



UiT Norges arktiske universitet

Fakultet for biovitenskap, fiskeri og økonomi, Norges Fiskerihøgskole

Immunstatus hos fertil og steril laks under sjøfasen

En komparativ oversikt

Guro Aalstad Ørnhaug

Masteroppgave i Akvamedisin BIO-3955 60 (stp) Mai 2022

Innholdsfortegnelse

1	Innledning.....	1
1.1	Introduksjon	1
1.2	Ny metode for sterilisering av laks	2
1.3	Immunsystemet hos fisk.....	4
1.4	Interaksjoner mellom reproduksjonsaksen og immunsystemet	6
1.5	Genuttrykk.....	7
1.5.1	Housekeeping genes	7
1.5.2	Immungener som ble undersøkt i forsøket.....	8
1.5.3	Metyltransferasegener	10
1.5.4	Hvorfor disse genene blir studert	11
1.6	Global metylering.....	12
1.7	Formål med oppgaven.....	13
2	Material og metode.....	15
2.1	Forsøksoppsett og prøveuttak av vevsprøver på RNAlater.....	15
2.2	RNA-isolering ved hjelp av RNeasy Mini Kit.....	16
2.3	Fortynning av RNA og cDNA-syntese	16
2.4	Kvantitativ real-time PCR (qPCR).....	17
2.4.1	Primere	18
2.4.2	Real-time qPCR analyse.....	19
2.5	Global DNA Methylation (5-mC) ELISA Assay	20
2.5.1	Rensing og isolering av totalt DNA	20
2.5.2	Enzyme-linked immunosorbent assay.....	20
2.6	Statistisk analyse og grafisk fremstilling	22
3	Resultater.....	24
3.1	Genuttrykk av immungener.....	24
3.2	Uttrykk av metyltransferasegener	34

3.3	Korrelasjon mellom immungener.....	35
3.4	Global DNA-metylering.....	42
4	Diskusjon.....	45
4.1	Uttrykk av immungener	45
4.1.1	Major Histocompatibility complex (MHC).....	45
4.1.2	T-cellereseptor.....	46
4.1.3	Immunoglobulin	47
4.1.4	Cytokiner	49
4.1.5	Peroxyredoksiner.....	52
4.2	Samvariasjon i genuttrykk.....	52
4.3	Global Metylering	55
4.3.1	Uttrykk av metyltransferaser	55
4.3.2	DNA-metylering.....	57
5	Konklusjon	60
	Referanseliste	62
	Appendix I.....	68
	Appendix II	69
	Appendix III	70
	Appendix IV	71
	Appendix V	72
	Appendix VI.....	73
	Appendix VII.....	74
	Appendix VIII.....	75
	Appendix IX.....	76

Forord

Arbeidet i denne masteroppgaven ble utført ved Norges Fiskerihøgskole, fakultet for biovitenskap, fiskeri og økonomi, UiT Norges arktiske universitet, i samarbeid med Nofima – Norsk institutt for mat, fiskeri og havbruksforskning.

Jeg vil rette en stor takk til min veileder Jaya Kumari Swain og biveileder Helge Tveiten for at jeg har fått tatt del i dette prosjektet, og for all veiledning under analyse av data og under skriveprosessen. Jeg vil takke Linn Greiner-Tollersrud for hjelp og veiledning med real-time qPCR.

Jeg vil til slutt takke min medstudent Katarina Sævareid for samarbeidet under denne prosessen og ikke minst for fem fine år på studiet.

Sammendrag

Rømning av oppdrettslaks medfører til uønsket genetisk innblanding i den ville laksebestanden, noe som resulterer i dårligere ytelse og overlevelse hos den ville laksen. I tillegg er kjønnsmodning av oppdrettslaksen et velferdsproblem, da dette medfører en rekke negative effekter for fisken, blant disse redusert vekst, immunrespons og hypomosome regulatoriske evner. En mulig løsning på disse problemene er å ta i bruk steril fisk innen kommersiell oppdrett. Dersom produksjon av steril fisk skal benyttes for å løse disse utfordringene, er det helt essensielt å benytte en steriliseringsmetode som ikke går på bekostning av fiskehelsen. Tidligere har kun triploidisering vært brukt for å produsere steril atlantisk laks innen akvakultur, men denne metoden har resultert i fisk med dårligere ytelse enn den fertile oppdrettslaksen. Det er derfor nødvendig å finne nye metoder for å produsere steril fisk. Gjennom prosjektet "Salmosterile" har Nofima AS utviklet en metode for å forhindre dannelsen av kjønnsellelinjen på embryonalstadiet, som har resultert i steril atlantisk laks. For å ta i bruk denne steriliseringsmetoden under storskala produksjon av laks, er det viktig å evaluere effektene et tap av kjønnseller har på fysiologiske prosesser og systemer i fisken. Det er blant annet viktig å se på ytelsen til immunsystemet hos den sterile laksen, og om uttrykket av immungener som beskytter fisken mot patogener og parasitter er tilsvarende det hos den fertile laksen. I dette forsøket ble steril kimcellefri laks sammenlignet med vanlig fertil laks i forhold til uttrykk av gener og global metylering av DNA, fra fisk under sjøfasen. Prøver ble tatt fra fisk som hadde gått på sjøvann i over et år, og fem måneder i åpne merder. Prøvene ble analysert ved qPCR for å se på hvordan bortfallet av kjønnseller påvirket uttrykket av 12 ulike gener. Resultatene viste at bortfallet av kjønnseller i liten grad påvirket uttrykket av genene studert. Global metylering av DNA ble også studert ved ELISA for å se om bortfallet av kjønnseller påvirket graden av metylering av DNA hos den sterile fisken sammenlignet med den fertile fisken. Her ble det funnet endringer mellom sterilitetsgruppene blant hunnfisk. Siden det ble funnet lite forskjeller mellom den sterile og den fertile laksen, er dette lovende for videre produksjon av steril fisk ved en knockdown av den maternale faktoren Dead End, noe som er viktig for at oppdrettsnæringen skal kunne fortsette å vokse på en bærekraftig måte.

1 Innledning

1.1 Introduksjon

Veksten til oppdrettsnæringen har eksplodert siden starten på 70-tallet og er i dag en av de største industriene i Norge. I 2020 hadde næringen en samlet førstehandsverdi på omlag 69 milliarder kroner. Som en av verdens største oppdrettsnasjoner, har Norge en viktig rolle som produsent av bærekraftig mat globalt (Regjeringen, 2021).

En av de største bekymringene knyttet til oppdrett av atlantisk laks (*Salmo salar* L.) er rømming av oppdrettsfisk. Hvert eneste år registreres det rømming av flere hundretusen oppdrettslaks (Føre & Thorvaldsen, 2021). Hovedbekymringen knyttet til dette er at innkryssninger av oppdrettslaks i den ville laksebestanden vil endre den genetiske integriteten til den ville laksepopulasjonen, medføre reduserte lokale tilpasninger og påvirke populasjonens kondisjon i negativ retning. En del av den rømte oppdrettslaksen finner veien til villaksens gyteområder, og det er dokumentert innkryssninger i den ville bestanden. Dette kan ha flere konsekvenser, blant annet redusert genetisk variasjon og lavere overlevelse blant avkommet (Taranger et al., 2014). Norge har forpliktet seg til å forvalte villaksen, og dersom det skal sikres at havbruk ikke bidrar til varige endringer i de genetiske egenskapene til villfiskbestandene, må fremtidig oppdrett baseres på produksjon av steril oppdrettslaks (Tveiten et al., 2015).

For industrien er kjønnsmodning hos oppdrettslaksen både et økonomisk og velferdsproblem. Tidlig kjønnsmodning gir negative effekter på vekst, filetkomposisjon, atferd, helse og overlevelse hos fisken (Taranger et al. 2010). Når fisken kjønnsmodnes vil den prioritere vekst og opprettholdelse av gonadene. Fôrintaket vil bli drastisk redusert eller stoppe helt opp, og begge disse faktorene vil medføre redusert somatisk vekst. Kjønnsmodningen kan påvirke fiskens immunsystem og helse. Når fisken kjønnsmodnes vil aktiviteten til kjønnssteroider, kortisol og veksthormoner endres og fiskens atferd endres. Dette kan gi agonistisk atferd som involverer dannelse av dominant fisk, som gjør fisken mer utsatt for infeksjoner. Kjønnsmodningen kan også påvirke fiskens hypo-osmoregulatoriske evner, altså vil evnen til å opprettholde saltbalansen svekkes og dette medfører dehydrering eller dødelighet (Taranger et al., 2010).

Bruken av steril fisk i oppdrettsnæringen har vært foreslått som et tiltak for å minimere den genetiske påvirkningen oppdrettslaks har på den ville laksepopulasjonen (Cotter et al., 2000). Oppdrett av steril fisk vil også kunne løse noen av utfordringene knyttet til dårlig fiskevelferd ved tidlig kjønnsmodning. Den eneste kommersielt tilgjengelige metoden for å produsere steril laks er via triploidisering av nylig befruktede egg (Golpour et al., 2016). Triploidiseringen induseres ved å eksponere de befruktede eggene for hydrostatisk trykk, dette resulterer i triploide egg med to sett kromosomer; ett sett fra hunnen og et sett fra hannen, noe som gir funksjonelt steril fisk (Madaro et al., 2021). Det er registrert flere utfordringer ved den triploide laksen, blant annet har den lavere toleranse til høye vanntemperaturer i sjøvann, er mer følsom for lave oksygenkonsentrasjoner, har en redusert vekst og er mer utsatt for skjelettdeformiteter sammenlignet med den diploide laksen (O'Flynn et al., 1997; Riseth et al., 2020). Sett i et velferdsperspektiv er frekvensen av fisk som viser tegn til alvorlige velferdsproblemer for høy, og i tillegg til dette er også dødeligheten til den triploide laksen for høy (Madaro et al., 2021).

1.2 Ny metode for sterilisering av laks

Til dags dato er sterilisering via triploidisering den eneste metoden som er kommersielt tilgjengelig for å produsere steril fisk. Siden det er flere negative aspekter ved den triploide laksen, er det ønskelig å finne en ny kommersiell metode for å produsere steril atlantisk laks. Et alternativ til denne metoden er å fjerne kjønnscellene til fisken slik at den ikke får dannet funksjonelle gonader. Primordiale kimceller (PGCs) er kjønnscellenes stamceller og disse er forløperne til alle gameter. Tidlig under embryogenesen vil kjønnscellelinjen dannes og PGCene migrere til området hvor gonadene dannes (Gross-Thebing et al., 2017).

Spesifisering av PGCene hos teleoster involverer en rekke maternale faktorer som legges ned i oocytten før befruktning og disse er derfor kritiske for etablering av kjønnscellelinjen. De maternale faktorene, både som mRNA og proteiner, ligger i oocyttens cytoplasma og utgjør det en kaller "germ plasm". Maternale faktorer som er sentrale i dannelsen av kimcellene er Nanos, Dead End (Dnd), Dazl og Vasa (Tveiten et al., 2015).

Dnd er kritisk for migrering og overlevelse av PGCene (Weidinger et al., 2003) og bortfall av dette proteinet kan resultere i steril fisk (Slanchev et al., 2005). Gjennom studier gjort på zebrafisk (*Danio rerio*) er det funnet at proteinet Dnd spiller en viktig rolle i utviklingen av kjønnscellelinjen. Under migrasjonsprosessen eksponeres de primordiale kimcellene for en rekke signaler som kan lede til differensiering til somatiske celler. Dnd beskytter kimcellene

slik at de når gonadene og kan differensieres til sperm og eggceller, dette ved at Dnd inhiberer somatisk differensiering til andre celletyper (Gross-Thebing et al., 2017). Dnd beskytter også mRNA som er spesifikk for kimcellelinjen mot miRNA-mediert degradering (Gross-Thebing et al., 2017).

Det er to effektive metoder for å forstyrre genereringen av genprodukter, enten via en midlertidig "knockdown" eller permanent "knockout" av genet. Knockdown-metodene er rettet mot mRNA og endrer ikke genene på DNA-nivå, dette gir ikke varige endringer på fiskens DNA (Pauli et al., 2015). En knockdown-basert metode for sterilisering, er bruken av antisens-oligonukleotider, såkalte Gapmer. Disse antisensmolekylene består av modifisert RNA i hver side og et "gap" av DNA i midten. RNA-delene øker affiniteten til komplementært RNA og DNA-delen står for RNaseH-mediert degradering av det komplementære RNAet (Pauli et al., 2015). Knockout-teknologier endrer DNA-lokuset til et gen ved å enten introdusere et prematurt stopp-kodon eller å fjerne hele lokuset, dette gir mutantorganismer (Pauli et al., 2015). Tidligere studier har kun analysert funksjonen til Dnd når maternalt og zygotisk Dnd-mRNA går midlertidig tapt under den tidlige utviklingen ved knockdown av genet (Wargelius et al., 2016). Det har blitt gjort forsøk på atlantisk laks for å finne ut hva knockout av Dnd har å si for steriliteten. CRISPR/Cas9-systemet er et genredigeringsverktøy brukt til å mutere genet for Dnd. Knockout av Dnd førte til et fullstendig bortfall av PGCer og steril fisk, dette viste at maternalt RNA ikke kan kompensere for et zygotisk tap av genet. CRISPR/Cas9-systemet kan dermed brukes for å finne nye steriliseringsmetoder hos atlantisk laks (Wargelius et al., 2016). I et forsøk av Skugor et al., (2014) ble det rapportert at en midlertidig inhibering av Dnd medførte til endringer i genuttrykk av en rekke andre gener involvert i viktige fysiologiske prosesser, som blant annet steroidmetabolisme, lipidmetabolisme og dannelsen av kjønnssteroider. Disse funnene indikerer at manipulering av gonadeutvikling kan gi uønskede bivirkninger som har en negativ innvirkning på fiskens fysiologi og ytelse (Skugor et al., 2014).

Gjennom prosjektet "Salmosterile" (Norges forskningsråd; BIOTEK 2021(2013-18)) har forskningsinstituttet Nofima utviklet en metode for å forhindre dannelsen av kjønnscellelinjen hos atlantisk laks. Denne metoden baserer seg på en midlertidig knockdown av Dnd mRNA på et tidlig utviklingsstadium via GapmeR antisenseteknologi. Spesifikke GapmeR`er har blitt mikroinjisert til befruktete egg og resulterte i et tilnærmet fullstendig bortfall av Dnd mRNA. Dette resulterer i en effektiv fjerning av PGCene og dermed utvikling av fiskelarver som

mangler kimceller, det har blitt påvist fullstendig fjerning av kimceller hos omtrent 90% av de behandlede individene (H. Tveiten, upublisert forskning). En viktig forutsetning for å kunne bruke denne teknologien i en fullskala produksjon, er at fiskens produksjonsytelse er like god som den fertile oppdrettslaksen. En behandling som denne kan resultere i uønskede endringer i fiskens fysiologi, og det er derfor nødvendig å undersøke denne fisken nærmere.

1.3 Immunsystemet hos fisk

Infeksiøse sykdommer er et stort problem og et av de største tapsområdene ved kommersiell oppdrett. Fiskens evne til å bekjempe patogener er en av hovedfaktorene som avgjør suksessen ved lakseproduksjonen (Krasnov et al., 2020). Et velutviklet immunsystem er derfor essensielt. Immunsystemet til fisk består av flere nivå av forsvarsmekanismer og fisk har både et medfødt og adaptivt immunsystem (Rauta et al., 2012).

Det medfødte immunforsvaret regnes som førstelinjeforsvaret mot patogener. Det består av fysiske barrierer som forhindrer patogener som bakterier og virus i å komme inn i organismen. Huden, gjellene og fordøyelseskanalen er viktige barrierer mot mikroorganismer fordi disse er i konstant kontakt med det ytre miljøet (Uribe et al., 2011). Dersom patogenene klarer å bryte barrierene, består det medfødte immunforsvaret også av mange mønstergjenkjennelsesreseptorer (MGR), immunceller og antimikrobielle molekyler. MGR kjenner igjen patogen-assosierte molekylære mønstre (PAMPs) og dette stimulerer cellene som uttrykker MGR til å skille ut cytokiner som kan initiere inflammasjon eller rekruttere andre celletyper (Abbas et al., 2014). Cytokinene fungerer som signalmolekyler som har som funksjon å modulere immunresponsen, dette ved at de regulerer fagocyttenes evne til å ødelegge patogener og de regulerer antigenpresenterende celler (APC) og deres migrasjon til lymfevev for å aktivere adaptive immunresponser (Wang & Secombes, 2013). De mest studerte cytokinene hos fisk er interferonene og interleukinene (Uribe et al., 2011).

Hvis patogenene unnviker det medfødte immunforsvaret, vil det adaptive immunforsvaret beskytte organismen. Det adaptive immunforsvaret aktiveres av den medfødte responsen og denne delen av immunforsvaret er spesielt viktig ved tilbakevendende infeksjoner ved at det dannes hukommelsesceller og ved spesifikke løselige og membranbundne reseptorer som T-cellerreseptorer og immunoglobuliner (Ig) som tillater en rask og effektiv eliminering av spesifikke fiskepatogener (Rauta et al., 2012).

Hos pattedyr er beinmargen og lymfeknutene viktige immunologiske organer, beinfisk derimot mangler disse. Hos fisk fungerer hovedsakelig nyre, milt, tymus og mucosa-assosierte lymfevev som gjeller, hud og tarm som lymfoide vev (Press & Evensen, 1999). Hos teleoster er hodenyre og milt regnet som primære og sekundære lymfeorganer. Nyrene er lokalisert utenpå rygveggen i kroppshulen. Den fremste delen av nyren kalles hodenyren og denne delen mangler ekskretorisk vev. Hodenyren er et viktig hematopoetisk organ og har mange morfologiske likheter som beinmargen hos pattedyr. I tillegg til dette fungerer også hodenyren som et sekundært lymfeorgan (Press & Evensen, 1999). Hodenyren har høye konsentrasjoner av utviklende B-celler og lavere konsentrasjoner av antistoff-sekreterende celler. Hodenyren er ansvarlig for fagocytose, antigen-prosessering og dannelse av immunoglobulin M (IgM) og immunologisk minne i melanomakrofagiske sentre (Rauta et al., 2012). Det andre viktige lymfeorganet hos fisk er milt. Milten kan deles inn i to deler; rød og hvit pulp. Den røde pulpen utgjør størsteparten av organet og den består av retikulære cellenettverk som støtter blodfylte sinusoider. Den inneholder mange cellepopulasjoner som blant annet makrofager og lymfocytter. Hvit pulp er ofte dårligere utviklet enn rød pulp (Press & Evensen, 1999). Milten består av rikelige mengder IgM+ modne B-celler og den er har også en viktig rolle når det kommer til fjerningen av blodbårne antigener, dannelsen av immunkomplekser i ellipsoider og antigenpresentering og initiering av adaptiv immunrespons. Siden fisk mangler lymfeknuter er milten essensiell når det kommer til å fange opp antigener (antigen trapping) (Rauta et al., 2012).

Teleoster har et adaptivt immunsystem knyttet til sine mukosale kroppsoverflater kalt "mucosa-associated lymphoid tissues" (MALT). Det er beskrevet fire ulike MALTs, men de tre hovedgruppene er; "gut-associated lymphoid tissue" (GALT), "skin-associated lymphoid tissue" (SALT) og "gill-associated lymphoid tissue" (GIALT). Disse vevene består av både medfødte og adaptive immunceller og molekyler som samarbeider om å opprettholde homeostasen i slimhinnene (Salinas, 2015). De mucosa-assosierte lymfevevene i fisk er eksponert for det ytre miljøet og danner en barriere mot patogener (Dalmo et al., 1997). B-celler, plasmaceller og immunoglobuliner er spesialiserte til å beskytte det komplekse miljøet i de mukosale barrierene og det ser ut til at de fleste vertebrater har en form for IgM og immunoglobulin T (IgT) i mukosale sekreter (Salinas, 2015).

Fordøyelseskanalen er direkte tilkoblet det ytre miljøet og kan være en av hovedinngangene for patogener hos både pattedyr og teleoster. Derfor er GALT en avgjørende komponent ved det mukosale immunsystemet og dette vevet utgjør et lokalt miljø for immunrespons og

dermed beskyttelse mot patogener (Yu et al., 2020). Fordøyelseskanalen har ulik oppbygning hos forskjellige fiskearter, men den deles hovedsakelig inn i tre segmenter med ulik funksjon knyttet til fordøyelse. I tillegg til denne funksjonen, har studier vist at den bakre delen av tarmen består av flere typer immunceller, som indikerer at denne delen av tarmen er involvert i immunresponser mot patogener. Immunresponser i fordøyelseskanalen har hovedsakelig blitt undersøkt i studier for T-cellefunksjon. Hos regnbueørret har det blitt identifisert tre B-cellepopulasjoner, blant disse IgM⁺ og IgT⁺ B-celler (Yu et al., 2020).

Beinfisk har fire par gjellebuer på hver side som består av mange gjellefilamenter. Dette er en svært effektiv måte å øke kontaktflaten med vannet for å skaffe oksygen. På grunn av den direkte kontakten med vannet, står fisken hele tiden ovenfor utfordringer knyttet til miljøforurensing og patogener og slik eksponering kan utløse immunresponser i GIALT (Yu et al., 2020). Flere studier har vist at mange medfødte og adaptive immunmolekyler eller immunceller involvert i immunrelaterte responser er tilstede i gjellene hos teleoster, blant annet immunoglobulin- og antistoff-sekreterende celler. Det er funnet at IgT⁺ B-celler spiller en viktig rolle i forsvaret mot patogener. Et studie viste at en stor populasjon av bakterier i slimhinnen til gjellene hovedsakelig var dekket av sIgT, noe som indikerer at de har et spesialisert slimhinne-immunoglobulin som kan kjenne igjen kommensale bakterier på gjellene (Yu et al., 2020).

Fiskens hud er et beskyttende og aktivt vevslag som hele tiden er i kontakt med det omkringliggende miljøet. Huden består av flere celletyper som er involvert i dannelsen og opprettholdelse av den første fysiske og immunaktive barrieren hos fisk. Epidermis er fiskens overflatelag, dette laget består av slimceller som produserer antimikrobielle faktorer og keratocytter som raskt migrerer til områder der hudbarrieren brytes for å dekke eventuelle sår. Under epidermis ligger dermis, dette er et fibrøst vev bestående av blodårer. Det ytterste laget av dermis består av fiskeskjell (Karlsen et al., 2018).

1.4 Interaksjoner mellom reproduksjonsaksen og immunsystemet

Hypotalamus-hypofyse-gonadeaksen (HGP-aksen) er en sentral del av det endokrine systemet og denne regulerer og styrer reproduksjonsutviklingen hos fisk. Peptidhormonet gonadotropinfrigjørende hormon (GnRH) blir frigjort fra hypotalamus via synapser til hypofysen (Lethimonier et al., 2004). GnRH stimulerer hypofysen til å skille ut gonadotropinene follikelstimulerende hormon (FSH) og luteiniserende hormon (LH). FSH og

LH binder seg til reseptorer på gonadene og gonadene responderer ved å skille ut kjønnshormoner (Yaron & Levavi-Sivan, 2011). Hunnfisk skiller ut østradiol-17-beta og progestagenet $17\alpha,20\beta$ dihydroxy-4-pregnen-3-one (DHP) mens hannfisk skiller ut 11-ketotestosteron og DPH (Yaron & Levavi-Sivan, 2011). GnRH og kjønnssteroider er sterkt involvert i utviklingen og moduleringen av immunsystemet. GnRH og reseptoren for dette peptidhormonet produseres lokalt av immunceller i tillegg til av HPG-aksen. Dette indikerer at GnRH har en autokrin rolle. Eksogen GnRH stimulerer også immunresponser. Virkningen til kjønnshormonene under embryoutviklingen ser ut til å være viktig for programmering av immunsystemet og kjønnsforskjeller ved immunrespons. Reseptorer for kjønnshormoner er uttrykt i primære lymfeorganene og perifere immunceller. Studier har vist at østrogen forsterker humorale immunresponser mens testosteron forsterker undertrykkningen av T-celleaktivitet (Tanriverdi et al., 2003). I de fleste vertebrater ser det ikke ut til at kjønnsceller er nødvendige for produksjon av kjønnssteroider i gonadene og påfølgende utvikling av sekundære kjønnskarakteristikk. I et forsøk utført på kimcellefri atlantisk laks sterilisert ved en knockdown av Dnd, ble det funnet at dette ikke gjelder for laksen da den pubertale produksjonen av androgen- og østrogen i gonadene krever tilstedeværelse av kjønnsceller (Kleppe et al., 2017). Det er kjent at reproduksjonssystemet interagerer med immunsystemet, men det er fremdeles ukjent om et bortfall av kjønnsceller påvirker genuttrykket av andre immungener eller DNA-metylering.

1.5 Genuttrykk

1.5.1 Housekeeping genes

"Housekeeping"-gener er gener som er helt nødvendige for å opprettholde cellenes funksjoner. Ved qPCR er det flere forhold som kan påvirke tolkningen av resultatene, blant annet om det er en pålitelig ekstraksjon av like mengder av ikke-nedbrutt RNA fra hver prøve og at det er konsistent transkriptase-effektivitet som gir like mengder av cDNA i alle prøvene. Primerspesifisiteten må også være tilstrekkelig. For å løse disse utfordringene blir ofte resultatene normalisert opp mot uttrykket av "housekeeping"-genene fordi disse er stabile i genuttrykk på tvers av prøver og behandlingsgrupper (Turabelidze et al., 2010).

1.5.1.1 Elongeringsfaktor-1-alfa

"Translasjon elongeringsfaktor 1 subenhet alfa" (EF1a) er en del av det cytosoliske EF1-komplekset som har som primærfunksjon å fremme bindingen av aminoacyl-tRNA til ribosomet under translasjonen. I tillegg har dette genet flere andre funksjoner, blant annet

interagerer EF1a med actin, det mitotiske apparatet og med edoplasmatiske retikulum. EF1a er et av de mest tallrike cytoplasmiske proteinene (Gao et al., 1997). EF1a er et vanlig referansegen ved RT-qPCR (Olsvik et al., 2005).

1.5.1.2 18s RNA

18S RNA er ofte brukt som et referansegen ved RT-qPCR. Ribosomalt RNA (rRNA) utgjør 80-90% av det totale cellulære RNAet. Studier har vist at rRNA varierer mindre under forhold som påvirker uttrykket av mRNA (Olsvik et al., 2005).

1.5.2 Immungener som ble undersøkt i forsøket

1.5.2.1 Cytokiner

Cytokiner kan deles inn i en rekke grupper, blant disse type II alfa-heliske cytokiner som inkluderer underfamilien interleukin-10 (IL-10). Denne underfamilien inneholder seks interleukiner (IL-10, IL-19, IL-20, IL-22, IL-24 og IL-26), IFN- γ og type I og III IFN. Disse signaliserer via reseptorer innenfor type II cytokinreseptor-familien (Zou & Secombes, 2016). Interferoner (IFN) er cytokiner som spiller en viktig rolle i forsvaret mot virusinfeksjoner hos vertebrater (Rauta et al., 2012). Genene for IFN har blitt identifisert hos flere teleoster, inkludert atlantisk laks. Disse genene blir betraktelig oppregulert ved virusinfeksjoner (Zhang & Gui, 2012). Interferonene kan klassifiseres i tre familier; type I, II og III. Type I IFN og type II IFN er identifisert hos teleoster. Disse gruppene kan videre deles inn i flere underfamilier (Zou & Secombes, 2011). Type II IFN kalles også for interferon-gamma (IFN- γ), og denne familien av interferoner fremmer først og fremst cellemediert immunitet mot virus (Zou & Secombes, 2016). IFN- γ blir studert i dette forsøket.

Interleukiner er molekyler som er involvert i den intercellulære reguleringen av immunforsvaret. De produseres av en rekke celletyper, men mange syntetiseres av CD4⁺ T-hjelperceller, makrofager eller monocytter og endotelceller (Secombes et al., 2011). Interleukinene som blir studert i dette forsøket er IL-10 og IL-22. IL-10 er hovedsakelig et anti-inflammatorisk cytokin som fungerer som en suppressor som demper inflammatoriske responser, IL-10 har blitt identifisert hos flere teleoster (Zou & Secombes, 2016). IL-22 hos fisk er en ortolog til IL-22 hos pattedyr, og er kjent for å være involvert i det medfødte immunforsvaret mot ekstracellulære patogener og mikrober (Zou & Secombes, 2016; Kumari et al., 2015).

1.5.2.2 Peroxiredoksiner

Peroxiredoksiner (Prx) er en familie av antioksidantproteiner som også er involvert i inflammasjon og medfødt immunitet. Prx1 og Prx2 er også kjent som "Natural killer enhancing factor" (NKEF), dette pga. deres evner til å forberede NK-cellenes aktivitet hos pattedyr (Esteban et al., 2013). Hos teleoster er det funnet ortologer til Prx-genene, men reguleringen av disse er lite studert. Allikevel er rollen til NKEF-genene antydnet og det er vist at uttrykket av disse er oppregulert ved patogener som bakterier, virus og parasitter. NKEF er derfor viktig ved medfødte immunresponser mot bakterie- eller virusinfeksjoner (Esteban et al., 2013).

1.5.2.3 Major Histocompatibility Complex I og II (MHC I og MHC II)

Adaptive immunresponser initieres ved at antigenreseptorer på lymfocytter kjenner igjen antigener. T-lymfocytene kjenner igjen peptidantigener som blir fremvist på celleoverflater bundet til MHC-molekyler. Dendrittiske celler er de mest potente antigenpresenterende cellene som uttrykker MHC. På denne måten binder MHC-molekylene det medfødte og adaptive immunforsvaret sammen (Abbas et al., 2014). Det har blitt funnet både MHC I og MHC II hos fisk og det ser ut til at funksjonen til disse er relativt lik som hos pattedyr, selv om dette har vært forsket lite på. MHC I presenterer peptid-antigener for T-cellerreseptorer på CD8⁺ cytotoksiske T-celler mens MHC II presenterer peptidantigener for T-cellerreseptorer på CD4⁺ hjelper T-celler. Hos fisk ser det ut til at MHC II-transkripter er uttrykt i antigenpresenterende celler som B-lymfocytter, og uttrykket oppreguleres etter immunstimulering (Yamaguchi & Djikstra, 2019).

