



UiT Norges arktiske universitet

Fakultetet for biovitenskap, fiskeri og økonomi

$\gamma\delta$ T-celler i atlantisk laks: Innsyn i $\gamma\delta$ T-cellers roller i antivirale responser mot *Piscine Orthoreovirus (PRV)* oppnådd gjennom genomiske og molekylære analyser

Mari Jahren Herud

Masteroppgave i akvamedisin BIO-3955 (60 stp)

Mai 2022

Innhold

1	Introduksjon	1
1.1	Prosjektbakgrunn.....	1
1.2	Utvikling av fiskevaksiner	2
1.3	Immunforsvaret – medfødt og adaptiv immunitet.....	3
1.4	Distribusjon av T-celler i immunologiske organer og vev i fisk.....	4
1.5	T-cellemediert immunitet	6
1.6	TR-diversitet og genomisk organisering	8
1.7	Analyser av immunrepertoaret	11
1.8	T-celler hos fisk.....	13
1.9	$\gamma\delta$ T-celler i fisk.....	14
1.10	Hjerte- og skjelettmuskelbetennelse.....	15
1.11	PRV-3 induserer beskyttelse mot PRV-1	16
1.12	Formålet med oppgaven	18
2	Materialer og metode	19
2.1	Kartlegging av TRG-loci.....	19
2.2	Sekvensanalyser og regelverk for nomenklatur	20
2.3	TRD- 5' RACE.....	21
2.4	Rådataprosessering og TRD-repertoaranalyse	22
2.5	PRV-eksperiment	23
2.6	Isolering av RNA	24
2.7	Behandling med DNase og syntese av cDNA.....	26
2.8	Primerdesign og - effektivitet.....	26
2.9	qPCR	27
2.10	Statistisk analyse	28
3	Resultater.....	29
3.1	Kartlegging og sammenlikning av TRG-loci i laks og regnbueørret.....	29

3.1.1	TRG-locus i laks.....	29
3.1.2	TRG-locus i regnbueørret.....	33
3.1.3	Identifisering av TRG-gener i arktisk røye, donaulaks, sik og harr.....	34
3.2	TRG-uttrykk i laks	36
3.3	Uttrykk av TRG- og TRD-gener etter PRV-infeksjon.....	39
3.3.1	TRG-uttrykk 5 og 10 uker etter PRV-infeksjon.....	40
3.3.2	TRGC-uttrykk 5 uker sekundær PRV-infeksjon.....	42
3.4	TRD-genuttrykk i laks analysert med RACE.....	45
3.4.1	Uttrykk av TRDV-Gener.....	48
3.4.2	Uttrykk av TRAV kombinert med TRDC.....	48
4	Diskusjon.....	51
4.1	Genomisk organisasjon av TRG i laksefisk.....	51
4.2	Uttrykk av TRGC-gener.....	53
4.3	TRD-repertoaranalyse	55
4.4	Uttrykk av TRG- og TRD-kjeder etter PRV-infeksjon.....	56
5	Konklusjon	58
	Referanseliste	60
	Vedlegg 1	66
	Vedlegg 2	70

Forord

Denne masteroppgaven er utført ved Fakultetet for biovitenskap, fiskeri og økonomi ved Norges Fiskerihøgskole, Universitetet i Tromsø (UiT) og symboliserer slutten av akvamedisinstudiet.

Først og fremst ønsker jeg å gi en stor takk til min veileder Eva-Stina Edholm som introduserte meg for dette spennende prosjektet. Takk for at du har delt din kunnskap og engasjement for faget. Din veiledning, tålmodighet og gode humør har vært uvurderlig.

Jeg ønsker å takke biveileder Agata Teresa Wyrosemska for enestående hjelp på laben og fremstilling av en rekke figurer.

Takk til Chris Graham Fenton og Ruth H. Paulssen ved Genomics Support Center Tromsø for jobben med sekvensering og dataanalyse av prøver.

Jeg vil takke gjengen for fem uforglemmelige år i Tromsø. Takk for alle fine stunder og moro vi har delt sammen, og for alle vennskap jeg har fått.

Til slutt vil jeg takke mine nærmeste, Ida, Thea, og støtteapparatet mamma og pappa for at dere alltid er der for meg og støtter meg.

Tromsø, 14. mai 2022.

