dominerer her mens IgM dominerer systemisk (Parra et al., 2015). I tillegg til membranbundet IgM er det også en løselige form, IgM(s) som fremkommer i blod og andre væsker (Ross et al., 1998).

Ontogenien og rollen til antistoffene IgM og IgT i lakselyngel i perioden før startfôring er til dels ukjent. Forsøk har vist at IgM overføres fra immunisert mor til avkom hos atlantisk laks. Selv om spesifikke maternale antistoff er påvist gir det ingen beskyttelse mot bakterien *Y.ruckeri* (Lillehaug et al., 1996). Antistoffproduserende celler opptrer senere hos marine fiskearter enn ferskvannsararter (Magnadottir, 2006). Hos regnbueørret ble IgM først uttrykt noen dager etter klekking, og det relative genuttrykket lavt frem til terminering av forsøket ved 695 dgr. I det samme forsøket viste IgT de samme tendensene som IgM, men var lavere uttrykt. (Heinecke et al., 2014).

1.4 *Yersinia ruckeri*

Y.ruckeri er en fakultativ anaerob og gram-negativ stavbakterie. Bakterien er det etiologiske agenset for yersinose (el. rødmunnsyke) og er isolert fra en rekke arter i hele verden og er blant de mest tapsbringende fiskepatogenene (Kumar et al., 2015). I Norge ble det i 2015 registrert 34 settefiskanlegg med utbrudd av yersinose. Det har vært en økning hvert år de siste årene (2012 -), og flere diagnostiseringer skjer først etter overføring til sjø (Hjeltnes et al., 2016). Bakterien deles inn i to serotyper, den mobile O1 og den immobile O2, hvor kun serotype O1 har flagellin (YRF) (Kumar et al., 2015).

Innledning

Sykdommen kan opptre akutt på yngelstadiet og er ofte kronisk på eldre individ. Kliniske tegn på yersinose er svømming nær overflaten og tap appetitt. Utvendige sykdomstegn er exophthalmia, mørk hud og blødninger rundt hals og munn (Kumar et al., 2015). I labforsøk er økt dødelighet sett i sammenheng med spredning til lever, milt, hjerte og hjerne (Ohtani et al., 2014).

1.5 Epigenetikk

Epigenetikk betyr kort sagt «over genetikk». Flere definisjoner om hva epigenetikken omhandler er foreslått. Bird (2007) argumenterte for at definisjonen bør understreke at epigenetikk også omhandler ikke-arvelige endringer i genuttrykket. Men en mer vanlig beskrivelse er regulering av genuttrykk uten endringer i DNA-sekvensen.

Epigenetisk regulering inkluderer DNA-metylering, histon modifisering og non-coding RNA. DNA metylering skjer i områder med repeterende sekvenser av CpG (Cytosin-phosphate diester-guanin), såkalte CpG-øyer, og fører til en direkte inhibering av gentranskripsjon (Jirtle og Skinner, 2007). I tillegg skjer det en rekruttering av proteiner som interagerer med kromatin re-modelleringsfaktorer til å kondensere kromatin, som igjen fører til en indirekte neddemping (Jirtle og Skinner, 2007). DNA metyleringen blir etablert eller vedlikeholdt *de novo* av DNA metyltransferase enzymene DNMT1 og DNMT3A/3B/3L (Bird, 2002).

1.6 Problemstilling

I denne oppgaven blir det stilt spørsmål ved om dagens behandling av rogn fra AquaGen AS, fra rognen blir befruktet til den blir mottatt hos settefiskprodusenten, er gunstig eller ikke, med hensyn til stress og immunrespons. I løpet av denne perioden på om lag 100 dager, går embryoene gjennom «sjokking» og transport. Dette er to element som kan virke svært belastende for embryoene, man vet at for mye stress gir negativ effekt, men det er også mye som taler for at «riktig» mengde kan gi økt toleranse ovenfor stress senere i livet (Auperin og Geslin, 2008; Flinn et al., 2011). Arbeids hypotesen for oppgaven var: Moderat stress tidlig i livet kan gi økt robusthet mot stressorer senere i livet.

I dette forsøket blir det gjort rede for ulike effekter på larvestadiet etter mekanisk sjokking og/eller transport under embryogenesen og påfølgende badsmitte med *Y.ruckeri*.

Mål for oppgaven

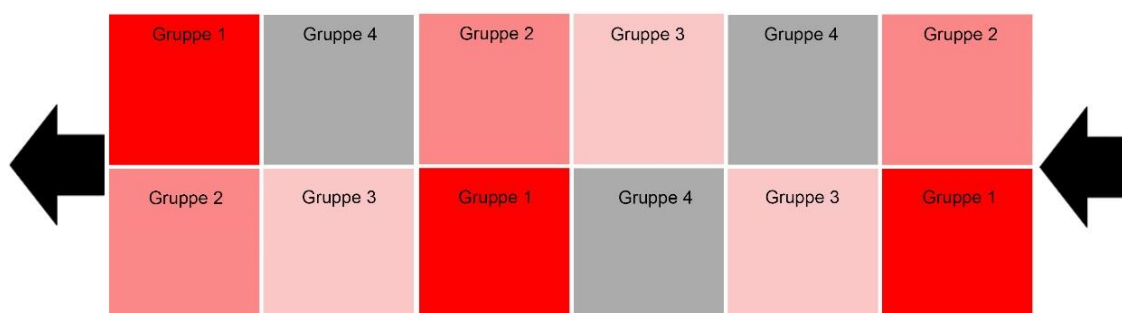
- Undersøke om sjokking og/eller transport av atlantisk laks under embryogenesen påvirker overlevelsen etter badsmitte med *Y. ruckeri* på larvestadiet.
- Undersøke med kvantitativ RT-PCR analyse uttrykket av 10 immun- og 2 stressrelaterte gener etter badsmitte av atlantisk laks larver med *Y. ruckeri*.
- Undersøke med kvantitativ RT-PCR analyse om sjokking og/eller transport under embryogenesen påvirker uttrykk av 10 immun- og 2 stressrelaterte gener etter badsmitte med *Y. ruckeri*.
- Undersøke om sjokking og/eller transport under embryogenesen har effekt på global 5-metylcytosin etter badsmitte med *Y. ruckeri*.

2 Materialer og metoder

Forsøket ble gjennomført ved Havbruksstasjonen i Tromsø (HiT) fra befruktning 25. November 2014 til terminering av smitteforsøket 13. April 2015. Undertegnede tok del i forsøket fra 1. Januar 2015. Forberedelser, bearbeiding og analyser ble utført ved Nofima, Tromsø. Prosjektet er en del av Nofimas interne instituttsatsing (SIS): “EPIGENETICS; Developing epigenomic tools and methods to study the effects of early life stress in Atlantic salmon and Atlantic cod.” Smitteforsøket var unntatt søknadsplikten per mars 2015 etter forsøksdyr-forskrift av 1996, men FDU ble likevel varslet (FOTS 7319).

2.1 Forsøksfisk og oppsett

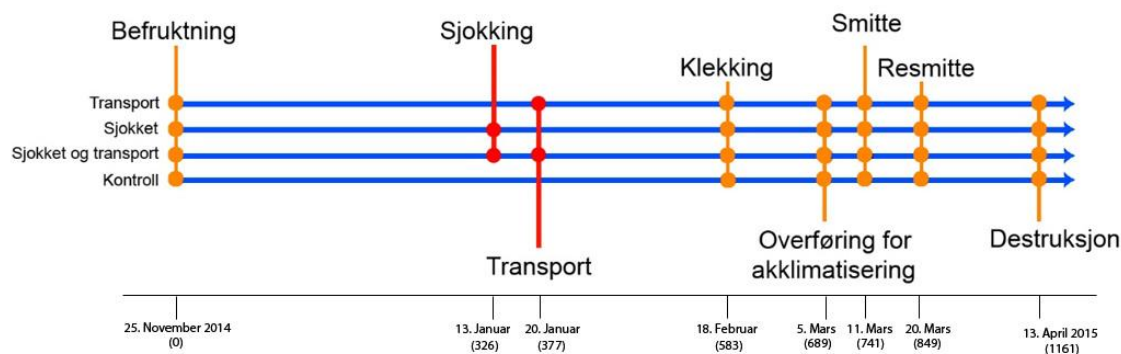
Rogn og melke ble fraktet ved 2-3 °C fra AquaGen, Kyrksæterøra i Sør-Trøndelag, med fly til Tromsø. Ved HiT ble rogn fra en hunnfisk tørrbefruktet med melke fra en hannfisk (ca. ett døgn etter stryking) og desinfisert i henhold til protokoll utarbeidet av AquaGen. Etter befruktningen ble eggene delt inn i fire grupper fordelt på tolv bakker (triplikate grupper) i klekkerenne med gjennomstrømming (figur 1). Vannet var filtret i sandfilter og holdt god kvalitet. I løpet av de første ni dagene av inkuberingen ble temperaturen justert gradvis fra 3 til 7 °C. Oksygenmetning ($101,7\% \pm 1,53$) og temperatur ($7,04\text{ °C} \pm 0,16$) ble målt og registrert daglig i forbindelse med fjerning av døde egg og senere unormale individer.



Figur 1. Gruppene plassering i klekkerennen. Pilene viser retning på vanngjennomstrømming.

Materialer og metoder

De fire forskjellige gruppene ble gjennom forsøket utsatt for ulike behandlinger: Gruppe 1 var ubehandlet kontroll, Gruppe 2 ble transportert og sjokket, Gruppe 3 kun sjokket og Gruppe 4 kun transportert. I god tid før startfôring, ved 741 dgr etter befruktning ble plommesecklarvene utsatt for badsmitte med bakterien *Yersinia ruckeri*.



Figur 2. Prosessdiagram. Oversikt over hendelsesforløpet frem til terminering av forsøket. Tall i parentes indikerer døgngrader ved hendestidspunktet.

2.1.1 Sjokking, gruppe 2 og 3

Døde og ubefruktede egg kan være vanskelig å skille fra befruktet rogn. En metode for å fremskynde koagulering og dermed forandre utseende til eggene, er mekanisk sjokking. Vitellinmembranen rundt plommesekken er svært følsom (Jensen og Collins, 2003). Hos levende embryo dannes epiboly under gastrulering (Velsen, 1980) som gir ekstra beskyttelse. Ubefruktede rogn vil derfor være ekstra utsatt for mekanisk sjokk. Når vann siver inn i plommesekken koaguleres eggeplommen.

AquaGen gjennomfører sjokking ved at rogn helles over i en bønne med vann fra rundt én meters høyde (knestående høyde). Ved 326 dgr, i samsvar med AquaGens produksjonsrutine ble gruppe 2 og 3 Sjokket. For at gjennomføringen skulle være mest mulig lik for hver av gruppene, ble det benyttet samme mengde vann i bønna (7,5 cm) og fallhøyden standardisert til 60 cm. Operasjonen ble gjentatt tre ganger før rognen ble overført til sine respektive kar i klekkrenna (figur 1).

Materialer og metoder

2.1.2 Transport, gruppe 2 og 4

Rognen ble transportert i samme type spesiallaget isoporkasse som blir benyttet av AquaGen (figur 3). Ved 377 dgr ble rogn fra gruppe 2 og 4 transportert i bil omtrent 80 mil i løpet av 48 t. To temperaturmålere var plassert i den midterste hyllen sammen med rognen. Gjennomsnittlig målt temperatur (°C) under transport var $1,12 \pm 0,96$, og $1,41 \pm 0,91$.



Figur 3. Transportkasse fra AquaGen. Kassen bestod av seks brett med seks adskilte rom. Bunnen av hvert rom var perforert slik at smeltevannet fra isen i øverste hylle kunne sile til brettene under, og rognen holdt seg fuktig under transporten.

2.2 Smitteforsøk med *Yersinia ruckeri*

Et badsmitteforsøk med *Y. ruckeri* ble gjennomført på forsøksgruppene før startfôringsfasen (741 dgr) på fiskehelselaboratoriet (FHL) ved HiT. I forkant av smitteforsøket ble 150 plommesecklarver (689 dgr) fra hver gruppe satt til akklimering med gradvis temperatur økning fra 7 til 12°C i sine respektive kar. Totalt var det klargjort fem kar, ett for hver av de fire gruppene og en usmittet kontroll. I forkant av smitteforsøket ble vekstegenskapene til to bakterieisolat undersøkt for å bestemme hvilket isolat som var best egnet med tanke på vekst på blodagar og i flytende kultur (kapittel 2.2.1).

Materialer og metoder

2.2.1 Oppdyrking av *Yersinia ruckeri*

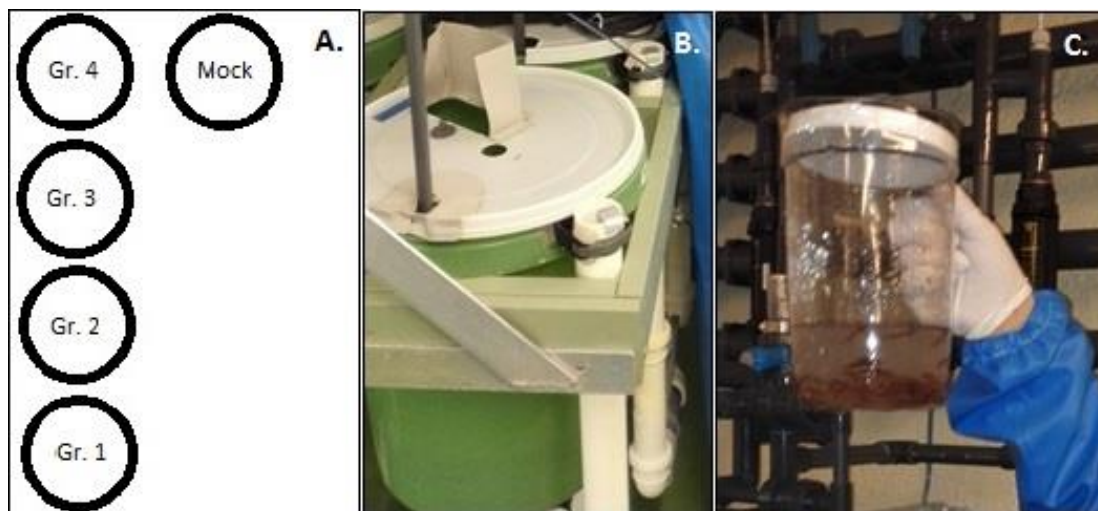
To isolater av *Y. ruckeri* (serotype O1) ISO1 og ISO2 ble dyrket etter beskrivelse av Lillehaug et al. (1996). Et lite avskrap fra bakteriekulturen på blodagarskål ble overført til 25 ml Brain-Heart-Infusion buljong (BHI) med podenål og dyrket ved 15 °C med kontinuerlig risting (IKA-VIBRAX VXR, Janke & Kunkel). For å avklare dyrkningstiden ble det etablert vekstkurve for begge isolatene (Appendix I). Optisk tetthet (OD) ved 520 nm ble målt med Spektrofotometer (uniSPEC 2, LLG® Labware). OD var tilnærmet 1,0 etter 20 timer for begge isolatene.

Samme dag smitteforsøket skulle gjennomføres ble ISO1 vasket og resuspendert i fosfat-bufret saltvann (PBS) ved at bakteriekulturen ble overført til 500 ml sentrifugerør og spunnet ned i 10 min ved 6000 rpm (RC5C, Sorval Instruments). Supernatant ble helt forsiktig ut og pelleten resuspendert i 25 ml PBS. Prosessen ble gjentatt én gang. Bakteriekulturen ble fortynnet til OD = 0,5 ved 520 nm og konsentrert ved å sentrifugere (6000 rpm, 10 min) og resuspendere pelleten i 1/10 volum PBS.

Etter oppkonsentrering ble bakteriekulturen fortynnet i en ti-folds fortynningsserie med PBS. 100 µl suspensjon av hver fortynning ble platet ut i duplikater på blodagar. Gjennomsnitt telletall av duplikatene ble brukt til å beregne «koloniformende enheter» (CFU) per ml. Bakteriekonsentrasjon til smittetest for ISO1 og ISO2 er oppført i appendix II.

2.2.2 Badsmitte

Ved 741 dgr ble plommesekkklarvene overført til smittebegre med 495 ml vann og plassert i bunnen av sine respektive kar. 5 ml $3,2 \times 10^{10}$ CFU/ml *Y. ruckeri* ble tilsatt til sluttkonsentrasjon $3,2 \times 10^8$ CFU/ml smittevann. 5 ml PBS ble tilført i usmittet kontroll. Hvert smittekar var tildekket med lokk med gløttehull for temperatur- og O₂-måler (figur 4). Oksygenmetning (70 - 100 %) og temperatur (12-13 °C) ble kontinuerlig overvåket fra start til slutt. Begrene stod i karene med senket vannstand slik at temperaturen holdt seg stabil gjennom smitten. Oksygen ble tilført kontinuerlig gjennom pimpstein, og justert etter behov. Kort tid etter oppstart falt O₂-nivået raskt til 30 % i samtlige grupper. Det tok om lag 5 min før alle gruppene var tilbake til normalt nivå. Selve smitten varte i 45 min før smitteløsning og yngel ble helt tilbake i sine respektive kar med vanngjennomstrømming.



Figur 4. (A) Plassering av smittekar (B) Smittekar med lokk (C) Smittebeger og larver med 500 ml smittevann

Etter en uke var det registrert svært lav dødelighet i de smitta gruppene. Som en følge av dette ble det bestemt igangsettelse av en ny smitte. Dag 10 (849 dgr) ble re-smitten utført og ISO2 (se kapittel 2.2.1) ble valgt til denne smitten. Fremgangsmåten var tilsvarende som ved den første smitten og sluttkonsentrasjonen var $1,9 \times 10^9$ CFU/ml smittevann.

For å bekrefte kausativagens for dødelighet, ble det tatt bakterieutstryk fra døde individer på blodagar. Dette ble gjort ved å lage et snitt i buken og forsiktig innføre en podenål. Totalt ble det tatt 18 utstryk gjennom forsøksperioden. Verifiseringen ble gjort på grunnlag av farge, konsistens og lukt på bakteriekoloniene og mikroskopi. I tillegg ble det kjørt kvantitativ RT-PCR med primere for *Yersinia ruckeri* 16S rRNA for ekstra verifisering (Kapittel 2.4.4, Tabell 2).

2.3 Prøveuttak

Det ble tatt prøver av ti hele plommesekklarver per gruppe ved fem ulike tidspunkt, henholdsvis 4, 24, 48, 72 og 120 timer etter første badsmitte. Ti plommesekklarver fra ett kar om gangen ble overført til en balje med hevert, før de ble håvet over og avlivet i et beger med overdose av benzokain. Ti individ fra hver gruppe ble overført til ett 20 ml rør med 10 ml RNA-later (Ambion). Rørene ble oppbevart ved 4°C i 24 t før de ble plassert i fryser (-20°C).

2.4 *Kvantitativ RT-PCR*

Kvantitativ reverse transkriptase (RT) polymerase kjedereaksjon (PCR) utnytter evnen til det termo-stabile enzymet DNA-polymerase til forlengelse av spesifikke primere gjennom flere sykluser med varmebehandling; denaturering, amplifisering og forlengelse. Etter hver syklus doubles templatet slik at syntesen blir eksponentiell frem til en av reagensene er brukt opp. Når antallet måltemplater overskrider en grenseverdi samt er i en eksponentiell fase registreres syklusnummeret (Ct-verdi) (Eurogentec, 2004). For å detektere og kvantifisere mRNA transkripter med kvantitativ RT-PCR må vevets RNA isoleres og transkriberes til komplimentær DNA (cDNA) gjennom flere trinn. Fremgangsmåte for hvert av trinnene er forklart kronologisk i de neste del-kapitlene.

2.4.1 Homogenisering av plommeseckklarver

Homogenisering og RNA isolering av hele-plommeseckklarver ble utført med MagMax-96 Total RNA Isolation kit (Ambion) i henhold til protokoll fra produsent, men med noen tilpasninger i forhold til mengde prøvemateriale. Et utvalg larver fra hver gruppe ble kontrollveid for å kunne justere mengde prøvemateriale til maksimalt 5 mg per 100 µl ved total RNA isoleringen. Hele larver ble overført til rør med 6-10 små keramiske kuler (Precellys, Bertin Technologies) og 800 µl lysis binding solution concentrate (Ambion). Prøvene ble homogenisert ved hjelp av Precellys-24 ved 6800rpm i 15sek i tre intervaller med 30 sekunders pause. Prøvene ble tilsatt 20 µl Proteinase-K (Ambion), inkubert i 90 minutter ved 37 °C og videre oppbevart ved -80 °C.

2.4.2 Isolering av totalt RNA og DNase behandling

Isolering av total RNA ble utført med MagMax-96 Total RNA Isolation kit (Ambion) etter produsentens protokoll. Det ble i imidlertid gjort noen modifikasjoner beskrevet i kapittel 2.5.1. Siden tidligere forsøk ved laben hadde slått fast at DNasebehandlingen i kitet var ufullstendig ble denne kuttet ut. Det ble heller gjort DNasebehandling i etterkant ved hjelp av Turbo DNA-free (Ambion). RNA isoleringen ble foretatt automatisk med MagMaxTM-96 Standard Magnetic Particle Processor (Applied Biosystems) etter forhåndsprogrammert instruks (Appendix III). Maskinen benytter magnetiske staver som binder seg til mikroskopiske RNA-

Materialer og metoder

bundede perler. Disse RNA-perlene kan deretter flyttes mellom vaskeløsningene automatisk, før programmet avsluttes i elueringsbufferen.

For rensing av genomisk DNA ble TURBO DNA-free Kit (Ambion) benyttet. DNasen virket i 30 min ved 37 °C før inaktiverings reagens ble tilsatt. Etter behandlingen ble supernatant pipettert over i et 96-brønnersbrett og absorpsjonen ved 260 og 280 nm målt med spektrofotometeret, NanoDrop 8000 (Thermo Fisher Scientific) for å bestemme RNA-utbytte og renhet.

2.4.3 cDNA syntese

For å kunne bestemme uttrykket av mRNA må det transkriberes til enkelttrådet cDNA (komplimentær DNA). cDNA ble transkribert med High-capacity cDNA Reverse Transcription kit (Applied Biosystems) supplert med Oligo dT primere (Invitrogen). Kittet ble benyttet i tråd med produsentens anbefalinger og Innholdet for hvert reaksjonsvolum à 25 µl er ført i tabell 1.

