



UiT Norges arktiske universitet

Fakultet for biovitenskap, fiskeri og økonomi (BFE), Norges Fiskerihøgskole (NFH)

Studier av B-celler hos laks (*Salmo salar*) - Aktiveres de av TLR-ligander?

Marie Mikkelsen

Masteroppgave i Akvamedisin | BIO-3955 | (60 stp)

Mai 2022

Forord

Denne oppgaven ble utført i forskningsgruppen *Fish Immunology and Vaccinology* ved Norges Fiskerihøgskole, fakultet for biovitenskap, fiskeri og økonomi ved UiT Norges arktiske universitet.

Jeg vil takke mine to hovedveiledere Ingvill og Jorunn for at jeg fikk være del av dette spennende prosjektet. Takk for god veiledning og for at dere har kommet med gode innspill som har gjort denne oppgaven bedre. Takk til bi-veileder Shiferaw for grundig opplæring på lab, og for all hjelp under statistiske analyser. Du har vist enorm tålmodighet fra start til slutt, og for det er jeg veldig takknemlig. Resten av forskningsgruppa fortjener også en stor takk for å ha tatt meg god imot, og for alltid å ha hjulpet meg med ulike ting som har dukket opp underveis i prosjektet. En spesiell takk til Henriette for god opplæring og hjelp med qPCR, og påfølgende analyser. Takk for at du alltid tar deg tid til å svare på mine mange spørsmål.

En flott dame som også fortjener en stor takk, er min kjære labpartner Hanna. Takk for at du ville gjennomføre dette prosjektet sammen med meg. Takk for all tillit, all hjelp og for det solide samarbeidet vi har hatt gjennom dette prosjektet spesielt, men også under hele Akvamedisinstudiet. Uten deg hadde ikke studieårene vært like *creme de la creme*. Jeg må også få takke resten av kull 2017. Dere er en fantastisk gjeng som jeg er så glad for at jeg har fått muligheten til å bli kjent med. Nå vil jeg ønske dere masse lykke til inn i arbeidslivet, jeg er ikke i tvil om dere kommer til å gjøre en fantastisk jobb som fiskehelsebiologer.

Sist, men ikke minst, min kjære familie. Mine foreldre, Janita og Jarl-Ivar, takk for at dere alltid har troa på meg. En spesiell takk til mamma for at du har tatt deg tid til å hjelpe meg med min oppgave, til tross for at du har hatt en Bachelor å skrive selv. Takk storebror Ståle for at du er den du er og alltid støtter meg i mine valg. Takk til samboer Marius for at du har holdt ut med meg dette året og for at du alltid passer på at jeg har det bra. Dere er gull verdt alle sammen, og jeg er så glad i dere.

Tromsø, mai 2022

Marie Mikkelsen

Marie Mikkelsen

Sammendrag

Virussykdommer hos atlantisk laks (*Salmo salar*) er en av de største utfordringene i norsk akvakulturindustri, og i tillegg til store økonomiske tap for næringa, fører virussykdommene også med seg store fiskevelferdsmessige problemer. Virusvaksinene som er tilgjengelig på det norske markedet i dag har vist å gi begrenset grad av beskyttelse, og velferdsmessige bekymringer er knyttet opp mot bivirkningene av oljeadjuvansene som de fleste vaksinene er formulert i. Det er dermed et stort behov for å utvikle mer effektive vaksiner formulert i adjuvanser med redusert risiko for bivirkninger.

Vaksiner skaper immunologisk beskyttelse i fisken ved blant annet å indusere differensiering av naive B-celler til celler som skiller ut antistoffer (antistoffsekreterende celler (ASC)). Gjennom denne oppgaven har vi forsøkt å stimulere leukocytter fra hodenyre, milt, perifert blod og bukhule fra laks med ulike immunmodulatorer, for å kartlegge om disse forårsaker at B-cellene differensierer til ASC. En type immunmodulatorer som kan være viktige kandidater som vaksineadjuvanser er TLR-ligander, da disse kan indusere sterke medfødte immunresponser, i tillegg til at de har potensiale til å påvirke en adaptiv immunrespons hos fisken. Dermed ble TLR-ligandene CpG, imiquimod og poly I:C, samt immunmodulatoren LPS testet som stimulanter under dette masterprosjektet.

Våre resultater viste at andelen ASC i leukocyttopulasjonen fra milt og perifert blod øker signifikant ved stimulering med CpG og LPS i seks dager. Leukocytter fra milt, perifert blod og bukhule stimulert med imiquimod viste også økt andel ASC som følge av seks dager stimulering, men forskjellene fra ustimulert kontroll var ikke signifikant. Stimulering med poly I:C påvirket ikke leukocytene til å differensiere til ASC, men et tydelig økt genuttrykk for IFN α 1 ble målt i leukocytene i etterkant av poly I:C stimulering. Stimulering av leukocytter fra hodenyre skilte seg ut fra de andre vevene ved å vise minimale endringer i andelen ASC i samtlige analyser etter stimulering med ulike TLR-ligander. Vi forsøkte også å stimulere leukocytter fra milt direkte med IFN α 1 og IFN γ , men så ikke noe forhøyet uttrykk av andelen ASC.

Resultatene viser at immunmodulatorene har ulike effekter, hvor CpG, LPS og imiquimod induserer økt differensiering av B-celler til ASC, mens poly I:C ikke ser ut til å påvirke B-cellene. Effekten av type I IFNer på B-celler fra laks er fremdeles uavklart.

Innhold

1	Innledning.....	1
1.1	Bakgrunn.....	1
1.2	Virussykdommer og virusvaksiner	2
1.2.1	Situasjonen i norsk lakseoppdrett i dag	2
1.2.2	Vaksineadjuvanser.....	5
1.3	Immunologiske organer og celler hos beinfisk	6
1.3.1	Tymus	7
1.3.2	Nyre	7
1.3.3	Milt	8
1.3.4	Mukosa-assosierte lymfoide vev	8
1.3.5	Immunceller i bukhulen.....	9
1.4	Immunsystemet til beinfisk	9
1.4.1	Medfødt immunitet.....	9
1.4.1.1	Toll-likende reseptorer.....	11
1.4.1.2	Type I Interferoner	16
1.4.2	Adaptiv immunitet.....	18
1.4.2.1	Immunrepertoar	18
1.4.2.2	T-celler.....	19
1.4.2.3	Immunologisk hukommelse	19
1.4.3	B-celler	20
1.4.3.1	B-celler hos beinfisk deltar i medfødt immunitet	22
1.4.3.2	Immunoglobuliner og B-celle populasjoner	23
1.5	Problemstilling.....	27
1.5.1	Hovedmål	27
1.5.1.1	Delmål.....	27
2	Materialer og metode.....	28
2.1	Forsøksfisk og organuttak.....	28
2.1.1	Forsøksfisk	28
2.1.2	Organuttak	28
2.2	Isolering og telling av leukocytter	29
2.2.1	Isolering av leukocytter	30
2.2.2	Telling av isolerte leukocytter	31
2.3	Kvantifisering av antistoff sekreterende celler ved ELISpot.....	32
2.4	Måling av genuttrykk i leukocytter ved Real-Time Kvantitativ Polymerase Kjedereaksjon 34	
2.4.1	Ekstraksjon og isolering av totalt RNA fra leukocytter.....	34

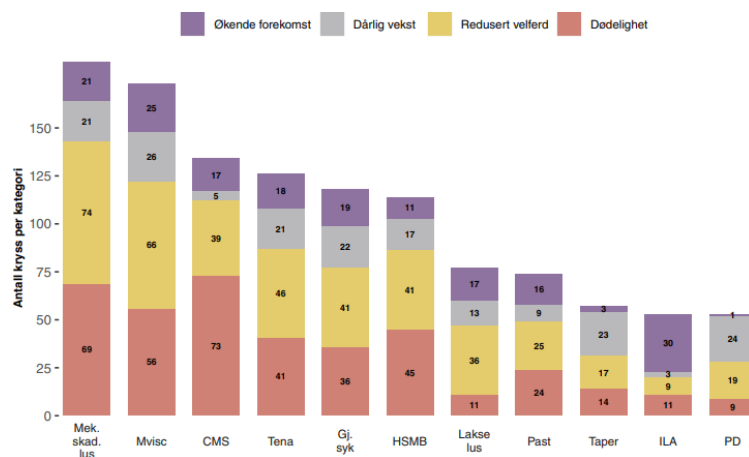
2.4.2	Syntetisering av komplementært DNA.....	35
2.4.3	Real-Time Kvantitativ Polymerase Kjedereaksjon (RT-qPCR).....	35
2.5	Beskrivelse av <i>in vitro</i> stimuleringsforsøk.....	39
2.5.1	Stimulering av leukocytter med TLR-ligander for kvantitering av ASC ved ELISpot ...	42
2.5.2	Stimulering av leukocytter til konsentrasjonskurveforsøk	43
2.5.3	Stimulering med rekombinant type I IFNer for kvantitering av ASC ved ELISpot	43
2.5.4	Stimulering av leukocytter med TLR-ligander og IFNer til qPCR-analyse	44
2.5.5	Sortering av IgM ⁺ B-celler for stimulering med LPS og kvantitering ved ELISpot	44
2.6	Databehandling	46
3	Resultater	47
3.1	Effekten av stimulering med LPS og TLR-ligander på andelen IgM-ASC	47
3.1.1	Basalnivå av ASC	47
3.1.2	Innledende IgM-ELISpot forsøk (forsøk 1).....	49
3.1.3	Optimal konsentrasjon av TLR-ligander	52
3.1.4	IgM-ELISpot forsøk 2; imiquimod i lavere konsentrasjon stimulerte til økt andel ASC	54
3.2	Effekt av stimulering med IFNer på andelen ASC i leukocyttopulasjon fra milt	57
3.3	Måling av Ig-transkripter fra stimulerte leukocyttopulasjoner	59
3.4	Direkte effekt av TLR-ligander på IgM ⁺ B-celler.....	63
4	Diskusjon.....	65
4.1	Stimulering av leukocytter med LPS, CpG, imiquimod og poly I:C	66
4.1.1	Basalnivå av ASC.....	66
4.1.2	Stimulering med CpG, LPS og imiquimod aktiverer B-celler fra milt og perifert blod..	67
4.2	Effekten av stimulering med type I IFNer på B-celler i laks	71
4.3	Stimulering med immunmodulatorer påvirker ikke cellens genuttrykk av antistoffer	72
4.4	Stimulering med LPS på sorterte IgM ⁺ B-celler aktiverte ikke cellene til ASC.....	73
4.5	Begrensinger i metoden	74
4.5.1	Forsøksbetingelser	74
4.5.2	Metodediskusjon – IgM-ELISpot.....	75
4.6	Videre forskning	75
5	Konklusjon.....	76
6	Referanser.....	77
	Appendiks I	88
	Appendiks II.....	89
	Appendiks III.....	90
	Appendiks IV	91

1 Innledning

1.1 Bakgrunn

Den norske akvakulturnæringen skjøt fart på slutten av 60-tallet og allerede i 1971 ble den første oppdrettslaksen slaktet i Norge. Siden den gang har lakseoppdrett vokst og i dag er Norge verdens største produsent og eksportør av oppdrettet atlantisk laks og regnbueørret (*Oncorhynchus mykiss*) (St.meld. nr 40 (2020-2021) 2021). I 2021 alene ble det eksportert 1,3 millioner tonn laks fra Norge, til en verdi av 81,4 milliarder kroner, ifølge Norges sjømatråd. Laksen eksporteres til flere land i Europa og verden, og i 2021 ble det solgt mest sjømat fra Norge til Polen, Danmark, Frankrike og USA (iLaks, 2022).

Dødeligheten for norsk oppdrettslaks har vært stabilt høy siden 2014. Omtrent 15% av all laks som settes ut i sjø, dør før den er slakteklar (Veterinærinstituttet, 2021b). I 2021 var det 54 millioner laks som døde i sjøfasen, og årsakene til dette er mange (Sommerset et al., 2022). Det er ingen enkelthendelser som forårsaker den høye dødeligheten, men heller summen av en rekke forhold som for eksempel dårlige miljøforhold, skader i forbindelse med håndtering, manglende fysiologisk tilpasning, og ikke minst infeksjonssykdommer (Sommerset et al., 2022). For å kunne sikre en bærekraftig virksomhet, og framtidig videre vekst i akvakulturnæringen er god fiskehelse avgjørende. I figur 1 vises en oversikt over de viktigste helseproblemene hos atlantisk laks i sjøfasen, ifølge Veterinærinstituttet.



Figur 1: Oversikt over de 10 viktigste årsakene til helseproblemer hos Atlantisk laks i sjøfasen.

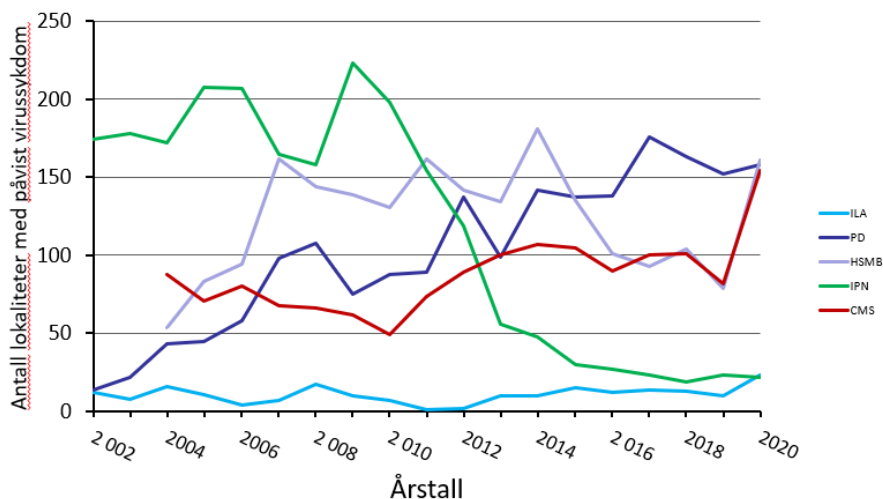
Mek.skad.lus= mekaniske skader relatert til avlusning, Mvisc = infeksjon med *Moritella viscosa* (klassiske vintersår), CMS = kardiomyopatisyndrom/hjertesprekk, Tena = infeksjon med *Tenacibaculum* spp. (ikke-klassiske vintersår), Gj, syk = gjellesykdom kompleks/multifaktoriell, HSMB = hjerte- og skjelettmuskelbetennelse, Lakselus = infestasjon med lakselus, Past = infeksjon med *Pasteurella* sp. (pasteurellose), Taper = taperfisk/avmagring, ILA = infeksiøs lakseanemi, PD = pankreassykdom. Figur hentet fra fiskehelse rapporten 2021 (Sommerset et al., 2022).

Fra figur 1 ser vi at fire av de ti viktigste årsakene til helseproblemer hos atlantisk laks er virussykdommer; kardiomyopatisyndrom (CMS), hjerte- og skjelettmuskelbetennelse (HSMB), infeksiøs lakseanemi (ILA) og pankreassykdom (PD). Siden starten på 70-tallet har industrien støttet på flere problemer når den har ønsket videre vekst, og sykdom har alltid vært en begrensende faktor. Det er utviklet flere gode vaksiner for bakterielle fiske sykdommer som historisk sett har skapt store problemer for oppdrettslaks i Norge. Situasjonen som gjelder bakterielle sykdommer i oppdrettsnæringen er derfor relativt stabil, og har vært det i mange år (Sommerset et al., 2022). Det er også utviklet vaksiner mot noen virussykdommer, men effekten av disse har vist seg å være begrenset. Det er derfor vanlig å iverksette alternative metoder for å håndtere virussykdommer. Sanering for å bryte smitteveier og brakklegging av smittede lokaliteter er blant de vanligste tiltakene, men dette medfører enorme kostnader (Bøggwald et al., 2020). Det er derfor ønskelig å kunne forebygge en infeksjon ved vaksiner, ikke bare for å minske kostnadene, men også for å forbedre fiskevelferden.

1.2 Virussykdommer og virusvaksiner

1.2.1 Situasjonen i norsk lakseoppdrett i dag

Hvert år de siste ti årene er det blitt diagnostisert mellom 400-500 oppdrettslokaliteter (laksefisk) med virussykdommer (Sommerset et al., 2022). Det er tre virussykdommer som dominerer i antall påvisninger; CMS, HSMB og PD (figur 2). CMS og HSMB forekommer endemisk langs hele norskekysten og i 2021 ble det påvist smitte på hhv. 155 og 188 oppdrettslokaliteter (Sommerset et al., 2022). Det pågår to epidemier med PD i Norge; en på Vestlandet, og en som strekker seg fra Flatanger i Trøndelag til Hustadvika i Møre og Romsdal. I 2021 ble det påvist 100 tilfeller av PD (Sommerset et al., 2022). Fra figur 1 ser vi at virussykdommen ILA også forårsaker store velferdsproblemer for oppdrettslaksen. ILA forekommer sporadisk langs hele kystlinjen, med noen få flere tilfeller i nordlige enn sørlige produksjonsområder. Det ble totalt påvist 25 tilfeller av ILA på lokaliteter i Norge i 2021 (Sommerset et al., 2022). ILA og PD er begge listeførte sykdommer, som vil si at påvisning må meldes inn til Mattilsynet (Sommerset et al., 2022).



*2020 inkluderer tall fra private diagnostiske laboratorier

Figur 2: Antall lokaliteter med påvist virussykdom fra 2002 til 2020. ILA= infeksjøs lakseanemi, PD= pankreassykdom, HSMB= Hjerne- og skjelettmuskelbetennelse, IPN= Infeksjøs pankreasnekrose, CMS= Kardiomyopatisyndrom/hjertesprekk. Figur hentet fra fiskehelse rapporten 2021 (Sommerset et al., 2022).

PD er en alvorlig sykdom i sjøvannsfasen, som forårsakes av Salmonid alphavirus (SAV). Det finnes to genotyper av SAV som skaper problemer i Norge. Genotypen SAV3 er utbredt på Vestlandet, mens SAV2 forårsaker utbrudd i området mellom Flatanger i nord til Hustadvika i sør. Det er fire kommersielt tilgjengelige vaksiner mot PD, og vaksinerings er vanlig på Vestlandet (Bøgwald et al., 2020). To av vaksinene (Norvax Compact PD vet og Alphaject micro 1 PD) er 1-komponentsvaksiner som inneholder inaktivert SAV og oljeadjuvans (kapittel 1.2.2.). Det er også en 7-komponentsvaksine tilgjengelig (Aquavac PD7 vet) som inneholder inaktivert SAV i oljeadjuvans. Den siste kommersielt tilgjengelige vaksinen mot PD er en DNA-vaksine uten adjuvans (Clynav) som kom på det norske markedet i 2018 (Veterinærinstituttet, 2020). Det er registrert en nedgang i antall PD-utbrudd i 2021 sammenlignet med tidligere år (Sommerset et al., 2022), men om det er knyttet til bruk av DNA-vaksinen er foreløpig ikke bevist.

HSMB er en vanlig virussykdom hos norsk oppdrettslaks som skyldes *Piscine orthoreovirus* (PRV). Den utgjør en trussel både i settefisk og sjøfasen. Viruset er svært utbredt hos oppdrettslaks, men de fleste tilfellene av virusfunn er ikke assosiert med klinisk sykdom. Det finnes ingen kommersiell vaksine mot PRV (Bøgwald et al., 2020).

CMS, også kalt hjertesprekk, er en svært alvorlig hjertesykdom som rammer laks i sjøfasen. Sykdommen opptrer som oftest i stor og slakteklar fisk, noe som kan gi enorme økonomiske

konsekvenser. De siste årene har man også sett at nyutsatt smolt har fått sykdommen, og ny forskning tyder på at Piscint myokardittvirus (PMC) (Haugland et al., 2011), som forårsaker CMS, er svært utbredt. Det finnes foreløpig ingen vaksine, men vaksineutvikling pågår (Bøgwald et al., 2020).

ILA er også en svært alvorlig sykdom hos atlantisk laks, forårsaket av infeksionsslakseanemivirus (ILAV). ILA er en liste 2 sykdom, så ved påvisning må det umiddelbart meldes inn til Mattilsynet (Mattilsynet, 2020). Mattilsynet vil da sette en kontrollområdeforskrift, hvor det fastsettes en sone for bekjempelse av sykdommen (bekjempelsessone) og en sone for overvåking av sykdommen (overvåkningssone) (Mattilsynet, 2020). Vanligvis vil også Mattilsynet kreve at syk fisk slaktes ut så fort som mulig for å begrense smittespredning (Mattilsynet, 2020). Det finnes en avirulent form for ILAV kalt HPR0, som er nokså utbredt både i settefisk og sjøfasen. HPR0 typen kan gjennom spesielle mutasjoner, gi opphav til den sykdomsfremkallende virusvarianten HPR-deletert ILAV (Sommerset et al., 2022). Det er to kommersielt tilgjengelige ILA-vaksiner i Norge (Bøgwald et al., 2020), men det er ikke blitt publisert kontrollerte studier som undersøker effekten av disse vaksinene i Norge. Det kan imidlertid forventes redusert dødelighet ved sykdomsutbrudd i en vaksinert laksepopulasjon, sammenlignet med en uvaksinert populasjon (Veterinærinstituttet, 2021a).

Den vanligste måten å vaksinere fisk på er ved å injisere vaksinen i bukhulen via kanyle. Den nye DNA-vaksinen mot PD injiseres derimot i muskel (Bøgwald et al., 2020). Målet med vaksinering er at immunsystemet skal detektere det patogenet som vaksinen er rettet mot og inducere en spesifikk immunrespons. Dersom vaksinen er effektiv vil vaksinering føre til produksjon av hukommelses B- og T-celler, som ved gjentatt eksponering til patogenet vil sørge for en hurtig og spesifikk respons (Bøgwald et al., 2020; Yu et al., 2020).

1.2.2 Vaksineadjuvanser

De fleste kommersielt tilgjengelige virusvaksinene til fisk består av et inaktivert antigen i tillegg til en adjuvans. En adjuvans er definert som en «hjelper-substans» som ofte virker ved å stimulere det medfødte immunsystemet og dermed øke styrken og varigheten av den spesifikke immunresponsen (Guy, 2007). Den mest brukte adjuvansen i virusvaksiner til fisk er oljeadjuvanser. Det er imidlertid knyttet store velferdsbekymringer til bruken av disse i multivalente vaksiner for fisk, da alvorlige bivirkninger kan forekomme (Bøgwald et al., 2020). Det er derfor av stor interesse å utvikle adjuvanser som enten vedlikeholder eller forbedrer effekten av vaksinen, samtidig som risikoen for bivirkninger reduseres.

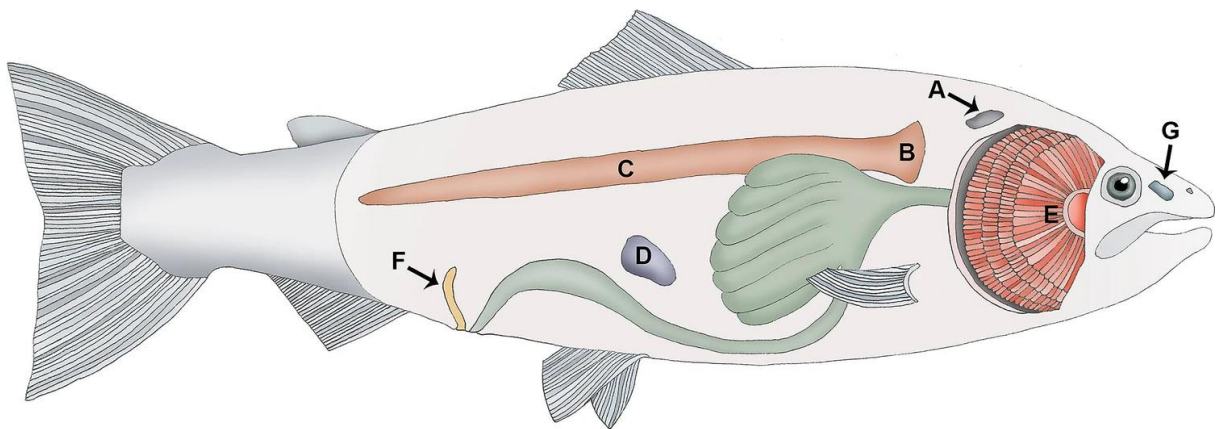
Vaksineadjuvanser kan deles inn i to grupper ut fra hvilke immunologiske effekter de induserer. Den ene gruppen (Signal 1 tilretteleggere) påvirker konsentrasjonen og distribusjonen av antigenet mellom injeksjonsområdet og lymfoidorganer. Den andre gruppen (Signal 2 tilretteleggere) induserer økt uttrykk av ko-stimulatoriske signaler hos profesjonelle antigen presenterende celler (makrofager og dendritiske celler) og gjør at den antigenspesifikke immunresponsen øker (Schijns et al., 2011). Eksempler på signal 1 adjuvanser er aluminiumsalter og mange olje-baserte emulsjoner. Signal 2 adjuvanser kan være ulike patogen-assosierte molekylære mønstre (PAMP) (kapittel 1.4.1) og inflammatoriske cytokiner (Schijns et al., 2011).

Mange såkalte Toll-liknende reseptor (TLR) ligander kan indusere sterke medfødte immunresponser som kan være avgjørende for utfallet av adaptive immunresponser. Slike TLR-ligander inngår i kategorien signal 2 tilretteleggere da de vil binde til TLRer på immunceller og blant annet utløse produksjonen av ulike cytokiner (Tafalla et al., 2013). De ulike TLRene beskrevet for fisk, og effektene av binding til disse er beskrevet i kapittel 1.4.1.1.

1.3 Immunologiske organer og celler hos beinfisk

Immunologiske organer (eller lymfoide organer) (figur 3) er organer som huser immunceller. De lymfoide organene deles gjerne inn i primære og sekundære lymfoide organer ut fra hvilke immunologiske prosesser som foregår i dem (Bjørngen et al., 2021). I primære lymfoide organer skjer modning av lymfocytter (kapittel 1.4.2), mens de sekundære lymfoide organene huser prosessen for masseproduksjon av aktiverte lymfocytter (kapittel 1.4.2) (Bjørngen et al., 2021).

Hos mennesker er de primære lymfoide organene tymus og beinmarg, og de sekundære lymfoide organene er lymfesystemet, milt og ulike mukosale vev (Abbas et al., 2016). Beinfisk har verken beinmarg eller lymfesystem, men har isteden utviklet et organ unikt for fisk, kalt hodenyre, hvor flere viktige immunologiske prosesser finner sted (Bjørngen et al., 2021). Hodenyre (eller fornyren) er en homolog til beinmargen hos mennesker, og utgjør sammen med tymus, fiskens primære lymfoide organer (Bjørngen et al., 2021). Hodenyren fungerer også som et sekundært lymfoid organ, i tillegg til resten av nyren, milt og ulike mukosale vev (Bjørngen et al., 2021).



Figur 3: Illustrasjon av immunologiske organer hos beinfisk. A= Tymus, B= Hodenyre, C= Baknyre, D= Milt, E= Gjeller, F= bursa, G= lukteorgan med nasopharynx-assosiert lymfoid vev (NALT). Illustrasjon fra (Bjørngen et al., 2021).

De lymfoide organene huser som nevnt en rekke ulike immunceller; lymfocytter, monocytter, makrofager, granulocytter, trombocytter, mast celler, cytotoksiske celler og dendrittiske celler (Ellis, 1977; Press et al., 1999). I milt og hodenyre til beinfisk er det også observert en gruppe celler kalt melanomakrofager (Press et al., 1999). Dette er svært pigmenterte fagocytter, men deres funksjon i immunologiske prosesser er ikke fullstendig kartlagt enda (Steinel et al.,

2017). Tettpakkede ansamlinger av melanomakrofager (kjent som melanomakrofag-sentre (MMC)) kan bli observert i milt og hodenyre hos beinfisk, og det er blitt foreslått at disse sentrene har funksjoner tilsvarende det germinale sentre i folliklene til pattedyr har (Steinel et al., 2017).

1.3.1 Tymus

Tymus er et paret organ hvor T-celler produseres og modnes. Organet finnes hos alle vertebrater, og morfologi og funksjon er i stor grad konservert (Bjørngen et al., 2021). Tymus ligger i epitelet på innsiden av gjellelokket, hvor det er dekket av et lag med epitelceller som danner en barriere mot det eksterne miljøet (Bjørngen et al., 2021). Sammen med hodenyre anses tymus som et av de primære lymfoidorganene hos beinfisk.

1.3.2 Nyre

Beinfiskens nyre har, på lik linje som pattedyrs nyre, både en ekskretorisk og en hormonproduserende funksjon, og er sammen med milten de viktigste stedene for filtrering av blod (Bjørngen et al., 2021). Beinfiskens nyre er delt inn i en forpart (hodenyre), en midpart (midtnyre) og en bakpart (baknyre).

Hodenyren er et primært lymfoid organ da den står for produksjon av B-celler (1.4.3) (Bjørngen et al., 2021). Samtidig fungerer hodenyren også som et sekundært lymfoidorgan da den er viktig for igangsetting og utvikling av immunresponser (Bjørngen et al., 2021). I hodenyrevevet finner vi kortisolproduserende interrenal-celler og katekolaminproduserende kromafine celler, som ligger spredt mellom hematopoetisk vev hvor produksjon av antistoffer og cytokiner skjer (Geven et al., 2017). I hodenyren finnes ikke nefroner, så det er resten av nyren som står for produksjon av urin (Bjørngen et al., 2021). I midt- og baknyren ligger det hematopoetisk vev mellom nefronene, som står for produksjon av blod (Bjørngen et al., 2021).

Det finnes rikelig med B-celler i nyrevevet til laks (Jenberie et al., 2018; Zwollo et al., 2005). I hodenyren finner vi både modne naive B-celler, og fullt utviklede plasmaceller (Zwollo et al., 2005). For at B-celler skal differensiere til plasmaceller, må de aktiveres av antigen. I den bakre delen av nyren og milt, finner vi aktiverte B-celler og plasmablaster (Zwollo et al., 2005). Dette tyder på at B-cellene migrerer fra hodenyre, og ut i andre sekundære lymfoide organer, før de returnerer til hodenyren og utvikles fullstendig til plasmaceller (Ye et al., 2011a).

1.3.3 Milt

Milten er et sekundært lymfoid organ som ligger midt i bukhulen til beinfisken.

Hovedoppgaven til milten er å filtrere blod, og å bryte ned gamle og skadede blodceller (Pethon et al., 2021). Organet deles ofte inn i rød og hvit pulpa, men hos beinfisk er overgangen mellom pulpaene diffus (Bjørngen et al., 2021). Den hvite pulpaen inneholder små blodkar kalt ellipsoider, disse er permeable og blod vil filtreres ut gjennom disse, til resten av den hvite pulpaen (Bjørngen et al., 2021). Hos pattedyr inneholder den hvite pulpaen flere lag med lymfocytter som vil fange opp antigener (Cesta, 2006), men den samme inndelingen er ikke beskrevet for fisk (Bjørngen et al., 2021). Det er derimot blitt karakterisert T-celler og MHC klasse II-positive celler (mest sannsynlig makrofager) i den hvite pulpaen til fisk (Koppang et al., 2003). Etter filtrering gjennom den hvite pulpaen vil blodet samles i den røde pulpaen, hvor det videre dreneres ut av organet (Bjørngen et al., 2021).

1.3.4 Mukosa-assosierte lymfoide vev

De viktigste mukosa-assosierte lymfoide vevene (MALT) til beinfisk er tarm-assosiert lymfoidvev (GALT), hud-assosiert lymfoidvev (SALT), nasopharynx-assosiert lymfoidvev (NALT) og gjelle-assosiert lymfoidvev (GIALT) (Salinas, 2015). I 2008 ble det også oppdaget en lymfoid struktur i den terminale enden av interbranchial septum ved basen av primærlamellene hos Atlantisk laks (Haugarvoll et al., 2008). Dette vevet fikk navnet interbranchialt lymfoidvev (ILT). I hver av disse områdene er det identifisert B- og T-celler av spesifikke fenotyper, som er ulike fra B- og T-cellene i systemiske organer hos fisk (Salinas, 2015).

Både ulike B-cellepopulasjoner, CD8⁺ T-celler celler og antigenpresenterende celler er tilstede i NALT hos regnbueørret og responderer på vaksinerings via nesehula (Das et al., 2020). NALT inneholder et større antall B-celler enn det som er funnet i de andre MALTene (Tacchi et al., 2014). IgT⁺ B-celler utgjør hovedpopulasjonen av B-celler funnet i NALT, SALT og GALT, hvilke B-celler som dominerer i GIALT er derimot ikke fullstendig kartlagt, men IgD⁺ B-celler har blitt detektert hos regnbueørret (Ramirez-Gomez et al., 2012; Salinas, 2015). Lymfocytene i ILT utgjøres i all hovedsak av T-celler, og da både CD8⁺ og CD3⁺ T-celler (Dalum et al., 2015). Et høyt antall T-celler er også beskrevet i GALT, SALT og GIALT, og i litt mindre grad i NALT (Salinas, 2015).

1.3.5 Immunceller i bukhulen

Hvilke immunceller som befinner seg i bukhulen til fisk er et viktig tema, siden intraperitoneal (i.p.) injeksjon er den vanligste strategien for vaksinerings av fisk (Bøggwald et al., 2020). I en studie fra 2013 viste Korytář et. al. at bukhulen til naiv regnbueørret inneholdt en liten nisje av IgM⁺ B-celler (Korytář et al., 2013). Kort tid etter stimulering med bakterien *Aeromonas salmonicida* var den dominerende celletypen i bukhulen myeloid celler, mens lymfocytter dominerte etter 48 timer, hvor IgM⁺ B-celler representerte mer enn to tredjedeler av alle cellene (Korytář et al., 2013). I 2017 underbygget Castro et. al. dette funnet ytterligere ved å vise at hovedpopulasjonen av immunceller i bukhulen til regnbueørret var IgM⁺ B-celler 48 timer etter i.p. injeksjon av både LPS (lipopolysakkarid) og viral hemoragisk septikemi virus (VHSV) (Castro et al., 2017). I et nyligere forsøk utført av Jenberie et. al. ble det vist at populasjonen av IgM-ASC vedlikeholdes i bukhulen hos atlantisk laks i inntil 9 uker etter i.p. injeksjon med SAV3 (Jenberie et al., 2020).

1.4 Immunsystemet til beinfisk

Immunsystemet til beinfisk fungerer i all hovedsak på samme måte som immunsystemet til andre vertebrater, men noen viktige forskjeller er det (Uribe et al., 2011). Immunsystemet hos alle vertebrater har to forgreininger, det medfødte og det adaptive (også kalt ervervede) immunsystemet. Den medfødte greinen gir en hurtigvirkende og uspesifikk immunrespons mot patogener. Den adaptive greinen vil i motsetning til den medfødte greinen bruke lengre tid før den gir en primærrespons, men det har imidlertid «hukommelse», og vil ved gjentatte eksponeringer for samme patogen, gi en hurtig og spesifikk immunrespons (Abbas et al., 2016).