Mari Jähren Herud

Sammendrag

Hos virveldyr med kjeve er $\alpha\beta$ - eller $\gamma\delta$ T-celler definert som de to hovedpopulasjonene av T-celler. Laksefamilien omfatter atlantisk laks og regnbueørret som er viktige arter i oppdrett. Oppdrett av disse artene avhenger av vaksiner for å kunne kultiveres på en bærekraftig måte. Det har skapt økt interesse for å forstå mekanismene i adaptive immunresponser mot patogener og vaksiner, og derfor gjøres det en innsats for å sekvensere B-cellerreseptorer og T-cellerreseptorer (TR) i disse artene. På bakgrunn av dette er det grunnleggende at det foreligger et felles nomenklatur for TRD/TRG-gener slik at det er mulig å gjøre videre dybdesekvensering for å analysere hvilke TRD og TRG gener som utnyttes. I denne oppgaven har vi for andre gang kartlagt TRG-locus i atlantisk laks, og gjort den første rapporteringen av den genomiske organiseringen av TRG i regnbueørret. TRG har en annerledes organisering enn tidligere antatt, da TRG hos laksefisk er funnet lokalisert på et locus, ikke to ulike loci. Kartleggingen tyder også på at TRG-gener til en viss grad er konserverte mellom atlantisk laks og regnbueørret. Atlantisk laks har 7 konstante (C) regioner, og det er funnet at TRG1, TRG2, TRG3 og TRG5 uttrykkes i vevet. Dybdesekvenseringen viste at uttrykket av TRD skiller seg markant fra TRA ved at det her er svært skjevfordelt distribusjon av TRV og TRJ gener kombinert med delta. Det bekreftes at PRV-3 induserer beskyttelse mot sekundær infeksjon med PRV-1, og i tillegg at $\gamma\delta$ T-celler kan bidra i beskyttelsen. Nøyaktig hvilke mekanismer som forårsaker beskyttelsen gjenstår å finne ut.

Forkortelser

AA	Aminosyrer	RAG	recombinase-activating gene
APC	Antigenpresenterende celler	RSS	rekombinasjonsignalsekvenser
C	konstant	SAV	<i>Salmonid Alphavirus</i>
cDNA	Komplementær DNA	TCR	T-cellereseptor kompleks
CDR	Complementarity-determining region	TdT	terminal deoxyribonucleotidyl transferase
Ct	Threshold-syklus	Th	T-hjelpercelle
CTL	Cytotoksiske T-celler	TR	T-cellereseptor
D	Diversity (Diversitet)	USP	Universal primer
dsDNA	Double stranded DNA (dobbeltrådet DNA)	V	Variable
EF1 α	Elongeringsfaktor 1 α	IMGT	International immunogenetics
gDNA	Genomisk DNA	TM	Transmembrane
GSP	Genspesifikk primer	TRA	T-cellereseptor alfa
HSMB	Hjerte- og skjelettmuskelbetennelse	TRD	T-cellereseptor delta
IEL	intra-epitel-leukocytter	TRG	T-cellereseptor gamma
IL	Interleukin		
ILAV	Infeksiøs lakseanemivirus		
ILT	Interbranchialt lymphoid tissue/ interbranchialt lymfoidvev		
IPN	Infeksiøs pankreasnekrose		
J	Joining		
MHC	Major histocompatibility complex		
Nt	Nukleotid		
PRR	Pattern recognition receptor		
PRV	<i>Piscine Orthoreovirus</i>		
qPCR	Quantitative polymerase chain reaction		
RACE	Rapid amplification of cDNA ends		

1 Introduksjon

Aller først skal jeg gjøre rede for prosjektets bakgrunn og hvorfor det er relevant med tanke på de utfordringene fiskeoppdrettsnæringen møter med infeksjose sykdommer. Deretter kommer teori innen ulike spesifikke områder for immunologi som er relevant for oppgaven, med fokus på T-celler generelt og T-celler i fisk. Til slutt i introduksjonen presenterer jeg formålet med oppgaven.

1.1 Prosjektbakgrunn

Fiskeoppdrett er et viktig tilskudd i en verden med økende matbehov som følge av stadig befolkningsvekst. Oppdrett av fisk overgår tradisjonell villfangst og er dermed den viktigste formen for produksjon av fiskeprotein, i tillegg har oppdrett positive virkninger ved at det fører til mindre overfiske og dermed kan bidra til gjenoppbygging av villfiskbestander. Fiskeoppdrettsnæringen preges av store utfordringer med høy dødelighet og problematikk innen fiskehelse. Ifølge fiskehelse rapporten 2021 var total dødelighet i sjøfasen 54 millioner laks, som er en økning fra 52 millioner i 2020 (Sommerset, 2021 #114; Sommerset, 2022 #113). Årsakene til dødelighet er mange og sammensatte. Det dreier seg blant annet om lus, parasitter, bakterie- og virussykdommer, sår og mekaniske skader fra håndtering og avlusning. En undersøkelse fra 2021 viste at virussykdommene kardiomyopatisyndrom (CMS) og hjerte- og skjelettmuskelbetennelse (HSMB) er blant de fire vanligste årsakene til dødelighet, sammen med mekaniske skader relatert til avlusning, og bakterieinfeksjoner med *Moritella viscosa* (Sommerset, 2022 #113). Profylaktisk behandling, og dermed vaksiner, er blant det viktigste man gjør for å forebygge infeksjoner. Oppdrettsfisk i Norge vaksineres i dag mot en rekke bakterie- og virussykdommer, og redusert bruk av antibiotika de siste 30 årene (Sommerset, 2022 #113) forteller oss at bakterievaksinene på mange måter har vært en suksess. Disse vaksinene er som regel basert på inaktiverede bakterier og, eller spesielle bakteriekomponenter, og er formulert slik at de primært påvirker B-cellene. Derimot er ikke de tilgjengelige virusvaksinene som i hovedsak er basert på inaktiverede virus eller viruskomponenter, effektive nok for å hindre sykdomsutbrudd i praksis.