Tabell 1. Innholdsoversikt per reaksjonsvolum til cDNA syntese

Reagenser	Volum (µl) per reaksjon
Reverse Transcription Buffer	2,5
25X dNTPs	1
Random primers	2,5
MultiScribe™ Reverse Transcriptase,	1,25
Nukleasefritt vann (Ambion)	1,75
Oligo d(T)	1
Totalt mastermiks	10
200ng RNA	15
Reaksjonsvolum	25

cDNA Reaksjonen ble utført i 2720 Thermal cycles (Applied Biosystems) med følgende temperatur parameter: 10 min ved 25 °C, 120 min ved 37 °C og 5 min ved 85 °C før temperatur ble redusert til 4 °C. Etter reverse transkriptase reaksjonen var fullført ble prøvene fortennet i stock-løsning 1:8 og videre allikotert 1:40 for påfølgende kvantitativ RT-PCR analyser. Alt cDNA ble oppbevart ved -80 °C.

2.4.4 Kvantitativ RT-PCR

Power SYBR Green Master Mix (Life Technologies) ble benyttet som fluorescerende fargestoff. SYBR Green fluorescerer når den binder dobbeltrådet DNA. Når temperaturen når ett visst punkt atskilles DNA-trådene og det fluoreserende signalet reduseres. Smeltepunktet kommer til uttrykk som en topp i en jevn kurve (Eurogentec, 2004).

For å måle relativt genuttrykk av utvalgte medfødte og adaptive immunkomponenter, stressproteiner og *Y. ruckeri* 16S rRNA ble det utført kvantitativ RT-PCR. Nye primere ble designet i Primer Express 3 mens sekvenser fra publiserte primere ble brukt direkte. Alle primere ble syntetisert av Eurogentec. Uttrykket av de forskjellige genene ble kvantifisert i til sammen 250 larver. Effektiviteten for hver av primerparene ble bestemt ut fra en to-folds fortynningsrekke i triplikater, med cDNA fortynnet 1:10 (20 ng) som startkonsentrasjon. Rekken bestod av totalt 11 fortynninger. Materiale benyttet til standardkurven ble opparbeidet fra hodenyre fra to IPNV-smittede og to usmittede individer. cDNA fra de to smittede og usmittede individene ble slått sammen til henholdsvis smittet positiv kontroll og usmittet positiv kontroll. Effektiviteten til primerparene ble kalkulert med ligning 2 og er notert i tabell 2 på sine respektive primerpar. Primerne ble godkjent ved korrelasjonskoeffisient (R^2) > 0,99, mellom Ct-verdi og log konsentrasjon.

$$E = 10^{-1/\text{stigningstall}} \quad (2)$$

Kvantitativ RT-PCR ble utført i Real-Time maskin fra Applied Biosystems (7900HT Fast Real-Time PCR system). Prøvene ble kjørt i 384-brønnersbrett i to-paralleller for hver reaksjon, i tillegg ble det benyttet tre kontroller, én negativ kontroll hvor templatet var erstattet med nukleasefritt vann og to positive kontroller (cDNA) fra hodenyre fra usmittet og smittet laks. Ett tilfeldig utvalg DNase behandlede RNA-prøver (non-template) ble kontrollert for eventuelt genomisk DNA. Hver reaksjon på totalt 20 µl, bestod av 10 µl Power SYBR Green Master Mix, 1,2 µl (300 nM) revers og forward primer, 0,6 µl nukleasefritt vann og 7 µl fortynnet cDNA. Kvantitativ RT-PCR parametre var som følger; Denaturering i 10 min ved 95 °C. 40 sykluser med denaturering ved 95 °C i 15 sek og amplifisering og ekstensjon ved 60 °C i 1 min. Program for smeltepunktanalyse à 15 sek ved 95 °C, 60 °C og 95 °C.

Materialer og metoder

Tabell 2. Primeroversikt. Tabellen viser primere benyttet i forsøket med tilhørende 5' - 3' sekvens, effektivitet og genbank nr. og/eller publikasjon. Alle primere var syntetisert hos Eurogentec. Bruksløsning ble fortynnet til 5µM med nukleasefritt vann (Ambion). Hver reaksjon bestod av 300nM Forward (FW) og 300nM Revers (RW) primer.

Primer	Sekvens (5-3')	Effektivitet	Publikasjon / Genbank Nr.
IL-1b FW IL-1b RW	CCC-GTC-CCC-ATT-GAG-ACT-AAA AGC-AGG-ACAGGT-AGA-GGT-TGG-ATC	1,98	NM001123582.1
Mx FW Mx RW	TGC-ACC-CAC-AGA-GGC-TTT-GAA GGC-TTG-GTC-AGG-ATG-CCT-AAT	1,94	Svingerud et al., 2012 U66475.1
IFNa FW IFNa RW	TGC-AGT-ATG-CAG-AGC-CTG-TG TCT-CCT-CCC-ATC-TGG-TCC-AG	1.88	Svingerud et al., 2012 DQ354152.1
IFNb FW IFNb RW	GCA-TTG-GAG-GCT-ATG-CGA-TAT TTC-CCA-AAC-ACC-TAC-GAC-A	Lavt uttrykt	Svingerud et al., 20012 EU768890
IFNc FW IFNc RW	ATG-TAT-GAT-GGG-CAG-TGT-GG CCA-GGC-GCA-GTA-ACT-GAA-AT	x	Svingerud et al., 20012 EU768890
IgT FW IgT RW	TGC-TCA-GTC-CGT-CTC-TCT ATA-ATT-GTC-TTC-GCC-CAC-CTT	2,04	Pennacchi et al., 2014 563e570
IFN γ FW IFN γ RW	CCA-CTA-TAA-GAT-CTC-CAA-GGA-C CTC-CTG-AAC-CTT-CCC-CIT-GAC	x	Kumari et al., 2013
iNOS FW iNOS RW	TTG-TCT-CAG-GCA-CTC-ACC-TAC-TTC CGC-CAA-CTG-AGA-GAG-CTT-GTG	1,88	xx
IgM (s) FW IgM (s) RW	AGA-TGG-ACG-CTT-GTG-GAT-CTC GGT-CTG-GAG-CAA-TGG-GAC-AG	1,99	Mutoloki et al., 2010 CK991004
HSP70a FW HSP70a RW	CTG-GGC-TGA-ATG-TGC-TGA-GA CTG-GAC-ATG-CCT-TTG-TCC-ATG	2	Ikke publisert
HSP90a4 FW HSP90A4 RW	GAA-GAA-GCA-AGA-GGA-GCT-GAA-CA AAC-TGA-AAC-CTT-CTC-AAT-CTT-CTT-GTC	1,94	Ikke publisert
<i>Y. ruckeri</i> 16S rRNA FW <i>Y. ruckeri</i> 16S rRNA RW	GCG-AGG-AGG-AAG-GGT-TAA-GTG GTT-AGC-CGG-TGC-TTC-TTC-TGC	1,87	xx
SAA FW SAA RW	CCC-TGC-AGG-TGC-TAA-AGA-CAT CCT-CGA-CCA-CTG-GAA-CCC-TGA-A	1,84	Martin et al., 2007 BQ037050.1
Ef-1 α FW Ef-1 α RW	CGC-CAA-CAT-GGG-CTG-G TCA-CAC-CAT-TGG-CGT-TAC-CA	2	AF321836
β -actin FW β -actin RW	CAG-CCC-TCC-TTC-CTC-GGT-AT CGT-CAC-ACT-TCA-TGA-TGG-AGT-TG	2	BT059604
18S rRNA FW 18S rRNA RW	TGT-GCC-GCT-AGA-GGT-GAA-ATT CGA-ACC-TCC-GAC-TTT-CGT-TCT	2	AJ427629

2.5 *Global metylering- deteksjon og kvantifisering av 5-metylcytosin*

For å undersøke forskjeller i DNA-metylering mellom gruppene ved 4 og 120 timer etter smitte, ble 5-metylcytosin (5-mC) målt med et 5-mC DNA ELISA kitt (Zymo Research). Kitet benytter en indirekte enzym-linked immunosorbent assay (ELISA) med det monoklonale antistoffet anti-5-metylcytosin som er både sensitivt og spesifikk for 5-mC. Til signalstoff brukes Horseradish peroxidase (HRP) konjugert med sekundær antistoff.

2.5.1 DNA ekstraksjon ved etanol utfelling

DNA ble ekstrahert fra det homogeniserte og proteinase-K behandlede materiale ved etanol og salt utfelling. 20 µl av det allerede homogeniserte materialet (2.4.1 RNA isolering) ble overført til eppendorfrør sammen med 230 µl lysis buffer (ATL, Qiagen) og 2 µl RNase A (Life Technologies). Prøvene ble ristet og inkubert i 5 min på benken. 70 µl 6M NaCl ble tilført, ristet og plassert i fryser ved -20 °C i minimum 10 min. Etter inkubering ble prøvene sentrifugert og supernatant forsiktig pipettert ut til nytt rør. Prøvene ble tilsatt 3 µl glycogen og ristet. 320 µl is-kald 100 % etanol ble overført til hver prøve, invertert og plassert i fryser (-20 °C). Etter 10 min ble prøvene sentrifugert og supernatant pipettert ut. Pellet ble resuspendert i 300 µl 100 % temperert etanol, invertert og sentrifugert. Supernatant ble fjernet og pellet resuspendert i 300 µl 70% etanol. Etter sentrifugering og fjerning av supernatant ble pelleten tørket i ca 15 min ved 45 grader. Tilslutt ble 100 µl nuklease fritt vann tilsatt og satt på varmeplate (50 °C) og jevnlig ristet for å løse opp pellet. DNA konsentrasjon og renhet ble målt (2.4.2 cDNA syntese) og justert til 100 ng per 10 µl.

2.5.2 Deteksjon og kvantifisering av 5-metylcytosin med indirekte ELISA

Kvantifiseringen ble utført i henhold til protokoll (Zymo Research), kort oppsummert: 100 ng DNA fra 8 individer per gruppe, i tillegg til negativ- og positiv kontroll til standardkurve denaturert med 5-mC Coating Buffer. Det denaturerte DNAet ble overført til ett 96-brønners ELISA-brett og inkubert i 1 t ved 37 °C. Etter inkubering ble brettet vasket med 5-mC ELISA buffer. En antistoff mikse bestående av anti-5-metylcytosin og sekundært antistoff ble tilsatt hver brønn. Brettet ble satt til inkubering i 1 time ved 37 °C. Etter at antistoff miksen var vasket bort med 5-mC Elisa buffer, ble HRP Developer konjugat tilsatt og satt til inkubering ved rom

temperatur. Etter 60 minutter ble absorbanse ved 405 nm målt i en ELISA-brettleser (SpectraMAX, Molecular Device).

2.6 Databehandling

All data ble bearbejdet i Microsoft Excel og videre analysert i GraphPad Prism 6. Gruppens normalfordeling for hvert uttakstidspunkt ($n=8-10$) ble sjekket for samtlige gen med D'Agostino & Pearson omnibus og Shapiro-Wilk normalitets test. 95,3 % av 300 grupper var normalfordelt. For å påvise eventuelle signifikante forskjeller mellom gruppene ble enveis variasjonsanalyse (ANOVA) benyttet. Ved utslag etter ANOVA ble Tukey's multiple comparisons test utført for å identifisere gruppene som var signifikant forskjellig. Til undersøkelse av overlevelse mellom gruppene ble daglig dødelighet plottet og analysert med Kaplan-Meier plott. Signifikante forskjeller i overlevelse ble sjekket med en log-rank test (Mantel-Cox). Undersøkelse av korrelasjon mellom genuttrykk og dødelighet ble utført med Pearsons korrelasjonstest. Til korrelasjonsanalyse mellom genene ble de fire smittede gruppene slått sammen for hvert tidspunkt ($n=36$). De «nye» gruppene var ikke normalfordelt og en ikke-parametrisk korrelasjonstest (Spearman) ble benyttet til å undersøke trender. Statistisk signifikans for Tukey's multiple comparisonstest, Pearsons og Mantel-Cox test korrelasjonstest ble satt ved $p < 0,05$.

2.6.1 Kvantifisering av immungener og primer effektivitet

I en relativ kvantifisering normaliseres genuttrykket relativt til et annet, endogent referansegene (Pfaffl, 2001). Hensikten med normalisering er å fjerne eventuelle forskjeller i form av RNA-kvalitet og kvantitet mellom prøvene, men en forutsetning er at referansegene er stabilt uttrykt. For å redusere den naturlige variasjon bør det benyttes flere referansegener (Vandesompele et al., 2002).

Programmet SDS 2.3 software (Applied Biosystems) ble brukt til å registrere og analysere data fra Real-Time RT-PCR maskinen. Threshold ble justert til 0,1 for alle kjøringene. Prøver som viste unormal eller ingen kurve ble fjernet for videre analyse. Ct-verdien for parallellene ble slått sammen. Prøver med lavt uttrykk ($Ct > 35$) ble ansett som ikke uttrykt og ble justert til $Ct = 40$ i forhold til videre utregninger. Det relative uttrykket ble kalkulert etter ligning 2 (Pfaffl, 2001) hvor det geometriske gjennomsnittet av *EF-1 α* , *β -actin* og *18S rRNA*, ble brukt som referansegen.

$$Ratio = \frac{(E_{m\hat{a}l})^{\Delta Ct_{m\hat{a}l}(kontroll-pr\ddot{o}ve)}}{(E_{ref})^{\Delta Ct_{ref}(kontroll-pr\ddot{o}ve)}} \quad (2)$$

2.6.2 % 5-mC metylcytosin

Gjennomsnittlig absorpsjon fra duplikatene ble beregnet for hvert individ. Prosentvis 5-mC (ligning 3) ble beregnet på grunnlag av andregradsregresjonsligningen til standardkurven til de negative og positive kontrollene (Appendix IV).

$$\% \text{ 5-mC} = \frac{Absorpsjon - y \text{ intercept}}{Slope} \quad (3)$$

Den positive og negative kontrollen i kittet består av *Escherichia coli* DNA. Genomisk andel av CpG-posisjoner utgjør 0,075 av det totale genomet hos *E.coli*. Forholdet mellom CpG-posisjoner og det totale antallet baser i genomet hos atlantisk laks ble beregnet til 0,0165 (56,403,179/3,412,113,583) etter opplysninger fra International Cooperation to Sequence the Atlantic Salmon Genome (ICSASG_v2, 2015). Dette ga en folds-forskjell på 4,537 mellom *E. coli* og atlantisk laks.

Materialer og metoder

3 Resultater

Et badsmitte forsøk med *Y. ruckeri* på plommsekklarver utsatt for ulike industrielle behandlinger under embryogenesen ble utført ved HiT. Behandlingene bestod av mekanisk sjokking ved 326 dgr etter befruktning, en 48 timers transport ved 375 dgr, eller en kombinasjon av disse. I smitteforsøket ble det også inkludert en usmittet kontrollgruppe (mock). Det ble registrert dødelighet i løpet av den 35 dager lange smitteperioden og uttrykket av utvalgte immun- og stressrelaterte gener etter første badsmitte ble målt ved kvantitativ RT PCR. En analyse av global DNA-metylering i form av en prosentvis 5-metylcytosin analyse ble også utført.

3.1 Klekking, dødelighet og vekst

Klekking av rogn startet 506 dgr etter befruktning med 33,5 % i gruppe 3 (sjokk) og mellom 0,3 og 5,1 % i gruppene for øvrig. Ved 562 dgr var det i gjennomsnitt klekt 94,3 % \pm 0,85 i de fire gruppene (Figur 5A). Gruppe 2 og 3 viste begge 14 % økning i dødelighet rett etter sjokkingen ved 326 dgr. Gruppe 4 transport viste en økning på 7 % rett etter transporten ved 375 dgr. Ved 569 dgr var gjennomsnittlig dødelighet 36 % \pm 0,94 i gruppene (Figur 5B).

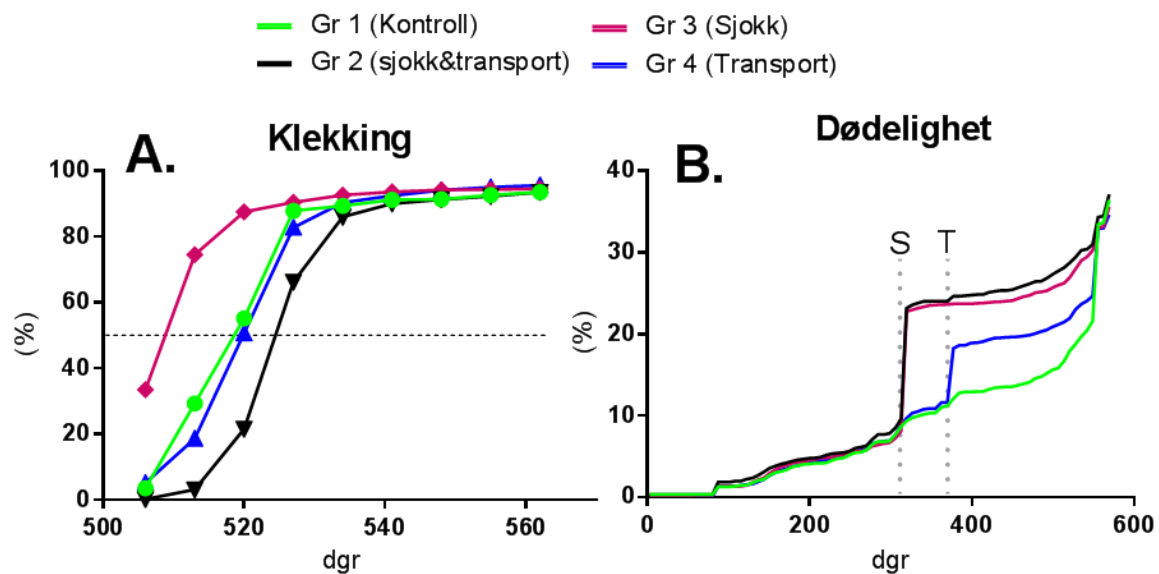
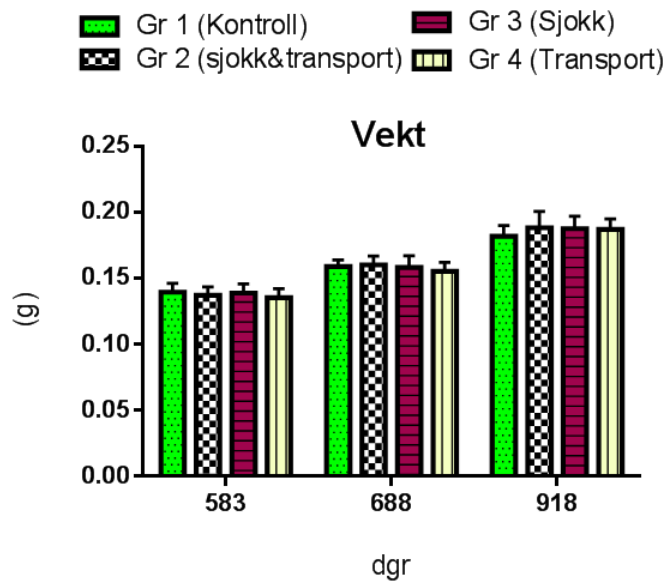


Figure 5. Dødelighet og Klekking av rogn under inkubering i klekkerenna. **A.** Akkumulert klekking. **B.** Akkumulert dødelighet, S indikerer tidspunkt for mekanisk sjokking. T indikerer tidspunkt for transport.

Resultater



Figur 6. Vekst av lakselarver ved 3 prøve tidspunkt oppgitt i døgngader. Hver søyle indikerer gjennomsnittlig vekt i gram (n = 28-38) og standardavvik.

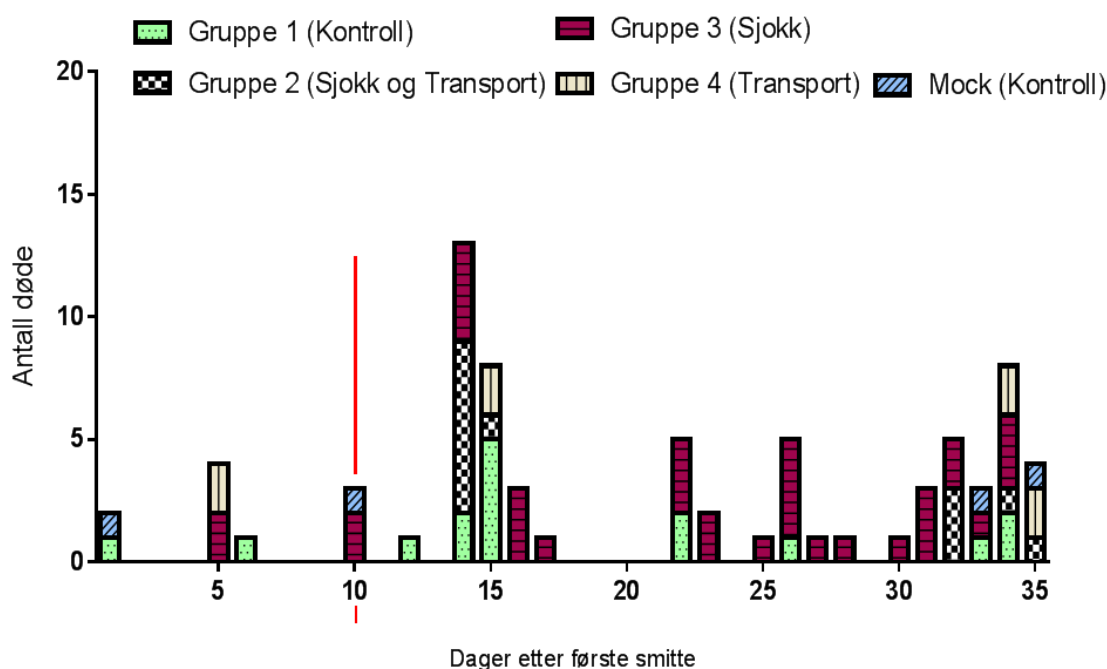
Etter klekking ble larvene veid på tre ulike tidspunkt: 583, 688 og 918 dgr. Fra første til siste veiing økte vekten til lakselarvene i snitt 52 mg. Det var ingen signifikante forskjeller i vekt mellom behandlingene (Figur 6).