1.5.2.4 TCR1 α

T-cellerreseptorer (TCR) kjenner igjen peptider bundet til MHC-molekylene. Antigenreseptoren på T-cellene eksisterer kun som en membranreseptor. T-cellerreseptoren er derfor kun involvert i antigengjenkjenning og aktiveringen av T-cellene. TCR har ingen effektorfunksjon og eliminering av mikrober utføres av T-lymfocytten selv etter aktivering eller av andre leukocytter som responderer til T-cellene (Abbas et al., 2014). TCR dannes av to distinkte polypeptidkjeder, enten α/β eller γ/δ , disse skiller de to store T-cellepopulasjonene hos vertebrater med kjeve (Edholm, 2021). α/β -T-cellene er mest tallrike i sirkulasjon og lymfoide organer. TCR α -sekvensene har blitt funnet hos flere teleoster, inkludert regnbueørret og atlantisk laks (Bilal et al., 2018). I dette forsøket ble genuttrykket for reseptoren TCR1 α studert hos den sterile og fertile laksen.

1.5.2.5 Immunoglobulin

Immunoglobuliner er komplekse glykoproteiner som har en kritisk funksjon i både medfødt og adaptiv immunitet hos vertebrater (Salinas et al., 2021). Det er identifisert to former av immunoglobuliner hos teleoster; membranbundne og sekretoriske. Den membranbundne formen er uttrykt som en B-cellereseptor (BCR) og fungerer som cellenes antigenreseptor (Yu et al., 2020). Sekretoriske immunoglobuliner (sIg) er spesialiserte til å opprettholde homeostase og holde patogener i sjakk i mukosale vev (Salinas et al., 2021). Igs produseres i terminalt differensierte B-celler, plasmablaste og plasmaceller og de fungerer som hovedeffektoren av B-celler ved adaptiv immunitet. Det er kjent at sIgs nøytraliserer patogener eller fremmer elimineringen av disse i kroppsvæsker og forhindrer videre infeksjoner (Yu et al., 2020). Ved genomisk sekvensering er det identifisert tre isotyper av immunoglobuliner hos teleoster; IgM, IgD og IgT/IgZ. Det er rapportert at disse fremkaller relativt like immunresponser som hos pattedyr i de ulike MALTs (Yu et al., 2020). De mest studerte mukosale immunresponsene hos teleoster forekommer i hud, gjeller og buk (Salinas et al., 2021).

IgM er den dominerende klassen av immunoglobulin i teleosters kroppsvæsker og er definert som den mest prevalente isotypen ved systemiske immunresponser. Akkurat som hos pattedyr har det blitt demonstrert at fiske-IgM utøver nøytraliserende og agglutinerende aktivitet mot virale og bakterielle patogener og at IgM kan aktivere den klassiske veien i komplementsystemet ved gjenkjennelse av disse patogenene (Salinas et al., 2021). Det er gjort flere studier der det er funnet at transkripsjonen av IgD er initiert under virale, bakterielle og parasittiske infeksjoner, men den immunbeskyttende rollen til IgD hos teleoster er imidlertid fremdeles ukjent. (Salinas et al., 2021). IgT er et mukosa-assosiert immunoglobulin hos teleoster og fiskens slimhinner inneholder enn høy andel IgT sammenlignet med serum. I huden, gjellene, buken og luktorganet er slimhinnenenes mikrobiota hovedsakelig dekket av IgT (Yu et al., 2020). I dette forsøket blir genuttrykket av sIgM, IgD og IgT studert hos steril laks sammenlignet med fertil laks.

1.5.3 Metyltransferasegener

DNA-metylering er en viktig prosess ved epigenetisk modifisering. DNA-metyltransferaser (DNMTs) katalyserer tilførelsen av metylgrupper til DNAet uten å endre protein-kodende sekvenser. Hos pattedyr er genene Dnmt1, Dnmt2, Dnmt3a, Dnmt3b og Dnmt3L som tilhører Dnmt-familien identifisert (Lai et al., 2020). Akkurat som hos pattedyr, er det funnet at hovedproteinene involvert i DNA-metylering hos fisk er metyltransferasene. Genomet til

zebrafisk inneholder åtte ortologer til metyltransferasene; en Dnmt1 ortolog, en Dnmt2 ortolog, to Dnmt3a ortologer og fire Dnmt3b ortologer. Dnmt3b ortologene til zebrafisk er like Dnmt3b hos pattedyr og deler like uttrykksmønstre gjennom utviklingen (Metzger & Schulte, 2016). Dnmt1 spiller en viktig rolle i vedlikeholdet av DNA-metylering. Dette genet er utelukkende assosiert med metylering av hemimetylert DNA, dette sørger for at DNA-metyleringsmønstre videreføres fra mor- til dattercelle under celledeling (Dasmahapatra & Khan, 2015). Dnmt3b har ansvar for å utføre de novo metylering og dette genet er essensielt under tidlig embryonisk utvikling (Dasmahapatra & Khan, 2015).

1.5.4 Hvorfor disse genene blir studert

EF1a og 18S RNA blir brukt som referansegener under dette forsøket. Begge disse genene har som nevnt over viktige cellulære funksjoner og stabile genuttrykk, de er derfor godt egnet som referansegener. Studier har vist at mange av de vanlige referansegenene viser store nok variasjoner til at de kan påvirke gentranskripsjonsprofiler når de brukes alene under normalisering. Det er derfor anbefalt å bruke flere enn ett enkelt referansegen for å oppdage transkripsjonsforskjeller mer nøyaktig (Julin et al., 2009). Dette er tatt hensyn til ved å bruke både EF1a og 18S som referansegener.

Cytokinene er en del av det medfødte immunforsvaret og dette er den første forsvarslinjen mot patogener. Det medfødte immunforsvaret består av to hovedreaksjoner; inflammasjon og antipatogene forsvar. Cytokinene fungerer som signalmolekyler som enten aktiverer eller rekrutterer celler involvert under inflammasjon. IL-22 er viktig i forsvaret mot bakterielle patogener. IFN- γ er viktig for aktiveringen av makrofager og nedbrytning av mikrober til peptider som MHC-molekylene kan kjenne igjen, dette cytokinet binder dermed sammen det medfødte og adaptive immunforsvaret. IL-10 er et antiinflammatorisk cytokin som demper betennelsesreaksjoner. NKEF er vist å være involvert ved både inflammasjon og det antivirale forsvaret. Ved å studere disse fire immungenene vil funksjoner innenfor det medfødte immunforsvaret være undersøkt for å se om det er signifikante forskjeller mellom den sterile og fertile laksen.

Immunoglobulinene er viktige komponenter av både det medfødte og adaptive immunforsvaret. Det er oppdaget tre immunoglobuliner hos fisk som har hver sin funksjon, men de er ofte assosiert med immunforsvaret i fiskens slimhinner og serum. Siden fisken slimhinner hele tiden er i kontakt med det omkringliggende miljøet, er det viktig å undersøke

om den sterile laksen har like godt uttrykk av disse genene for å kunne opprettholde homeostase og holde patogener i sjakk.

MHC I og II er viktige ved antigenpresenteringen av peptidantigener for T-cellereseptorer. Disse to gruppene binder og fremviser trolig peptidantigener til ulike populasjoner av T-celler og aktiverer hver sin vei i det adaptive immunforsvaret og er derfor viktige å studere hos den sterile laksen. TCR kjenner igjen peptidantigenene som fremvises av MHC-molekylene, TCR1a er en kjent reseptor hos fisk som har denne funksjonen og det er derfor hensiktsmessig å studere genuttrykket av denne.

Dnmt1 og Dnmt3b er viktige under DNA-metyleringen og dermed viktige for epigenetisk modifisering og reguleringen av genuttrykk. For å se hvordan tapet av kimceller har påvirket genuttrykket av metyltransferaser, ble transkripter av Dnmt1 og Dnmt3b studert og videre relatert til global metylering, som nevnt i neste avsnitt.

1.6 Global metylering

DNA-metylering er en kovalent tilføring av metylgrupper til 5-karbonet på cytosinringene, og dette resulterer i dannelsen av 5-metylcytosin (5-mC). Dette er en prosess som skjer naturlig hos blant annet eukaryoter, da inkludert fisk. Denne metyleringen forekommer primært ved CpG-dinukleotider, altså i DNA-sekvenser der et cytosin- og et guanin-nukleotid er tilstøtende og dette spiller en viktig rolle i lokal kontroll av genuttrykk (Li & Tollefsbol, 2021). Epigenetisk regulering og de fenotypiske konsekvensene av dette skjer gjennom ulike molekylære prosesser som innebærer modifikasjon av histoner eller DNA-metylering. Dette er store modifikasjoner i epigenomet som medfører til en undertrykkelse eller aktivering av gener som er avgjørende for embryogenese, celledifferensiering og utviklingen til organismer (Bautista et al., 2020). Tilførelsen eller fjerningen av metylgrupper kan regulere transkripsjonsaktiviteten til nabogener ved at strukturen og funksjonen til kromatin endres. Høye nivåer av metylering av genenes promoter blir assosiert med en undertrykkelse av transkripsjonen, metylering av forsterkerelementer kan også undertrykke transkripsjonen ved at dette forhindrer bindingen av transkripsjonsfaktorer som vanligvis ville induisert uttrykket (Metzger & Schulte, 2016). For å se hvorvidt bortfallet av kimcellene hadde noen effekt på globale metyleringsnivåer, ble nivåene av 5-mC studert i både steril og fertil voksen laks.

1.7 Formål med oppgaven

Til dags dato er det få forskningsdata tilgjengelig knyttet til steril laks, eksisterende data kommer fra immunstatus hos triploid steril laks. Det er ikke utført noen studier knyttet til immunstatus hos den kimcelfrie sterile laksen. Derfor er det svært viktig å studere immunstatus hos den voksne, kimcelfrie laksen i forhold til den voksne, fertile laksen. Den kimcelfrie fisken benyttet i dette forsøket kommer fra den første batchen produsert vha. mikroinjeksjonsmetoden, og har for første gang blitt undersøkt for å vurdere immunstatus ved det siste prøveuttaket fra sjømerden.

Det er to hovedmål ved dette studiet:

1. Det ene målet med denne oppgaven er å undersøke om sterilisering ved å fjerne kimcellene til laksen påvirker immunforsvaret til fisken og om den sterile laksen har samme ytelse som den fertile laksen. Det er ønskelig å finne en ny metode som kan brukes i storskala kommersiell produksjon av kimcelfri laks for å løse oppdrettsnæringens problemer knyttet til rømning av oppdrettsfisk og innkryssninger i den ville laksebestanden. For at en ny steriliseringsmetode skal kunne brukes i kommersiell sammenheng, er det nødvendig å undersøke hvordan sterilisering påvirker fiskens immunstatus. Et av de største problemene til oppdrettsnæringen er sykdom og store tap grunnet dette. Dette er derfor helt essensielt å undersøke ytelsen til immunsystemet til den kimcelfrie laksen, dette for å sikre god fiskehelse og velferd hos oppdrettsfisken og forhindre dødelighet.
 - Et delmål ved denne oppgaven er å undersøke om uttrykket av ulike immungener varierer sammen. Dersom steriliseringen påvirker uttrykket av ett immungen, kan dette potensielt også påvirke uttrykket av et annet gen dersom det er en korrelasjon mellom uttrykket av de to genene.
2. Det skal også undersøkes om sterilitet virker inn på graden av global DNA-metylering (5-metylcytosin). Et bortfall av kjønnsceller i gonadene kan påvirke produksjonen av kjønns hormoner. Kjønns hormonene er kjent å modulere immunsystemet på ulike måter og reseptorer for kjønns hormonene er uttrykt i lymfoide organer og perifere immunceller. Dersom kjønnssteroider er med på å regulere metyleringsstatus, er det mulig at den kimcelfrie fisken har endret metyleringsmønster i forhold til den fertile

fisken. Metylering av DNA kan føre til at enkelte immungener enten blir opp- eller nedregulert og dermed påvirkes immunsystemet til fisken. Det er derfor hensiktsmessig å undersøke hvilken effekt et bortfall av kjønnsceller har på de globale DNA-metyleringsnivåene hos den sterile, kimcelfrie fisken sammenlignet med den fertile fisken i et bestemt vev.

2 Material og metode

2.1 Forsøksoppsett og prøveuttak av vevsprøver på RNAlater

Til dette forsøket ble det tatt ut vevsprøver fra fisk i sjøfasen, helt i slutten av produksjonssyklusen. Eksperimentet bestod av fire fiskegrupper; to kontrollgrupper av fertil laks og to grupper bestående av steril laks. Fisken ble holdt ved Havbruksstasjonen i Kårvika. Dette var et gjennomstrømningsanlegg. Karene hadde en diameter på 2 m og en høyde på 1 m og en gjennomstrømning i vannstanden på 75 cm ble opprettholdt under forsøket. Fisken ble holdt i to av disse karene. All fisk som ble studert i dette forsøket var vaksinert med en 6-komponent vaksine (alphaject), dette for at forholdene skulle ligne så mye som mulig på vanlige oppdrettsforhold. Våren 2019 gjennomgikk fisken en naturlig smoltifiseringsprosess og i juni ble den overført til sjøvann. Fisken sto i kar med sjøvann i et år før de ble overført til merder på sjøen 14.05.2020. Fisken ble overført til ei firkantnot på 5,3 x 5,3 m og en dybde på 7 m. Dette var ei storfisknot med en stolpelengde på 25 mm. Snittet av vekten og lengden til fisken i hver gruppe ved utsett til sjø og ved prøveuttaket 08.10.20 kan ses ut fra Tabell 1, vekt og lengde for enkeltindividene kan ses i Appendix I.

Nofima sjekket genuttrykket av Dnd og Vasa i fiskens gonader før forsøkets start for å bekrefte sterilitet. Sterilitet ble bekreftet ved å se på uttrykket av Dnd siden dette var målgenet for knockdown gjennom injeksjonen av antisensemolekyler. Av fisken i prøveuttaket var det et begrenset antall fertil fisk igjen og kontrollgruppene bestod derfor kun av tre fisk av hvert kjønn, altså tre hunnfisk i den ene gruppen og tre hannfisk i den andre fordi det var dette antallet det var mulig å få av hvert kjønn. Den sterile laksen var også delt inn i to grupper, en gruppe bestod av seks hunner og den andre av seks hanner. Fra hver fisk ble det hentet ut vevsprøver på RNAlater. Vevsprøvene ble tatt fra hud, gjeller, hodenyre, milt og tarm. Alle prøvene ble oppbevart ved 4°C over natten og deretter lagret ved -20 °C. Oversikt over antall fisk, fiskegrupper og hvilke vev prøver ble hentet fra kan ses i Appendix I.

Tabell 1 Viser snitt av vekt og lengde for hver fiskegruppe (Kontroll/Steril), sterilitet (Fertil (f)/Steril (s)) og kjønn (Female (f)/Male (m)) ved utsett til sjø (14.05.20) og ved prøveuttak (08.10.20).

Gruppe	Kjønn (f/m)	Fertil/steril (f/s)	Vekt avslutt (g)	Lengde avslutt (cm)	Vekt avslutt (g)	Lengde avslutt (cm)
			08.10.2020	08.10.2020	14.05.2020	14.05.2020
Kontroll	f	f	3906,7	65	1525,7	49,7
Kontroll	m	f	4270	65,3	1468	48,3
Steril	f	s	3348,3	61,5	1269,5	45,3
Steril	m	s	3029,2	59,2	1199,8	45

2.2 RNA-isolering ved hjelp av RNeasy Mini Kit

Før cDNA brukt under kvantitativ real-time PCR (qPCR) ble produsert, ble RNA fra de ulike fiskevevene rensert og isolert. Vevsprøvene ble tint opp og plassert på en ren petriskål, deretter delt opp i biter på ca. 0,5 x 0,5 cm ved hjelp av skalpell. Bitene ble videre delt opp i mange mindre biter og eventuell overflødig RNA later ble tørket vekk med papir. Vevsbitene ble overført til hvert sitt eppendorfrør som inneholdt en stålkule og 600 µL buffer RLT tilsatt DTT. Prøvene ble så homogenisert vha. (Qiagen TissueLyser II) ved en frekvens på 28 1/s i 1 minutt. De ferdig homogeniserte prøvene ble pipettert over til nye eppendorfrør og deretter sentrifugert på 19000 x g i tre minutter (Eppendorf Centrifuge 5417R), slik at det ble dannet et klart homogenat. Til rensing og isolering av RNA ble RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden, Tyskland) benyttet og protokollen kan ses i RNeasy® Mini Handbook og i Appendix III. For gjeller og hud ble det benyttet proteinase K for å lysere vevet fullstendig, det ble da tilsatt 1,2 mL RNase-fritt vann og 20 µL proteinase K til homogenatet og prøvene ble inkubert på vannbad ved 55 °C i 15 minutter. Videre ble spinnprotokollen i RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden, Tyskland) benyttet. Konsentrasjon og kvalitet til ferdig isolert RNA ble målt vha. Nanodrop (Nanodrop ND-1000 Spectrophotometer). 260/280 var forholdet mellom absorbansen ved 260 nm og 280 nm, 260/280-ratio ble brukt til å vurdere renheten til det isolerte RNAet, verdi tilsvarende 2,0 ble ansett som rent. Lavere verdier indikerte forurensning. Alle prøvene ble lagret ved -80 °C frem til cDNA-syntese.

2.3 Fortynning av RNA og cDNA-syntese

For produksjon av cDNA ble QuantiTect Reverse Transcription Kit (Qiagen, Hilden, Tyskland) benyttet. Dette er en enkel prosedyre for å revers transkribere RNA til cDNA og effektivt eliminere genomisk DNA fra prøvene. Den totale mengden RNA brukt til cDNA syntese var 1000 ng. Mengden RNasefritt vann og RNA som ble tilsatt til stripsen for å oppnå den totale konsentrasjonen ble beregnet på forhånd ut fra konsentrasjonen til hver prøve funnet ved nanodrop. Det første steget i cDNA-syntesen var fjerning av genomisk DNA. Ferdig rensert RNA ble inkubert i to minutter i gDNA wipeout-buffer ved 42 °C og dette fjernet en eventuell kontaminering av gDNA. Videre ble RNAet revers transkribert ved hjelp av en mastermiks bestående av Quantiscrypt revers transkriptase, Quantiscrypt RT-buffer og RT-primermiks. Reaksjonen (20 µL) foregikk ved 42 °C, deretter ble den inaktivert ved 95 °C. En nøyaktig beskrivelse av fremgangsmåte kan ses ut fra QuantiTect® Reverse Transcription Handbook og i Appendix III. Ferdig cDNA ble fortynnet før qPCR via to steg. Først ble det laget en 1:5 fortynning der 10 µL cDNA ble overført til 40 µL dH₂O. Videre ble

det dannet en arbeidsløsning som ble benyttet til qPCR, denne fortynningen hadde konsentrasjonen 1:10. Her ble 35 μL av fortynning 1:5 overført til et nytt rør bestående av 140 μL dH_2O . Fortynningene ble oppbevart ved $-20\text{ }^\circ\text{C}$.

Under cDNA-syntesen ble det dannet positive kontroller (RT+) og en negative kontroller (RT-). Positiv kontroll ble dannet fra en prøve fra hvert vev, til disse ble det tilsatt 5 μL RNA og RNasefritt vann til en total konsentrasjon på 1000 ng RNA var oppnådd. Disse prøvene ble tilsatt gDNA wipeout-buffer og inkubert, men de ble videre tilsatt vann i stedet for RT-mastermix, ellers ble samme prosedyre som oppgitt ovenfor fulgt. Det ble dannet to negative kontrollprøver, disse ble dannet ved å tilsette vann i stedet for RNA, deretter ble alle stegene i cDNA-syntesen fulgt. Alle RT+ og RT- ble kjørt ved qPCR for genet EF1a. Hensikten med RT+ var å sjekke effekten av gDNA wipeout-bufferen og om gDNA ble fjernet fra prøvene eller ikke. Hensikten med RT- var å sjekke for enhver form for ekstern forurensning i vannet eller mastermixen som ble benyttet.

2.4 Kvantitativ real-time PCR (qPCR)

Kvantitativ real-time PCR (qPCR) PCR står for "polymerase chain reaction" og dette er et verktøy som brukes for å oppformere spesifikke DNA-sekvenser. Ved real-time PCR (qPCR) kan genuttrykk av spesifikke gener kvantifiseres, dette ved at fluoriserende fargestoffer binder seg til dobbeltrådet DNA (dsDNA). Fargestoffet som ble benyttet under dette forsøket var SYBR® Green, når dette binder seg til dsDNA vil det fluoresisere, fargen øker proporsjonalt med mengden PCR-produkter som dannes etter hver amplifiseringssyklus og ved hjelp av dette kan genuttrykket kvantifiseres. Hver amplifiseringssyklus består av tre deler; denaturering, amplifisering og ekstensjon. Under denatureringen utsettes prøvene for høy temperatur for å separere DNA-trådene og dsDNA omdannes til enkeltrådet DNA (ssDNA). Under amplifiseringen binder primere og komplementære DNA-sekvenser seg sammen til spesifikke gener. Ekstensjonen er det siste steget i hver syklus, her økes temperaturen til optimumstemperaturen for enzymet DNA polymerase og syntesen av en ny DNA-tråd i 5'-3' retning begynner. Primer Forward og Primer Reverse er nødvendig for å få festet polymerasen til de komplementære ssDNA-trådene. Det kjøres også smeltepunktsanalyse under PCR.

Videre ble 12 ng ble tilsatt til hver reaksjonsbrønn. For hver reaksjon (hver brønn) ble det blandet en mastermix bestående av 7,5 μL SYBR® Green, 0,8 μL Primer Forward og 0,8 μL

Primer Reverse, dette tilsvarer 9 μL mastermiks. Antallet ble ganget opp til antallet prøver til hver runde PCR. 9 μL mastermiks ble overført til hver brønn på en 96-brønnsplate (MicroAmp Fast Optical 96-well, Life Technologies) ved hjelp av en multikanalpipette. Det ble videre tilsatt 6 μL cDNA til brønnene slik at totalvolum var 15 μL . Hver prøve ble analysert i duplikater, dette vil si at hver enkelt prøve ble overført til to brønner. De to siste brønnene på brettet var såkalte "no template control" (NTC) og disse inneholdt ikke cDNA, men heller 6 μL dH₂O. NTC brukes som en kontroll for å se om det er uspesifikk binding eller forurensning i prøvene. Prøvene ble analysert ved bruk av 7500 Fast Real-Time PCR system (Applied Biosystems, CA, USA). Programmet brukt for qPCR foreligger i Appendix IV.

2.4.1 Primere

Under qPCR ble det brukt primere med en bruksløsning på 5 μM . Hver enkelt primer ble dannet ved å fortynne en 100 μM stamløsning med vann til en konsentrasjon på 5 μM . Effektiviteten til primerne ble funnet ved å lage standardkurve. Det ble da laget en to ganger fortynningsserie av åtte bestående av en miks av cDNA, denne ble kjørt i tre duplikater opp mot 5 μM primer. Standardkurven ble laget ved å plote Ct-verdiene mot fortynningens log-verdi, kurvens stigningstall ble også beregnet. Primernes effektivitet ble beregnet ved hjelp av formelen (F.1) beskrevet av (Pfaffl, 2001), oppgitt under.

$$E = 10 \left(\frac{1}{\text{slope}} \right) \quad \text{Formel (F.1)}$$

Alle målgene og deres primersekvens, tilgangsnummer, smeltepunkt, amplikon, R² og effektivitet kan ses ut fra Tabell 2 oppgitt under.

Tabell 2 Viser primerne som ble brukt under analysen av genuttrykk ved qPCR. Tabellen oppgir genmålene, deres navn, forward (F) og Revers (R) gensekvens, tilgangsnummer, smelteverdi (Tm), amplikonstørrelse, R² og effektivitet. .

Gene Target	Name	Sequence	Accession no	Tm	Amplicon size (bp)	R ²	Efficiency
Elongationfactor 1-alpha	ELF1a	F: TGCCCTCCAGGATGTCTAC R: CACGGCCACAGGACTG	BG933853	75,327	57	0,999	1,93849
18 sRNA	18S	F: TGTGCCGCTAGAGGTGAAATT R: CGAACCTCCGACTTTCTGTTCT	AJ427629	76,480	101	0,997	1,86699
Immunoglobulin M (secretory)	SIgM	F: CTACAAGAGGGAGACCGGAG R: AGGGTCACCGTATTACTAGTTT	BT060420	77,013	90	0,998	1,99495
Immunoglobulin T	IgT	F: CAACACTGACTGGAAACAAGGT R: CGTCAGCGGTTCTGTTTGGGA	GQ907004	77,518	97	0,999	2,00277
Immunoglobulin D	IgD	F: GTGTCTGCAGCAGCCTATGA R: GTGAAGTCCTCCCTGGTT	AF278717.1	77,577	143	0,998	1,96083
Major Histocompatibility complex I	MHC I	F: GAAGAGCACTCTGATGAGGACAG R: CACCATGACTCCACTGGGGT	JN561338	79,928	112	0,998	2,00164
Major Histocompatibility complex II	MHC II	F: AGAAGCCTGGAACAAGGTCTGA R: AACTGTCTTGCCAGTATGGCGCT	AM259955.1	78,555	109	0,999	1,96764
T-cell receptor 1-alpha	TCR1alpha	F: AACAAATACAGAGGCCACCAG R: ACCAGTTTGCTTACATTTCTC	BT057540.1	76,192	106	0,998	1,93805
Interleukin 22	IL22	F: GGCCCGAGTCAGCAGAGACCT R: CTCCTCCATCCCGGCAACTTC	DW572073	78,047	106	0,95	1,92
Interleukin 10	IL10	F: CCTTCTCCACCATCAGAGATTAC R: AACTTCAGGATGCTGTCCATAG	EF165028	77,983	127	0,988	2,02035
Natural killer enhancing factor	NKEF	F: TGCCGAGGAGTTTAGGAAGA R: AATCTTCATGGCACCAGAC	NM_001141386	78,786	121	0,999	1,87848
Interferon-γ	IFN-γ	F: AAGGGCTGTGATGTGTTTCTG R: TGTACTGAGCGGCATTACTCC	AY795563	74,801	166	0,998	1,99594
DNA (cytosine-5) methyltransferase 1	Dnmt-1	F: ACTGACTCTGCGCTGTCTTGTC R: CGTACTGCCAGCCTGAAGT	XM_014193376	77,648	71	0,998	1,87464
DNA (cytosine-5)-methyltransferase 3B like	Dnmt-3b	F: CGCAACATCACCAGAAAGAA R: AGCAGGCGGTAGAACTCAA	XM_045693101.1	78,773	152	0,998	1,84577

2.4.2 Real-time qPCR analyse

Under qPCR er det anbefalt å normalisere målgenene opp mot en endogen standard, og det gjøres via å sammenligne uttrykk opp mot et referansegene. Dette er nødvendig for å kompensere for variasjoner under PCR. Referansegenene er ofte såkalte "housekeeping" gener som er tilstede i alle celler med kjerne og som er essensielle for cellenes overlevelse. Syntesen av mRNA er også ansett som stabil i alle vev for disse genene (Pfaffl, 2001). Elongeringsfaktor 1-alfa (EF1 α) og 18s ble brukt som referansegener under qPCR. Disse genene har et stabilt genuttrykk i alle vev og er dermed godt egnet som referansegener (Lock, 2010).

CP står for "crossing point" og er definert som punktet der fluorensensen øker betraktelig over bakgrunns-fluorensensen. Δ CP er CP-avviket til kontrollgruppen minus prøven av gentranskriptet (Pfaffl, 2001). Δ CP ble beregnet ved å finne snittet av Ct-verdiene til kontrollgruppene og deretter bruke dette og trekke fra Ct-verdien til hver enkelt prøve. Dette ble gjort for alle genene. Siden det ble brukt to referansegener, ble det beregnet et geometrisk gjennomsnitt av disse to. Ratio sier noe om det relative uttrykket av et målgen basert på effektivitet til målgenet, effektiviteten til referansegenet og avvik i CP-verdi hos en prøve sammenlignet med en kontrollgruppe og uttrykt i forhold til et referansegene. Ratio ble beregnet fra formel (F.2) utarbeidet av Pfaffl (2001) oppgitt under.

$$Ratio = \frac{(E_{m\grave{a}l})^{\Delta CP_{m\grave{a}l}(kontroll-pr\ddot{o}ve)}}{(E_{ref})^{\Delta CP_{ref}(kontroll-pr\ddot{o}ve)}} \text{ Formel (F.2)}$$

2.5 Global DNA Methylation (5-mC) ELISA Assay

2.5.1 Rensing og isolering av totalt DNA

Et mukosalt vev (hud) og et lymfoid vev (milt) ble valgt for DNAisolering etterfulgt av metyleringsanalyse ved "enzyme linked immunosorbent assay" (ELISA). For å rense og isolere DNA ble DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen, Hilden, Tyskland) benyttet. En mer detaljert fremgangsmåte kan ses i DNeasy® Blood & Tissue Handbook og i Appendix V. Før start ble eventuell utfelling i buffer ATL og Buffer AL løst opp ved å varme dem opp i inkuberingseskapp ved 37°C. Buffer AW1 og Buffer AW2 ble blandet ut med 96% etanol. Vannbadet ble varmet opp til 56°C. Vevet ble tatt opp fra fryseren og tint opp til romtemperatur. Alle stegene i denne protokollen ble utført ved romtemperatur. Kvalitet og konsentrasjon til ferdig rensed DNA ble kontrollert vha. nanodrop (Nanodrop ND-1000 Spectrophotometer), 260/280 ratio rundt 1,8 ble regnet som rent for DNA, verdier mellom 1,7-1,9 ble akseptert. I milt ble DNAet fortynnet ved å tilsette 2 µL DNA og vann til en konsentrasjon på 50 ng/µL. I hud ble det tilsatt 3 µL DNA og vann til en total konsentrasjon på 50 ng/µL.