For å kunne utvikle gode vaksiner kreves det kompetanse innenfor immunologi. Naturlig nok er immunsystemet i pattedyr mye grundigere studert enn immunsystemet hos fisk. Det er derfor mange mekanismer og funksjoner i fiskens immunsystem man ikke kjenner fullt ut, særlig innenfor adaptiv immunitet og T-cellebiologi. . For å studere immunologi i fisk bruker man

kunnskapen fra pattedyr som utgangspunkt, og det antas at det er store likheter, men mye er også ulikt. Det interessante ved immunologi hos fisk er at de i motsetning til terrestriske dyr utsettes for ekstremt mange flere sykdomsfremkallende substanser. Vann inneholder mer bakterier, virus og sopp enn luft, og fisk er dermed kontinuerlig kontakt med stoffer som kan fremkalle sykdom. Dessuten er de vekselvarme og har frittlevende larvestadier. Alle de ovennevnte er faktorer som mest sannsynlig påvirker hvordan immunsystemet responderer.

Oppdrettsfisk har høyere sannsynlighet for å få infeksjoner enn annen fisk. Det kommer av flere årsaker, blant annet er høy tetthet mellom individene, og åpent miljø for patogene mikro- og makroorganismer sentrale faktorer. I tillegg er rask vekst, kort produksjonssyklus og kunstig smoltifisering faktorer som påvirker fiskens fysiologi. Produksjonsregimet sørger ikke for eksponering mot naturlige patogener i den første fasen av livssyklusen i ferskvann, og immunsystemet får dermed ikke muligheten til å «øve» seg før den blir overført til sjøen der eksponeringen for patogener øker. I tillegg medfører overføring til sjø, og ulike operasjoner som blant annet avlusning, økt stress for fisken, som kan redusere forsvarsevnen til immunsystemet (Tort, 2011). Dette gjør at forebyggende tiltak og vaksiner er essensielt for å oppnå god fiskehelse.

1.2 Utvikling av fiskevaksiner

Den første engelskspråklige artikkelen om immunitet mot sykdom i fisk, ble utgitt allerede i 1942 av canadiske Duff (Dalmo & Bøgvald, 2020). På slutten av 70- og 80-tallet begynte man å bruke de første fiskevaksinene i kommersiell oppdrett. Den første godkjente fiskevaksinen ble produsert i USA i 1976 og var mot yersiniose (enteric red mouth disease) forårsaket av bakterien *Yersinia ruckeri* i regnbueørret (*Oncorhynchus mykiss*). Dette var en type inaktivert immersjonsvaksine (dypp- eller badvaksine). Den første vaksinen benyttet på fisk i Norge ble introdusert på slutten 80-tallet og var en inaktivert vaksine mot kaldtvannsvibriose (*Vibrio salmonicida/ Aliivibrio salmonicida*). Til å begynne med ble denne administrert ved dyppvaksinering, men etter hvert gikk man over til intraperitoneal administrering i bukhulen (Sundell, #115).

Generelt fungerer vaksinerne svært godt mot bakteriesykdommene, noe som har bidratt til å minske antibiotikabruken i fiskeoppdrett (Sommerset, 2022 #113). Virusvaksiner som brukes i dag har suboptimal effekt på grunn av blant annet ugunstig komposisjon, som ikke klarer

å engasjere hele immunsystemet. De fleste fiskevaksinene er basert på inaktiverede hele virus eller bakterier som utløser den humorale delen av det adaptive immunsystemet, men i liten eller ingen grad klarer å engasjere det cellemedierte systemet. Dette er et problem for virussykdommer fordi virus er obligat intracellulære organismer i vertsceller, som betyr at virus kan skjule seg inni celler der de beskyttes fra humorale B-celleresponser som f.eks. antistoffer. På grunn av dette er det essensielt å engasjere det cellemedierte immunsystemet, særlig CD8-cytotoksiske T-celler for å bekjempe virus. Det kan argumenteres med at de viktigste mekanismene for å overvinne virus ligger i T-cellene. De fleste studiene på immunsystemet hos fisk så langt er gjort på det medfødte systemet og den humorale delen av det adaptive immunsystemet, og færre studier på det cellemedierte systemet (Laing, 2011 #120; Nakanishi, 2015 #116; Somamoto, 2014 #119; Yamaguchi, 2019 #121). En del av utfordringen er at man har problemer med å utvikle cellelinjer for atlantisk laks og fisk generelt. Derfor finnes det ikke cellelinjer for B- og T-celler, noe som gjør det ekstra utfordrende å studere T-celleresponser mot virus.

1.3 Immunforsvaret – medfødt og adaptiv immunitet

Immunforsvarets viktigste oppgave er å forebygge og fjerne infeksjoner forårsaket av enten mikro- eller makroskopiske organismer eller substanser. En videre definisjon er kroppens respons mot mikrober og andre molekyler som gjenkjennes som fremmed, uavhengig om det medfører en fysiologisk eller patologisk reaksjon. Immunologi er altså studiet av immunresponser og de cellulære og molekylære hendelsene som skjer etter at en kroppscelle møter mikrober eller andre fremmede molekyler (Abbas, Lichtman, & Pillai, 2019). Tradisjonelt skiller man mellom medfødt immunitet og adaptiv immunitet. Medfødt immunitet finnes til en viss grad i alle levende flercellede organismer.