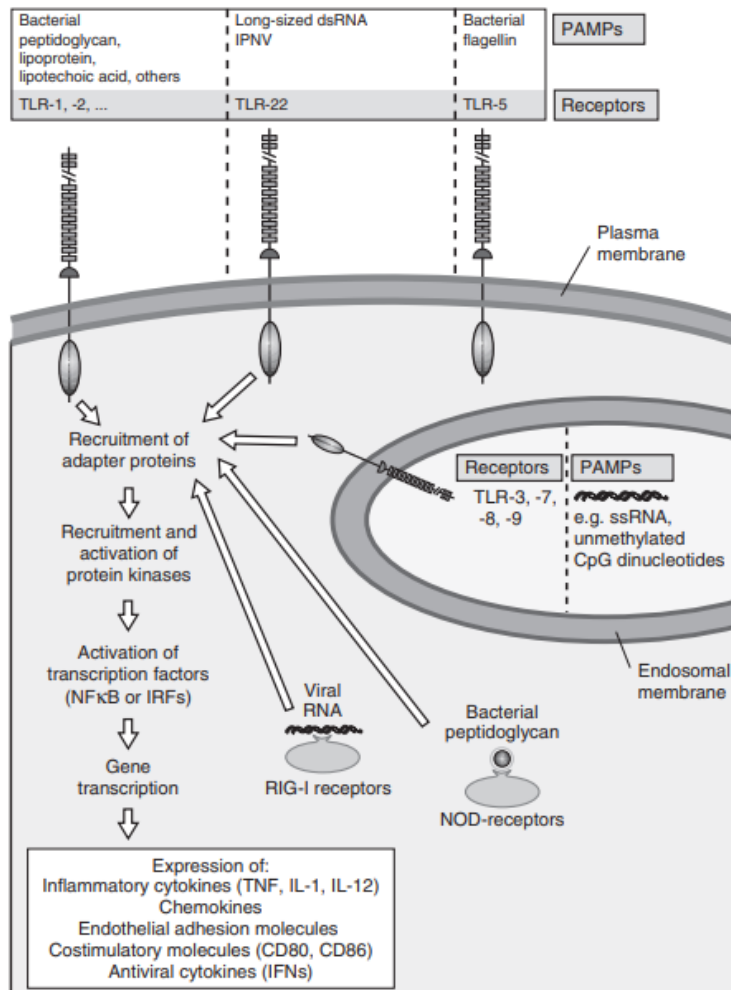
Alle levende organismer har en eller annen form for medfødt immunitet, mens den adaptive immuniteten er kun identifisert hos vertebrater. Adaptive immunresponser ble først oppdaget hos kjevemunner (*Gnathostomata*), og fisk er derfor den første gruppen dyr som har både medfødte og adaptive immunresponser (Magnadóttir, 2010).

1.4.1 Medfødt immunitet

Det medfødte immunsystemet er vertens førstelinjeforsvar mot patogener. Systemet kan deles inn i tre deler; en fysisk barriere, humoral immunitet og cellulær immunitet (Magnadóttir, 2006). Den fysiske barrieren er fiskens hud og slimlag. De humorale parameterne inkluderer

komplementsystemet, antimikrobielle peptider og cytokiner, mens ulike immunceller som fagocytter (makrofager, monocytter, nøytrofiler) naturlige-dreper celler (NK-celler), dendrittiske-, epitel- og endotelceller utgjør cellene i det medfødte immunforsvaret (Magnadottir, 2010).

Mønsterkjenningsreseptorer (PRR – pattern recognition receptors) er de viktigste reseptorene i medfødte immunresponser, da de virker som sensorer for patogener (Rivera et al., 2016). PRRene gjenkjenner patogen-assosierte molekulære mønstre (PAMPer – pathogen associated molecular patterns) og skade-assosierte molekulære mønstre (DAMPer – danger/damage associated molecular patterns) (Tanekhy, 2016). Det finnes flere ulike typer av PRRer som toll-liknende reseptorer (TLR), RIG-I-liknende reseptorer (RLRer), NOD-liknende reseptorer (NLRer) og C-type lektin reseptorer (CLRer) (Soomro et al., 2021). PRRene uttrykkes både på celleoverflaten, i endosomer og i cytosol til en rekke ulike celler i det medfødte immunsystemet (Lazarte et al., 2019). Hvor i cellen reseptorene uttrykkes, har mye å si for hvilke PAMPer og DAMPer de vil gjenkjenne (figur 4). Reseptorene som presenteres på cellens overflate gjenkjenner typisk ekstracellulære mikrober (TLRer og CLRer), mens reseptorene i endosomer gjenkjenner mikrobielle produkter som blir endocyttert inn i cella (TLRer) (Abbas et al., 2016). Reseptorene i cytosol gjenkjenner virale nukleinsyrer, bakterielle peptider og DAMPer (NLRer og RLRer) (Yajuan Li et al., 2017).



Figur 4: Funksjoner og spesifisiteter av ulike PRRer. Ulike PRRer responderer til ulike mikrobielle molekyler, inkludert lipoproteiner og nukleinsyker. Ved binding til sine spesifikke ligander vil PRRene aktivere ulike transkripsjonsfaktorer som NK-kB og ulike IRFer som resulterer i cellulære responser som er essensielle i medfødte immunresponser. Figur hentet fra: (Jørgensen, 2014).

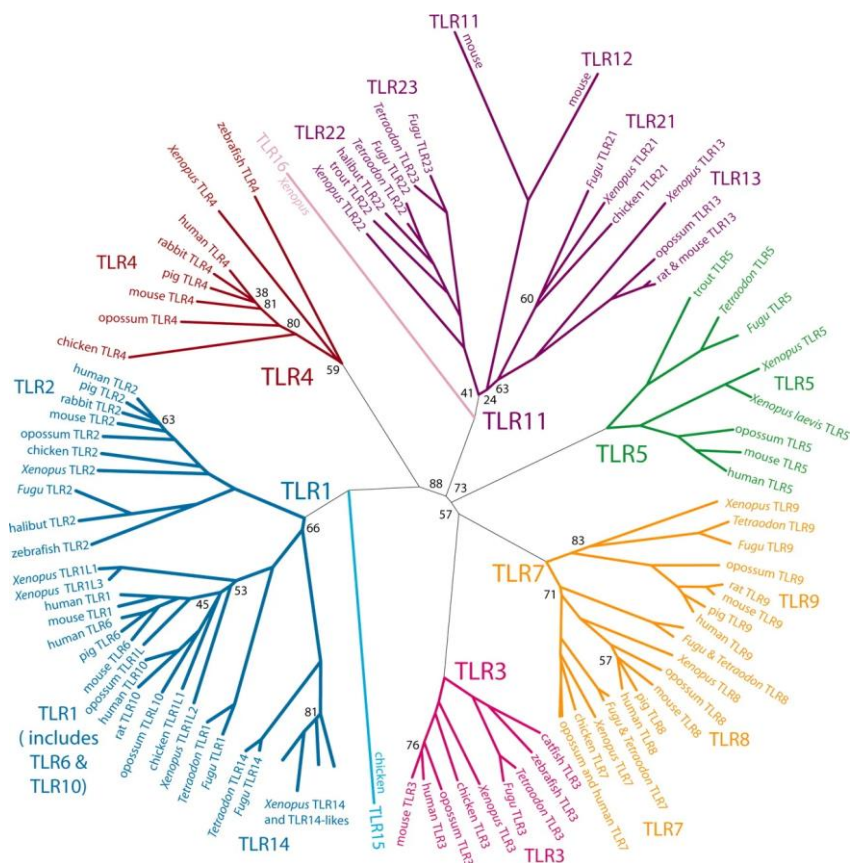
1.4.1.1 Toll-likende reseptorer

Av de ulike proteinfamiliene av PRRer er TLRer de mest studerte. Det er identifisert totalt 13 ulike TLRer hos mennesker, men hos fisk er det identifisert en rekke flere, inkludert nye TLR gener som ikke finnes hos pattedyr (Quiniou et al., 2013). Hos fisk er det så langt kartlagt gener som koder for 21 TLRer (TLR1-5, 5S, TLR7-9, TLR13, 14, TLR18-23, og TLR25-28) i en rekke ulike arter (Nie et al., 2018).

En TLR er et type I transmembran-protein, som består av tre strukturelle domener: et leucinrikt repeterende motiv (LRR), et transmembrandomene og et cytoplasmatisk Toll/IL-1 reseptor domene (TIR) (Nie et al., 2018). Det er LRR-motivet som binder patogenet, mens TIR domenet interagerer med signal-proteiner (adaptermolekyler) som deltar i

signaloverføring, noe som initierer intracellulær signalering (Takeda et al., 2003). Signalene stimulerer cellene til å uttrykke gener som koder for cytokiner, enzymer og andre proteiner involvert i antimikrobielt forsvar (Quiniou et al., 2013).

TLRene hos vertebrater kan deles inn i 6 større gen-familier; TLR1, TLR3, TLR4, TLR5, TLR7 og TLR11 (Figur 5) (Roach et al., 2005). TLR1 subfamilien inneholder TLR1, TLR2, TLR6 (ikke hos fisk), TLR10 (ikke hos fisk), TLR14 og TLR18 (Roach et al., 2005). I tillegg er TLR27 og TLR28 identifisert hos fisk, og de tilhører også TLR1 familien (Jiaren Zhang et al., 2013). Disse spiller en viktig rolle i gjenkjenningen av bakterielle PAMP'er (Jiaren Zhang et al., 2013). TLR3, TLR4 og TLR5 subfamiliene gjenkjenner dobbeltrådig RNA (dsRNA), LPS og bakterielt flagellin respektivt (Roach et al., 2005). TLR7 subfamilien gjenkjenner hovedsakelig ulike RNA molekyler, mens TLR11 familien er lite karakterisert, men gjenkjenner trolig mange ulike molekyler, alt fra proteiner til nukleinsyrer (Roach et al., 2005).



Figur 5: Molekylært tre over TLR hos vertebrater. Grener i hver familie er vist ved unike farger. TLR16 kan tilhøre TLR11 familien; TLR15 kan tilhøre TLR1 familien. Figur hentet fra (Roach et al., 2005).

Ligandspesifisiteten til de ulike TLRe ne funnet hos fisk er ikke fullstendig kartlagt enda, men en oppsummering av hva vi vet til nå er presentert i tabell 1.

Tabell 1: Oversikt over foreslåtte ligander for TLRe r hos fisk. Tabell i utgangspunktet hentet fra: (Jie Zhang et al., 2014), men inneholder oppdatert informasjon.

TLR	Ligand	Referanse
TLR1	Ukjent	(Palti, Rodriguez, et al., 2010) (Wei et al., 2011)
TLR2	Lipopeptider	(Wei et al., 2011)
TLR3	dsRNA, poly I:C	(Huang et al., 2011)
TLR4	Ukjent	(Sullivan et al., 2009)
TLR5M	Flagellin	(Tsujita et al., 2004)
TLR5S	Flagellin	(Tsujita et al., 2004)
TLR7	Ukjent	(Palti, Gahr, et al., 2010) (Lee et al., 2013)
TLR8	Ukjent	(Palti, Gahr, et al., 2010) (Lee et al., 2013)
TLR9	CpG DNA	(Skjæveland et al., 2008) (Iliev, Skjæveland, et al., 2013)
TLR13	Ukjent	(Leong et al., 2010)
TLR14	Ukjent	(Hwang et al., 2011)
TLR18	Ukjent	(Meijer et al., 2004)
TLR19	Ukjent	(Meijer et al., 2004)
TLR20	Ukjent	(Pietretti et al., 2014)
TLR21	CpG DNA	(Yeh et al., 2013) (Lee et al., 2014)
TLR22	dsRNA, poly I:C	(Lv et al., 2012)
TLR23	Ukjent	(Roach et al., 2005)
TLR24	Ukjent	(Kasamatsu et al., 2010)
TLR25	Ukjent	(Roach et al., 2005)
TLR26	Ukjent	(Roach et al., 2005)
TLR27	Ukjent	(J. Wang et al., 2015)
TLR28	Ukjent	(Y. Wang et al., 2016)

Immunmodulatorer brukt i denne oppgaven

I denne oppgaven har vi stimulert leukocytter med en rekke ulike immunmodulatorer og observert om dette øker andelen antistoff sekreterende celler i leukocyttopulasjonen.

Immunmodulatorene som vi har undersøkt er: LPS, CpG, imiquimod og poly I:C.

Lipopolysakkarid (LPS) er et kompleks i den ytre membranen til gram-negative bakterier (Bi et al., 2018), som består av et lipid kalt lipid A og et polysakkarid med en indre oligosakkaridkjerne og et O-antigen. Lipid A er den mest konserverte strukturen i LPS, og er den delen som aktiverer medfødte immunresponser (Raetz et al., 2002). Hos pattedyr er det TLR4 som gjenkjenner LPS (Bi et al., 2018). De fleste beinfisker uttrykker ikke TLR4, og heller ikke viktige co-stimulerende molekyler som MD2 og CD14 (Sepulcre et al., 2009). Fisk har også mye lavere sensitivitet for LPS enn hva pattedyr har, derfor er det foreslått at gjenkjenning av LPS hos fisk er fundamentalt ulikt enn hva det er for pattedyr (Sepulcre et al., 2009). Fisk er ofte resistente mot LPS, men det er likevel bevist at LPS stimulerer fisk til å sette i gang immunresponser (Meng et al., 2012). Det er blitt vist at LPS signaliserer gjennom en TLR4 og MyD88-uavhengig rute i fisk (Sepulcre et al., 2009), men nøyaktig hvordan er ikke beskrevet. Leukocytter fra ulike fiskearter responderer på LPS ved å skille ut inflammatoriske cytokiner som blant annet tumor necrosis factor- α (TNF α), interleukin 1 β (IL-1 β) og interleukin 8 (IL-8) (Yunkun Li et al., 2020).

Umetylerte cytosin-guanidin dinukleotid (CpG) motiver i bakterielt DNA er potente stimulatorer av immunresponser som proliferering av B-celler og aktivering av makrofager og dendritiske celler (Krieg et al., 1995). Hos atlantisk laks aktiverer CpG DNA leukocytter, og induserer produksjon av IFN γ (kapittel 1.4.1.2) (Jørgensen et al., 2001) og inflammatoriske cytokiner (Iliev et al., 2019). CpG gjenkjennes av TLR9 og TLR21 hos beinfisk (Lai et al., 2019). I 2003 viste Jørgensen et. al. at atlantisk laks som behandles med CpG DNA før de blir infisert med infeksjøs pankreas nekrosevirus (IPNV), har lavere konsentrasjon av virus i blodet, og mindre dødelighet sammenlignet med kontrollfisk (Jørgensen et al., 2003). Det er blitt identifisert tre ulike klasser av CpG DNA; klasse A, B og C, basert på immunstimulatorske forskjeller (Vollmer et al., 2004). Leukocytter fra laks responderer på disse klassene på en måte som kan sammenlignes med det som blir sett hos pattedyr (Strandskog et al., 2007). CpG av klasse A og C induserer høyt uttrykk av type I IFN γ i milt-

og hodenyreleukocytter, mens CpG klasse B og C stimulerer til celleprolifisering i hodenyre-, milt- og blodleukocytter fra laks (Strandskog et al., 2007). Klasse B CpG, som er den klassen av CpG som ble brukt i denne oppgaven, har også vist å inducere økt uttrykk av tumor necrosis factor α (TNF α) (Strandskog et al., 2007). Non-CpG ble i denne oppgaven brukt som negativ kontroll for CpG. For non-CpG er CG invertert til GC, så non-CpG har verker agonistisk eller antagonistisk effekt på TLR9 (H. Wang et al., 2005).

Polyinosinic:polycytidylic acid (poly I:C) er en syntetisk analog til dobbeltrådig RNA (dsRNA). dsRNA molekyler er immunmodulerende nukleinsyrer som kan inducere IFNer og beskyttelse mot virus hos en rekke arter av vertebrater (Poynter et al., 2018). De er viktige PAMPer produsert av virus, noe som gjenspeiles i de mange ulike reseptorene på celleoverflater, i cytoplasma og i endosomer som gjenkjenner dsRNA hos vertebrater (Poynter et al., 2018). For fisk er det foreslått at poly I:C er en ligand for TLR3 som er plassert i cellas endosomer, og TLR22 (Matsuo et al., 2008; Zhou et al., 2014). Hos pattedyr har stimulering med poly I:C vist å inducere økt uttrykk av type I IFN (Y.-G. Li et al., 2012), og antivirale effekter fra poly I:C har også blitt påvist hos beinfisk, blant annet ved økt aktivering av makrofager i hodenyren og leukocytter i blod (Strandskog et al., 2011; Zhou et al., 2014).

Imiquimod er et syntetisk imidazoquinolin amin, som imiterer ssRNA (Avunje et al., 2017). Imiquimod er en ligand for TLR7 hos pattedyr (Palti, Gahr, et al., 2010), men det er gjort få studier på effekten av imiquimod-stimulering hos atlantisk laks. TLR7 er identifisert hos atlantisk laks (Lee et al., 2013), og flere studier har vist at stimulering av atlantisk laks med ligander for TLR7 induserer oppregulering av gener som koder for antivirale cytokiner. En studie har blitt gjort med S-27609, som også er et imidazoquinolin og ligand for TLR7, hvor atlantisk laks ble injisert intraperitonealt med 10mg/kg S-27609. Studien viste at S-27609 induserte IFN α 1/ α 2 gener og Mx-gener i atlantisk laks (Kileng et al., 2008).

1.4.1.2 Type I Interferoner

Interferoner (IFNer) er en gruppe cytokiner som produseres av ulike medfødte immunceller som en inflammatorisk respons til infeksjoner (Zou et al., 2011). Hos pattedyr er det identifisert tre familier med interferoner; type I IFNer, type II IFNer og IFN- λ (Robertsen, 2006). Hos atlantisk laks er det identifisert interferoner fra type I og type II familiene (Robertsen, 2018).

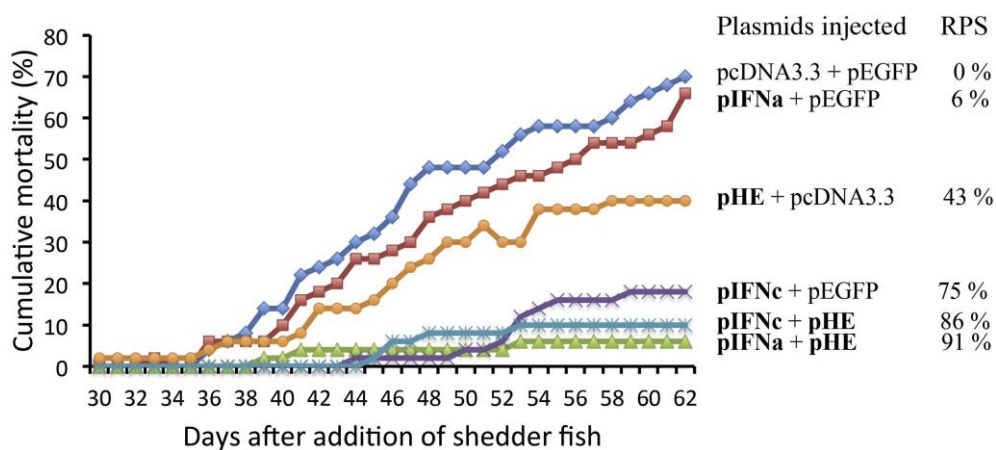
Type I IFNer (IFN-I) hos laks induserer uttrykk av mange ulike antivirale proteiner som Mx, ISG15 (interferonstimulert gen 15), viperin og PKR (protein kinase R) (Svingerud et al., 2012). IFN-I deltar også i adaptive immunresponser da de har evnen til å indusere både antiviral aktivitet og stimulere T-, B-, og dendritiske celler (Zou et al., 2011). De kjente funksjonelle egenskapene til IFN-I hos atlantisk laks er oppsummert i tabell 2. I 2003 ble det for første gang klonet to type I IFNer fra hodenyren til Atlantisk laks (Robertsen et al., 2003), og i 2009 identifiserte Sun. et. al. et cluster med 11 type I IFN-gener i genomet til atlantisk laks (Sun et al., 2009). Genene koder for tre ulike subtyper av IFN-I; IFNa (to gener), IFNb (fire gener) og IFNc (fem gener). Siden den gang er det blitt identifisert ytterligere tre subtyper IFN-I gener i laks; IFNd, IFNe og IFNf (Zou et al., 2014). Salmonider er den eneste gruppen innenfor beinfisk hvor medlemmer fra alle subtypene er identifiserte, og salmonider innehar derfor det mest komplekse repertoaret av IFN-I som så langt er funnet hos fisk (Robertsen, 2018).

Tabell 2: Funksjonelle egenskaper til IFNa, b, c og d i Atlantisk laks. Cellelinjer= Atlantisk laks ASK og TO cellelinjer, Poly I:C= ligand for MDA5, TLR3 og TLR22, R848= ligand for TLR7, ISGer= interferonstimulerte gener. Tabell hentet fra (Robertsen, 2018).

	IFNa	IFNb	IFNc	IFNd
Antiviral aktivitet i cellelinjer	+++	+	+++	-
Antiviral aktivitet <i>in vivo</i>	+	++	+++	-
Systemisk induksjon av ISGer	-	++	+++	-
Induseres av poly I:C i cellelinjer	+++	-	-	-
Induseres av poly I:C <i>in vivo</i>	+++	-	+++	-
Induseres av R848 i cellelinjer	-	-	-	-
Induseres av R848 <i>in vivo</i>	-	++	++	-

Atlantisk laks uttrykker RIG-I, MDA5, TLR3 og TLR7 samt hoved adaptorproteinene og ulike interferon regulerende faktorer (IRFer) som deltar i å indusere type I IFNer (Robertsen, 2018). I 2012 gjennomførte Svingerud et al. en studie som viste hvordan de ulike type I IFNene funnet hos laks blir induisert (Svingerud et al., 2012). Uttrykk av IFNa, IFNb, IFNc og IFNd i TO-celler og hodenyre, milt, gjeller og lever fra levende laks ble målt etter stimulering med poly I:C og imidazoquinolin R848. Hos pattedyr induserer Poly I:C IFN-b gjennom MDA5 og TLR3, mens R848 (som etterlikner viralt ssRNA) induserer IFN-a produksjon gjennom TLR7. Studien viste at IFNa i hovedsak ble induisert av poly I:C, og dermed mest sannsynlig via MDA5 og TLR3, mens IFNb og c i hovedsak ble induisert av R848, og dermed mest sannsynlig via TLR7 (Svingerud et al., 2012). Hvordan IFNd indueres hos laks er fremdeles ukjent, men det ser ikke ut til være gjennom viralt RNA (Svingerud et al., 2012).

IFN-I sine funksjoner som adjuvans i vaksiner er blitt undersøkt ved bruk av DNA vaksiner, hvor atlantisk laks ble injisert med et plasmid som kodet for infeksiøst lakseanemivirus (ILAV) hemagglutininesterase (HE) som antigen, sammen med plasmider som kodet for enten IFNa, IFNb eller IFNc (Chang et al., 2015). Alle tre IFN-plasmidene som ble gitt sammen med HE-plasmidet gav økt beskyttelse mot ILAV-infeksjonen (figur 6). Samtidig stimulerte disse til økt uttrykk for IgM, IgT, CD8, perforin og granzym A transkripter, noe som tyder på at det var en økning i andelen B- og cytotoksiske T-celler på injeksjonsstedet (Chang et al., 2015). IFN-I stimulerer altså adaptive immunresponser, og har dermed stort potensiale som adjuvanser i fiskevaksiner.



Figur 6. Økt resistens hos laks mot ILAV infeksjon ved DNA-vaksinering med adjuvanser som inneholder plasmider som uttrykker gener for IFNa (pIFNa) eller IFNc (pIFNc). Figuren viser kumulativ økning i dødelighet blant fisken etter injisering med henholdsvis 15µg pIFN og pHE, før påfølgende smitte med ILAV vha. sheddere. pcDNA3.3 = plasmidkontroll for IFN-plasmid, pEGFP= plasmidkontroll for HE plasmid. RPS= relativ overlevelsesprosent. Figur hentet fra (Robertsen, 2018).

1.4.2 Adaptiv immunitet

Den adaptive immuniteten deltar i et spesifikt forsvar mot patogener, og deles inn i to greiner; cellemedierte immunresponser (mediert av T-celler) og humorale immunresponser (mediert av B-celler). Beinfisk har både B- og T-celler, i tillegg til en rekke gener som definerer adaptive immunresponser, slik som immunoglobuliner (Ig), T-celle reseptorer (TCR), *major histocompatibility complex* klasse I og II (MHC I og MHC II) og *recombination-activating gene* 1 og 2 (RAG1 og RAG2) (Sunyer, 2013). Som tidligere nevnt har ikke fisk beinmarg, som hos pattedyr er hovedsetet for hematopoese, i stedet har fisk hodenyre som anses som analog til beinmargen. I hodenyren genereres forløpere til både B- og T-celler, B-cellen modnes også i hodenyren, mens T-cellen må migrere til tymus før den modnes. B-celler (kapittel 1.4.3) uttrykker membranbundne Ig-er, kjent som B-celle reseptorer (BCR). Disse Ig-ene kan sekreseres, og blir da referert til som antistoffer, de ulike immunoglobulinene hos beinfisk og deres rolle under immunresponser blir nærmere diskutert i kapittel 1.4.3.2.

1.4.2.1 Immunrepertoar

Det adaptive immunsystemet er i stand til å gjenkjenne flere millioner ulike antigener, til tross for at det kun er to ulike reseptorer involvert; BCR og TCR. Grunnen til dette er at genskvensene som koder for BCR og TCR kan omorganiseres gjennom en prosess kalt V(D)J rekombinasjon (Abbas et al., 2016). V(D)J rekombinasjon initieres av proteinene RAG1 og RAG2 som sørger for at variable (V), konstante (C), diversitet (D) og spleising (J) genskvenser i BCR og TCR rearrangeres slik at det dannes et enormt repertoar av ulike antigenreseptorer (Abbas et al., 2016). Både RAG1 og RAG2 er blitt identifisert hos beinfisk (Hansen et al., 1995, 1996), i tillegg til et stort antall ulike organiseringer av genene i IgH (Ig-tungkjedene) (Yasuike et al., 2010) noe som indikerer at beinfisk gjennomfører V(D)J rekombinasjon.

Etter V(D)J rekombinasjon sitter en igjen med mange ulike varianter av TCR og BCR. Ved infeksjon av antigen vil kun de T- og B-celleklonene som binder sterkt til antigenet bli selekterte og dele seg. Slik gjennomgår leukocytter fra både pattedyr og fisk to prosesser kalt klonal seleksjon og klonal ekspansjon (Abbas et al., 2016; Sunyer, 2013). Etter denne gjenkjenningen vil enkelte lymfocytter øke enormt i antall (>100 000 spesifikke lymfocytter) som vil sørge for en adaptiv immunrespons (Abbas et al., 2016; Sunyer, 2013).

1.4.2.2 T-celler

T-celler uttrykker TCR som gjenkjenner prosesserte antigener som presenteres til dem på MHC molekyler (Abbas et al., 2016). T-celler deles inn i to hovedpopulasjoner: cytotoksiske T-celler (CTL) som uttrykker CD8 ko-reseptoren som binder MHC I, og hjelper T-celler (Th) som uttrykker CD4 ko-reseptoren som binder MHC II (Abbas et al., 2016). Det er blitt identifisert både CD8⁺ CTL og CD4⁺ hjelper T-celler hos beinfisk (Tang et al., 2021; Yamaguchi, Takizawa, et al., 2019).

Hos pattedyr er CD4⁺ hjelper T-celler viktige under initieringen av adaptive immunresponser, ved at de differensierer til spesialiserte undergrupper slik som Th1, Th2, Th17 og Treg, som i sin tur produserer ulike cytokiner som blant annet IFN- γ , en rekke ulike interleukiner (IL-2, IL-4, IL-5, IL-13, IL-17A, IL 17F, IL-21 og IL-22), og *transcription factor forkhead box P3* (FOXP3) (Tang et al., 2021). Hos beinfisk er både Th1, Th2, Treg og Th17 undergruppene karakterisert, sammen med mange av cytokinene de uttrykker, og i likhet med pattedyr spiller beinfiskens CD4⁺ hjelper T-celler en viktig rolle under adaptive immunresponser (Tang et al., 2021).

Cellemediert cytotoxicitet (CMC) medieres av CD8⁺ CTL og *natural killer* (NK) celler. CMC er en viktig mekanisme for vertebrater for å kunne angripe intracellulære patogener (Yamaguchi, Takizawa, et al., 2019). CTLer bruker TCR for å gjenkjenne peptider fra patogener som presenteres på MHC I på overflaten til infiserte celler, og ved binding vil CTLer slippe ut perforin og granzymmer som fører til at målcellen vil gjennomgå apoptose (Yamaguchi, Takizawa, et al., 2019).

1.4.2.3 Immunologisk hukommelse

Det adaptive immunsystemet hos fisk vil utløse en spesifikk respons til antigener som invaderer for første gang. En annen karakteristikk ved det adaptive immunsystemet er at det vil sørge for en kraftigere, og hurtigere respons ved gjentatte infeksjoner av samme antigen, en respons som skyldes immunologisk hukommelse (Abbas et al., 2016). Signifikante forskjeller i primær og sekundærrespons er blitt rapportert for beinfisk. Blant annet viste regnbueørret en raskere antistoffrespons i tillegg til forhøyede antistoff-titere ved sekundær i.p injeksjon av LPS (Ma et al., 2013). Responsen var imidlertid beskjeden sammenlignet med det man finner hos pattedyr (Ma et al., 2013). At fisk har immunologisk hukommelse kan også underbygges av den relativt lange beskyttelsen fisk får etter vaksinerings (Yamaguchi,

Quillet, et al., 2019). Hos beinfisk er mekanismene for immunologisk hukommelse ufullstendig kartlagt, blant annet er det usikkert om beinfisk kan utvikle spesifikke hukommelsesceller (Yamaguchi, Quillet, et al., 2019).

Flere av funksjonene som definerer det adaptive immunforsvaret er beskrevet hos beinfisk. Likevel er det tydelig at den grenen av immunforsvaret fortsatte å utvikle seg gjennom evolusjonen, og har nådd en høyere grad av spesialisering hos pattedyr enn hos fisk (Abós et al., 2022).

1.4.3 B-celler

B-celler er ansvarlige for humorale adaptive immunresponser. Ved hjelp av BCR gjenkjenner de antigener, og de kan syntetisere spesifikke antistoffer (Abbas et al., 2016) med en rekke ulike funksjoner, som blir nærmere beskrevet senere. Hos pattedyr består BCR-komplekset av et immunoglobulin som gjenkjenner antigenet, og to transmembranproteiner; CD79a og CD79b (eller Iga og b) (Abbas et al., 2016). Det er få studier som er gjort på CD79 hos beinfisk, men CD79 gensekvenser har blitt identifisert blant annet hos regnbueørret (Østergaard et al., 2009), og nilmunnruger (*oreochromis niloticus*) (Wu et al., 2019). Hos pattedyr er CD79a og CD79b ansvarlig for signaltransduksjonen fra BCR og inn til cellekjernen (Abbas et al., 2016), men det er ikke beskrevet at CD79 transmembranproteinene har denne effekten hos fiskens B-celler.

Sekrerte antistoffer har en rekke effektorfunksjoner som utgjør en viktig del av de humorale immunresponsene. Disse effektfunksjonene inkluderer opsonisering hvor antistoffer binder patogener og «markerer» dem for fagocytose av fagocytiske celler (Abbas et al., 2016). En annen funksjon er nøytralisering hvor antistoffer blokkerer patogener fra å binde seg til celler og infisere dem, eller at antistoffene blokker toksiner fra å binde seg til cellulære reseptorer (Abbas et al., 2016). Antistoffer har også evnen til å aktivere komplementsystemet som blant annet vil føre til dannelsen av et kompleks som vil lysere de infiserte cellene, samt induksjonen av komplementfaktorer som vil «markere» infiserte celler for fagocytose (Abbas et al., 2016).

Hos pattedyr defineres B-cellen som en «profesjonell antigenpresenterende celle», da den tar opp spesifikke løselige antigener og presenterer disse til CD4⁺ hjelper T-celler via MHC-II molekylet på membranen (Abbas et al., 2016). B-cellene hos pattedyr er derimot ikke i stand

til å aktivere naive T-celler i noen særlig grad, og det er derfor makrofager og dendrittiske celler som i all hovedsak tar seg av denne jobben (Abbas et al., 2016). I en studie fra 2014 utført av Zhu et. al. ble det vist at B-celler fra beinfisk kan presentere antigener til medfødte naive T-celler under primære adaptive immunresponser (Zhu et al., 2014), på samme måte som makrofager og dendrittiske celler hos pattedyr (Abbas et al., 2016). Det å presentere antigener til naive T-celler er en funksjon som er antatt å tilhøre det medfødte immunsystemet hos pattedyr, og det at B-cellene hos beinfisk har denne egenskapen underbygger oppfatningen om at beinfiskens B-celler, minner mest om B1 B-celler hos pattedyr (kapittel 1.4.3.1.).

B-celler hos pattedyr presenterer antigener til T-celler (CD4⁺ hjelper T-celler) i germinale sentre (GC) i lymfekjertler (Abbas et al., 2016), og under denne interaksjonen vil B-cella motta aktiverende signaler fra T-cellen i retur (Abbas et al., 2016). B-cellen vil da differensiere til plasmablast, plasmaceller eller hukommelses B-celler (kapittel 1.4.2.) (Abbas et al., 2016). B-cellene som differensierer til plasmaceller vil begynne å produsere antistoffer, av ulike isotyper (ulike tungkjeder (kapittel 1.4.3.2.)) og med ulik spesifisitet for antigener. For å oppnå dette gjennomgår genene som koder for antistoffene to typer DNA-modifikasjon; *class-switch recombination* (CSR) og *somatic hypermutation* (SHM) (Abbas et al., 2016). Disse to prosessene krever tilstedeværelse av enzymet *activation-induced cytidine deaminase* (AID) (Abbas et al., 2016). B-cellene som har Ig-er med størst affinitet for antigenet etter CSR og SHM vil bli valgt ut til å overleve, en prosess kjent som affinitetsmodning, mens resten av B-cellene mottar signaler som induserer apoptose (Abbas et al., 2016). De overlevende B-cellene som uttrykker Ig-er med høy affinitet for antigenet vil da proliferere (klonal ekspansjon (kapittel 1.4.2.)). På den måten dannes det spesifikke antistoffer med høy affinitet for det inntrengende patogenet.

Hos beinfisk er det ikke identifisert germinale sentere slik man finner disse hos pattedyr (Zapata et al., 1995). Og til tross for tilstedeværelsen av AID gjennomgår ikke Ig-ene hos beinfisk CSR (Bilal et al., 2021), trolig fordi de mangler *cis*-elementer i IgH genet som kreves for å kunne gjennomføre AID-mediert rekombinasjon (Wakae et al., 2006). SHM er derimot beskrevet for beinfisk (Ye et al., 2011b), både i den variable (V) og i spleising (J) gensekvensen i tungkjeden til immunoglobulinet (kapittel 1.4.3.2.) (Yang et al., 2006). Affinitetsmodning er også blitt beskrevet for beinfisk, men denne responsen er mindre

effektiv hos beinfisk enn pattedyr (Magor, 2015). En oppsummering av nøkkelementer i immunoglobulin-baserte immunresponser hos fisk og pattedyr er presentert i tabell 3.