2.5.2 Enzyme-linked immunosorbent assay

Relative nivåer av global DNA metylering (5-metylcytosin) prosent i DNA-prøvene ble kvantifisert vha. MethylFlash™ DNA Quantification kit (EpiGentekGroup, USA) i følge produsentens instruksjoner. En illustrasjon av hvordan dette kittet fungerer kan ses i Appendix VI. OD-intensiteten til hver DNA-prøve ble normalisert til 100 ng. Denne protokollen ble benyttet for både hud og milt.

Dette kittet er effektivt i å oppdage nivåene av global DNA-metylering i DNA isolert fra vev. DNA-metylering forekommer ved at en metylgruppe tilsettes til det femte karbonet på cytosin-ringen vha. enzymet DNAmetyltransferase, dette resulterer i 5-methylcytosin (5-mC). Nivåene av 5-mC er varierende i dyrs genom og kan utgjøre opptil 2% hos vertebrater. Modifiserte cytosiner spiller trolig en kritisk rolle i reguleringen av genfunksjon ved å påvirke DNA-metyleringen. Påvisning av 5-mC kan være svært nyttig for å identifisere og forstå endringene i den globale metyleringen som forekommer i DNA under varierende fysiologiske og patologiske prosesser hos dyr (EpiGentekGroup, USA).

Før start ble den fortyndede vaskebufferen laget klar ved å tilsette destillert vann til vaskebufferen som fulgte med kittet, pH ble målt vha. et pH-meter og regulert til den lå mellom 7,2-7,5 ved å tilsette noen dråper 1N natriumhydroksid (NaOH). Standardkurven ble dannet ved å danne ulike fortyndinger av positiv kontroll (PC) med de seks konsentrasjonene 0,1%, 0,2%, 0,5%, 1%, 2% og 5%. Det isolerte DNAet ble fortyndet til en konsentrasjon på 100 ng. Det ble tilført 100 µL av "binding solution" (BS) til alle brønnene. Negativ kontroll (NC) ble platet ut i de to første brønnene på stripsen og deretter ble positiv kontroll med ulik konsentrasjon platet ut. Alle prøver ble tilført stripsen vertikalt i duplikater. Etter at komponentene til standardkurven var platet ut ble alle prøvene tilført til brettet. Brettet ble vendt fra side til side for å blande prøvene i hver brønn med BS. Platen ble forseglet og deretter inkubert i 60 minutter ved 37 °C. "5-mC detection complex solution" ble laget ved å tilsette fortyndet vaskebuffer, 5-mC antistoff (mAb), "signal indicator" (SI) og "enhancer solution" (ES). Når platen var ferdig inkubert ble BS fjernet fra alle brønnene og det ble vasket med 150 µL vaskebuffer tre ganger i hver brønn. Det ble så tilsatt 50 µL "5-mC detection complex solution" til hver brønn, før brettet ble forseglet og inkubert i romtemperatur i 50 minutter. Videre ble hver brønn vasket med 150 µL vaskebuffer fem ganger. Det ble tilsatt 100 µL "developer solution" (DS) til hver brønn kolonnevis ved å bruke en multikanalpipette. Denne ble inkubert ved romtemperatur i inntil 3-4 minutter og fargeutviklingen ble studert underveis. Da fargen i brønnen til 5% PC var dyp blå ble det tilsatt 100 µL av "stop solution" (SS) for å stoppe enzymreaksjonen i brønnene. Platen ble lest av i VERSAmax microplate reader (Molecular Devices, USA), etter 2, 5 og 10 minutter. Nøyaktig protokoll for utføringen av ELISA kan ses ut fra MethylFlash™ Global DNA Methylation (5-mC) ELISA Easy Kit (EpiGentekGroup, USA).

Resultatene fra avlesningen ble brukt til å beregne prosenten av metylert DNA i hver prøve. Først ble en standardkurve satt opp i Excel ved å plote OD-verdiene mot PC ved hvert prosentnivå. Grafen ble brukt til å finne stigningstallet til standardkurven ved lineær regresjon. Dette ble brukt videre til å beregne 5-mC % i hver prøve ut fra formel (F.3) oppgitt under (EpiGentekGroup, USA). S er mengden prøveDNA oppgitt i ng, og det ble brukt en konsentrasjon på 100 ng DNA. NC er negativ kontroll som er umetylert DNA bestående av 0% 5-metylcytosin.

$$5 - mC\% = \frac{\text{Prøve OD} - \text{NC OD}}{\text{Stigningstall} * S} * 100\% \quad \text{Formel (F.3)}$$

Resultatene ble ytterligere sammenlignet for å korrelere DNAmetylering med genuttrykket av Dnmt1 og Dnmt3b i hud og milt.

2.6 Statistisk analyse og grafisk fremstilling

Alt av prøvedata ble behandlet og organisert i Microsoft Excel. Videre ble statistisk analyse utført i programmet GraphPad Prism 9 (versjon 9.3.1).

Det første som ble gjort var å sjekke om datasettet var normalfordelt. Shapiro-Wilk-test ble benyttet til dette fordi denne er godt egnet ved små prøvenummer (<50). Signifikansnivå alfa ble satt til 0,05. I de tilfellene der det ble funnet avvik fra normalfordelingen ble datasettet log(10)transformert for om mulig å oppnå normalfordeling (Feng et al., 2014), med en oppfølgende Shapiro-Wilk test. Log(10)transformasjon resulterte i normalfordeling i de fleste tilfeller og kun 10 datasett var tilslutt ikke normalfordelte. Log(10)transformerte data ble brukt til statistisk analyse der det var aktuelt, mens de originale dataene ble brukt i fremstillingen av figurene. Figurene bruker gjennomsnitt +/- "Standard error of mean" (SEM). Signifikante forskjeller mellom gruppene ble markert med ulike bokstaver i grafene. Tatt i betraktning at det var svært få datasett som ikke var normalfordelte, ble det vurdert at forutsetningen for bruk av parametrisk statistikk var oppfylt før variansanalysen ble kjørt. Det ble kjørt en toveis (fertilitet x kjønn) ANOVA (Analysis of variance) (Løvås. 2018) på normalfordelte og lognormalfordelte data for å avgjøre om det var statistisk signifikant forskjell i uttrykk av ulike gener i ulike vev mellom sterile og fertile hunn- og hannfisk.

Tukey ble valgt som post-hoc test fordi denne sammenligner alle grupper, denne testen forutsetter at data er normalfordelte (Motulsky, 2022a). Tukey-testen beregner gjennomsnittet til hvert datasett og sammenligner hvert gjennomsnitt med alle andre gjennomsnitt. Dette gir mulighet for ujevn prøvestørrelse. Testen tar hensyn til spredningen av alle gruppene, når flere gjennomsnittet sammenlignes, sammenlignes også forskjellene mellom gjennomsnitt og mengden av spredning til hver gruppe. Dette kvantifiseres vha. informasjonen som innhentes fra alle gruppene, noe som gir mer kraft til å oppdage forskjeller. Resultatene fra Tukey-testen oppgis som statistisk signifikante ($P < 0,05$) eller ikke statistisk signifikante (Motulsky, 2022a).

Dersom kravene for parametrisk statistikk ikke ble oppfylt, ble det benyttet en ikke-parametrisk test. Kruskal-Wallis test ble brukt i dette tilfellet. Kruskal-Wallis testen sammenligner tre eller flere grupper. Prism rangerer først alle verdiene fra lavest til høyest uten å ta hensyn til hvilken gruppe verdien tilhører, laveste verdi får rangeringen 1 mens den

høyeste får rangeringen N som er antallet i hele datasettet. Avvikene mellom rangeringssummene blir kombinert for å lage en verdi som kalles Kruskal-Wallis statistikk. Det blir beregnet en P-verdi som sier noe om hva sjansene er for at summen av rangeringene ligger så langt fra hverandre som de gjør ved tilfeldig prøvetaking (Motulsky 2022b). Kruskal-Wallis testen ble benyttet der det verken var mulig å bruke originaldata eller logtransformerte data for å oppnå normalfordeling, Dunns post-hoc test ble benyttet i disse tilfellene.

GraphPad ble benyttet for korrelasjonsanalyse som sier noe om samvariasjonen mellom to eller flere variabler (Motulsky, 2022b). Det ble undersøkt om det var korrelasjon mellom genuttrykk og grad av metylering (5-mC%) i hud og milt for genene Dnmt1 og Dnmt3b. Ratio for Dnmt1 og Dnmt3b og 5-mC% fra både hud og milt ble lagt inn i GraphPad i kolonner, deretter ble det brukt Pearson-korrelasjon for å beregne en r-verdi som sa noe om i hvilken grad de to variablene varierte sammen (Motulsky, 2022b). Det ble også beregnet en p-verdi som sa noe om korrelasjonen var statistisk signifikant eller ikke. Samme tilnærming ble brukt for å undersøke eventuelle sammenhenger mellom uttrykk av ulike immungener. I denne sammenhengen ble det fokusert på gener som på forhånd var kjent å være involvert i samme immunrespons ("pathway") og dermed kunne ha en biologisk sammenheng med hverandre. Korrelasjonene ble beregnet med basis i data fra alle 18 individene og en "heatmap" ble satt opp som viste r-verdi for alle immungenene satt opp mot hverandre. P-verdiene ble undersøkt og alle som var under 0,05, og ansett som statistisk signifikante, ble undersøkt videre. Siden ANOVA-analysen avslørte at genuttrykket i noen tilfeller var påvirket av kjønn, ble det ved statistisk signifikant sammenheng mellom to immungener gjort en videre analyse av datasettet med tanke på mulige kjønnseffekter. Bortfall av signifikante korrelasjoner etter at analysene ble kjørt separat for hvert kjønn, ble tolket som en effekt av kjønn på sammenhengen mellom de undersøkte variablene.

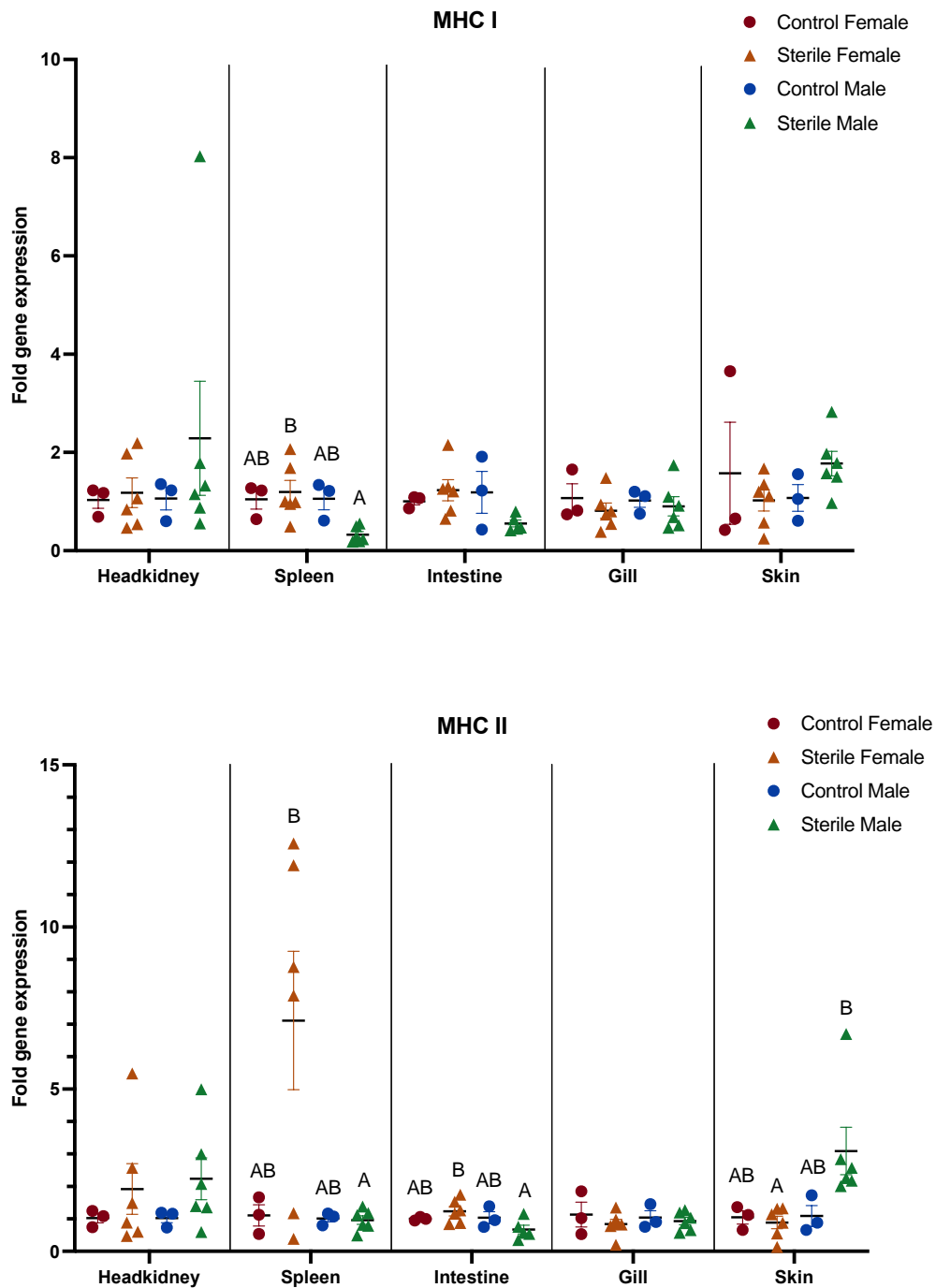
3 Resultater

3.1 Genuttrykk av immungener

Alle de isolerte RNA-prøvene hadde en 260/280 ratio over 1,9 og prøvene ble ansett som av god kvalitet. Uttrykket av referansegenene i alle gruppene og vevene som ble studert. Nofima sjekket genuttrykket av Dnd i fiskens gonader for å bekrefte steriliteten. Seks hunnfisk og seks hannfisk viste et ikke detekterbart uttrykk (Ct-verdi >33) av Dnd og ble bekreftet som sterile. Fertile/kontroll fisk skulle hentes fra en subpopulasjon bestående av ca. 10% av en populasjon som i utgangspunktet bestod av totalt ca. 450 fertile og sterile individer. Grunnet stor dødelighet i sjøfasen (uvær og angrep av lakselus), samt en tendens til økt dødelighet hos fertile fisk sammenlignet med den sterile, ble kun tre fertile hunnfisk og tre fertile hannfisk tatt prøver fra. Resultatene innhentet fra Nofima kan ses i Appendix II. På grunn av det lave antallet kontrollfisk, må resultatene fra forsøket vurderes med forsiktighet. Hvilken fordeling de ulike vevene for hvert immunogen tilhørte under statistisk analyse kan ses i Appendix VII.

Tabell 3 Viser oversikt over 2-veis ANOVA interaksjoner i alle vev og for alle genene studert. "ns" betyr at det ikke ble funnet signifikante forskjeller ($P > 0,05$), "*" betyr at $P \leq 0,05$ og "***" betyr at $P \leq 0,01$. For rutene merket i grått var ikke data normalfordelt eller lognormalfordelt og det ble benyttet Kruskal Wallis test. Rutene merket i rosa hadde signifikante forskjeller ved 2-veis ANOVA.

		Hodenyre	Milt	Tarm	Gjelle	Hud
MHC I	Interaksjon:	ns	*	ns	ns	ns
	Sterilitet	ns	ns	ns	ns	ns
	Kjønn:	ns	ns	ns	ns	ns
MHC II	Interaksjon:	ns	ns	ns	ns	*
	Sterilitet	ns	ns	ns	ns	*
	Kjønn:	ns	ns	ns	ns	*
sigM	Interaksjon:	ns	ns	*	ns	ns
	Sterilitet	ns	ns	ns	ns	ns
	Kjønn:	ns	ns	ns	ns	ns
Igd	Interaksjon:	ns	ns	ns	ns	ns
	Sterilitet	ns	ns	ns	ns	ns
	Kjønn:	ns	ns	ns	ns	ns
Igt	Interaksjon:	ns	ns	ns	ns	ns
	Sterilitet	ns	ns	ns	ns	ns
	Kjønn:	ns	ns	ns	ns	ns
TCR1a	Interaksjon:	*	ns	ns	ns	ns
	Sterilitet	ns	ns	ns	ns	ns
	Kjønn:	*	ns	ns	ns	ns
IL10	Interaksjon:	ns	*	ns	ns	ns
	Sterilitet	ns	*	ns	ns	ns
	Kjønn:	ns	*	ns	ns	ns
IL22	Interaksjon:	**	ns	ns	ns	ns
	Sterilitet	ns	ns	ns	ns	ns
	Kjønn:	**	*	ns	ns	ns
NKEF	Interaksjon:	ns	ns	ns	ns	ns
	Sterilitet	ns	ns	ns	ns	ns
	Kjønn:	ns	ns	ns	ns	ns
IFNg	Interaksjon:	ns	ns	ns	ns	ns
	Sterilitet	ns	ns	ns	ns	ns
	Kjønn:	ns	ns	ns	ns	ns
Dnmt1	Interaksjon:	ns	ns	ns	ns	ns
	Sterilitet	ns	ns	ns	*	ns
	Kjønn:	ns	ns	ns	ns	ns
Dnmt3b	Interaksjon:	ns	ns	ns	ns	ns
	Sterilitet	ns	**	ns	ns	ns
	Kjønn:	ns	ns	ns	ns	ns

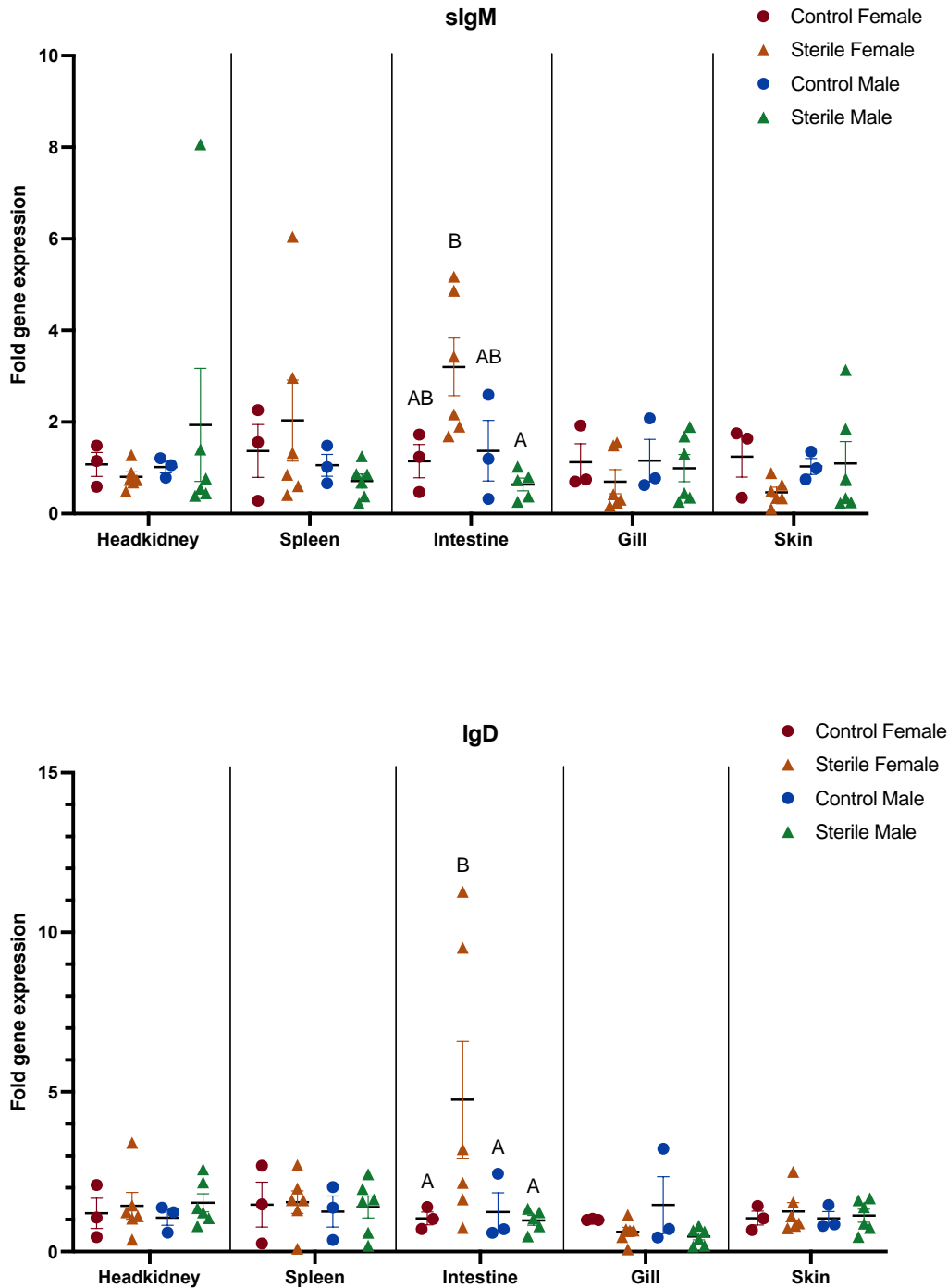


Figur 1 Grafen viser relativt genuttrykk av MHC I (øverste) og MHC II (nederste) hos kontroll hunn (n=3), steril hunn (n=6), kontroll hann (n=3) og steril hann (n=6) i hodenyre, milt, tarm, gjeller og hud. Ulike bokstaver angir signifikante forskjeller ($P < 0,05$) mellom gruppene innenfor hvert vev. Gruppen merket med A er signifikant forskjellig fra gruppen merket med B. Gruppene merket med AB er ikke signifikant forskjellig fra verken gruppe A eller B. Bokstavangivelsen er utelatt i vevene der det ikke ble funnet signifikante forskjeller i genuttrykk. Data er presentert som gjennomsnitt \pm SEM. For MHC II oppfylte ikke data i hud kravene til en parametrisk fordeling og Kruskal-Wallis test ble benyttet.

Det relative genuttrykket av MHC I og MHC II er presentert i Figur 1. MHC I og II følger mer eller mindre de samme trendene i genuttrykk i alle vevene studert. Det ble funnet signifikante forskjeller for begge genene mellom steril hunn og steril hann, og ikke mellom de fertile kontrollgruppene og de sterile fiskegruppene. Som vist i Figur 1, var genuttrykket av

MHC I signifikant høyere i steril hunn sammenlignet med steril hann. Genuttrykket var ikke signifikant med verken fertil hunn eller fertil hann. Tilsvarende var tilfellet for MHC II i milt og tarm. I hud derimot, viste MHC II motsatte trender og genuttrykket hos steril hann var signifikant høyere enn hos steril hunn, men det var ikke signifikant med noen av de fertile fiskegruppene.

Interaksjonstabellen ved ANOVA kan ses ut fra Tabell 3. Denne avdekket en signifikant interaksjon mellom kjønn og sterilitet i milt for genuttrykket av MHC I, både kjønn og sterilitet påvirker resultatene fra milt. Det ble ikke oppdaget signifikante interaksjoner i noen av de andre vevene. For MHC II ble det funnet en signifikant interaksjon mellom kjønn og sterilitet i hud og disse variablene påvirker resultatene i dette vevet. Det ble ikke funnet interaksjoner av signifikans i noen av de andre vevene.

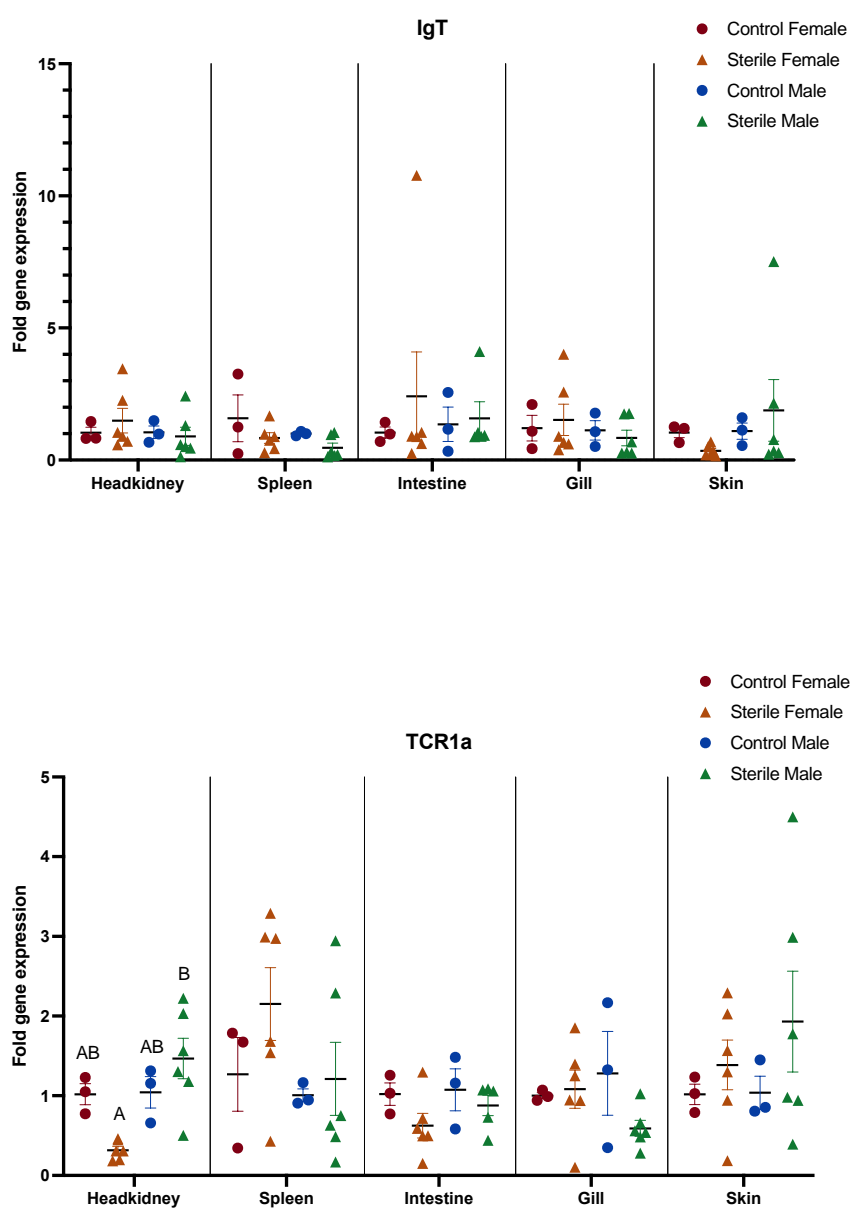


Figur 2 Grafen viser relativt genuttrykk av sIgM (øverste) og IgD (nederste) hos kontroll hunn (n=3), steril hunn (n=6), kontroll hann (n=3) og steril hann (n=6) i hodeknyre, milt, tarm, gjeller og hud. Ulike bokstaver angir signifikante forskjeller ($P < 0,05$) mellom gruppene innenfor hvert vev. Gruppen merket med A er signifikant forskjellig fra gruppen merket med B. Gruppene merket med AB er ikke signifikant forskjellig fra verken gruppe A eller B. Bokstavangivelsen er utelatt i vevene der det ikke ble funnet signifikante forskjeller i genuttrykk. Data er presentert som gjennomsnitt \pm SEM.

Det relative uttrykket av sIgM og IgD er vist i Figur 2. Både sIgM og IgD følger omtrent de samme trendene i genuttrykk i vevene som ble studert. I tarm hadde steril hunnfisk et signifikant høyere genuttrykk av både sIgM og IgD sammenlignet med steril hann. Uttrykket av sIgM var ikke signifikant forskjellig mellom steril hunn og de to fertile kontrollgruppene.

Uttrykket av IgD var også signifikant forskjellig mellom steril hunn og fertil hunn og mellom steril hunn og fertil hann. Det ble ikke avdekket signifikante forskjeller i genuttrykk av sIgM eller IgD i noen av de andre vevene.

Ut fra interaksjonstabellen i Tabell 3 kan det ses at det ble funnet en signifikant interaksjon mellom sterilitet og kjønn i tarm, for genuttrykk av sIgM. Både kjønn og sterilitet har påvirket resultatene i dette vevet. Det ble ikke avdekket signifikante interaksjoner i noen av de andre vevene. Det ble heller ikke avdekket noen interaksjoner for uttrykket av IgD. Sterilitet eller kjønn har trolig ikke påvirket resultatene for uttrykket av dette immunogenet.