Medfødt immunitet er barrierer og funksjoner vi blir født med som sørger for kontinuerlig beskyttelse, mens den adaptive delen utvikles saktere og gir spesialisert beskyttelse. Medfødt immunitet finnes til en viss grad i alle levende organismer, utgjør førstelinjeforsvaret imot infeksjoner og responderer umiddelbart ved infeksjon. Det omfatter hud- og slimhinner og ulike typer leukocytter. Adaptiv immunitet basert på B- og T-celler med antigenreseptorer generert ved somatisk rekombinasjon (B-cellerreseptorer og T-cellerreseptorer), oppsto i virveldyr med kjeve (*Gnathostomata*) for om lag 450 – 50 millioner år siden (Flajnik & Kasahara, 2010) og finnes bare i disse artene.

Adaptiv immunitet, som også kalles andrelinjeforsvaret, må ofte få et signal fra det medfødte systemet for å respondere, og bruker derfor lengre tid på å svare. En av forskjellene mellom det medfødte og det adaptive immunsystemet er at det medfødte responderer med det samme forsvaret og de samme våpnene hver gang. Det kan enten være en inflammasjonsrespons bestående av leukocytter og plasmaproteiner, eller antivirusemekanismer som «natural killer» - celler (Rosati, 2017 #3), som dreper virusinfiserte celler eller type I interferoner (IFNs) som blokkerer virusreplikasjon i kroppsceller. Det medfødte systemet har en rekke forskjellige konserverte mønstergjenkjenningsreseptorer (PRRs) som gjenkjenner ca. 1000 forskjellige strukturer hos patogener som omtales med samlebetegnelsen "pathogen associated molecular patterns» (PAMPs)(Abbas, 2019 #18). Eksempel på slike PAMPs er glykoproteiner og glykolipider som er i overflaten på bakterier og sopp. I motsetning til det medfødte systemet har det adaptive systemet kun to ulike typer reseptorer: immunglobuliner (Ig) og T-cellerreseptorer (TCRs) som gjenkjenner antigener, men disse kan til gjengjeld gjenkjenne millioner av ulike antigener (se kap. 1.6 for mer detaljer).

1.4 Distribusjon av T-celler i immunologiske organer og vev i fisk

Det er store likheter i immunsystemet til beinfisk og pattedyr når det gjelder immungener, molekyler og celler, mens det derimot er store forskjeller i de immunologiske organene.

Thymus i fisk er sannsynligvis funksjonelt ekvivalent med thymus i mennesker, og er dermed et primært immunologisk organ. En viktig forskjell på thymus i fisk og pattedyr er lokasjonen. Mens den i pattedyr ligger godt beskyttet bak brystbenet, ligger den mer eksponert i fisk, like under gjellekammer-epitelet (Bjørngen, 2021 #62). Det innebærer at det ligger svært utsatt for patogene organismer som eventuelt kommer inn via gjellene. I laksefamilien har man ikke klart å identifisere at thymus har den klassiske organiseringen av cortex og medulla som man kjenner fra pattedyr. Denne organiseringen er viktig fordi cortex og medulla er spesialiserte immunologiske områder som er der utviklingen av T-celle foregår. I thymus hos pattedyr er cortex der hvor rekombinasjon av TCR og påfølgende profilering av T-celler som uttrykker funksjonelle TCRs foregår, og i medulla foregår apoptose av selekterte negative T-celler (T-celler som enten ikke klarer å gjenkjenne MHC eller gjør det med for høy affinitet). I regnbueørret har man basert på histologiske analyser delt inn thymus i en ytre kapsulær sone, etterfulgt av en subkapsulær sone, indre sone, ytre sone og svelgeepitel, men det er ikke funnet

ut om det foregår positiv og eller negativ seleksjon av T-celler i disse sonene (Castillo, 1990 #57; Chilmonczyk, 1983 #55).

I pattedyr er rød benmarg et primært lymfoid organ, men siden fisk mangler dette finnes tilsvarende funksjon i hodenyren, det vil si den kraniale delen av nyren. Hodenyre innehar B-celleutvikling (Rombout, 2005 #59; Zwollo, 2005 #60) og antigenpresentasjon (Press & Evensen, 1999), og ansees derfor både som primært og sekundært lymfoid organ. Dessuten er T-celler også påvist i hodenyre (Maisey, 2016 #136). Baknyren er et sekundært lymfoid organ og inneholder B-celler, makrofager, melanomakrofager og T-celler (Bjørgen & Koppang, 2021).

I pattedyr er rød benmarg et primært lymfoid organ, men siden fisk mangler dette finnes tilsvarende funksjon i hodenyren, det vil si den kraniale delen av nyren. Hodenyre innehar B-celleutvikling (Rombout, 2005 #59; Zwollo, 2005 #60) og antigenpresentasjon (Press & Evensen, 1999), og ansees derfor både som primært og sekundært lymfoid organ. Baknyren er et sekundært lymfoid organ og inneholder B-celler, makrofager, melanomakrofager og T-celler (Bjørgen & Koppang, 2021).