Tabell 3: Sammenligning mellom nøkkelementer i immunoglobulin-baserte immunresponser, fra beinfisk og pattedyr. AID=activation-induced cytidine deaminase. Tabell hentet fra: (Sunyer, 2013).

	Beinfisk	Pattedyr
Immunoglobulin	IgM, IgD og IgT (IgZ)	IgM, IgD, IgA, IgG og IgE
AID	Ja	Ja
Class-switch rekombinasjon	Nei	Ja
Somatisk hypermutasjon	+++	+++
Hukommelsesresponser	+	+++

1.4.3.1 B-celler hos beinfisk deltar i medfødt immunitet

I likhet med pattedyr er B celler hos fisk viktige for adaptive humorale responser, men B-cellene hos beinfisk har også vist seg å være viktige under medfødte immunresponser, gjennom en rekke ulike mekanismer.

I 2006 viste Li et. al. for første gang at B-celler fra beinfisk er fagocytiske (J. Li et al., 2006). Gjennom studien viste de at IgM⁺ B-celler fra regnbueørret og malle (*Ictalurus punctatus*) har fagocytisk aktivitet, og i påfølgende studier ble det vist at IgT⁺ B-celler fra regnbueørret har den samme evnen (J. Li et al., 2006; Y.-A. Zhang et al., 2010). Videre er det vist at B-cellene til beinfisk viser et høyt uttrykk av toll-liknende reseptorer (TLRer), samt at de responderer ved stimulering av spesifikke ligander til disse reseptorene (Wu et al., 2020). Blant annet uttrykker B-celler i regnbueørret TLR1-3, TLR5, TLR7, TLR8a2, TLR9 og TLR22 (Abós et al., 2013). I 2018 viste Jenberie et. al. at IgM⁺ B-celler hos atlantisk laks uttrykker høye nivåer av TLR9 og TLR8a1, samt noe lavere uttrykk av TLR21, TLR3 og TLR22 (Jenberie et al., 2018). Studien viste at sorterte IgM⁺ celler fra hodenyre hos laks økte sekresjonen av IgM ved CpG-stimulering, noe som tyder på at CpG påvirker B-cellene fra laks direkte til å differensiere til antistoff sekreterende celler (Jenberie et al., 2018).

Naturlige antistoffer (NAb) er antistoffer som produseres av B-celler uten stimulering med antigener og disse er også identifisert hos en rekke arter av beinfisk, deriblant regnbueørret (Díaz-Rosales et al., 2018; Uribe et al., 2011). NAb-er finnes i høye konsentrasjoner i serum hos fisk, og sørger for en umiddelbar respons på invaderende bakterier og virale patogener (Uribe et al., 2011). I 1989 gjennomførte Gonzalez et. al. et forsøk med regnbueørret, hvor de viste at NAb-ene var i stand til å nøytralisere både viral hemorragisk septikemivirus (VHSV) og IPNV *in vitro* når antistoffene ble tilsatt til en cellekultur infisert av virusene (Gonzalez et al., 1989). Naturlige antistoffer er derfor trolig i stand til å beskytte fisk under tidlige faser av infeksjoner, frem til antigen spesifikke responser er klar til å ta over (Díaz-Rosales et al., 2018).

B-celler hos fisk blir ofte sammenlignet med en undergruppe av B-celler hos pattedyr kalt B1 B-celler (Wu et al., 2020). B1 B-celler er for det meste til stede i bukhulen og i mukosalt vev hos pattedyr. De produserer de NAb-er, utenfor germinale sentre, og uavhengig av T-celle hjelp (Abbas et al., 2016). B1 B-cellene karakteriseres også ved høyt uttrykk av TLRer, fagocytisk aktivitet, samt uttrykk av en «medfødt» Ig-reseptor som har lav spesifisitet og kan binde mange godt konserverte mikrobielle produkter (Abbas et al., 2016; Parra et al., 2012). I 2018 utførte Abos et. al. en studie hvor de identifiserte pan-T markøren CD5 på B-celler hos beinfisk (Abós et al., 2018). Dette er en markør for en spesifikk undergruppe av B1 B-celler hos pattedyr (CD5⁺ B1 B-celler), og hos ørret uttrykte en stor prosentandel av B-celler denne markøren (Abós et al., 2018). Denne oppdagelsen gav ytterligere indikasjon på likheter mellom fiskens IgM⁺ B-celler og pattedyrs B1 B-celler.

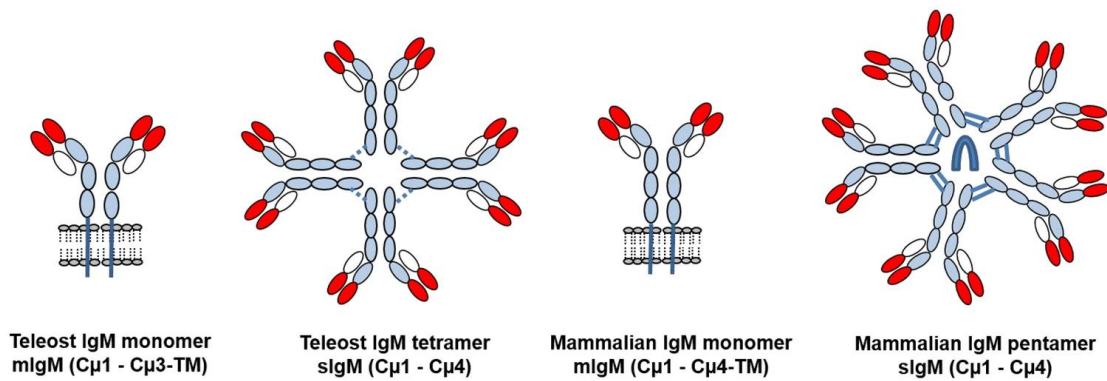
1.4.3.2 Immunoglobuliner og B-celle populasjoner

Immunoglobuliner som uttrykkes på membranen til B-cella kalles B-celle reseptor (BCR), mens sekreterte immunoglobuliner kalles antistoffer (Abbas et al., 2016). Det er identifisert tre ulike immunoglobulin-klasser hos beinfisk; IgM, IgD og IgT (Hordvik, 2015). Hvert immunoglobulin består av et sett med to identiske lett-kjeder (IgL) og to identiske tung-kjeder (IgH). Både IgL og IgH består av et N-terminalt variabelt domene, og en eller flere C-terminale konstante domener (Hordvik, 2015). Variable domener gjenkjenner antigen, mens effektorfunksjonene til Ig molekylet er mediert av de konstante domene (Bilal et al., 2021). Det er oppbygningen av tungkjeden som avgjør hvilke egenskaper immunoglobulinet har, da alt annet er likt mellom hver av klassene. Lettkjeden består av et variabelt og et konstant

domene, mens tungkjeden har et variabelt domene, og så et ulikt antall konstante domener, utfra hvilket immunoglobulin som uttrykkes (Hordvik, 2015). Beinfisk har tre isotyper av IgH: μ og δ som korresponderer til IgM og IgD klassene funnet i alle kjevemunner, og τ som koder for IgT klassen som er spesifikk for fisk (Castro et al., 2017). På grunn av organiseringen av genene i tungkjedene kan IgM og IgD av samme spesifisitet uttrykkes samtidig på en og samme B-celle; IgT kan derimot kun uttrykkes alene, og utgjør derfor en egen populasjon av B-celler hos beinfisk (Y.-A. Zhang et al., 2010). IgT isotypen deltar hovedsakelig i mukosale immunresponser i tarm og hud (Hordvik, 2015). I likhet med hva vi ser hos pattedyr, er beinfiskens hovedpopulasjonen av B-celler i milt, nyre og perifert blod IgM^+IgD^+ B-celler (naive B-celler) (Jenberie et al., 2018; Tafalla et al., 2017). Når disse cellene aktiveres i møte med antigen, vil de miste uttrykket av IgD, og bli IgM^+IgD^- B-celler, og det er disse som er ASC (Tafalla et al., 2017). Noen av de IgM^+IgD^+ B-cellene vil gjennom ukjente mekanismer miste uttrykket av IgM, og bli IgD^+IgM^- B-celler, som sekreterer IgD (Perdiguero et al., 2019). IgD^+IgM^- B-celler utgjør en stor B-cellepopulasjon i noen mukosale områder som tarmmukosa og gjellene (Perdiguero et al., 2019).

IgM

IgM var det første immunoglobulinet som ble identifisert hos fisk, og er det hyppigst forekommende Ig-et i plasma (Bilal et al., 2021). Tarm- og hudmucus har vist å ha svært lave nivåer av IgM (Sunyer, 2013). Tungkjeden til IgM består av fire konstante domener ($\mu 1$ - $\mu 4$) (figur 7), men som membranbundet Ig mangler IgM hos beinfisk det fjerde konstante domenet, og er derfor kortere en membranbundet IgM hos pattedyr (Hordvik, 2015). IgM uttrykkes vanligvis som en tetramer, men kan også forekomme som monomer, dimer og trimer i serum (Bilal et al., 2021).



Figur 7: Skjematisk presentasjon av membranbunden og sekret IgM hos beinfisk og pattedyr. Hver sirkel representerer en Ig-domene, blå sirkler (tungkjede) og hvite sirkler (lettkjede) er konstante domener, mens røde sirkler er variable domener. mIgM = membranbundet IgM, sIgM = sekret IgM. Figur hentet fra (Bilal et al., 2021).

Beinfisk-IgM sekreses av plasmablaste og plasma-liknende celler, og en stor andel av disse er påvist i hodenyre (Ye et al., 2011a). I 2018 demonstrerte Jenberie et. al. at leukocyttopulasjonene fra perifert blod og milt hos atlantisk laks innehar flest IgM⁺ celler sammenlignet med leukocyttopulasjonene fra hodenyre og baknyre (Jenberie et al., 2018). I tillegg viste de at andelen ASC i naiv laks var høyest i hodenyre, sammenlignet med blod og milt (Jenberie et al., 2020). I 2020 og 2021 viste de samme forskerne at atlantisk laks viser en markant økning i andelen IgM⁺ B-celler og IgM-ASC i bukhulen etter intraperitoneal injeksjon med SAV3 og *Piscirickettsia salmonis* (bakterien som forårsaker piscirickettsiose) (Jenberie et al., 2020; van der Wal et al., 2021). Forsøkene viste at bukhulen kan ha funksjon som et perifert immunologisk område som vedlikeholder en ASC-respons hos atlantisk laks etter infeksjon (Jenberie et al., 2020; van der Wal et al., 2021).

IgD

IgD, er i likhet med IgM, blitt beskrevet i mange klasser av vertebrater, inkludert beinfisk (Ohta et al., 2006), men når det gjelder dens spesifikke funksjon er det fremdeles mye som er usikkert (Hordvik, 2015). De fleste artene av beinfisk uttrykker IgD med syv tungkjededomener, og ett variabelt domene. Det er imidlertid beskrevet flere ulike isotyper av IgD hos ulike arter av beinfisk, der noen uttrykker flere, og noen færre, antall konstante-domener i tungkjedene til IgD (Bilal et al., 2021). Hos kanal malle (*Ictalurus punctatus*) er IgD til stede i serum i to ulike former; en variant med 7 tungkjededomener, og en variant som mangler ett C-tungkjededomene, i tillegg til det variable domenet i tungkjeden (Bilal et al., 2021). Det er blitt foreslått at IgD isotypen uten variabelt domene hos kanal malle markerer

ulike patogener for destruksjon, slik som et mønstergjenkjenningsmolekyl (Edholm et al., 2011). I 2019 gjennomførte Perdiguero et. al. et studie på IgD hos regnbueørret hvor de fant at IgD⁺ celler, og sekret IgD, var tilstede både i tarm- og gjellemukosa (Perdiguero et al., 2019). De IgD-ASC som ble funnet i tarm- og gjellemukosa sekreerte IgD som var reaktiv mot fiskens egen mikrobiota, noe som indikerer et samarbeid mellom sekret IgD og lokal mikrobiota, som kan være relevant for å opprettholde mukosal homeostase (Perdiguero et al., 2019).

IgT

Immunoglobulinet IgT ble for første gang beskrevet hos regnbueørret i 2005, og har siden blitt beskrevet i en rekke ulike arter av beinfisk (Bilal et al., 2021). IgT er et immunoglobulin spesifikt for beinfisk (Bilal et al., 2021), og i likhet med IgA hos pattedyr, spiller IgT en kritisk rolle når det kommer til å beskytte fiskens mukosale områder mot patogener, i tillegg til å vedlikeholde homeostase på mukosale overflater (Xu et al., 2020). IgT er tilstede som en monomer i blodet hos regnbueørret, og en tetramer i mukus (Hordvik, 2015). Nivået av IgT tilstede som monomer i blodet er mellom 100 og 1000 ganger lavere enn nivået av IgM, men nivået av IgT kan imidlertid bli sterkt oppregulert som respons på patogener (Hordvik, 2015). I 2020 utførte Bakke et. al. en studie på atlantisk laks infisert med SAV, som viste at IgT⁺ B-celler migrerte til hjertet som respons på virusinfeksjonen (Bakke et al., 2020). Andre studier har også detektert IgT-transkripter i hodenyre (Abos et al., 2018) og milt (Castro et al., 2013) hos laksefisk, noe som indikerer at IgT også spiller en rolle i ikke mukosale vev under systemiske virale infeksjoner.

1.5 Problemstilling

B-celler har en viktig rolle i laksens immunforsvar og vanligvis skjer aktivering av B-celler ved binding av B-celle reseptoren til et spesifikt antigen og eventuelt ko-stimulering fra T-celler. Men andre signaler er også nødvendige og både hos pattedyr og fisk er det vist at TLR-ligander og cytokiner fra det medfødte immunforsvaret deltar i B-celleaktivering. I fisk er skillet mellom adaptiv og medfødt immunitet mere uklart enn hos pattedyr og B-celler i fisk har flere egenskaper som ligner på de man finner hos celler i det medfødte immunforsvaret.

Tidligere studier i laks har vist at vaksiner hvor CpG og poly I:C er inkludert som adjuvans gir en signifikant høyere og mer langvarig antistoffrespons sammenlignet med en vaksine gitt uten (Thim et al., 2012). Laksens B-celler uttrykker TLRer som gjenkjenner ulike nukleinsyrer og *in vitro* stimulering av B-celler med CpG gir økt utskillelse av IgM, noe som indikerer at CpG kan indusere modning av B-celler til plasmaceller (Jenberie et al., 2018). I dette prosjektet har vi studert hvilke effekter flere ulike TLR-ligander samt LPS og type I IFN har på laksens B-celler *in vitro* og om ulike B-celle populasjoner fra ulike vev responderer forskjellig på slik stimulering.

1.5.1 Hovedmål

Undersøke hvilke indirekte og direkte effekter TLR-ligander og cytokiner som for eksempel type I interferoner har på B-celler fra ulike vev/lokasjoner i laks.

1.5.1.1 Delmål

- a) **Undersøke om ulike TLR-ligander og LPS påvirker andelen antistoffsekreterende celler (ASC) i leukocyttpopulasjoner fra hodenyre, milt, blod og bukhule.**
- b) **Bestemme optimal konsentrasjon av to til tre utvalgte TLR-ligander for stimulering av ASC-responsen.**
- c) **Undersøke om ulike subtyper av type I interferoner (IFN) (IFN α 1 og IFN γ) fra laks påvirker andelen ASC i leukocyttpopulasjoner fra milt hos laks.**
- d) **Undersøke om type I IFN, ulike TLR-ligander og LPS fra laks påvirker genuttrykk av ulike immunoglobuliner.**

2 Materialer og metode

2.1 Forsøksfisk og organuttak

2.1.1 Forsøksfisk

All fisken benyttet i oppgaven var uvaksinert, sykdomsfri atlantisk laks, QTL-innOvaPrime rogn fra AquaGen Steigen. Fisken ble klekket og smoltifisert ved Havbruksstasjonen i Tromsø, Kårvika og ved uttakene hadde den en vekt mellom 500 og 1600 gram og gikk på sjøvann. Den ble føret med Skretting Nutra Olympic etter veksttabell levert av leverandør. Fisken gikk på 24 timer mørke frem til startføring, og deretter 24 timer lys. Temperaturen fulgte naturlige temperatursvingninger.

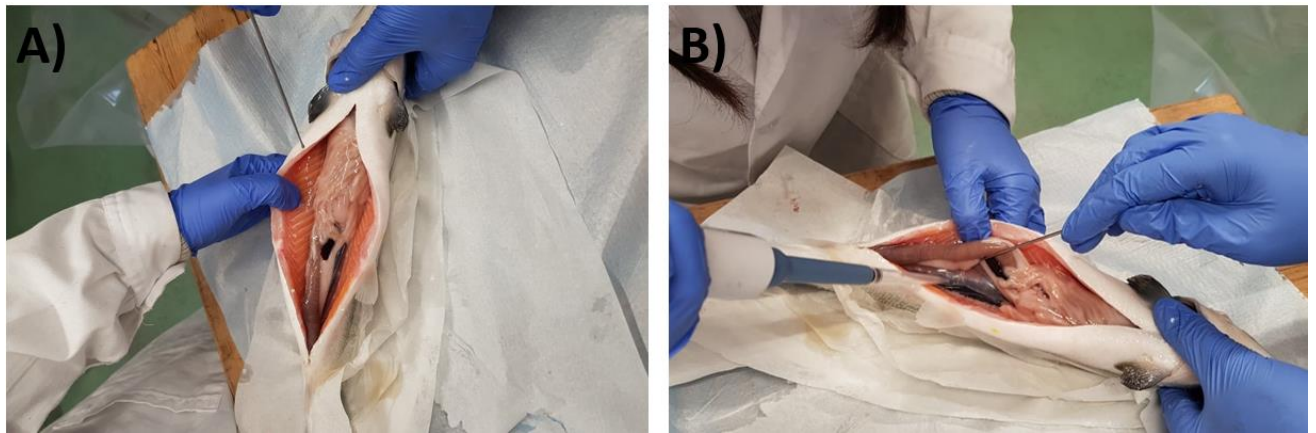
Fisken har blitt screenet ved qPCR for ILAV, IPNV, PRV, SAV, PMCV, Salmon gill poxvirus (SGPV), ILAV HPR0, *Branchiomonas cysticola*, og *Clavochlamydia salmonicola*. Det ble påvist moderat mengde *Clavochlamydia salmonicola* på gjellene til samtlige individer testet (n=5). Infeksjonen medførte imidlertid ikke økt dødelighet eller andre problemer blant fiskegruppen, og tidligere erfaring hos personellet på Havbruksstasjonen tilsier at bakterien forsvinner fra gjellene noen uker etter overføring til sjø (Jan-Eirik Jensen, personlig kommunikasjon, 5. april 2022). Fisken testet negativt for resten av agensene. Forsiden fra analyserapporten kan ses i appendiks I.

2.1.2 Organuttak

For å sikre sterile forhold under uttak av organer ble skalpell, pinsett og stålstang dyppet i 70% etanol og brent av mellom hver fisk.

Fisken ble avlivet med slag til hodet, veid og deretter blodtappet fra *Vena caudalis* med vacutainer og kanyle. Blodet ble overført til et 50ml falconrør med 10 ml transportmedium (9,5 ml L-15 tilsatt 2% FBS (Gibco)) og 40 µl heparin (5000IE/ml (Leo pharma)). Buken ble forsiktig snittet opp med skalpell uten å komme i kontakt med de underliggende organene, da lekkasje av blod eller tarminnhold kan kontaminere bukhulen.. En liten stålstang ble brukt til å skrape forsiktig langs bukveggen og organene for å løsne bukholecellene, som vist i figur 4. Vaskebuffer (9,5 ml PBS i 2% FBS tilsatt 40µl heparin) ble sprøytet over organene i bukhulen slik at cellene ble samlet i væsken, før denne ble hentet ut igjen med en pipette. Væsken med bukceller ble overført til transportmedium (tabell 4). Denne prosessen ble

gjentatt flere ganger for å hente ut mest mulig celler fra bukhulen, totalt ble det brukt omtrent 2,5 ml vaskebuffer.



Figur 8: Uttak av organer fra Atlantisk laks. A) Plasseringen av organene i fiskens bukhule. B) Høsting av bukceller. Med en stålstang ble cellene løsnet, vaskebuffer ble tilsatt og deretter sugd opp med pipette.

Hodenyre og milt ble tatt ut ved hjelp av skalpell og pinsett. Hele milten ble hentet ut ved å forsiktig løsne den fra det omkringliggende fettvevet. Resten av organpakken ble forsiktig fjernet, før hodenyre ble tatt ut med skalpell. Organene ble overført til rør med 10ml transportmedium (tabell 4). Under uttak og frakt til NFH ble rør med transportmedium og organer/blod holdt på is.

En oversikt over analyser, uttakstidspunkt, antall fisk og organer for forsøk gjort gjennom dette masterprosjektet er presentert i tabell 7.

2.2 Isolering og telling av leukocytter

Leukocytter fra hodenyre, milt, blod og bukhule ble isolert som beskrevet (Iliev et al., 2010; Jenberie et al., 2020; Jørgensen et al., 2001). Perkollgradienter (GE Healthcare) blir brukt til å skille leukocytter fra øvrige celler basert på deres spesifikke tetthet. Gradientene som ble brukt hadde en tetthet på 25% og 54% Perkoll for hodenyre, milt og bukceller, og 25% Perkoll for blod. Perkoll består av «colloid silica» partikler som danner tettheten på gradienten beskrevet. Under sentrifugering vil leukocytene fra hodenyre, milt og bukhule sedimentere i fasen mellom 25% og 54% gradientene, mens leukocytene fra blod vil legge seg over 25% Perkollgradienten.

Konsentrasjonen av celler ble bestemt ved telling i en Countess II FL Automated Cell Counter (ThermoFisher Scientific). Celletelleren bruker en bildeanalysealgoritme som

identifiserer objekter, klassifiserer celler etter form og størrelse, og i tillegg skiller mellom levende og døde celler basert på hvordan de farges med trypanblått (ThermoFisher, 2014).

2.2.1 Isolering av leukocytter

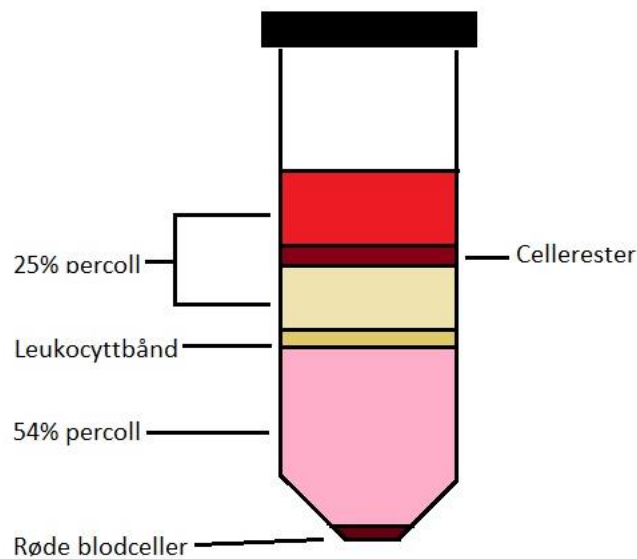
Perkollgradientene prepareres fra utgangsløsning som beskrevet i tabell 4. Gradientene ble lagt lagvis i et 50ml Falconrør. Tjuefem-prosent Perkoll (8ml for hodenyre, milt og bukceller, 10ml for blod) ble lagt på først, deretter ble 54% Perkoll (10ml for hodenyre, milt og bukceller, ingenting for blod) forsiktig lagt under 25% Perkollen ved hjelp av en glasspipette.

Tabell 4. Oversikt over komponentene i 100ml transportmedium og ulike Perkolløsninger. FBS= Foetal Bovine Serum, PBS= Phosphate-buffered saline, L-15= Leibovitz's L-15 medium

Løsning	Volum av hver komponent	Sluttkonsentrasjon
Transportmedium	98ml L-15	
	2ml FBS	
	400µl Heparin (5000IE/ml)	20IE/ml
90% Perkoll	90ml Perkoll stock løsning	
	3ml 5M NaCl	0,15M
	7ml dH ₂ O	
	400µl Heparin /5000IE/ml)	20IE/ml
54% Perkoll	59ml 90% Perkoll	
	40ml L-15	
	820µl FBS	
	164µl Heparin (5000IE/ml)	8,2IE/ml
25% Perkoll	28ml 90% Perkoll	
	72ml PBS	
	288µl Heparin (5000IE/ml)	14,4IE/ml

Vevsprøvene fra hodenyre og milt ble homogenisert ved å presse disse gjennom en 100µM Cell Strainer (Falcon) med sprøytetempel. Transportmediet (tabell 4) som vevsprøvene ble lagret på under prøveuttaket ble også brukt til å vaske cellene gjennom filteret over i en 50ml Falcontube, før celledensjonen ble overført til gradientene. Celler fra bukhu- le og blod ble

overført direkte til perkollgradient. Cellesuspensjonene utgjorde omtrent 10ml for hodenyre og milt, 15ml for blod og 7,5ml for bukcellene. Videre ble gradienter med cellesuspensjon spunnet ned i en Multifuge 1S-R sentrifuge (Heraeus) ved 400xg på 4°C i 40 minutter, akselerasjon og brems på 4. Etter sentrifugering anrikes leukocytterne mellom 25% og 54% gradientene, som vist i figur 9. Leukocyttbåndet ble høstet og overført til nye rør. Leukocytterne ble vasket ved å tilsette L15 (2,5x volumet av cellesuspensjonen), og sentrifugert i 10 minutter på 400xg ved 4°C. Supernatanten ble fjernet og hodenyrecellene ble løst opp i 15ml, milt-cellene i 10ml, blodcellene i 5ml og bukhole-cellene i 0,5ml L15.



Figur 9: Illustrasjon av Percoll-gradienten med de ulike lagene etter sentrifugering. Et distinkt leukocyttbånd legger seg over fasen med 54% Percoll.

2.2.2 Telling av isolerte leukocytter

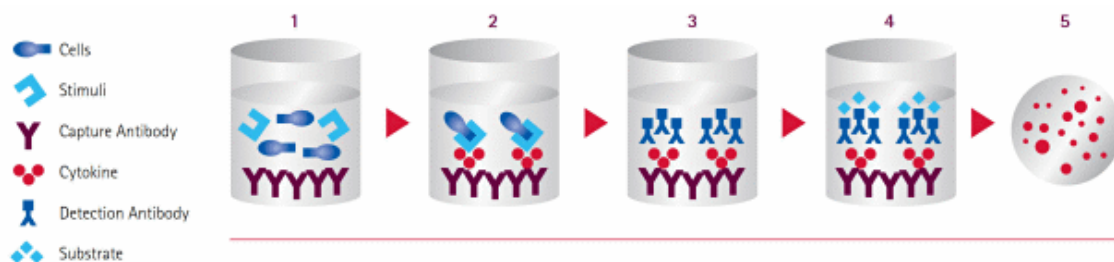
Ti µl av celleprøvene ble overført til eppendorfrør tilsatt 10ul Trypanblå fargestoff, blandet, og overført til et Countess tellekammer (ThermoFisher). Celletallet ble bestemt ved avlesning i en Countess II FL Automated Cell Counter (ThermoFisher). Maskinen oppgav antall leukocytter/ml prøve, og dette tallet ble brukt til å beregne den totale leukocyttemengden i prøven. Hvordan leukocytterne ble fortynnet og sådd ut i brønner er beskrevet i kapittel 2.5.

2.3 Kvantifisering av antistoff sekreterende celler ved ELISpot

Enzym-linket immunosorbent spot (ELISpot) er en kvantitativ metode for å måle spesifikke molekyler som immunceller skiller ut. ELISpot er basert på samme prinsippet som enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), men i stedet for at man får total konsentrasjon av det proteinet man ønsker å måle, detekterer og kvantiterer ELISpot individuelle celler som skiller ut et spesifikt cytokin- eller antistoff (Udayangani, 2021). I dette prosjektet ble metoden brukt til å identifisere og kvantitere enkeltceller som skiller ut IgM fra ulike vev hos atlantisk laks og tallfeste disse som beskrevet av Jenberie et. al. (Jenberie et al., 2020).

I våre oppsett ble membranen dekket med et antistoff som gjenkjenner IgM fra laks (beskrevet nedenfor). Hvis cellene skiller ut IgM vil disse fanges opp av antistoffet og danne et kompleks på membranen. Videre tilsettes et biotinykert deteksjonsantistoff (sekundærantistoff) som binder til antistoff-komplekset på membranen, før et Streptavidin-enzym konjugat tilsettes. Streptavidin-enzym konjugatet vil binde sekundærantistoffet og katalysere substratet som tilsettes til slutt, slik at substratet frigir fargestoff og danner prikker på membranen i bunnen av brønnen (Kalyuzhny, 2005).

Prinsippet bak metoden er videre illustrert i figur 10.



Figur 10: ELISpot for kvantitering av B celler hos laks som skiller ut IgM. 1) Membranen dekkes med antistoff som binder lakse- IgM. Leukocytene og stimulantløsning tilsettes. 2) Responderende celler produserer IgM (cytokine i figuren). IgM binder seg til anti-IgM på membranen. 3) cellene fjernes ved å vaske brønnene. Tilsetter biotinykert antistoff (detection antibody i figuren) spesifikt for IgM, som vil binde seg til IgM-antistoff komplekset på membranen. 4) Ubundet antistoff vaskes bort før Streptavidin-HRP konjugat (ikke vist i figuren) tilsettes og binder biotin. TMB-substrat tilsettes og binder seg til komplekset. Enzymet initierer en reaksjon hvor fargeendring oppstår. 5) Hver responderende celle vil resultere i utviklingen av en prikk (spot) på membranen. Figur hentet fra (Merck KGaA 2022).

Gjennomføring av metoden

I oppgaven ble ELISpot brukt til å kvantitere antallet IgM-sekreserende celler i hodenyre, milt, blod og bukhole. For dette ble ELISpot-plater med Immobilon-P membraner (Millipore) aktivert med 15µl 35% etanol/brønn i 30 sekunder, vasket en gang med 200µl Milli-Q vann/brønn, og tre ganger med 200µl PBS, før hver brønn ble «coatet» med 100µl rensset anti-ørret IgM mAb (IgF1-18) (Hedfors et al., 2012) fortynnet til 2µg/ml i PBS og inkubert over natt ved 4°C. Brønnene ble tømt og vasket 4 ganger med PBS, videre ble platen inkubert med 2% bovine serum albumin (BSA) i PBS i 1,5 timer ved romtemperatur for å blokkere ikke spesifikk binding til membranen. Fra hver fisk ble 1×10^5 leukocytter fortynnet i L-15 tilsatt 5% FBS sådd ut i parallelle brønner og inkubert i 48 timer ved 15°C. Hvordan leukocytene ble stimulert før de ble sådd ut i ELISpot-platen er beskrevet i kapittel 2.5. Etter inkubering ble platen vasket 5 ganger med PBS tilsatt 0,1% Tween 20 for å fjerne celler og ubundet IgM. Biotinylert deteksjonsantistoff (biotinylert IgF1-18) fortynnet i PBS tilsatt 1% BSA og 0,1% Tween 20 til 1,5µg/ml ble tilsatt hver brønn, før platen ble inkubert i 1,5 timer i romtemperatur. Platen ble så vasket 4 ganger med PBS før streptavidin-horseradish peroxidase (HRP) (fortynnet 1:500 i PBS) (Thermo Scientific) ble tilsatt og platen ble inkubert i romtemperatur i 1 time. Deretter ble den igjen vasket med PBS og inkubert med TMB substrat løsning (MABTECH) i 10 minutter i romtemperatur i mørket. Substratreaksjonen ble stoppet ved å vaske platen under springvann før den ble lufttørket over natten i kjøleskap. Brønner uten celler (NCC) og brønner uten biotinylert antistoff (DAC) ble inkludert som kontroller for hver plate. Etter membranen var tørket i kjøleskap over natt, ble den skannet digitalt i en ImmunoSpot S5 Micro Analyzer (Cellular Technology Limited (CTL)), og antall prikker ble automatisk talt av CTL-programvaren, og platen ble fotografert med ImmunoSpot Image programvaren (begge fra CTL). Hver prikk i ELISpot-brønnene representerer én IgM-ASC.

2.4 Måling av genuttrykk i leukocytter ved Real-Time Kvantitativ Polymerase Kjedereaksjon

Real-Time Kvantitativ Polymerase Kjedereaksjon (RT-qPCR) er en metode for å måle uttrykk av spesifikke gentranskripter i celler, blod og vev. Metoden er svært sensitiv og gjør det mulig å detektere lave nivåer av transkripter. I oppgaven ble metoden brukt for å måle uttrykk av ulike immungener (tabell 6) i stimulerte lakseleukocytter fra ulike vev. Fra isolerte, stimulerte leukocytter ble først RNA isolert, før komplementært DNA (cDNA) ble syntetisert fra RNAet. cDNAet ble så brukt som templat i qPCR-reaksjonen (beskrevet mer detaljert nedenfor).

2.4.1 Ekstraksjon og isolering av totalt RNA fra leukocytter

For isolering av totalt RNA fra leukocytter ble kitet RNeasy Mini Kit fra QIAGEN benyttet, og utført basert på deres protokoll (QIAGEN, 2019). Celleprøvene blir kjørt gjennom en selektiv silicamembran som binder RNA over 200 basepar, mens mindre RNA og andre kontaminanter blir spunnet ut under sentrifugering (QIAGEN, 2019).

Gjennomføring av metoden

Leukocytter til RNA-isolering ble sådd ut i 48-brønnersbett og inkubert i 24 timer. For å høste leukocytene ble først cellemediet sugd av og overført til eppendorfrør som ble spunnet ned i fem minutt på 500xg. Dette var for å pelletere de ikke-adherente cellene. For å lysere de adherente cellene ble 370µl lysisbuffer RLT (QIAGEN) med 2M dithiothreitol (DTT) tilsatt hver brønn og blandet godt. For rørene med de pelleterte ikke-adherente cellene ble mediet fjernet før lysisbufferen i brønnen ble overført til cellepelleten i røret. Prøvene ble holdt på is under hele prosessen. Totalt RNA ble isolert fra celleprøvene i henhold til protokollen fra QIAGEN. Et volum 70% etanol (370µl) ble tilsatt rørene med lyserte celler og blandet godt. Prøvene ble overført til RNeasy Mini Spin kolonne plassert på et 2ml oppsamlingsrør, og sentrifugert i 15 sekunder på 8000xg. Oppsamlingsrør ble kastet og byttet ut med ett nytt, før 700µl Buffer RW1 (QIAGEN) ble tilsatt kolonnen og prøven ble sentrifugert igjen i 15 sekunder på 8000xg. Oppsamlingsrør ble byttet ut og 500 µl Buffer RPE (QIAGEN) ble tilsatt RNeasy spinkolonnen. Prøven ble sentrifugert i 15 sekunder på 8000xg. Oppsamlingsrør ble byttet ut og prøven ble spunnet på maks hastighet i 1 minutt for å tørke membranen. RNeasy spinkolonnen ble så satt på et 1,5ml oppsamlingsrør, og 30µl RNase fritt vann ble direkte tilsatt til membranen. Prøven ble sentrifugert i 1 minutt på 8000xg for å eluere RNA. RNA-

konsentrasjonen og renheten på prøvene ble målt i et Nanodrop-spektrofotometer ND-1000 (Thermo Fisher Scientific).