Resultater

3.2 Dødelighet etter smitte med *Yersinia ruckeri*

Etter 33 dager ble det registrert ett dødt individ i mock karet (Figur 7). I denne perioden fra dag 31 ble det observert økt dødelighet i de øvrige gruppene. Med mistanke om lav næringstilgang og et økende behov for næring ble smitteforsøket terminert etter 35 dager. Alle bakterieutstrykene fra de smittede gruppene viste oppvekst av renkulturer. Det siste utstryket ble tatt dag 31.

Dødeligheten var høyest i perioden fra dag 14 til dag 15 etter første smitte, og fra dag 30 til terminering (figur 7 og 8). I perioden fra dag 16 til 31 var det kun i gruppe 3 (sjokk) og gruppe 1 (kontroll) dødelighet ble registrert. 52 % av samlet dødelighet skjedde fra dag 22.



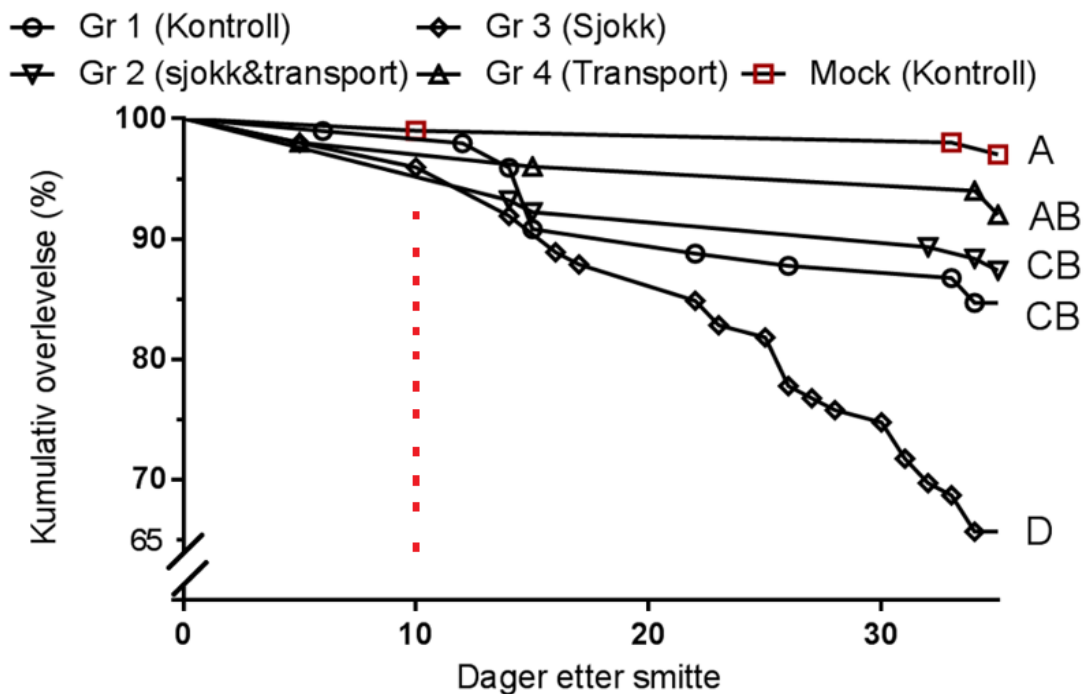
Figur 7. Antall døde lakselarver i hver gruppe fra badsmitten med *Y. ruckeri*. Første badsmitte ble utført dag 1 (ISO1), dag 10 ble re-smitte utført med *Y. ruckeri* (ISO2). Fra dag 1 til dag 5 ble det tatt totalt fem prøveuttak fra hver gruppe. Etter prøveuttakene var det ca 100 individ igjen i hvert kar/gruppe.

Gjennom forsøksperioden døde fire larver (3 %) i mock-karet fordelt på henholdsvis dag 1, 10, 33 og 35. I gruppe 1 (kontroll) døde 15,3 % av individene. Mellom dag 14 og 15 døde totalt syv individer i denne gruppen, mens dødeligheten forøvrig var spredt med en topp mot terminering. Gruppe 2 (sjokk og transport) hadde en total dødelighet på 12,6 % også her høyest ved dag 14 og 15 med åtte individer, mens fra dag 33 til 35 døde fem individer. Gruppe 3

Resultater

(sjokking) viste en relativt jevn dødelighet i løpet av forsøksperioden med en akkumulert dødelighet på 34,3 %. Gruppe 4 (transport) hadde lavest dødelighet etter mock-gruppen med kun åtte døde individ (8 %), hvorav fire av individene døde mellom dag 32 og 35 etter smitten. En oversikt over antall larver ved start og antall døde er fremstilt i appendix V.

Gjennom forsøket var overlevelsen signifikant lavere for gruppe 1 (Kontroll), 2 (Sjokk og Transport) og 3 (Sjokk) sammenlignet med mock (figur 8). Kun gruppe 4 (Transport) var ikke signifikant forskjellig fra mock ($p = 0.12$). Gruppe 4 viste 7,2 % høyere overlevelse mot gruppe 1 ($p = 0.11$). Gruppe 3 (sjokk) var den eneste behandlede gruppen som viste signifikant forskjell i overlevelse fra både gruppe 1 og de øvrige gruppene.

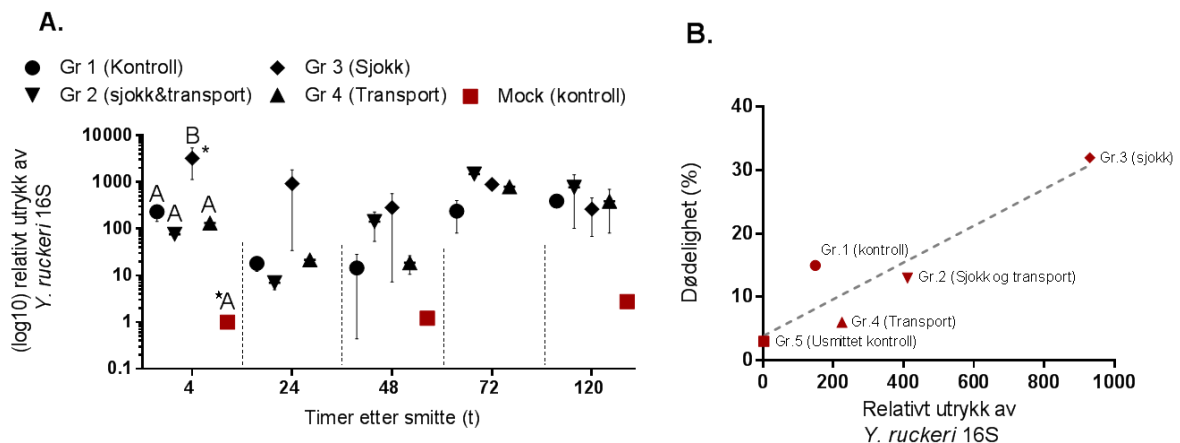


Figur 8. Kumulativ overlevelse etter badsmitte med *Yersinia ruckeri* hos lakselarver som gjennomgikk ulikt industrielt simulert stress under embryogenesen. Signifikante forskjeller er indikert ved ulike bokstaver. Rød strek indikerer re-smitte på dag 10. Overlevelsen i usmittet kontroll var signifikant høyere sammenlignet med Gr 1 ($p = 0.0024$), Gr 2 ($p = 0.0105$) og Gr 3 ($p < 0.0001$).

Resultater

3.2.1 Relativt uttrykk av *Yersinia ruckeri* 16S rRNA og dødelighet

For å undersøke tilstedeværelse og kvantifisere *Y. ruckeri* etter smitte ble bakteriens 16S rRNA analysert med kvantitativ RT-PCR på prøvene tatt 4, 24, 48, 72 og 120 timer etter første badsmitte. Fire timer etter badsmitte ble *Y.ruckeri* påvist i yngel fra alle smittede grupper (Fig. 9A). Gruppe 3 (sjokk) hadde signifikant høyere ($p < 0,05$) uttrykk av 16S rRNA i forhold til gruppe 1 (kontroll) fire timer etter smitte. Ingen andre signifikante forskjeller ble registrert mellom behandlingsgruppene innenfor hvert prøvetidspunkt. Fra 4 til 24 timer etter smitte ble mengden 16S rRNA redusert i alle grupper, men økte igjen til 72 t etter smitte. For å undersøke om dødelighet og uttrykket av *Y. ruckeri* 16S rRNA korrelerte, ble forholdet analysert med Pearson-r korrelasjonstest (Figur 3B). Resultatet ga positiv korrelasjon med R^2 på 0.85. Det vil si at 85 % av variasjonen i dødelighet er forklart med variasjonen av *Y. ruckeri* 16S rRNA uttrykket og motsatt (GraphPad, 2016). Uten gruppe 3 ($n=4$) er ikke korrelasjonen signifikant ($p = 0.43$).



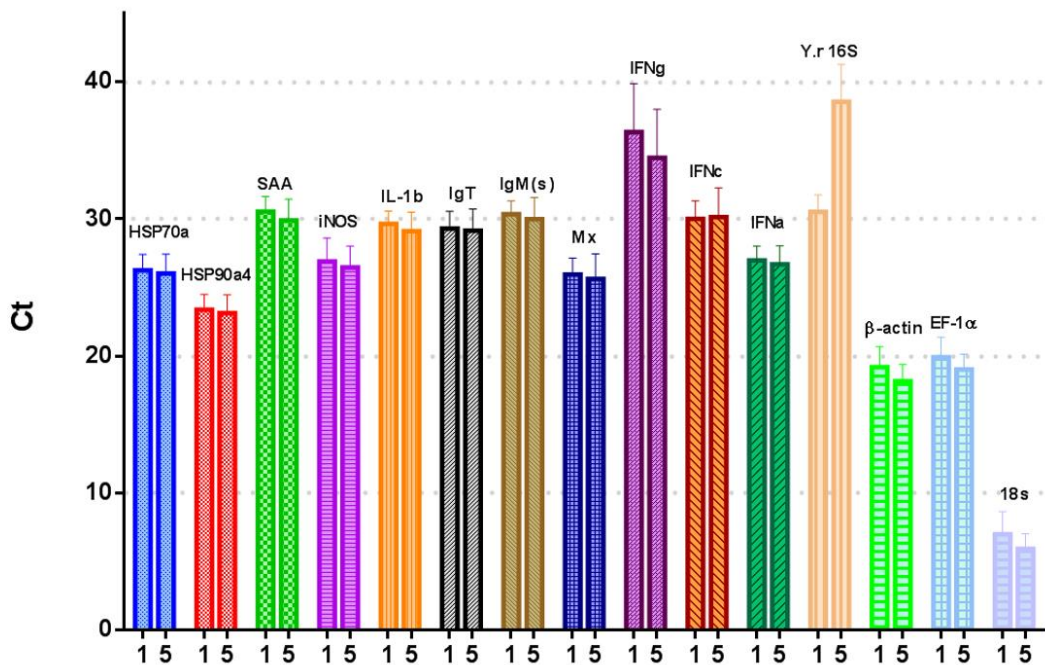
Figur 9. Relativt uttrykk av *Yersinia ruckeri* 16S rRNA hos lakselarver (741 dgr) etter badsmitte med *Y. ruckeri*. Dataene er presentert som gjennomsnittlig relativt uttrykk fra 7-10 yngel (741 dgr – 800 dgr) med standardfeil (Relativt uttrykk \pm S.E). **A.** Relativt uttrykk av *Y. ruckeri* 16S (log10) 4, 24, 48, 72 og 120 timer etter smitte for hver av de fem behandlede gruppene. Gjennomsnittlig Ct-verdi for kalibrator var 38 (= Mock 4 t, merket med stjerne, ★). Signifikant ulikhet til gr. 1 (kontroll) er notert med asterisk ved $p < 0,05$. **B.** Forhold mellom kumulativ dødelighet og gjennomsnittlig relativt uttrykk av *Y. ruckeri* 16S rRNA fra alle tidspunktene. Pearson r-korrelasjonstest ga koeffisient $R^2 = 0,8519$ ($p = 0,0243$).

Resultater

3.3 Relativt uttrykk av immun- og stressrelaterte gen

I dette forsøket ønsket vi å studere to aspekt av immun- og stressproteinresponser. Først og fremst om sjokking og transport påvirket uttrykk av immun- og stressgener i larver smittet med *Y.ruckeri*. Samtidig er det lite kunnskap om immun- og stressresponser hos laks på larvestadiet før startforing, og det var derfor interessant å også undersøke hvilken effekt selve smitten med *Y. ruckeri* hadde på disse samme responsene, uavhengig av sjokking og transport. Uttrykket av ti immungener og to stressrelaterte gener ble målt med Kvantitativ RT-PCR (Kapittel 2.4.4, tabell 2). Det ble analysert ti hele larver fra hver gruppe fra fem forskjellige prøveuttak: 4, 24, 48, 72 og 120 timer etter første smitte. Konstitutivt uttrykk av de undersøkte genene i usmittet kontrollgruppe sammenlignet med uttrykket i smittet kontroll 4 timer etter smitte er vist under (Figur 10). IFN β var kun lavt uttrykt i 25 av 250 individ med gjennomsnittlig Ct-verdi $35,5 \pm 1,4$ og er ikke nevnt videre her i kapittel 3 (Appendix IIX). Generelt var det det små endringer i uttrykket av de fleste undersøkte genene i forsøksgruppene etter badsmitte med *Y ruckeri*.

Transkripsjonsnivå av undersøkte gener på smittede og usmitede lakselarver



Figur 10. Konstitutivt uttrykk av 15/16 undersøkte gen i hele lakselarver fra gruppe 5 (usmittet kontroll) og Ct-verdier i gruppe 1 (smittet kontroll) 4 timer etter badsmitte med *Y. ruckeri*. Data er presentert som gjennomsnittlig Ct-verdi (n=9) og standardavvik. terskelverdi 0.1. Venstre kolonne = gruppe 1, Høyre kolonne = gruppe 5.

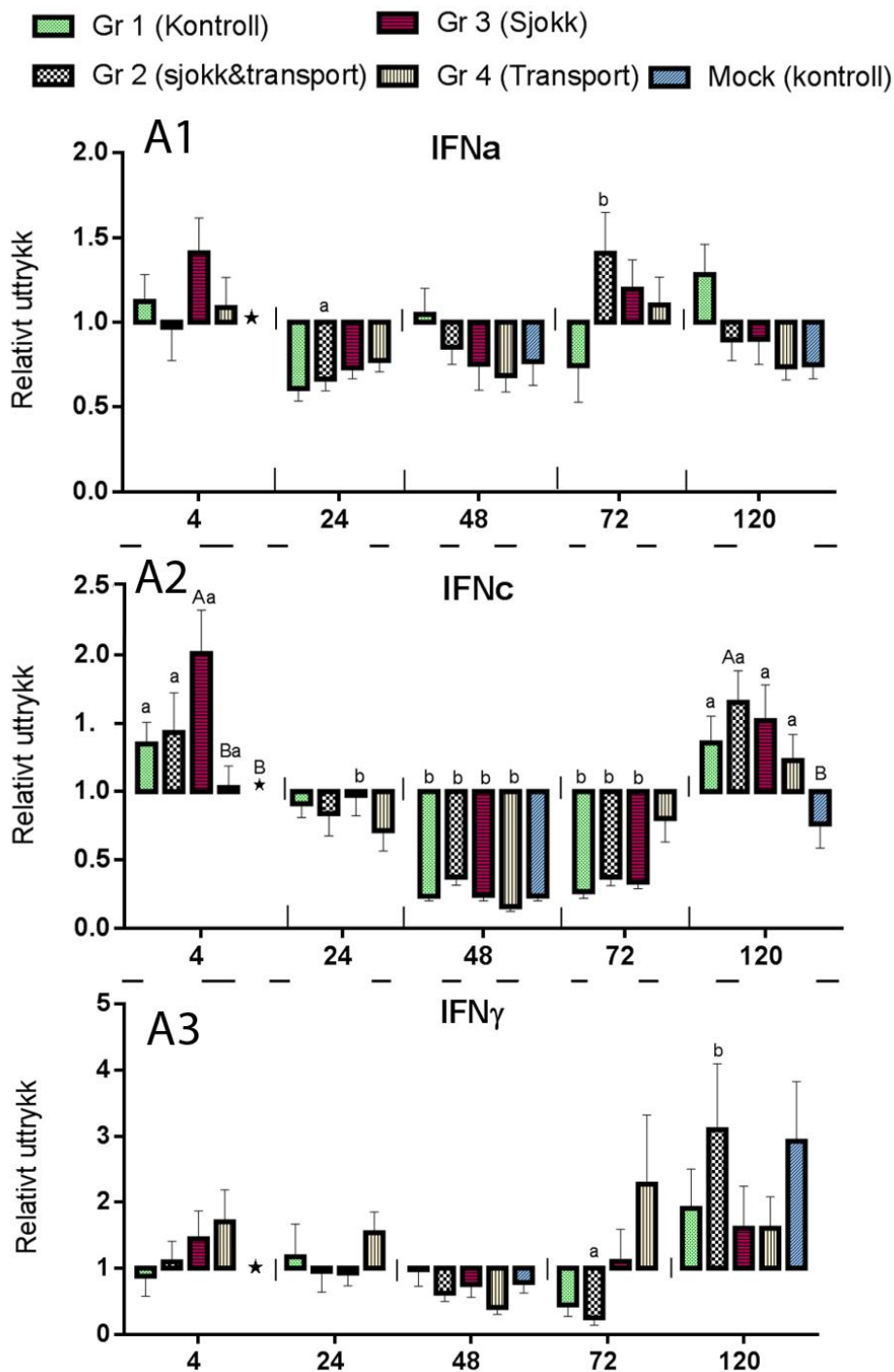
3.3.1 Relativt uttrykk av IFN α , IFN γ og IFN β etter badsmitte med *Y. ruckeri*

Uttrykket av IFN α var noe nedregulert 24 t etter smitte fra 4 t uttaket. Fra 24 til 72 t etter smitte økte uttrykket signifikant for gruppe 2 (Sjokk og Transport) (Figur 11, A1). Gruppe 3 viste noe høyere uttrykk (1,5x) enn gruppene for øvrig fire timer etter smitte.

Gruppe 3 (Sjokk) viste signifikant høyere uttrykk av IFN β i forhold til gruppe 4 (Transport) og mock (Figur 11, A2). Fra 4 til 48 t etter smitte var IFN β uttrykket signifikant nedregulert relativt til kalibrator for samtlige grupper ($p < 0,01$). Uttrykket økte 120 t etter smitte hvor gruppe 2 (Sjokk og transport) viste signifikant oppregulering mot mock.

IFN γ (Figur 11, A3) viste høye transkripsjonsnivåer i hele prøvematerialet og er også preget av stor individuell variasjon (appendix IIX). Etter badsmitten viste gruppe 4 (Transport) høyest relativt uttrykk av IFN γ . Samtlige grupper viste nedregulert uttrykk 48 t etter smitte. Fra 48 til 72 t stiger det gjennomsnittlige uttrykket i gruppe 3 (Sjokk) og gruppe 4 (Transport). Uttrykket stiger signifikant i gruppe 2 (Sjokk og Transport) fra 72 til 120 timer etter smitte. Fra 4 til 120 t øker uttrykket 2,9x i mock gruppen.

Resultater



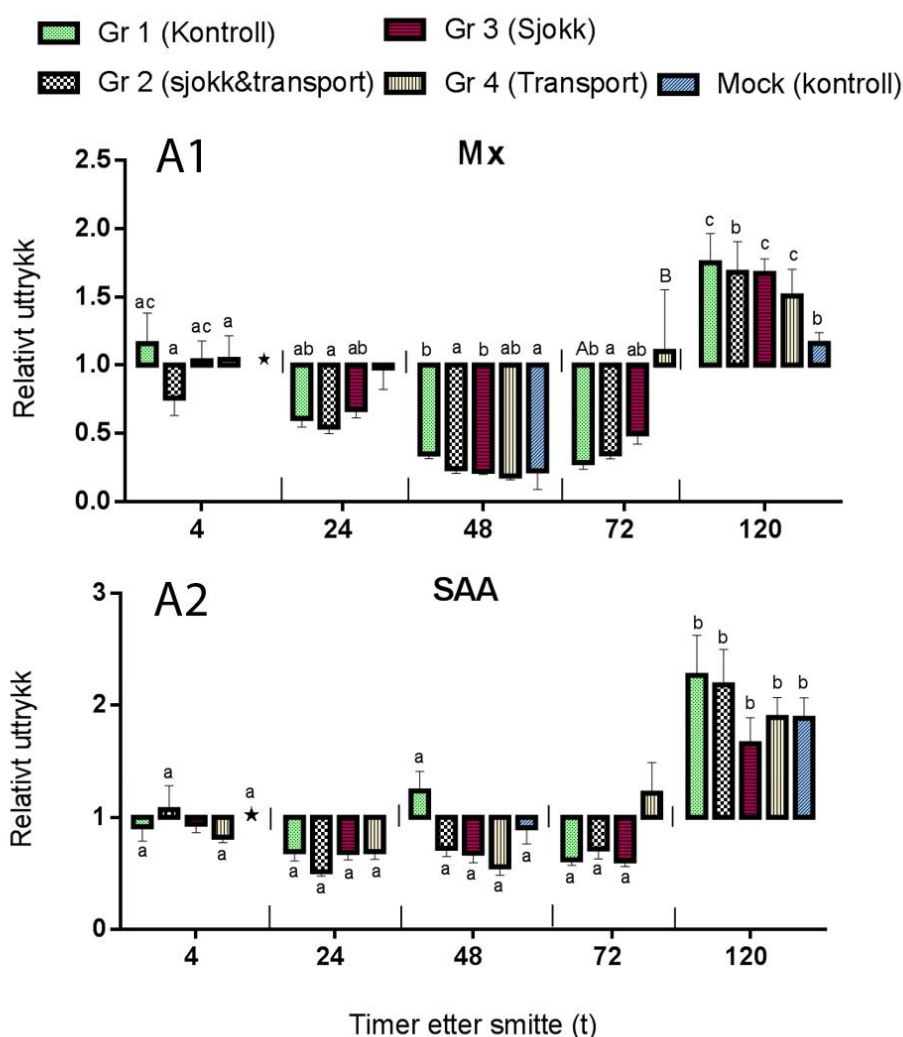
Figur 12. Relativt uttrykk av IFN α (A1), IFN c (A2) og IFN γ (A3) 4, 24, 48, 72 og 120 timer etter badsmitte med *Yersinia ruckeri*. Dataene er presentert som gjennomsnitt av relativt uttrykk av 8-10 yngel (fra 741 dgr) med standardfeil (Relativt uttrykk \pm S.E). Det relative uttrykket ble målt med kvantitativ RT-PCR og normalisert med geometrisk gjennomsnitt av tre referansegen; β -actin, ef-1 α og 18S rRNA. Mock 4 t er benyttet som kalibrator, merket med stjerne, \star . Signifikante ulikheter mellom de fem gruppene ved ett gitt tidspunkt er merket med store bokstaver. Signifikante forskjeller for en gitt gruppe ved ulike tidspunkt er merket med små bokstaver.