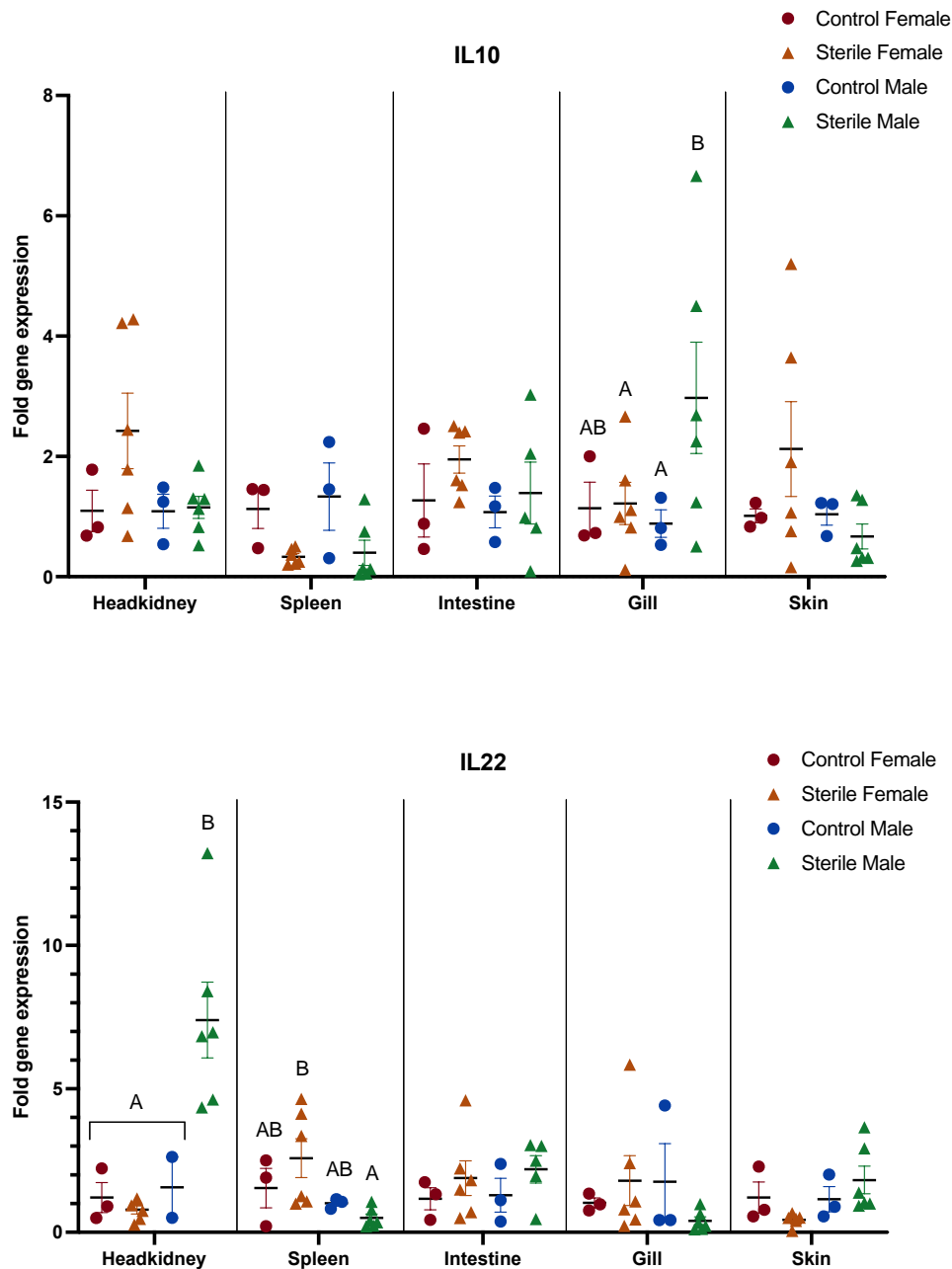


Figur 3 Grafen viser relativt genuttrykk av IgT (øverste) og TCR1a (nederste) hos kontroll hunn (n=3), steril hunn (n=6), kontroll hann (n=3) og steril hann (n=6) i hodenyre, milt, tarm, gjeller og hud. Ulike bokstaver angir signifikante forskjeller ($P < 0,05$) mellom gruppene innenfor hvert vev. Gruppen merket med A er signifikant forskjellig fra gruppen merket med B.

Gruppene merket med AB er ikke signifikant forskjellig fra verken gruppe A eller B. Bokstavangivelsen er utelatt i vevene der det ikke ble funnet signifikante forskjeller i genuttrykk. Data er presentert som gjennomsnitt \pm SEM.

Uttrykket av IgT varierte omtrent som for de to andre immunoglobulinene. Det ble ikke avdekket signifikante forskjeller i genuttrykket av IgT mellom noen av gruppene og heller ikke i noen av vevene. Data fra Hodenyre og tarm hadde en ikke-normal fordeling og ble også analysert ved Kruskal-Wallis test, denne avdekket heller ingen signifikante forskjeller i genuttrykk av IgD. TCR1a hadde et relativt likt genuttrykk som immunoglobulinene og MHC I og II. I hodenyre ble det funnet at steril hunn hadde et signifikant lavere genuttrykk av TCR1a enn steril hann. Steril hunn hadde et lavere genuttrykk enn fertil hunn og fertil hann, men disse forskjellene var ikke signifikante. Det ble ikke observert signifikante forskjeller i genuttrykk mellom noen av de andre gruppene i de andre vevene, disse resultatene er presentert i Figur 3.

Tabell 3 viser eventuelle interaksjoner som ble funnet ved toveis ANOVA. For genuttrykket av IgD ble det ikke avdekket noen interaksjoner av signifikans mellom sterilitet eller kjønn. Det så derfor ut til at verken sterilitet eller kjønn hadde en innvirkning på resultatene. For genuttrykket av TCR1a ble det oppdaget en overordnet interaksjoner av signifikans i hodenyre. Sterilitet og særlig kjønn ser ut til å ha hatt en innvirkning på genuttrykket av TCR1a i hodenyre.

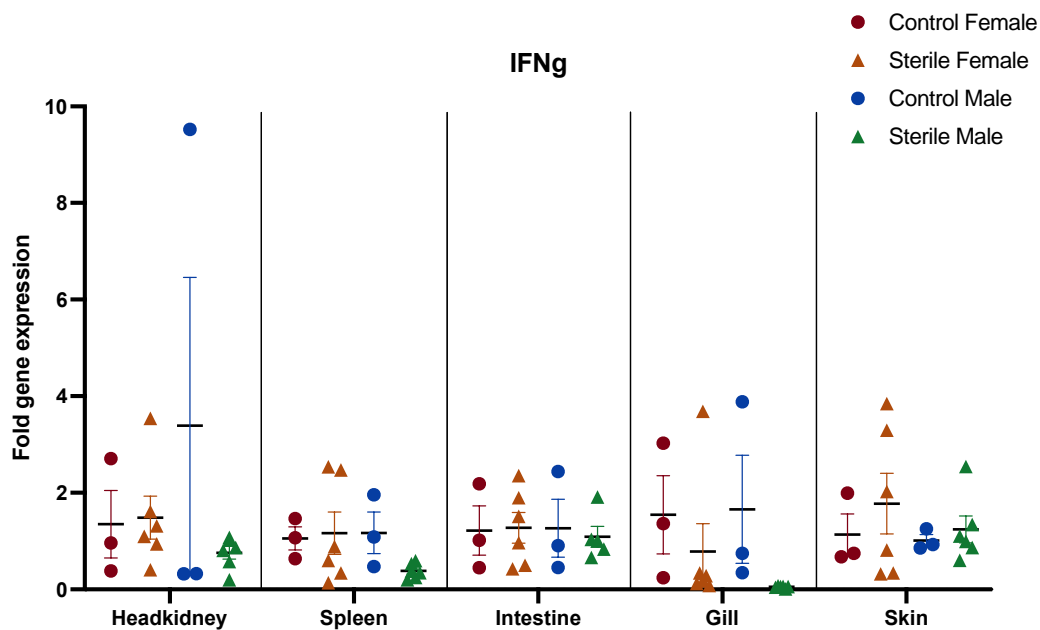
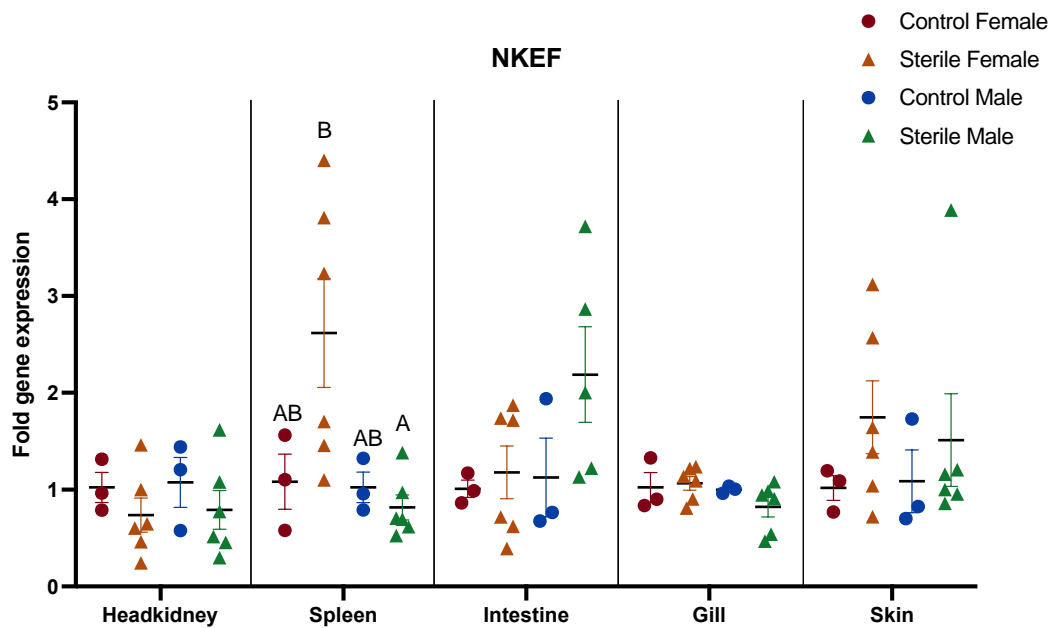


Figur 4 Grafen viser relativt genuttrykk av IL-10 (øverste) og IL-22 (nederste) hos kontroll hunn (n=3), steril hunn (n=6), kontroll hann (n=3 for IL-10, n=2 for IL-22) og steril hann (n=6) i hodekyr, milt, tarm, gjeller og hud. Ulike bokstaver angir signifikante forskjeller ($P < 0,05$) mellom gruppene innenfor hvert vev. Gruppen merket med A er signifikant forskjellig fra gruppen merket med B. Gruppene merket med AB er ikke signifikant forskjellig fra verken gruppe A eller B. Bokstavangivelsen er utelatt i vevene der det ikke ble funnet signifikante forskjeller i genuttrykk. Data er presentert som gjennomsnitt \pm SEM.

Det relative genuttrykket av IL-10 og IL-22 kan ses ut fra Figur 4. Genuttrykket av IL-10 fulgte mer eller mindre de samme trendene i hodekyr, tarm, gjeller og hud. De sterile fiskegruppene hadde et noe høyere genuttrykk enn sin tilhørende fertile fiskegruppe. I gjeller ble det målt et signifikant høyere genuttrykk hos steril hann sammenlignet med fertil hann og steril hunn. I milt var trenden omvendt og de sterile fiskegruppene hadde et noe lavere

genuttrykk av IL-10 enn de fertile kontrollgruppene, det ble ikke funnet signifikante forskjeller her. Etter qPCR, var den ene prøven av kontroll hann for IL-22 av dårlig kvalitet, denne ble derfor fjernet fra beregningene av ratio. Kontroll hann for dette genet bestod derfor kun av to fertile fisk, derfor må resultatene for IL-22 vurderes med ekstra forsiktighet. I hodenyre var uttrykket av IL-22 signifikant høyere hos steril hann sammenlignet med fertil hann, fertil hunn og steril hunn. Til tross for dette ble det ikke funnet signifikante forskjeller i genuttrykk av IL-22 mellom fertil og steril hunn og fertil hann. I milt var genuttrykket av IL-22 signifikant høyere hos steril hunn sammenlignet med steril hann, det ble ikke avdekket signifikante forskjeller i genuttrykk av IL-22 mellom de andre gruppene. Det ble ikke funnet signifikante forskjeller mellom gruppene i de andre vevene.

Interaksjonstabellen ved ANOVA kan ses ut fra Tabell 3. Denne avdekket en signifikant interaksjon mellom kjønn og sterilitet i milt for genuttrykket av IL-10, både kjønn og sterilitet påvirker resultatene for genuttrykket av IL-10 i milt. Data fra genuttrykk av IL-10 i milt oppfylte ikke kravene om en normal fordeling og Kruskal-Wallis test ble benyttet under denne analysen. Det ble ikke oppdaget signifikante interaksjoner i noen av de andre vevene for uttrykket av IL-10. For IL-22 ble det avdekket signifikante interaksjoner mellom kjønnene i både hodenyre og milt, det ser derfor ut til at kjønn har påvirket genuttrykket av IL-22 i begge disse vevene. I hodenyre ble det i tillegg funnet en overordnet signifikant interaksjon mellom kjønn og sterilitet. Det ble ikke funnet interaksjoner av signifikans i noen av de andre vevene.



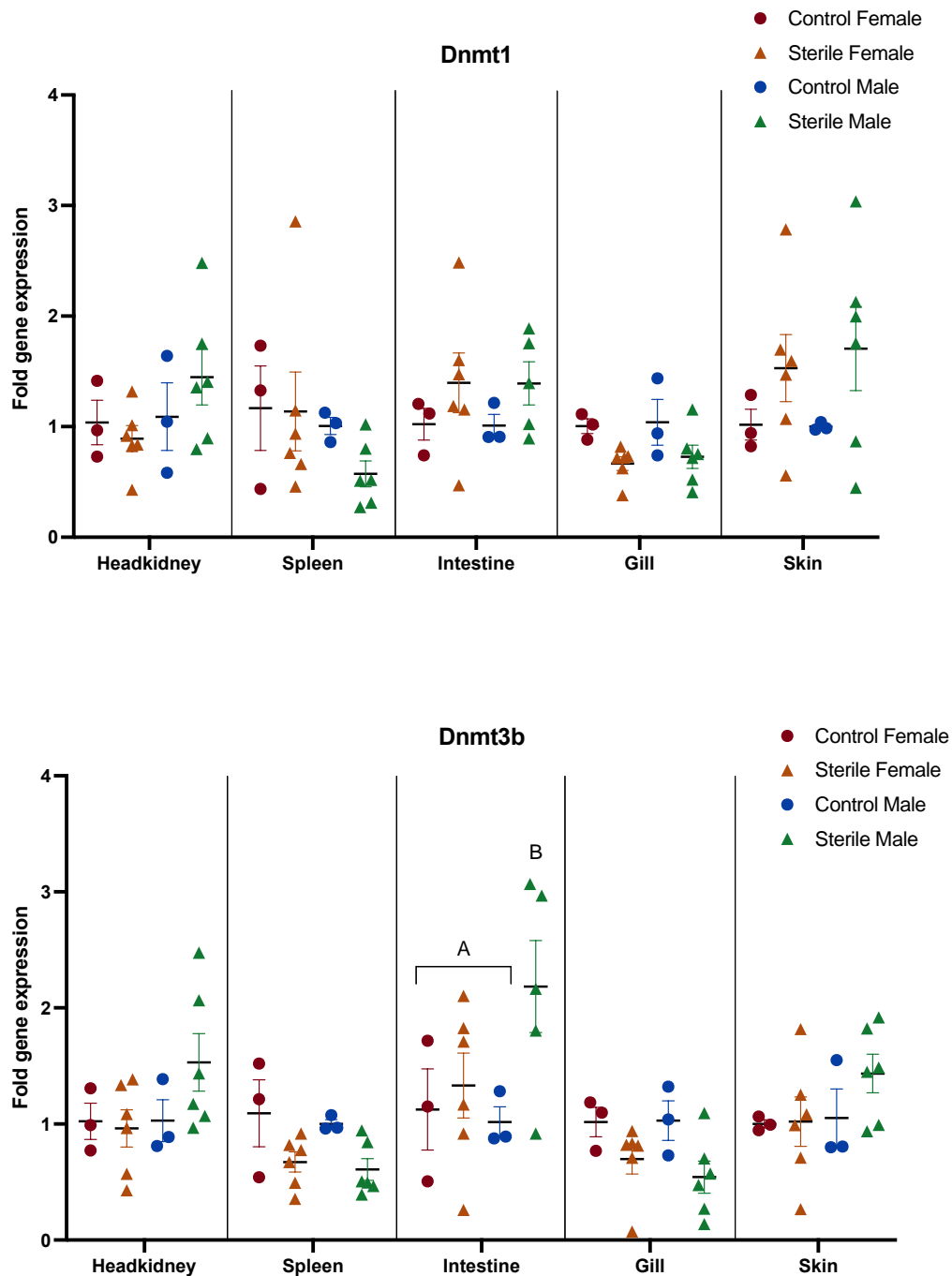
Figur 5 Grafen viser relativt genuttrykk av NKEF (øverste) og IFN- γ (nederste) hos kontroll hunn (n=3), steril hunn (n=6), kontroll hann (n=3) og steril hann (n=6) i hodenyre, milt, tarm, gjeller og hud. Ulike bokstaver angir signifikante forskjeller ($P < 0,05$) mellom gruppene innenfor hvert vev. Gruppen merket med A er signifikant forskjellig fra gruppen merket med B. Gruppen merket med AB er ikke signifikant forskjellig fra verken gruppe A eller B. Bokstavangivelsen er utelatt i vevene der det ikke ble funnet signifikante forskjeller i genuttrykk. Data er presentert som gjennomsnitt \pm SEM.

Uttrykket av NKEF var noe varierende mellom individene i hver av gruppene for de fleste vevene, med unntak av gjeller der uttrykket var relativt stabilt rundt en. I milt ble det avdekket et signifikant høyere uttrykk av NKEF hos steril hunn sammenlignet med steril

hann. Det ble også observert en trend der steril hann hadde høyere uttrykk enn de andre gruppene i tarm, men denne forskjellen ble ikke funnet signifikant. Det ble ikke funnet signifikante forskjeller mellom noen av de andre fiskegruppene eller i noen av de andre vevene. Uttrykket av IFN- γ var generelt noe høyere hos steril hunn sammenlignet med fertil hunn. For hannfisk var snittet i uttrykk av IFN- γ noe høyere hos fertil hann sammenlignet med steril hann, med unntak av i hud der steril hann hadde et noe høyere uttrykk. Det ble ikke avdekket signifikante forskjeller i genuttrykket av IFN- γ mellom noen av gruppene eller i noen av vevene. Disse resultatene er fremvist i Figur 5.

Tabell 3 viser eventuelle interaksjoner som ble funnet. For genuttrykket av NKEF og IFN- γ ble det ikke avdekket noen interaksjoner av signifikans mellom sterilitetsgruppene eller kjønnene. Det så ikke ut til at sterilitet eller kjønn hadde enn innvirkning på genuttrykket av NKEF og IFN- γ .

3.2 Uttrykk av metyltransferasegener



Figur 6 Grafen viser relativt genuttrykk av *Dnmt1* (øverste) og *Dnmt3b* (nederste) hos kontroll hunn ($n=3$), steril hunn ($n=6$), kontroll hann ($n=3$) og steril hann ($n=6$) i hodenyre, milt, tarm, gjeller og hud. Gruppen merket med A er signifikant forskjellig fra gruppen merket med B. Bokstavangivelsen er utelatt i vevene der det ikke ble funnet signifikante forskjeller i genuttrykk. Data er presentert som gjennomsnitt \pm SEM.

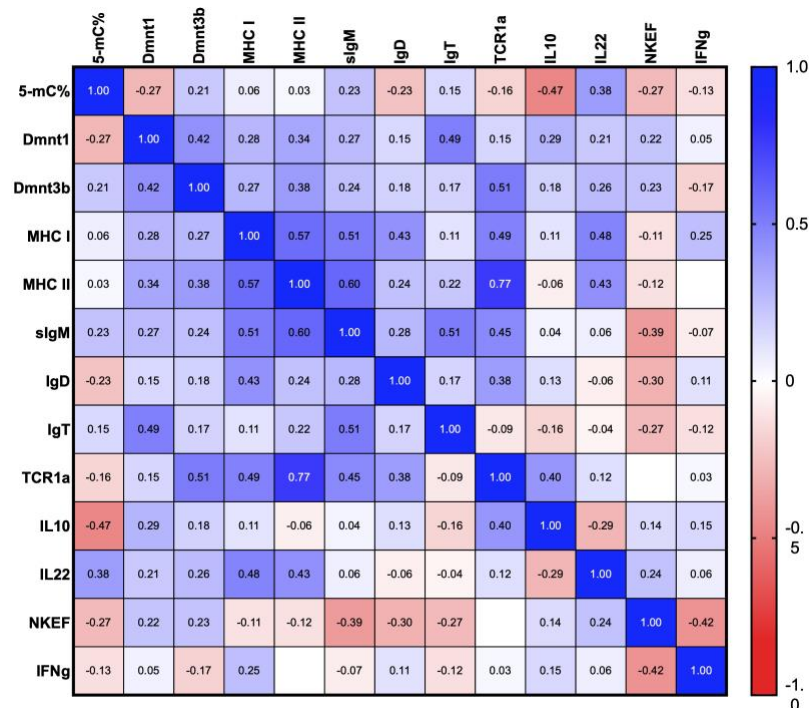
Figur 6 viser resultatene for uttrykket av *Dnmt1* og *Dnmt3b*. *Dnmt1* og *Dnmt3b* følger mer eller mindre de samme trendene i genuttrykk i alle vevene studert. Det ble ikke funnet signifikante forskjeller i genuttrykk av *Dnmt1* mellom de fertile kontrollgruppene og de sterile fiskegruppene eller mellom kjønnene i noen av vevene. I tarm var genuttrykket av

Dnmt3b signifikant høyere hos steril hann sammenlignet med fertil hann. Uttrykket var også signifikant høyere hos steril hann sammenlignet med fertil hunn og steril hunn. Det ble ikke avdekket signifikante forskjeller i genuttrykk av Dnmt3b i noen av de andre vevene.

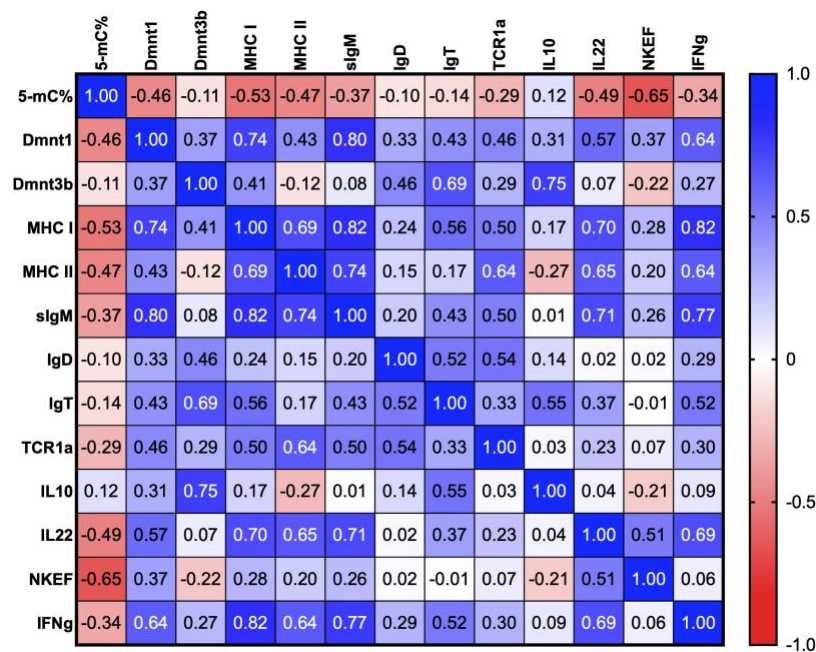
Interaksjonstabellen kan ses ut fra Tabell 3. I gjeller avdekket denne en signifikant interaksjon mellom sterilhetsgruppene for genuttrykket av Dnmt1, og sterilitet kan ha hatt en innvirkning på resultatene i gjeller. Det ble ikke oppdaget overordnede signifikante interaksjoner mellom kjønn eller sterilitet i noen av de andre vevene for uttrykket av Dnmt1. For Dnmt3b ble det funnet en signifikant interaksjon mellom sterilhetsgruppene i milt. I dette vevet så det ut til at sterilitet kan ha hatt en innvirkning på genuttrykket av Dnmt3b. Det ble ikke funnet interaksjoner av signifikans i noen av de andre vevene. For å oppsummere har sterilitet en innvirkning på uttrykket av Dnmt1 og Dnmt3b i henholdsvis gjeller og milt.

3.3 Korrelasjon mellom immungener

Resultatene fra hud kan ses ut fra heatmap oppgitt i Figur 7 og resultatene fra milt kan ses ut fra heatmap oppgitt i Figur 8.

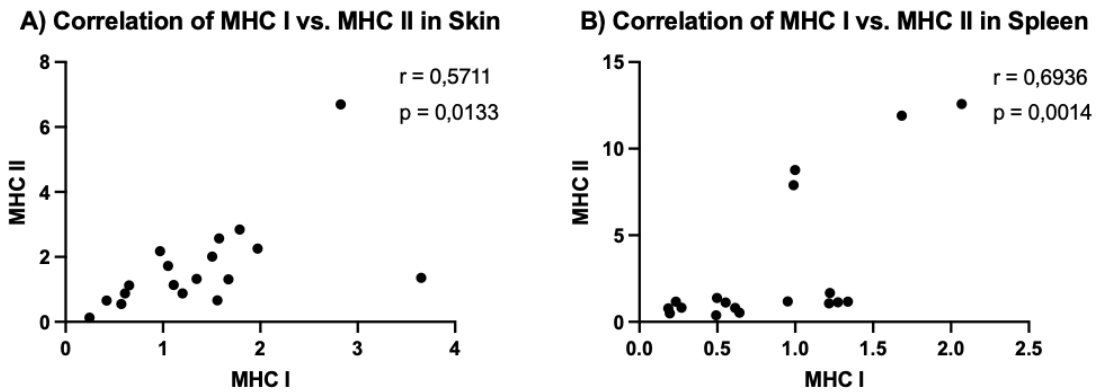


Figur 7 Heatmap fra Pearsons korrelasjon i hud som angir Pearsons r-verdi for eventuelle korrelasjoner mellom alle immungenene og 5-mC%. I tillegg til r-verdien, angir også fargen styrken på korrelasjonene. Desto sterkere blåfarge jo nærmere er r-verdien 1 og indikerer en positiv korrelasjon. Desto sterkere rødfarge, jo nærmere er r-verdien -1 og indikerer en negativ korrelasjon.



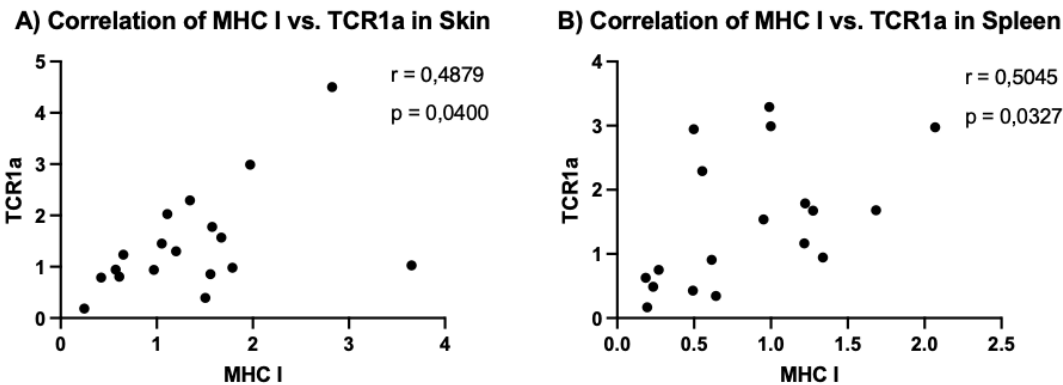
Figur 8 Heatmap fra Pearsons korrelasjon i milt som angir Pearsons r-verdi for eventuelle korrelasjoner mellom alle immungenene og 5-mC%. I tillegg til r-verdien, angir også fargen styrken på korrelasjonene. Desto sterkere blåfarge jo nærmere er r-verdien 1 og indikerer en positiv korrelasjon. Desto sterkere rødfarge, jo nærmere er r-verdien -1 og indikerer en negativ korrelasjon.

Heatmap viste overordnede korrelasjoner i hud og milt, og viser at nesten alle genene som ble studert var positivt korrelerte. I hud var det, ut fra heatmap, få gener som antydte sterke korrelasjoner mellom dem. Den høyeste r-verdien var 0,77 og denne var mellom TCR1a og MHC II. I tillegg hadde MHC II og sIgM en r-verdi på 0,6 og MHC I og MHC II en r-verdi på 0,57, dette ses ut fra Figur 7. I milt viste heatmap sterkere korrelasjoner enn i hud mellom immungenene og mye flere eventuelle korrelasjoner, dette ses ut fra Figur 8. I tillegg til å danne heatmap ble det også beregnet p-verdier for korrelasjonene mellom alle immungenene, disse p-verdiene er oppgitt i Appendix VIII. Kun korrelasjoner som viste en statistisk signifikant sammenheng ble studert videre. I tillegg ble det tatt i betraktning hvilke immungener som kunne ha en biologisk sammenheng med hverandre før korrelasjonene ble studert.



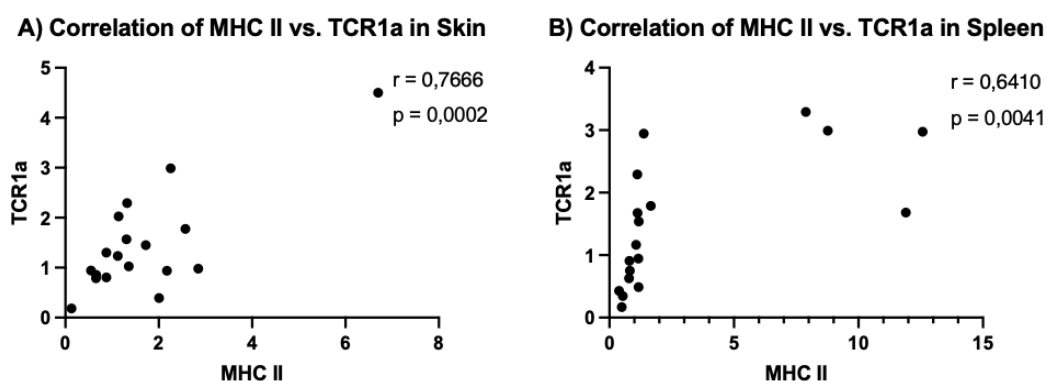
Figur 9 Viser korrelasjonen i genuttrykk mellom MHC I og MHC II i A) hud og B) milt. Pearsons r er et mål for samvariasjonen og viser om sammenhengen er positiv eller negativ og p-verdien indikerer en statistisk signifikant sammenheng ($P < 0,05$).