I 2008 oppdaget Haugarvoll et al. et nytt lymfoid organ som kalles interbranchialt lymfoid vev (ILT) (Haugarvoll, Bjerkås, Nowak, Hordvik, & Koppang, 2008). ILT er lokalisert i groppen mellom gjellefilamentene, og deles inn i en proximal og distal del (Dalum et al., 2015). ILT består hovedsakelig av T-celler i et nettverk av epitelceller, men også av enkelte spredte B-celler og MHC (major histocompatibility complex) klasse II positive celler. (Koppang et al., 2010). Nylig ble det identifisert uttrykk av kjemokin (C-C motif) ligand 19 (CCL19) i ILT (Bjørgen et al., 2019). CCL19 kjennetegnes ved at det er involvert i aktivering av T-celler, og er i pattedyr høyt uttrykket i thymus og lymfekjertler (Yoshida, 1997 #137). Dermed kan uttrykk av CCL19 indikere at ILT er et lymfoid organ. Basert på observasjoner finnes det ikke uttrykk av RAG-1 eller RAG-2 og dermed ikke rekombinatorisk aktivitet (Bjørgen & Koppang, 2021), hvilket betyr at det ikke er et primært lymfoid organ, men det foregår proliferering av T-celler på visse steder i organet (Dalum, 2016 #35). Det er heller ikke observert at celler i ILT kan ta opp antigener, som er en forventet funksjon i et sekundært lymfoid organ. Her skiller ILT seg fra pattedyr-MALT (mucosa-assosiert lymfoid vev), som kjennetegnes av evnen til å ta opp eksogene antigener direkte. Cellestrukturen i overflaten av ILT ser ikke ut til å være egnet for antigenopptak, fordi den består av flate epitelceller som minner om lagdelt plateepitel

(Bjørngen & Koppang, 2021). I tillegg inneholder overflaten mange begerceller som skiller ut slim.

I 2019 oppdaget Løken et al. (Løken, Bjørngen, Hordvik, & Koppang, 2020) ved en tilfeldighet organet bursa i laksefisk. Organet er analogt med bursa av Fabricius i fugl, som har tilsvarende struktur og delvis funksjon. Det er lokalisert caudalt for kloaka (felles kammer der tarm, urinrør og genitale kanaler samles). Bursa i laksefisk består av lymfoid epitelvev og på samme måte som i fugl degenerer organet etter seksuell modning. Et annet likhetstrekk med bursa av Fabricius er at det ser ut til å være et sekundært lymfoid organ fordi det har evnen til å ta opp antigener fra tarmen og det utvendige miljøet, i tillegg til at det inneholder antigenpresenterende celler (Løken et al., 2020). På grunn av fravær av rekombinasjonsaktivitet er det trolig ikke et primært lymfoid organ, i motsetning til bursa av Fabricius. Et interessant funn av var at både $\alpha\beta$ T-celler og $\gamma\delta$ T-celler var til stede, der det var flest av førstnevnte (Løken et al. 2020). I motsetning til Bursa av Fabricius, som er dominert av B-celler utgjør T-celler majoriteten av lymfocytene.

To studier har vist at beinfisk har T-celler i tarmen, men det er usikkert hvilken rolle de har ved immunresponser. I følge Takizawa et al. (2011 #54) er $CD8\alpha^+$ T-celler dominerende blant epitel-leukocytter i tarmen og utgjør 55 prosent i regnbueørret. I likhet med mus og mennesker består intra-epitel-leukocytter (IEL) i tarmen hos regnbueørret sannsynligvis hovedsakelig av T-celler, fordi de uttrykker gener for T-celle markører som CD8, CD4, CD28, CD3 ϵ , TCR ζ , TCR γ og TCR β (Bernard et al., 2006). De uttrykte ikke IgM, hvilket betyr at B-celler, i stor grad ikke er til stede i tarmepitelet. Det er også rapportert at T-celler lokalisert i tarmen ivaretar et svært mangfoldig TR (T-cellereseptorer) $\alpha\beta$ repertoar, i mangel av «Peyers Patches» og mesenteriske lymfeknuter (Bernard et al., 2006).

1.5 T-cellemediert immunitet

T-cellene er en del av det ervervede immunforsvaret og medierer cellulær immunitet. T-cellene uttrykker spesifikke T-cellereseptorer (TRs) som gjenkjenner antigener. TR består av to forskjellige polypeptidkjeder bundet sammen med en disulfidbinding. Majoriteten av T-celler i mennesker og mus har reseptorer som består av en α -kjede og en β -kjede. I tillegg finnes det en populasjon med T-celler med annerledes reseptor bestående av en γ -kjede og en δ -kjede. $\alpha\beta$ T-celler kalles konvensjonelle T-celler og grupperes i to populasjoner: cytotoksiske T-celler

(CTLs) og T-hjelperceller (Th). CTLs uttrykker koreseptor CD8 på overflaten og binder til MHC klasse I, mens Th-celler uttrykker koreseptor CD4 som binder til MHC klasse II. CTLs og Th-celler har forskjellige roller i immunsystemet. CTLs viktigste rolle er å bekjempe virus og andre intracellulære patogener ved å direkte drepe infiserte celler. T-hjelperceller bidrar til å få B-celler til å produsere antistoffer, makrofager til å destruere mikrober og ikke minst til å aktivere CTLs til å drepe infiserte målceller. Hvilken type patogen det er, bestemmer om T-hjelperceller differensierer til effektorcelle: Th1, Th2 eller Th17.