2.4.2 Syntetisering av komplementært DNA

I en PCR-analyse benyttes DNA som templat for reaksjonen, og komplementært DNA (cDNA) syntetiseres fra isolert RNA. cDNA syntese ble utført med QuantiTect Reverse Transcription kittet fra QIAGEN. Prosedyren er basert på deres protokoll.

Gjennomføring av metoden

Først ble RNA prøvene fortynnet til ønsket konsentrasjon i RNase fritt vann.

Konsentrasjonen av RNA ble bestemt ut fra den RNA-prøven med lavest konsentrasjon av totalt RNA, og det ble brukt 200ng RNA i qPCR fra 2.11.21 (tabell 7) og 500ng RNA i qPCR fra 28.09.21 og 16.03.22 (tabell 7) i cDNA syntesen.

Ti µl fortynnet RNA ble overført til 0,2ml 8-rør strips før 2µl gDNA Whipeout buffer (QIAGEN) og 2 µl RNase-fritt vann ble tilsatt. Løsningen ble inkubert ved 42°C i 2 minutter. Under inkubering ble mastermix bestående av 1µl RT-enzym (QIAGEN), 4µl RT-buffer (QIAGEN) og 1µl Primer-mix (QIAGEN) blandet sammen. Seks µl av Mastermixen ble tilsatt hvert rør med RNA. Løsningen ble inkubert i 15 minutter ved 42°C og 3 minutter ved 95°C for å inaktivere enzymet. All inkubering ble gjort i PCR maskinen ThermalCycler 2720 (Applied Biosystems). Mellom inkuberingene ble prøvene holdt på is.

Ferdig syntetisert cDNA ble fortynnet til 1:5 og lagret ved -20°C.

2.4.3 Real-Time Kvantitativ Polymerase Kjedereaksjon (RT-qPCR)

For å detektere uttrykk av spesifikke gener i celler eller vev kan man kjøre en Real-time kvantitativ polymerase kjedereaksjon (RT-qPCR). Prinsippet bak metoden er å oppformere spesifikke DNA sekvenser, som kvantifiseres ved hjelp av et fluoriserende stoff.

Sekvensspesifikke korte biter av DNA, kalt primere, binder til DNAet i prøven slik at DNA polymerase kan binde seg og kopiere (amplifisere) områder av genene man vil studere. DNA-prøven er tilsatt et fluoriserende fargestoff som vil binde seg uspesifikt inn i DNAets doble helix, og etter hvert som PCR-produktet dannes vil fluorescens frigis og registreres av PCR-maskinen. Mengden frigitt fluorescens er proporsjonal med mengden PCR-produkt, noe som

gjør at man kan måle mengden produkt for hver amplifikasjonssyklus. Det fluoriserende stoffet som ble brukt i våre forsøk var SYBR Green (Applied Biosystems).

Samtidig som reaksjonene pågår vil resultatene avleses, derav navnet *Real-Time*. Dette resulterer i en amplifikasjonskurve med en initial-, en eksponensiell- og en plata-fase. Når amplifikasjonen starter, er mengden fluorescens lav og blir brukt for å sette et grunnivå av mengden fluorescens. Ettersom reaksjonen fortsetter begynner den eksponensielle vekstfasen, fluorescenssignalet når et nivå som er signifikant høyere enn grunnivået, og her i den eksponentielle fasen settes terskelverdien. Der hvor reaksjonen krysser terskelverdien avleses en verdi kalt Ct-verdien (Arya et al., 2005). Ct-verdien er da et tall på antall amplifiseringer av genet av interesse som må til for å nå terskelverdien. Ct-verdien er invers proporsjonal med mengde DNA, derfor vil en høy Ct-verdi tilsi lavt genuttrykk og lav Ct-verdi tilsi høyt genuttrykk.

Under RT-qPCR eksperimenter kan spesifikke «feil» bli introdusert på grunn av forskjeller i mengde RNA, ulik RNA-kvalitet eller forskjeller i effektiviteten til cDNA syntesen og/eller PCR amplifikasjonen. For å kunne minimere disse feilene blir et referansegene amplifisert i hver prøve, slik at uttrykket til referansegene kan sammenlignes opp mot uttrykket til målgenet (Arya et al., 2005). Referansegener bør være stabilt uttrykte og helst ikke endre uttrykk på tvers av prøver eller behandlinger. At referansegener i en RT-qPCR reaksjon er stabilt uttrykte er kritisk siden det spiller en stor rolle i tolkningen av resultatet (Turabelidze et al., 2010). Elongeringsfaktor (ELF1aB) ble brukt som referansegene i denne oppgaven, siden den har vist seg å være stabilt uttrykt i naiv atlantisk laks (Olsvik et al., 2005).

En syklus i en RT-qPCR reaksjon har tre faser; denaturering, hybridisering og polymerisering (tabell 5). Fasene skilles fra hverandre ved endring i temperatur. Først skjer en denaturering for å aktivere DNA polymerase, her økes temperaturen til 95°C og holdes i 20 sekunder. Deretter skjer en ny denaturering ved samme temperatur i 3 sekunder hvor dobbeltrådig DNA (dsDNA) smeltes til enkeltrådig DNA (ssDNA). Videre senkes temperaturen til 60°C i 30 sekunder hvor hybridisering og polymerisering skjer. Hybridisering er når forward og revers primer binder seg til sine respektive gensekvenser på ssDNA, og ved polymerisering vil DNA polymerase syntetisere dannelsen av to nye komplementære dsDNA tråder ved å

koble sammen nukleotider. Ved optimale betingelser vil mengden DNA fordobles ved hver syklus. Reaksjonen gjentas i 40 sykluser.

Tabell 5: En syklus i en Rt-qPCR reaksjon

Steg	Temperatur (°C)	Varighet i sekunder	Antall sykluser
Denaturering	95	20	Hold-fase
Denaturering	95	3	40
Hybridisering og polymerisering	60	30	40

Gjennomføring av metoden

Mastermix bestående av 0,8µl 5µM revers primer og 0,8µl 5µM forward primer, samt 1µl vann og 7,5µl SybrGreen ble blandet forsiktig og spunnet ned. Ti µl av mastermix ble tilsatt hver brønn i qPCR brettet (MicroAmp Fast Optical 96-Well Reaction Plate), deretter ble 5µl cDNA (fortynnet 1:5) tilsatt i sine respektive brønner på platen, i duplikater. Det ble også satt opp to vannprøver som inneholdt 5µl vann og 10µl mastermix. Vannprøvene fungerer som en kontroll for å kunne utelukke kontaminering av DNA i fargestoffet, mastermixen og primerløsningene. I tillegg ble det tatt med to kontroller med cDNA uten tilsatt revers transkriptase for å kunne oppdage eventuell kontaminering med genomisk DNA.

Videre ble en plastfilm lagt over PCR-platen og klemt fri for luft, før platen ble spunnet ned i omtrent 20 sekunder i en PCR-platespinner. Platen ble så analysert med metoden Comparative C_T ($\Delta\Delta C_T$) i et 7500 Fast Real-Time PCR system (Applied Biosystems). De ulike primersekvensene som ble brukt er oppsummert i tabell 6.

Tabell 6: Primersekvenser for de genene som ble analysert ved RT-qPCR og tilhørende genbanknummer.

Gen	Fw/rev	Sekvens	Primereff.	Genbank nr.	Publikasjoner
Elf1aB	Fw	TGCCCCTCCAGGATGTCTAC	2,18	BG933897	(Iliev, Thim, et al., 2013)
	Rev	CACGGCCCACAGGTACTG		BG933853	
Mx1	Fw	GATGCTGCACCTCAAGTCCTATTA	2,00	U66475	(Thim et al., 2014)
	Rev	CGGATCACCATGGGAATCTGA			
IFNa1	Fw	CCTTTCCTGCTGGACCA	2,02	XM-014187640.1	(Thim et al., 2014)
	Rev	TGTCTGTAAAGGGATGTTGGGAAAA			
TNFα	Fw/rev	TGCTGGCAATGCAAAAGTAG	1,97	AY848945.1	
	Rev	AGCCTGGCTGTAAACGAAGA			
mIgM	Fw	CCTACAAGAGGGAGACCGA	2,07	S48658	(Jenberie et al., 2018; Thim et al., 2014)
	Rev	GATGAAGGTGAAGGCTGTTTT			
sIgM	Fw	CTACAAGAGGGAGACCGGAG	2,09	BT060420	(Jenberie et al., 2018; Thim et al., 2014)
	Rev	AGGGTCACCGTATTATCACTAGTTT			
IgD	Fw	GTGTCTGCAGCAGCCTATGA	2,08	AF278717.1	
	Rev	GTGAAGTCCTTCCCCTGGTT			
IgT	Fw	CAAACTGACTGGAACAACAAGGT	2,06	HQ379938.1	
	Rev	CGTCAGCGGTTCTGTTTTGGA			

Primer-effektiviteten ble beregnet etter metode beskrevet av (Pfaffl, 2001). En fortynningsrekke med to-folds fortyninger ble laget av cDNA, fra ufortynnet (200ng) til 1:64 fortykning. qPCR ble kjørt for alle primerne (5µM) og Ct-verdiene ble plottet mot fortykningene i en lineær standardkurve. Stigningstallet ble brukt til å regne ut amplifikasjonsfaktor og effektivitet (ligning 1).

$$Effektivitet (\%) = \left(\frac{-1}{10^{\text{stigningstall} - 1}} \right) \times 100 \quad (\text{Ligning 1})$$

2.5 Beskrivelse av *in vitro* stimuleringsforsøk

Fra alle uttakene våre isolerte vi leukocytter som ble brukt i ulike *in vitro* stimuleringsforsøk. Hvilke stimulanter som ble benyttet, og deres konsentrasjon varierte mellom de ulike forsøkene. Tabell 7 gir en oversikt over de ulike forsøkene, hva leukocytene ble stimulert med, hvor lenge, og hvilke analyser som ble gjort.

Tabell 7: Oversikt over organuttak for alle de ulike eksperimentene, med hvilke forsøk som ble gjennomført, antall fisk tatt ut, hvilke organer tatt ut, tidspunkt for uttak, lengde på stimulering og hvilken analyse som ble gjort. HN= hodenyre, MI = milt, BL = perifert blod, BC = bukhole-celler.

Forsøk	Antall fisk pr uttak	Organ	Uttaksdato	Høstetidspunkt etter stimulering	Analyse
Effekt av LPS CpG, Poly I:C og Imiquimod stimulering på antall IgM-sekreserende celler.	4 pr uttak	HN, MI, BL, BC	23. april 2021**	3d, 6d	IgM ELISpot For uttakene 23.4*, 28.9, og 2.11, ble det gjort qPCR målinger på ELF, TNF α , Mx, IFN α 1
			7. sept. 2021*	RNA høstet etter 24t stimulering	
			28. sept. 2021		
			2. nov. 2021		
Konsentrasjonskurve-eksperiment for CpG, Poly I:C og Imiquimod	4	HN, MI	22. okt. 2021	3d	IgM ELISpot
Antall IgM sekreserende celler ved stimulering med IFNα1, IFNγ, CpG og LPS	4	MI	22. nov. 2021	3d, 6 d	IgM ELISpot
	4	HN, MI	20. jan. 2022*	3d, 6d	
	4	HN, MI, BL, BC	1. mars. 2022*	3d, 6d	
Effekten av LPS, CpG, Imiquimod, Poly I:C, nCpG, IFNα1 og IFNγ på uttrykk av ulike Ig-gener	4	HN, MI, BL, BC	7. feb. 2022* 22. feb. 2022*	24t, 72t	RT-qPCR, målt på: ELF, mIgM, sIgM, IgD, IgT, Mx
	3	HN, MI, BL	16. mars 2022	24t, 48t	
	3	HN, BL	4. april 2022*	24t, 48t	
Effekten av LPS på sorterte IgM+ B celler	4	MI	7. des. 2021	12t	IgM ELISpot
Effekten av LPS og CpG på sorterte IgM+ B-celler	4	MI	4. jan. 2022*	12t	RT-qPCR

*= ingen resultater. Disse forsøkene gikk ikke som planlagt og ELISpot platen gav ingen positive prikker. For qPCR fra 16.03.22 ble resultatene for leukocytter fra milt ekskludert, på grunn av en feil med revers-transkriptase kitet fra QIAGEN.

**= feil under utsåing av stimulerede leukocytter til ELISpot-plate, fikk dermed lavere respons enn forventet. Resultatene etter 6 dager stimulering er presentert i appendiks II.

Tabell 8 viser en oversikt over konsentrasjonene på stimuleringsløsningene som ble brukt. For hvert organ ble det også inkludert en ubehandlet kontroll-brønn. Stock-løsningene av stimulanter ble fortynnet til 2x brukskonsentrasjon i L-15 med 5% FBS (kalt L15+) før de ble brukt til å stimulere leukocytene.

Tabell 8: Liste over stimulanter og hvilke konsentrasjoner som ble tilsatt per brønn for stimulering av leukocytter. E. coli 0111:B4 = *Escherichia coli* 0111:B4

Produkt	Konsentrasjon	Konsentrasjon etter konsentrasjonskurveforsøk	Produsent
LPS (lipopolysakkarid) fra E. coli 0111:B4	50µg/ml	-	Sigma
B klasse CpG 2006 ODN*	2µM	-	Sigma
Imiquimod	5µg/ml	1µg/ml	Sigma
Poly I:C	10µg/ml	1µg/ml	Cytiva
Non-CpG*	2µM	-	Integrated DNA technologies (IDT)
IFNa1	1000 U/ml	-	Rekombinant fremstilt (Berg et al., 2009)
IFNc	1000 U/ml	-	Rekombinant fremstilt (Berg et al., 2009)

* B-klasse CpG med gensekvens: 5'-T*CGT*CGT*TTT*GTC*GTT*TTG*TCG*T*T-3', der * indikerer fosforiat-bånd. For nCpG er CG reversert til GC.

Konsentrasjoner markert med -, ble ikke endret etter konsentrasjonskurveforsøk.

2.5.1 Stimulering av leukocytter med TLR-ligander for kvantitering av ASC ved ELISpot

Det ble gjennomført to ELISpot forsøk som er tatt med i resultatdelen av denne oppgaven. Innledende ELISpot forsøk (ELISpot forsøk 1, figur 15) ble gjennomført før konsentrasjonskurveforsøket (kapittel 2.5.2) og ELISpot forsøk 2 (figur 18) ble gjennomført etter konsentrasjonskurveforsøket. For hver av disse ELISpot forsøkene ble det brukt ulike konsentrasjoner av enkelte av stimulantene, ellers ble samme forsøksoppsett fulgt.

Isolerte leukocytter ble spunnet ned i 10 minutter på 400xg. Cellepellet ble løst opp i L15+ til 10 millioner leukocytter/ml. Videre ble leukocytterne sådd ut i et 96-brønnersbrett (ThermoFisher), 100µl/brønn, som gav en konsentrasjon på 1 million leukocytter/brønn. Til slutt ble 100µl med stimuleringsløsningene tilsatt hver brønn i konsentrasjoner som angitt i tabell 8, kontrollceller ble kun tilsatt L15+. Leukocytterne ble sådd ut i to parallelle plater (figur 11) og disse ble inkubert i henholdsvis tre og seks dager. Etter inkubering ble leukocytterne høstet og overført til en ELISpot-plate coatet med anti-IgM. Videre ble protokoll for kvantitering av ASC ved ELISpot fulgt, som beskrevet i kapittel 2.3.

For innledende ELISpot forsøk ble det brukt konsentrasjoner av stimulantene som vist i tabell 8, under «konsentrasjon»-kolonnen. For ELISpot forsøk 2 ble konsentrasjoner oppgitt under «konsentrasjon etter konsentrasjonskurveforsøket»-kolonnen brukt til stimulering.

	Ktrl	nCpG	CpG	LPS	Imi	Poly						
HN1	X	X	X	X	X	X						
HN2	X	X	X	X	X	X						
HN3	X	X	X	X	X	X						
HN4	X	X	X	X	X	X						
MI1	X	X	X	X	X	X						
MI2	X	X	X	X	X	X						
MI3	X	X	X	X	X	X						
MI4	X	X	X	X	X	X						

Figur 11: Oppsett for 96-brønnsbrett med leukocytter stimulert med TLR-ligander. HN1= hodenyre fra fisk 1, HN2= hodenyre fra fisk 2 osv., MI= milt, Ktrl= kontroll, Imi= imiquimod, Poly= poly I:C.

qPCR analyse av leukocytter stimulert med CpG, LPS, imiquimod og poly I:C.

Som en kontroll på at stimuleringen hadde fungert ble det kjørt qPCR analyse av deler av leukocyttopulasjonen fra hodenyre fra samme forsøksfisk som ble brukt under ELISpot-analysene.

Isolerte leukocytter fra hodenyre fra fire laks ble sådd ut i et 24-brønnersbrett i en konsentrasjon på 2,5 millioner celler/brønn. Leukocytterne ble så stimulert med nCpG, CpG, LPS, imiquimod og poly I:C etter konsentrasjon oppgitt i tabell 8 under «konsentrasjon»-kolonnen for qPCR analyse etter ELISpot forsøk 1, og «konsentrasjon etter konsentrasjonskurveforsøk» for qPCR etter ELISpot forsøk 2. Leukocytterne ble stimulert i 24 timer ved 15°C, før de ble høstet og RNA ble isolert som beskrevet i kapittel 2.4.1. Kontrollceller ble kun tilsatt L15+. Disse leukocytterne ble analysert for uttrykk av genene ELFa1, Mx, IFNa1 og TNF α .

2.5.2 Stimulering av leukocytter til konsentrasjonskurveforsøk

Flere av stimulantene som er brukt i våre forsøk har ikke vært testet for B-celle spesifikke responser tidligere. For å bestemme den optimale konsentrasjonen av stimulantene for våre formål ble det derfor satt opp et konsentrasjonskurveforsøk etter det innledende ELISpot-forsøket.

Isolerte leukocytter fra hodenyre og milt ble sådd ut i et 96-brønnersbrett. Leukocytterne var fortynnet til 10 millioner/ml, og det ble sådd 100 μ l til hver brønn. Disse ble stimulert med CpG, poly I:C og imiquimod i ulike konsentrasjoner; CpG: 1 μ M, 2 μ M og 5 μ M, Poly I:C: 1 μ g/ml, 5 μ g/ml og 10 μ g/ml, imiquimod: 1 μ g/ml, 5 μ g/ml og 10 μ g/ml. Platen ble inkubert i tre dager på 15°C før leukocytterne ble høstet og ELISpot protokollen ble fulgt som beskrevet i kapittel 2.3.

2.5.3 Stimulering med rekombinant type I IFNer for kvantitering av ASC ved ELISpot

Isolerte leukocytter ble prestimulert med to ulike rekombinante IFNer (IFNa1 og IFNc), for påfølgende stimulering med CpG og LPS og kvantitering ved ELISpot. En million leukocytter ble sådd ut i hver brønn i to parallelle 96-brønnersbrett, slik at leukocytterne kunne stimuleres i to ulike tidspunkter; tre og seks dager. Leukocytterne ble stimulert med IFNa og IFNc etter konsentrasjon oppgitt i tabell 8, i tre dager ved 15°C. Platen ble så spunnet ned og stimulantløsningene ble fjernet før leukocytterne ble høstet og overført til en ELISpot-plate coatet med anti-IgM (kapittel 2.3), før de enten ble stimulert med CpG og LPS etter konsentrasjon oppgitt i tabell 8, i tre og seks dager ved 15°C, eller holdt som kontrollbrønner. Det ble inkludert kontroller kun tilsatt leukocytter og 250 μ l L15+, samt kontroller kun tilsatt

CpG eller LPS, og kontroller kun tilsatt IFN α 1 eller IFN γ (etter oppsett som vist i figur 12).

Videre ble ELISpot platen farget og avlest som beskrevet i kapittel 2.3.

	Ktrl	IFN α 1	IFN γ	CpG	LPS	IFN α 1+ CpG	IFN α 1+ LPS	IFN γ + CpG	IFN γ + LPS			
MI1	X	X	X	X	X	X	X	X	X			
MI2	X	X	X	X	X	X	X	X	X			
MI3	X	X	X	X	X	X	X	X	X			
MI4	X	X	X	X	X	X	X	X	X			

Figur 12: Oppsett av 96-brønnersbrett for stimulering av leukocytter med IFN α 1, IFN γ , LPS og CpG. MI1 = milt fra fisk 1, MI2= milt fra fisk 2, MI3= milt fra fisk 3, MI4 = milt fra fisk 4, Ktrl= kontroll.

2.5.4 Stimulering av leukocytter med TLR-ligander og IFNer til qPCR-analyse

Isolerte leukocytter fra hodenyre, milt og blod fra tre laks ble sådd ut i et 48-brønners brett til en konsentrasjon på 2,5 millioner leukocytter/brønn og stimulert med nCpG, CpG, LPS, imiquimod, poly I:C, IFN α 1 og IFN γ (etter konsentrasjon oppgitt i tabell 8 – «konsentrasjon etter konsentrasjonskurveforsøk») i 24 og 48 timer ved 15°C. RNA ble isolert som beskrevet i kapittel 2.4.1. Kontrollceller ble kun tilsatt L15+. Disse leukocytene ble analysert for uttrykk av genene ELFa1, sIgM, mIgM, IgD, IgT og Mx.

2.5.5 Sortering av IgM⁺ B-celler for stimulering med LPS og kvantitering ved ELISpot

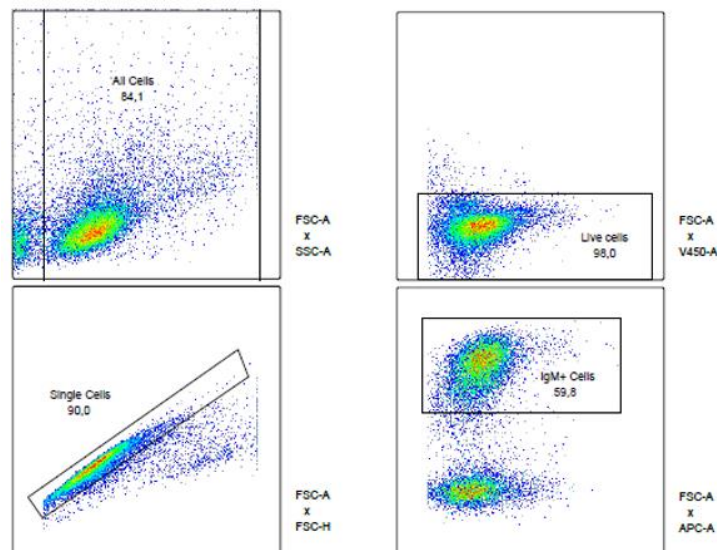
For å kunne studere IgM⁺ B-celler alene må disse sorteres ut fra hele leukocyttopulasjonen. Fluorescensaktivert celledatering (FACS) er en metode som benyttes for å separere enkeltceller fra resten av en cellepopulasjon. For å kunne sortere ut cellene man ønsker å studere, merkes de først med fluorescensmerkede monoklonale antistoffer (mAb), som gjenkjenner spesifikke markører på overflaten til de ønskede cellene. Sortering med FACS krever et flowcytometer med sorteringskapasitet og en passende programvare. For FACS sendes celleprøven i suspensjon som en strøm av dråper, der hver enkelt dråpe inneholder en enkelt celle, foran en laser. Systemet som detekterer fluorescens, oppdager cellene av interesse basert på forhåndsbestemte fluorescensparametere for cellene. Instrumentet vil da påføre dråpene som inneholder cellene av interesse en ladning, og et elektrostatiske

avbøyningsystem vil tiltrekke til seg de ladede dråpene og føre dem til et oppsamlingsrør (Basu et al., 2010).

Gjennomføring av metoden

Leukocytter ble isolert og talt, før opp til 15×10^6 celler ble sentrifugert ved $500 \times g$ i 5 minutter ved $4^\circ C$. Medium ble sugd av og cellene ble vasket ved resuspending i 1ml FACS buffer (FB) (Dulbecco PBS med 1% BSA, filter-sterilisert). Cellene ble så tilsatt anti-laks IgM mAb (IgF-18) (Hedfors et al., 2012) ($2,5 \mu g/ml$) konjungert med Alexa 647 i 1 ml FB i 20 minutter ved $4^\circ C$ i mørket. Leukocytene ble vasket to ganger før *viability dye* FVD450 ($1 \mu l/ml$; eBioscience) fortynnet i FB ble tilsatt, og cellene ble videre inkubert i 20 minutter i $4^\circ C$ i mørket.

Leukocytene ble vasket to gang og resuspendert i 1ml FB. Sortering ble gjort med BD FACS Aria III flow cytometer (BD Biosciences). Cellene ble først sortert ved FSC-A og SSC-A som sorterer cellene basert på størrelse og kompleksitet. Deretter ble døde celler sortert ut (FSC-A og FVD780⁺) før dubletter (FSC-A og FSC-H) ble ekskludert. Videre ble lymfocytter sortert ut for videre analyse. Alexa 647 positive celler, altså celler som uttrykker overflate IgM ble sortert ut fra lymfocyttopulasjonen og samlet i iskaldt kulturmedium. Sorteringsstrategien er vist i figur 13.



Figur 13: Strategi for sortering av IgM⁺ B-celler. Første sortering FSC-A og SSC-A sorterer ut for store celler og granulocytter. Andre sortering FSC-A og V450-A sorterer ut døde celler. Tredje sortering FSC-A og FSC-H ekskluderer dubletter og siste sortering FSC-A og APC-A sorterer ut IgM⁺ celler.

Sorterte IgM⁺ B-celler ble spunnet ned og videre løst opp i L15+ til en konsentrasjon på 2,5 millioner celler/ml. Videre ble B-cellene sådd ut i en ELISpot-plate, coatet med anti-IgM, i en fortynningsrekke. 25 000 leukocytter i første brønn, 12 500 i neste brønn, 6250 celler i neste, og i siste ble det tilsatt 3125 sorterte leukocytter. B-cellene ble så stimulert med 50µg/ml LPS, eller holdt som kontroller og kun tilsatt L15+. Videre ble protokollen for kvantitering av ASC ved ELISpot (kapittel 2.3) fulgt.

2.6 Databehandling

Data fra samtlige analyser ble analysert ved Microsoft Excel. Alle statistiske analyser ble utført i GraphPad Prism 9 ved bruk av ikke parametriske Kurskal-Wallis test, og påfølgende Dunn's post hoc test. P-verdier <0,05 ble vurdert signifikante og er angitt i grafer med *.

Kalkulering av fold-ændring og relativt genuttrykk for Ct-verdiene fra qPCR-analyser ble gjort i Excel. $2^{-\Delta\Delta C_t}$ metoden (Pfaffl, 2001) ble benyttet for å kalkulere fold-ændring i genuttrykk. Metoden relaterer den stimulerede gruppen opp mot kontroll-gruppen og normaliserer det mot referansegnet. Ligningen for kalkuleringen av fold-uttrykk etter Pfaffls metode er vist i ligning 2. $E_{målgen}$ og E_{ref} representerer effektivitet av målgenet og effektivitet av referansegnet, respektivt. ΔC_p representerer differansen mellom gjennomsnittlig Ct-verdi for stimulerede og ustimulerede celler.

$$Fold\ endring = \frac{(E_{målgen})^{\Delta C_p\ målgen(kontroll-prøve)}}{(E_{ref})^{\Delta C_p\ Ref(kontroll-prøve)}} \quad (\text{Ligning 2})$$

Kalkulering av relativt uttrykk av genuttrykket ble gjort ved bruk av $2^{-\Delta C_t}$ -metoden (Schmittgen et al., 2008). Hver Ct-verdi blir da normalisert mot referansegnet, men blir ikke sammenlignet mot kontroll-prøven. Metoden krever heller ikke at man beregner primer-effektivitet, da den antar 100% effektivitet. Ligning for kalkulering av relativt uttrykk er vist i ligning 3. Gj.snitt $Ct_{målgen}$ og Gj.snitt Ct_{ref} representerer gjennomsnittlig Ct-verdi for målgenet og gjennomsnittlig Ct-verdi for referansegnet, respektivt.

$$Relativt\ uttrykk = 2^{-(Gj.snitt\ Ct_{målgen} - Gj.snitt\ Ct_{ref})} \quad (\text{Ligning 3})$$

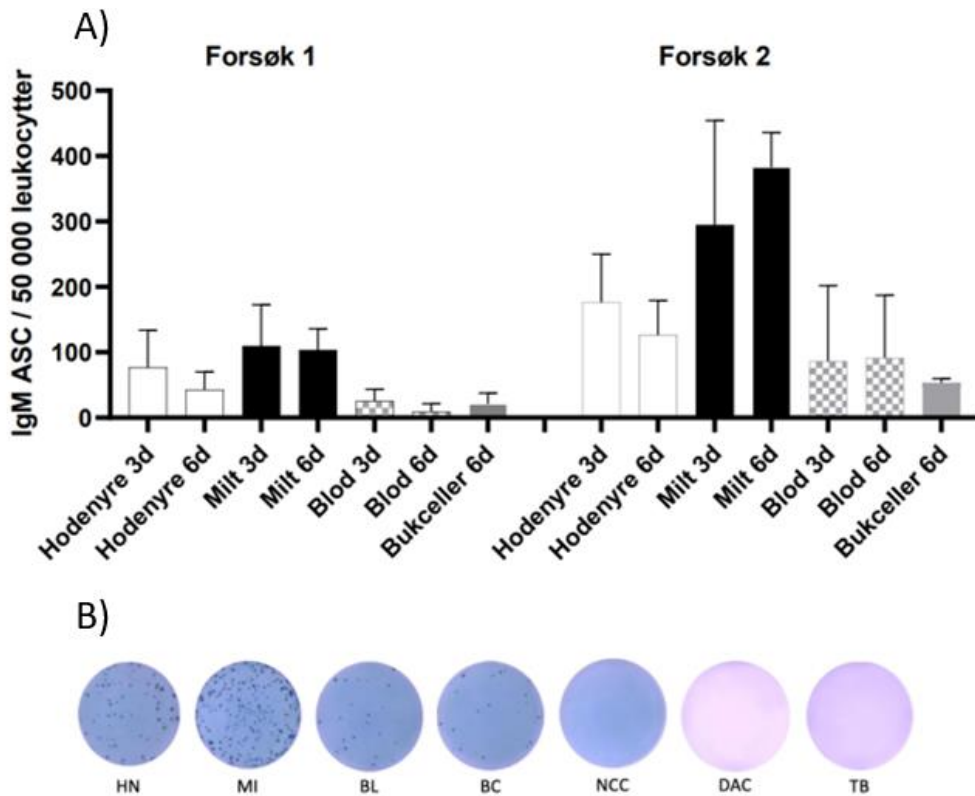
3 Resultater

3.1 Effekten av stimulering med LPS og TLR-ligander på andelen IgM-ASC

TLR-ligander er blitt foreslått som lovende adjuvanser i virusvaksiner til fisk grunnet deres evne til å modulere immunresponser (Tafalla et al., 2013). Det er blitt gjort en rekke studier *in vivo* som viser at TLR-ligander som CpG og poly I:C induserer beskyttende antivirale responser hos laks (Jørgensen et al., 2003; Strandskog et al., 2011; Thim et al., 2014). I våre studier ønsket vi derfor å teste effekten av stimuleringer med immunmodulatorene CpG, LPS, imiquimod og poly I:C på leukocyttopulasjoner fra hodenyre, milt, blod og bukhule hos laks. Vi forsøkte å kartlegge om disse ligandene stimulerte B-celler i nevnte leukocyttopulasjoner til å differensiere (enten direkte eller indirekte) til antistoff-sekreserende celler (ASC). For å kvantitere andelen IgM-ASC ble det satt opp ELISpot-forsøk (kapittel 2.3).

3.1.1 Basalnivå av ASC

Fra tidligere er det kjent at frisk, uvaksinert laks har IgM-ASC i lymfoid vev og i bukhule, og at andelen av disse varierer mellom vevene (Jenberie et al., 2020). For å få en oversikt over basalnivået av ASC i forsøksfisken, og for å bedre kunne se om andelen ASC varierte mye mellom individene ble det satt opp en figur (figur 14) som sammenlignet kontrollene fra begge ELISpot-forsøkene (figur 15 og 18).



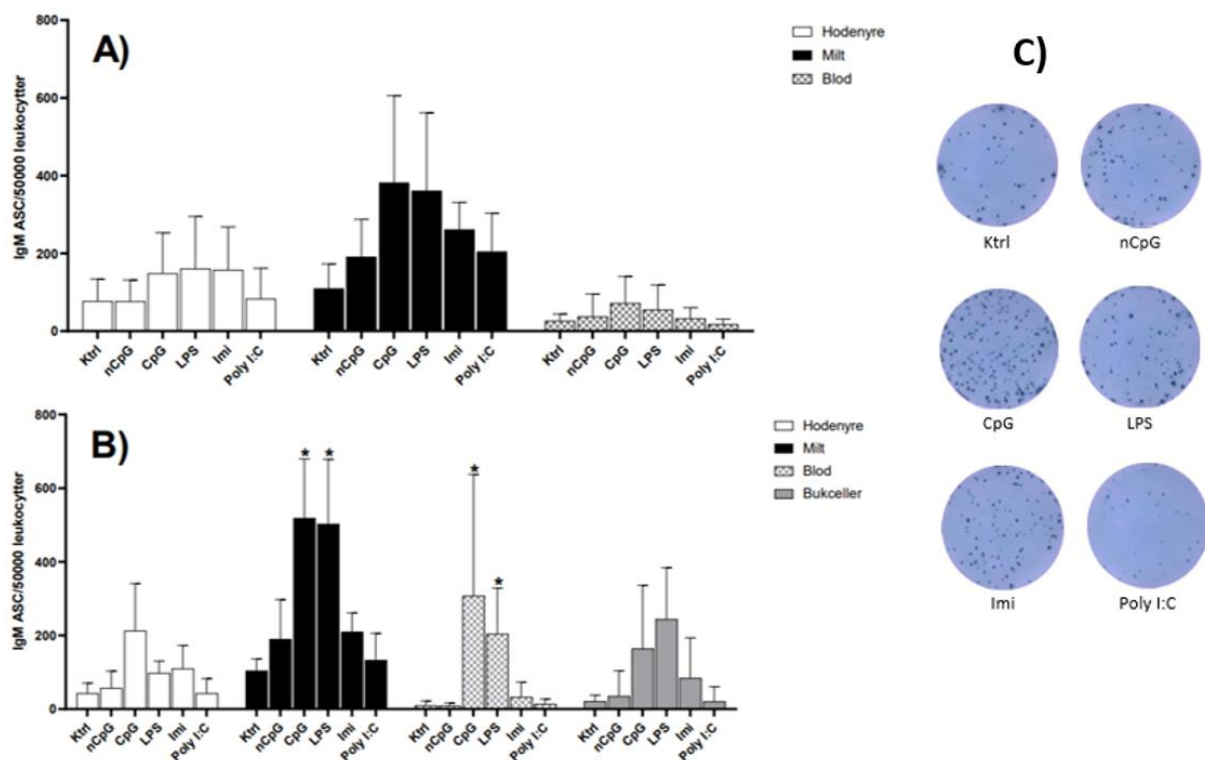
Figur 14: Basalnivå av ASC i leukocyttopulasjonene fra hodenyre, milt, blod og bukhole fra frisk, uvaksinert laks. A) viser en grafisk fremstilling av kontrollprøvene fra de to ELISpot-forsøkene representert i figur 15 og 18. (n=4 for både forsøk 1 og 2) B) Digitale ELISpot-avlesninger av brønner fra hodenyre (HN), milt (MI), blod (BL) og bukceller (BC) for kontrollprøvene fra forsøket representert i figur 15 B). NCC= kontroll uten tilsatt celler, DAC= kontroll uten tilsatt deteksjonsantistoff, TB=tom brønn.