Resultater

3.3.2 Mx, SAA og iNOS

mRNA transkriptet til Mx-proteinet var godt uttrykt i prøvematerialet med gjennomsnittlig Ct-verdi 26 for kalibrator (figur 13, A1). Generelt viste uttrykket nedregulering 48 timer etter smitte, før uttrykket steg signifikant til 120 t etter smitte. Ved 72 t etter smitte var gruppe 4 (Transport) signifikant høyere uttrykt sammenlignet med gruppe 1 (Kontroll).

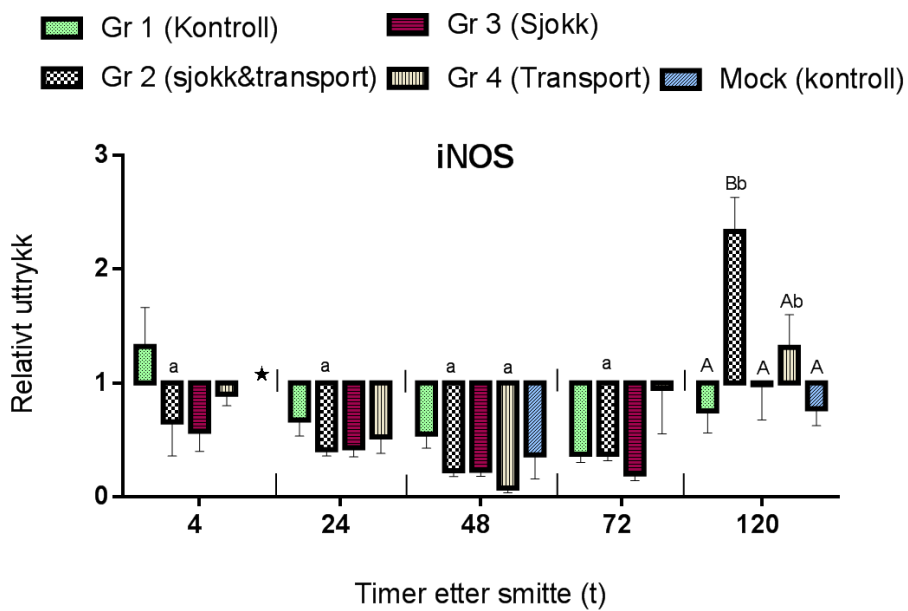
Det akutt inflammatoriske proteinet SAA viste generelt lite variasjon i uttrykket fra 4 til 72 t etter smitte (Figur 13, A2). Fra 72 til 120 t etter smitte, økte uttrykket signifikant for samtlige grupper. Ingen signifikante forskjeller mellom gruppene ble registrert.



Figur 13. Relativt uttrykk av Mx (A1) og SAA (A2) 4, 24, 48, 72 og 120 timer etter badsmitte med *Yersinia ruckeri*. Dataene er presentert som gjennomsnitt av relativt uttrykk av 8-10 yngel (fra 741 dgr) med standardfeil (Relativt uttrykk \pm S.E). Det relative uttrykket ble målt med kvantitativ RT-PCR og normalisert med geometrisk gjennomsnitt av tre referansegene; β -actin, ef-1 α og 18S rRNA. Mock 4 t er benyttet som kalibrator. Mock 4 t, merket med stjerne, ★). Signifikante ulikheter mellom de fem gruppene ved ett gitt tidspunkt er merket med store bokstaver. Signifikante forskjeller for en gitt gruppe ved ulike tidspunkt er merket med små bokstaver.

Resultater

Figur 14 viser mRNA transkriptet til enzymet iNOS. Uttrykket var noe høyere i gruppe 1 (Kontroll) sammenlignet med de øvrige gruppene de første 48 timene etter smitte. Generelt var uttrykket gradvis nedregulert frem til 48 t, etterfulgt av en oppregulering 120 t etter smitte. Ved 120 t viste gruppe 2 (Sjokk og transport) ett signifikant oppregulert uttrykk, både fra 4 timers uttaket og sammenlignet med de øvrige gruppene ved 120 t uttaket.

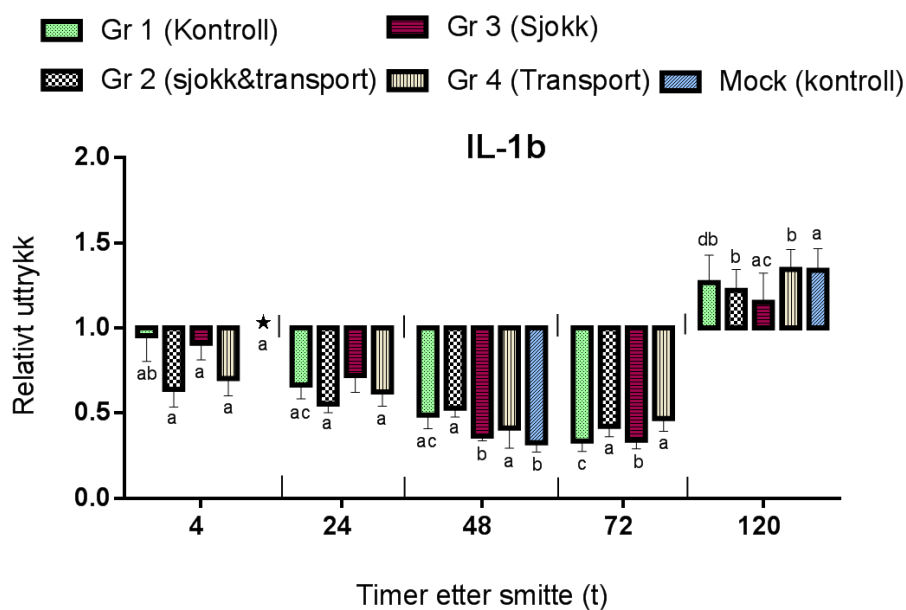


Figur 14. Relativt uttrykk av iNOS, 4, 24, 48, 72 og 120 timer etter badsmitte med *Yersinia ruckeri*. Dataene er presentert som gjennomsnitt av relativt uttrykk av 8-10 yngel (fra 741 dgr) med standardfeil (Relativt uttrykk \pm S.E). Det relative uttrykket ble målt med kvantitativ RT-PCR og normalisert med geometrisk gjennomsnitt av tre referansegen; β -actin, ef-1 α og 18S rRNA. Mock 4 t er benyttet som kalibrator, merket med stjerne, ★. Signifikante ulikheter mellom de fem gruppene ved ett gitt tidspunkt er merket med store bokstaver. Signifikante forskjeller for en gitt gruppe ved ulike tidspunkt er merket med små bokstaver.

Resultater

3.3.3 Interleukin-1b, og immunglobulinene (Ig) -M og -T

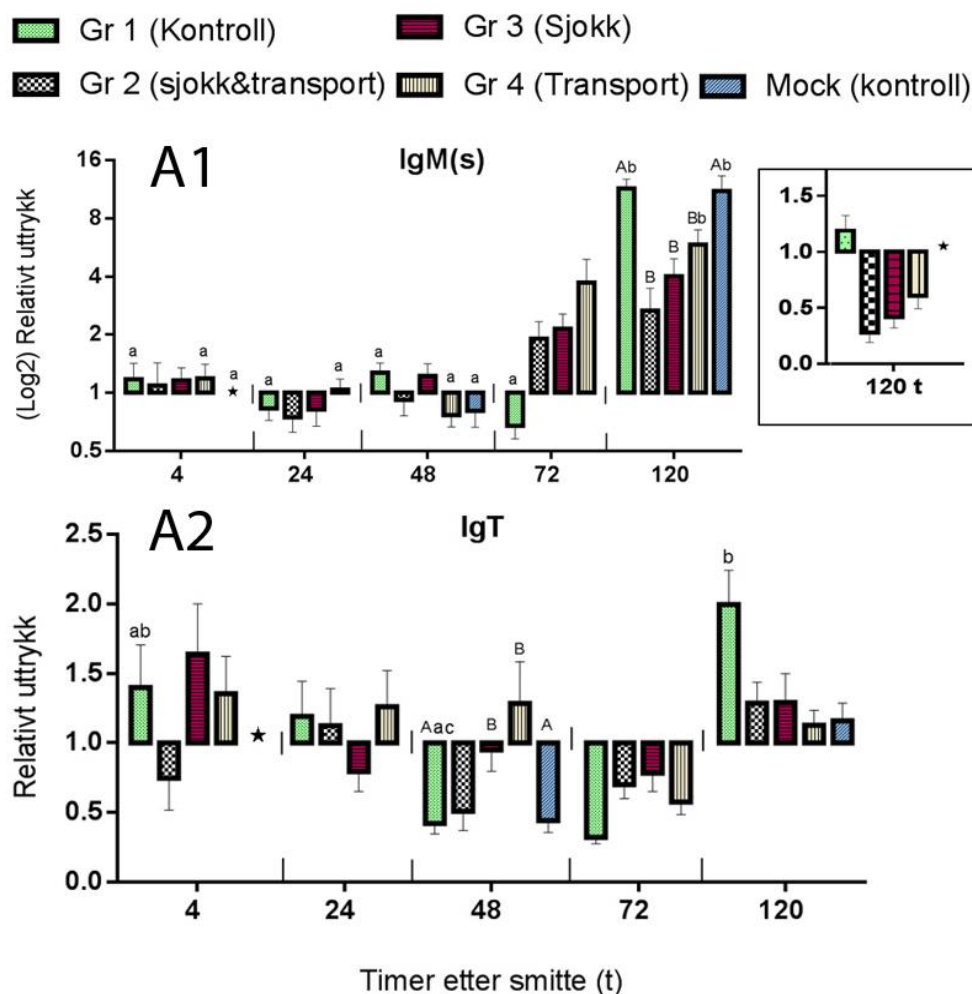
Det relative uttrykket til det pro-inflammatoriske cytokinet IL-1b reduseres gradvis i perioden fra 4 t til 48-72 t (0,5x) etter smitte (Figur 15). Fra 72 t til 120 t stiger uttrykket signifikant for alle gruppene. Gruppe 1 (Kontroll) og 3 (Sjokk) viser høyest uttrykk av de fire gruppene 4 t etter smitte, dette forholdet vedvarte frem til 24 t etter smitte. Ved 48 og 72 t er IL-1b mRNA transkriptet noe lavere uttrykt i gruppe 1 og 3 enn gruppe 2 (Sjokk og Transport) og 4 (Transport).



Figur 15. Relativt uttrykk av IL-1b, 4, 24, 48, 72 og 120 timer etter smittebehandling med *Yersinia ruckeri* i 45 min. Dataene er presentert som gjennomsnitt av relativt uttrykk av 8-10 yngel (fra 741 dgr) med standardfeil (Relativt uttrykk \pm S.E). Det relative uttrykket ble målt med kvantitativ RT-PCR og normalisert med geometrisk gjennomsnitt av tre referanseneg; β -actin, ef-1 α og 18S rRNA. Mock 4 t er benyttet som kalibrator (merket med stjerne, ★). Gjennomsnittlig Ct-verdi for kalibrator var 29,1. Signifikante ulikheter mellom de fem gruppene ved ett gitt tidspunkt er merket med store bokstaver. Signifikante forskjeller for en gitt gruppe ved ulike tidspunkt er merket med små bokstaver.

Figur 16A1 viser utviklingen av det relative uttrykket til IgM(s) over 5 dager etter smitte med ISO1, fremstilt logaritmisk (log 2). Generelt var uttrykket jevnt mellom gruppene til og med 48 t etter badsmitten. Gruppe 1 (Kontroll) er den eneste gruppen som viser et nedregulert uttrykk i forhold til kalibrator ved 72 t. Fra 48 til 120 t øker uttrykket signifikant for gruppe 1 (11x), gruppe 4 transport (5,8x) og mock (11x). Ved 120 t er gruppe 1 noe høyere uttrykt enn mock (innfelt, figur 11). Gruppe 2 (sjokk og transport), gruppe 3 (sjokk) og gruppe 4 er nedregulert relativt til mock.

Resultater



Figur 16. Relativt uttrykk av **IgM(s) vist ved log 2 (A1)** og **IgT (A2)** 4, 24, 48, 72 og 120 timer etter badsmitte med *Yersinia ruckeri*. Dataene er presentert som gjennomsnitt av relativt uttrykk av 8-10 yngel (fra 741 dgr) med standardfeil (Relativt uttrykk \pm S.E). Det relative uttrykket ble målt med kvantitativ RT-PCR og normalisert med geometrisk gjennomsnitt av tre referansegen; β -actin, ef-1 α og 18S rRNA. Mock 4 t er benyttet som kalibrator merket med stjerne, ★. Signifikante ulikheter mellom de fem gruppene ved ett gitt tidspunkt er merket med store bokstaver. Signifikante forskjeller for en gitt gruppe ved ulike tidspunkt er merket med små bokstaver. **Innfelt i figur A1:** Gjennomsnittlig relativt uttrykk kalibrert mot usmittet kontroll ved 120 t. Ct-verdi for kalibrator 120 t = 27,6.

Uttrykket av IgT (Figur 16, A2) var preget av store individuelle forskjeller innad i gruppene med forholdsvis høye Ct-verdier. 4 timer etter smitte viste gruppe 3 (sjokk) det høyeste uttrykket, etterfulgt av gruppe 1 (kontroll) og gruppe 4 (Transport). Gruppe 2 (sjokk og transport) viste lavest uttrykk. Gruppe 1 viste en gradvis nedregulering til 72 t etter smitte med en signifikant oppregulering mot 120 timer. Alle behandlingsgruppene ble nedregulert i perioden 4 til 72 t. Uttrykket var relativt jevnt mellom gruppe 2, 3, 4 og mock ved 120 t.

Resultater

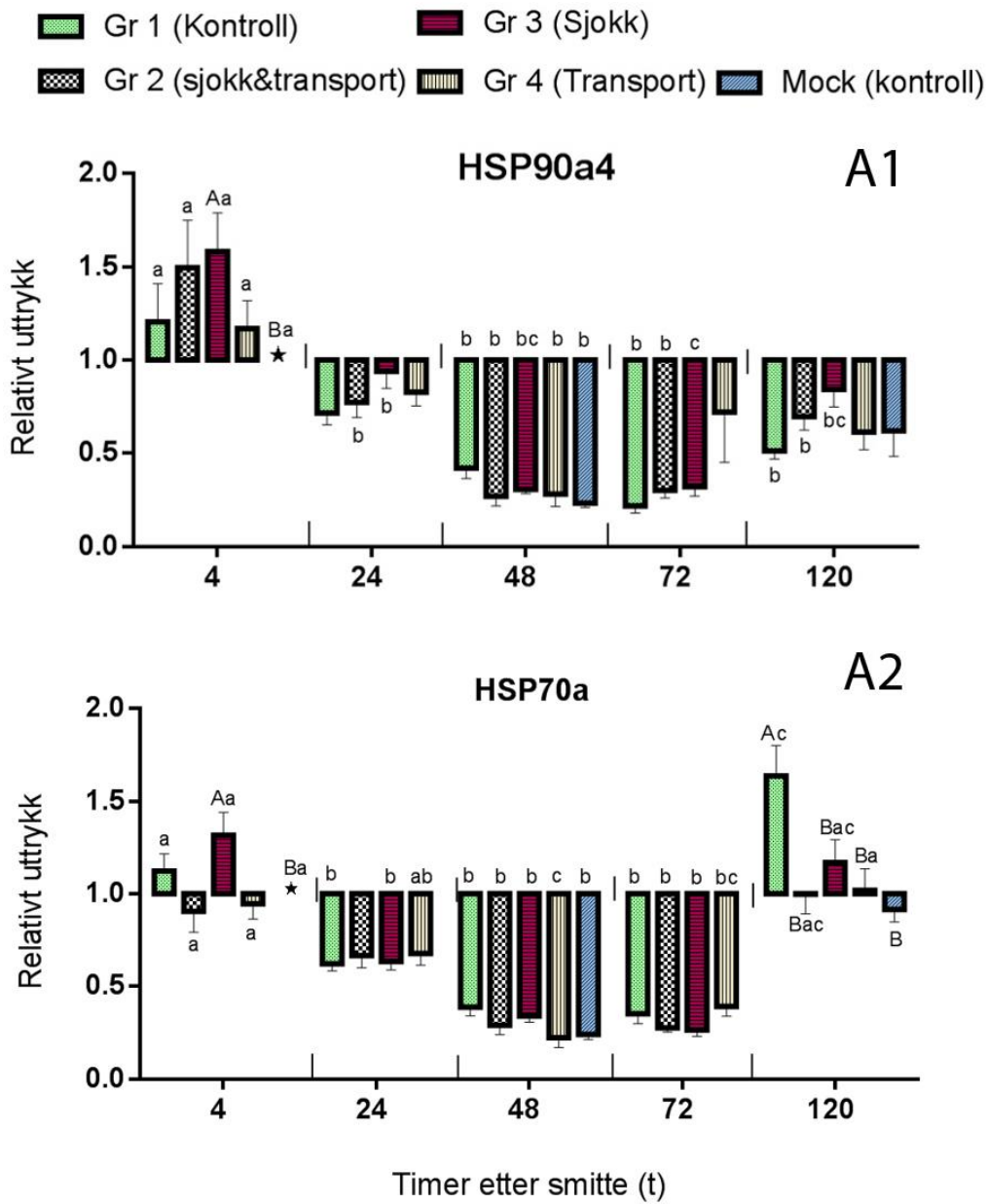
3.3.4 Stressproteinene HSP70a og HSP90a4

mRNA uttrykket til begge heat-shock proteinengenene viser en lignende tendens i uttrykket gjennom perioden, med lavest uttrykk 48 og 72 timer etter smitte (Figur 17). HSP90a4 starter (4 t) høyere og avslutter (120 t) lavere sammenlignet med HSP70a relativt til deres kalibrator (figur 13). Foruten om uttrykket av HSP70 til gruppe 1 (kontroll) ved 120 t uttaket er forholdet mellom gruppene relativt stabilt fra 4 til 120 t etter smitte for begge transkriptene. Gruppe 3 (Sjokk) viser det høyeste uttrykket av både HSP90a4 og HSP70 ved 4 t etter smitte.

HSP90a4 transkriptet var signifikant nedregulert fra 4 til 24 etter smitte hos gruppe 2 (sjokk og transport) og 3, hvor uttrykket var høyest sammenlignet med de øvrige gruppene. HSP90a4 var høyest uttrykt i gruppe 2 og 3 fire timer etter smitte, mens fra 4 til 24 t ble uttrykket signifikant nedregulert i disse to gruppene. Gruppe 3 viste signifikant høyere uttrykk enn mock ved 4 t. Gruppe 1 og 4 (Transport) var signifikant nedregulert etter 48 t sammenlignet med 4 t uttaket. Generelt var uttrykket redusert 48 og 72 t, og oppregulert ved 120 t etter smitte.

Fire timer etter smitte var HSP70 høyest uttrykt i gruppe 3 og 1 mens gruppe 2 viste det laveste uttrykket. Fra 4 til 24 timer etter smitte ble gruppe 1 (kontroll) og gruppe 3 (sjokk) signifikant nedregulert, henholdsvis $0,001 < p < 0,01$ og $p < 0,0001$. Fra 4 til 48 timer ble samtlige grupper signifikant nedregulert. Fra 48 til 120 timer stiger uttrykket signifikant for alle gruppene. Det relative uttrykket ved 120 t er forholdsvis likt mellom gruppe 2, 3 og 4 som ved 4 t. Gruppe 1 (kontroll) viser en signifikant økning fra 4 til 120 t ($0,001 < p < 0,01$) og var ved dette tidspunktet signifikant høyere sammenlignet med de øvrige gruppene.

Resultater

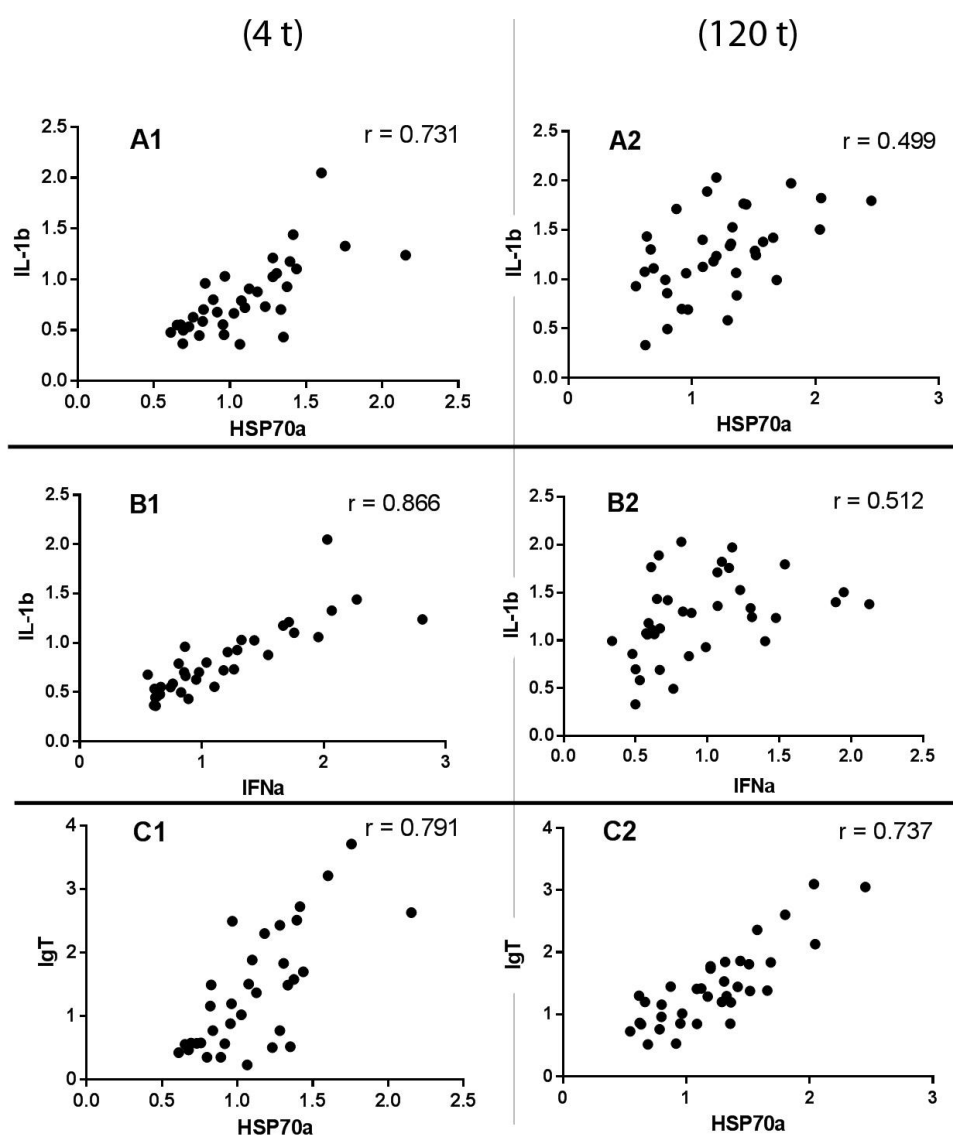


Figur 17. Relativt uttrykk av **HSP90a4 (A1)** og **HSP70a (A2)**, 4, 24, 48, 72 og 120 timer etter badsmitte med *Yersinia ruckeri*. Dataene er presentert som gjennomsnitt av relativt uttrykk av 8-10 yngel (fra 741 dgr) med standardfeil (Relativ uttrykk \pm S.E). Det relative uttrykket ble målt med kvantitativ RT-PCR og normalisert med geometrisk gjennomsnitt av tre referansegene; β -actin, ef-1 α og 18S rRNA. Mock 4 t er benyttet som kalibrator merket med stjerne, ★. Gjennomsnittlig Ct-verdi for kalibrator var henholdsvis 23 og 26. Signifikante ulikheter mellom de fem gruppene ved ett gitt tidspunkt er merket med store bokstaver. Signifikante forskjeller for en gitt gruppe ved ulike tidspunkt er merket med små bokstaver.