Det ble utført en Pearsons korrelasjonsanalyse mellom MHC I og MHC II for å vurdere sammenhengen mellom relativt genuttrykk av de to immungenene. I hud ble Pearsons r angitt å være 0,5711 og p-verdien 0,0133. I milt ble r-verdien satt til 0,6936 og p-verdien 0,0014. Dette antydte en positiv korrelasjon mellom uttrykket av MHC I og MHC II i både hud og milt. P-verdien indikerte også en signifikant korrelasjon mellom genene i begge vevene, dette er vist i Figur 9. I milt lå mange av punktene samlet i små klynger og et par enkeltpunkter strakk seg ut og gjorde at det statistisk sett ble dannet en korrelasjon. Korrelasjonen mellom disse genene ble testet videre ved å teste kjønnene separat, dette for å undersøke om forskjeller mellom kjønnene bidro signifikant til korrelasjonene. Resultatene viste at korrelasjonen var signifikant for hunnfisk og ikke hannfisk i milt. I hud var derimot punktene mer jevnt spredt utover og gjorde det mer sannsynlig at det var en reell korrelasjon mellom de to genene. Både hunnfisk og hannfisk hadde signifikante korrelasjoner (dette er ikke fremvist i figuren).



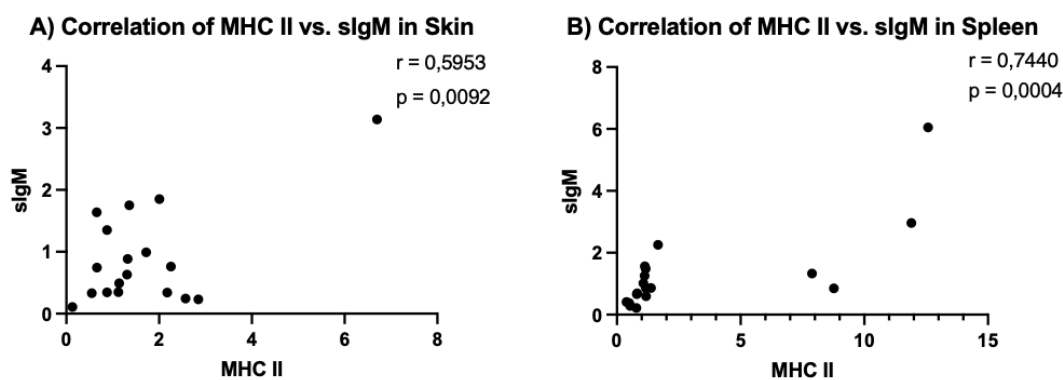
Figur 10 Viser korrelasjonen i genuttrykk mellom genene MHC I og TCR1a i A) hud og B) milt. Pearsons r er et mål for samvariasjonen og viser om sammenhengen er positiv eller negativ og p-verdien indikerer en statistisk signifikant sammenheng ($P < 0,05$).

Forholdet mellom genuttrykk av MHC I og TCR1a ble også vurdert ved å kjøre en Pearsons korrelasjonstest. I hud ble r bestemt å være 0,4879 som indikerte en svak positiv korrelasjon der genuttrykket av de to økte sammen. P-verdien ble satt til 0,0400 som var under signifikansnivå alfa, dette viste at korrelasjonen mellom de to genene var signifikant. Korrelasjonene ble testet videre på kjønnsnivå og kun populasjonen av hannfisk viste en signifikant korrelasjon, dette er ikke vist i figuren. I milt ble Pearsons r bestemt å være 0,5045, dette indikerte også en svak positiv korrelasjon i uttrykk av de to immungenene. P-verdien ble satt til 0,0327 som sa at korrelasjonen var statistisk signifikant, dette kan ses ut fra Figur 10.



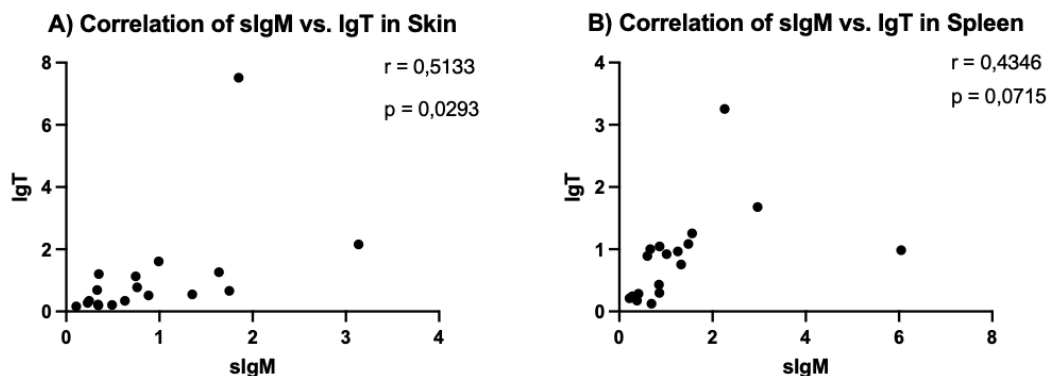
Figur 11 Viser korrelasjonen i genuttrykk mellom genene MHC II og TCR1a i A) hud og B) milt. Pearsons r er et mål for samvariasjonen og viser om sammenhengen er positiv eller negativ og p-verdien indikerer en statistisk signifikant sammenheng ($P < 0,05$).

Korrelasjonen mellom genuttrykk av MHC II og TCR1a ble også undersøkt og resultatene fra korrelasjonsanalysen kan ses ut fra Figur 11. I hud lå punktene relativt jevnt fordelt, men med en stor andel utover starten av diagrammet. Ett punkt fra steril hannfisk strakte seg lenger ut enn alle de andre. Allikevel ble Pearsons r beregnet til 0,7666, dette indikerer en positiv korrelasjon. P-verdien lå på 0,0002 som var mye lavere enn signifikansnivå alfa. Det var derfor en sterk signifikant korrelasjon mellom uttrykket av MHC II og TCR1a i hud. I milt lå mange av punktene samlet, men stigende i begynnelsen av diagrammet, med flere punkter som strakte seg lenger ut, disse kom fra steril hunnfisk. R-verdien ble satt til å være 0,6410 som betyr at det var en positiv korrelasjon mellom de to genene. P-verdien ble beregnet til å være 0,0041 som var lavere enn signifikansnivå alfa og viste en signifikant korrelasjon mellom genuttrykk av MHC II og TCR1a. På kjønnsnivå ble det funnet signifikante korrelasjoner mellom uttrykket av de to genene hos både hunnfisk og hannfisk.



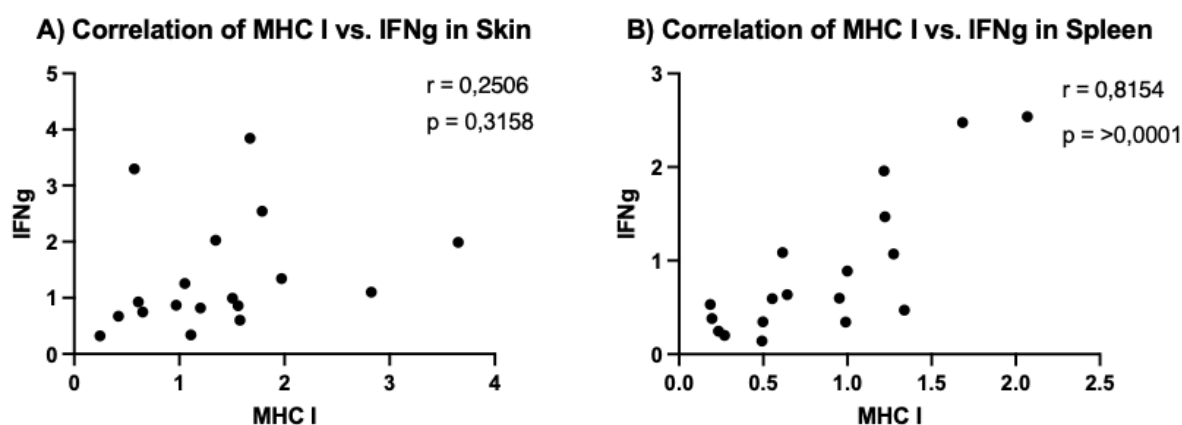
Figur 12 Viser korrelasjonen i genuttrykk mellom genene MHC II og sIgM i A) hud og B) milt. Pearsons r er et mål for samvariasjonen og viser om sammenhengen er positiv eller negativ og p-verdien indikerer en statistisk signifikant sammenheng ($P < 0,05$).

Pearsons korrelasjonstest ble benyttet for å finne korrelasjonen mellom MHC II og sIgM for å vurdere forholdet mellom relativt genuttrykk av de to immunogenene. I hud ble Pearsons r angitt å være 0,5953 og p-verdien 0,0092. I milt ble r-verdien satt til 0,7440 og p-verdien 0,0004. Dette antydte en positiv korrelasjon mellom uttrykket av MHC II og sIgM i både hud og milt. P-verdien viste at det var signifikante korrelasjon mellom uttrykket av genene i begge vevene, dette kan ses ut fra Figur 12. På kjønnsnivå ble det funnet signifikante korrelasjoner mellom uttrykket av MHC II og sIgM hos begge kjønnene i milt. I hud derimot ble det ikke funnet noen korrelasjoner i uttrykk av de to genene hos kjønnene separat.



Figur 13 Viser korrelasjonen i genuttrykk mellom genene sIgM og IgT i A) hud og B) milt. Pearsons r er et mål for samvariasjonen og viser om sammenhengen er positiv eller negativ og p-verdien indikerer en statistisk signifikant sammenheng ($P < 0,05$).

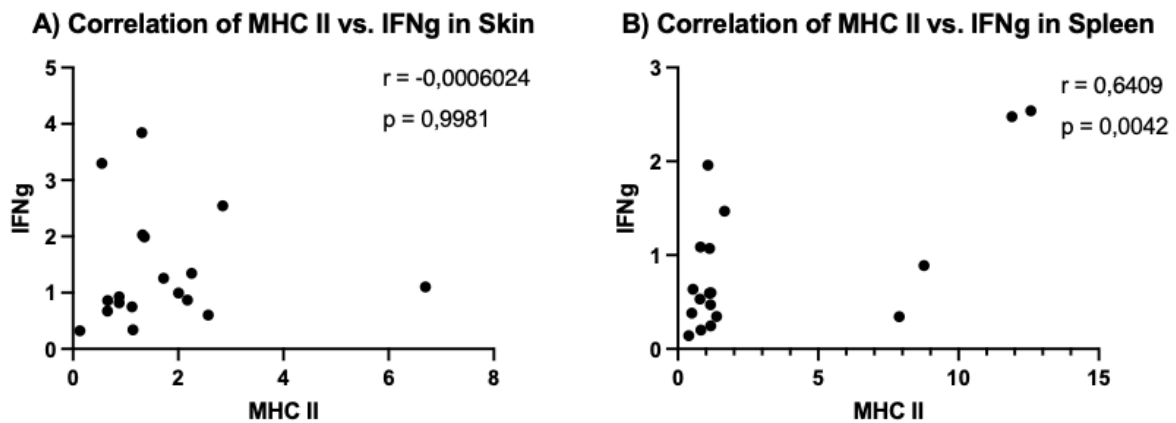
Pearsons korrelasjonskoeffisient ble beregnet for å finne forholdet i relativt genuttrykk mellom genene sIgM og IgT. Det ble funnet en positiv korrelasjon mellom uttrykket av de to genene i både hud og milt, i hud ble r beregnet til å være 0,5133 mens i milt ble r beregnet til 0,4346. I hud var forholdet mellom de to immungenene signifikant og p-verdi var 0,0293. I milt derimot ble p-verdi beregnet til 0,0715 som ikke viste et signifikant forhold i genuttrykk. I hud var det mulig å si at det relative uttrykket av sIgM var assosiert med det relative uttrykket av IgT. I milt var det alt i alt ikke mulig å konkludere med at det relative uttrykket av sIgM var assosiert med det relative uttrykket av IgT, men på kjønnsnivå ble det funnet en signifikant korrelasjon mellom hannfisk. Resultatene kan ses ut fra Figur 13.



Figur 14 Viser korrelasjonen i genuttrykk mellom genene MHC I og IFN- γ i A) hud og B) milt. Pearsons r er et mål for samvariasjonen og viser om sammenhengen er positiv eller negativ og p-verdien indikerer en statistisk signifikant sammenheng ($P < 0,05$).

Pearsons korrelasjonskoeffisient ble beregnet mellom uttrykket av MHC I og uttrykket av IFN- γ i både hud og milt. I hud ble r satt til 0,2506 og p-verdien til 0,3158. Dette viste at det ikke var en signifikant korrelasjon mellom uttrykket av de to genene i hud. På kjønnsnivå ble

det ikke funnet signifikante korrelasjoner mellom uttrykket av de to genene i verken populasjonen av hunnfisk eller i populasjonen av hannfisk. I milt ble r beregnet til 0,8154 og p -verdien var mindre enn 0,0001, dette betyr at det er en sterk korrelasjon mellom uttrykk av MHC I og uttrykk av IFN- γ i milt. Resultatene er fremvist i Figur 14. På kjønnsnivå ble det funnet en signifikant korrelasjon mellom uttrykket av MHC I og IFN- γ i populasjonen av hunnfisk, men ikke hos hannfisk.

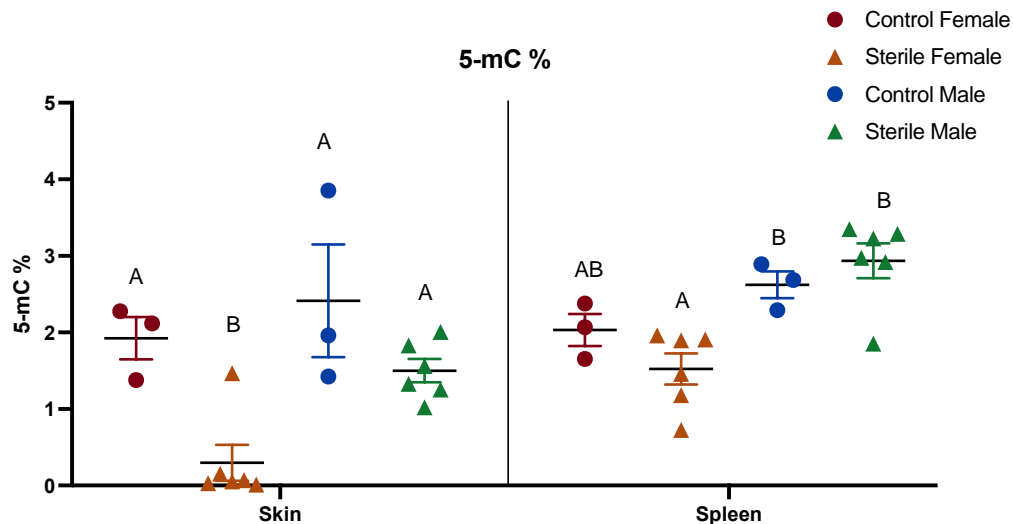


Figur 15 Viser korrelasjonen i genuttrykk mellom genene MHC II og IFN- γ i A) hud og B) milt. Pearsons r er et mål for samvariasjonen og viser om sammenhengen er positiv eller negativ og p -verdien indikerer en statistisk signifikant sammenheng ($P < 0,05$).

Pearsons korrelasjonskoeffisient ble også beregnet mellom uttrykket av MHC II og uttrykket av IFN- γ i hud og milt. I hud ble r angitt å være -0,0006024 og p -verdien satt til 0,9981. Dette betyr at det ikke er noen korrelasjon mellom uttrykket av de to immungenene i hud, på kjønnsnivå ble det heller ikke funnet noen signifikante korrelasjoner. I milt ble r -verdien beregnet til 0,6409 og p -verdien til 0,0042, dette er en signifikant positiv korrelasjon mellom uttrykket av de to genene. I milt ble det på kjønnsnivå funnet en signifikant korrelasjon mellom uttrykket av de to genene blant hunnfisk, men populasjonen av hannfisk viste ingen signifikante korrelasjoner. Figur 15 viser korrelasjonen mellom uttrykket av MHC II og IFN- γ i både hud og milt. På kjønnsnivå ble det funnet en signifikant korrelasjon mellom uttrykket av MHC II og IFN- γ i populasjonen av hunnfisk, det ble ikke funnet en signifikant korrelasjon mellom uttrykket av de to genene hos hannfisk.

3.4 Global DNA-metylering

Standardkurven som ble dannet ved å plote OD-verdiene fra avlesning ved ELISA opp mot en 5-mC standard (%) kan ses ut fra Appendix IX.



Figur 16 Viser beregnet 5-mC% i hud og milt for kontroll hunn (n=3), steril hunn (n=6), kontroll hann (n=3) og steril hann (n=6). Bokstavangivelsen viser om det er signifikans mellom gruppene innenfor hvert vev. Like bokstaver viser til at det ikke ble funnet signifikans mens ulike bokstaver indikerer signifikans mellom gruppene ($P < 0,05$). Bokstavangivelsen er utelatt i vevene der det ikke ble funnet signifikante forskjeller i genuttrykk. Data er presentert som gjennomsnitt \pm SEM.

Tabell 4 Oversikt over interaksjoner ved toveis ANOVA i hud og milt for 5-mC%. "ns" betyr at det ikke ble funnet signifikante forskjeller ($P > 0,05$), "*" betyr at $P \leq 0,05$ og "***" betyr at $P \leq 0,01$ og "****" betyr at $P \leq 0,001$. For rutene merket i grått oppfylte ikke data kravene til en normalfordeling. For rutene merket i rosa var data normalfordelte.

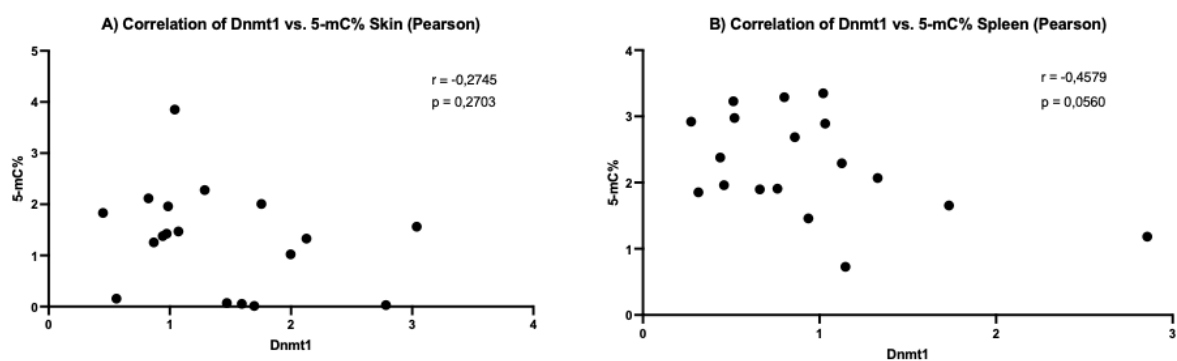
		Hud	Milt
5-mC%	Interaksjon:	*	ns
	Sterilitet	**	ns
	Kjønn:	**	***

Figur 16 presenterer 5-mC% i både hud og milt for de ulike fiskegruppene. I hud hadde steril hunn og steril hann lavere 5-mC% enn den fertile hunnfisken og hannfisken. Ved statistisk analyse ble det funnet signifikante forskjeller i grad av metylering mellom steril hunn og fertil hunn og mellom steril hunn og begge gruppene av hannfisk. Det ble ikke observert signifikante forskjeller i grad av metylering mellom kontroll hann og steril hann.

Variasjonene i 5-mC% mellom kontroll hunn og kontroll hann og kontroll hunn og steril hann ble heller ikke funnet signifikante. I milt var graden av metylering noe høyere hos hannfisk enn hos hunnfisk. Kontroll hunn hadde noe høyere 5-mC% enn steril hunn, allikevel var det ikke like store variasjoner i 5-mC% mellom kontroll hunn og steril hunn som i hud, og disse

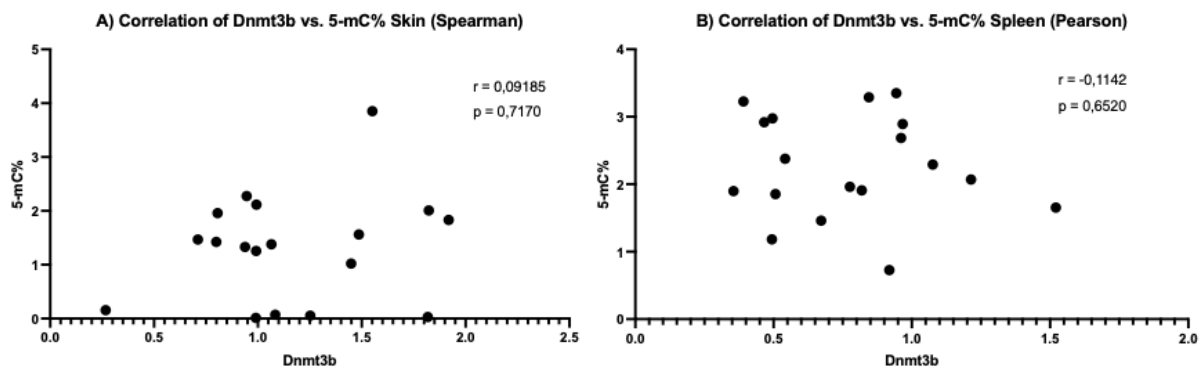
gruppene ble ikke funnet statistisk signifikante. Det var heller ikke store variasjoner mellom kontroll hann og steril hann og det ble ikke avdekket statistisk signifikans i grad av metylering mellom disse. Både kontroll hann og steril hann hadde høyere 5-mC% enn steril hunn og det ble funnet statistisk signifikans i grad av metylering mellom disse. Disse resultatene er fremvist i Figur 16.

Interaksjonstabellen kan ses ut fra Tabell 4. I hud ble det avdekket en signifikant interaksjon mellom steriltetsgruppene og mellom kjønnene for global metylering, både sterilitet og kjønn kan ha hatt en innvirkning på resultatene. Det ble også oppdaget overordnede signifikante interaksjoner mellom kjønn eller sterilitet i grad av metylering av DNA. I milt ble det funnet overordnede signifikant interaksjon mellom kjønnene.



Figur 17 Viser korrelasjonen mellom 5-mC% og uttrykk av Dnmt1 i A) hud og B) milt. Pearsons r er et mål for samvariasjonen og viser om sammenhengen er positiv eller negativ og p-verdien indikerer en statistisk signifikant sammenheng ($P < 0,05$).

Det ble brukt Pearsons test for å beregne korrelasjonskoeffisienten mellom relativt genuttrykk av Dnmt1 og grad av metylering (5-mC%) i hud og milt. I hud ble Pearsons r ble beregnet til å være -0,2745, dette indikerer en svakt negativ korrelasjon mellom genuttrykk av Dnmt1 og 5-mC%. P-verdien ble beregnet til å være 0,2703 som er større enn signifikansnivå alfa, det kan dermed ikke sies at det er en signifikant korrelasjon mellom genuttrykk av Dnmt1 og 5-mC% i hud. I milt ble Pearsons r beregnet til å være -0,4579, dette indikerte negativ korrelasjon mellom uttrykket av Dnmt1 og 5-mC% i milt. P-verdien ble beregnet til å være 0,0560 som er større enn signifikansnivå alfa, det var dermed ikke en signifikant korrelasjon mellom disse to variablene. Ut fra dette er det mulig å si at det relative genuttrykket av Dnmt1 og 5-mC% i milt ikke korrelerer med hverandre. Resultatene kan ses ut fra Figur 17. Det ble videre testet om de ulike kjønnene bidro til signifikans, det ble ikke funnet signifikante korrelasjoner mellom 5-mC% og uttrykk av Dnmt1 for verken hunnfiskfisk eller hannfisk i hud eller milt.



Figur 18 Viser korrelasjonen mellom 5-mC% og uttrykk av Dnmt3b i A) hud og B) milt. Korrelasjonen i hud ble funnet ved Spearmans test og i milt ved Pearsons test. Verdien for r er et mål for samvariasjonen og viser om sammenhengen er positiv eller negativ og p-verdien indikerer en statistisk signifikant sammenheng ($P < 0,05$).

Det ble brukt Spearmans test for å finne en eventuell korrelasjon mellom 5-mC% og relativt genuttrykk av Dnmt3b i hud, dette fordi data ikke var normalfordelte. R-verdien ble beregnet til 0,09185, dette var en svært svak positiv korrelasjon som var nesten tilnærmet null. P-verdien ble beregnet til å være 0,7170 som er mye større enn signifikansnivå, korrelasjonen var derfor ikke signifikant. Ut fra dette kan det sies at det ikke er en korrelasjon mellom relativt uttrykk av Dnmt3b og 5-mC% i hud. Pearsons korrelasjonskoeffisient ble beregnet for å finne forholdet mellom relativt genuttrykk av Dnmt3b og 5-mC% i milt. Det ble funnet en svak negativ korrelasjon mellom uttrykket av Dnmt3b og 5-mC% og r ble beregnet til å være -0,1142. P-verdien ble beregnet til å være 0,6520, som er større enn signifikansnivå alfa, dette betyr at det ikke var en signifikant korrelasjon. Ut fra dette er det mulig å slå fast at det relative genuttrykket av Dnmt3b og 5-mC% i milt ikke korrelerer med hverandre. Resultatene kan ses ut fra Figur 18. På kjønnsnivå ble det ikke funnet signifikante korrelasjoner mellom 5-mC% og genuttrykk av Dnmt3b i verken hud eller milt.

4 Diskusjon

I dette studiet ble det ikke funnet mange signifikante forskjeller i relativt uttrykk av immungenene mellom den kimcellefrie sterile fisken og den fertile kontrollfisken, men det ble i noen vev funnet signifikante forskjeller i genuttrykk av IgD, IL-22 og IL-10 mellom fertil og steril fisk. Det er mulig disse forskjellene skyldes sterilisering via et tap av kimceller, men siden det ikke ble observert noen systematiske endringer er det også mulig at noen av de signifikante forskjellene ble funnet ved tilfeldighet. Lavt antall prøver fra fertil fisk gjør imidlertid at resultatene må tolkes med en viss forsiktighet.

4.1 Uttrykk av immungener

Til dags dato er det ingen forskningsdata tilgjengelig om genuttrykk av ulike immungener hos steril, kimcellefri teleost fisk sammenlignet med fertil fisk. Hovedmålet ved dette forsøket var å undersøke hvordan bortfallet av kjønnsceller påvirket uttrykket av immungener som er essensielle for fiskens immunsystem og opprettholdelse av homeostase. Genene som ble undersøkt var MHC I, MHC II, TCR1a, IgM, IgD, IgT, IL-10, IL-22, IFN- γ og NKEF. Disse genene ble studert fordi de dekker ulike deler av fiskens immunsystem og er viktige for fisken i møte med patogener.

4.1.1 Major Histocompatibility complex (MHC)

I dette forsøket ble det verken observert signifikante forskjeller i relativt genuttrykk av MHC I eller MHC II mellom sterilitetsgruppene hos den atlantiske laksen. Den atlantiske laksen benyttet i dette forsøket var vaksinert og ble holdt i sjøen under normale oppdrettsbetingelser, den var dermed hele tiden i kontakt med vannmassene rundt og dermed eksponert for patogener. Siden det ikke ble funnet signifikante forskjeller i uttrykk av MHC I eller MHC II mellom sterilitetsgruppene, indikerte dette at sterilisering via et bortfall av kjønnsceller ikke hadde en innvirkning på uttrykket av disse immungenene, til tross for at fisken hadde vært i et miljø med patogener. I dette forsøket ble det funnet signifikante forskjeller i genuttrykk av MHC I i milt mellom steril hunn og steril hann. For MHC II ble det også avdekket signifikante forskjeller i genuttrykk mellom steril hunn og steril hann i milt, tarm og hud. Det kan spekuleres i om sterilitet ved tap av kjønnscellene har en kjønnsseffekt når det kommer til uttrykket av MHC, spesielt MHC II og dermed forskjeller når det kommer til evnen til antigenpresenteringen hos sterile hunnfisk og hannfisk. Noen av disse funnene er i tråd med funnene gjort i et annet forsøk utført på triploid og diploid kongelaks (*Onchorhynchus tshawytscha*), der det har vært forsøkt å avdekke transkripsjonelle forskjeller etter en

injeksjon med bakterien *Vibrio anguillarum*. Uttrykket av MHC II ble studert både før og etter injeksjonen og det ble ikke funnet forskjeller i genuttrykk mellom den diploide og den triploide kongelaksen før fisken ble injisert med bakterien (Ching et al., 2010). Dette viste at det heller ikke var forskjeller mellom diploid og steril triploid kongelaks når det kom til uttrykk av MHC II, kongelaksen ble imidlertid holdt i et miljø uten patogener. Den triploide kongelaksen er funksjonelt steril, men triploidiseringen medfører ikke et tap av kjønnseller og denne fisken er dermed ulik fra den kimcellefrie sterile fisken. Det kan derfor hende det er forskjeller mellom kimcellefrie steril fisk og triploid fisk. Som allerede nevnt levde den atlantiske laksen benyttet i dette forsøket i åpne merder under normale oppdrettsbetingelser. Fisken var kjent infisert med lakselus og noen fisk døde trolig pga. lakselusinfeksjon. Laksen som døde tilhørte hovedsakelig den fertile fiskegruppen, og dette viser at den kimcellefrie fisken hadde samme sykdomsresistens som den fertile fisken når det kommer til uttrykk av MHC. Dette er ikke i samsvar med forsøket på triploid og diploid kongelaks, da den triploide kongelaksen hadde høyere dødelighet sammenlignet med den diploide fisken. Etter injeksjonen med *V. anguillarum* endret genuttrykket av MHC II seg og den triploide kongelaksen viste et redusert uttrykk av MHC II, mens den diploide kongelaksen viste et økt uttrykk. Den triploide kongelaksen hadde også høyere dødelighet etter infeksjonen. Data fra forsøket indikerte at triploidiseringen reduserte kongelaksens sykdomsresistens (Ching et al., 2010).