Resultatene (figur 14) viser at andelen IgM-ASC i leukocyttopulasjonen var høyere fra samtlige organer i forsøk 2 (figur 18) sammenlignet med forsøk 1 (figur 15). Figuren viser også at det stort sett var færre IgM-ASC for celler inkubert i seks dager kontra tre dager. Dette gjelder for samtlige organer bortsett fra milt og blod i forsøk 2. I begge forsøkene var det størst andel ASC i milt, noe lavere i hodenyre og lavest i blod.

I forsøk 1, ved dag 3, var 0,15% av leukocyttopulasjonen fra hodenyre IgM-ASC, mens i forsøk 2 var 0,35% av populasjonen ASC i nevnte vev. For leukocytterne fra milt var denne forskjellen enda større der vi i forsøk 1 så at 0,2% av leukocytterne var IgM-ASC etter tre dagers inkubering, mens det i forsøk 2 var 0,6% IgM-ASC i leukocyttopulasjonen. Andelen ASC i populasjonen fra blod for begge forsøkene var hhv. 0,05% og 0,2% etter tre dagers inkubering. For bukhole var 0,04% av leukocytterne i det første forsøket, og 0,1% av leukocytterne i det andre forsøket, IgM-ASC.

3.1.2 Innledende IgM-ELISpot forsøk (forsøk 1)

For å undersøke om andelen ASC i leukocyttopulasjoner fra Hodenyre, milt, blod og bukceller blir påvirket av stimulering med TLR-ligander ble det gjort et innledende stimuleringsforsøk på leukocytter fra laks. Konsentrasjonen som ble benyttet av de ulike stimulantene er basert på tidligere forsøk gjennomført av forskingsgruppen (Jenberie et al., 2018; Thim et al., 2014). Leukocytterne ble stimulert etter metode beskrevet i kapittel 2.5.1, og ELISpot-platen ble farget og avlest som beskrevet i kapittel 2.3.



Figur 15: Effekten av stimulering med ulike TLR-ligander på andelen IgM-ASC i leukocyttopulasjonen fra Hodenyre, milt, blod og bukceller fra frisk, uvaksinert laks. Leukocytter ble isolert og sådd ut i 96-brønnersbrett (1 million leukocytter/brønn) og stimulert med nCpG (2 μ M), CpG (2 μ M), LPS (50 μ g/ml), imiquimod (5 μ g/ml) og poly I:C (10 μ g/ml) i tre (A), og seks dager (B) ved 15°C. Ustimulerte leukocytter ble inkludert som kontroll (Ktrl). Leukocytterne ble høstet og sådd ut i en ELISpot-plate (50 000 leukocytter/brønn) som ble farget og avlest som beskrevet i kapittel 2.3. Søylen viser gjennomsnittsverdier av andel ASC \pm standardavvik (n=4 foruten Hodenyre der n=3 i figur 15A, og bukceller der n=3 for CpG og imiquimod, og n=1 for poly I:C og nCpG i figur 15B) C) Et utvalg digitalt avleste ELISpot-brønner for hver av stimulantene (seks dager stimulering). Hver prikk representerer én IgM-ASC. Signifikansnivået er satt til 0,05 der P<0,05 tilsvarende (*).

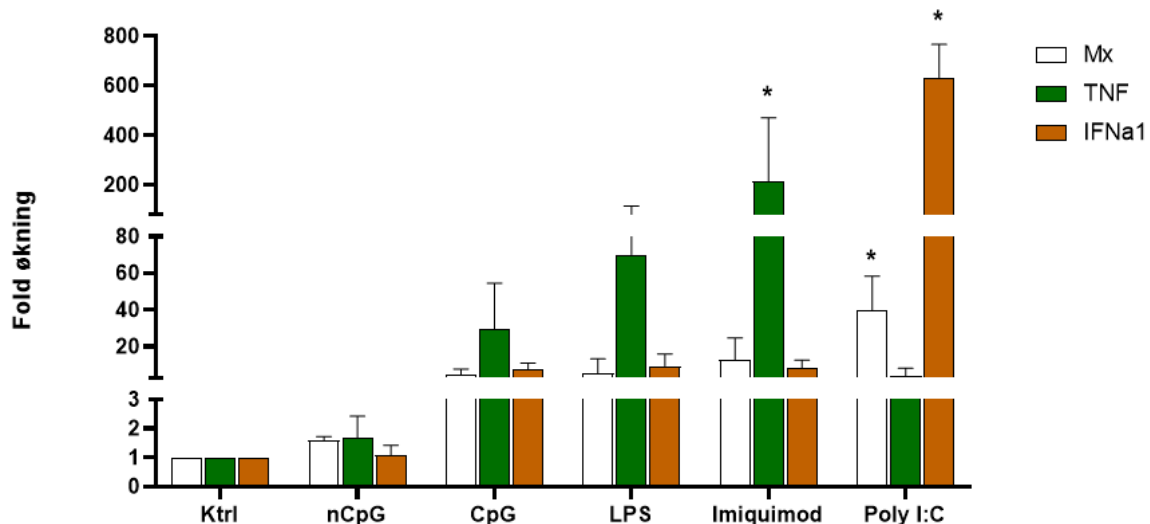
Figur 15 viser effekten av stimulering med LPS og ulike TLR-ligander på andelen ASC, analysert med IgM-ELISpot. Etter tre dager stimulering (figur 15A) var det ingen signifikante økninger i andelen ASC for noen av stimulantene. For leukocytter fra hodenyre og milt stimulert med CpG og LPS var det en beskjeden økning i andelen ASC. Leukocytterne fra blod viste tilnærmet ingen økning i andelen IgM-ASC etter tre dager stimulering, mens etter seks dager var andelen IgM-ASC for leukocytter stimulert med LPS og CpG økt betraktelig. Denne forskjellen fra tre til seks dager stimulering var ikke like fremtredende for leukocytter fra milt og hodenyre.

Resultatene etter seks dager stimulering (figur 15B) viser en signifikant økning i andelen ASC i milt og blod etter stimulering med LPS og CpG, sammenlignet med ustimulert kontroll. For leukocytter fra milt, dag seks, var det en fem ganger økning i antallet ASC hos leukocytter stimulert med LPS og CpG sammenlignet med ustimulert kontroll. For leukocytter fra blod derimot var det 33 ganger så mange IgM-ASC i populasjonen stimulert med CpG sammenlignet med ustimulert kontroll, og en økning på 22 ganger for LPS-stimulerte leukocytter.

For bukceller så vi en økning på 12 ganger i andelen IgM-ASC etter seks dager stimulering med LPS, og 8 ganger økning for leukocytter stimulert med CpG. Disse verdiene var imidlertid ikke signifikant forskjellig fra ustimulert kontroll. Bukhule-leukocytter stimulert med imiquimod og poly I:C i seks dager viste heller ingen signifikant økning i andelen ASC. nCpG som ble inkludert som negativ kontroll for CpG lå på omtrent samme nivå som ustimulert kontroll, for samtlige organer etter tre og seks dager stimulering, noe som viste at effekten vi så for CpG skyldtes CpG-motivet.

qPCR analyse av stimulerte leukocytter

Det ble gjennomført en qPCR analyse som en kontroll på om stimuleringen av leukocytterne hadde fungert. Genuttrykk av Mx, IFN α 1 og TNF α ble undersøkt og brukt som markører for stimulering av cellene. Det ble brukt leukocytter fra hodenyre fra samme forsøksfisk som ble brukt under innledende ELISpot-forsøk. Hvordan leukocytterne ble stimulert er beskrevet i kapittel 2.5.1, og hvordan qPCR-analysen ble gjennomført er beskrevet i kapittel 2.4.



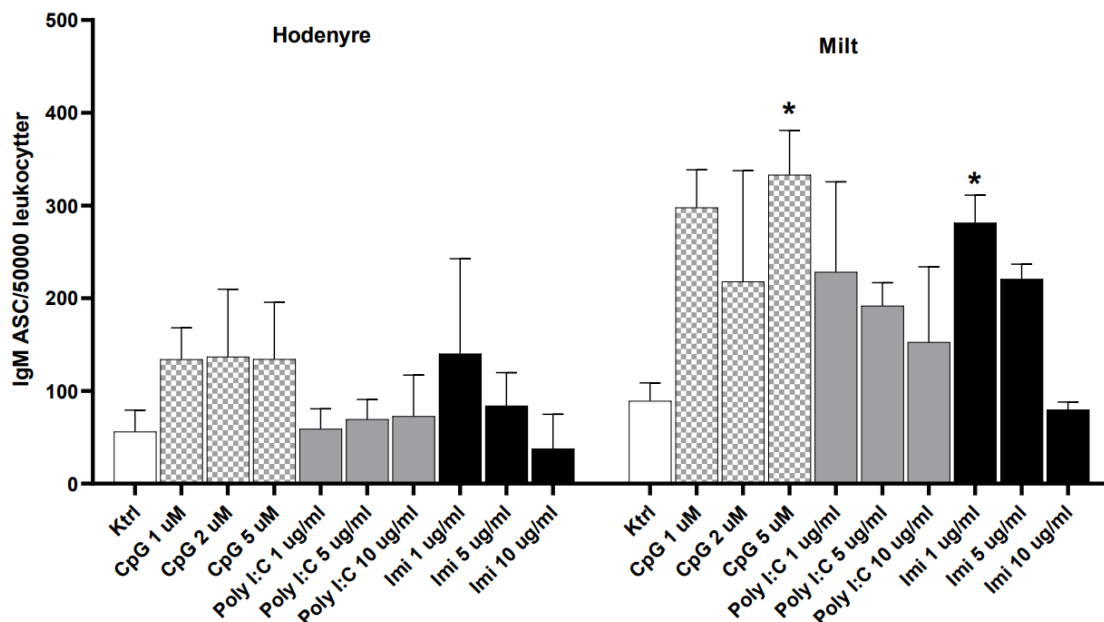
Figur 16: Fold endring i genuttrykket av Mx, TNF α og IFN α 1 i leukocytter fra hodenyre til frisk, uvaksinert laks. Som en kontroll til ELISpot forsøk 1 ble deler av leukocyttopopulasjonen fra hodenyre sådd ut i et 24-brønners brett (2,5 millioner leukocytter/brønn) og stimulert med nCpG (2 μ M), CpG (2 μ M), LPS (50 μ g/ml) imiquimod (5 μ g/ml) og poly I:C (10 μ g/ml), ustimulerte leukocytter ble inkludert som kontroll (Ktrl). Leukocytterne ble stimulert i 24 timer ved 15°C for deretter høsting til RNA isolering og videre qPCR analyse. qPCR ble kjørt for genene: ELFa1, Mx, TNF α og IFN α 1. Resultatene er presentert som fold økning og er sammenlignet med ubehandlet kontroll. (n=4). Signifikansnivået er satt til 0,05 der P<0,05 tilsvarer (*).

qPCR-analyse av leukocytter stimulert med CpG, LPS, imiquimod og poly I:C (figur 16) viste at LPS og de ulike TLR-ligandene stimulerte leukocytterne til en økning av markørgenene, og at graden av økning varierte mellom stimulantene. Leukocytter stimulert med poly I:C viste en signifikant økning i uttrykket for IFN α 1 og Mx sammenlignet med ustimulert kontroll. Leukocytter stimulert med imiquimod viste derimot en signifikant oppregulering av transkripter for TNF α , sammenlignet med ustimulerte kontroll-leukocytter. Videre viste resultatene at LPS og CpG stimulerte leukocytterne fra hodenyre til å uttrykke økte nivåer av både Mx, TNF α og IFN α 1, hvor TNF α transkripter ble høyest induert, men disse nivåene var ikke signifikant forskjellig fra ustimulert kontroll. Totalt viste qPCR resultatene at stimuleringen av leukocytterne hadde fungert. Stimulering med nCpG gav ingen økning i genuttrykket for verken TNF α , IFN α 1 eller Mx.

3.1.3 Optimal konsentrasjon av TLR-ligander

Etter det innledende ELISpot-forsøket ønsket vi å teste konsentrasjonseffekten av CpG, imiquimod og poly I:C på nivået av ASC. På den måten kunne vi undersøke om lav, eller totalt fravær av respons i det innledende ELISpot-forsøket skyldes sub-optimal konsentrasjon av stimulantløsningene. Ved for høye konsentrasjoner kan for eksempel effekten av de ulike TLR-ligandene bli toksiske for leukocytene.

Leukocytter fra hodenyre og milt ble sådd ut og stimulert med CpG, imiquimod og poly I:C i tre forskjellige konsentrasjoner; CpG: 1 μ M, 2 μ M og 5 μ M, imiquimod og poly I:C: 1 μ g/ml, 5 μ g/ml og 10 μ g/ml (kapittel 2.5.2). Etter 3 dager ble leukocytene overført til en ELISpot-plate og avlest som beskrevet i kapittel 2.3.



Figur 17: Effekt av ulike konsentrasjoner av TLR-ligander på andelen ASC i leukocytter fra hodenyre og milt fra frisk, uvaksinert laks. Leukocytter fra hodenyre og milt i 96-brønnersbrett (1 million leukocytter/brønn) ble stimulert i tre dager med ulike konsentrasjoner av CpG (1 μ M, 2 μ M og 5 μ M), Poly I:C (1 μ g/ml, 5 μ g/ml og 10 μ g/ml) og imiquimod (1 μ g/ml, 5 μ g/ml og 10 μ g/ml), ustimulerte leukocytter ble inkludert som kontroll (Ktrl). Leukocytene ble så høstet og sådd ut i en ELISpot-plate (50 000 leukocytter/brønn) som ble farget og avlest som beskrevet i kapittel 2.3. Søylen viser gjennomsnittsverdier av andel ASC \pm standardavvik (n=3). Signifikansnivået er satt til 0,05 der P<0,05 tilsvarer (*).

Resultatene fra figur 17 viser at de ulike ligandene gav ulik respons. CpG stimulering av leukocytter fra hodenyre viste en bortimot lik andel ASC for alle konsentrasjonene som ble testet (omtrent 2,5 ganger høyere en kontroll). For milt var det derimot større variasjon, hvor

leukocytter stimulert med 2 μ M viste lavest andel ASC av de tre testede konsentrasjonene, mens CpG 5 μ M var den eneste konsentrasjonen som viste signifikant økning i andelen ASC sammenlignet med kontrollen. Konsentrasjonen av CpG (2 μ M) ble ikke justert etter konsentrasjonskurveforsøket, da stimulering med 2 μ M CpG har vist tilstrekkelig effekt i tidligere forsøk for celler fra milt, samt at endret konsentrasjon ikke påvirket hodenyreleukocytterne.

Både for leukocytter fra hodenyre og milt viste imiquimod mye bedre effekt ved de to laveste konsentrasjonene. For leukocytter fra hodenyre ble det observert en signifikant økning (3,2 ganger høyere enn kontroll) i andelen ASC etter stimulering med 1 μ g/ml imiquimod. Resultatene viste også at andelen ASC i leukocytterne fra hodenyre var høyest etter stimulering med 1 μ g/ml imiquimod, men det var ikke en statistisk signifikant økning sammenlignet med ustimulert kontroll.

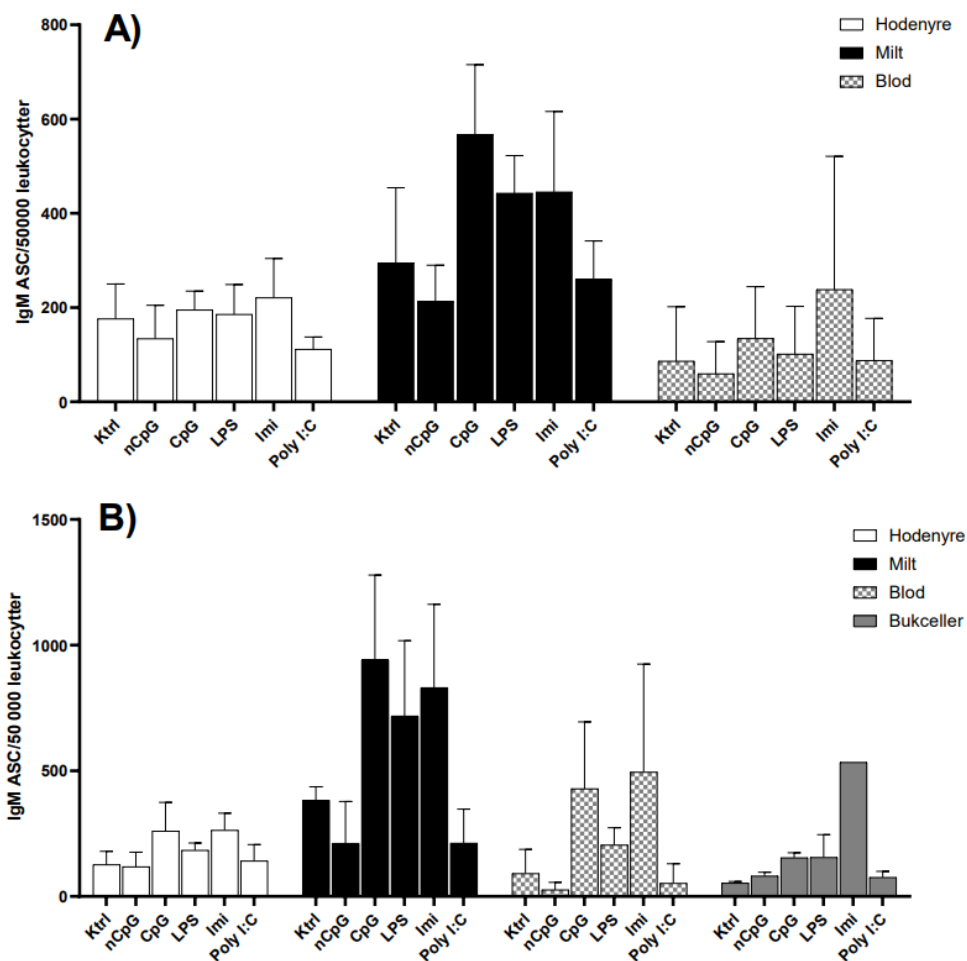
Både leukocytter fra hodenyre og milt viste en nedgang i andelen IgM-ASC etter stimulering med 10 μ g/ml imiquimod sammenlignet med ustimulert kontroll. Konsentrasjonen av imiquimod ble dermed nedjustert fra 5 μ g/ml til 1 μ g/ml etter dette forsøket.

Stimulering av leukocytter fra milt med poly I:C viste at økende konsentrasjoner gav en redusert andel ASC, mens i hodenyre gav endrede poly I:C konsentrasjoner omtrent ingen effekt. Andelen ASC økte mest for miltleukocytter stimulert med 1 μ g/ml poly I:C, men stimulering gav ingen signifikante økninger i andelen ASC ved noen av konsentrasjonene verken i milt eller hodenyre. Konsentrasjonen av poly I:C ble justert ned fra 10 μ g/ml til 1 μ g/ml etter dette forsøket.

3.1.4 IgM-ELISpot forsøk 2; imiquimod i lavere konsentrasjon stimulerte til økt andel ASC

Ut fra konsentrasjonskurveforsøket ble konsentrasjonene av poly I:C og imiquimod justert ned fra hhv. 10µg/ml og 5µg/ml til 1µg/ml. Det ble derfor satt opp et nytt IgM-ELISpot forsøk for kvantitering av ASC stimulert med de nye konsentrasjonene av ligandene, for å teste effekten av disse.

Leukocytter fra hodenyre, milt, blod og bukhole ble isolert, sådd ut og stimulert med de nye konsentrasjonene av stimulantene, etter metode beskrevet i kapittel 2.5.1. Cellene ble høstet etter tre og seks dager og overført til ELISpot-plate, som ble avlest etter ytterligere to dager, etter metode beskrevet i kapittel 2.3.



Figur 18: Effekten av stimulering med ulike TLR-ligander på andelen IgM-ASC i leukocytter fra hodenyre, milt, blod og bukhole fra frisk, uvaksinert laks. Leukocytter ble isolert og sådd ut i 96-brønnersbrett (1 million leukocytter/brønn) og stimulert med nCpG (2µM), CpG (2µM), LPS (50µg/ml), imiquimod (1µg/ml) og poly I:C (1µg/ml) i tre dager (A), og seks dager (B) ved 15°C. Ustimulerte leukocytter ble inkludert som kontroll (Ktrl). Leukocytene ble høstet og overført til en ELISpot-plate (50 000 leukocytter/brønn) som ble farget og avlest som beskrevet i kapittel 2.3. Søylen viser gjennomsnittsverdier av andel ASC ± standardavvik (n=4, foruten bukceller der n=2, foruten bukceller stimulert med imiquimod hvor n=1). Signifikansnivået er satt til 0,05 der P<0,05 tilsvarende (*).

Resultatene fra ELISpot forsøk 2 (figur 18) bekreftet i stor grad resultatene fra ELISpot forsøk 1 (figur 15) når det gjelder effekten av LPS- og CpG-stimulering på andelen ASC. I dette forsøket ble det derimot ikke påvist statistisk signifikante forskjeller sammenlignet med kontrollgruppen, for noen av behandlingene. Stimulering med CpG viste igjen størst effekt på andelen ASC i leukocyttopopulasjonen fra blod stimulert i seks dager. Stimulering med LPS gav størst økning i andelen ASC (tre ganger så mange ASC som ustimulert kontroll) for leukocytter fra bukhulen i dette forsøket, mens vi i det første ELISpot forsøket (figur 15) fant størst respons for LPS i blod (22 ganger så mange ASC som ustimulert kontroll).

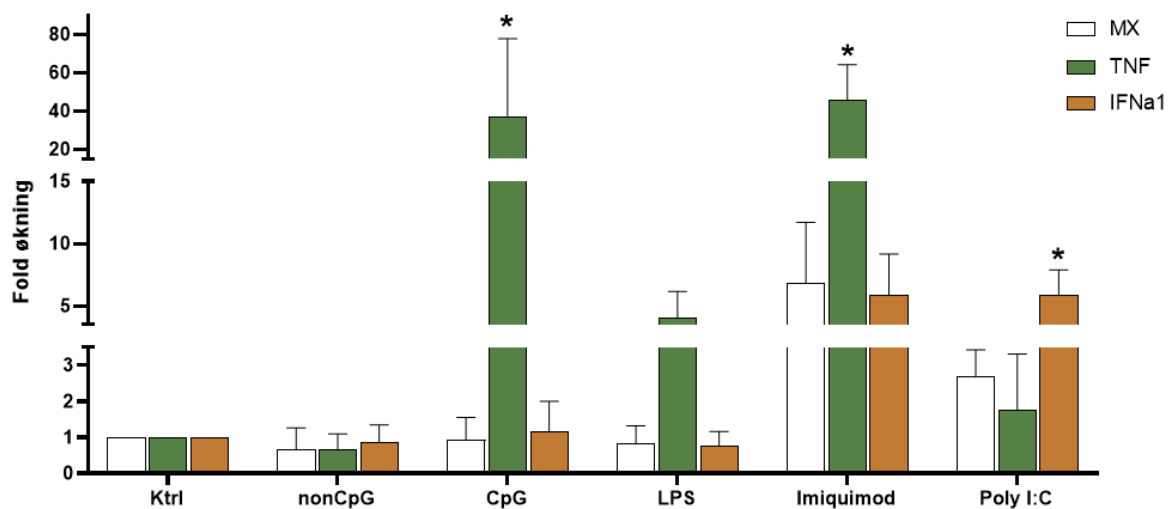
Resultatene viste at imiquimod (1µg/ml) stimulerte til høyere andel IgM-ASC i leukocyttopopulasjonene fra samtlige organer, sammenlignet med ustimulert kontroll. Under ELISpot forsøk 1, hvor konsentrasjonen av imiquimod var på 5µg/ml, viste leukocytterne fra bukhulen en fire ganger høyere andel IgM-ASC enn ustimulert kontroll. Dette var den største økningen av ASC etter imiquimod-stimulering sett blant alle organene/vevene. I ELISpot forsøk 2 (figur 18) derimot, så vi nesten en 10-folds økning i andelen IgM-ASC fra bukhule etter stimulering med imiquimod, men dette er usikre data siden kun én fisk ble undersøkt. For leukocytter fra blod stimulert i seks dager med imiquimod så vi over 5-folds økning av IgM-ASC i populasjonen, til sammenligning med det innledende forsøket hvor vi så tre ganger mer IgM-ASC i imiquimod-stimulerte blodleukocytter, sammenlignet med ustimulert kontroll. Andelen ASC var doblet sammenlignet med ustimulert kontroll for leukocyttopopulasjonen fra milt og hodenyre stimulert med imiquimod i seks dager.

Poly I:C stimulering (1µg/ml) gav ingen økt andel ASC i noen av leukocyttopopulasjonene sammenlignet med sine ustimulerte kontroller. Dette stemte ikke overens med forsøket hvor ulike konsentrasjoner av poly I:C ble testet (figur 17). Andelen ASC så ut til å være lavere for leukocytter fra hodenyre og blod stimulert i seks dager med poly I:C sammenlignet med ustimulert kontroll.

For både ELISpot forsøk 1 (figur 15) og ELISpot forsøk 2 (figur 18) så vi at alle stimulantene vi testet, for uten poly I:C, stimulerte til økt andel IgM-ASC. Leukocytter fra alle fire organene/vevene stimulert med poly I:C i både tre og seks dager viste enten nedjustert eller lik mengde ASC som ustimulert kontroll.

qPCR analyse for å undersøke effekt av stimulering

Også for ELISpot-forsøk 2 ble det kjørt en qPCR-analyse av leukocytene fra hodenyre, for å undersøke om stimuleringene hadde fungert. Genuttrykk av Mx, IFN α 1 og TNF α ble brukt som markører for stimulering av cellene. Leukocytene ble stimulert som beskrevet i kapittel 2.5.1, og qPCR analyse ble gjennomført som beskrevet i kapittel 2.4.



Figur 19: Fold endring i genuttrykket av Mx, TNF α og IFN α 1 for leukocytter fra hodenyre til frisk, uvaksinert laks. Som en kontroll for ELISpot forsøk 2 ble deler av leukocyttopulasjonen fra hodenyre sådd ut i et 24-brønners Brett (2,5 millioner leukocytter/brønn) og stimulert med nCpG (2 μ M), CpG (2 μ M), LPS (50 μ g/ml) Imiquimod (1 μ g/ml) og poly I:C (1 μ g/ml), ustimulerte leukocytter ble inkludert som kontroll (Ktrl). Leukocytene ble stimulert i 24 timer ved 15°C for deretter høsting til RNA isolering og videre qPCR analyse. qPCR ble kjørt for genene: ELFa1, Mx, TNF α og IFN α 1. Resultatene er presentert som fold økning og er sammenlignet med ubehandlet kontroll. (n=4). Signifikansnivået er satt til 0,05 der P<0,05 tilsvarer (*).

Resultatene i figur 19 viste at både CpG, LPS, imiquimod og poly I:C i de konsentrasjonene som ble undersøkt stimulerte leukocytene til forhøyet genuttrykk, men hvilke gener som ble stimulert varierte mellom de ulike stimulantene. For leukocytter stimulert med CpG og imiquimod så vi en signifikant økning i TNF α -transkripter. For LPS og poly I:C-stimulerte leukocytter var uttrykket av TNF α også høyere enn ustimulert kontroll, men denne økningen var ikke signifikant.

Genuttrykk av Mx og IFN α 1 ble kun induisert ved stimulering med imiquimod og poly I:C. Transkripter av IFN α 1 var signifikant høyere for poly I:C stimulerte leukocytter, sammenlignet med ustimulert kontroll. Like høyt uttrykk av IFN α 1 så vi også hos imiquimod-

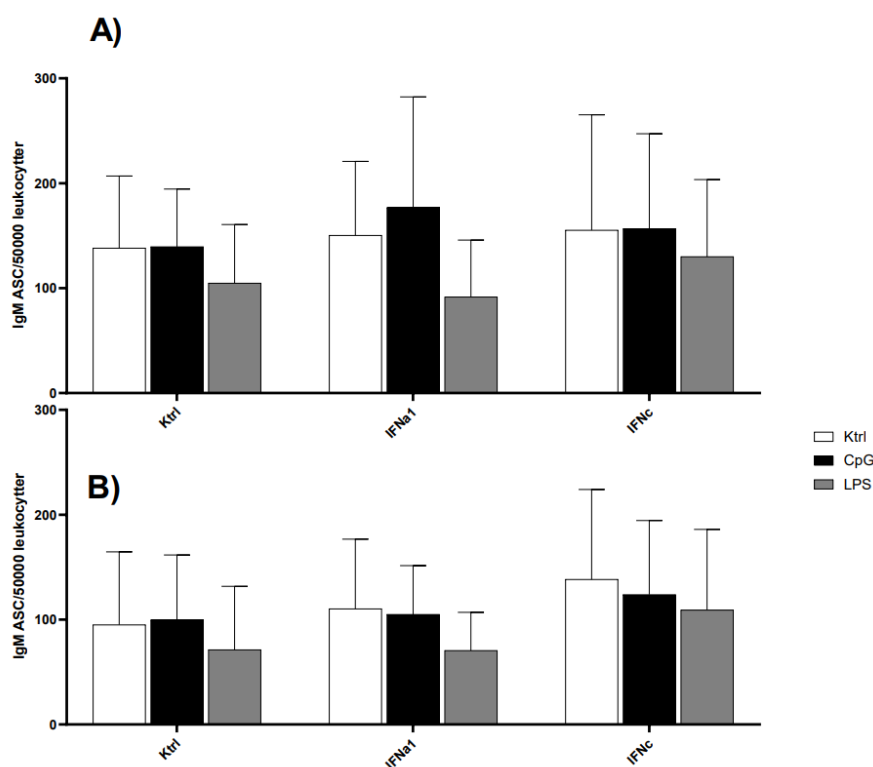
stimulerte leukocytter, men der var imidlertid standardavviket høyere så verdien var ikke signifikant. Genuttrykket av Mx ble mest oppregulert for leukocytterne stimulert med imiquimod, men også stimulering med poly I:C økte genuttrykket for Mx sammenlignet med ustimulert kontroll.

Stimulering med nCpG gav ingen økning i genuttrykket for verken TNF α , IFN α 1 eller Mx.

3.2 Effekt av stimulering med IFNer på andelen ASC i leukocyttopulasjon fra milt

Gjennom å stimulere leukocytter med ulike type I IFNer kunne vi ved ELISpot-målinger undersøke om IFNene stimulerte B-celler i leukocyttopulasjonen til å differensiere til IgM-ASC. I tillegg til IFN stimulering alene, ble leukocytterne også stimulert med type I IFN med påfølgende LPS og CpG stimulering. Vi kunne dermed få et innblikk i hvorvidt forbehandling med type I IFN påvirker modning av B-celler til ASC på en annen måte en type I IFN alene gjør.

Leukocytter fra milt ble forbehandlet med IFNer, før påfølgende stimulering med LPS og CpG, hvor noen leukocytter kun ble behandlet med IFNer, andre kun med LPS og CpG, mens noen leukocytter ble beholdt som ustimulerte kontroller. Metoden for stimulering er beskrevet i kapittel 2.5.3. Antallet ASC ble kvantitert ved ELISpot som beskrevet i kapittel 2.3.



Figur 20: Effekten av stimulering med type I IFNer på andelen IgM ASC i leukocytyter fra milt fra frisk, uvaksinert laks. Leukocytyter ble isolert og sådd ut i 96-brønnersbrett (1 million leukocytyter/brønn) og stimulert med IFN α 1 (1000 enheter/ml) og IFN γ c (1000 enheter/ml) i tre dager. Kontroller med celler kun tilsatt medium ble inkludert (Ktrl). Leukocytytene ble høstet og overført til en ELISpot-plate (50 000 leukocytyter/brønn) i duplikater. Utvalgte brønner ble så tilsatt CpG (2 μ M) eller LPS (50 μ g/ml) eller beholdt som ustimulerte kontroller etter oppsett vist i figur 12. Etter tre (A) og seks (B) dager ble ELISpot-platene fremkalt som beskrevet i kapittel 2.3. Søylen viser gjennomsnittsverdier av antall ASC \pm standardavvik. Signifikansnivået er satt til 0,05 der $P < 0,05$ tilsvare (*).

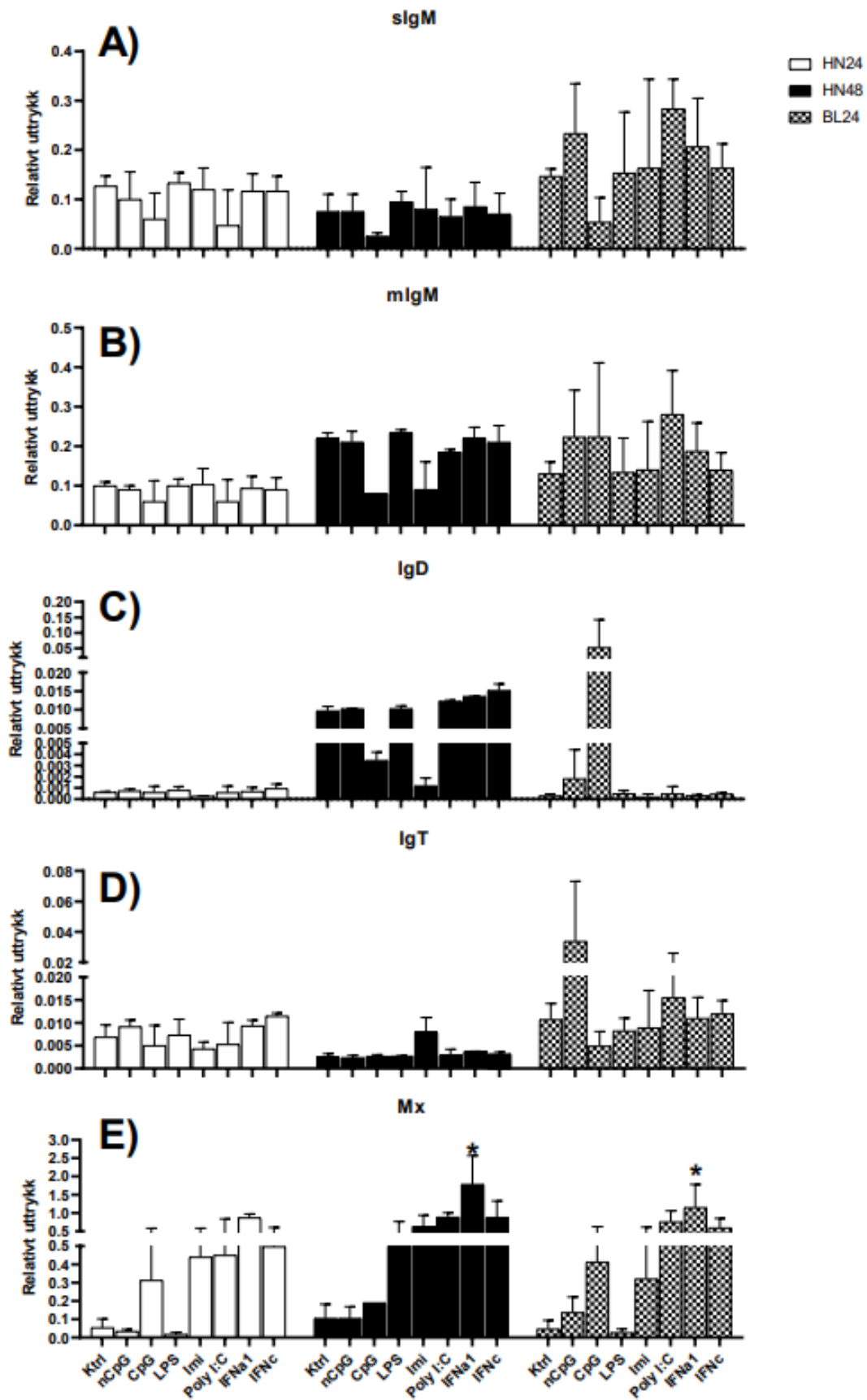
Resultatene (figur 20) viste at verken stimulering med IFN α eller IFN γ c alene, eller pre-stimulering med IFN α eller IFN γ c for påfølgende LPS eller CpG-stimulering medførte en signifikant økning i andelen IgM ASC, sammenlignet med kontrollcellene som ikke ble stimulert.