Resultater

3.4 Korrelasjonsanalyse

Til å studere korrelasjoner mellom genuttrykkene på plommesekkstadiet ble det gjennomført en spearman korrelasjonstest på prøver fra 4 og 120 t etter første badsmitte (appendix IX). Interessante funn ble analysert i punktdiagram (Figur 18). Generelt, fire timer etter smitte var det flere korrelasjoner mellom mRNA transkripter undersøkt enn 120 t etter smitte. Med to unntak var også korrelasjonskoeffisientene høyere ved 4 t sammenlignet med 120 t uttaket.

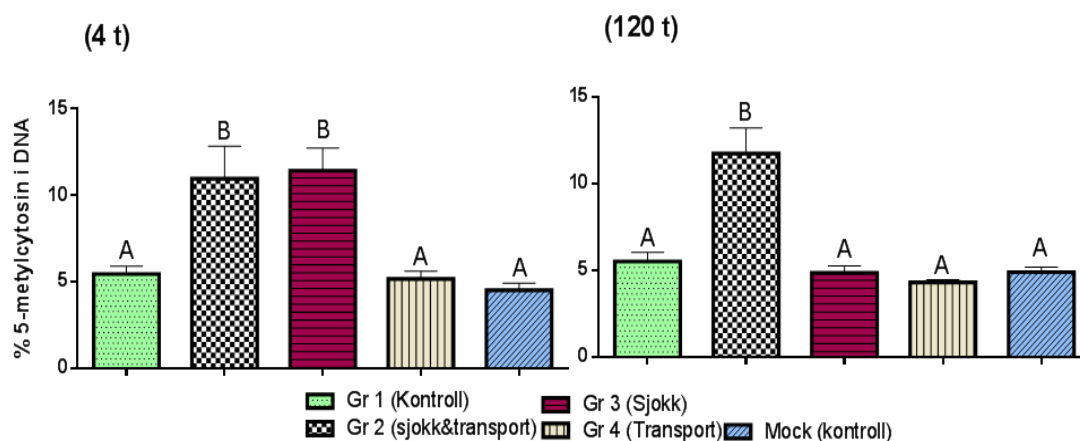


Figur 18. XY- spredningsanalyse av relativt uttrykk av utvalgte immun- og stressrelaterte gen (n = 36). Figurer merket x1 er prøver fra 4 t etter smitte. x2 120 t etter smitte. r = Spearman korrelasjonsverdi.

Resultater

3.5 DNA-metylering (%) av 5-metylcytosin

I dette forsøket ønsket vi å teste indirekte ELISA som metode for analysering av prosentvis 5-metylcytosin globalt på isolert DNA.



Figur 19. ELISA analyse av 5-metylcytosin (5-mC) fra hele individ ved 4 og 120 timer etter badsmitte med *Yersinia ruckeri*. n = 8 for hver gruppe. Signifikant forskjeller er notert med store bokstaver ved $p < 0,05$.

Ved 4 og 120 timer etter smitte er den prosentvise andelen 5-metylcytosin relativt lik for gruppe 1 (Kontroll), 4 (Transport) og 5 (Mock). Både gruppe 2 og 3 viser signifikant høyere prosentvis global 5-mC sammenlignet med de øvrige gruppene ($p < 0,01$) ved 4 timers uttaket, men kun i gruppe 2 er dette forholdet vedvart ved 120 t, hvor % 5-mC i gruppe 3 er redusert signifikant til samme nivå som de øvrige gruppene.

4 Diskusjon

Under embryogenesen går det befruktete egget fra å være embryoniske stamceller til å forme hele organ. Epigenetiske mekanismer som DNA-metylering, histon-modifisering og non-coding RNA sørger for celle differensieringen. Forstyrrelser i form av stress i løpet av denne perioden kan ha signifikante konsekvenser på den fenotypiske karakteristikken. I løpet av perioden fra lakseroggen er befruktet til den er mottatt hos settefiskproduzenten går embryoene gjennom mekanisk sjokking og transport. Dette er to element som potensielt kan påvirke karakteristikken til individene.

Målet for oppgaven var å studere hvordan produksjonsindusert stress i form av mekanisk sjokking og/eller transport under embryogenesen (300-400 dgr) ville påvirke overlevelse og uttrykk av utvalgte immungener på plommesekkstadiet (740-900 dgr) etter en immunologisk utfordring - badsmitte med *Yersinia ruckeri*. Effektene av tidligere behandling ble undersøkt ved å registrere dødelighet måle immun- og stress gen respons ved kvantitativ RT-PCR og undersøke DNA-metylering i form av en prosentvis 5-metylcytosin analyse

I denne studien ble det demonstrert at produksjonsindusert stress under embryogenesen til atlantisk laks kan øke dødelighet og endre prosentvis 5-metylcytosin profil etter badsmitte med *Y. ruckeri*. I tillegg blir det vist at lakselarver (fra 741 dgr) uttrykker flere immun- og stressrelaterte gener, men at det var små endringer i uttrykket for de fleste av disse etter badsmitte med *Y. ruckeri*.

4.1 Undersøkelse av behandlingsselektiv dødelighet

Det ble det ikke registrert behandlingsselektiv dødelighet i forkant av badsmitten. For å undersøke eventuell annen bias mellom behandlingsgruppene ble, vekt og klekkespunkt registrert rutinemessig. Ingen signifikante forskjeller mellom gruppene ble registrert. Gruppe 2 (sjokk og transport) og gruppe 3 (sjokk) viste forhøyet dødelighet rett etter sjokkingen. Det er en risiko for at den levedyktig rognen dør under mekanisk sjokking (Jensen og Collins, 2003). En slik tendens ble ikke observert i dette forsøket. I løpet av perioden fra sjokking til klekking utlignet forskjellene mellom gruppene seg - noe som tyder på at det var ubefructede og allerede døde egg som ble sortert ut etter påskyndet koagulering.

Diskusjon

Under selve smitteforsøket sank oksygen-nivået i samtlige grupper til 30 %, 5 etter min var nivået tilbake til 80-95 %. Langvarig og kronisk hypoksia kan påvirke en rekke fysiologiske og biokjemiske prosesser, som overlevelse og endringer i genuttrykk (Kvamme et al., 2013). Kortvarig (< 12 t) lave oksygennivå (2.37 mg l⁻¹, 10 °C) ser ikke ut til å indusere dødelighet på larvestadiet (Sundt-Hansen et al., 2007).

4.2 Dødelighet etter badsmitte med *Y. ruckeri*

Etter første badsmitte ble det utført prøveuttak fordelt på fem tidspunkt: 4 t, 1 dag, 2 dager, 3 dager og 5 dager. Ti dager etter første smitte ble en re-smitte utført. Dødelighet per gruppe fra dag 1 til 35 var: Kontroll 15,3 %, Sjokk og transport 12,6 %, Sjokk 34,3 %, Transport 8 %, Usmittet kontroll 3 %.

4.2.1 Forventet og faktisk oppstart av dødelighet etter badsmitte med *Y. ruckeri*

Under et normalt badsmitteforsøk med *Y. ruckeri* ser dødeligheten ut til å starte etter mellom dag 4 og dag 7 hos atlantisk laks og regnbueørret (Lillehaug et al., 1996; Raida og Buchmann, 2008; Raida et al., 2011; Chettri et al., 2012). På larvestadiet er det imidlertid mindre informasjon. I studien til Chettri et al. (2012) ble det ikke registret dødelighet i løpet av 15 dager på regnbueørret larver (152 dgr etter klekking), mens 73 % døde etter smitte av yngel som var 1118 dgr (etter klekking). Lillehaug et al. (1996) registrerte gradvis økende dødelighet med økt alder på larvestadiet til laks og oppnådde dødelighet på 40-50 % i larvegrupper som ble smittet (1x10⁷ cfu/ml) på omtrent samme døgngader som i vårt forsøk. Prøveuttakene i vårt forsøk ble lagt opp over en periode på 5 dager, slik at det siste uttaket skulle korrelere med antatt oppstart av dødelighet, noe det ikke gjorde.

Re-smitten ble dermed iverksatt 10 dager etter den første smitten med ISO2, og fra dag 14 økte dødeligheten i de smittede gruppene. Man vet virulensen til ulike *Y. ruckeri* stammer varierer, og er i flere tilfeller avirulent i lab-forsøk (Vercauteren et al., 2010). Det ville vært ønskelig å testet virulensen i forkant av forsøket, men på grunn av utviklingen til larvene og smittetidspunktet var det ikke tid. Det ble benyttet to isolat *Y. ruckeri* O1 fra hvert sitt feltutbrudd og basert på veksturvener bestemt hvilket isolat som skulle benyttes (begge isolatene viste forholdsvis lik vekst). Hvis det første isolatet (ISO1) skulle vise seg å være avirulent var

Diskusjon

det dermed anledning til å benytte seg av det andre isolatet (ISO2). Bakteriekonsentrasjon var høyere ved smitte nummer to, noe som kan ha bidratt til den økte dødeligheten. Om ISO2 var mer virulent enn ISO1 er dermed ikke sikkert, men vi kunne se en positiv korrelasjon mellom 16S rRNA etter første smitte og dødelighet. Det er dermed grunn til å tro at ISO1 har bidratt til dødeligheten, til å sannsynliggjøre påstanden ytterligere, er det vist i multibakterielle smitteforsøk på mus, hvor ulike bakterier sammen potensielt kan gi en synergisk effekt på dødelighet (Brook et al., 1984).

4.2.2 Årsak til dødelighet

For å etablere en sammenheng mellom dødelighet og *Y. ruckeri* var dødsårsaken ble det tatt utstryk på blodagar fra døde individer. Verifisering ble gjort på grunnlag av oppvekst av renkultur av *Y. ruckeri* og karakteristiske kjennetegn for bakterien i mikroskop. I tillegg ble det utført kvantitativ RT-PCR av *Y. ruckeri* 16S rRNA på prøver tatt de første 5 dagene etter første badsmitte til å undersøke infeksjonsforløpet. I forsøket til Chettri et al. (2012) ble det registrert rødhet ved munn og inflammasjon på ryggen til regnbueørret larver 2 dager etter smitte med *Y. ruckeri*. I vårt forsøk var ikke de kliniske tegnene like fremtredende, men det ble registrert noe rødhet rundt munnen på de døde smittede individene.

Det var en signifikant korrelasjon mellom gjennomsnittlig uttrykk av *Y. ruckeri* 16S rRNA og påfølgende dødelighet i forsøket. Denne korrelasjonen var ikke signifikant da gruppe 3 ble fjernet, men tidligere forsøk gjort på sebrafisk har vist økt dødelighet med økt bakteriekonsentrasjon (Kim et al., 2015). Også på regnbueørret er det registrert signifikant høyere bakteriekonsentrasjon i døde individ enn individ som overlevde smitte (Raida et al., 2011)

Andre mulige årsaker til dødelighet

Etter første badsmitte døde totalt 6 av 750 individer fra dag 1 til dag 5 etter smitten med ISO1. I denne perioden ble det tatt fem prøveuttak og vi vet håndtering og selve smitteprosedyren kan være stressende og dermed potensielt bidra til økt dødelighet. Det kan ikke utelukkes at larver som døde i løpet av, eller i kort tid etter behandling døde som en følge av selve håndteringen, men intervensjon ble forsøkt begrenset til et minimum og var lik for alle grupper.

Diskusjon

Selv dag 31 ga renkultur på blodager, men det kan diskuteres om *Y. ruckeri* var alene om årsaken til den økte dødeligheten i avslutningsfasen, dag 32-35. Startføring starter normalt rundt 900 dgr, og når vi avsluttet forsøket var larvene 1162 dgr. Det kan derfor tenkes at det var en kombinasjon av redusert plommesekk og smitten som førte til økt dødelighet disse siste dagene. Den fortsatt lave dødeligheten i usmittet kontroll i løpet av dag 32-35 tilsier imidlertid at *Y. ruckeri* infeksjonen var sterkt medvirkende til registrert dødeligheten også i avslutningefasen av forsøket.

4.2.3 Effekt av produksjonsindusert stress på dødelighet etter badsmitte med *Y. ruckeri*

Forskjellene i dødelighet mellom de ulike behandlingene under embryogenesen kan være noe vrient å forklare, da det er utført svært få studier på området. Det man imidlertid vet er at avhengig av intensitet og varighet på stressoren kan toleransen ovenfor en senere stressor både økes (Dhabhar, 2002; Auperin og Geslin, 2008) og redusere (Hunter et al., 1980; Fast et al., 2008). I vårt forsøk fant vi eksempel på både redusert og uendret motstandsdyktighet for sykdom. Gruppe 3 (sjokk) viste signifikant høyere dødelighet mot samtlige grupper, mens gruppe 4 (transport) viste en ikke-signifikant forskjell i dødelighet mot usmittet kontroll.

Stressrespons som en fordelaktig konsekvens av stressor er kontroversielt, i hvertfall hos mennesker (Flinn et al., 2011), men forsøk på gnagere har vist positive effekter på HPI-aksen og utvikling av hippocampus-nevroner etter moderat eksponering til stress rett etter fødsel og under utviklingen (Ladd et al., 2004; Fujioka et al., 2006). Gruppe 2, som var utsatt for både sjokking og transport var forventet å gi høyest dødelighet, men viste faktisk tilsvarende respons som den ubehandlede gruppen (Gruppe 1). Det kan nesten virke som langvarig moderat stress (transport) kan øke toleransen og kortvarig intenst stress (sjokk) reduserer toleransen, mens en kombinasjon av disse to utligner hverandre (gruppe 2).

Under transporten ble rognen utsatt for mekanisk behandling og temperaturendringer ($1.12 \text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0.96$) i løpet av 48 timer. I en produksjonssammenheng vil transport av øyerogn variere fra noen timer til flere dager. Intensiteten og varigheten til en stressor er av betydning (Barton, 2002), og det er dermed ikke sikkert en kortere eller lenger transport enn det vi gjennomførte ville gitt tilsvarende resultater. En annen faktor verdt å nevne er at de transporterte gruppene teknisk sett var 12 dgr yngre (1.6% av total utviklingstid til 740 dgr) enn de øvrige gruppene, men der det er antatt at et så lite avvik ikke har påvirket resultatene i noen vesentlig grad.

4.3 Relativt uttrykk av immun- og stressrelatertegener etter kvantitativ RT-PCR

På larvestadiet har flere fiskearter et dårlig utviklet immunforsvar og er avhengig av den medfødte immunresponsen (Magnadottir, 2006). I likhet med regnbueørret larver (Chettri et al., 2012) var det svært få av de undersøkte genene som viste signifikant endring i uttrykket.

4.3.1 *Y. ruckeri* 16S rRNA

Uttrykket av *Y. ruckeri* 16S rRNA var redusert fra 4 til 24 timer og økte deretter frem til siste prøveuttak 120 timer etter første badsmitte, noe som tyder på en aktiv infeksjon. Et lignende forløp, med ett nedsatt uttrykk før en økning ble også registrert hos 1118 dgr gammel yngel i studien til Chettri et al. (2012). Der ble det spekulert i om fallet kunne skyldes at aktivering av forskjellige medfødte immunfaktorer begrenser proliferasjon og spredning av bakteriene, mens de medfødte immunfaktorene i senere faser mister evnen til å dempe bakteriepresset. Man vet imidlertid at mukus hos voksne fisk inneholder immunkomponenter med antimikrobielle egenskaper (Parra et al., 2015) og både i hud og i gjeller er det registrert MHC klasse II positive celler hos regnbueørret larver (695 dgr) (Heinecke et al., 2014). Det kan dermed være fristende å tenke at reduksjonen 24 t etter smitte skyldes en fungerende ytre barriere, men at dette ikke er tilstrekkelig til å hindre den senere systemiske infeksjonen.

4.3.2 Effekt av badsmitte med *Y. ruckeri* på immun- og stressproteingener

HSP70a, *HSP90a4* og *IgT*

Heat-shock proteinene spiller en viktig rolle i opprettholdelse av homeostasen under stressende situasjoner som kan ha negativ effekt på cellulære strukturer. HSP70 er vist oppregulert i nyre og gjelle etter smitte med de gram-negative bakteriene *Vibrio anguillarum* og *Vibrio alginolyticus* hos henholdsvis regnbueørret og pagell (*Sparus sarba*) (Ackerman og Iwama, 2001; Deane og Woo, 2004). Uttrykket til HSP90 etter smitte med *V. alginolyticus* er vist å være uendret hos pagell (Deane og Woo, 2004). I vårt forsøk var uttrykket til hverken HSP70a eller HSP90a4 signifikant endret de første 72 timene etter badsmitte med *Y. ruckeri*.

Diskusjon

Ved 120 timers uttaket var HSP70a signifikant oppregulert, mens HSP90a4 viste noe oppregulering (1,9x ved 48 t), men ikke signifikant. HSP90a4 viste lavere Ct-verdier enn HSP70a (henholdsvis 24 og 27). På sebrafisk er det blitt implisert at selv små forstyrrelser i HSP90 funksjonen under kritiske utviklingsstadier kan underbygge uttrykket av utviklingsmessige unormaliteter (Yeyati et al., 2007). Det ville vært interessant å sett hvordan det konstitutive forholdet mellom HSP70a og HSP90a4 er etter larvestadiet hos atlantisk laks da det er fristende å si at HSP90a4 har en viktig funksjon under utvikling på larvestadiet hos laks.

Ved 4 og 120 timers uttaket viste HSP70a og IgT positiv korrelasjon med henholdsvis $r = 0.720$ og 0.777 . Fra introduksjonen vet vi at HSPer kan stimulere T-celler intercellulært hos pattedyr. B-cellene hos pattedyr mangler imidlertid de fagocytterende og antimikrobielle egenskapene man finner i fiskens B-celler. Hos pattedyr induserer HSP og ko-induserende forbindelser uttrykket av HSP i vevsceller, inkludert MHC klasse II positive celler (Wieten et al., 2007). Dette kan eventuelt være svært interessant for vaksineutvikling hos atlantisk laks. Det er ikke kjent for forfatter om dette faktisk har blitt gjort på fisk, men HSP70 har vært benyttet i vaksineforskning på mus med lovende resultater (Gong et al., 2009).

IFNa og Mx

IFNb var ikke uttrykt på larvestadiet i dette forsøket, men var uttrykt i de positive prøvene fra både smittet og usmittet HK. Vi kan derfor anta IFNb blir oppregulert på ett senere livsstadier. Ingen av de undersøkte IFNene viste signifikant oppregulering, men IFNa viste flere signifikante korrelasjoner mot andre immungener. Blant annet viste IFNa og Mx en positiv korrelasjon med $r = 0.912$ fire timer etter første smitte. Denne korrelasjon var redusert til $r = 0,562$ ved 120 timers uttaket. Type 1 IFN ene –a og –b har vist å inducere Mx transkript i pattedyr (Nygaard et al., 2000) og i atlantisk laks har CpG-DNA vist å inducere Mx uttrykk (Jorgensen et al., 2003) også *Y. ruckeri* O2 har vist å inducere respons på Mx-1 uttrykket (3 folds) hos regnbueørret (50 g) (Wiens og Vallejo, 2010). Mx var høyt uttrykt sammenlignet med flere andre undersøkte gen i dette forsøket (Ct < 27) til sammenligning viste SAA gjennomsnittlig Ct = 30. Det kan tenkes Mx spiller en vesentlig rolle i det medfødte immunforsvaret hos lakselarver, samtidig indikerer resultatene at lakselarver har en evne til å regulere type I IFN respons ved smitte av *Y. ruckeri* O1.

IFN γ

IFN γ var noe oppregulert 120 timer etter badsmitte, men ingen signifikante forskjeller ble registrert mellom smittet kontroll og usmittet kontroll. Som nevnt tidligere var transkripsjonsnivået svært variert innad i gruppene (Ct 31-40). IFN γ har vist å øke uttrykket av MHC klasse I og II på makrofager ved stimulering med YRF *in vitro* cellelinje (RTS-11) fra regnbueørret (Wangkahart et al., 2016). IFN γ blir produsert av T-celler i respons til MHC presenterende antigen under en adaptiv immunrespons. Under en medfødt respons produseres IFN γ av NK-celler stimulert av IL-12 og/eller IL18 sekret av APCer og mononukleale fagocytter (Robertsen, 2006). Med tanke på det lave transkripsjonsnivået, kan det være et resultat av et prematurt adaptivt immunforsvar på larvestadiet. IFN γ viste ingen signifikante korrelasjoner med noen av de undersøkte genene, inkludert *Y. ruckeri* 16S rRNA.