4.1.2 T-cellereseptor

I dette forsøket ble det ikke funnet signifikante forskjeller i genuttrykk av TCR1a mellom sterilitetsgruppene og det kan dermed spekuleres i om T-leukocytene til den kimcellefrie fisken har samme evner til å binde peptidantigener fremvist av MHC-molekylene. Den fertile og sterile atlantiske laksen var kjent infisert med lakselus, og flere fisk døde som følge av infeksjonen. Siden fisken benyttet i forsøket var infisert, og det allikevel ikke ble funnet signifikante forskjeller i uttrykket av TCR1a mellom den sterile og fertile fisken, indikerer dette at steriliseringen via et bortfall av kjønnseller ikke har en innvirkning på genuttrykket av denne T-cellereseptoren. Det har blitt utført studier på atlantisk laks som undersøker genuttrykket av diverse immungener i hud, milt og hodenyre i løpet av de 15 første dagene etter en lakselusinfeksjon med lakselusa *Lepeophtheirus salmonis*. En dag etter infeksjonen ble det blant annet observert en forbigående økning i genuttrykket av TCRa i hud. Det ble også observert en økning i TCRa fem dager etter infeksjonen, men etter dette ble det ikke observert en økning i uttrykk (Tadiso et al., 2011). Dette indikerer at T-cellereseptorer er

viktig tidlig under en infeksjon. Tilsvarende kan dette også være en av årsakene til at det ikke ble funnet forskjeller i uttrykk av TCR1a i dette studiet, fordi begge fiskegruppene var i sjø og eksponert for lus i flere måneder. Ved analysen for interaksjoner ble det funnet signifikante kjønnsforskjeller i uttrykk av TCR1a i hodenyre grunnet signifikante forskjeller mellom hannfisk og hunnfisk. Dette kan indikere at steriliseringen kan ha hatt en kjønns effekt på genuttrykket av TCR1a. Det er mulig hunnfisk og hannfisk har varierende evner til å binde peptidantigener fremvist av antigenpresenterende celler, men dette er et område som krever videre forskning for å se på de eventuelt fysiologiske forskjellene mellom kjønnene hos den kimcellefrie fisken.

4.1.3 Immunoglobulin

I dette forsøket ble det funnet et signifikant høyere uttrykk av IgD hos steril hunn, sammenlignet med fertil hunn og de to gruppene av hannfisk, i tarm. Årsaken til dette kan være at to av de sterile hunnfiskene hadde et høyt uttrykk av IgD. Uttrykket hos disse var nesten 10 ganger så høyt som hos resten og økte dermed snittet med fem ganger. Tilsvarende var uttrykket av sIgM i tarm. Dette kan kanskje indikere at en knockdown av kjønns cellene har virket inn på genuttrykket av IgD hos noen sterile hunnfisk. Årsaken kan også være at to av individene var i kontakt med patogener som medførte endringer i det mikrobielle miljøet i tarmen, og dermed gav et økt uttrykk av IgD i tarm. Hittil har IgD blitt funnet hos alle teleoster. Konsentrasjonen av IgD i mukos i flere av slimhinnene er rapportert å være lavere enn det i serum. Det har blitt funnet at IgD utgjør en signifikant andel av mikrobiota på fiskens gjeller, men denne er mindre enn for IgM og IgT. Andre studier viser også at IgD utgjør en del av mikrobiota på andre slimhinner, inkludert i buk og munnhulen. Det er derfor mulig at IgD har en funksjon i reguleringen av homeostase i mikrobiota (Salinas et al., 2021). Den kimcellefrie hunnfisken kan derfor ha et immunforsvar som er bedre rustet til å beskytte slimhinnene i fordøyelseskanalen mot virus, bakterier eller parasitter. Hos den atlantiske laksen i dette forsøket lå det relative genuttrykket av IgD hos de fleste fiskegruppene et sted mellom 0,5-1,5, dette var i noe samsvar med funnene gjort i et studie utført på regnbueørret (*Onchorhynchus mykiss*), der uttrykket av immunoglobulinene ble undersøkt før og etter en infeksjon med bakterien *Flavobacterium psychrophilum*. Det normale relative uttrykket ble funnet i lymfocytter, gjeller, hud og tarm for de tre immunoglobulinene. For IgD lå det relative genuttrykket før infeksjonen på en fold-endring rundt 1 (Makesh et al., 2015). Laksen i dette forsøket var i sjøvann og hele tiden eksponert for patogener og parasitter, derfor er det ikke rart at det ble funnet et noe høyere uttrykk hos laksen enn hos regnbueørreten.

Det ble ikke funnet signifikante endringer i genuttrykk av IgT mellom den sterile og fertile laksen i dette forsøket, som indikerer at steriliseringen via et bortfall av kjønnsceller ikke har påvirket uttrykket av IgT. Ved infeksjoner er patogen-spesifikke titre av IgT svært prevalente i slimhinnene i de ulike MALTs. Det er gjort forsøk for å avdekke IgTs rolle ved mikrobiota-homeostase der fisk som manglet IgT ble studert. Denne fisken utviklet en tydelig dysbiose der mikrobiota var i stand til å forflytte seg over epitelet og inn i sirkulasjonen. Dette indikerte at IgT har en viktig rolle for å holde mikrobiota i de ulike mukosale vevene i sjakk (Salinas et al., 2021). Siden det i dette forsøket ikke ble funnet signifikante forskjeller i genuttrykk av IgT mellom fertil og steril laks i noen av vevene, kan dette indikere at den sterile, kimcelfrie laksen har like gode evner til å opprettholde homeostasen i slimhinnenes mikrobiota. Funnene i genuttrykk av IgD og IgT hos steril og fertil atlantisk laks var relativt like de som ble funnet hos regnbueørret i forsøket nevnt over, før en infeksjon. Dette kan tyde på at atlantisk laks har en relativt lik uttrykksprofil som regnbueørreten, men siden det er to ulike arter og fiskene ble holdt i ulike miljøer, er det forventet å finne små variasjoner. I dette forsøket lå det relative uttrykket av IgT hos den sterile og fertile atlantiske laksen et sted mellom 0,5-1,5. Dette samsvarte noe med funnene gjort på regnbueørreten hvor det normale relative genuttrykket av IgT lå på en foldendring rundt 0,5 før infeksjonen med *Flavobacterium psychrophilum* (Makesh et al., 2015). Det er høyst sannsynlig at genuttrykket hos laksen var noe høyere enn hos regnbueørreten fordi laksen var konstant eksponert for miljøet rundt, og dermed patogener, mens regnbueørreten ble holdt i et miljø uten patogener.

Det ble ikke oppdaget noen signifikante forskjeller i relativt genuttrykk av sIgM mellom sterilitetsgruppene i noen av vevene for den atlantiske laksen. All fisken brukt i dette studiet var vaksinert med en sekskomponents vaksine før de ble overført til merden, og uttrykket av sIgM hos både den fertile og sterile fiskegruppen var mer eller mindre lik etter fem måneder. Dette kan indikere at et steriliseringen ved et bortfall av kjønnsceller ikke har noen innvirkning på uttrykket av sIgM under vanlige oppdrettsbetingelser. Disse resultatene er i overensstemmelse med resultatene fra det samme forsøket utført av Ching et al., (2010), før en infeksjon. Her ble også uttrykket av IgM studert hos den triploide og diploide kongelaksen både før og etter injeksjonen med *V. anguillarum*. Uttrykket av IgM fulgte samme trendene som MHC II; før injeksjonen var det ingen forskjell i uttrykk av IgM hos den diploide og triploide kongelaksen, men etter injeksjonen ble det observert et redusert uttrykk hos den triploide laksen og et økt uttrykk hos den diploide laksen.

4.1.4 Cytokiner

I dette forsøket viste både den sterile og fertile atlantiske laksen et lavt uttrykk av IL-10. Laksen ble holdt i åpne merder og var vaksinert mot store patogener for å etterligne mest mulig naturlige oppdrettsbetingelser. Siden fisken ble holdt i sjøen og var i kontakt med vannmassene, var det mulig fisken hadde infeksjoner med lakselus eller andre vanlige patogener. Derfor var det forventet å oppdage et uttrykk av IL-10. I gjeller ble det funnet en signifikant forskjell i genuttrykk av IL-10 mellom fertil og steril hannfisk og uttrykket var oppregulert hos steril hannfisk. Det ble også funnet et signifikant høyere genuttrykk av IL-10 i steril hannfisk sammenlignet med steril hunnfisk. Dette kan indikere at bortfallet av kjønnsceller påvirker genuttrykket av IL-10 i gjeller og at den sterile fisken har et oppregulert uttrykk av IL-10 i dette vevet. Innad i den sterile gruppen av hannfisk i gjeller ble det observert en del variasjoner i genuttrykk mellom individene. Noen hadde relativt likt genuttrykk som individer i de andre gruppene, mens to av individene hadde mye høyere genuttrykk av IL-10. Det er derfor sannsynlig at enkelte hannfisk i den sterile gruppen var infisert med lakselus eller andre patogener, og derfor hadde et høyere genuttrykk. Det kan derfor spekuleres om de signifikante forskjellene i genuttrykk som ble målt kommer av disse variasjonene heller enn steriliseringen, siden det er mulig enkelte individer var infisert av parasitter eller patogener. IL-10 er et antiinflammatorisk cytokin som spiller en kritisk rolle i reguleringen av inflammasjonsprosessen. Dette cytokinet er uttrykt i mange celletyper, og hovedfunksjonen er å undertrykke den inflammatoriske responsen ved å nedregulere uttrykket av andre cytokiner, hovedsakelig på transkripsjonsnivå. Det har blitt utført få studier på IL-10 hos fisk, og det er ikke bekreftet at det innehar antiinflammatoriske funksjoner som tilsvarer den hos pattedyr (Seppola et al., 2008). Siden det ikke ble observert signifikante forskjeller i genuttrykk mellom kontrollfisken og den kimcellefrie fisken i noen av de andre vevene, kan det antas at den sterile fisken har samme ytelse når det kommer til antiinflammasjonsprosesser som den fertile fisken her. Genet for IL-10 har blitt identifisert hos flere teleoster, og funksjonen har blitt karakterisert hos gullfisk og karpe (Zou & Secombes, 2016). I et forsøk utført på karpe (*Cyprinus carpio* L.) ble genuttrykket av blant annet IL-10 analysert i hud før og etter skader som skulle etterligne infeksjon med ektoparasitter (Gonzalez et al., 2007). Det basale uttrykket av IL-10 var relativt lavt før fisken ble utsatt for skade på epitelet. Tre timer etter den mekaniske induksjonen av hudskade ble det observert en signifikant økning i transkripsjonen av IL-10, bare etter 30 minutter ble det observert fem ganger så høye transkripsjonsnivåer som ved start. Etter 24 timer kunne fremdeles et lavere, men fremdeles signifikant uttrykk observeres. Etter at uttrykket av andre cytokiner har vært

oppregulert, forventes det å finne en oppregulering av uttrykket av IL-10. Dette ble ikke funnet i forsøket på karpene, men det er mulig denne responsen skjer mer enn 24 timer etter en skade (Gonzalez et al., 2007). Hos karpefisken ble basalnivået til IL-10 målt til å være lavt før inflammasjonsprosessen og dette resultatet er i samsvar med resultatene fra dette forsøket der uttrykket hos den sterile og fertile atlantiske laksen ble målt å være lavt.

I dette forsøket ble det observert et uttrykk av IFN- γ hos alle fiskegruppene, noe som var forventet da fisken ble holdt ved naturlige oppdrettsbetingelser der den hele tiden var i kontakt med vannmassene og patogener i vannet. Uttrykket var relativt lavt for de fleste fiskene, med unntak av enkelte individer av fertil hann med et noe høyere uttrykk. Årsaken til dette kan være at disse enkeltfiskene var i kontakt med patogener og derfor hadde et noe høyere uttrykk. Det ble imidlertid ikke funnet noen signifikante forskjeller i uttrykk av IFN- γ mellom kontrollfisken og den sterile fisken. Dette gir trolig grunnlag for å tro at et bortfall av kjønnseller ikke påvirker genuttrykket av IFN- γ og det er sannsynlig at den sterile fisken har samme evne til å forsvare seg mot patogener som den fertile kontrollfisken. Hos pattedyr blir IFN- γ hovedsakelig syntetisert og utskilt fra T-hjelper 1-celler (Th1-celler) og NK-celler og virker på mange celletyper som makrofager, T-celler og NK-celler. IFN- γ regulerer både cellemedierte og medfødte immunresponser. IFN- γ regulerer prolifereringen og differensieringen av T-celler og forbedrer antigenpresenteringen (Zou et al., 2005). I et vaksineforsøk utført på atlantisk laks, med antigenbakterien *Aeromonas salmonicida* og infeksjons pankreas nekrosevirus (IPNV), ble genprofilen til cytokiner undersøkt for å indikere tilstedeværelsen av T-hjelperceller. Det relative uttrykket av blant annet IFN- γ ble funnet og lå på rundt 1 i milt og 2 i hodenyre hos fertil atlantisk laks 30 dager etter vaksinasjonen (Kumari et al., 2013). Resultatene fra vaksineforsøket med *A. salmonicida* og IPNV er i noe samsvar med resultatene fra dette forsøket da det ikke ble observert høye uttrykk av IFN- γ .

I dette forsøket ble uttrykket av IL-22 også studert hos steril kimcellefri laks sammenlignet med fertil laks. Det ble ikke funnet signifikante forskjeller i genuttrykk mellom de sterile fiskegruppene og de respektive kontrollgruppene i milt, tarm, gjeller eller hud. Dette kan indikere at den kimcellefrie laksen uttrykker IL-22 like godt som den fertile kontrollfisken i disse vevene. Dermed vil trolig den sterile fisken ha et IL-22 som er like potent som hos fertil fisk. Fisken som ble studert var vaksinert og holdt under naturlige oppdrettsbetingelser, det ble derfor funnet et relativt basalt uttrykk av IL-22. IL-22 er et kritisk cytokin som er involvert i moduleringen av vevsresponser under betennelsesreaksjoner. Hos teleoster har IL-22 blitt klonet og studert i flere arter og transkripsjonen er sterkt uttrykt i slimhinnevev og

induseres av PAMPs. Dette tyder på at IL-22 også er en viktig komponent ved det medfødte immunforsvaret til fisk (Hu et al., 2019). Hos pattedyr blir IL-22 hovedsakelig produsert av lymfoide celler inkludert flere typer T-celler, medfødte lymfoide celler og naturlig dreper T-celler (NKT-celler). I tillegg kan makrofager, neutrofiler og mastceller produsere IL-22 under sykdomsmodeller (Perusina Lanfranca et al., 2016). I infeksjonsforsøk utført på regnbueørret infisert med bakterien *Aeromonas salmonicida* ble det funnet at transkripsjonsnivåene av IL-22 økte signifikant i gjellene etter infeksjonen. Fisken ble også infisert med bakterien *Yersinia ruckeri*, her økte transkripsjonsnivåene av IL-22 drastisk. Dette viste at uttrykket av IL-22 viste en markant økning i noen mukosale vev under infeksjoner (Hu et al., 2019). I et annet forsøk viste uttrykket av IL-22 en oppregulering i tarm fem dager etter en infeksjon med *A. salmonicida* hos atlantisk laks. Det ble ikke funnet en oppregulering i genuttrykk i hud eller lymfoide vev (Kumari et al., 2015). I dette forsøket ble det funnet signifikante forskjeller i genuttrykk mellom steril hann- og hunnfisk i både hodenyre og milt. I tillegg ble det funnet en signifikant forskjell i relativt genuttrykk av IL-22 mellom fertil og steril hannfisk i hodenyre. Alle individene av den sterile hannfisken hadde et sterkere uttrykk av IL-22 sammenlignet med den fertile hannfisken. Denne forskjellen kan indikere at sterilisering via et tap av kjønnsceller, kan påvirke uttrykket av IL-22 og kan ha ført til kjønnsforskjeller i genuttrykket av IL-22. Disse resultatene i hodenyre og milt gjenspeiles også i analysen av den generelle kjønns- og sterilitetsinteraksjonen, hvor kjønn har bidratt betydelig i disse vevene. Mekanismene bak denne forsterkningen i genuttrykk hos steril hannfisk er fremdeles ukjent, men det kan spekuleres i om hodenyre hos den sterile hannfisken inneholder flere av celletypene som produserer IL-22, men dette krever videre forskning. Som allerede nevnt produseres IL-22 hovedsakelig i T-celler, NKT-celler og andre lymfoide celler (Perusina Lanfranca et al., 2016). Hodenyre og milt regnes som hovedlymfoide organer, og disse inneholder mange av disse celletypene (Wang et al., 2011). En av prøvene av kontroll hann i hodenyre var av dårlig kvalitet og ble fjernet fra beregningene. Kontrollgruppen her bestod derfor kun av to individer. Det lave prøvenummeret kan ha gitt en skjevhet i resultatene som medførte til at det ble funnet signifikante forskjeller. Disse resultatene er derfor usikre og det kreves videre og mer omfattende testing for å kunne konkludere hvordan ytelsen til den sterile fisken er i forhold til den fertile fisken.

4.1.5 Peroxiredoksiner

Det ble ikke funnet signifikante forskjeller i genuttrykket av NKEF mellom fertil og steril fisk i dette forsøket. Imidlertid var det en kjønnseffekt i den sterile gruppen i milt. Dette gir grunnlag for å tro at sterilisering ved et bortfall av kjønnsceller ikke virker inn på uttrykket av NKEF hos den kimcellefrie atlantiske laksen. Trolig vil NK-cellenes evne til å forsvare fisken mot virus og bakterier være like god i den sterile fisken som hos den fertile fisken, men det kreves videre studier for å kunne bekrefte eller avkrefte dette. NKEF har blitt sekvensert fra flere fiskearter og rapportert uttrykt i de fleste store fiskeorganene, inkludert slimhinnene. Som hos pattedyr, har NKEF vist seg å ha en utløsende effekt på naturlige dreperceller (NK-celler) også hos teleoster (Kumari et al., 2015). Hos pattedyr kjenner NK-cellene igjen infiserte celler og dreper disse ved å skille ut det makrofageaktiverende cytokinet IFN- γ . Makrofagene vil så fagocyttere og drepe mikrobene (Abbas et al., 2014). Tidligere studier har avdekket forholdet mellom mRNA-uttrykket av NKEF og bakterielle eller virale infeksjoner. I hodenyre og milt hos piggvar har det blitt funnet et høyere uttrykk av NKEF under infeksjoner med *V. anguillarum*, og i regnbueørret ved viral hemorragisk septikemi (VHS) (Kumari et al., 2015). I et infeksjonsforsøk med *Aeromonas salmonicida* på atlantisk laks har det blitt funnet forsterkninger av NKEF i hud, tarm, milt og hodenyre. Dette kan være relatert til en aktivering av NK-liknende celler i lymfe- og slimhinnevev som en respons på infeksjonen. Det ble også funnet en oppregulering av NKEF i huden ved bakterieinfeksjonen, som kan fremheve muligheten for at det er NK-liknende celler i hudbarrieren hos laks (Kumari et al., 2015). Alle de ovennevnte resultatene står i kontrast til den foreliggende studien hvor NKEF-uttrykket var mer eller mindre likt i både den sterile og fertile laksen, med små variasjoner. Dette kan skyldes at uttrykket av NKEF nådde basalnivået siden den vaksinerte fisken var lenge i et multipatogenmiljø.

4.2 Samvariasjon i genuttrykk

For å videre studere styrken av forholdet mellom immungenene studert hos de sterile og fertile hunn- og hannfiskene, ble det utført en korrelasjonsanalyse. Siden det ble funnet få forskjeller mellom fertilitetene, ble data slått sammen innenfor et gen, men det var aktuelt å undersøke effekten kjønn hadde på sammenhengene, og det ble utført en kjønnsanalyse i tillegg for å se hvordan kjønn bidro til korrelasjonene mellom uttrykk av genene. Ut fra heatmap og beregnede p-verdier så det ut til at det kunne være en korrelasjon i genuttrykk mellom mange av immungenene. Til tross for dette ble det kun studert korrelasjoner mellom de genene der det var mulig å anta en biologisk sammenheng.

MHC I og MHC II er begge involvert i antigenpresenteringen, men disse fremviser peptidantigenene sine for T-cellerreseptorer på ulike populasjoner av T-celler. Tidligere studier har vist at genene for MHC I og MHC II hos pattedyr er koblet sammen, det ser ikke ut til at det samme gjelder for fisk (Yamaguchi & Djikstra, 2019). Siden MHC I og MHC II har omtrent samme funksjon, er det aktuelt å studere om det finnes en korrelasjon mellom uttrykket av de to genene. I både hud og milt ble det funnet en signifikant positiv korrelasjon mellom uttrykket av MHC I og uttrykket av MHC II. I hud bidro begge kjønnene til signifikans da det ble funnet signifikante korrelasjoner mellom uttrykket av de to genene hos både hunnfisk og hannfisk ved separat korrelasjonstesting. I milt ble det kun funnet en signifikant korrelasjon mellom uttrykket av de to genene hos hunnfisk, det så derfor ikke ut til at hannfisk bidro til den signifikante korrelasjonen. Siden det ble funnet signifikante korrelasjoner, er det mulig at uttrykket av MHC I og MHC II øker eller minker sammen. Dette skyldes at individene som ligger lengre "opp" i diagrammet har et høyere uttrykk av MHC, noe som kan indikere at disse fiskene f.eks var i kontakt med patogener og dermed hadde et oppregulert uttrykk av MHC. Siden det verken ble funnet signifikante forskjeller i genuttrykk av MHC I eller MHC II mellom fertil eller steril fisk, er det lite sannsynlig at steriliseringen har ført til at det ene genet opp- eller nedregulerer det andre.

MHC-molekylene og T-cellerreseptorer har en biologisk sammenheng ved immunrespons, og det er derfor sannsynlig at uttrykket av disse to varierer sammen. TCR kjenner igjen peptidene som er bundet og fremvist av MHC-molekylene (Bilal et al., 2018). Det ble funnet en svak positiv, signifikant korrelasjon mellom uttrykket av MHC I og uttrykket av TCR1a i både hud og milt. R-verdiene var positive, og dette betyr at uttrykket av MHC I og TCR1a har en tendens til å øke eller å minke sammen. Det ble også funnet positive, signifikante korrelasjoner mellom uttrykket av MHC II og uttrykket av TCR1a i både hud og milt. R-verdiene var høyere for korrelasjonene mellom uttrykket av MHC II og TCR1a enn mellom MHC I og TCR1a, dette tilsier at samvariasjonen er sterkere mellom disse to genene. Dette kan indikere den positive effekten ved vaksinasjon og MHC II og TCR1a kan spille en betydelig rolle i å stimulere B-celler for antistoffproduksjon mot antigenkomponentene i vaksinen. Ut fra dette er derfor mulig å si at uttrykket av MHC I og uttrykket av TCR1a korrelerer med hverandre og at uttrykket av MHC II og uttrykket av TCR1a korrelerer med hverandre.

Naive B-celler har membranbundne Igs som fungerer som antigenreseptorer. Ved binding av antigener til disse, og ved stimulering av T-celler eller andre stimuli, aktiveres de naive B-cellene. Dette fører til en proliferering og differensiering til antigen-sekreserende plasmaceller. Naive IgM⁺ B-celler skiller ut sIgM ved aktivering (Abbas et al., 2014). Dersom B-cellene aktiveres ved å binde proteinantigener, kan B-cellene fungere som antigenpresenterende celler og interagere med T-celler. B-cellene kan uttrykke klasse II MHC-molekyler. De aktiverte B-cellene kan endocyttere proteinantigenene, videre vil disse brytes ned til peptider og fremvises for T-cellene via MHC II-molekylene (Abbas, et al., 2014). På grunn av dette samspillet mellom B-celler og T-celler under den humorale immunresponsen, er derfor sannsynlig å finne en samvariasjon mellom uttrykket av IgM og MHC II. Korrelasjonen i uttrykk av disse to genene ble studert hos den sterile og fertile atlantiske laksen. Det ble funnet positive, signifikante korrelasjoner i uttrykk mellom uttrykket av de to genene i både hud og milt, og dette viste at uttrykket av de to genene korrelerte. I hud lå 17 av punktene relativt samlet i starten av diagrammet, mens ett punkt fra hannfisk lå langt ute i forhold til resten, dette kan ses i Figur 12. Dette punktet kan være årsaken til at det ble funnet en signifikant positiv korrelasjon mellom uttrykket av sIgM og MHC II, men det ble ikke funnet signifikante korrelasjoner mellom kjønnene og resultatene er derfor usikre. I milt lå også mange av punktene relativt samlet, men her var det flere punkter fra steril hunnfisk som strakte seg lenger ut og det ble funnet signifikante korrelasjoner mellom genuttrykket av de to genene hos både hunnfisk og hannfisk. Interaksjonen mellom B-celler og T-celler forekommer hovedsakelig i lymfeorganene (Abbas et al., 2014) og det er derfor sannsynlig at det er en mer signifikant korrelasjon mellom uttrykket av MHC II og sIgM i milt enn hud fordi dette er et lymfeorgan hos fisk.

Både IgM og IgT finnes i høye konsentrasjoner i MALTs. Immunoglobulinene er spesialiserte til å beskytte det komplekse miljøet i de mukosale barrierene og det er funnet IgM og IgT i mukosale sekreter hos alle vertebrater (Salinas, 2015). Siden begge disse genene har en viktig funksjon i immunforsvaret i slimhinnene, er det mulig at uttrykket av IgM og IgT korrelerer. Det ble funnet en positiv, signifikant korrelasjon mellom uttrykk av sIgM og uttrykk av IgT i hud. I milt ble det ikke funnet en signifikant p-verdi og derfor regnes ikke den svakt positive korrelasjonen som ble funnet mellom de to immunoglobulinene å være av betydning. Siden immunoglobulinene er spesielt viktige for immunforsvaret i de mukosale flatene, kan dette være en av årsakene til at det ble funnet en korrelasjon mellom uttrykk av sIgM og uttrykk IgT i hud, men ikke i milt.

Tidligere studier gjort på ørret, der makrofager ble behandlet med IFN- γ , viste en betydelig økning i MHC I- og MHC II- molekyler på både transkripsjonsnivå og proteinnivå. Dette antyder at IFN- γ har en viktig rolle i forbedringen av antigenpresenteringen via MHC-molekylene (Zou & Secombes, 2011), det var derfor aktuelt å studere korrelasjonen mellom uttrykket av MHC I og IFN- γ og korrelasjonen mellom uttrykket av MHC II og IFN- γ . Det ble ikke funnet en signifikant korrelasjon mellom uttrykket av MHC I og IFN- γ i hud, dette indikerte at uttrykket av de to genene ikke varierte sammen i hud. I milt ble det derimot funnet en sterk positiv, signifikant korrelasjon mellom uttrykket av MHC I og IFN- γ , og uttrykket av de to genene varierte sammen i milt. Hunnfisk bidro signifikant til denne korrelasjonen. Korrelasjonen mellom uttrykket av MHC II og IFN- γ viste omtrent de samme trendene. I hud ble det ikke funnet noen korrelasjon mellom de to genene, mens i milt ble det funnet en positiv, signifikant korrelasjon mellom genuttrykkene, og steril hunnfisk bidro signifikant til denne korrelasjonen. Ut fra dette er det grunn til å tro at uttrykket av både MHC I og MHC II oppreguleres av IFN- γ i makrofager også hos laks. Milten er et lymfoid organ som inneholder store mengder av blant annet makrofager (Press & Evensen, 1999). Dette kan være en av årsakene til at det kun ble funnet mulige korrelasjoner mellom uttrykket av MHC-molekylene og IFN- γ i milt, men ikke i hud.

4.3 Global Metylering

Det ble sett på hvordan bortfallet av kjønnscellene påvirket uttrykket av metyltransferasegenene Dnmt1 og Dnmt3b, som er viktige under DNA-metyleringen. For å undersøke om sterilitet induverte endringer i DNA-metylering, ble de globale metyleringsnivåene (5-metylcytosin) undersøkt og deretter korrelert med transkripsjonsuttrykket til de studerte metyltransferasegenene.

4.3.1 Uttrykk av metyltransferaser

Det meste av den nåværende forståelsen knyttet til DNA-metylering hos fisk, kommer fra studier utført på zebrafisk. Allikevel er funksjonene til de ulike Dnmt-genene hos zebrafisk lite forstått. Knockdown av Dnmt1 har resultert i endringer i metyleringsmønstre og utvikling av abnormiteter (Metzger & Schulte, 2016). I genomet til regnbueørret og atlantisk laks har det blitt funnet to distinkte Dnmt1-loci. Dnmt3b ser ut til å ha gjennomgått en kompleks evolusjon som innebærer duplikasjon og differensiell lagring og tap av spesifikke Dnmt3b-paraloger. Dette gir diversitet til genfamilien hos fisk sammenlignet med pattedyr (Best et al., 2018). Både Dnmt1 og Dnmt3b ble funnet uttrykt hos den fertile og sterile laksen i forsøket.