Stimulering med LPS og CpG alene skulle fungere som positive kontroller i dette forsøket basert på resultatene fra de tidligere ELISpot-forsøkene (figur 15 og 18), men stimuleringen med disse, ved begge tidspunktene, gav ikke noen økning i andelen IgM-ASC. Ut fra resultatene ser det ut til at LPS-stimulering reduserte andelen IgM-ASC i leukocytyttopulasjonen, sammenlignet med ustimulert kontroll.

3.3 Måling av Ig-transkripter fra stimulerte leukocyttopulasjoner

Fra ELISpot-forsøkene (figur 15 og 18) førte LPS, CpG og imiquimod stimuleringer til økt andel IgM-ASC i leukocyttopulasjonene. Som en oppfølging ønsket vi å undersøke om B-celler viste økte nivåer av andre immunoglobuliner enn IgM, og samtidig undersøke om økt sekresjon av IgM antistoffer målt ved ELISpot korrelerte med økte nivåer av IgM transkripter. Dette ble gjort ved å kjøre en qPCR-analyse for genene sIgM (sekret IgM), mIgM (membranbundet IgM), IgD og IgT. Mx-uttrykk ble inkludert som positiv kontroll i dette forsøket.

Leukocytter fra hodenyre, milt og blod fra laks ble stimulert etter metode beskrevet i kapittel 2.5.4. RNA ble isolert og cDNA syntetisert, før qPCR analyse ble kjørt som beskrevet i kapittel 2.4. Resultatene for leukocytter fra milt er ekskludert da det ble oppdaget feil med Revers-Transkriptase kitet fra QIAGEN (nærmere beskrevet i kapittel 4.5.1) og cDNA syntesen dermed ikke gikk som den skulle. qPCR resultatene av blodleukocytterne stimulert i 48 timer ble ekskludert fra denne figuren grunnet usannsynlig høye verdier av ELFa1-transkript, men resultatene kan ses i appendiks III. Gjennomsnittlige Ct-verdier fra samtlige genuttrykk i leukocytter fra hodenyre og blod er presentert i appendiks IV.



Figur 21 (side 60): Relativt genuttrykk av sIgM (A), mIgM (B), IgD (C) IgT (D) og Mx (E) i leukocytter fra hodenyre (HN) og blod (BL) fra frisk, uvaksinert laks. Leukocytter ble isolert og sådd ut i 48 brønners brett (2,5 millioner leukocytter/brønn) og stimulert med nCpG (2 μ M), CpG (2 μ M), LPS (50 μ l/ml), imiquimod (1 μ g/ml), poly I:C (1 μ g/ml), IFN α 1 (1000 enheter/ml) og IFN γ (1000 enheter/ml), ustimulerte leukocytter ble inkludert som kontroll (Ktrl). Leukocytene ble stimulert i 24 og 48 timer ved 15°C for deretter høsting til RNA isolering og videre qPCR analyse. qPCR ble kjørt for genene ELFa1 sIgM, mIgM, IgD, IgT og Mx. (n=3 for HN24 og BL24, n=2 for HN48). Signifikansnivået er satt til 0,05 der P<0,05 tilsvarer (*).

I figur 21 viser de ustimulerte kontrollcellene basalnivået av de ulike Ig-genene i leukocyttopulasjonene. Både mIgM og sIgM var uttrykt i leukocytene fra hodenyre og blod, og de hadde et ganske likt uttrykksnivå. B-cellene fra hodenyre som ble inkubert i 48 timer (HN48) viste høyere uttrykk av mIgM enn B-cellene fra hodenyre inkubert i 24 timer (HN24), og B-cellene fra blod (BL24). Basalnivået av IgD og IgT var generelt mye lavere enn basalnivået av mIgM og sIgM i samtlige leukocyttopulasjoner før stimulering. B-cellene fra HN48 uttrykte 34 og 16 ganger mer IgD enn B-cellene fra hhv. HN24 og BL24.

Generelt var det små, ikke signifikante endringer i genuttrykket for alle Ig-ene for begge organene. Heller ikke de ulike stimuleringene viste å stimulere til signifikante endringer i transkripter. Figur 21A) og 21B) viser for HN24 at nivået av sIgM og mIgM transkripter ble lite påvirket av stimuleringene. Etter 48 timer stimulering av hodenyreleukocytter så vi at uttrykket av sIgM og mIgM var lavere hos de CpG-stimulerte cellene (hhv. 3x og 2,75x lavere) enn ustimulerte kontrollceller. Transkripter for mIgM ble også nedjustert for HN48 stimulert med imiquimod (2,75x lavere enn ustimulert kontroll). Leukocytene fra blod viste generelt litt høyere uttrykk av både sIgM og mIgM sammenlignet med hodenyreleukocytene. For BL24 stimulert med CpG var uttrykket av sIgM nedregulert sammenlignet med ustimulert kontroll (2,8x lavere). For nevnte leukocyttopulasjon så det derimot ut til at CpG, poly I:C og IFN α 1 stimulerte til økt genuttrykk av mIgM, hvor Poly I:C stimulerte til en dobling i genuttrykket, sammenlignet med ustimulert kontroll.

Uttrykket av IgD og IgT var generelt mye lavere i samtlige prøver sammenlignet med både sekret og membranbundet IgM. For IgD (figur 21C) skiller resultatene for BL24 stimulert med CpG seg ut, der genuttrykket for IgD var 166 ganger høyere enn hva det var for den ustimulerte kontrollen. Økningen var likevel ikke statistisk signifikant, noe som viser at det var store standardavvik i datasettet. Leukocytene fra HN48 viste høyere basalnivå av IgD, enn BL24 og HN24, men ingen av stimulantene påvirket til en økning i uttrykket av IgD for HN48 i noen særlig grad sammenlignet med kontrollgruppen. HN48 stimulert med imiquimod uttrykte 8x lavere nivå av IgD enn ustimulert kontroll. For HN24 uttrykte B-

cellene lavere nivå av IgD-transkripter sammenlignet med de andre organene, uavhengig av stimulering.

I figur 21D) ser vi uttrykket av IgT. Fra resultatene ser det ut til at dette immunoglobulinet var litt høyere uttrykt enn IgD i leukocytter fra både blod og hodenyre. HN24 viste høyere basalnivå av IgT enn HN48. HN48 stimulert med imiquimod viste 4x høyere genuttrykk av IgT, enn ustimulert kontroll. Resten av stimulantene påvirket ikke genuttrykket av IgT for HN48 i noen særlig grad. For leukocytter fra blod stimulert i 24 timer med CpG var genuttrykket for IgT halvert, mens resten av stimulantene viste lite stimulerende effekt.

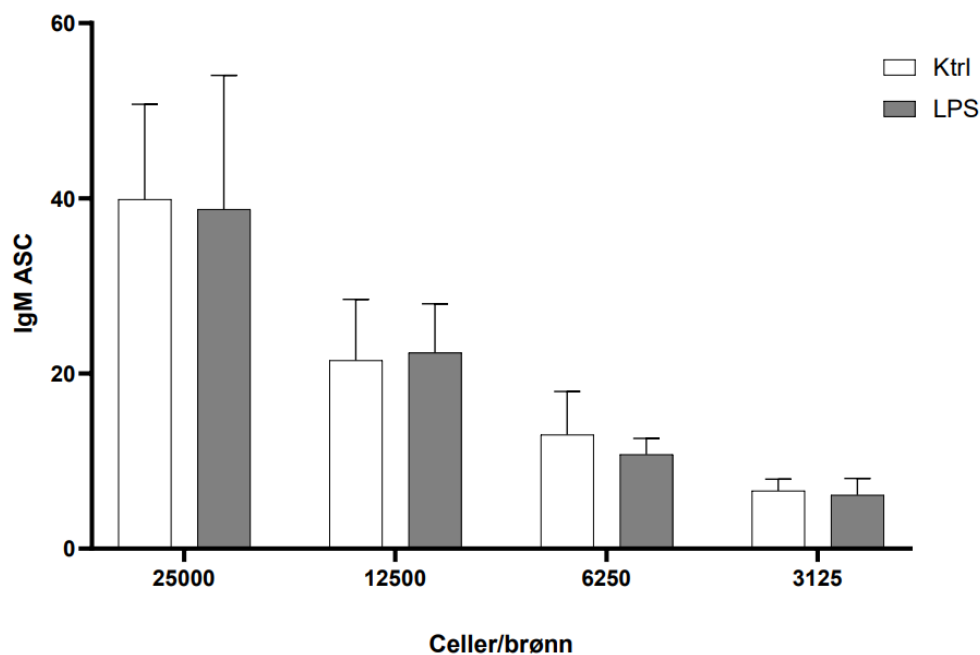
Stimulering med nCpG så ut til å påvirke blodleukocytene til høyere genuttrykk for samtlige Ig-er. For hodenyre leukocytter viste nCpG ingen stimulerende effekt.

Mx ble tatt med i qPCR analysen som kontroll for å se om de ulike stimulantene hadde fungert (figur 21E). Stimulering med IFN α 1 induserte signifikant økning for genuttrykket av Mx for HN48, og BL24, sammenlignet med ustimulert kontroll. IFN α 1 induserte også økt genuttrykk av Mx for HN24, men uttrykket var ikke signifikant høyere enn ustimulert kontroll. Det ble også sett en økning i Mx-transkripter for leukocytter stimulert med CpG, imiquimod, poly I:C og IFN γ for både blod og hodenyre, men ingen signifikante forskjeller fra ustimulert kontroll ble registrert. LPS stimulerte hodenyreleukocytter til økt genuttrykk av Mx etter 48, sammenlignet med ustimulert kontroll. Resultatene viste altså at de ulike stimuleringene hadde virket. Genuttrykket av Mx ble ikke oppregulert som følge av stimulering med nCpG.

3.4 Direkte effekt av TLR-ligander på IgM⁺ B-celler

For å kunne studere om LPS og de ulike TLR-ligandene hadde en direkte aktiverende effekt på B-celler, ble IgM⁺ B-celler sortert ut fra resten av leukocyttpopulasjonen, slik at disse kunne stimuleres direkte. Dette var et innledende forsøk for å bestemme hvor mange sorterte IgM⁺ B-celler vi kunne så ut i en brønn, da det var risiko for at for mange celler ville gi et såpass høyt antall prikker at CTL-programvaren ikke klarte å registrere antallet. B-cellene ble også stimulert med LPS da dette har vist å være en av de mest potente stimulantene under ELISpot-forsøkene (figur 15 og 18), og vi forventet å se en tydelig økning i andelen ASC ved stimulering.

Leukocyttter fra milt fra laks ble isolert og sortert ved FACS som beskrevet i kapittel 2.5.5. Sorterte IgM⁺ B-celler ble sådd ut i duplikat i ulike konsentrasjoner; 25 000, 12 500, 6250 og 3125 B-celler/brønn. Cellene ble stimulert med 50µg/ml LPS i tre dager direkte i ELISpot-platen, ustimulerte kontroller for hver av konsentrasjonene ble også inkludert, før platen ble farget og avlest etter metode beskrevet i kapittel 2.3.



Figur 22: Andel ASC i ustimulerte og LPS-stimulerte IgM⁺ B-celler fra milt fra frisk, uvaksinert laks. Sorterte B-celler ble sådd ut i duplikat i ulike konsentrasjoner; 25000, 12500, 6250 og 3125 celler/brønn, i en ELISpot-plate. Videre ble B-cellene stimulert med LPS (50µg/ml) eller holdt som ustimulert kontroll (Ktrl) i tre dager før ELISpot-platen ble videre fremkalt som beskrevet i material og metode (kapittel 2.3). Søylen viser gjennomsnittsverdier av antall ASC ± standardavvik (n=4). Signifikansnivået er satt til 0,05 der P<0,05 tilsvarende (*)

Fra figur 22 ser vi et lineært forhold mellom antall utsådde celler og andel ASC. Andelen ASC i B-celle populasjonen som ble sådd ut var lav sammenlignet med hva som er blitt sett under tidligere ELISpot forsøk (figur 15 og 18) hvor hele leukocyttpopulasjoner var blitt sådd ut. Ved det høyeste utsådde celledetallet på 25 000 B-celler, ble det registrert 40 prikker på ELISpot-membranen, noe som gav en andel ASC på 0,16%. Stimulering med LPS gav ingen signifikant endring i andelen ASC i B-cellepopulasjonen i dette forsøket, sammenlignet med ustimulert kontroll.

I etterkant av dette forsøket var meningen å sortere ut IgM⁺ B-celler igjen og stimulere dem med CpG, LPS, imiquimod og poly I:C for å undersøke om stimulantene hadde direkte aktiverende effekt på B-cellene, men BD FACSAria III maskinen ble ødelagt under sortering og vi fikk derfor ikke gått videre med dette.

4 Diskusjon

Toll-lignende reseptorer er viktige reseptorer under den medfødte grenen av immunforsvaret. Disse reseptorene gjenkjenner PAMP-er som for eksempel LPS, ssRNA og dsRNA. Det er vist at ulike TLR-ligander kan stimulere laks til å indusere sterke immunresponser mot ulike virus (Jørgensen et al., 2003; Strandskog et al., 2008; Thim et al., 2012), ved blant annet å stimulere leukocytter til å skille ut type I IFN-er, TNF α og Mx-protein. TLR-ligander kan derfor indusere kraftige medfødte immunresponser hos fisk. En annen viktig egenskap til TLR-ligandene er at noen av disse er i stand til å indusere en kraftigere, og mer langvarig antistoffrespons når de tilsettes i vaksineadjuvanser, sammenlignet med vaksiner gitt uten slik adjuvans (Thim et al., 2012). Dette viser at TLR-ligander også har potensiale til å påvirke en adaptiv immunrespons hos fisken.

Til nå vet vi at laksens B-celler uttrykker TLR3, TLR8a1, TLR9, TLR21 og TLR22 (Jenberie et al., 2018). Effekten av stimuleringer med ligand for disse reseptorene er derimot i stor grad ukjent. Vi vet at CpG binder TLR9 og TLR21 på laksens B-celler, og stimulerer til økt genuttrykk for sIgM (Jenberie et al., 2018), noe som antyder at B-cellen differensierer til ASC. Under dette masterprosjektet har vi dermed forsøkt å kartlegge om stimulering med TLR-ligandene CpG, imiquimod og poly I:C, samt immunstimulanten LPS, stimulerer B-celler i leukocyttopulasjoner fra hodenyre, milt, blod og bukhule til å differensiere til ASC. Ved å opparbeide seg mer kunnskap om dette temaet, kan de ulike TLR-ligandene potensielt bli brukt i vaksineadjuvanser til laks, som kan forbedre vaksineeffekten ved å indusere en kraftigere og mer langvarig antistoffrespons.

4.1 Stimulering av leukocytter med LPS, CpG, imiquimod og poly I:C

4.1.1 Basalnivå av ASC

Ved bruk av IgM-ELISpot kan vi kvantitere antallet IgM-ASC. I hvert forsøk ble det inkludert ustimulerte kontrollceller og resultatene fra disse kontrollene ble brukt til å vurdere basalnivået av ASC i blod og ulike organer (figur 14A). Der så vi at så å si alle de ustimulerte kontrollene dyrket i seks dager hadde en lavere andel ASC enn kontrollene dyrket i tre dager. At andelen ASC var lavere etter lengre inkubasjonstid indikerer at ASC har dødd som følge av inkuberingen. Under lignende forsøk som tidligere er blitt gjennomført av forskningsgruppen er det ved dag 0 observert størst andel av ASC i leukocyttopulasjonen fra bukhole (Abrahamsen, 2019; Jenberie et al., 2020; Jenberie et al., 2018), sammenlignet med hodenyre, milt og perifert blod. I Jenberie et. al. sin studie fra 2020 (Jenberie et al., 2020) ble det beregnet at ca. 1,4% av leukocyttopulasjonen fra bukhole var antistoffsekreterende celler, mens vi i vårt ELISpot forsøk 2 (figur 18A) så at 0,1% av bukholeleukocytterne var ASC etter tre dager i kultur. Denne ulikheten i andel ASC fra bukhole kan skyldes at våre resultater ikke direkte reflekterer basalnivået av ASC. Leukocytterne kan ha differensiert og blitt flere under inkubasjonstiden, eller viabiliteten kan ha blitt påvirket grunnet den lange inkuberingen, eller skyldes tekniske utfordringer under uttak og laboratorieøvelser. For leukocytterne fra hodenyre så vi samme effekt, da Jenberie et. al. observerte at 0,6% var ASC ved dag 0, mens vi så at 0,35% av leukocyttopulasjonen var ASC etter tre dager stimulering (ELISpot forsøk 2, figur 18A). Miltleukocytterne derimot ble ikke påvirket i like stor grad av lengre inkubering, da både våre resultater og resultatene fra Jenberie et. al. viste at 0,6% av leukocyttopulasjonen var ASC etter hhv 3 og 0 dager inkubering.

Det ble imidlertid påvist ASC, i større eller mindre grad, i leukocyttopulasjonene fra alle organer og vev før stimulering, med en betydelig større andel fra milt-leukocytter.

Tilstedeværelse av aktiverte B-celler til tross for manglende immun-stimulering kan indikere at fisken tidligere har hatt en infeksjon, eller at B-cellene fra laks sekreterer antistoffer spontant (naturlige antistoffer), noe som ligner aktiviteten til B1 B-celler hos pattedyr (Martin et al., 2000).

4.1.2 Stimulering med CpG, LPS og imiquimod aktiverer B-celler fra milt og perifert blod

I IgM-ELISpot forsøk 1 (figur 15) ble det observert en signifikant økning i andelen ASC i leukocyttopopulasjonen fra milt og blod etter seks dager stimulering med CpG og LPS. IgM⁺-leukocyttter fra bukhule ble også aktivert til ASC som følge av stimulering med CpG og LPS, men økningen i andelen ASC var ikke signifikant forskjellig fra kontrollene.

Leukocyttopopulasjonen fra hodenyre viste derimot lite respons på CpG- og LPS-stimulering, men det ble observert en liten økning i andelen ASC. Ved den påfølgende qPCR analysen viste resultatene at stimulering med CpG gav en signifikant oppregulering i genuttrykket for TNF α hos hodenyreleukocytterne. Dette bekreftet at stimulering med CpG hadde fungert, også for leukocyttter fra hodenyre, og vi kunne utelukke det som grunn til at vi ikke så effekt under ELISpot analysen.

Leukocytterne ble stimulert med en B-klasse CpG, som er en klasse av CpG som induserer proliferering av celler fra hodenyre, milt og blod hos laks (Strandskog et al., 2007). B-klasse CpG stimulerer derimot ikke til økt utskillelse av IFN α/β i noen særlig grad, slik som klasse A og klasse C CpG gjør (Strandskog et al., 2007). Resultatene fra qPCR kontrollene (figur 16 og 19) viste effekter på CpG-stimulerte leukocyttter som korresponderer med de beskrevne effektene av en B-klasse CpG. For at CpG skal kunne aktivere naive B-celler direkte, må B-cellen uttrykke en reseptor som CpG kan binde til. Det er vist at B-celler fra laks uttrykker både TLR9 og TLR21 (Jenberie et al., 2018), som begge har CpG som ligand (Iliev, Skjæveland, et al., 2013; Lai et al., 2019). I våre forsøk så vi, som nevnt tidligere, en signifikant økning i andelen ASC i leukocyttopopulasjoner fra milt og blod, stimulert med CpG. Denne aktiveringen av B-celler kan skyldes direkte binding av CpG DNA til TLR9 og/eller TLR21 på B-cellen, eller indirekte effekter ved at andre leukocyttter ble stimulert av CpG til å skille ut cytokiner som igjen påvirket B-cellene. Tidligere forsøk har vist at direkte stimulering av IgM⁺ B-celler fra beinfisk med CpG medfører en økning i sekresjon av IgM (Jenberie et al., 2018; Simón et al., 2019), og hos pattedyr er det bekreftet at CpG binder TLR9 på B-cellen og stimulerer til differensiering og proliferering av cellene (Vollmer et al., 2009). Dette underbygger påstanden om at CpG stimulerer B-cellene fra laks direkte til differensiering til ASC. For å kunne verifisere dette må metoden for sortering av B-celler optimaliseres, slik at man kan benytte en B-cellemarkør under sorteringen som ikke binder

BCR slik som anti-IgM gjør, da dette kan være et signal som er nødvendig i tillegg til TLR-stimulering for å få differensiering til ASC.

LPS, som er en bakteriell PAMP, ga i våre forsøk en signifikant økning i andelen IgM-ASC etter seks dager stimulering av leukocyttopopulasjonen fra milt og blod. B-cellene fra hodenyre og bukhule så derimot ikke ut til å differensiere i særlig stor grad som følge av LPS stimulering. Dette kan skyldes at B-celler i ulike organer har ulike egenskaper, som for eksempel at de uttrykker ulike overflateproteiner (Peñaranda et al., 2019). I tillegg er komposisjonen av hele leukocyttopopulasjonen forskjellig mellom ulike organer og vev, noe som gjør at leukocytterne kan indusere ulike responser, som igjen kan påvirke B-cellene på forskjellige måter. LPS er en PAMP som er blitt mye brukt for å studere immunresponser hos fisk, og det er vist at LPS direkte stimulerer B-celler i ørret til å differensiere til ASC (Abós et al., 2016; Zwollo et al., 2005), noe som støtter våre resultater. Abós et. al. fant blant annet at LPS stimulerer B-celler til proliferering og økt sekresjon av IgM, til tross for at TLR4 er fraværende. Hvilke(n) reseptor(er) som binder LPS på B-celler og andre leukocytter i fisk er ikke avklart. TLR4, myeloid differensieringsprotein-2 (MD-2) og CD14 er viktige under gjenkjenningen av LPS hos pattedyr, men ingen av disse molekylene er beskrevet hos beinfisk (Swain et al., 2008). Det er fremdeles usikkert hvordan LPS nøyaktig induserer immunresponser hos beinfisk, men en mulighet er at LPS gjenkjennes av NOD-lignende reseptor (NLR) 1 (NOD1). I 2018 ble en studie utført på beinfisken miiuy croaker (*Miichthys miiuy*), hvor det ble vist at NOD1 responderer på LPS stimulering, og induserer sekresjon av inflammatoriske cytokiner som TNF α og IL-1 β (Bi et al., 2018). Under våre forsøk så vi at stimulering med LPS førte til en økning i TNF α -transkripter, samt en økning i andelen ASC i leukocyttopopulasjonen fra milt og blod hos laks. Om denne effekten skyldes direkte aktivisering av B-cellene, eller om det er en indirekte effekt ved at LPS aktiverer andre leukocytter i populasjonen er derimot usikkert.

Imiquimod er en syntetisk analog for enkelttrådig RNA. I pattedyr er imiquimod en ligand for TLR7 (Hemmi et al., 2002), i beinfisk er det derimot ikke vist hvilken TLR som binder imiquimod. Det er blitt bekreftet at beinfisk uttrykker TLR7 (Palti, Gahr, et al., 2010), men det har ikke blitt undersøkt om denne reseptoren finnes på laksens B-celler. I våre forsøk ble leukocytter stimulert med 5 μ g/ml imiquimod (ELISpot forsøk 1, figur 15), og resultatene fra dette forsøket viste svært lite differensiering av B-celler til ASC i samtlige organer og vev

testet. Det påfølgende konsentrasjonskurveforsøket viste at konsentrasjonen vi hadde brukt av imiquimod var for høy for å oppnå optimal effekt av stimuleringen, dermed ble konsentrasjonen nedjustert til 1µg/ml i neste ELISpot-forsøk (figur 18). Etter nedjustering fant vi at en større andel IgM⁺ B-celler differensierte til ASC, sammenlignet med det innledende ELISpot-forsøket, men ingen signifikante økninger sammenlignet med ustimulert kontroll ble registrert. Resultatene viser at imiquimod enten direkte eller indirekte stimulerer til en økning i andelen ASC i en leukocyttopulasjon fra hodenyre, milt, blod og bukhule. Hos pattedyr er det vist at imiquimod stimulerer B-celler direkte til å proliferere og sekretere større mengder antistoffer, sammenlignet med ustimulerte B-celler (Tomai et al., 2000), men om dette også gjelder for fiske B-celler er ikke avklart.

Poly I:C er et syntetisk dobbeltrådig RNA som i pattedyr er en ligand for TLR3 (Schröder et al., 2005). I beinfisk induserer poly I:C en type I IFN respons (Jensen et al., 2002; Lockhart et al., 2004; Zhou et al., 2014) og det er foreslått at dette skjer gjennom binding til TLR3 og TLR22 (Svingerud et al., 2012). I våre ELISpot-forsøk ble det brukt to ulike konsentrasjoner av poly I:C. I det innledende ELISpot-forsøket (figur 15) ble poly I:C administrert i en konsentrasjon på 10µg/ml, noe som ikke induserte en økning i andelen ASC. Påfølgende qPCR analyse (figur 16) viste at poly I:C stimulerte leukocytene til en signifikant økning i genuttrykket for Mx og IFN α 1. Genuttrykket av Mx og IFN α 1 ble oppjustert hhv. 30 og 600 ganger i de poly I:C stimulerte leukocytene, sammenlignet med ustimulert kontroll, noe som beviste at stimuleringen hadde fungert. Videre ble det utført et konsentrasjonskurveforsøk hvor leukocytter fra hodenyre og milt ble stimulert med tre ulike konsentrasjoner av poly I:C (1µg/ml, 5µg/ml og 10µg/ml). Resultatene fra konsentrasjonskurveforsøket (figur 17) viste at B-celler fra milt til en viss grad differensierte til ASC som følge av stimulering med poly I:C, i samtlige konsentrasjoner, men i størst grad ved en konsentrasjon på 1µg/ml.

Hodenyreleukocytene derimot viste ingen respons på stimulering med poly I:C, uavhengig av konsentrasjon. Dermed ble det bestemt at konsentrasjonen av poly I:C skulle justeres ned til 1µg/ml, og det var denne konsentrasjonen som ble brukt under ELISpot forsøk 2 (figur 18). Her så vi igjen ingen effekt av stimulering med poly I:C for noen av organene/vevene. Under påfølgende qPCR analyse ble det igjen observert at poly I:C stimulerte til en signifikant økning i genuttrykket for IFN α 1, men her var genuttrykket bare fem ganger høyere enn for ustimulert kontroll. Totalt sett ble det altså ikke observert økt differensiering av B-celler som følge av poly I:C stimulering under i de to ELISpot-forsøkene, mens

konsentrasjonskurveforsøket viste en ikke signifikant økning i andelen ASC som følge av poly I:C stimulering, noe som tyder på at resultatene fra konsentrasjonskurveforsøket ikke var «reelle».

Tidligere *in vivo* forsøk har pekt ut poly I:C som en lovende kandidat som adjuvans til virusvaksiner hos fisk, grunnet dens evne til å oppregulere immunresponser. Intraperitoneal administrering av poly I:C i atlantisk laks oppregulerer transkripter for Mx og type I interferoner (Andresen et al., 2020; Svingerud et al., 2012). Det er også vist at i.p. administrering av poly I:C stimulerer atlantisk laks til å opparbeide økt beskyttelse mot SAV-smitte, ved oppregulering av nettopp type I IFNer og Mx (Strandskog et al., 2011). Dette stemmer godt overens med hva vi så under qPCR analysen av de Poly I:C-stimulerte leukocytene (figur 16 og 19) hvor vi så en økning i genuttrykket for IFN α 1 og Mx. Resultatene indikerer at stimulering med poly I:C induserer antivirale immunresponser hos fisk, men at disse responsene ikke aktiverer det adaptive immunsystemet i form av aktivering av B-celler til ASC. Det finnes en rekke reseptorer som gjenkjenner dsRNA, deriblant TLR22, TLR3, og RIG-I/MDA5 som gjenkjenner dsRNA i cytoplasma. Det er bekreftet at B-celler fra laks uttrykker TLR3 og TLR22 (Jenberie et al., 2018), så resultatene våre viste at binding av poly I:C til disse reseptorene kanskje ikke medfører signalering inn til cellekjernen som er sterk nok til å aktivere B-cellen til ASC, eller at poly I:C ikke binder disse reseptorene på B-cellen i det hele tatt. Hos mus er det vist at stimulering av TLR3 med poly I:C ikke direkte øker sekresjonen av antistoffer fra B-celler (Rubtsov et al., 2008; Weir et al., 2017), noe som stemmer godt overens med våre resultater. Siden poly I:C er en kjent stimulant av type I IFN i lakseleukocytter *in vitro* (Svingerud et al., 2012) kan våre resultater (figur 16 og 19) tyde på at også type I IFNer ikke har betydelig effekt på differensiering av B-celler i laks til ASC.

4.2 Effekten av stimulering med type I IFNer på B-celler i laks

Som en del av dette masterprosjektet ble det forsøkt å forbehandle leukocytter fra milt hos laks med type I IFNene IFN α 1 og IFN γ , for påfølgende stimulering med LPS og CpG og kvantitering ved ELISpot. Fra før er det vist at makrofager fra mennesker som stimuleres med type I IFNer og deretter stimuleres med TLR-ligander øker cellens uttrykk av TLRer og MyD88 (Sirén et al., 2005). Begrunnelsen for å gjøre dette forsøket var da for å undersøke om forbehandling av leukocytterne fra laks med IFNer, og påfølgende stimulering med TLR-ligander ville føre til at flere B-celler differensierte til ASC sammenlignet med ustimulerte kontrollceller. Samtidig kunne vi undersøke om IFN-stimulering alene påvirket B-cellene fra milt til å differensiere.

Resultatene (figur 20) viste at verken kun IFN-stimulerte leukocytter, LPS/CpG stimulerte leukocytter, eller leukocytter som var forbehandlet med IFN for påfølgende stimulering med enten LPS eller CpG ble påvirket til å indusere differensiering av B-celler til ASC. I og med at vi hadde benyttet LPS og CpG i tidligere stimuleringsforsøk, og da hadde sett signifikant økning i andelen ASC hos leukocyttopulasjonen i milt, indikerte disse resultatene at det var noe med selve forsøksoppsettet som ikke fungerte. Leukocytterne ble først forbehandlet med IFNer før de ble overført til en ELISpot-plate, hvor de ble stimulert direkte med LPS og CpG. Slik direkte stimulering i ELISpot-platen har ikke vært gjort før, og det er mulig at det var årsaken til at vi ikke fikk respons. Vi forsøkte derfor i et nytt oppsett å stimulere leukocytter, allerede forbehandlet med IFNer, med LPS og CpG i 96-brønnerplaten. Leukocytterne ble så høstet og overført til en ELISpot-plate, men heller ikke det gav noen økning i andelen ASC. Benedicenti et al. viste i 2020 at IFN-stimulering i tre dager av leukocytter fra blod hos regnbueørret, ga en signifikant økning i andelen ASC (Benedicenti et al., 2020). Dette er i direkte kontrast til hva vi så for våre milt-leukocytter, og underbygger ytterligere at noe gikk galt under vårt forsøk.

4.3 Stimulering med immunmodulatorer påvirker ikke cellens genuttrykk av antistoffer

Det ble gjennomført en qPCR analyse av TLR-ligand og type I IFN stimulerede leukocytter som en oppfølging til ELISpot forsøkene. Dette var for å undersøke om stimuleringene medførte økt genuttrykk av andre immunoglobuliner enn IgM, samtidig som det ble undersøkt om økt sekresjon av IgM målt ved ELISpot korrelerte med økte nivåer av IgM transkripter. De ustimulerte leukocytene viste å uttrykke omtrent likt nivå av sIgM og mIgM. Genuttrykket for IgD og IgT var derimot mye lavere enn uttrykket av sIgM og mIgM for de ustimulerte leukocytene, både i blod og hodenyre, noe som samsvarer med hva som er rapportert tidligere hos beinfisk (Makesh et al., 2015; Tian et al., 2009).

De stimulerede cellene viste lite endring i genuttrykket for sIgM, mIgM, IgD og IgT (figur 21). Dette tilsier at uttrykket av Ig-er ikke påvirkes av stimulering med LPS, de ulike TLR-ligandene og IFNer. Sett i sammenheng med resultatene fra ELISpot-forsøkene hvor andelen IgM-ASC økte etter stimulering med LPS, CpG og imiquimod (figur 15 og 18) hadde vi forventet å se en økning i genuttrykket av sIgM. Økning i Mx uttrykk (figur 21E) viste at stimuleringene hadde fungert, i tillegg til at det tidligere er blitt vist at stimulering av leukocytter fra hodenyre og blod hos laks med CpG, fører til økt genuttrykk for sIgM og økt sekresjon av IgM-protein i celsesupernatant (Jenberie et al., 2018). Hvorfor vi ikke så en økning i sIgM genuttrykk etter stimulering med CpG og de andre ligandene er usikkert, men kanskje kan aktivering av BCR spille inn. Forskningen av Jenberie et. al. ble gjort med sorterte IgM⁺ B-celler, og under MACS sortering blir cellene «merket» med anti-IgM før sortering. Anti-IgM stimulerer BCR, og det kan tenkes at dette signalet kanskje er nødvendig i tillegg til TLR/LPS-stimulering for å få differensiering til ASC.

4.4 Stimulering med LPS på sorterte IgM⁺ B-celler aktiverte ikke cellene til ASC

I ELISpot forsøk 1 (figur 15) så vi en signifikant økning i andelen ASC etter stimulering med CpG og LPS. For å utelukke at denne økningen i ASC skyldtes at andre leukocytter i populasjonen sekreterte cytokiner som stimulerte B-cellene til å differensiere, ble det forsøkt å sortere ut IgM⁺ B-celler, slik at disse kunne stimuleres direkte. Dermed ble det først gjennomført et konsentrasjonskurveeksperiment for å undersøke hvor mange IgM⁺ B-celler vi burde så ut i én ELISpot-brønn, da for mange celler kan gi for høyt antall prikker til at CTL-programvaren klarer å lese av antallet. Resultatene i figur 22 viser at vi fikk generelt mange færre prikker enn vi hadde forventet etter sortering. Andelen ASC fra den sorterte B-celle populasjonen viste seg faktisk å være lavere enn andelen ASC i en hel leukocyttopulasjon. Fra ELISpot-forsøkene (figur 15 og 18) så vi at den høyeste andelen ASC vi fikk fra den ustimulerte leukocyttopulasjonen var omtrent 0,6%. Fra de sorterte B-cellene derimot var den største andelen ASC vi fikk etter kvantitering ved ELISpot på 0,2%. Under sortering av B-celler med FACS vil B-cellene, i likhet med B-cellene under sortering med MACS, «merkes» med anti-IgM i forkant av sorteringen, og denne bindingen av antistoff til BCR kan som nevnt være med på å aktivere B-cellene. Det så imidlertid ikke ut til at B-cellene fra vårt eksperiment ble påvirket i særlig grad av dette, da andelen ASC var såpass lav som den var.