IL-1b

Det pro -inflammatoriske cytokinet IL-1b er normalt svært godt uttrykt etter smitte med *Y. ruckeri* (Wang et al., 2009). Chettri et al. (2012) viste 22x økning 96 timer etter badsmitte på hhv 770 mg og 4-6 g stor regnbueørret. På regnbueørretlarver var det derimot ingen signifikant endring i genuttrykket av IL-1b, som også er i tråd med vårt forsøk. Fire timer etter den første badsmitten viste imidlertid IL-1b korrelasjon med en rekke gen (IgT, HSP70a, HSP90a4, IFNa og Mx), men ved 120 timers uttaket var antallet redusert til kun IgT og SAA.

SAA

Hos mus og mennesker har SAA vist rekruttering og aktivering av monocytter og neutrofiler til inflammasjonsstedet (Badolato et al., 1994). Evenhuis og Cleveland (2012) viste korrelasjon mellom SAA og *Y. ruckeri* tre dager etter smitte på 40-50 g regnbueørret. SAA positive celler er også registrert på larvestadiet hos regnbueørret larver (695 dgr) (Heinecke et al., 2014). Det var en positiv korrelasjon mellom uttrykket av *Y. ruckeri* 16S rRNA og SAA i vårt forsøk ($r = 606$) fire timer etter første smitte, noe som kan tyde på at SAA har en funksjon ved *Y. ruckeri* infeksjon av lakselarver, selv om vi ikke så en signifikant økning i uttrykket.

iNOS

Gruppe 1 (Kontroll) viste et noe oppregulert uttrykk av iNOS (2 fold, ikke signifikant) 48 timer etter badsmitten. Chettri et al. (2012) så en signifikant økning allerede 24 timer etter badsmitte med *Y. ruckeri* på regnbueørretlarver, men var lavere enn kontroll 72 timer etter smitten. Det er mulig dette skyldes artsforskjellig respons, men mange andre variabler kan også spille inn på uttrykket. I studien til Chettri et al. ble det foreslått at økningen i iNOS kunne ha spilt en rolle i eliminering av bakterier under infeksjonsforløpet. Dette kunne eventuelt ha forklart det lave *Y. ruckeri* 16S rRNA uttrykket vi ser i gruppe 1 på dette tidspunktet. iNOS viste ingen signifikante korrelasjoner mot undersøkte gener i dette forsøket ved 4 timer eller 120 timer etter badsmitten.

IgM(s) og IgT

Flere fiskearter har vist et lavt uttrykk av IgM på larvestadiet, inkludert salmonider. IgM(s) var lavt uttrykt (Ct > 29) fra første prøveuttak ved 4 til 48 timer etter den første prøveuttak ved 4 t til 48 t etter den første badsmitten. Både gruppe 1 (kontroll) og gruppe 5 (usmittet kontroll) viste det høyeste uttrykket etter 120 timer, noe som tyder på responsen ikke var et resultat av smitten. Årsaken kan muligens forklares med en studie av Olsen og Press (1997). I deres forsøk ble det vist at IgM-nivået i plasma reduseres fra befruktning og frem til startfôring. Og fra startfôring økte plasma nivået av IgM raskt. I et annet forsøk ble det ikke registrert IgM-positive celler etter immunfarging med anti-IgM hos regnbueørret larver (695 dgr) (Heinecke et al., 2014). Dette kan indikere at økningen vi kunne se fra 72 og 120 timer, mulig skyldes en naturlig immun- modningsprosess uavhengig av smitten.

Det ble registrert noe lavere Ct-verdi for IgT enn IgM fire timer etter smitten (henholdsvis 29 og 30 i snitt) og etter 120 timer var forholdet reversert med henholdsvis 29.6 og 28.7 og ved IgT positive celler i gjeller er godt uttrykt under larvestadiet, både i smittede og usmitede regnbueørret larver (Chettri et al., 2012) og er foreslått å ha en viktig rolle under larvestadiet før immunsystemet er fullt utviklet.

4.3.3 Effekt av produksjonsindusert stress på immun- og stressrelaterte gener etter badsmitte med *Y. ruckeri*

Uttrykket av iNOS var signifikant høyere i Gruppe 2 (Sjokk og transport) sammenlignet med de andre gruppene 120 timer etter smitten. I forsøket til Chettri et al. ble det nevnt at iNOS muligens har en viktig rolle under infeksjon av *Y.ruckeri*. I vårt forsøk så vi derimot ingen sammenheng mellom genuttrykk og dødelighet mellom gruppene. Faktisk kunne det se ut til at et økt uttrykk (fortsatt snakk om lave uttrykk) kan assosieres med økt dødelighet. Gruppe 3 (sjokk) viste noe (ikke signifikant) høyere uttrykk av HSP70a, HSP90a4, IgT, IFN α og IFN γ mot usmittet kontroll fire timer etter smitte. Vi vet at bakterier kan føre til septikemi hos mennesker med nedsatt immunforsvar (Delano og Ward, 2016). Dødeligheten i gruppe 3 var relativt jevn fra dag 5 til dag 35 etter første smitte i motsetning til de øvrige gruppene som viste en dødelighetstopp rundt dag 13-15. Noe som tyder på at disse gruppene var i stand til å håndtere infeksjonen av *Y.ruckeri*.

IgM var generelt lite uttrykt ved de tre første prøveuttakene. Fra 48 til 120 timer var uttrykket signifikant økt for samtlige grupper. Gruppe 1 (kontroll) viste det høyeste uttrykket, etterfulgt av gruppe 4 (transport), gruppe 3 (sjokk) og gruppe 2 (sjokk og transport). Dette virker litt pussig ettersom det følger hvor mye «stress» larvene ble utsatt for. Det er fristende å spekulere i om dette vil gjelde andre gen også, om responsen var høyere, for eksempel på et senere stadiet. Behandlingene har trolig hatt en direkte effekt på IgM uttrykket, samtlige grupper var signifikant lavere enn kontrollgruppen. At gruppe to viste det laveste uttrykket kan muligens ses i sammenheng med % 5mC (kapitel 4.5). Denne trenden ble ikke registrert på de andre undersøkte genene. Forutsatt at det økte IgM-uttrykket ikke er en konsekvens av smitten, kan grunnen til at vi ikke ser den samme trenden for de øvrige genene, være at behandlingene gir utslag i ulike respons.

4.4 Effekt av produksjonsstress på prosentvis 5-mC

Under embryogenesen blir cellenes vevsspesifikke «skjebne» bestemt gjennom epigenetiske mekanismer som avgjør cellens uttrykk. Disse epigenetiske modifikasjonen er arvelige, men samtidig potensielt reversible med evne til å respondere på eksogene faktorer (Bird, 2007). Det er med andre ord ikke så rart at vi ser forskjeller i % 5mC mellom behandlingene. Det som imidlertid er interessant er gruppe 3 (sjokk) som viser en reduksjon på 57 % fra 4 til 120 timer. Global hypometylering er hos mennesker assosiert med sykdom (kreft) (Ehrlich, 2002) og aldring (Fraga og Esteller, 2007) i form av uønsket celle proliferasjon, og likhetstrekk til embryoniske celler er registrert (Pierce og Johnson, 1971). Det er verdt å bemerke seg at den samme gruppen viste signifikant høyere dødelighet.

Gruppe 2 (Sjokk og Transport) viste høyere andel % 5 mC både ved 4 t og 120 t. En naturlig konsekvens av hypermetylering er nedregulering av genuttrykk. I dette forsøket viste Gruppe 2 det laveste uttrykket i 6 av 11 gen, i tillegg til å være nest lavest uttrykt i to. Det må bemerkes at metyleringsanalysen ble utført globalt i hel yngel, vi har med andre ord ikke anledning til å si om nedreguleringen faktisk skyldes metylering av de aktuelle genene. Det ville derfor vært interessant å undersøkt promoterspesifikk /genspesifikke endringer i DNA metylering.

Embryoene er mer følsom for eksternt stimuli frem til epiboly, under gastrulasjonsstadiet (Jensen og Alderdice, 1983). Det kan derfor tenkes «plastisiteten» følger den samme eller en lignende kurve, i så tilfelle kan den økte % 5-mC vi ser på gruppe 2 og 3 skyldes stadiet behandlingen ble utført, fremfor type behandling.

4.5 Videre forskning

I dette forsøket viste gruppen som kun var utsatt for sjokk signifikant høyere dødelighet etter badsmitte med *Y. ruckeri* enn alle de andre gruppene, og samtidig var *Y. ruckeri* 16S mRNA signifikant høyere i denne gruppen, noe som tyder på økt mottakelighet for *Y.ruckeri*. Det ville vært interessant å undersøkt effekten av sjokk og/eller transport også på senere livsstadier hvor immunresponsen er mer fremtredende. Flere problemer i norsk lakseoppdrett er knyttet til ferskvannsfasen. Resultater i dette forsøker indikere at produksjonsrelatert stress manifesterer seg på lang sikt. Det vil derfor være interessant å studere flere langtidseffekter etter produksjonsindusert stress på lakselarvestadiet, som smoltifisering og tapersyndrom. Det vil

Konklusjoner

også være interessant å se hvordan behandlingene påvirker tilvekst og robusthet i sjøfasen. I perioden 300-400 dgr mangler lakseembryoene en funksjonell kortisolrespons, det ville være svært interessant å studert langtidseffektene på kortisol profilen i et lignende studie.

5 Konklusjoner

I denne studien ble det gjort rede for ulike effekter av mekanisk sjokking og/eller transport under embryogenesen til atlantisk laks på immun- og stressrespons etter badsmitte av plommeseekkyngel med *Y.ruckeri*. Resultatene kan oppsummeres som følger:

- Mekanisk sjokking under embryogenesen førte til signifikant høyere dødelighet etter senere badsmitte av larver med *Y.ruckeri*
- Transport i 48 timer under embryogenesen har ingen effekt på dødelighet etter senere badsmitte av larver med *Y.ruckeri*
- HSP70 var signifikant oppregulert 120 timer etter infeksjon med *Y. ruckeri* og indikerer en rolle i immunforsvaret etter badsmitte med *Y. ruckeri* på lakselarve-stadiet.
- 740 dgr lakselarver uttrykte flere av de immun- og stressrelaterte genene som ble undersøkt i forsøket, men endringene etter badsmitte med *Y.ruckeri* var moderate.
- Sjokking og/eller transport førte til oppregulering av iNOS og nedregulering av HSP70a og IgM(s) etter badsmitte med *Y. ruckeri*.
- Sjokking alene eller i kombinasjon med transport under embryogenesen gav økt global 5-metylcytosin 475 dgr etter badsmitte med *Y. ruckeri*.

Referanser

- Abbas, K. A., Lichtman, H. A. & Pillai, S. (2014). *Basic immunology: Functions and Disorders of the immune system 4th ed.*, Elsevier Saunders.
- Ackerman, P. A. & Iwama, G. K. (2001). Physiological and cellular stress responses of juvenile rainbow trout to vibriosis. *Journal of Aquatic Animal Health*, **13**, 173-180.
- Adamo, S. A. (2014). The Effects of Stress Hormones on Immune Function May be Vital for the Adaptive Reconfiguration of the Immune System During Fight-or-Flight Behavior. *Integrative and Comparative Biology*, **54**, 419-426.
- Agius, C. & Roberts, R. J. (2003). Melano-macrophage centres and their role in fish pathology. *Journal of Fish Diseases*, **26**, 499-509.
- Auperin, B. & Geslin, M. (2008). Plasma cortisol response to stress in juvenile rainbow trout is influenced by their life history during early development and by egg cortisol content. *General and Comparative Endocrinology*, **158**, 234-239.
- Badlato, R., Wang, J. M., Murphy, W. J., Lloyd, A. R., Michiel, D. F., Bausserman, L. L., Kelvin, D. J. & Oppenheim, J. J. (1994). Serum amyloid-a is a chemoattractant – induction of migration, adhesion, and tissue infiltration of monocytes and polymorphonuclear leukocytes. *Journal of Experimental Medicine*, **180**, 203-209.
- Barksby, H. E., Lea, S. R., Preshaw, P. M. & Taylor, J. J. (2007). The expanding family of interleukin-1 cytokines and their role in destructive inflammatory disorders. *Clinical and Experimental Immunology*, **149**, 217-225.
- Barton, B. A. (2002). Stress in fishes: A diversity of responses with particular reference to changes in circulating corticosteroids. *Integrative and Comparative Biology*, **42**, 517-525.
- Bassity, E. & Clark, T. G. (2012). Functional Identification of Dendritic Cells in the Teleost Model, Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Plos One*, **7**, 14.
- Bayne, C. J. & Gerwick, L. (2001). The acute phase response and innate immunity of fish. *Developmental and Comparative Immunology*, **25**, 725-743.
- Bird, A. (2002). DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes & Development*, **16**, 6-21.
- Bird, A. (2007). Perceptions of epigenetics. *Nature*, **447**, 396-398.
- Boehm, T., Mccurley, N., Sutoh, Y., Schopp, M., Kasahara, M. & Cooper, M. D. (2012). VLR-Based Adaptive Immunity. In: Paul, W. E. (ed.) *Annual Review of Immunology*, Vol 30. Palo Alto: Annual Reviews.
- Bogdan, C., Mattner, J. & Schleicher, U. (2004). The role of type I interferons in non-viral infections. *Immunological Reviews*, **202**, 33-48.
- Bonga, S. E. W. (1997). The stress response in fish. *Physiological Reviews*, **77**, 591-625.
- Boraschi, D. & Tagliabue, A. (2013). The interleukin-1 receptor family. *Seminars in Immunology*, **25**, 394-407.
- Brook, I., Hunter, V. & Walker, R. I. (1984). Synergistic effect of bacteroides, *Clostridium*, *Fusobacterium*, anaerobic cocci, and aerobic bacteria on mortality and induction of subcutaneous abscesses in mice. *J Infect Dis*, **149**, 924-8.
- Chettri, J. K., Raida, M. K., Kania, P. W. & Buchmann, K. (2012). Differential immune response of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) at early developmental stages (larvae and fry) against the bacterial pathogen *Yersinia ruckeri*. *Developmental and Comparative Immunology*, **36**, 463-474.

- Chrousos, G. P. & Gold, P. W. (1992). The concepts of stress and system disorders – overview of physical and behavioural homeostasis. *Jama-Journal of the American Medical Association*, **267**, 1244-1252.
- Ciocca, D. R. & Calderwood, S. K. (2005). Heat shock proteins in cancer: diagnostic, prognostic, predictive, and treatment implications. *Cell Stress & Chaperones*, **10**, 86-103.
- Deane, E. E. & Woo, N. Y. S. (2004). Differential gene expression associated with euryhalinity in sea bream (*Sparus sarba*). *American Journal of Physiology-Regulatory Integrative and Comparative Physiology*, **287**, R1054-R1063.
- Deane, E. E. & Woo, N. Y. S. (2011). Advances and perspectives on the regulation and expression of piscine heat shock proteins. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, **21**, 153-185.
- Delano, M. J. & Ward, P. A. (2016). Sepsis-induced immune dysfunction: can immune therapies reduce mortality? *Journal of Clinical Investigation*, **126**, 23-31.
- Dhabhar, F. S. (2000). Acute stress enhances while chronic stress suppresses skin immunity - The role of stress hormones and leukocyte trafficking. In: Conti, A., Maestroni, G. J. M., Mccann, S. M., Sternberg, E. M., Lipton, J. M. & Smith, C. C. (eds.) *Neuroimmunomodulation: Perspectives at the New Millennium*. New York: New York Acad Sciences.
- Dhabhar, F. S. (2002). Stress-induced augmentation of immune function - The role of stress hormones, leukocyte trafficking, and cytokines. *Brain Behavior and Immunity*, **16**, 785-798.
- Ehrlich, M. (2002). DNA methylation in cancer: too much, but also too little. *Oncogene*, **21**, 5400-13.
- EUROGENTEC,. (2004). Your one-shop real-time supplier, *q&qPCR booklet-0304-VI*.
- Evenhuis, J. P. & Cleveland, B. M. (2012). Modulation of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) intestinal immune gene expression following bacterial challenge. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, **146**, 8-17.
- Fast, M. D., Hosoya, S., Johnson, S. C. & Afonso, L. O. B. (2008). Cortisol response and immune-related effects of Atlantic salmon (*Salmo salar* Linnaeus) subjected to short- and long-term stress. *Fish & Shellfish Immunology*, **24**, 194-204.
- Flinn, M. V., Nepomnaschy, P. A., Muehlenbein, M. P. & Ponzi, D. (2011). Evolutionary functions of early social modulation of hypothalamic-pituitary-adrenal axis development in humans. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, **35**, 1611-1629.
- Forstermann, U., Boissel, J. P. & Kleinert, H. (1998). Expressional control of the 'constitutive' isoforms of nitric oxide synthase (NOS I and NOS III). *Faseb Journal*, **12**, 773-790.
- Fraga, M. F. & Esteller, M. (2007). Epigenetics and aging: the targets and the marks. *Trends Genet*, **23**, 413-8.
- Fujioka, A., Fujioka, T., Ishida, Y., Maekawa, T. & Nakamura, S. (2006). Differential effects of prenatal stress on the morphological maturation of hippocampal neurons. *Neuroscience*, **141**, 907-915.
- Gadan, K., Marjara, I. S., Sundh, H., Sundell, K. & Evensen, O. (2012). Slow release cortisol implants result in impaired innate immune responses and higher infection prevalence following experimental challenge with infectious pancreatic necrosis virus in Atlantic salmon (*Salmo salar*) parr. *Fish & Shellfish Immunology*, **32**, 637-644.
- Gething, M. J. & Sambrook, J. (1992). Protein folding in the cell. *Nature*, **355**, 33-45.

- Gong, J., Zhu, B., Murshid, A., Adachi, H., Song, B., Lee, A., Liu, C. & Calderwood, S. K. (2009). T cell activation by HSP70 vaccine requires TLR signaling and scavenger receptor SREC-1. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, **183**, 3092-3098.
- GraphPad. (2016). *Interpreting results: Correlation*. Lastet ned den 17.05.2016 fra http://www.graphpad.com/guides/prism/7/statistics/index.htm?stat_interpreting_results_correlati.htm
- Groot, C. (1996). Salmonid life histories. *Developments in aquaculture and Fisheries Science*, **29**, 97-230.
- Hansen, J. D., Landis, E. D. & Phillips, R. B. (2005). Discovery of a unique Ig heavy-chain isotype (IgT) in rainbow trout: Implications for a distinctive B cell developmental pathway in teleost fish. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **102**, 6919-6924.
- Heinecke, R. D., Chettri, J. K. & Buchmann, K. (2014). Adaptive and innate immune molecules in developing rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* eggs and larvae: Expression of genes and occurrence of effector molecules. *Fish & Shellfish Immunology*, **38**, 25-33.
- Hjeltnes, B., Walde, C. S., Jensen, B. B. & Haukaas, A. (2016). Fiskehelse rapporten 2015. *Veterinærinstituttet rapportserie nr 3/2016*.
- Hunter, V. A., Knittel, M. D. & Fryer, J. L. (1980). Stress-induced transmission of *yersinia-ruckeri* infection from carriers to recipient steelhead trout *salmo-gairdneri* Richardson. *Journal of Fish Diseases*, **3**, 467-472.
- Husain, M., Bird, S., Van Zwieten, R., Secombes, C. J. & Wang, T. H. (2012). Cloning of the IL-1 beta 3 gene and IL-1 beta 4 pseudogene in salmonids uncovers a second type of IL-1 beta gene in teleost fish. *Developmental and Comparative Immunology*, **38**, 431-446.
- ICSASG_V2 2015. International Cooperation to Sequence the Atlantic Salmon Genome.
- Jacquiarsarin, M. R., Fuller, K., Dinhxuan, A. T., Richard, M. J. & Polla, B. S. (1994). Protective effects of hsp70 in inflammation. *Experientia*, **50**, 1031-1038.
- Jensen, J. O. T. & Alderdice, D. F. (1983). Changes in mechanical-shock sensitivity of coho salmon (*oncorhynchus-kisutch*) eggs during incubation. *Aquaculture*, **32**, 303-312.
- Jensen, L. E., Hiney, M. P., Shields, D. C., Uhlar, C. M., Lindsay, A. J. & Whitehead, A. S. (1997). Acute phase proteins in salmonids: evolutionary analyses and acute phase response. *The Journal of Immunology*, **158**, 384-92.
- Jensen, N. R. & Collins, K. C. (2003). Time required for yolk coagulation in pink salmon and steelhead eggs exposed to mechanical shock. *North American Journal of Aquaculture*, **65**, 339-343.
- Jirtle, R. L. & Skinner, M. K. (2007). Environmental epigenomics and disease susceptibility. *Nature Reviews Genetics*, **8**, 253-262.
- Jorgensen, J. B., Johansen, L. H., Steiro, K. & Johansen, A. (2003). CpG DNA induces protective antiviral immune responses in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Journal of Virology*, **77**, 11471-11479.
- Jorgensen, J. B., Lunde, H., Jensen, L., Whitehead, A. S. & Robertsen, B. (2000). Serum amyloid A transcription in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) hepatocytes is enhanced by stimulation with macrophage factors, recombinant human IL-1 beta, IL-6 and TNF alpha or bacterial lipopolysaccharide. *Developmental and Comparative Immunology*, **24**, 553-563.
- Juang, Y. T., Lowther, W., Kellum, M., Au, W. C., Lin, R., Hiscott, J. & Pitha, P. M. (1998). Primary activation of interferon A and interferon B gene transcription by interferon