$\gamma\delta$ T-celler kalles for ukonvensjonelle T-celler, fordi de har egenskaper som skiller seg fra de konvensjonelle $\alpha\beta$ T-cellene. I mennesker og mus utgjør $\gamma\delta$ T-celler 1–10 prosent av sirkulerende T-celler i perifert blod (Antonacci et al., 2020). Til sammenlikning utgjør de en betydelig andel av sirkulerende T-celler i vanlig husdyr som storfe, sau, svin og kylling (15–60 prosent) (Antonacci et al., 2020). Uavhengig om det er menneske, mus eller husdyr kjennetegnes $\gamma\delta$ T-celler ved at de finnes i større populasjoner i mucosal- og epitelvev, hvilket indikerer at de har en viktig rolle i medfødte immunresponser. I motsetning til $\alpha\beta$ T-celler kan de gjenkjenne antigener direkte uten at de presenteres på et MHC-kompleks, på samme måte som immunoglobuliner (Antonacci et al., 2020). Det henger sammen med at de aller fleste ikke har CD4- eller CD8-reseptorer, de kalles derfor CD4- eller CD8- dobbelt negative. Det innebærer fleksibilitet, men det er uklart hvilke typer ligander de foretrekker (løselige, membranbundet eller hele uproseserte antigener) (Antonacci et al., 2020). Det som er spesielt for TR $\gamma\delta$ er at de forekommer i mange ulike subpopulasjoner med ulike spesifisiteter og funksjoner, det gjelder i pattedyr, mus og sannsynligvis også fisk. TR $\gamma\delta$ i drøvtyggere uttrykker istedenfor CD4/CD8 spesifikke WC1-proteiner som virker som mønstergjenkjenningreseptorer (pattern recognition receptors, PRR) og $\gamma\delta$ T-celleaktiverende koreseptorer (Chen, Hsu, Hudgens, Telfer, & Baldwin, 2014) (Wang, Herzig, Ozer, Baldwin, & Telfer, 2009).

I løpet av de siste årene er det rapportert om flere spesifikke funksjoner innen immunregulering og vevsreparasjon hos mus og menneskelige $\gamma\delta$ T-celler. En av funksjonene de har er direkte cytotoxisk aktivitet mot infiserte eller neoplastiske celler¹ ved hjelp av sekresjon av granzyme B eller perforin (Qin et al., 2009). En annen rapportert funksjon er evnen til fagocytose av bakterier via CD16-reseptoren (Wu et al., 2009). Ikke nok med det rapporterte Maniar et al.

¹ Celler som vokser ukontrollert og ikke reguleres på vanlig måte (dvs. kreftceller).

(Maniar, 2010 #45) at de kan indusere cellemediert antitumor-cytotoksisitet fra NK-celler via CD137-reseptoren. Videre er det funnet at de kan regulere andre involverte celler i den medfødte immunresponsen på to måter: enten ved å produsere immunundertrykkende cytokiner som transformerende vekstfaktor (TGF)- β og IL-10, eller regulere $\alpha\beta$ T-cellenes aktivitet til å undertrykke proliferering av CD4 T-celler (Kühl et al., 2009). Ved å syntetisere og uttrykke konnektiv vevs-vekstfaktor (CTGF) (Workalemahu, Foerster, Kroegel, & Braun, 2003) og insulinliknende vekstfaktor-1 (IGF-1) (Toulon et al., 2009), kan de fremme regenerasjon av epitel og sårheling. I tillegg fungerer de som antigenpresenterende celler (APC) for $\alpha\beta$ T-celler (Brandes et al., 2009). Alt dette forteller at repertoaret til $\gamma\delta$ T-celler har svært varierte og mangfoldige funksjoner.