Videre så vi ingen effekt av stimulering med LPS. LPS skulle fungere som en positiv kontroll i dette forsøket, da vi tidligere har sett stor økning i andelen ASC etter stimulering med LPS på hele leukocyttopulasjon, samt at det er vist at LPS kan stimulere B-celler fra regnbueørret direkte (Abós et al., 2016; Zwollo et al., 2005). At vi ikke så noe økning i andelen ASC etter stimulering med LPS antyder at noe gikk galt under dette forsøket. Når vi da skulle forsøke å gjenta forsøket ble sorteringsmaskinen (BD FACSAria III) ødelagt, og vi fikk dessverre ikke gått videre.

4.5 Begrensinger i metoden

4.5.1 Forsøksbetingelser

Forsøksfisken gikk på sjøvann i kar med flere individer, i tillegg ble vannstanden i karet senket for hver gang forsøksfisk skulle hentes ut. Disse faktorene kan ha medført økt stress for fisken, som i sin tur kan påvirke fiskens immunforsvar negativt og føre til at fisken blir mer mottakelig for sykdom (Tort, 2011). Stress kan øke kortisolnivået i blodplasma, som kan hemme produksjonen av B-celler og IgM-ASC-responser hos fisk (Zwollo, 2018). Dette kan ha påvirket basalnivået av IgM-ASC vi så ut fra ELISpot analysene (figur 14). For hver av ELISpot-analysene, samt for qPCR-kontrollene, fikk vi store standardavvik. Dette skyldes individforskjeller, noe som er vanlig hos laks. Ved bruk av genetisk like forsøksfisk kunne individforskjellene vært minsket, men dette er foreløpig ikke tilgjengelig for laks. Det hadde da vært fordelaktig å inkludere celler fra flere individer i hvert forsøk for å redusere standardavvikene, men på grunn av arbeidskrevende prosedyrer for celleisolering fra fire ulike vev og påfølgende ELISpot lot det seg ikke gjennomføre i praksis.

Under qPCR analyse for ulike Ig-transkripter ble det oppdaget en feil med revers transcriptase kitet fra QIAGEN. Under alikvotering av reagensene fra kitet ble det oppdaget presipitat i bunnen av røret med RT-buffer. Kitet ble testet med RNA som det tidligere hadde vært kjørt qPCR på, og sammenlignet opp mot et eldre kit, slik at det fra samme RNA ble laget cDNA fra to kit. Ved qPCR analysen viste det seg å være mer enn 10 Ct verdier høyere uttrykk av elongeringsfaktor i cDNAet laget med det nye kitet, sammenlignet med det gamle. QIAGEN ble kontaktet, og de kunne bekrefte at de hadde hatt problemer med kitet med det aktuelle batchnummeret (Henriette Nordli, personlig kommunikasjon, 05. mai 2022). Dette medførte for oss at det ble brukt mye tid på cDNA syntese og qPCR som ikke gav noen resultater vi kunne benytte i vår oppgave, samt at mye forsøksmateriale måtte kasseres.

4.5.2 Metodediskusjon – IgM-ELISpot

Vi valgte å bruke IgM-ELISpot for å kvantitere antallet IgM-sekreserende celler i leukocyttpopulasjonen fra hodenyre, milt, blod og bukhole. Det endelige celletallet man får fra hvert organ/vev påvirkes av en rekke faktorer. Når man benytter levende celler i forsøk er riktig uttak, lagring og behandling under utførelsen av metoden svært viktig for å oppnå troverdige resultater. Først og fremst vil individforskjeller og størrelsesforskjeller på fisken påvirke hvor mange celler det i utgangspunktet er i organet/vevet. Videre vil metoden som blir brukt for å høste organet/vevet innvirke hvor mange celler man får med seg over i transportmediet. På laben kan ulik gjennomføring av metoden for isolering påvirke antallet celler som til slutt blir talt av Countess telleren. ELISpot-analyse er også en metode som inneholder mange steg, noe som medfører at det er mange ting under prosedyren som kan gå galt. Vi opplevde at flere av ELISpot-analysene vi utførte ikke gav noen prikker på membranen (tabell 7). Det ble dermed nøye gjennomgått om vi hadde benyttet riktige reagenser, og om disse fungerte slik som de skulle, samt at vi gjennomførte metoden på riktig måte. Det ble ikke oppdaget noen åpenbare feil, så årsaken til manglende resultat er fortsatt uviss.

4.6 Videre forskning

Ved videre forskning på effekten av stimulering med TLR-ligander på B-celler fra laks vil det være viktig å undersøke om ligandene har direkte effekt på rene kulturer av B-celler, for å kunne undersøke om andre leukocytter i populasjonen bidrar til differensiering av B-cellene. Dermed burde det legges fokus på å finne antistoffer mot markører på B-celler til sortering, slik at man ikke trenger å benytte anti-IgM som i seg selv kan aktivere B-celler. Videre bør metoden for å studere sorterte IgM⁺ B-celler i ELISpot optimaliseres. Dersom dette blir gjort kunne man også undersøkt om type I IFNer har direkte effekter på B-celler fra fisk, og om uttrykket av TLRer oppreguleres som respons på interferonstimulering.

5 Konklusjon

- Seks dager stimulering med TLR9/TLR22-liganden CpG førte til en signifikant økning i andelen IgM-ASC i leukocyttpopulasjon fra milt og blod sammenlignet med ustimulert kontroll. CpG stimulerte også til en økning i andelen IgM-ASC i leukocytter fra hodenyre og bukhule, men disse økningene var ikke signifikant forskjellig fra ustimulert kontroll.
- Seks dager stimulering med LPS førte til en signifikant økning i andelen IgM-ASC i leukocyttpopulasjonen fra milt og blod sammenlignet med ustimulert kontroll. LPS-stimulering førte også til økt andel IgM-ASC i leukocytter fra hodenyre og bukhule, men ingen signifikant økning sammenlignet med ustimulert kontroll.
- Imiquimod, som er en foreslått ligand for TLR7, gav en stimulerende effekt på andelen IgM-ASC i leukocyttpopulasjonen fra hodenyre, milt, blod og bukhule etter seks dager stimulering, i en konsentrasjon på 1µg/ml. Imiquimod-stimulering gav imidlertid ikke en signifikant økning i andelen IgM-ASC i noen av organene/vevene sammenlignet med ustimulert kontroll.
- Poly I:C, som er en foreslått ligand for TLR3/TLR22, gav ingen økning i andelen IgM-ASC i leukocyttpopulasjonene vi undersøkte.
- Vi fant at optimal konsentrasjon av CpG, imiquimod og poly I:C for våre formål var hhv. 2µM, 1µg/ml og 1µg/ml.
- Effekten av type I IFN på B-celler i laks er uavklart og forsøksprotokoller for å studere dette må videreutvikles.
- Stimulering av leukocytter med LPS, TLR-ligander og type I IFNer gav små, ikke signifikante endringer i genuttrykk av immunoglobuliner.
- Metoden for å studere sorterte IgM⁺ B-celler i ELISpot må optimaliseres videre og det er uavklart om ligandene testet her stimulerer B-celler direkte til IgM-ASC.

6 Referanser

- Abbas, A. K., Lichtman, A. H. & Pillai, S. (2016). *Basic Immunology. Functions and Disorders of the Immune System* (Fifth Edition utg.): ELSEVIER.
- Abós, B., Bailey, C. & Tafalla, C. (2022). Adaptive Immunity. I *Principles of Fish Immunology* (s. 105-140): Springer.
- Abós, B., Bird, S., Granja, A. G., Morel, E., Bayona, J. A. M., Barreda, D. R. & Tafalla, C. (2018). Identification of the first teleost CD5 molecule: additional evidence on phenotypical and functional similarities between fish IgM+ B cells and mammalian B1 cells. *The Journal of Immunology*, 201(2), 465-480.
- Abós, B., Castro, R., Pignatelli, J., Luque, A., González, L. & Tafalla, C. (2013). Transcriptional heterogeneity of IgM+ cells in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) tissues. *PLoS One*, 8(12), e82737.
- Abos, B., Estensoro, I., Perdiguero, P., Faber, M., Hu, Y., Díaz Rosales, P., . . . Tafalla, C. (2018). Dysregulation of B cell activity during proliferative kidney disease in rainbow trout. *Frontiers in immunology*, 9, 1203.
- Abós, B., Wang, T., Castro, R., Granja, A. G., Leal, E., Havixbeck, J., . . . Tafalla, C. (2016). Distinct differentiation programs triggered by IL-6 and LPS in teleost IgM+ B cells in the absence of germinal centers. *Scientific reports*, 6(1), 1-16.
- Abrahamsen, M. (2019). *Humorale immunresponser i bukhule og systemiske organer hos Atlantisk laks (Salmo salar L.) - sammenligning av levende og inaktivert salmonid alphavirus 3 administrert i bukhulen* (MSC). UiT Norges Arktiske Universitet. Hentet fra <file:///C:/Users/Bruker/AppData/Local/Microsoft/Windows/INetCache/Content.Outlook/SP2EFH4D/thesis%20Mathias%20Abrahamsen.%20NFH%20v-19.pdf>
- Andresen, A. M. S., Boudinot, P. & GjØen, T. (2020). Kinetics of transcriptional response against poly (I: C) and infectious salmon anemia virus (ISAV) in Atlantic salmon kidney (ASK) cell line. *Developmental & Comparative Immunology*, 110, 103716.
- Arya, M., Shergill, I. S., Williamson, M., Gommersall, L., Arya, N. & Patel, H. R. H. (2005). Basic principles of real-time quantitative PCR. *Expert Review of Molecular Diagnostics*, 5(2), 209-219. 10.1586/14737159.5.2.209
- Avunje, S. & Jung, S.-J. (2017). Poly (I: C) and imiquimod induced immune responses and their effects on the survival of olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) from viral haemorrhagic septicaemia. *Fish & Shellfish Immunology*, 71, 338-345.
- Bakke, A. F., BjØrgen, H., Koppang, E. O., Frost, P., Afanasyev, S., Boysen, P., . . . Lund, H. (2020). IgM+ and IgT+ B Cell Traffic to the Heart during SAV Infection in Atlantic Salmon. *Vaccines*, 8(3), 493.
- Basu, S., Campbell, H. M., Dittel, B. N. & Ray, A. (2010). Purification of specific cell population by fluorescence activated cell sorting (FACS). *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*, (41), e1546.
- Benedicenti, O., Wang, T., Morel, E., Secombes, C. J., Soletto, I., Díaz-Rosales, P. & Tafalla, C. (2020). Type I interferon regulates the survival and functionality of B cells in rainbow trout. *Frontiers in Immunology*, 1494.
- Berg, K., Svingerud, T., Sun, B. & Robertsen, B. (2009). An antiserum against Atlantic salmon IFN α 1 detects IFN and neutralizes antiviral activity produced by poly I: C stimulated cells. *Developmental & Comparative Immunology*, 33(4), 638-645.

- Bi, D., Wang, Y., Gao, Y., Li, X., Chu, Q., Cui, J. & Xu, T. (2018). Recognition of Lipopolysaccharide and Activation of NF- κ B by Cytosolic Sensor NOD1 in Teleost Fish. *frontiers in Immunology*. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01413>
- Bilal, S., Etayo, A. & Hordvik, I. (2021). Immunoglobulins in teleosts. *Immunogenetics*, 1-13.
- Björngen, H. & Koppang, E. O. (2021). Anatomy of teleost fish immune structures and organs. *Immunogenetics*, 1-11.
- Bøggwald, J. & Dalmo, R. A. (2020). Historisk blikk–og nåværende vaksiner i norsk fiskeoppdrett. *Naturen*, 144(5), 207-213.
- Castro, R., Abós, B., González, L., Granja, A. G. & Tafalla, C. (2017). Expansion and differentiation of IgM+ B cells in the rainbow trout peritoneal cavity in response to different antigens. *Developmental & Comparative Immunology*, 70, 119-127.
- Castro, R., Jouneau, L., Pham, H.-P., Bouchez, O., Giudicelli, V., Lefranc, M.-P., . . . Six, A. (2013). Teleost fish mount complex clonal IgM and IgT responses in spleen upon systemic viral infection. *PLoS pathogens*, 9(1), e1003098.
- Cesta, M. F. (2006). Normal structure, function, and histology of the spleen. *Toxicologic pathology*, 34(5), 455-465.
- Chang, C.-J., Sun, B. & Robertsen, B. (2015). Adjuvant activity of fish type I interferon shown in a virus DNA vaccination model. *Vaccine*, 33(21), 2442-2448.
- Dalum, A. S., Austbø, L., Björngen, H., Skjødt, K., Hordvik, I., Hansen, T., . . . Koppang, E. O. (2015). The interbranchial lymphoid tissue of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) extends as a diffuse mucosal lymphoid tissue throughout the trailing edge of the gill filament. *Journal of morphology*, 276(9), 1075-1088.
- Das, P. K. & Salinas, I. (2020). Fish nasal immunity: From mucosal vaccines to neuroimmunology. *Fish & Shellfish Immunology*, 104, 165-171.
- Díaz-Rosales, P., Muñoz-Atienza, E. & Tafalla, C. (2018). Role of teleost B cells in viral immunity. *Elsevier*. Hentet fra file:///C:/Users/Bruker/AppData/Local/Microsoft/Windows/INetCache/Content.Outlook/SP2EFH4D/Tafalla%20teleost%20B%20cells%20review_2019.pdf
- Edholm, E.-S., Bengten, E. & Wilson, M. (2011). Insights into the function of IgD. *Developmental & Comparative Immunology*, 35(12), 1309-1316.
- Ellis, A. E. (1977). The leucocytes of fish: a review. *Journal of fish biology*, 11(5), 453-491.
- Geven, E. J. & Klaren, P. H. (2017). The teleost head kidney: Integrating thyroid and immune signalling. *Developmental & Comparative Immunology*, 66, 73-83.
- Gonzalez, R., Matsiota, P., Torchy, C., De Kinkelin, P. & Avrameas, S. (1989). Natural anti-TNP antibodies from rainbow trout interfere with viral infection in vitro. *Research in immunology*, 140(7), 675-684.
- Guy, B. (2007). The perfect mix: recent progress in adjuvant research. *Nature Reviews Microbiology*, 5(7), 396-397.
- Hansen, J. D. & Kaattari, S. L. (1995). The recombination activating gene 1 (RAG1) of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): cloning, expression, and phylogenetic analysis. *Immunogenetics*, 42(3), 188-195.
- Hansen, J. D. & Kaattari, S. L. (1996). The recombination activating gene 2 (RAG2) of the rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Immunogenetics*, 44(3), 203-211.
- Haugarvoll, E., Bjerkås, I., Nowak, B. F., Hordvik, I. & Koppang, E. O. (2008). Identification and characterization of a novel intraepithelial lymphoid tissue in the gills of Atlantic salmon. *Journal of Anatomy*, 213(2), 202-209.
- Haugland, Ø., Mikalsen, A. B., Nilsen, P., Lindmo, K., Thu, B. J., Eliassen, T. M., . . . Evensen, Ø. (2011). Cardiomyopathy syndrome of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.)

- is caused by a double-stranded RNA virus of the Totiviridae family. *Journal of virology*, 85(11), 5275-5286.
- Hedfors, I. A., Bakke, H., Skjødt, K. & Grimholt, U. (2012). Antibodies recognizing both IgM isotypes in Atlantic salmon. *Fish & shellfish immunology*, 33(5), 1199-1206.
- Hemmi, H., Kaisho, T., Takeuchi, O., Sato, S., Sanjo, H., Hoshino, K., . . . Akira, S. (2002). Small anti-viral compounds activate immune cells via the TLR7 MyD88-dependent signaling pathway. *Nature immunology*, 3(2), 196-200.
- Hordvik, I. (2015). Immunoglobulin isotypes in Atlantic salmon, *Salmo salar*. *Biomolecules*, 5(1), 166-177.
- Huang, X.-N., Wang, Z.-Y. & Yao, C.-L. (2011). Characterization of Toll-like receptor 3 gene in large yellow croaker, *Pseudosciaena crocea*. *Fish & Shellfish Immunology*, 31(1), 98-106.
- Hwang, S. D., Kondo, H., Hirono, I. & Aoki, T. (2011). Molecular cloning and characterization of Toll-like receptor 14 in Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*. *Fish & Shellfish Immunology*, 30(1), 425-429.
- iLaks. (2022). Sjømateksporten passerte 120 milliarder kroner i fjor, *iLaks*. Hentet fra <https://ilaks.no/sjomateksporten-passerte-120-milliarder-kroner-i-fjor/>
- Iliev, D. B., Jørgensen, S. M., Rode, M., Krasnov, A., Harneshaug, I. & Jørgensen, J. B. (2010). CpG-induced secretion of MHCII β and exosomes from salmon (*Salmo salar*) APCs. *Developmental & Comparative Immunology*, 34(1), 29-41.
- Iliev, D. B., Lagos, L., Thim, H. L., Jørgensen, S. M., Krasnov, A. & Jørgensen, J. B. (2019). CpGs induce differentiation of Atlantic salmon mononuclear phagocytes into cells with dendritic morphology and a proinflammatory transcriptional profile but an exhausted allostimulatory activity. *Frontiers in immunology*, 10, 378.
- Iliev, D. B., Skjæveland, I. & Jørgensen, J. B. (2013). CpG oligonucleotides bind TLR9 and RRM-Containing proteins in Atlantic Salmon (*Salmo salar*). *BMC immunology*, 14(1), 1-12.
- Iliev, D. B., Thim, H. L., Lagos, L., Olsen, R. & Jørgensen, J. (2013). Homing of antigen-presenting cells in head kidney and spleen—salmon head kidney hosts diverse APC types. *Frontiers in Immunology*, 4, 137.
- Jenberie, S., Peñaranda, M., Michelle, D., Thim, H. L., Styrvold, M. B., Strandskog, G., . . . Jensen, I. (2020). Salmonid Alphavirus Subtype 3 Induces Prolonged Local B Cell Responses in Atlantic Salmon (*Salmo salar*) After Intraperitoneal Infection. *Frontiers in immunology*, 1682.
- Jenberie, S., Thim, H. L., Sunyer, J. O., Skjødt, K., Jensen, I. & Jørgensen, J. B. (2018). Profiling Atlantic salmon B cell populations: CpG-mediated TLR-ligation enhances IgM secretion and modulates immune gene expression. *Scientific Reports*. Hentet fra file:///C:/Users/Bruker/AppData/Local/Microsoft/Windows/INetCache/Content.Outlook/SP2EFH4D/Jenberie%20et%20al_2018.pdf
- Jensen, I., Albuquerque, A., Sommer, A.-I. & Robertsen, B. (2002). Effect of poly I: C on the expression of Mx proteins and resistance against infection by infectious salmon anaemia virus in Atlantic salmon. *Fish & shellfish immunology*, 13(4), 311-326.
- Jørgensen, J. B. (2014). The innate immune response in fish. *Fish vaccination*, 85-103.
- Jørgensen, J. B., Johansen, A., Stenersen, B. & Sommer, A.-I. (2001). CpG oligodeoxynucleotides and plasmid DNA stimulate Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) leucocytes to produce supernatants with antiviral activity. *Developmental & Comparative Immunology*, 25(4), 313-321.

- Jørgensen, 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(21), 11471-11479.
- Kalyuzhny, A. E. (2005). Chemistry and biology of the ELISPOT assay. *Handbook of ELISPOT*, 15-31.
- Kasamatsu, J., Oshiumi, H., Matsumoto, M., Kasahara, M. & Seya, T. (2010). Phylogenetic and expression analysis of lamprey toll-like receptors. *Developmental & Comparative Immunology*, 34(8), 855-865.
- Kileng, Ø., Albuquerque, A. & Robertsen, B. (2008). Induction of interferon system genes in Atlantic salmon by the imidazoquinoline S-27609, a ligand for Toll-like receptor 7. *Fish & shellfish immunology*, 24(5), 514-522.
- Koppang, E., Hordvik, I., Bjerås, I., Torvund, J., Aune, L., Thevarajan, J. & Endresen, C. (2003). Production of rabbit antisera against recombinant MHC class II β chain and identification of immunoreactive cells in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Fish & Shellfish Immunology*, 14(2), 115-132.
- Korytář, T., Jaros, J., Verleih, M., Rebl, A., Kotterba, G., Kühn, C., . . . Köllner, B. (2013). Novel insights into the peritoneal inflammation of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Fish & shellfish immunology*, 35(4), 1192-1199.
- Krieg, A. M., Yi, A.-K., Matson, S., Waldschmidt, T. J., Bishop, G. A., Teasdale, R., . . . Klinman, D. M. (1995). CpG motifs in bacterial DNA trigger direct B-cell activation. *Nature*, 374(6522), 546-549.
- Lai, C.-Y., Yu, G.-Y., Luo, Y., Xiang, R. & Chuang, T.-H. (2019). Immunostimulatory activities of CpG-oligodeoxynucleotides in teleosts: toll-like receptors 9 and 21. *Frontiers in immunology*, 179.
- Lazarte, J. M. S., Thompson, K. D. & Jung, T. S. (2019). Pattern recognition by melanoma differentiation-associated gene 5 (*Mda5*) in teleost fish: A review. *Frontiers in Immunology*, 10, 906.
- Lee, P.-T., Zou, J., Holland, J. W., Martin, S. A., Collet, B., Kanellos, T. & Secombes, C. J. (2014). Identification and characterisation of TLR18-21 genes in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Fish & shellfish immunology*, 41(2), 549-559.
- Lee, P.-T., Zou, J., Holland, J. W., Martin, S. A., Kanellos, T. & Secombes, C. J. (2013). Identification and characterization of TLR7, TLR8a2, TLR8b1 and TLR8b2 genes in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Developmental & Comparative Immunology*, 41(2), 295-305.
- Leong, J. S., Jantzen, S. G., von Schalburg, K. R., Cooper, G. A., Messmer, A. M., Liao, N. Y., . . . Jones, S. J. (2010). *Salmo salar* and *Esox lucius* full-length cDNA sequences reveal changes in evolutionary pressures on a post-tetraploidization genome. *BMC genomics*, 11(1), 1-17.
- Li, J., Barreda, D. R., Zhang, Y.-A., Boshra, H., Gelman, A. E., LaPatra, S., . . . Sunyer, J. O. (2006). B lymphocytes from early vertebrates have potent phagocytic and microbicidal abilities. Hentet fra <https://www.nature.com/articles/ni1389>
- Li, Y.-G., Siripanyaphinyo, U., Tumkosit, U., Noranate, N., Pan, Y., Kameoka, M., . . . Anantapreecha, S. (2012). Poly (I: C), an agonist of toll-like receptor-3, inhibits replication of the Chikungunya virus in BEAS-2B cells. *Virology journal*, 9(1), 1-8.
- Li, Y., Li, Y., Cao, X., Jin, X. & Jin, T. (2017). Pattern recognition receptors in zebrafish provide functional and evolutionary insight into innate immune signaling pathways. *Cellular & molecular immunology*, 14(1), 80-89.

- Li, Y., Xia, P., Wu, J., Huang, A., Bu, G., Meng, F., . . . Yu, G. (2020). The potential sensing molecules and signal cascades for protecting teleost fishes against lipopolysaccharide. *Fish & Shellfish Immunology*, *97*, 235-247.
- Lockhart, K., Bowden, T. & Ellis, a., AE. (2004). Poly I: C-induced Mx responses in Atlantic salmon parr, post-smolts and growers. *Fish & shellfish immunology*, *17*(3), 245-254.
- Lv, J., Huang, R., Li, H., Luo, D., Liao, L., Zhu, Z. & Wang, Y. (2012). Cloning and characterization of the grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) Toll-like receptor 22 gene, a fish-specific gene. *Fish & Shellfish Immunology*, *32*(6), 1022-1031.
- Ma, C., Ye, J. & Kaattari, S. L. (2013). Differential compartmentalization of memory B cells versus plasma cells in salmonid fish. *European Journal of Immunology*, *43*(2), 360-370.
- Magnadóttir, B. (2010). Immunological control of fish diseases. *Marine biotechnology*, *12*(4), 361-379.
- Magnadóttir, B. (2006). Innate immunity of fish (overview). *Fish & shellfish immunology*, *20*(2), 137-151.
- Magor, B. G. (2015). Antibody affinity maturation in fishes—our current understanding. *Biology*, *4*(3), 512-524.
- Makesh, M., Sudheesh, P. S. & Cain, K. D. (2015). Systemic and mucosal immune response of rainbow trout to immunization with an attenuated *Flavobacterium psychrophilum* vaccine strain by different routes. *Fish & shellfish immunology*, *44*(1), 156-163.
- Martin, F. & Kearney, J. F. (2000). B - cell subsets and the mature preimmune repertoire. Marginal zone and B1 B cells as part of a “natural immune memory” . *Immunological reviews*, *175*(1), 70-79.
- Matsuo, A., Oshiumi, H., Tsujita, T., Mitani, H., Kasai, H., Yoshimizu, M., . . . Seya, T. (2008). Teleost TLR22 recognizes RNA duplex to induce IFN and protect cells from birnaviruses. *The Journal of Immunology*, *181*(5), 3474-3485.
- Mattilsynet. (2020). *Mattilsynets faglige beredskapsplan for kontroll med utbrudd av infeksjøs lakseanemi (ILA)*. Hentet fra https://www.mattilsynet.no/fisk_og_akvakultur/fiskehelse/fiske_og_skjellsykdommer/ila/faglig_beredskapsplan_infeksjos_lakseanemi.23808/binary/Faglig%20beredskapsplan:%20Infeksi%C3%B8s%20lakseanemi
- Meijer, A. H., Krens, S. G., Rodriguez, I. A. M., He, S., Bitter, W., Snaar-Jagalska, B. E. & Spaink, H. P. (2004). Expression analysis of the Toll-like receptor and TIR domain adaptor families of zebrafish. *Molecular immunology*, *40*(11), 773-783.
- Meng, Z., Zhang, X.-y., Guo, J., Xiang, L.-x. & Shao, J.-z. (2012). Scavenger receptor in fish is a lipopolysaccharide recognition molecule involved in negative regulation of NF- κ B activation by competing with TNF receptor-associated factor 2 recruitment into the TNF- α signaling pathway. *The Journal of Immunology*, *189*(8), 4024-4039.
- Nie, L., Cai, S.-Y., Shao, J.-Z. & Chen, J. (2018). Toll-like receptors, associated biological roles, and signaling networks in non-mammals. *Frontiers in immunology*, *9*, 1523.
- Ohta, Y. & Flajnik, M. (2006). IgD, like IgM, is a primordial immunoglobulin class perpetuated in most jawed vertebrates. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *103*(28), 10723-10728.
- Olsvik, P. A., Lie, K. K., Jordal, A.-E. O., Nilsen, T. O. & Hordvik, I. (2005). Evaluation of potential reference genes in real-time RT-PCR studies of Atlantic salmon. *BMC molecular biology*, *6*(1), 1-9.
- Palti, Y., Gahr, S. A., Purcell, M. K., Hadidi, S., Rexroad III, C. E. & Wiens, G. D. (2010). Identification, characterization and genetic mapping of TLR7, TLR8a1 and TLR8a2

- genes in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Developmental & Comparative Immunology*, 34(2), 219-233.
- Palti, Y., Rodriguez, M. F., Gahr, S. A., Purcell, M. K., Rexroad III, C. E. & Wiens, G. D. (2010). Identification, characterization and genetic mapping of TLR1 loci in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Fish & Shellfish Immunology*, 28(5-6), 918-926.
- Parra, D., Rieger, A. M., Li, J., Zhang, Y. A., Randall, L. M., Hunter, C. A., . . . Sunyer, J. O. (2012). Pivotal advance: peritoneal cavity B - 1 B cells have phagocytic and microbicidal capacities and present phagocytosed antigen to CD4+ T cells. *Journal of leukocyte biology*, 91(4), 525-536.
- Peñaranda, M., Michelle, D., Jensen, I., Tollersrud, L. G., Bruun, J.-A. & Jørgensen, J. B. (2019). Profiling the atlantic salmon IgM+ B cell surface proteome: Novel information on teleost fish B cell protein repertoire and identification of potential B cell markers. *Frontiers in immunology*, 10, 37.
- Perdiguero, P., Martín-Martín, A., Benedicenti, O., Díaz-Rosales, P., Morel, E., Muñoz-Atienza, E., . . . Cerutti, A. (2019). Teleost IgD+ IgM- B cells mount clonally expanded and mildly mutated intestinal IgD responses in the absence of lymphoid follicles. *Cell reports*, 29(13), 4223-4235. e4225.
- Pethon, P. & Vøllestad, A. (2021). Fisk. I *Store Norske Leksikon*. <https://snl.no/fisk>
- Pfaffl, M. W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic acids research*, 29(9), e45-e45.
- Pietretti, D., Scheer, M., Fink, I. R., Taverne, N., Savelkoul, H. F., Spaink, H. P., . . . Wiegertjes, G. F. (2014). Identification and functional characterization of nonmammalian Toll-like receptor 20. *Immunogenetics*, 66(2), 123-141.
- Poynter, S. J. & DeWitte-Orr, S. J. (2018). Understanding viral dsRNA-mediated innate immune responses at the cellular level using a rainbow trout model. *Frontiers in Immunology*, 9, 829.
- Press, C. M. & Evensen, Ø. (1999). The morphology of the immune system in teleost fishes. *Fish & shellfish immunology*, 9(4), 309-318.
- QIAGEN. (2019). RNeasy Mini Handbook. Hentet fra file:///C:/Users/Bruker/Downloads/HB-0435-006-HB_RNYMini_1019_WW.pdf
- Quiniou, S. M. A., Boudinot, P. & Bengtén, E. (2013). Comprehensive survey and genomic characterization of Toll-like receptors (TLRs) in channel catfish, *Ictalurus punctatus*: identification of novel fish TLRs. *Immunogenetics*, 65(7), 511-530. 10.1007/s00251-013-0694-9
- Raetz, C. R. & Whitfield, C. (2002). Lipopolysaccharide endotoxins. *Annual review of biochemistry*, 71(1), 635-700.
- Ramirez-Gomez, F., Greene, W., Rego, K., Hansen, J. D., Costa, G., Kataria, P. & Bromage, E. S. (2012). Discovery and characterization of secretory IgD in rainbow trout: secretory IgD is produced through a novel splicing mechanism. *The Journal of Immunology*, 188(3), 1341-1349.
- Regjeringen. (2021). *Havbruksstrategien - Et hav av muligheter* (Meld. St. 40 (2020-2021)). Hentet fra <https://www.regjeringen.no/no/dokumenter/havbruksstrategien-et-hav-av-muligheter/id2864482/?ch=1>
- Rivera, A., Siracusa, M. C., Yap, G. S. & Gause, W. C. (2016). Innate cell communication kick-starts pathogen-specific immunity. *Nature immunology*, 17(4), 356-363.
- Roach, J. C., Glusman, G., Rowen, L., Kaur, A., Purcell, M. K., Smith, K. D., . . . Aderem, A. (2005). The evolution of vertebrate Toll-like receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(27), 9577-9582.

- Robertsen, B. (2006). The interferon system of teleost fish. *Fish & shellfish immunology*, 20(2), 172-191.
- Robertsen, B. (2018). The role of type I interferons in innate and adaptive immunity against viruses in Atlantic salmon. *Developmental & Comparative Immunology*, 80, 41-52.
- Robertsen, B., Bergan, V., Røkenes, T., Larsen, R. & Albuquerque, A. (2003). Atlantic salmon interferon genes: cloning, sequence analysis, expression, and biological activity. *Journal of Interferon & Cytokine Research*, 23(10), 601-612.
- Rubtsov, A. V., Swanson, C. L., Troy, S., Strauch, P., Pelanda, R. & Torres, R. M. (2008). TLR agonists promote marginal zone B cell activation and facilitate T-dependent IgM responses. *The Journal of Immunology*, 180(6), 3882-3888.
- Salinas, I. (2015). The mucosal immune system of teleost fish. *Biology*, 4(3), 525-539.
- Schijns, V. E. & Lavelle, E. C. (2011). Trends in vaccine adjuvants. *Expert review of vaccines*, 10(4), 539-550.
- Schmittgen, T. D. & Livak, K. J. (2008). Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. *Nature protocols*, 3(6), 1101-1108.
- Schröder, M. & Bowie, A. G. (2005). TLR3 in antiviral immunity: key player or bystander? *Trends in immunology*, 26(9), 462-468.
- Sepulcre, M. P., Alcaraz-Pérez, F., López-Muñoz, A., Roca, F. J., Meseguer, J., Cayuela, M. L. & Mulero, V. (2009). Evolution of lipopolysaccharide (LPS) recognition and signaling: fish TLR4 does not recognize LPS and negatively regulates NF- κ B activation. *The Journal of Immunology*, 182(4), 1836-1845.
- Simón, R., Díaz-Rosales, P., Morel, E., Martín, D., Granja, A. G. & Tafalla, C. (2019). CpG Oligodeoxynucleotides modulate innate and adaptive functions of IgM+ B cells in rainbow trout. *Frontiers in immunology*, 10, 584.
- Sirén, J., Pirhonen, J., Julkunen, I. & Matikainen, S. (2005). IFN- α regulates TLR-dependent gene expression of IFN- α , IFN- β , IL-28, and IL-29. *The Journal of Immunology*, 174(4), 1932-1937.
- Skjæveland, I., Iliev, D. B., Zou, J., Jørgensen, T. & Jørgensen, J. B. (2008). A TLR9 homolog that is up-regulated by IFN- γ in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Developmental & Comparative Immunology*, 32(6), 603-607.
- Sommerset, I., Walde, C. S., Jensen, B. B., Wiik-Nielsen, J., Bornø, G., Oliveira, V. H. S. d., . . . Brun, E. (2022). Fiskehelse rapporten 2021. *Veterinærinstituttets rapportserie nr. 2a/2022*. Hentet fra https://www.vetinst.no/rappporter-og-publikasjoner/rappporter/2022/fiskehelse rapporten-2021/_attachment/download/95491d66-63af-4af5-894d-4f249ab13ec4:1c6a99a5667ce92bae66fd32039918670f9ddc11/web-fiskehelse2-40mb.pdf
- Soomro, M. A., Pavase, T. R. & Hu, G. (2021). Role of pattern recognition receptors in teleost fish: Recent advances.
- Steinel, N. C. & Bolnick, D. I. (2017). Melanomacrophage centers as a histological indicator of immune function in fish and other poikilotherms. *Frontiers in immunology*, 8, 827.
- Strandskog, G., Ellingsen, T. & Jørgensen, J. B. (2007). Characterization of three distinct CpG oligonucleotide classes which differ in ability to induce IFN α/β activity and cell proliferation in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) leukocytes. *Developmental & Comparative Immunology*, 31(1), 39-51.
- Strandskog, G., Skjæveland, I., Ellingsen, T. & Jørgensen, J. B. (2008). Double-stranded RNA and CpG DNA-induced immune responses in Atlantic salmon: comparison and synergies. *Vaccine*, 26(36), 4704-4715.