Uttrykket til begge Dnmt-genene hos fertil kontrollfisk (både hunnfisk og hannfisk) var stabilt i alle vevene studert og ble opprettholdt på et relativt genuttrykk rundt 1. Genuttrykket av Dnmt-genene varierte opp og ned mellom sterile hunnfisk og sterile hannfisk og også mellom vevene. Det ble ikke funnet noen signifikante endringer i genuttrykk av Dnmt1 mellom den sterile og fertile fiskegruppen, noe som kan indikere at sterilitet ikke virker inn på hvordan metyleringsmønstrene videreføres under celledelingen. Resultatene fra interaksjonsanalysen viste imidlertid en signifikant sterilitetseffekt i gjeller, men ingen av de andre vevene. Dette kan skyldes et samtidig undertrykk av Dnmt1 hos sterile hunnfisk og hannfisk i gjeller. Ut fra dette er det ingen sterk indikasjon på at den sterile fisken har andre evner til metylering av genomet enn den fertile kontrollfisken, men dette krever videre undersøkelse.

Genet Dnmt3b er funksjonelt viktig for de novo metylering (Dasmahapatra & Khan, 2015). Det ble ikke funnet noen signifikante forskjeller i relativt genuttrykk av Dnmt3b mellom sterilitetsgruppene i hodenyre, milt, gjeller eller hud, noe som antyder at den kimcellefrie fisken har omtrent like evner til metylering av DNA som den fertile fisken i disse vevene. Det ble funnet en signifikant forskjell i uttrykk av Dnmt3b i tarm mellom fertil hann og steril hann, som kan indikere at en sterilisering har ført til et høyere uttrykk hos den sterile hannfisken. DNA-metylering blir generelt sett på som en undertrykkende epigenetisk markør som hemmer genuttrykket av andre gener (Liu et al., 2020). For uttrykket av Dnmt3b viste interaksjonsanalysen en signifikant, overordnet sterilitetseffekt i milt, men ikke i noen av de andre vevene som ble studert. Dette kan skyldes en samtidig undertrykking av uttrykket av Dnmt3b hos både sterile hunnfisk og sterile hannfisk i milt. For begge Dnmt-genene som ble studert, viste interaksjonsresultatene en sterilitetseffekt i ett vev, selv om det ikke ble funnet signifikante forskjeller i genuttrykk mellom de fertile og sterile fiskegruppene. Dette indikerer at det er mulig at det er en viss metyleringseffekt grunnet sterilitet, men ytterligere studier med større antall fiskeprøver, tidspunkter og tidligere livsstadier (som nevnt under) er nødvendig for å kunne konkludere.

På den annen side, siden både vedlikeholds-metyltransferasen og den de novo metyltransferasen som ble studert under dette forsøket så ut til å ha et relativt likt genuttrykk hos den kimcellefrie fisken og hos den fertile fisken, ser det ut til at den sterile fisken har samme ytelse når det kommer til DNA-metylering og dermed epigenetisk modifisering av genomet. Det er gjort forsøk på medaka (*Oryzias latipes*) der uttrykket av Dnmt-mRNA har blitt studert fra befruktning av egg og frem til klekking. Det ble funnet at uttrykket er regulert under utviklingen og det høyeste antallet kopier Dnmt1 mRNA ble funnet i embryo på tidlige

stadier, deretter avtok mRNAet gradvis under utviklingen (Dasmahapatra & Khan, 2015). Det finnes fremdeles lite forskning rundt uttrykk av Dnmt hos atlantisk laks, og spesielt hos fisk under sjøfasen. Både Dnmt1 og Dnmt3b hadde et lavt uttrykk hos den sterile (mellom 0,5-2,0 fold) og fertile laksen (ca. 1 fold). Ved prøveuttak var laksen fire år og hadde vært i sjøvann i over et år. Dersom laks følger den samme uttrykksprofilen som annen fisk, er det sannsynlig at genuttrykket av metyltransferasene var høyt tidlig i utviklingen og under embryogenesen og deretter avtok. Dette kan være en av årsakene til at det ikke ble funnet mange signifikante forskjeller i genuttrykk av disse genene. Det hadde derfor vært hensiktsmessig å undersøke den fertile og sterile fisken gjennom hele utviklingen fra befruktet egg til slaktefisk.

4.3.2 DNA-metylering

Det er store variasjoner i utbredelsen av mønstrene for DNA-metylering blant ulike taksonomiske grupper. CpG-områdene i vertebratenes genom er metylert til nivåer som kan overstige 80%. Det er også epigenetisk variasjon blant individer innenfor samme art i metyleringsmønstre. Disse individuelle nivåvariasjonene i DNA-metylering kan opprettholdes gjennom hele organismens levetid og kan videreføres gjennom generasjoner. Det er også mulig DNA-metyleringen påvirkes av miljøfaktorer (Metzger & Schulte, 2016). Fisken studert i dette forsøket ble holdt i to ulike kar under settefiskfasen, miljøet i disse karene skal ha vært relativt likt, allikevel kan dette ha gitt rom for små miljømessige variasjoner som muligens kan ha spilt en liten rolle i DNA-metyleringen mellom enkeltindividene. I tillegg ble fisken holdt under naturlige oppdrettsbetingelser i sjøfasen, og fisken var i kontakt med parasitter og patogener i vannmassene, dette kan ha gitt små variasjoner blant enkeltindivider dersom noen fisk ble infisert med for eksempel høyere nivåer av lakselus, mens andre individer lavere nivåer av lakselus. Metyleringsmønstrene kan også overføres mellom generasjoner, det er derfor mulig variasjoner innenfor fiskepartiet kommer av enten maternale eller paternale faktorer som har blitt nedarvet. Det ble observert enkelte små individuelle forskjeller i 5-mC% hos fiskene innenfor hver gruppene, men få av disse var uttalte. Det må også tas i betraktning at det lave prøvenummeret kan gi en skjevhet i de fremstilte resultatene og at noen metyleringsforskjeller fremdeles kan være uopdaget.

I dette forsøket ble det ikke funnet noen signifikante forskjeller i 5-mC% mellom noen av sterilitetsgruppene i milt. Siden det ikke var signifikante forskjeller i global metylering mellom kontrollgruppene og deres respektive sterile fiskegruppe, medførte trolig ikke bortfallet av kjønnsceller ulik grad av global metylering og dermed forskjeller i dannelsen av 5-

mC. Disse resultatene er i samsvar med resultatene funnet i et annet forsøk. Det har blitt utført noen få studier på marin eller diadrom fisk. Som nevnt tidligere blir triploidisering ofte benyttet innen akvakultur for å endre fiskens sterilitet. Det har blitt gjort forsøk på brunørret (*Salmo trutta*) der global metylering i hjerne, gjeller, hjerte, lever, nyrer og muskelvev ble målt hos diploid og triploid brunørret. Det ble ikke funnet signifikante forskjeller mellom den diploide og triploide fisken i noen av vevene på helgenomnivå. Ut fra dette forsøket så det ut som at sterilisering via triploidisering ikke medførte til metyleringsforskjeller i genomet. Lokale endringer i metylering ble heller ikke detektert ved enkeltlokusanalyse (Covelo-Soto et al., 2015). Siden det ikke ble funnet forskjeller mellom den kimcellefrie sterile fisken og den fertile fisken, og heller ikke mellom den triploide fisken som har kjønnsceller og den diploide fisken, kan dette indikere at kjønnscellene ikke påvirker global metylering, men dette må undersøkes nærmere. Det ble imidlertid funnet signifikante forskjeller mellom steril hunn og kontroll hann og steril hunn og steril hann. Dette kan indikere at steriliseringen har ført til kjønnsforskjeller når det kommer til global metylering i milt. Den overordnede kjønns-effekten ble også bekreftet ved interaksjonsanalysen da det ble funnet en signifikant interaksjon mellom kjønn i milt.

I hud ble det funnet en overordnet signifikant sterilitets- og kjønns-effekt ved interaksjonsanalysen. Den signifikante effekten skyldtes signifikante forskjeller i genuttrykk mellom kontroll hunn og steril hunn. Den sterile hunnfisken hadde svært lav 5-mC% og viste signifikante forskjeller med alle gruppene. Siden det ble funnet signifikante forskjeller i 5-mC% mellom kontroll hunn og steril hunn, gir dette grunnlag for å tro at bortfallet av kjønnsceller kan ha hatt en innvirkning på graden av global metylering og dannelsen av 5-mC hos hunnfisk i hud. Som allerede nevnt er DNA-metylering hovedsakelig en undertrykkende epigenetisk markør som hemmer genuttrykket av andre gener (Liu et al., 2020). Siden den sterile hunnfisken hadde signifikant lavere nivåer av global metylering, er det mulig at den sterile hunnfisken derfor vil ha en oppregulering av andre viktige gener sammenlignet med fertil hunnfisk. Dette ble ikke funnet for noen av gene i hud hos den atlantiske laksen, men dette kan være tilfellet for andre gener som ikke har blitt studert her. I dette forsøket ble det dessuten sett på globale metyleringsnivåer, og ikke metyleringen av spesifikke gener. Det er derfor vanskelig å vite hvor mye informasjon som kan innhentes ved å studere global DNA-metylering i forhold til genuttrykk. Under gametogenesis blir kimcellene produsert. Den sterile fisken hadde gjennomgått en knockdown av Dnd som medførte til et tap av kimcellene. Det er vist at kimcellefrie fisk har redusert produksjon av kjønnssteroider (Kleppe et al., 2017).

Siden det er kjent at kjønnssteroidene er med på å modulere immunsystemet på ulike måter, kan det spekuleres i om bortfallet av kimcellene og den reduserte produksjonen av kjønnssteroider er med på å endre metyleringen av DNA, og dermed uttrykket av viktige gener. Det kan undres om dette er årsaken til at det ble funnet signifikante forskjeller mellom steril hunn og kontroll hunn og at mangelen på kjønnsceller har ført til at det ble funnet lavere 5-mC% hos den sterile hunnfisken, men dette er en mekanisme som må undersøkes videre med et større antall fisk. Hannfisken viste de samme trendene som hunnfisken i hud, men ikke signifikante forskjeller, og dette er i samsvar med forsøket utført på triploid fisk der det ikke ble funnet signifikante forskjeller i metylering mellom triploid og diploid fisk. Siden prøveantallet var lavt i dette forsøket, er det vanskelig å dra en sikker konklusjon.

I dette forsøket ble det ikke funnet noen signifikante korrelasjoner mellom 5-mC% og uttrykket av Dnmt1 eller Dnmt3b i verken hud eller milt. Imidlertid var korrelasjonen mellom 5-mC% og uttrykk av Dnmt1 på grensen til signifikant. Årsaken til dette kan være stor individuell variasjon av Dnmt1 i den sterile fiskegruppen i hud. Dette gjør det vanskelig å konkludere med at en oppregulering eller nedregulering av Dnmt1 eller Dnmt3b påvirker metyleringen og dermed 5-mC%. Et tidligere studie har prøvd å finne ut om Dnmt-genfamilien påvirker 5-mC ratio på genom-nivå. 5-mC ratio fra tre ulike marine arter ble analysert etter en kloning av Dnmt-genene. 5-mC ratio ble analysert i fisken *Kryptolebias marmoratus*, kopepoden *Trigriopus japonicus* og en type rotifer (*Branchionus koreanus*). Det ble funnet at fraværet eller tilstedeværelsen av Dnmt-genfamilien og deres komposisjon i de tre marine dyrene var sterkt assosiert med deres nivåer av 5-mC i genomet. Ut fra dette så det ut til å være en korrelasjon mellom antallet og komposisjonen av Dnmt1/Dnmt3 og nivåene av 5-mC i genomet (Kim et al., 2016). Disse resultatene er ikke i tråd med resultatene funnet i dette forsøket, da det verken ble funnet en korrelasjon mellom Dnmt1/Dnmt3b og 5-mC% i verken hud eller milt.

5 Konklusjon

Hovedmålet med dette forsøket var å undersøke genuttrykket av flere immungener hos steril kimcelfri atlantisk laks sammenlignet med fertil kontrollfisk. Det ble ikke funnet store forskjeller i relativt genuttrykk av immungenene mellom den kimcelfrie sterile fisken og den fertile kontrollfisken for de fleste av immungenene studert. Det så derfor ikke ut til at sterilisering via et tap av kjønnsceller hadde en stor effekt på genuttrykk, og det kan antas at den sterile fiskens immunforsvar har samme ytelse som den fertile fisken i de fleste vev og for de fleste immungenene. Det ble funnet signifikante forskjeller i genuttrykk mellom sterile kimcelfrie hannfisker og fertile hannfisker i uttrykk av IL-22 i hodenyre, av IL-10 i gjeller og Dnmt3b i tarm. Det ble også funnet en signifikant forskjell i genuttrykk mellom fertil hunnfisk og steril kimcelfri hunnfisk i genuttrykket av IgD i tarm. Dette kan indikere at bortfallet av kjønnsceller har hatt en innvirkning på uttrykket av disse genene i vevene der de signifikante forskjellene ble funnet. Siden det kun ble funnet signifikante forskjeller for enkelte gener i enkelte organer, men ingen systematiske endringer, og mange kombinasjoner ble testet opp mot hverandre med signifikansnivå på 0,05, er det mulig at noen av forskjellene som ble funnet var rent tilfeldige. Selv om det ikke ble funnet mange forskjeller i relativt genuttrykk mellom de fertile og sterile fiskegruppene, ble det observert en gjentakende trend i resultatene, og det ble observert signifikante forskjeller i genuttrykk mellom steril hunnfisk og steril hannfisk for mange av immungenene. Steriliseringen kan derfor ha ført til kjønnsforskjeller i genuttrykk.

Eventuelle korrelasjoner ble undersøkt mellom immungener som kunne ha en biologisk sammenheng med hverandre. Det ble funnet enkelte korrelasjoner mellom immungenene, som viste at uttrykket av ett immungen kan påvirke uttrykket av et annet. Dersom genuttrykket av et immungen oppreguleres kan dette føre til enten en oppregulering eller nedregulering av et annet immungen, og motsatt. Dersom sterilitet har en virkning i uttrykket av ett gen, kan dette potensielt endre uttrykket av et annet gen.

Et annet formål ved dette forsøket var å undersøkes effekten sterilitet hadde på graden av DNA-metylering og dannelsen av 5-mC. Det ble funnet signifikante forskjeller 5-mC% mellom steril hunn og fertil hunn i hud, noe som kan indikere at steriliseringen har virket inn på graden av metylering, mekanismen bak dette er fremdeles ukjent og må undersøkes. En eventuell metylering av DNA kan medføre til oppregulering eller nedregulering av viktige immungener og dermed påvirke fiskens evne til å bekjempe patogener. Til tross for at det ble

oppdaget en signifikant forskjell i global DNA-metylering i hud, ble det ikke funnet signifikante endringer i genuttrykket til noen av de studerte genene mellom hunnfiskene i hud.

Dette forsøket er kun et innledende studie for hvordan immunsystemet til den kimcelfrie fisken responderer i sjøfasen, og det kreves videre studier for å kunne konkludere med hvordan ytelsen til den kimcelfrie fisken er sammenlignet med den fertile kontrollfisken. Forsøket ble utført på fisk under naturlige oppdrettsbetingelser for å sikre at resultatene var mest mulig lik en oppdrettssituasjon. Til tross for det lave prøvenummeret, gir dette forsøket et enkelt bilde av hvordan ytelsen til den kimcelfrie fisken er sammenlignet med den fertile kontrollfisken. Siden det ikke ble oppdaget store forskjeller i relativt genuttrykk mellom sterilitetsgruppene, ser det ut til at en sterilisering via knockdown av Dnd er lovende for videre produksjon av steril fisk. Dette er viktig for en bærekraftig utvikling for oppdrettsnæringen.

Referanseliste

- Abbas, K.A., Lichtman, H.A., & Pillai, S. (2014). *Basic Immunology: Functions and Disorders of the immune system 4th ed.*, Elsevier Saunders.
- Bautista, N. M., Crespel, A., Crossley, J., Padilla, P., & Burggren, W. (2020). Parental transgenerational epigenetic inheritance related to dietary crude oil exposure in Danio rerio. *J Exp Biol*, 223(Pt 16). <https://doi.org/10.1242/jeb.222224>
- Best, C., Ikert, H., Kostyniuk, D. J., Craig, P. M., Navarro-Martin, L., Marandel, L., & Mennigen, J. A. (2018). Epigenetics in teleost fish: From molecular mechanisms to physiological phenotypes. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 224, 210-244. <https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2018.01.006>
- Bilal, S., Lie, K. K., Saele, O., & Hordvik, I. (2018). T Cell Receptor Alpha Chain Genes in the Teleost Ballan Wrasse (*Labrus bergylta*) Are Subjected to Somatic Hypermutation. *Front Immunol*, 9, 1101. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01101>
- Ching, B., Jamieson, S., Heath, J. W., Heath, D. D., & Hubberstey, A. (2010). Transcriptional differences between triploid and diploid Chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) during live *Vibrio anguillarum* challenge. *Heredity*, 104(2), 224-234. <https://doi.org/10.1038/hdy.2009.108>
- Cotter, D., O'Donovan, V., O'Maoláidigh, N., Rogan, G., Roche, N., & Wilkins, N. P. (2000). An evaluation of the use of triploid Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) in minimising the impact of escaped farmed salmon on wild populations. *Aquaculture*, 186(1), 61-75. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(99\)00367-1](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(99)00367-1)
- Covelo-Soto, L., Leunda, P. M., Perez-Figueroa, A., & Moran, P. (2015). Genome-wide methylation study of diploid and triploid brown trout (*Salmo trutta* L.). *Anim Genet*, 46(3), 280-288. <https://doi.org/10.1111/age.12287>
- Dalmo, R. A., Ingebrigtsen, K., & Bøgwald, J. (1997). Non-specific defence mechanisms in fish, with particular reference to the reticuloendothelial system (RES). *Journal of Fish Diseases*, 20(4), 241-273. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2761.1997.00302.x>
- Dasmahapatra, A. K., & Khan, I. A. (2015). DNA methyltransferase expressions in Japanese rice fish (*Oryzias latipes*) embryogenesis is developmentally regulated and modulated by ethanol and 5-azacytidine. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*, 176-177, 1-9. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2015.07.002>
- Edholm, E.-S., Fenton, C. G., Mondot, S., Paulssen, R. H., Lefranc, M.-P., Boudinot, P., & Magadan, S. (2021). Profiling the T Cell Receptor Alpha/Delta Locus in Salmonids [Original Research]. *Frontiers in Immunology*, 12. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.753960>
- Epigentek. (2019). MethylFlash Global DNA Methylation (5-mC) ELISA Easy Kit (Colorimetric). Hentet fra <https://www.epigentek.com/catalog/methylflash-global-dna-methylation-mc-elisa-easy-kit-colorimetric-p-5370.html>
- Esteban, M. A., Chaves-Pozo, E., Arizcun, M., Meseguer, J., & Cuesta, A. (2013). Regulation of natural killer enhancing factor (NKEF) genes in teleost fish, gilthead seabream and European sea bass. *Mol Immunol*, 55(3-4), 275-282. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2013.02.009>
- Feng, C., Wang, H., Lu, N., Chen, T., He, H., Lu, Y., & Tu, X. M. (2014). Log-transformation and its implications for data analysis. *Shanghai archives of psychiatry*, 26(2), 105-109. <https://doi.org/10.3969/j.issn.1002-0829.2014.02.009>

- Føre, H. M., & Thorvaldsen, T. (2021). Causal analysis of escape of Atlantic salmon and rainbow trout from Norwegian fish farms during 2010–2018. *Aquaculture*, 532, 736002. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.736002>
- Gao, D., Li, Z., Murphy, T., & Sauerbier, W. (1997). Structure and transcription of the gene for translation elongation factor 1 subunit alpha of zebrafish (*Danio rerio*). *Biochim Biophys Acta*, 1350(1), 1-5. [https://doi.org/10.1016/s0167-4781\(96\)00179-0](https://doi.org/10.1016/s0167-4781(96)00179-0)
- Golpour, A., Siddique, M. A. M., Siqueira-Silva, D. H., & Pšenička, M. (2016). Induced sterility in fish and its potential and challenges for aquaculture and germ cell transplantation technology: a review. *Biologia*, 71(8), 853-864. <https://doi.org/10.1515/biolog-2016-0118>
- Gonzalez, S. F., Huisling, M. O., Stakauskas, R., Forlenza, M., Lidy Verburg-van Kemenade, B. M., Buchmann, K., Nielsen, M. E., & Wiegertjes, G. F. (2007). Real-time gene expression analysis in carp (*Cyprinus carpio* L.) skin: Inflammatory responses to injury mimicking infection with ectoparasites. *Developmental & Comparative Immunology*, 31(3), 244-254. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2006.06.010>
- Gross-Thebing, T., Yigit, S., Pfeiffer, J., Reichman-Fried, M., Bandemer, J., Ruckert, C., Rathmer, C., Goudarzi, M., Stehling, M., Tarbashevich, K., Seggewiss, J., & Raz, E. (2017). The Vertebrate Protein Dead End Maintains Primordial Germ Cell Fate by Inhibiting Somatic Differentiation. *Dev Cell*, 43(6), 704-715 e705. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2017.11.019>
- Havforskningsinstituttet (2016). *Solving bottlenecks in triploid salmon production – a way to strengthen the sustainability of the salmon aquaculture industry* (HI-rapport 25-2015). https://www.hi.no/hi/nettrapporter/rapport-fra-havforskningen/2015/hi-rapp_25-2015_bottlenecks_triploid_salmonprod
- Hu, Y., Carpio, Y., Scott, C., Alnabulsi, A., Alnabulsi, A., Wang, T., Liu, F., Monte, M., Wang, T., & Secombes, C. J. (2019). Induction of IL-22 protein and IL-22-producing cells in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Developmental & Comparative Immunology*, 101, 103449. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2019.103449>
- Julin, K., Johansen, L. H., & Sommer, A. I. (2009). Reference genes evaluated for use in infectious pancreatic necrosis virus real-time RT-qPCR assay applied during different stages of an infection. *J Virol Methods*, 162(1-2), 30-39. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2009.07.003>
- Karlsen, C., Ytteborg, E., Timmerhaus, G., Host, V., Handeland, S., Jorgensen, S. M., & Krasnov, A. (2018). Atlantic salmon skin barrier functions gradually enhance after seawater transfer. *Sci Rep*, 8(1), 9510. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-27818-y>
- Kim, B.-M., Mirbahai, L., Mally, A., Kevin Chipman, J., Rhee, J.-S., & Lee, J.-S. (2016). Correlation between the DNA methyltransferase (Dnmt) gene family and genome-wide 5-methylcytosine (5mC) in rotifer, copepod, and fish. *Genes & Genomics*, 38(1), 13-23. <https://doi.org/10.1007/s13258-015-0333-y>
- Kleppe, L., Andersson, E., Skaftnesmo, K. O., Edvardsen, R. B., Fjellidal, P. G., Norberg, B., Bogerd, J., Schulz, R. W., & Wargelius, A. (2017). Sex steroid production associated with puberty is absent in germ cell-free salmon. *Sci Rep*, 7(1), 12584. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-12936-w>
- Krasnov, A., Afanasyev, S., Nylund, S., & Rebl, A. (2020). Multigene Expression Assay for Assessment of the Immune Status of Atlantic Salmon. *Genes (Basel)*, 11(11). <https://doi.org/10.3390/genes11111236>
- Kumari, J., Bøggwald, J., & Dalmo, R. A. (2013) Vaccination of Atlantic salmon, *Salmo salar* L., with *Aeromonas salmonicida* and infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) showed a mixed Th1/Th2/Treg response. *Journal of fish diseases*, 36(10). Doi:10.1111/jfd.12100

- Kumari, J., Zhang, Z., Swain, T., Chi, H., Niu, C., Bøggwald, J., & Dalmo, R. A. (2015). Transcription Factor T-Bet in Atlantic Salmon: Characterization and Gene Expression in Mucosal Tissues during *Aeromonas Salmonicida* Infection [Original Research]. *Frontiers in Immunology*, 6. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00345>
- Lai, Y. H., Audira, G., Liang, S. T., Siregar, P., Suryanto, M. E., Lin, H. C., Villalobos, O., Villaflores, O. B., Hao, E., Lim, K. H., & Hsiao, C. D. (2020). Duplicated dnmt3aa and dnmt3ab DNA Methyltransferase Genes Play Essential and Non-Overlapped Functions on Modulating Behavioral Control in Zebrafish. *Genes (Basel)*, 11(11). <https://doi.org/10.3390/genes11111322>
- Lethimonier, C., Madigou, T., Muñoz-Cueto, J.-A., Lareyre, J.-J., & Kah, O. (2004). Evolutionary aspects of GnRHs, GnRH neuronal systems and GnRH receptors in teleost fish. *General and Comparative Endocrinology*, 135(1), 1-16. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2003.10.007>
- Li, S., & Tollefsbol, T. O. (2021). DNA methylation methods: Global DNA methylation and methylomic analyses. *Methods*, 187, 28-43. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2020.10.002>
- Liu, J., Hu, H., Panserat, S., & Marandel, L. (2020). Evolutionary history of DNA methylation related genes in chordates: new insights from multiple whole genome duplications. *Scientific Reports*, 10, 970. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-57753-w>
- Løvås, G.G. (2018). *Statistikk for universiteter og høyskoler* (4. utg.). Universitetsforlaget.
- Madaro, A., Kjøglum, S., Hansen, T., Fjellidal, P. G., & Stien, L. H. (2021). A comparison of triploid and diploid Atlantic salmon (*Salmo salar*) performance and welfare under commercial farming conditions in Norway. *Journal of Applied Aquaculture*, 1-15. <https://doi.org/10.1080/10454438.2021.1916671>
- Makeesh, 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. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.fsi.2015.02.003>
- Metzger, D. C. H., & Schulte, P. M. (2016). Epigenomics in marine fishes. *Marine Genomics*, 30, 43-54. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.margen.2016.01.004>
- Motulsky, H. J., & Brown, R. E. (2006). Detecting outliers when fitting data with nonlinear regression - a new method based on robust nonlinear regression and the false discovery rate. *BMC Bioinformatics*, 7, 123. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-7-123>
- Motulsky, H.J. (2022a). Tukey and Dunnett methods. *GraphPad Statistics guide*. Hentet fra https://www.graphpad.com/guides/prism/latest/statistics/stat_the_methods_of_tukey_and_dunne.htm
- Motulsky, H.J. (2022b). Interpreting results: Kruskal-Wallis test. *GraphPad Statistics Guide*. Hentet fra https://www.graphpad.com/guides/prism/latest/statistics/how_the_kruskal-wallis_test_works.htm
- O'Flynn, F. M., McGeachy, S. A., Friars, G. W., Benfey, T. J., & Bailey, J. K. (1997). Comparisons of cultured triploid and diploid Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *ICES Journal of Marine Science*, 54(6), 1160-1165. [https://doi.org/10.1016/s1054-3139\(97\)80022-7](https://doi.org/10.1016/s1054-3139(97)80022-7)
- Olsvik, P. A., Lie, K. K., Jordal, A. E., Nilsen, T. O., & Hordvik, I. (2005). Evaluation of potential reference genes in real-time RT-PCR studies of Atlantic salmon. *BMC Mol Biol*, 6, 21. <https://doi.org/10.1186/1471-2199-6-21>
- Pauli, A., Montague, T. G., Lennox, K. A., Behlke, M. A., & Schier, A. F. (2015). Antisense Oligonucleotide-Mediated Transcript Knockdown in Zebrafish. *PLoS One*, 10(10), e0139504. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0139504>

- Perusina Lanfranca, M., Lin, Y., Fang, J., Zou, W., & Frankel, T. (2016). Biological and pathological activities of interleukin-22. *Journal of molecular medicine (Berlin, Germany)*, 94(5), 523-534. <https://doi.org/10.1007/s00109-016-1391-6>
- Pfaffl, M. W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res*, 29(9), e45. <https://doi.org/10.1093/nar/29.9.e45>
- Press, C. M., & Evensen, Ø. (1999). The morphology of the immune system in teleost fishes. *Fish & Shellfish Immunology*, 9(4), 309-318. <https://doi.org/https://doi.org/10.1006/fsim.1998.0181>
- Quiagen. (2009). Quantitect Reverse Transcription Handbook. Hentet fra <https://www.qiagen.com/us/resources/resourcedetail?id=f0de5533-3dd1-4835-8820-1f5c088dd800&lang=en>
- Quiagen. (2019). RNeasy Mini Handbook. Hentet fra <https://www.qiagen.com/us/resources/resourcedetail?id=14e7cf6e-521a-4cf7-8cbc-bf9f6fa33e24&lang=en>
- Rauta, P. R., Nayak, B., & Das, S. (2012). Immune system and immune responses in fish and their role in comparative immunity study: a model for higher organisms. *Immunol Lett*, 148(1), 23-33. <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2012.08.003>
- Regjeringen (2021). Norsk Havbruksnæring. Hentet fra <https://www.regjeringen.no/no/tema/mat-fiske-og-landbruk/fiskeri-og-havbruk/Norsk-havbruksnaring/id754210/>
- Riseth, E. N., Fraser, T. W. K., Sambraus, F., Stien, L. H., & Hvas, M. (2020). Is it advantageous for Atlantic salmon to be triploid at lower temperatures? *J Therm Biol*, 89, 102548. <https://doi.org/10.1016/j.jtherbio.2020.102548>
- Salinas, I. (2015). The Mucosal Immune System of Teleost Fish. *Biology (Basel)*, 4(3), 525-539. <https://doi.org/10.3390/biology4030525>
- Salinas, I., Fernández-Montero, Á., Ding, Y., & Sunyer, J. O. (2021). Mucosal immunoglobulins of teleost fish: A decade of advances. *Dev Comp Immunol*, 121, 104079. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2021.104079>
- Secombes, C. J., Wang, T., & Bird, S. (2011). The interleukins of fish. *Dev Comp Immunol*, 35(12), 1336-1345. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2011.05.001>
- Seppola, M., Larsen, A. N., Steiro, K., Robertsen, B., & Jensen, I. (2008). Characterisation and expression analysis of the interleukin genes, IL-1 β , IL-8 and IL-10, in Atlantic cod (*Gadus morhua* L.). *Molecular Immunology*, 45(4), 887-897. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.molimm.2007.08.003>
- Skugor, A., Tveiten, H., Krasnov, A., & Andersen, O. (2014). Knockdown of the germ cell factor Dead end induces multiple transcriptional changes in Atlantic cod (*Gadus morhua*) hatchlings. *Anim Reprod Sci*, 144(3-4), 129-137. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2013.12.010>
- Slanchev, K., Stebler, J., de la Cueva-Mendez, G., & Raz, E. (2005). Development without germ cells: the role of the germ line in zebrafish sex differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102(11), 4074-4079. <https://doi.org/10.1073/pnas.0407475102>
- Tadiso, T. M., Krasnov, A., Skugor, S., Afanasyev, S., Hordvik, I., & Nilsen, F. (2011). Gene expression analyses of immune responses in Atlantic salmon during early stages of infection by salmon louse (*Lepeophtheirus salmonis*) revealed bi-phasic responses coinciding with the copepod-chalimus transition. *BMC Genomics*, 12(1), 141. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-12-141>
- Tanriverdi, F., Silveira, L. F., MacColl, G. S., & Bouloux, P. M. (2003). The hypothalamic-pituitary-gonadal axis: immune function and autoimmunity. *J Endocrinol*, 176(3), 293-304. <https://doi.org/10.1677/joe.0.1760293>