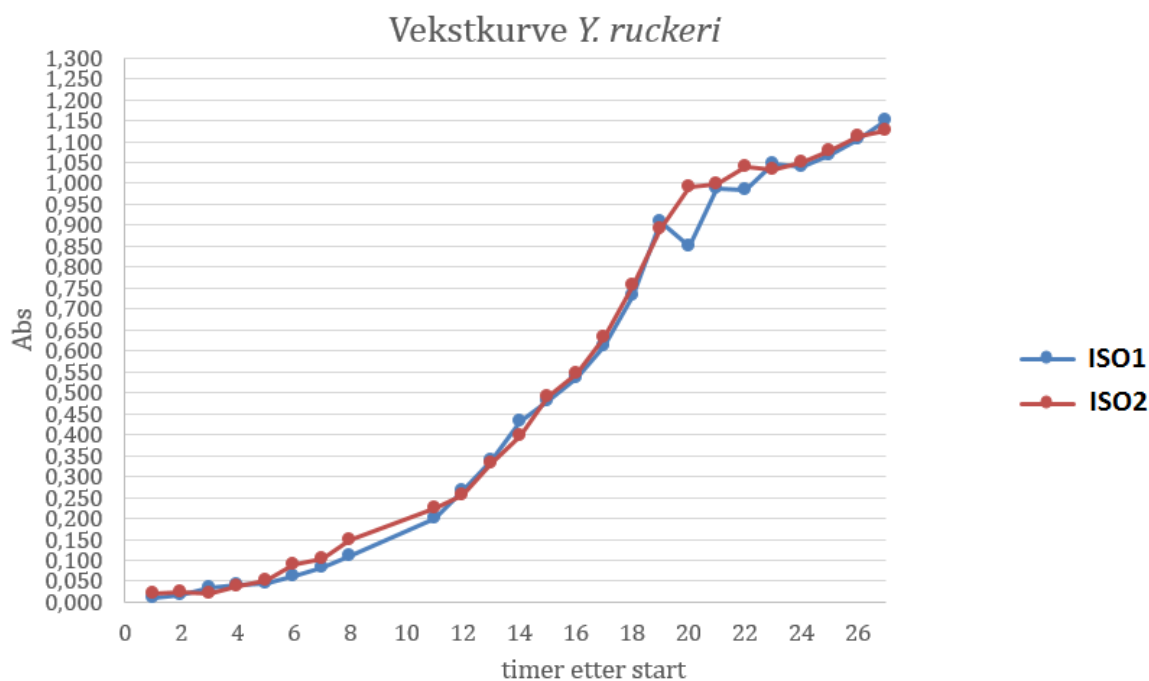
- regulatory factor 3. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **95**, 9837-9842.
- Kawai, T. & Akira, S. (2010). The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nature Immunology*, **11**, 373-384.
- Kim, B. J., Hancock, B. M., Del Cid, N., Bermudez, A., Traver, D. & Doran, K. S. (2015). *Streptococcus agalactiae* infection in zebrafish larvae. *Microbial Pathogenesis*, **79**, 57-60.
- Koppang, E. O., Fischer, U., Moore, L., Tranulis, M. A., Dijkstra, J. M., Kollner, B., Aune, L., Jirillo, E. & Hordvik, I. (2010). Salmonid T cells assemble in the thymus, spleen and in novel interbranchial lymphoid tissue. *Journal of Anatomy*, **217**, 728-739.
- Kumar, G., Menanteau-Leanteau-Ledouble, S., Saleh, M. & El-Matbouli, M. (2015). *Yersinia ruckeri*, the causative agent of enteric redmouth disease in fish. *Veterinary Research*, **46**, 10.
- Kumari, J., Bogwald, J. & Dalmo, R. A. (2013). Eomesodermin of Atlantic Salmon: An Important Regulator of Cytolytic Gene and Interferon Gamma Expression in Spleen Lymphocytes. *Plos One*, **8**, 13.
- Kvamme, B. O., Gadan, K., Finne-Fridell, F., Niklasson, L., Sundh, H., Sundell, K., Taranger, G. L. & Evensen, O. (2013). Modulation of innate immune responses in Atlantic salmon by chronic hypoxia-induced stress. *Fish & Shellfish Immunology*, **34**, 55-65.
- Ladd, C. O., Huot, R. L., Thiruvikraman, K. V., Nemeroff, C. B. & Plotsky, P. M. (2004). Long-term adaptations in glucocorticoid receptor and mineralocorticoid receptor mRNA and negative feedback on the hypothalamo-pituitary-adrenal axis following neonatal maternal separation. *Biological Psychiatry*, **55**, 367-375.
- Leifeld, L., Fielenbach, M., Dumoulin, F. L., Speidel, N., Sauerbruch, T. & Spengler, U. (2002). Inducible nitric oxide synthase (iNOS) and endothelial nitric oxide synthase (eNOS) expression in fulminant hepatic failure. *J Hepatol*, **37**, 613-9.
- Levy, D. E., Marie, I., Smith, E. & Prakash, A. (2002). Enhancement and diversification of IFN induction by IRF-7-mediated positive feedback. *Journal of Interferon and Cytokine Research*, **22**, 87-93.
- Li, M. & Leatherland, J. F. (2012). The interaction between maternal stress and the ontogeny of the innate immune system during teleost embryogenesis: implications for aquaculture practice. *Journal of Fish Biology*, **81**, 1793-1814.
- Lillehaug, A., Sevatdal, S. & Endal, T. (1996). Passive transfer of specific maternal immunity does not protect Atlantic salmon (*Salmo salar* L) fry against yersiniosis. *Fish & Shellfish Immunology*, **6**, 521-535.
- Magnadottir, B. (2006). Innate immunity of fish (overview). *Fish & Shellfish Immunology*, **20**, 137-151.
- McEwen, B. S. (1998). Protective and damaging effects of stress mediators. *New England Journal of Medicine*, **338**, 171-179.
- Monroe, K. M., McWhirter, S. M. & Vance, R. E. (2010). Induction of type I interferons by bacteria. *Cellular Microbiology*, **12**, 881-890.
- Munang'andu, H. M., Fredriksen, B. N., Mutoloki, S., Dalmo, R. A. & Evensen, O. (2013). Antigen dose and humoral immune response correspond with protection for inactivated infectious pancreatic necrosis virus vaccines in Atlantic salmon (*Salmo salar* L). *Veterinary Research*, **44**, 16.
- Mutoloki, S., Cooper, G. A., Marjara, I. S., Koop, B. F. & Evensen, O. (2010). High gene expression of inflammatory markers and IL-17A correlates with severity of injection

- site reactions of Atlantic salmon vaccinated with oil-adjuvanted vaccines. *Bmc Genomics*, **11**, 15.
- Nygaard, R., Husgard, S., Sommer, A. I., Leong, J. A. C. & Robertsen, B. (2000). Induction of Mx protein by interferon and double-stranded RNA in salmonid cells. *Fish & Shellfish Immunology*, **10**, 435-450.
- Ohtani, M., Villumsen, K. R., Strom, H. K. & Raida, M. K. (2014). 3D Visualization of the Initial *Yersinia ruckeri* Infection Route in Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) by Optical Projection Tomography. *Plos One*, **9**, 10.
- Olsen, Y. A. & Press, C. M. (1997). Degradation kinetics of immunoglobulin in the egg, alevin and fry of Atlantic salmon, *Salmo salar* L, and the localisation of immunoglobulin in the egg. *Fish & Shellfish Immunology*, **7**, 81-91.
- Parra, D., Reyes-Lopez, F. E. & Tort, L. (2015). Mucosal immunity and B cells in teleosts: effect of vaccination and stress. *Frontiers in Immunology*, **6**, 12.
- Pennachi, Y., Leef, M. J., Crosbie, P. B. B., Nowak, B. F. & Bridle, A. R. (2014). Evidence of immune and inflammatory processes in the gills of AGD-affected Atlantic salmon, *Salmo salar* L. *Fish & Shellfish Immunology*, **36**, 563-570.
- Pereiro, P., Costa, M. M., Diaz-Rosales, P., Dios, S., Figueras, A. & Novoa, B. (2014). The first characterization of two type I interferons in turbot (*Scophthalmus maximus*) reveals their differential role, expression pattern and gene induction. *Developmental and Comparative Immunology*, **45**, 233-244.
- Pfaffl, M. W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research*, **29**, 6.
- Pickering, A. D. & Pottinger, T. G. (1985). Cortisol can increase the susceptibility of brown trout, *Salmo Trutta*-L, to disease without reducing the white blood-cell count. *Journal of Fish Biology*, **27**, 611-619.
- Pierce, G. B. & Johnson, L. D. (1971). Differentiation and cancer. *In Vitro*, **7**, 140-5.
- Raida, M. K. & Buchmann, K. 2008. Development of adaptive immunity in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum) surviving an infection with *Yersinia ruckeri*. *Fish & Shellfish Immunology*, **25**, 533-541.
- Raida, M. K., Holten-Andersen, L. & Buchmann, K. (2011). Association between *Yersinia ruckeri* infection, cytokine expression and survival in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Fish & Shellfish Immunology*, **30**, 1257-1264.
- Randolph, G. J., Angelli, V. & Swartz, M. A. (2005). Dendritic-cell trafficking to lymph nodes through lymphatic vessels. *Nature Reviews Immunology*, **5**, 617-628.
- Reid, S. G., Bernier, N. J. & Perry, S. F. (1998). The adrenergic stress response in fish: control of catecholamine storage and release. *Comparative Biochemistry and Physiology C-Toxicology & Pharmacology*, **120**, 1-27.
- Roberts, R. J., Agius, C., Saliba, C., Bossier, P. & Sung, Y. Y. (2010). Heat shock proteins (chaperones) in fish and shellfish and their potential role in relation to fish health: a review. *Journal of Fish Diseases*, **33**, 789-801.
- Robertsen, B. (2006). The interferon system of teleost fish. *Fish & Shellfish Immunology*, **20**, 172-191.
- Ross, D. A., Wilson, M. R., Miller, N. W., Clem, L. W. & Warr, G. W. (1998). Evolutionary variation of immunoglobulin mu heavy chain RNA processing pathways: origins, effects, and implications. *Immunological Reviews*, **166**, 143-151.
- Saeij, J. P., Stet, R. J., Ggroeneveld, A., Verburg-Van Kemenade, L. B., Van Muiswinkel, W. B. & Wiegertjes, G. F. (2000). Molecular and functional characterization of a fish inducible-type nitric oxide synthase. *Immunogenetics*, **51**, 339-46.

- Salinas, I., Zhang, Y. A. & Sunyer, J. O. (2011). Mucosal immunoglobulins and B cells of teleost fish. *Developmental and Comparative Immunology*, **35**, 1346-1365.
- Sandilands, J., Drynan, K. & Roberts, R. J. (2010). Preliminary studies on the enhancement of storage time of chilled milt of Atlantic salmon, *Salmo salar* L., using an extender containing the Tex-OE (R) heat shock-stimulating factor. *Aquaculture Research*, **41**, 568-571.
- Schneider, W. M., Chevillotte, M. D. & Rice, C. M. (2014). Interferon-Stimulated Genes: A Complex Web of Host Defenses. *Annual review of immunology*, **32**, 513-545.
- Secombes, C. J., Wang, T. & Bird, S. (2011). The interleukins of fish. *Developmental and Comparative Immunology*, **35**, 1336-1345.
- Siegmund, S. V., Schlosser, M., Schildberg, F. A., Seki, E., De Minicis, S., Uchinami, H., Kuntzen, C., Knolle, P. A., Strassburg, C. P. & Schwabe, R. F. (2016). Serum Amyloid A Induces Inflammation, Proliferation and Cell Death in Activated Hepatic Stellate Cells. *Plos One*, **11**, 17.
- Song, L., Li, C., Xie, Y. J., Liu, S. K., Zhang, J. R., Yao, J., Jiang, C., Li, Y. & Liu, Z. J. (2016). Genome-wide identification of Hsp70 genes in channel catfish and their regulated expression after bacterial infection. *Fish & Shellfish Immunology*, **49**, 154-162.
- Sun, B. J., Skjæveland, I., Svingerud, T., Zou, J., Jorgensen, J. & Robertsen, B. (2011). Antiviral Activity of Salmonid Gamma Interferon against Infectious Pancreatic Necrosis Virus and Salmonid Alphavirus and Its Dependency on Type I Interferon. *Journal of Virology*, **85**, 9188-9198.
- Sundt-Hansen, L., Sundstrom, F., Einum, S., Hindar, K., Fleming, I. A. & Devlin, R. H. (2007). Genetically enhanced growth causes increased mortality in hypoxic environments. *Biology Letters*, **3**, 165-168.
- Singerud, T., Solstad, T., Sun, B. J., Nyrud, M. L. J., Kileng, O., Greiner-Tollersrud, L. & Robertsen, B. (2012). Atlantic Salmon Type I IFN Subtypes Show Differences in Antiviral Activity and Cell-Dependent Expression: Evidence for High IFN β /IFN γ -Producing Cells in Fish Lymphoid Tissues. *Journal of Immunology*, **189**, 5912-5923.
- Tort, L. (2011). Stress and immune modulation in fish. *Developmental and Comparative Immunology*, **35**, 1366-1375.
- Uribe, C., Folch, H., Enriquez, R. & Moran, G. (2011). Innate and adaptive immunity in teleost fish: a review. *Veterinari Medicina*, **56**, 486-503.
- Vandesompele, J., De Preter, K., Pattyn, F., Poppe, B., Van Roy, N., De Paepe, A. & Speleman, F. (2002). Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biology*, **3**, 12.
- Velsen, F. P. J. (1980). Embryonic development in eggs of sockeye salmon, *Oncorhynchus nerka*. *Canadian special publication of fisheries and aquatic sciences*, **49**, 19.
- Vercauteren, G., Tobbach, E., Hermans, K., Decostere, A., Vandenbrouck, W. & Chiers, K. (2010). Interactions of virulent and avirulent *Yersinia ruckeri* strains with isolated gill arches and intestinal explants of rainbow trout (*Onchorhynchus mykiss*, Walbaum). *Journal of Comparative Pathology*, **143**, 327-327.
- Vijayan, M. M., Pereira, C., Forsyth, R. B., Kennedy, C. J. & Iwama, G. K. (1997). Handling stress does not affect the expression of hepatic heat shock protein 70 and conjugation enzymes in rainbow trout treated with beta-naphthoflavone. *Life Sciences*, **61**, 117-127.
- Villaroel, F., Casado, A., Vasquez, J., Matamala, E., Araneda, B., Amthauer, R., Enriquez, R. & Concha, M. I. (2008). Serum amyloid A: A typical acute-phase reactant in rainbow trout? *Developmental and Comparative Immunology*, **32**, 1160-1169.

- Wang, T. H., Bird, S., Koussounadis, A., Holland, J. W., Carrington, A., Zou, J. & Secombes, C. J. (2009). Identification of a Novel IL-1 Cytokine Family Member in Teleost Fish. *Journal of Immunology*, **183**, 962-974.
- Wang, T. H. & Secombes, C. J. (2013). The cytokine networks of adaptive immunity in fish. *Fish & Shellfish Immunology*, **35**, 1703-1718.
- Wangkahart, E., Scott, C., Secombes, C. J. & Wang, T. H. (2016). Re-examination of the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) immune response to flagellin: *Yersinia ruckeri* flagellin is a potent activator of acute phase proteins, anti-microbial peptides and pro-inflammatory cytokines in vitro. *Developmental and Comparative Immunology*, **57**, 75-87.
- Wei, H., Yin, L. C., Feng, S. Y., Wang, X. Y., Yang, K., Zhang, A. Y. & Zhou, H. (2015). Dual-parallel inhibition of IL-10 and TGF-beta 1 controls LPS-induced inflammatory response via NF-kappa B signaling in grass carp monocytes/macrophages. *Fish & Shellfish Immunology*, **44**, 445-452.
- Wei, Y. Q., Zhao, X., Kariya, Y., Teshigawara, K. & Uchida, A. (1995). Inhibition of proliferation and induction of apoptosis by abrogation of heat-shock protein (HSP)-70 expression in tumor-cells. *Cancer Immunology Immunotherapy*, **40**, 73-78.
- Welch, W. J. (1993). How cells respond to stress. *Scientific American*, **268**, 56-64.
- Wiens, G. D. & Vallejo, R. L. (2010). Temporal and pathogen-load dependent changes in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) immune response traits following challenge with biotype 2 *Yersinia ruckeri*. *Fish & Shellfish Immunology*, **29**, 639-647.
- Wieten, L., Broere, F., Van Der Zee, R., Koerkamp, E. K., Wagenaar, J. & Van Eden, W. (2007). Cell stress induced HSP are targets of regulatory T cells: A role for HSP inducing compounds as anti-inflammatory immuno-modulators? *FEBS Letters*, **581**, 3716-3722.
- Workenhe, S. T., Hori, T. S., Rise, M. L., Kibenge, M. J. T. & Kibenge, F. S. B. (2009). Infectious salmon anaemia virus (ISAV) isolates induce distinct gene expression responses in the Atlantic salmon (*Salmo salar*) macrophage/dendritic-like cell line TO, assessed using genomic techniques. *Molecular Immunology*, **46**, 2955-2974.
- Wu, C. C., Croxtall, J. D., Perretti, M., Bryant, C. E., Thiemermann, C., Flower, R. J. & Vane, J. R. (1995). Lipocortin 1 mediates the inhibition by dexamethasone of the induction by endotoxin of nitric oxide synthase in the rat. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **92**, 3473-3477.
- Yeyati, P. L., Bancewicz, R. M., Maule, J. & Van Heyningen, V. (2007). Hsp90 selectively modulates phenotype in vertebrate development. *Plos Genetics*, **3**, 431-447.

Appendix I



Vekstkurve av *Y. ruckeri* til fastsettelse av dyrkningstid ved 540 nm. Absorpsjon mot tid (t).

Appendix II

Gjennomsnittlig talletall fra duplikat utplating av *Y. ruckeri* i ti-folds fortyningsserie og colony forming units (CFU) per ml bakteriekultur til smittetest (741 dgr) og re-smitten (921 dgr).

Fortynning	ISO1	ISO2
10^{-5}	Teppe	Teppe
10^{-6}	Teppe	Teppe
10^{-7}	292	Teppe
10^{-8}	32	182,5
CFU/ml	$3,2 \times 10^{10}$	$1,8 \times 10^{11}$

Appendix III

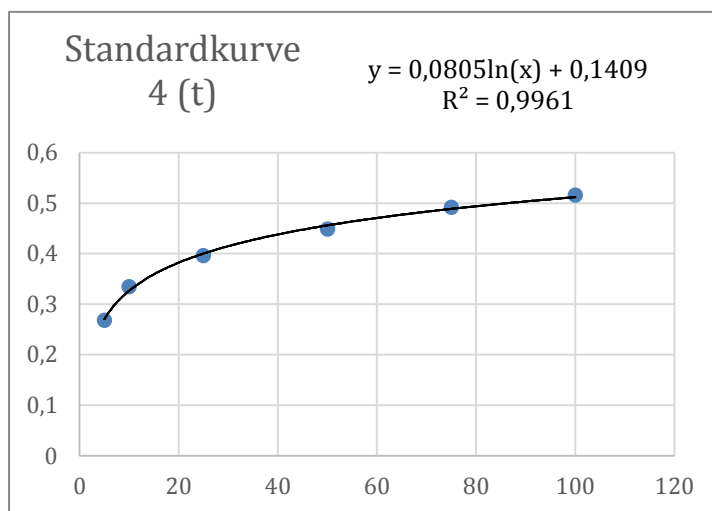
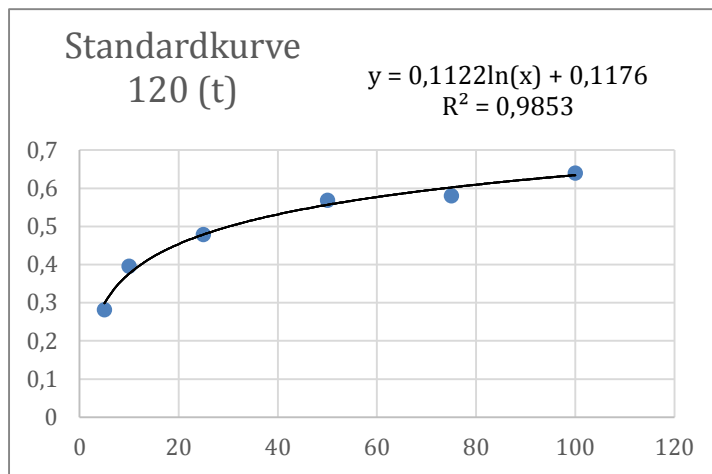
Reagenser	Volum (µl) per prøve
Lysis/Binding Solution Concentrate	65-55 *
Wash Solution 1	150
Wash Solution 2	150 x 3
Bead mix	20
Elution Buffer	50
MagMAX™ TURBO™ DNase Buffer	0,1 volum
TURBO DNase™	1

Instruks, MagMax™ -96 Standard Magnetic Particle Processor, for MagMax-96 Total RNA Isolation kit. Prosessen tar ca 25 min.

-
1. Total RNA binder seg til RNA Binding Beads i plate A, som inneholder prøve, Lysis/Binding Solution og Bead Mix.
 2. RNA Binding Beads blir samlet og frigitt fra magnetene i Vaskeløsning 1, plate B.
 3. RNA Binding Beads blir samlet og frigitt i Vaskeløsning 2, plate C
 4. RNA Binding Beads blir samlet og frigitt i Vaskeløsning 2, Plate D
 5. RNA Binding Beads blir samlet og frigitt i Vaskeløsning 2, Plate E
 6. RNA Binding Beads blir samlet og tørket utenfor Plate E
 7. RNA Binding Beads blir samlet og frigitt i eluerings buffer, Plate F.
 8. RNA Bindings Beads blir samlet og returnert til Plate B, RNA blir værende igjen i elueringsbuffer, Plate F.

Appendix IV

Standardkurver % 5-mC ELISA



Standardkurvene er etablert med negativ (0 % metylering) og positiv (100 % metylering) kontroll parallelt med prøvene fra 4 t og 120 t etter smitte.

Appendix V

Appendix V

Oversikt over individ fordeling mellom kar og antall døde. * indikere antall individer etter prøveuttak, ** inkluderer døde individ under prøveuttaketetsperiode. Ett individ døde i mock- og kontrollkaret (*Gr. 1*) under akklimatiseringen, trukket fra i tabellen. To individ i sjokk- og transportkaret døde *i prøveuttaksperioden*, med i tabellen.

Behandling	Antall*	døde**
Usmittet kontroll	101	3
Gr. Kontroll	98	15
Gr. Sjokking og Transport	103	13
Gr. Sjokking	99	34
Transport	100	8

Appendix V

Appendix VI

Relativt uttrykk av immun og heat-shock protein gen hos 741 dgr gamle larver etter smitte med *Yersinia ruckeri* i 45 min. Dataene er her fremstilt som effekt av smitte på de ulike gruppene; us-kontroll = usmittet kontroll, gr 1 = Ubehandlet Kontroll, gr2 = Sjokk og Transport, gr 3 = Sjokk og gr 4 = Transport. Hvert tidspunkt er kalibrert til usmittet kontroll. n = 8-10 ± standardfeil.