- Strandskog, G., Villoing, S., Iliev, D. B., Thim, H. L., Christie, K. E. & Jørgensen, J. B. (2011). Formulations combining CpG containing oligonucleotides and poly I: C enhance the magnitude of immune responses and protection against pancreas disease in Atlantic salmon. *Developmental & Comparative Immunology*, 35(11), 1116-1127.
- Sullivan, C., Charette, J., Catchen, J., Lage, C. R., Giasson, G., Postlethwait, J. H., . . . Kim, C. H. (2009). The gene history of zebrafish tlr4a and tlr4b is predictive of their divergent functions. *The Journal of Immunology*, 183(9), 5896-5908.
- Sun, B., Robertsen, B., Wang, Z. & Liu, B. (2009). Identification of an Atlantic salmon IFN multigene cluster encoding three IFN subtypes with very different expression properties. *Developmental & Comparative Immunology*, 33(4), 547-558.
- Sunyer, J. O. (2013). Fishing for mammalian paradigms in the teleost immune system. <https://dx.doi.org/10.1038%2Fni.2549>
- Svingerud, T., Solstad, T., Sun, B., Nyrud, M. L. J., Kileng, Ø., Greiner-Tollersrud, L. & Robertsen, B. (2012). Atlantic Salmon Type I IFN subtypes show differences in antiviral activity and cell-dependent expression: evidence for high IFNb/IFNc-producing cells in fish lymphoid tissues. *The Journal of Immunology*, 189(12), 5912-5923.
- Swain, P., Nayak, S., Nanda, P. & Dash, S. (2008). Biological effects of bacterial lipopolysaccharide (endotoxin) in fish: a review. *Fish & shellfish immunology*, 25(3), 191-201.
- Tacchi, L., Musharrafieh, R., Larragoite, E. T., Crossey, K., Erhardt, E. B., Martin, S. A., . . . Salinas, I. (2014). Nasal immunity is an ancient arm of the mucosal immune system of vertebrates. *Nature communications*, 5(1), 1-11.
- Tafalla, C., Bøggwald, J. & Dalmo, R. A. (2013). Adjuvants and immunostimulants in fish vaccines: current knowledge and future perspectives. *Fish & Shellfish Immunology*, 35(6), 1740-1750.
- Tafalla, C., González, L., Castro, R. & Granja, A. G. (2017). B cell-activating factor regulates different aspects of B cell functionality and is produced by a subset of splenic B cells in teleost fish. *Frontiers in Immunology*, 8, 295.
- Takeda, K., Kaisho, T. & Akira, S. (2003). Toll-like receptors. *Annual review of immunology*, 21(1), 335-376.
- Tanekhy, M. (2016). The role of toll - like receptors in innate immunity and infectious diseases of teleost. *Aquaculture research*, 47(5), 1369-1391.
- Tang, H., Jiang, X., Zhang, J., Pei, C., Zhao, X., Li, L. & Kong, X. (2021). Teleost CD4+ helper T cells: Molecular characteristics and functions and comparison with mammalian counterparts. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 240, 110316.
- ThermoFisher. (2014). Introducing a three-channel cell counter for your benchtop. Hentet 22.03 fra <https://www.thermofisher.com/content/dam/LifeTech/global/technical-reference-library/newsletters-journals/bioprobes/pdfs/bp70/bp70-countess-II-cell-counter-flr.pdf>
- Thim, H. L., Iliev, D. B., Christie, K. E., Villoing, S., McLoughlin, M. F., Strandskog, G. & Jørgensen, J. B. (2012). Immunoprotective activity of a Salmonid Alphavirus Vaccine: comparison of the immune responses induced by inactivated whole virus antigen formulations based on CpG class B oligonucleotides and poly I: C alone or combined with an oil adjuvant. *Vaccine*, 30(32), 4828-4834.
- Thim, H. L., Villoing, S., McLoughlin, M., Christie, K. E., Grove, S., Frost, P. & Jørgensen, J. B. (2014). Vaccine Adjuvants in Fish Vaccines Make a Difference: Comparing

- Three Adjuvants (Montanide ISA63A Oil, CpG/Poly I:C Combo and VHSV Glycoprotein) Alone or in Combination Formulated with an Inactivated Whole Salmonid Alphavirus Antigen. *Vaccines*, (Vaccine Adjuvants).
<https://doi.org/10.3390/vaccines2020228>
- Tian, J., Sun, B., Luo, Y., Zhang, Y. & Nie, P. (2009). Distribution of IgM, IgD and IgZ in mandarin fish, *Siniperca chuatsi* lymphoid tissues and their transcriptional changes after *Flavobacterium columnare* stimulation. *Aquaculture*, 288(1-2), 14-21.
- Tomai, M. A., Imbertson, L. M., Stanczak, T. L., Tygrett, L. T. & Waldschmidt, T. J. (2000). The immune response modifiers imiquimod and R-848 are potent activators of B lymphocytes. *Cellular immunology*, 203(1), 55-65.
- Tort, L. (2011). Stress and immune modulation in fish. *Developmental & Comparative Immunology*, 35(12), 1366-1375.
- Tsujita, T., Tsukada, H., Nakao, M., Oshiumi, H., Matsumoto, M. & Seya, T. (2004). Sensing bacterial flagellin by membrane and soluble orthologs of Toll-like receptor 5 in rainbow trout (*Onchorhynchus mikiss*). *Journal of Biological Chemistry*, 279(47), 48588-48597.
- Turabelidze, A., Guo, S. & DiPietro, L. A. (2010). Importance of housekeeping gene selection for accurate reverse transcription - quantitative polymerase chain reaction in a wound healing model. *Wound repair and regeneration*, 18(5), 460-466.
- Udayangani, S. (2021). What is the Difference Between Elisa and Elispot. Hentet fra <https://www.differencebetween.com/what-is-the-difference-between-elisa-and-elispot/>
- Uribe, C., Folch, H., Enriquez, R. & Moran, G. (2011). Innate and adaptive immunity in teleost fish: a review. Hentet fra <https://www.agriculturejournals.cz/publicFiles/50222.pdf>
- van der Wal, Y. A., Jenberie, S., Nordli, H., Greiner-Tollersrud, L., Kool, J., Jensen, I. & Jørgensen, J. B. (2021). The importance of the Atlantic salmon peritoneal cavity B cell response: Local IgM secreting cells are predominant upon *Piscirickettsia salmonis* infection. *Developmental & Comparative Immunology*, 123, 104125.
- Veterinærinstituttet. (2020). *Svarbrev vedr. vaksinering mot PD og fiskevelferd*. Hentet fra file:///C:/Users/Bruker/Downloads/Svarbrev%20NFDs%20ref.%2019-7148-7%20Vaksinering%20mot%20PD%20og%20fiskevelferd.pdf
- Veterinærinstituttet. (2021a). *Bestilling om vurdering av smitterisikoen ved videre produksjon av ILA-vaksinerte fisk etter påvisning av ILA*. file:///C:/Users/Bruker/Downloads/Vurdering%20av%20smitterisikoen%20ved%20ILA-vaksinerte%20fisk.pdf
- Veterinærinstituttet. (2021b). Statistikk over tap og dødelighet av laks og regnbueørret. Hentet fra <http://apps.vetinst.no/Laksetap/>
- Vollmer, J. & Krieg, A. M. (2009). Immunotherapeutic applications of CpG oligodeoxynucleotide TLR9 agonists. *Advanced drug delivery reviews*, 61(3), 195-204.
- Vollmer, J., Weeratna, R., Payette, P., Jurk, M., Schetter, C., Laucht, M., . . . Davis, H. L. (2004). Characterization of three CpG oligodeoxynucleotide classes with distinct immunostimulatory activities. *European journal of immunology*, 34(1), 251-262.
- Wakae, K., Magor, B. G., Saunders, H., Nagaoka, H., Kawamura, A., Kinoshita, K., . . . Muramatsu, M. (2006). Evolution of class switch recombination function in fish activation-induced cytidine deaminase, AID. *International immunology*, 18(1), 41-47.

- Wang, H., Rayburn, E. & Zhang, R. (2005). Synthetic oligodeoxynucleotides containing deoxycytidyl-deoxyguanosine dinucleotides (CpG ODNs) and modified analogs as novel anticancer therapeutics. *Current pharmaceutical design*, *11*(22), 2889-2907.
- Wang, J., Zhang, Z., Liu, J., Li, F., Chang, F., Fu, H., . . . Yin, D. (2015). Structural characterization and evolutionary analysis of fish-specific TLR27. *Fish & Shellfish Immunology*, *45*(2), 940-945.
- Wang, Y., Li, J., Han, J., Shu, C. & Xu, T. (2016). Identification and characteristic analysis of TLR28: a novel member of the TLR1 family in teleost. *Developmental & Comparative Immunology*, *62*, 102-107.
- Wei, Y. C., Pan, T. S., Chang, M. X., Huang, B., Xu, Z., Luo, T. R. & Nie, P. (2011). Cloning and expression of Toll-like receptors 1 and 2 from a teleost fish, the orange-spotted grouper *Epinephelus coioides*. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, *141*(3-4), 173-182.
- Weir, G. M., Karkada, M., Hoskin, D., Stanford, M. M., MacDonald, L., Mansour, M. & Liwski, R. S. (2017). Combination of poly I: C and Pam3CSK4 enhances activation of B cells in vitro and boosts antibody responses to protein vaccines in vivo. *PLoS One*, *12*(6), e0180073.
- Wu, L., Bian, X., Kong, L., Yin, X., Mu, L., Wu, S., . . . Ye, J. (2019). B cell receptor accessory molecule CD79 gets involved in response against *Streptococcus agalactiae* infection and BCR signaling in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Fish & shellfish immunology*, *87*, 212-219.
- Wu, L., Qin, Z., Liu, H., Lin, L., Ye, J. & Li, J. (2020). Recent advances on phagocytic B cells in teleost fish. *Frontiers in Immunology*, *11*, 824.
- Xu, Z., Takizawa, F., Casadei, E., Shibasaki, Y., Ding, Y., Sauters, T. J., . . . Sunyer, J. O. (2020). Specialization of mucosal immunoglobulins in pathogen control and microbiota homeostasis occurred early in vertebrate evolution. *Science immunology*, *5*(44), eaay3254.
- Yamaguchi, T., Quillet, E., Boudinot, P. & Fischer, U. (2019). What could be the mechanisms of immunological memory in fish? *Fish & shellfish immunology*, *85*, 3-8.
- Yamaguchi, T., Takizawa, F., Furihata, M., Soto-Lampe, V., Dijkstra, J. M. & Fischer, U. (2019). Teleost cytotoxic T cells. *Fish & Shellfish Immunology*, *95*, 422-439.
- Yang, F., Waldbieser, G. C. & Lobb, C. J. (2006). The nucleotide targets of somatic mutation and the role of selection in immunoglobulin heavy chains of a teleost fish. *The Journal of Immunology*, *176*(3), 1655-1667.
- Yasuike, M., De Boer, J., von Schalburg, K. R., Cooper, G. A., McKinnel, L., Messmer, A., . . . Koop, B. F. (2010). Evolution of duplicated IgH loci in Atlantic salmon, *Salmo salar*. *BMC genomics*, *11*(1), 1-16.
- Ye, J., Kaattari, I. & Kaattari, S. (2011a). Plasmablasts and plasma cells: reconsidering teleost immune system organization. *Developmental & Comparative Immunology*, *35*(12), 1273-1281.
- Ye, J., Kaattari, I. M. & Kaattari, S. L. (2011b). The differential dynamics of antibody subpopulation expression during affinity maturation in a teleost. *Fish & shellfish immunology*, *30*(1), 372-377.
- Yeh, D.-W., Liu, Y.-L., Lo, Y.-C., Yuh, C.-H., Yu, G.-Y., Lo, J.-F., . . . Chuang, T.-H. (2013). Toll-like receptor 9 and 21 have different ligand recognition profiles and cooperatively mediate activity of CpG-oligodeoxynucleotides in zebrafish. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *110*(51), 20711-20716.

- Yu, Y., Wang, Q., Huang, Z., Ding, L. & Xu, Z. (2020). Immunoglobulins, mucosal immunity and vaccination in teleost fish. *Frontiers in immunology*, 2597.
- Zapata, A., Torroba, M., Vicente, A., Varas, A., Sacedon, R. & Jimenez, E. (1995). The relevance of cell microenvironments for the appearance of lympho-haemopoietic tissues in primitive vertebrates. *Histology and histopathology*.
- Zhang, J., Kong, X., Zhou, C., Li, L., Nie, G. & Li, X. (2014). Toll-like receptor recognition of bacteria in fish: ligand specificity and signal pathways. *Fish & shellfish immunology*, 41(2), 380-388.
- Zhang, J., Liu, S., Rajendran, K., Sun, L., Zhang, Y., Sun, F., . . . Liu, Z. (2013). Pathogen recognition receptors in channel catfish: III Phylogeny and expression analysis of Toll-like receptors. *Developmental & Comparative Immunology*, 40(2), 185-194.
- Zhang, Y.-A., Salinas, I., Li, J., Parra, D., Bjork, S., Xu, Z., . . . Sunyer, J. O. (2010). IgT, a primitive immunoglobulin class specialized in mucosal immunity. *Nature immunology*, 11(9), 827-835.
- Zhou, Z.-x., Zhang, B.-c. & Sun, L. (2014). Poly (I: C) induces antiviral immune responses in Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) that require TLR3 and MDA5 and is negatively regulated by Myd88. *PLoS One*, 9(11), e112918.
- Zhu, L.-y., Lin, A.-f., Shao, T., Nie, L., Dong, W.-r., Xiang, L.-x. & Shao, J.-z. (2014). B cells in teleost fish act as pivotal initiating APCs in priming adaptive immunity: an evolutionary perspective on the origin of the B-1 cell subset and B7 molecules. *The Journal of Immunology*, 192(6), 2699-2714.
- Zou, J., Gorgoglione, B., Taylor, N. G., Summated, T., Lee, P.-T., Panigrahi, A., . . . Hassan, M. U. (2014). Salmonids have an extraordinary complex type I IFN system: characterization of the IFN locus in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* reveals two novel IFN subgroups. *The Journal of Immunology*, 193(5), 2273-2286.
- Zou, J. & Secombes, C. J. (2011). Teleost fish interferons and their role in immunity. *Developmental & Comparative Immunology*, 35(12), 1376-1387.
- Zwollo, P. (2018). The humoral immune system of anadromous fish. *Developmental & Comparative Immunology*, 80, 24-33.
- Zwollo, P., Cole, S., Bromage, E. & Kaattari, S. (2005). B cell heterogeneity in the teleost kidney: evidence for a maturation gradient from anterior to posterior kidney. *The Journal of Immunology*, 174(11), 6608-6616.
- Østergaard, A. E., Martin, S. A., Wang, T., Stet, R. J. & Secombes, C. J. (2009). Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) possess multiple novel immunoglobulin-like transcripts containing either an ITAM or ITIMs. *Developmental & Comparative Immunology*, 33(4), 525-532.

Appendiks I

Real time RT-PCR analyserapport fra Pharmaq Analytiq. Resultat fra qPCR analyse hvor uttaksfisken ble screenet for ILAV, IPNV, PRV, SAV, PMCV, SGPV, ILAV HPR0, Branchiomonas cysticola, og clavo-chlamydia salmonicola. Det ble påvist moderat mengde Clavo-chlamydia salmonicola på gjellene til samtlige individer testet (n=5 for fisk fra gruppen vi fikk forsøksfisk fra), fisken screenet negativt for resterende agens.

PHARMAQ
Analytiq **Real time RT-PCR analyserapport** Rapport nr.: 20-3777-P

Informasjon fra kunde

Firma	HAVBRUKSSTASJONEN I TROMSØ AS	Lokalitet	INDRE KÅRVIK LAND
		Lokalitetnr.	10767
Fiskeart	Laks	Vev	Gjelle, Hjerte, Nyre
Stamme		Generasjon	2019
Uttaksdato	15.06.2020	Antall prøver	45
		Prosjekt	Helseovervåkning nr. 2
Rapportmottaker	Astrid-Elisabeth Christiansen Hanssen	E-post	astrid.chr.hanssen@havbruksstasjonen.no

Informasjon fra PHARMAQ Analytiq

Prøve mottatt	07.07.2020	Analyseperiode	07.07.2020 - 14.07.2020, Lab: Bergen
----------------------	------------	-----------------------	--------------------------------------

Oppsummering av analyseresultater

Agens	Vev	Antall analyser	Antall positive	Godkjente
CLAVOchl-PA*	Gjelle	15	6	15
BRANCHIOc-PA*	Gjelle	15	0	15
ILAVHPR0-PA*	Gjelle	15	0	15
IPNV-PA	Nyre	15	0	15
ILAVa-PA	Hjerte	15	0	15
PRV-PA*	Hjerte	15	0	15
SGPV-PA*	Gjelle	15	0	15
PMCV-PA	Hjerte	15	0	15
SAVuni-PA	Hjerte	15	0	15

Resultater markert med * omfatter tjenester som ikke er dekket av akkrediteringen.
For detaljert informasjon om analyse, se neste side.
Kunden står fri til å kopiere denne analyserapporten, men ufullstendig gjengivelse må ha skriftlig godkjenning fra laboratoriet.
Laboratoriet er akkreditert av Norsk Akkreditering med registreringsnummer TEST 257


PHARMAQ Analytiq
Bergen, 14.07.2020

Elisabeth Plünnecke (sign.)
Laboratorieingeniør / Laboratory technician

PHARMAQ Analytiq tar ansvar for korrekte analyseresultater basert på det innsendte materialet i henhold til gjeldende prosedyrer og metodologi. Bruk av resultatene er utenfor PHARMAQ Analytiq sitt ansvarsområde. Rapporten leveres i henhold til vilkårene i våre salgs- og leveringsvilkår som finnes på www.pharmaq-analytiq.com

PHARMAQ Analytiq
Thormøllensgate 53D-5006 Bergen-Norway

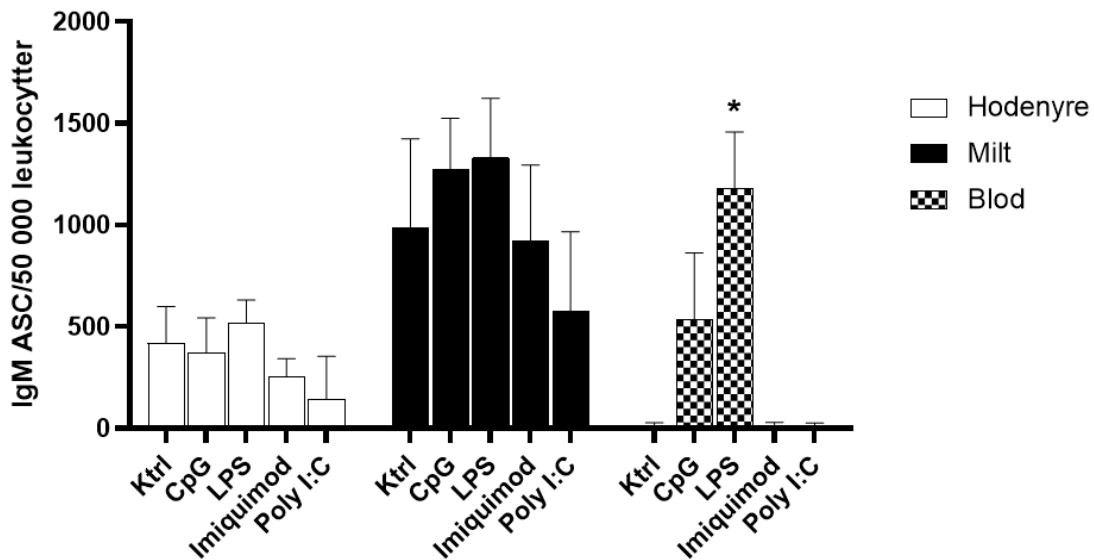
Side 1 av 10



Figur: Forside fra Real time RT-PCR analyserapport for screening av forsøksfisken. CLAVOchl-PA = Chlavo-chlamydia, BRANCHIOc-PA = branchiomonas cysticola, ILAVHPR0-PA = avirulent infeksiosøst lakseanemivirus, IPNV-PA = Infeksiosøst pankreas nekrose virus, ILAVa-PA = Inefksiosøst lakseanemi virus, PRV-PA = Piscine orthoreovirus, SGPV-PA = Salmon gill poxvirus, PMCV-PA = Piscine myocarditis virus, SAVuni-PA = Salmonid alphavirus

Appendiks II

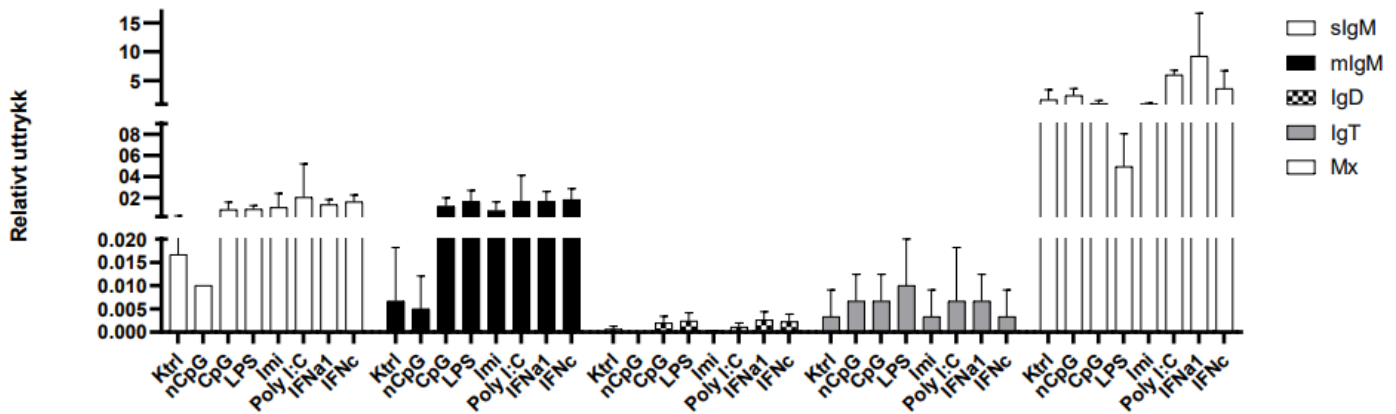
IgM-ELISpot analyse av leukocytter fra hodenyre, milt og blod, stimulert i seks dager med CpG, LPS, imiquimod og poly I:C.



Figur: Effekten av stimulering med ulike TLR-ligander på andelen IgM-ASC i leukocyttopulasjonen fra hodepyre, milt og blod fra frisk, uvaksinert atlantisk laks. Leukocytter ble isolert og sådd ut i 96-brønnersbrett (1 million leukocytter/brønn) og stimulert med CpG (2 μ M), LPS (50 μ g/ml), imiquimod (5 μ g/ml) og poly I:C (10 μ g/ml) i seks dager ved 15°C. Leukocytene ble høstet og sådd ut i duplikater (50 000 leukocytter/brønn) i ELISpot-plate coatet med anti-IgM. Videre ble protokoll for ELISpot beskrevet i material og metode fulgt. Søylene representerer gjennomsnittsverdier av antall IgM-ASC \pm standardavvik (n=4) Signifikansnivået er satt til 0,05 der P<0,05 tilsvare (*).

Appendiks III

qPCR-analyse av leukocytter fra blod stimulert i 48 timer med nCpG, CpG, LPS, imiquimod, poly I:C, IFN α 1 og IFN γ .



Figur: Relativt uttrykk av sIgM, mIgM, IgD, IgT og Mx fra isolerte leukocytter fra blod hos frisk, uvaksinert atlantisk laks. Leukocytene ble stimulert med nCpG (2 μ M), CpG (2 μ M), LPS (50 μ g/ml), imiquimod (1 μ g/ml), poly I:C (1 μ g/ml), IFN α 1 (1000 enheter/ml), IFN γ (1000 enheter/ml) i 48 timer. Videre ble leukocytene høstet og RNA ble isolert og cDNA syntetisert. qPCR ble kjørt for genene ELFa1, sIgM, mIgM, IgD, IgT og Mx. (n=3). Signifikansnivå er satt til 0,05 der P<0,05 tilsvarer (*).

Appendiks IV

Ulike genuttrykk i leukocytter fra hodenyre og blod stimulert med TLR-ligander og IFNer

Tabell 1. Ct-verdier for hodenyreleukocytter ved ulik stimulering. Tabellen viser Ct-verdier (laveste og høyeste verdi) samt gjennomsnitt mellom alle verdier for genuttrykk av ELF1aB, sIgM, mIgM, IgD, IgT og Mx i leukocytter høstet etter 24 og 48 timer med stimulering. (A) Kontroll og celler stimulert med non-CpG. (B) Leukocytter stimulert med CpG og LPS (C) leukocytter stimulert med imiquimod og poly I:C. (D) leukocytter stimulert med IFN α 1 og IFN γ .

A)

Gen	Kontroll				Non-CpG			
	24 timer		48 timer		24 timer		48 timer	
	Variasjon	Snitt	Variasjon	Snitt	Variasjon	Snitt	Variasjon	Snitt
<i>ELF1aB</i>	18,1-19,6	20,14609146	16,0-17,3	16,69928932	18,8-21,9	19,99770037	17,0-18,1	17,69198608
<i>sIgM</i>	20,8-26,0	23,18190765	19,0-19,9	19,4742864	21,4-26,3	23,47813416	19,6-21,0	19,85452779
<i>mIgM</i>	21,2-26,2	23,43909009	19,3-19,9	19,69132996	22,1-25,4	23,44643911	19,5-20,6	19,9664917
<i>IgD</i>	28,7-33,6	30,83403206	27,3-30,3	28,78014247	29,0-32,8	30,44041189	25,7-29,8	28,0375824
<i>IgT</i>	25,2-30,7	27,41675186	23,1-23,4	23,3016758	25,5-28,5	26,78478305	21,7-24,2	23,28513336
<i>Mx</i>	22,8-28,0	24,85595767	20,6-22,8	21,55241712	23,4-26,7	25,14749972	20,2-21,4	20,8652019

B)

Gen	CpG				LPS			
	24 timer		48 timer		24 timer		48 timer	
	Variasjon	Snitt	Variasjon	Snitt	Variasjon	Snitt	Variasjon	Snitt
<i>ELF1aB</i>	19,1-21,8	19,98811849	16,5-23,3	18,90190379	17,3-24,9	20,29483732	15,7-15,9	15,85188325
<i>sIgM</i>	22,4-25,0	23,36933072	19,8-39,1	26,63963509	20,0-27,8	23,24201012	17,7-20,0	18,91739019
<i>mIgM</i>	22,4-25,1	23,41883151	19,7-24,5	21,45074399	20,4-28,5	23,66709264	18,0-19,9	18,98787626
<i>IgD</i>	28,9-32,7	30,40064621	26,0-28,0	27,57154401	27,1-35,8	30,67975171	26,2-28,0	27,0848484
<i>IgT</i>	25,9-28,6	26,98924573	23,7-33,0	26,93693924	24,2-31,6	27,53933843	22,3-23,2	22,83711878
<i>Mx</i>	20,1-22,3	20,89347903	18,2-23,9	20,30032476	24,3-30,0	26,63444265	20,1-22,9	21,58554268

C)

Gen	Imiquimod				Poly: IC			
	24 timer		48 timer		24 timer		48 timer	
	Variasjon	Snitt	Variasjon	Snitt	Variasjon	Snitt	Variasjon	Snitt
<i>ELF1aB</i>	17,4-19,2	18,57982763	15,5-17,0	16,3729922	18,9-20,1	19,51789665*	17,9-20,2	19,13008626
<i>sIgM</i>	20,7-22,7	21,67084058	18,4-20,3	19,59332021	21,8-26,9	23,88200887	19,5-22,4	20,96249898
<i>mIgM</i>	21,0-23,0	21,93778292	18,8-20,0	19,54965909	22,1-24,1	23,12922096	19,3-22,7	21,04892794
<i>IgD</i>	29,1-31,3	30,47239176	28,0-30,7	29,79788844	28,6-31,1	30,21297709	27,6-34,4	31,56315231
<i>IgT</i>	24,9-27,7	26,51798757	22,8-24,1	23,58725293	26,2-27,2	26,81354841	23,2-27,5	25,37921206
<i>Mx</i>	19,0-20,1	19,80996068	17,6-19,0	18,43239594	19,6-20,8	20,04881477	18,0-21,5	19,63732656

D)

Gen	IFN α 1				IFN γ			
	24 timer		48 timer		24 timer		48 timer	
	Variasjon	Snitt	Variasjon	Snitt	Variasjon	Snitt	Variasjon	Snitt
<i>ELF1aB</i>	18,8-21,5	19,93013954	16,5-17,4	16,98532804	18,9-21,2	19,96910795	16,2-17,4	16,75857417
<i>sIgM</i>	21,5-25,1	23,03334618	18,6-20,2	19,35836093	22,3-23,9	23,06386248	19,0-20,4	19,42974854
<i>mIgM</i>	21,9-25,6	23,44066111	18,9-20,3	19,47589811	22,9-24,3	23,50222715	19,1-20,6	19,62507566
<i>IgD</i>	28,8-33,3	30,61992709	28,3-29,5	28,6843427	29,7-30,8	30,10172526	27,3-28,9	27,91392008
<i>IgT</i>	25,6-28,4	26,68774033	22,9-24,1	23,58926201	25,5-27,6	26,42132187	22,9-23,6	23,17903646
<i>Mx</i>	18,9-21,6	20,13361677	16,1-17,4	16,94796817	20,0-22,5	21,00203768	17,0-18,0	17,62537575

Tabell 2. Ct-verdier for blodleukocytter ved ulik stimulering. Tabellen viser Ct-verdier (laveste og høyeste verdi) samt gjennomsnitt mellom alle verdier for genuttrykk av ELF1aB, sIgM, mIgM, IgD, IgT og Mx i leukocytter høstet etter 24 og 48 timer etter stimulering. (A) Kontroll og celler stimulert med non-CpG. (B) Leukocytter stimulert med CpG og LPS (C) leukocytter stimulert med imiquimod og poly I:C. (D) leukocytter stimulert med IFN α 1 og IFN γ .

A)

Gen	Kontroll				Non-CpG			
	24 timer		48 timer		24 timer		48 timer	
	Variasjon	Snitt	Variasjon	Snitt	Variasjon	Snitt	Variasjon	Snitt
<i>ELF1aB</i>	17,8-19,9	19,2409732	26,3-27,7	27,0468763**	18,1-21,6	19,8128834	28,3-31,6	29,79802**
<i>sIgM</i>	21,2-25,0	23,5083192	32,9-34,4	33,4901797**	21,4-25,1	23,5117353	35,8-36,5*	24,0793126**
<i>mIgM</i>	19,9-24,4	22,1936347	32,0-37,5	35,2997615**	20,2-24,8	22,3638522	36,7-37,6	37,0557493**
<i>IgD</i>	24,5-29,5	26,9150003	37,3-39,2	38,3252144**	24,7-30,3	27,093188	34,9-36,5*	23,8257955**
<i>IgT</i>	26,3-29,0	28,0415961	35,1-37,6	36,559227**	26,6-30,8	28,7038689	36,7-39,7	37,8345375**
<i>Mx</i>	21,1-22,6	21,9905192	25,9-27,9	26,9627088**	22,4-20,6	21,7436256	26,6-30,5	28,6456477**

B)

Gen	CpG				LPS			
	24 timer		48 timer		24 timer		48 timer	
	Variasjon	Snitt	Variasjon	Snitt	Variasjon	Snitt	Variasjon	Snitt
<i>ELF1aB</i>	16,9-19,7	18,3820012	17,8-19,2	18,6924362**	18,2-20,1	18,3820012	17,8-19,8	19,1182162**
<i>sIgM</i>	22,2-24,8	23,7519175	20,3-23,9	22,6010825**	21,8-24,3	23,0487569	21,2-24,0	22,7278023**
<i>mIgM</i>	20,7-24,2	22,3076032	20,1-23,8	22,0161489**	20,2-23,2	21,839901	20,5-23,6	21,9565856**
<i>IgD</i>	24,9-29,2	26,9960899	26,3-30,6	28,1444728**	24,8-28,6	26,6296635	26,3-30,6	28,262476**
<i>IgT</i>	25,6-29,7	27,4239502	24,4-27,6	26,2399591**	26,7-29,3	28,1257954	25,4-28,0	26,902895**
<i>Mx</i>	19,4-20,9	19,8792013	18,5-19,3	18,7748394**	19,9-20,3	20,1665688	20,2-20,6	20,4322503**

C)

Gen	Imiquimod				Poly			
	24 timer		48 timer		24 timer		48 timer	
	Variasjon	Snitt	Variasjon	Snitt	Variasjon	Snitt	Variasjon	Snitt
<i>ELF1aB</i>	19,0-21,7	19,9303608	19,7-20,7	20,1933657**	18,5-21,0	19,8555342	24,7-25,8	25,2042319**
<i>sIgM</i>	22,0-26,3	24,3018481	22,6-25,8	24,3132706**	21,9-25,9	24,2274818	25,5-31,3	29,3447247**
<i>mIgM</i>	21,9-26,5	24,0000242	23,2-26,2	24,685372**	20,9-25,4	22,9514052	25,9-31,6	29,5040925**
<i>IgD</i>	28,3-34,3	30,7233626	32,7-33,5	32,7660828**	24,8-30,6	27,27705	34,0-36,5	35,3745995**
<i>IgT</i>	25,7-30,3	27,4995569	26,0-30,5	27,7862631**	26,5-31,2	28,9120941	32,2-36,5	34,7727763**
<i>Mx</i>	19,4-20,7	20,0856482	19,5-20,8	20,276577**	18,8-20,1	19,5865459	22,0-23,4	22,6308702**

D)

Gen	IFN α 1				IFN γ			
	24 timer		48 timer		24 timer		48 timer	
	Variasjon	Snitt	Variasjon	Snitt	Variasjon	Snitt	Variasjon	Snitt
<i>ELF1aB</i>	19,0-21,5	20,1046651	18,4-22,8	20,8953342**	18,6-21,6	20,1309853	18,1-22,8	20,8419075**
<i>sIgM</i>	22,0-25,7	23,9318638	21,7-25,2	23,8439903**	21,8-25,5	24,0161572	21,5-25,0	23,5607554**
<i>mIgM</i>	21,0-25,1	22,7677339	21,1-25,4	23,7293193**	20,6-25,3	22,856575	21,2-24,6	23,4588979**
<i>IgD</i>	25,2-30,5	27,2220624	26,3-31,9	29,7984034**	24,5-30,1	26,9998461	26,0-32,1	29,9585985**
<i>IgT</i>	27,0-30,5	28,4707813	25,9-30,0	28,5924664**	26,7-31,0	28,7752673	26,1-30,0	28,6147753**
<i>Mx</i>	18,6-18,7	18,6754831	17,6-19,3	18,4599101**	19,4-19,9	19,6896426	19,0-20,8	19,8466269**

*= mangler én verdi

**= tatt vekk verdier fra datasettet.