1.6 TR-diversitet og genomisk organisering

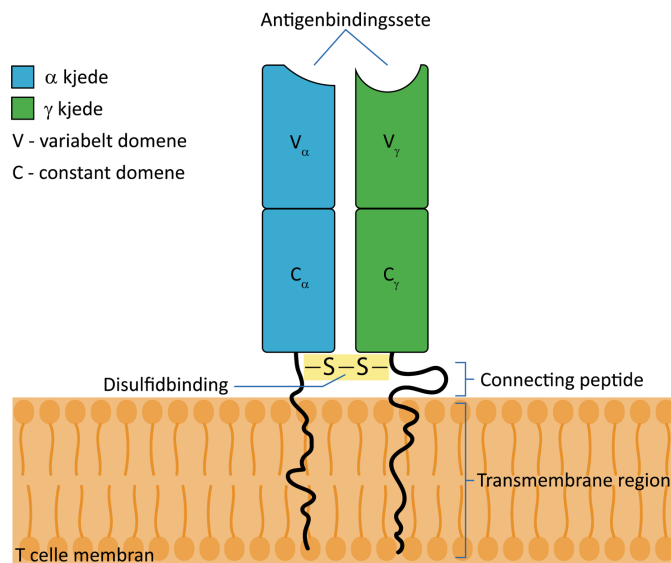
Et av kjennetegnene ved TR (og B-celle reseptorer (BR)) er at de har enorm diversitet. Jo større mangfold av TR og BR, desto flere antigener kan detekteres og dermed gi bredere beskyttelse mot sykdom. Hver T-celle uttrykker en unik TR som blir generert ved somatisk rekombinasjon. Somatisk rekombinasjon er endringer i DNA-et hos somatiske celler og arves av datterceller. V(D)J-rekombinasjon er en type somatisk rekombinasjon som skjer tidlig i modningen av B- og T-celler, og skjer i de primære lymfoide organene (thymus for T-celler). I prosessen blir variable (V)-, joining (J)- og diversitet (D)-segmenter rearrangert tilfeldig. Dette fører til at det skapes flere ulike TRs, og på den måten blir det mulig å gjenkjenne de aller fleste patogenene som finnes (Abbas et al., 2019). Genene som koder for kjedene α , β , γ og δ har unik organisering. I TRB-locus er det V-, D- og J-gensegmenter, mens i TRA-locus er det kun V og J. Under utvikling av en konvensjonell T-celle skjer det først en rekombinasjon i β -kjeden med D og J. Rekombinasjon av DJ blir etterfulgt av at et V-segment som er oppstrøms for DJ kobles på, slik at man får en rearrangert VDJ. V(D)J-rearrangering involverer enzymene recombina-activating gene 1 (RAG-1) og RAG-2. RAG $\frac{1}{2}$ -komplekset gjenkjenner rekombinerte signalsekvenser (RSSs) som omfatter alle antigenreseptorenes V-, D- og J-gensegmenter. Enzymkomplekset binder seg til RSS og markerer DNA-et. Det fører til at det mellomliggende DNA fjernes, deretter repareres hullene av ligaser. Resultatet er at man får et komplett rekombinert V-J eller V-D-J uten mellomliggende DNA-segmenter (Abbas et al., 2019). Det rekombinerte genet blir så transkribert før mellomliggende gener spleises vekk, og den

konstante regionen (C) blir også inkorporert. Til slutt blir mRNA-et til et ferdig protein i TR β -kjeden. α -kjeden går gjennom tilsvarende prosess der V og J rekombineres.

Diversitet i antigenreseptorene produseres ved at V-, D- og J-segmentene kombineres på ulike måter i de ulike lymfocyttklonene. Dette kalles for kombinatorisk diversitet. I tillegg kan ekstra nukleotider legges til i mellomrommene når V, D og J rekombineres (junctional diversitet) som fører til enda større diversitet. Denne typen diversitet består av tre mekanismer. Den første er ved hjelp av exonukleaser som fjerner nukleotider fra V-, D- og J-segmentene ved punktet for rekombinasjon. Den andre mekanismen oppstår når terminal deoxyribonucleotidyl transferase (TdT) enzymet legger til tilfeldige nukleotider (N-nukleotider) i mellomrommene. Mens den tredje måten er hvis spleising og liming av DNA-et ikke skjer korrekt som fører til overhengende nukleotider, og dermed må det fylles inn med P-nukleotider (P for palindrom).

Figur 1 illustrerer en skjematisk oppbygning av en $\gamma\delta$ TR. C-regionen som koder for det konstante domenet av reseptoren forankrer reseptoren i cellemembranen og er viktig i signaltransduksjon. C-regionen består av flere domener som ofte kodes av ulike eksoner: et konstant Ig-superfamiliedomene, et connecting peptide, en transmembran region og en kort cytoplasmisk hale. Det området på reseptoren som binder til antigenet kalles for variabel region. Den variable regionen som består av et V- og et J-gen som kombineres via rekombinasjon er konserverert innenfor hver lymfocyttklone, men varierer i ulike kloner. I den variable regionen er sekvensvariabiliteten konsentrert over korte strekninger som kalles hypervariable regioner (complementarity-determining regions (CDR)). Det er tre slike regioner: CDR1, CDR2 og CDR3. CDR3 har størst variabilitet, fordi den kodes av regionen imellom V- og J-genene, eller D- og J-genene. Denne regionen er komplementær med antigenets form, det vil si at den passer som en nøkkel i en lås. Poenget med å konsentrere variabiliteten i mindre regioner er at det øker antall mulige antigenbindingssteder samtidig som reseptoren beholder sin grunnleggende form CDR1 og CDR2 kodes av V-gener. Ved binding til et antigen (peptid) binder hovedsakelig CDR3, én fra α -kjeden og én fra β -kjeden. CDR1 og CDR2 i α - og β -kjedene interagerer med MHC-molekylet og påvirker dermed affiniteten i bindingen. I denne sammenhengen må man huske på at T-cellene ikke bare er spesifikke for peptidet, men også MHC-molekylet. På denne

måten oppfatter reseptoren en hel sammenhengende struktur som består av MHC og peptid som passer i reseptorens bindingssete (Lea, 2002).