	4 t		48 t		120 t			4 t		48 t		120 t	
<i>hsp70 us-Kontroll</i>	1.0	±0,06	1.0	±0,12	1.0	±0,08	<i>IgT us-Kontroll</i>	1.0	±0,19	1.0	±0,24	1.0	±0,12
<i>hsp70a (gr. 1)</i>	1,1	±0,37	1,7	±0,21	1,8	±0,18	<i>IgT (gr. 1)</i>	1,4	±0,31	1,2	±0,21	1,8	±0,22
<i>hsp70a (gr. 2)</i>	0,9	±0,32	1,3	±0,22	1,1	±0,12	<i>IgT (gr. 2)</i>	0,7	±0,23	1,4	±0,38	1,2	±0,14
<i>hsp70a (gr. 3)</i>	1,3	±0,42	1,5	±0,14	1,3	±0,14	<i>IgT (gr. 3)</i>	1,6	±0,36	2,6	±0,42	1,2	±0,19
<i>hsp70a (gr. 4)</i>	0,9	±0,32	1,0	±0,23	1,1	±0,13	<i>IgT (gr. 4)</i>	1,4	±0,27	3,5	±0,82	1,0	±0,10
<i>hsp90a4 us-Kontroll</i>	1.0	±0,08	1.0	±0,10	1.0	±0,26	<i>IgM us-Kontroll</i>	1.0	±0,09	1.0	±0,20	1.0	±0,23
<i>hsp90a4 (gr. 1)</i>	1,2	±0,20	1,9	±0,24	1,0	±0,08	<i>IgM (gr. 1)</i>	1,0	±0,26	1,8	±0,22	1,2	±0,14
<i>hsp90a4 (gr. 2)</i>	1,5	±0,24	1,2	±0,22	1,4	±0,14	<i>IgM (gr. 2)</i>	1,1	±0,34	1,3	±0,22	0,3	±0,09
<i>hsp90a4 (gr. 3)</i>	1,6	±0,21	1,4	±0,10	1,6	±0,17	<i>IgM (gr. 3)</i>	1,2	±0,19	1,7	±0,27	0,4	±0,10
<i>hsp90a4 (gr. 4)</i>	1,2	±0,15	1,2	±0,28	1,2	±0,19	<i>IgM (gr. 4)</i>	1,2	±0,22	1,1	±0,14	0,6	±0,12
<i>SAA us-Kontroll</i>	1.0	±0,07	1.0	±0,18	1.0	±0,10	<i>Mx us-Kontroll</i>	1,0	±0,12	1,0	±0,26	1,0	±0,07
<i>SAA (gr. 1)</i>	0,9	±0,13	1,5	±0,21	1,3	±0,20	<i>Mx (gr. 1)</i>	1,2	±0,22	2,0	±0,20	1,5	±0,19
<i>SAA (gr. 2)</i>	1,1	±0,21	0,9	±0,09	1,2	±0,18	<i>Mx (gr. 2)</i>	0,8	±0,13	1,4	±0,19	1,5	±0,20
<i>SAA (gr. 3)</i>	0,9	±0,08	0,8	±0,11	0,9	±0,13	<i>Mx (gr. 3)</i>	1,0	±0,14	1,3	±0,14	1,5	±0,09
<i>SAA (gr. 4)</i>	0,8	±0,05	0,7	±0,09	1,0	±0,10	<i>Mx (gr. 4)</i>	1,0	±0,17	1,1	±0,17	1,3	±0,17
<i>YR us-Kontroll</i>	1.0	±7,58	1.0	±2,25	1.0	±0,73	<i>IFNg us-Kontroll</i>	1,0	±0,34	1,0	±0,86	1,0	±0,81
<i>YR (gr. 1)</i>	231,6	±89,15	31,7	±30,58	294,0	±50,19	<i>IFNg (gr. 1)</i>	0,7	±0,29	4,1	±1,23	1,3	±0,48
<i>YR (gr. 2)</i>	76,4	±9,09	439,6	±274,38	493,4	±429,35	<i>IFNg (gr. 2)</i>	0,8	±0,28	2,9	±0,67	2,8	±0,90
<i>YR (gr. 3)</i>	3221,4	±2090,70	878,6	±857,68	148,3	±111,58	<i>IFNg (gr. 3)</i>	1,3	±0,40	2,5	±0,93	1,4	±0,57
<i>YR (gr. 4)</i>	132,3	±30,45	51,6	±24,57	252,3	±200,61	<i>IFNg (gr. 4)</i>	1,5	±0,46	1,2	±0,52	1,3	±0,41
<i>iNOS us-Kontroll</i>	1.0	±0,16	1.0	±0,25	1.0	±0,25	<i>IFNc us-Kontroll</i>	1,0	±0,19	1,0	±0,17	1,0	±0,32
<i>iNOS (gr. 1)</i>	1,3	±0,34	2,0	±0,44	1,3	±0,33	<i>IFNc (gr. 1)</i>	1,3	±0,16	1,1	±0,16	2,4	±0,35
<i>iNOS (gr. 2)</i>	0,7	±0,30	0,8	±0,18	4,0	±0,51	<i>IFNc (gr. 2)</i>	1,4	±0,29	1,8	±0,28	2,9	±0,41
<i>iNOS (gr. 3)</i>	0,6	±0,18	0,8	±0,19	1,7	±0,53	<i>IFNc (gr. 3)</i>	2,0	±0,32	1,1	±0,19	2,7	±0,46
<i>iNOS (gr. 4)</i>	0,9	±0,10	0,3	±0,15	2,2	±0,48	<i>IFNc (gr. 4)</i>	1,0	±0,16	0,8	±0,16	2,2	±0,34
<i>Il-1b us-Kontroll</i>	1.0	±0,12	1.0	±0,18	1.0	±0,10	<i>IFNa us-Kontroll</i>	1,0	±0,10	1,0	±0,20	1,0	±0,12
<i>Il-1b (gr. 1)</i>	1,0	±0,15	1,7	±0,27	1,0	±0,12	<i>IFNa (gr. 1)</i>	1,1	±0,16	1,5	±0,22	1,8	±0,25
<i>Il-1b (gr. 2)</i>	0,6	±0,10	1,8	±0,18	0,9	±0,09	<i>IFNa (gr. 2)</i>	1,0	±0,20	1,2	±0,15	1,3	±0,17
<i>Il-1b (gr. 3)</i>	0,9	±0,10	1,2	±0,09	0,9	±0,13	<i>IFNa (gr. 3)</i>	1,4	±0,20	1,1	±0,22	1,3	±0,21
<i>Il-1b (gr. 4)</i>	0,7	±0,10	1,4	±0,40	1,0	±0,09	<i>IFNa (gr. 4)</i>	1,1	±0,18	1,0	±0,14	1,0	±0,11

Appendix VII

Appendix VII

Relativt uttrykk av immun og heat-shock protein gener hos 741 dgr gamle larver etter smitte med *Yersinia ruckeri* (3.2×10^8 CFU/ml) i 45 min. Dataene er her fremstilt som forskjeller mellom behandlingene; gr 1 = Ubehandlet Kontroll, gr2 = Sjokk og Transport, gr 3 = Sjokk og gr 4 = Transport. Hvert tidspunkt er kalibrert til ubehandlet kontroll (gr. 1). n = 8-10 \pm standardfeil.

	4 t		48 t		120 t			4 t		48 t		120 t	
<i>hsp70a (gr. 1)</i>	1.0	$\pm 0,09$	1.0	$\pm 0,13$	1.0	$\pm 0,10$	<i>IgT (gr. 1)</i>	1.0	$\pm 0,27$	1.0	$\pm 0,20$	1.0	$\pm 0,13$
<i>hsp70a (gr. 2)</i>	0,8	$\pm 0,10$	0,8	$\pm 0,14$	0,6	$\pm 0,07$	<i>IgT (gr. 2)</i>	0,7	$\pm 0,20$	1,4	$\pm 0,38$	0,7	$\pm 0,08$
<i>hsp70a (gr. 3)</i>	1,2	$\pm 0,11$	1,0	$\pm 0,09$	0,7	$\pm 0,08$	<i>IgT (gr. 3)</i>	1,4	$\pm 0,32$	2,6	$\pm 0,42$	0,7	$\pm 0,11$
<i>hsp70a (gr. 4)</i>	0,9	$\pm 0,08$	0,6	$\pm 0,15$	0,7	$\pm 0,07$	<i>IgT (gr. 4)</i>	1,2	$\pm 0,23$	3,5	$\pm 0,82$	0,6	$\pm 0,06$
<i>hsp90a4 (gr. 1)</i>	1.0	$\pm 0,19$	1.0	$\pm 0,14$	1.0	$\pm 0,08$	<i>IgM (gr. 1)</i>	1.0	$\pm 0,25$	1.0	$\pm 0,13$	1.0	$\pm 0,12$
<i>hsp90a4 (gr. 2)</i>	1,3	$\pm 0,22$	0,7	$\pm 0,12$	1,3	$\pm 0,13$	<i>IgM (gr. 2)</i>	1,1	$\pm 0,34$	0,8	$\pm 0,13$	0,3	$\pm 0,08$
<i>hsp90a4 (gr. 3)</i>	1,4	$\pm 0,19$	0,8	$\pm 0,06$	1,6	$\pm 0,17$	<i>IgM (gr. 3)</i>	1,2	$\pm 0,19$	1,0	$\pm 0,16$	0,4	$\pm 0,09$
<i>hsp90a4 (gr. 4)</i>	1,1	$\pm 0,14$	0,7	$\pm 0,16$	1,2	$\pm 0,18$	<i>IgM (gr. 4)</i>	1,2	$\pm 0,22$	0,6	$\pm 0,08$	0,6	$\pm 0,11$
<i>SAA (gr. 1)</i>	1.0	$\pm 0,15$	1.0	$\pm 0,16$	1.0	$\pm 0,17$	<i>Mx (gr. 1)</i>	1.0	$\pm 0,22$	1.0	$\pm 0,11$	1.0	$\pm 0,13$
<i>SAA (gr. 2)</i>	1,3	$\pm 0,25$	0,7	$\pm 0,07$	1,1	$\pm 0,15$	<i>Mx (gr. 2)</i>	0,7	$\pm 0,13$	0,7	$\pm 0,10$	1,0	$\pm 0,14$
<i>SAA (gr. 3)</i>	1,1	$\pm 0,09$	0,6	$\pm 0,08$	0,8	$\pm 0,11$	<i>Mx (gr. 3)</i>	1,0	$\pm 0,14$	0,7	$\pm 0,07$	1,0	$\pm 0,06$
<i>SAA (gr. 4)</i>	1,0	$\pm 0,06$	0,5	$\pm 0,07$	0,9	$\pm 0,09$	<i>Mx (gr. 4)</i>	1,0	$\pm 0,17$	0,6	$\pm 0,09$	0,9	$\pm 0,12$
<i>YR (gr. 1)</i>	1.0	$\pm 0,63$	1.0	$\pm 12,46$	1.0	$\pm 0,21$	<i>IFNg (gr. 1)</i>	1.0	$\pm 1,46$	1.0	$\pm 0,82$	1.0	$\pm 1,36$
<i>YR (gr. 2)</i>	0,5	$\pm 0,06$	179,2	$\pm 111,83$	2,0	$\pm 1,71$	<i>IFNg (gr. 2)</i>	4,1	$\pm 1,40$	1,9	$\pm 0,45$	8,0	$\pm 2,58$
<i>YR (gr. 3)</i>	22,8	$\pm 14,80$	358,1	$\pm 349,58$	0,6	$\pm 0,44$	<i>IFNg (gr. 3)</i>	6,5	$\pm 1,99$	1,6	$\pm 0,62$	4,1	$\pm 1,64$
<i>YR (gr. 4)</i>	0,9	$\pm 0,22$	21,0	$\pm 10,01$	1,0	$\pm 0,80$	<i>IFNg (gr. 4)</i>	7,5	$\pm 2,29$	0,8	$\pm 0,35$	3,7	$\pm 1,16$
<i>iNOS (gr. 1)</i>	1.0	$\pm 0,36$	1.0	$\pm 0,29$	1.0	$\pm 0,47$	<i>IFNc (gr. 1)</i>	1.0	$\pm 0,12$	1.0	$\pm 0,16$	1.0	$\pm 0,17$
<i>iNOS (gr. 2)</i>	0,7	$\pm 0,31$	0,5	$\pm 0,12$	5,6	$\pm 0,72$	<i>IFNc (gr. 2)</i>	1,1	$\pm 0,23$	1,8	$\pm 0,28$	1,4	$\pm 0,20$
<i>iNOS (gr. 3)</i>	0,6	$\pm 0,19$	0,5	$\pm 0,12$	2,4	$\pm 0,75$	<i>IFNc (gr. 3)</i>	1,6	$\pm 0,25$	1,1	$\pm 0,19$	1,3	$\pm 0,22$
<i>iNOS (gr. 4)</i>	0,9	$\pm 0,11$	0,2	$\pm 0,09$	3,2	$\pm 0,69$	<i>IFNc (gr. 4)</i>	0,8	$\pm 0,12$	0,7	$\pm 0,16$	1,0	$\pm 0,16$
<i>Il-1b (gr. 1)</i>	1.0	$\pm 0,17$	1.0	$\pm 0,19$	1.0	$\pm 0,14$	<i>IFNa (gr. 1)</i>	1.0	$\pm 0,15$	1.0	$\pm 0,16$	1.0	$\pm 0,15$
<i>Il-1b (gr. 2)</i>	0,7	$\pm 0,12$	1,3	$\pm 0,13$	0,4	$\pm 0,04$	<i>IFNa (gr. 2)</i>	0,9	$\pm 0,19$	0,9	$\pm 0,11$	0,8	$\pm 0,10$
<i>Il-1b (gr. 3)</i>	1,0	$\pm 0,11$	0,9	$\pm 0,07$	0,4	$\pm 0,06$	<i>IFNa (gr. 3)</i>	1,4	$\pm 0,20$	0,8	$\pm 0,16$	0,8	$\pm 0,13$
<i>Il-1b (gr. 4)</i>	0,8	$\pm 0,12$	1,0	$\pm 0,29$	0,5	$\pm 0,04$	<i>IFNa (gr. 4)</i>	1,0	$\pm 0,17$	0,7	$\pm 0,10$	0,6	$\pm 0,07$

Gjennomsnittlig Ct-verdi for hver gruppe, 1 = Ubehandlet Kontroll, 2 = Sjøkk og Transport, 3 = Sjøkk, 4 = Transport, 5 = Usnittet Kontroll (Threshold 0,1).

Gruppe	HSP70α	HSP90α4	SAA	iNOS	IL-1β	IgT	IgM	Mx	IFNγ	IFNε	IFNδ	IFNβ	Yr	b-actin	Ef-1α	18S	
4t	1	26,2	23,4	30,5	26,9	29,6	29,3	30,3	25,9	36,3	30,0	27,0	34,4	30,5	18,8	19,6	6,5
	2	26,4	22,8	30,2	29,6	30,0	30,2	30,4	26,3	35,7	29,9	27,1		31,4	18,6	19,2	6,4
	3	25,6	22,5	29,9	28,8	29,3	28,8	29,9	25,6	34,3	29,1	26,2	34,7	29,0	18,3	19,1	6,3
	4	26,3	23,2	30,4	26,9	29,9	29,1	30,1	25,9	34,6	30,3	26,9	35,2	30,7	18,6	19,3	6,4
	5	26,0	23,1	29,9	26,4	29,1	29,1	30,0	25,6	34,5	30,0	26,7	34,8	38,3	18,3	19,1	6,0
24t	1	26,6	23,5	30,5	27,4	29,7	29,2	30,2	26,3	35,2	30,1	27,4		34,6	18,7	19,6	5,9
	2	26,7	23,6	31,0	28,3	30,1	29,3	30,1	26,6	35,9	30,5	27,4	37,2	36,2	18,8	19,8	6,0
	3	27,4	23,9	31,3	28,9	30,4	30,3	31,1	27,0	36,7	30,9	27,9	34,6	33,1	19,3	20,4	6,6
	4	27,4	24,3	30,6	29,5	30,0	29,9	30,8	26,6	37,0	31,4	27,9	35,0	32,5	19,3	20,5	6,7
48t	1	27,7	24,7	30,0	28,0	30,6	30,7	29,9	27,5	35,7	32,4	26,9		38,6	18,9	20,1	6,1
	2	26,8	24,0	29,1	28,1	28,9	29,3	29,1	26,6	34,0	30,3	25,8		31,7	17,7	18,8	5,0
	3	27,0	24,2	29,9	28,9	30,0	28,8	29,2	27,3	35,9	31,6	26,7		33,8	18,2	19,4	5,4
	4	27,9	24,7	30,3	31,3	29,9	28,7	29,9	27,8	37,4	32,3	26,8		31,9	18,6	19,7	5,4
	5	27,5	24,7	29,5	27,8	30,3	30,0	29,9	27,6	35,4	31,6	26,6		39,2	18,3	19,3	5,4
72t	1	27,5	25,3	30,5	28,1	30,7	30,7	30,5	27,5	37,0	31,8	27,4	34,7	33,1	18,5	19,6	5,9
	2	27,9	25,0	30,5	28,3	30,5	29,8	29,4	27,3	38,1	31,7	26,4		26,7	18,8	20,1	5,8
	3	28,0	24,9	30,7	30,4	30,8	29,7	29,1	26,8	36,1	31,7	26,6	35,2	27,3	19,0	20,0	5,8
	4	27,6	24,2	29,9	28,1	30,5	30,2	28,8	26,2	34,6	31,2	26,8	36,4	27,6	18,6	20,0	6,3
120t	1	26,7	25,2	29,6	29,5	30,3	29,7	28,1	26,6	36,3	31,3	27,9		30,5	19,9	21,0	8,4
	2	26,4	23,7	28,5	25,9	29,5	29,3	30,3	25,5	33,9	29,9	27,4	35,6	32,6	18,7	20,6	7,4
	3	26,7	23,9	29,5	28,4	30,0	29,8	29,2	25,5	35,3	30,7	27,9	38,9	34,8	18,4	20,8	8,1
	4	26,5	23,9	28,8	27,0	29,3	29,5	28,2	25,6	35,7	30,4	27,7	36,6	33,9	18,0	20,4	7,7
	5	26,9	24,5	29,2	28,3	29,6	29,9	27,6	26,3	34,4	31,7	28,1	35,3	38,5	18,9	20,9	7,7

Appendix IIX

Appendix IX

Kryssdiagramet med r-verdi (blått) og p-verdi (brunt) etter korrelasjons analyse med Spearmans-test. Analysen er utført på de behandlede gruppene (Gr. 1-4). 4 og 120 timer etter første badsmitte (740 dgr). n = 36 per gen.

4 t

	yr	IFNC	IFNg	Mx	iNOS	iI1b	IgT	IgM	SAA	HSP70	HSP90a4	IFNa
yr		0,272	0,048	0,550	0,041	0,503	0,429	0,595	0,606	0,448	0,386	0,523
IFNC	0,1081		0,317	0,386	0,118	0,477	0,487	0,314	0,285	0,394	0,429	0,532
IFNg	0,7827	0,0597		0,149	-0,112	-0,058	0,204	0,088	0,230	-0,010	0,057	0,099
Mx	0,0005	0,0200	0,3873		0,270	0,812	0,763	0,746	0,468	0,775	0,691	0,912
iNOS	0,8127	0,4935	0,5137	0,1112		0,300	0,221	0,121	0,117	0,283	0,037	0,262
iI1b	0,0018	0,0033	0,7372	0,0000	0,0751		0,794	0,644	0,342	0,731	0,630	0,866
IgT	0,0090	0,0026	0,2336	0,0000	0,1945	0,0000		0,657	0,315	0,720	0,611	0,791
IgM	0,0001	0,0619	0,6097	0,0000	0,4803	0,0000	0,0000		0,329	0,550	0,668	0,623
SAA	0,0001	0,0918	0,1765	0,0040	0,4973	0,0413	0,0615	0,0501		0,473	0,339	0,466
HSP70	0,0061	0,0173	0,9525	0,0000	0,0943	0,0000	0,0000	0,0005	0,0036		0,610	0,829
HSP90a4	0,0202	0,0090	0,7429	0,0000	0,8301	0,0000	0,0001	0,0000	0,0431	0,0001		0,768
IFNa	0,0011	0,0008	0,5653	0,0000	0,1230	0,0000	0,0000	0,0000	0,0042	0,0000	0,0000	

120 t

	yr	IFNC	IFNg	Mx	iNOS	iI1b	IgT	IgM	SAA	HSP70	HSP90a4	IFNa
yr		0,415	-0,002	0,453	0,039	0,244	0,427	0,125	0,160	0,418	-0,013	0,389
IFNC	0,0077		-0,099	0,645	0,228	0,533	0,676	0,062	0,443	0,572	0,441	0,665
IFNg	0,9908	0,5107		-0,080	0,213	-0,118	-0,188	-0,010	-0,099	-0,275	0,168	-0,116
Mx	0,0033	0,0000	0,5978		0,037	0,370	0,508	0,056	0,323	0,548	0,349	0,562
iNOS	0,8128	0,1282	0,1556	0,8068		-0,152	-0,103	-0,332	0,039	-0,227	0,295	0,031
iI1b	0,1294	0,0001	0,4354	0,0115	0,3140		0,689	0,439	0,610	0,499	0,054	0,512
IgT	0,0060	0,0000	0,2117	0,0003	0,4940	0,0000		0,471	0,714	0,777	0,106	0,737
IgM	0,4423	0,6806	0,9478	0,7138	0,0244	0,0023	0,0009		0,353	0,500	-0,125	0,309
SAA	0,3245	0,0020	0,5118	0,0286	0,7974	0,0000	0,0000	0,0161		0,490	0,020	0,504
HSP70	0,0073	0,0000	0,0642	0,0001	0,1299	0,0004	0,0000	0,0004	0,0006		0,202	0,614
HSP90a4	0,9377	0,0022	0,2653	0,0175	0,0462	0,7217	0,4852	0,4087	0,8929	0,1791		0,272
IFNa	0,0130	0,0000	0,4446	0,0000	0,8372	0,0003	0,0000	0,0366	0,0004	0,0000	0,0674	