- Taranger, G. L., Carrillo, M., Schulz, R. W., Fontaine, P., Zanuy, S., Felip, A., Weltzien, F. A., Dufour, S., Karlsen, O., Norberg, B., Andersson, E., & Hansen, T. (2010). Control of puberty in farmed fish. *Gen Comp Endocrinol*, 165(3), 483-515. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2009.05.004>
- Taranger, G. L., Karlsen, Ø., Bannister, R. J., Glover, K. A., Husa, V., Karlsbakk, E., Kvamme, B. O., Boxaspen, K. K., Bjørn, P. A., Finstad, B., Madhun, A. S., Morton, H. C., & Svåsand, T. (2014). Risk assessment of the environmental impact of Norwegian Atlantic salmon farming. *ICES Journal of Marine Science*, 72(3), 997-1021. <https://doi.org/10.1093/icesjms/fsu132>
- 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 Regen*, 18(5), 460-466. <https://doi.org/10.1111/j.1524-475X.2010.00611.x>
- Tveiten, H., Skugor, A., Andersen, Ø., Slanchev, K., Mommens, M., & Santi, N. (2015). *Steril laks – kartlegging av faktorer sentrale i dannelsen av kjønnsceller hos Atlantisk laks* (Rapport K-36/2015). Nofima <https://www.fhf.no/prosjekter/prosjektbasen/900791/>
- Uribe, C., Folch, H., Enríquez, R., & Moran, G. (2011). Innate and adaptive immunity in teleost fish: A review. *Veterinarni Medicina*, 56, 486-503. <https://doi.org/10.17221/3294-VETMED>
- Wang, T., Diaz-Rosales, P., Costa, M. M., Campbell, S., Snow, M., Collet, B., Martin, S. A. M., & Secombes, C. J. (2011). Functional Characterization of a Nonmammalian IL-21: Rainbow Trout *Oncorhynchus mykiss* IL-21 Upregulates the Expression of the Th Cell Signature Cytokines IFN- γ , IL-10, and IL-22. *The Journal of Immunology*, 186(2), 708-721. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1001203>
- Wang, T., & Secombes, C. J. (2013). The cytokine networks of adaptive immunity in fish. *Fish Shellfish Immunol*, 35(6), 1703-1718. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2013.08.030>
- Wargelius, A., Leininger, S., Skaftnesmo, K. O., Kleppe, L., Andersson, E., Taranger, G. L., Schulz, R. W., & Edvardsen, R. B. (2016). Dnd knockout ablates germ cells and demonstrates germ cell independent sex differentiation in Atlantic salmon. *Sci Rep*, 6, 21284. <https://doi.org/10.1038/srep21284>
- Weidinger, G., Stebler, J., Slanchev, K., Dumstrei, K., Wise, C., Lovell-Badge, R., Thisse, C., Thisse, B., & Raz, E. (2003). dead end, a novel vertebrate germ plasm component, is required for zebrafish primordial germ cell migration and survival. *Curr Biol*, 13(16), 1429-1434. [https://doi.org/10.1016/s0960-9822\(03\)00537-2](https://doi.org/10.1016/s0960-9822(03)00537-2)
- Yamaguchi, T., & Dijkstra, J. M. (2019). Major Histocompatibility Complex (MHC) Genes and Disease Resistance in Fish. *Cells*, 8(4). <https://doi.org/10.3390/cells8040378>
- Yaron, Z. & Levavi-Sivan, B. (2011). Endocrine regulation of fish reproduction. *Encyclopedia of fish physiology: from genome to environment*, 2, 1500-1508.
- Yu, Y., Wang, Q., Huang, Z., Ding, L., & Xu, Z. (2020). Immunoglobulins, Mucosal Immunity and Vaccination in Teleost Fish [Review]. *Frontiers in Immunology*, 11. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.567941>
- Zhang, Y.-B., & Gui, J.-F. (2012). Molecular regulation of interferon antiviral response in fish. *Developmental & Comparative Immunology*, 38(2), 193-202. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.dci.2012.06.003>
- Zou, J., Carrington, A., Collet, B., Dijkstra, J. M., Yoshiura, Y., Bols, N., & Secombes, C. (2005). Identification and Bioactivities of IFN- γ in Rainbow Trout *Oncorhynchus mykiss*: The First Th1-Type Cytokine Characterized Functionally in Fish. *The Journal of Immunology*, 175(4), 2484-2494. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.175.4.2484>

- Zou, J., & Secombes, C. J. (2011). Teleost fish interferons and their role in immunity. *Dev Comp Immunol*, 35(12), 1376-1387. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2011.07.001>
- Zou, J., & Secombes, C. J. (2016). The Function of Fish Cytokines. *Biology (Basel)*, 5(2). <https://doi.org/10.3390/biology5020023>

Appendix I

Gruppe	fertil/steril	kjønn	Vev	Vev	Vev	Vev	Vev
Kontroll	f	f	Hodenyre	Milt	Tarm	Gjeller	Hud
Kontroll	f	f	Hodenyre	Milt	Tarm	Gjeller	Hud
Kontroll	f	f	Hodenyre	Milt	Tarm	Gjeller	Hud
Kontroll	f	m	Hodenyre	Milt	Tarm	Gjeller	Hud
Kontroll	f	m	Hodenyre	Milt	Tarm	Gjeller	Hud
Kontroll	f	m	Hodenyre	Milt	Tarm	Gjeller	Hud
Steril	s	f	Hodenyre	Milt	Tarm	Gjeller	Hud
Steril	s	f	Hodenyre	Milt	Tarm	Gjeller	Hud
Steril	s	f	Hodenyre	Milt	Tarm	Gjeller	Hud
Steril	s	f	Hodenyre	Milt	Tarm	Gjeller	Hud
Steril	s	f	Hodenyre	Milt	Tarm	Gjeller	Hud
Steril	s	f	Hodenyre	Milt	Tarm	Gjeller	Hud
Steril	s	m	Hodenyre	Milt	Tarm	Gjeller	Hud
Steril	s	m	Hodenyre	Milt	Tarm	Gjeller	Hud
Steril	s	m	Hodenyre	Milt	Tarm	Gjeller	Hud
Steril	s	m	Hodenyre	Milt	Tarm	Gjeller	Hud
Steril	s	m	Hodenyre	Milt	Tarm	Gjeller	Hud
Steril	s	m	Hodenyre	Milt	Tarm	Gjeller	Hud

Oversikt over antall fisk, fiskegrupper og hvilke vev prøver ble hentet fra.

Gruppe	kjønn	fertil/steril	Vekt avslutt (g) 8.10.20	Lengde avslutt (g) 8.10.20	Prøvenr. 8.10.20	Løpenr	Lengde (cm) 14.05.20	Vekt (g) 14.05.20
Kontrol	f	f	3090,0	60,0	1	1	47	1334
Kontrol	f	f	3850,0	64,0	31	2	49	1590
Kontrol	f	f	4780,0	71,0	39	3	53	1653
Kontrol	m	f	3850,0	65,0	32	4	48	1436
Kontrol	m	f	5045,0	67,0	36	5	53	1955
Kontrol	m	f	3915,0	64,0	37	6	44	1013
Sterile	f	s	2720,0	61,0	4	7	46	1342
Sterile	f	s	3495,0	63,0	5	8	46	1217
Sterile	f	s	4065,0	64,0	7	9	49	1512
Sterile	f	s	2625,0	57,0	8	10	41	978
Sterile	f	s	3365,0	61,0	11	11	45	1259
Sterile	f	s	3820,0	63,0	17	12	45	1309
Sterile	m	s	3895,0	63,0	12	13	49	1464
Sterile	m	s	3550,0	64,0	13	14	49	1457
Sterile	m	s	2555,0	55,0	19	15	43	1116
Sterile	m	s	3380,0	61,0	20	16	45	1320
Sterile	m	s	2340,0	56,0	21	17	42	972
Sterile	m	s	2455,0	56,0	23	18	42,2	870

Oversikt over fiskens lengde og vekt ved overføring til sjøvann (14.05.20) og ved prøveuttak (08.10.20) inkludert prøvenummer og løpenummer.

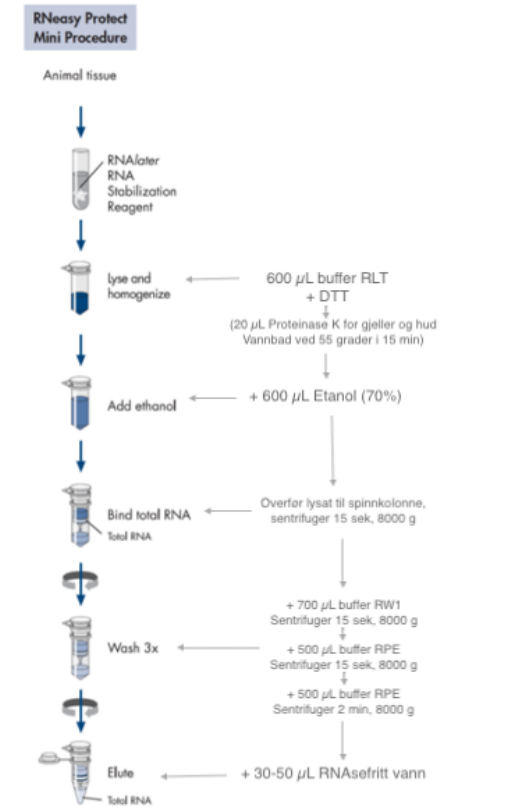
Appendix II

Prøve-Nr 08.10.20			Vasa		Dnd	
			Ct-mean	Uttrykt	Ct-mean	Uttrykt
1	Fertil	F	21,2	Ja	22,0	Ja
39	Fertil	F	21,7	Ja	21,9	Ja
4	Steril	F	29,6	Nei	33,0	Nei
5	Steril	F	30,3	Nei	31,9	Nei
7	Steril	F	30,8	Nei	36,1	Nei
8	Steril	F	31,6	Nei	34,5	Nei
17	Steril	F	31,7	Nei	35,6	Nei
36	Fertil	M	22,4	Ja	24,9	Ja
37	Fertil	M	22,0	Ja	24,6	Ja
12	Steril	M	30,5	Nei	37,0	Nei
13	Steril	M	32,0	Nei	38,0	Nei
19	Steril	M	31,4	Nei	36,9	Nei
20	Steril	M	27,7	Nei	28,4	Nei
21	Steril	M	31,3	Nei	34,3	Nei
23	Steril	M	33,1	Nei	36,6	Nei
Pos ktr.			24,6		25,9	

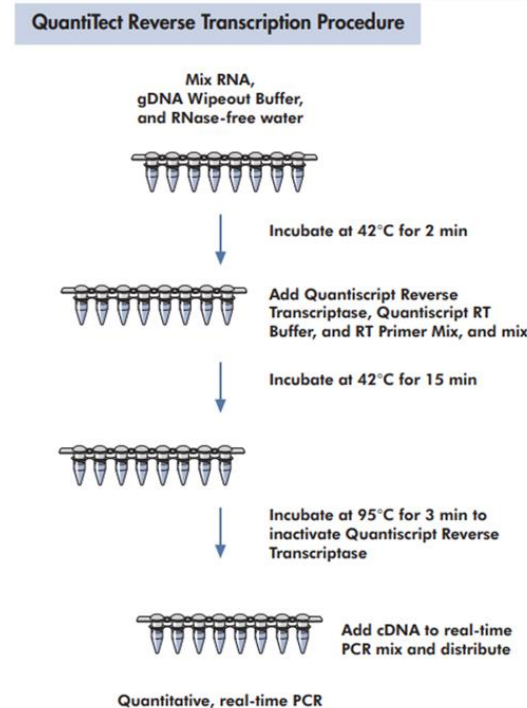
Data innhentet fra Nofima som viser uttrykket av Dnd og vasa i fiskens gonader.

Prøvenummer 31 og 32 (løpenummer 2 og 4) tilhørende den fertile fiskegruppen er ikke vist i tabellen, men uttrykket av Dnd og vasa har blitt bekreftet. Fisk 11 tilhørende den fertile hunnfisken viste ingen uttrykk.

Appendix III

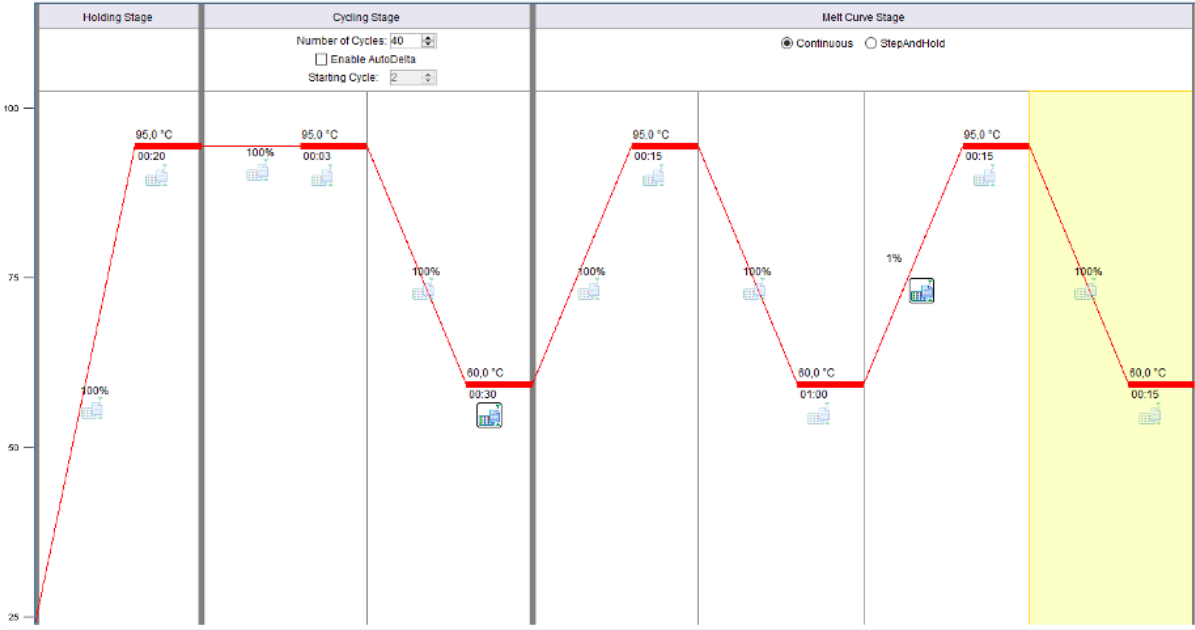


Hurtigprotokoll for RNA-isolering vha. RNeasy mini kit (Qiagen, Hilden, Tyskland).



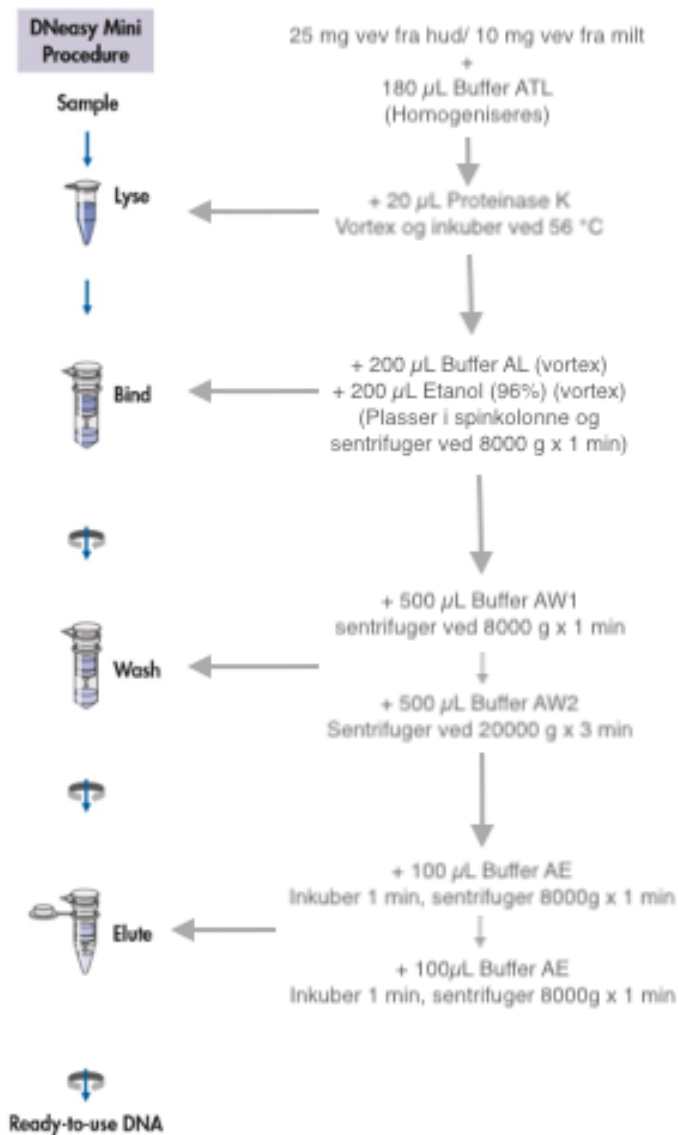
cDNA-syntese vha. QuantiTect Reverse Transcription Kit (Qiagen, Hilden, Tyskland).

Appendix IV



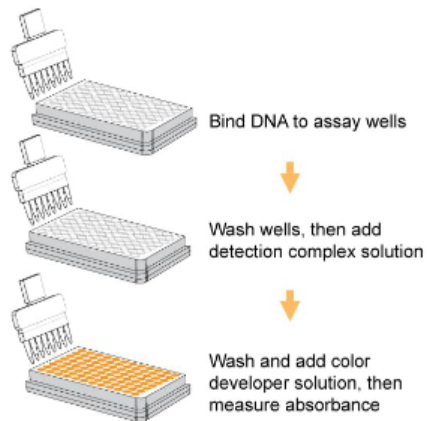
Program for SYBR® Green reagent for qPCR.

Appendix V

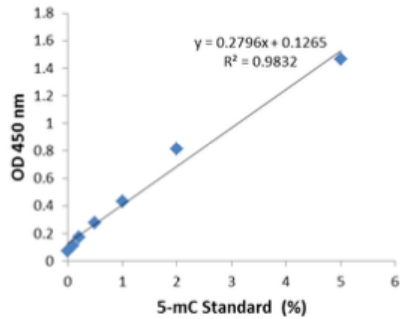


Illustrasjon av protokoll ved rensing og isolering av DNA (Qiagen, Hilden, Tyskland).

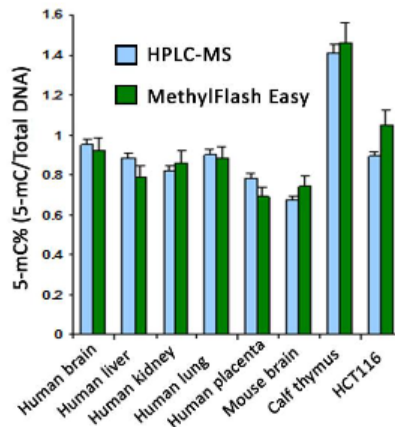
Appendix VI



▲ Schematic procedure for the MethylFlash™ Global DNA Methylation (5-mC) ELISA Easy Kit (Colorimetric).



▲ An example of an optimal standard curve generated with 5-mC standard control.



▲ Accurate quantification of 5-mC content of various DNA samples from different species using the MethylFlash™ Global DNA Methylation (5-mC) ELISA Easy Kit (Colorimetric). The results are closely correlated with those obtained by HPLC-MS.

Figur som illustrerer kvantifisert av global DNA metylering (5-metylcytosin) prosent i DNA-prøvene ble vha. MethylFlash™ DNA Quantification kit (EpiGentekGroup, USA).

Appendix VII

Viser om det er brukt normalfordeling, lognormalfordeling eller en ikke-parametrisk fordeling under analysen av data for genuttrykk av de ulike genene. Der fordelingen kvalifiserer for både normalfordeling og lognormalfordeling er det benyttet normalfordelte originaldata til 2-veis ANOVA. I de datasettene der data kun kvalifiserer for normalfordeling og ikke lognormal fordeling er normalfordelte originaldata benyttet. Der data kvalifiserer for lognormal fordeling og ikke normalfordeling er logtransformerte data benyttet. I de tilfellene der data verken kvalifiserer for normalfordeling eller lognormal fordeling er det brukt originaldata og en ikke-parametrisk fordeling (Kruskal-Wallis test) for å analysere data.

	MHC I		MHC II		sIgM		IgD		IgT		TCR1a	
	Normal	Lognormal	Normal	Lognormal	Normal	Lognormal	Normal	Lognormal	Normal	Lognormal	Normal	Lognormal
Hodenyre	No	yes	yes	yes	No	yes	yes	yes	No	No	yes	yes
Milt	yes	yes	yes	yes	yes	yes	yes	No	No	yes	yes	yes
Tarm	yes	yes	yes	yes	yes	yes	yes	yes	No	No	yes	yes
Gjeller	yes	yes	yes	No	No	yes	yes	No	No	yes	yes	No
Hud	yes	yes	No	No	yes	yes	yes	yes	No	yes	yes	yes

	IL10		IL22		NKEF		IFNg		Dnmt1		Dnmt3b	
	Normal	Lognormal	Normal	Lognormal	Normal	Lognormal	Normal	Lognormal	Normal	Lognormal	Normal	Lognormal
Hodenyre	yes	yes	No	yes	yes	yes	No	No	yes	yes	yes	yes
Milt	No	No	yes	yes	yes	yes	yes	yes	No	yes	yes	yes
Tarm	yes	yes	yes	No	yes	yes	yes	yes	No	No	yes	yes
Gjeller	yes	yes	No	yes	yes	yes	yes	no	yes	No	No	No
Hud	No	No	No	yes	No	No	yes	yes	yes	yes	No	No

Appendix VIII

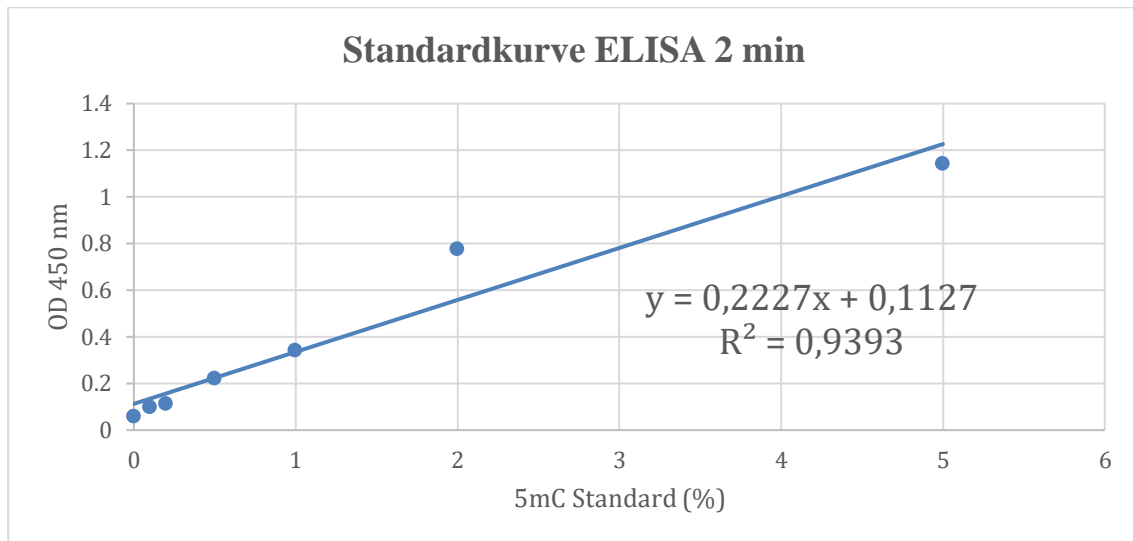
Viser p-verdier for korrelasjoner mellom immungener i hud. Rutene merket med rødt er ansett som statistisk signifikante og P-verdien er mindre enn 0,05.

Correlation P values	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M
	5-mC%	Dnmt1	Dnmt3b	MHC I	MHC II	sigM	IgD	IgT	TCR1a	IL10	IL22	NKEF	IFNg
1 5-mC%		0.270	0.408	0.804	0.896	0.354	0.352	0.562	0.519	0.050	0.119	0.278	0.616
2 Dnmt1	0.270		0.083	0.260	0.163	0.286	0.565	0.037	0.542	0.249	0.402	0.371	0.848
3 Dnmt3b	0.408	0.083		0.270	0.115	0.331	0.485	0.495	0.030	0.485	0.291	0.359	0.498
4 MHC I	0.804	0.260	0.270		0.013	0.030	0.078	0.669	0.040	0.678	0.044	0.659	0.316
5 MHC II	0.896	0.163	0.115	0.013		0.009	0.339	0.387	2.063e-004	0.806	0.074	0.638	0.998
6 sigM	0.354	0.286	0.331	0.030	0.009		0.268	0.029	0.059	0.871	0.825	0.113	0.779
7 IgD	0.352	0.565	0.485	0.078	0.339	0.268		0.504	0.116	0.614	0.801	0.225	0.656
8 IgT	0.562	0.037	0.495	0.669	0.387	0.029	0.504		0.722	0.515	0.865	0.283	0.626
9 TCR1a	0.519	0.542	0.030	0.040	2.063e-004	0.059	0.116	0.722		0.096	0.622	0.991	0.891
10 IL10	0.050	0.249	0.485	0.678	0.806	0.871	0.614	0.515	0.096		0.244	0.578	0.559
11 IL22	0.119	0.402	0.291	0.044	0.074	0.825	0.801	0.865	0.622	0.244		0.341	0.804
12 NKEF	0.278	0.371	0.359	0.659	0.638	0.113	0.225	0.283	0.991	0.578	0.341		0.082
13 IFNg	0.616	0.848	0.498	0.316	0.998	0.779	0.656	0.626	0.891	0.559	0.804	0.082	

Viser p-verdier for korrelasjoner mellom immungener i milt. Rutene merket med gult er ansett som statistisk signifikante og P-verdien er mindre enn 0,05.

Correlation P values	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M
	5-mC%	Dnmt1	Dnmt3b	MHC I	MHC II	sigM	IgD	IgT	TCR1a	IL10	IL22	NKEF	IFNg
1 5-mC%		0.056	0.652	0.025	0.050	0.125	0.682	0.569	0.248	0.628	0.040	0.004	0.170
2 Dnmt1	0.056		0.135	4.336e-004	0.078	5.811e-005	0.184	0.077	0.056	0.210	0.014	0.135	0.005
3 Dnmt3b	0.652	0.135		0.095	0.647	0.740	0.058	0.002	0.246	3.399e-004	0.781	0.378	0.274
4 MHC I	0.025	4.336e-004	0.095		0.001	3.658e-005	0.336	0.016	0.033	0.500	0.001	0.258	3.728e-005
5 MHC II	0.050	0.078	0.647	0.001		4.002e-004	0.547	0.494	0.004	0.284	0.003	0.430	0.004
6 sigM	0.125	5.811e-005	0.740	3.658e-005	4.002e-004		0.424	0.072	0.036	0.967	0.001	0.294	2.011e-004
7 IgD	0.682	0.184	0.058	0.336	0.547	0.424		0.028	0.021	0.569	0.933	0.941	0.242
8 IgT	0.569	0.077	0.002	0.016	0.494	0.072	0.028		0.176	0.019	0.127	0.967	0.028
9 TCR1a	0.248	0.056	0.246	0.033	0.004	0.036	0.021	0.176		0.920	0.349	0.776	0.228
10 IL10	0.628	0.210	3.399e-004	0.500	0.284	0.967	0.569	0.019	0.920		0.863	0.409	0.712
11 IL22	0.040	0.014	0.781	0.001	0.003	0.001	0.933	0.127	0.349	0.863		0.031	0.001
12 NKEF	0.004	0.135	0.378	0.258	0.430	0.294	0.941	0.967	0.776	0.409	0.031		0.822
13 IFNg	0.170	0.005	0.274	3.728e-005	0.004	2.011e-004	0.242	0.028	0.228	0.712	0.001	0.822	

Appendix IX



Standardkurve ved ELISA dannet ved å plote OD-verdiene fra avlesning ved ELISA opp mot en 5-mC standard (%) ved avlesningen etter 2 minutter. X-aksen viser 5-mC Standard (%) mens Y-aksen viser absorbansen til OD-verdiene ved 450nm. Avlesningene etter 2 minutter gav punkter i plottet som gav en rett linje ved lineær regresjon, dette indikerte at alle prøvene var gode. Derfor ble verdiene ved avlesningen etter 2 minutter benyttet til videre beregninger. Stigningstallet til grafen i standardkurven var 0,2227 og ble benyttet videre til å beregne 5-mC % for hver prøve ut fra formel (F.3).