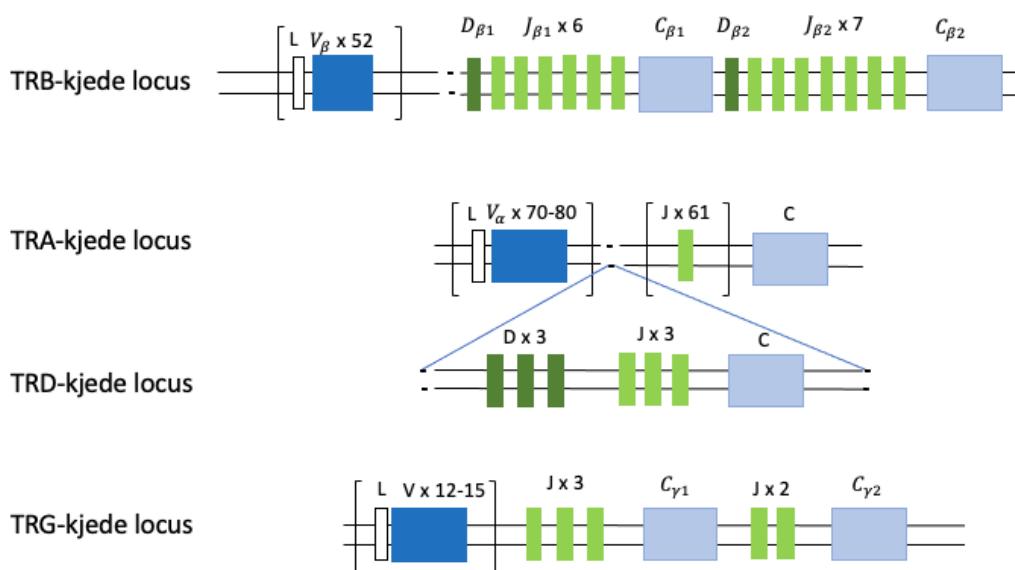


Figur 1. Skjematisk illustrasjon av en $\gamma\delta$ T-celle reseptor (TR). Hver kjede består av en variabel (V) og et konstant domene (C), samt en transmembran region (TM) og en kort cytoplasmisk hale. δ -kjeden er markert i blått, og γ -kjeden i grønt. Antigenbindingssetet er vist som halvsirkelen øverst. Figuren er basert på humane $\gamma\delta$ TRs.

Terrestriske husdyr har et bredere og mer mangfoldig TRG- og TRD-repertoar sammenliknet med mennesker og mus, dette kan forklare hvordan $\gamma\delta$ T-celler har funksjonelle forskjeller i de ulike artene. Rearrangering av γ og δ foregår på samme måte som for α og β , med ett unntak, under rearrangering av TRD kan flere ulike D-gene brukes i samme rearrangeringer. Dette fører til en ekstra lang CDR3-region i TRDV og skaper økt variabilitet ved at ekstra N-nukleotider kan legges til i mellomrommet mellom de to D-segmentene, og i mellom V–D og D–J (Janeway Jr, Travers, Walport, & Shlomchik, 2001).

I mennesker ligger TRA på kromosom 14 og består av 70–80 V_α -gener (se **figur 2**). Foran hvert V-ekson ligger det en L- (leder) sekvens, men eksakt hvor mange av disse som er funksjonelle er man usikker på. Menneskets TRA inneholder 61 J_α -gensegmenter, etterfulgt av ett enkelt C-gen som inneholder separate eksoner for den konstante regionen og connecting peptide-regionen, og ett ekson som koder for transmembran- og cytoplasmisk region (Janeway Jr et al., 2001). TRB (kromosom syv i menneske) har annerledes organisering og har 52 V_β , ett D-gen, seks eller syv J-gener og to C-gener. C-segmentet i TRB har separate eksoner som koder for konstant domene, connecting peptide, transmembran region og cytoplasmisk region. Det som

er spesielt med TRD er at det er innebygd i α -kjeden, mellom V_α og J_α , og det gjelder for alle pattedyr. TRD inneholder tre D_δ , tre J_δ , og ett C_δ -gen. Antallet V_δ -gener er usikkert, men det er minst fire og disse ligger spredt omkring innimellom V_α . TRG-locuset i mennesker er orientert i motsatt retning. Locuset består av 12–15 V-gener, oppstrøms for en duplikert J–C-kassett som i første del består av tre J-gener og ett C1-gen, og den andre delen består av to J-gener og et C2-gen (Forster, Huck, Ghanem, Lefranc, & Rabbitts, 1987; M. P. Lefranc & Rabbitts, 1990; M. P. Lefranc & Rabbitts, 1985). Alle J- og C-genene i mennesker er funksjonelle og blir uttrykket, men for J-genene blir kun fire til seks av dem uttrykket. (M. Lefranc, 2000; M.-P. Lefranc, 2006).



Figur 2. Menneskets organisering av V-, J-, D- og C-gener i de forskjellige TR-kjedene. Figuren viser at D-kjeden er lokalisert mellom V- og J-genene i A-kjeden. V-gener er markert i mørkeblått, D i mørkegrønt, J i lysegrønt, C i lyseblått, og L i hvit. Tallet over boksene forteller antallet av hvert gen.

1.7 Analyser av immunrepertoaret

Med immunrepertoar menes summen av alle TR og BR som til sammen utgjør det adaptive immunsystemet i en organisme. Grunnen til at man analyserer immunrepertoaret er at det forandrer seg i et sykdomsforløp. Med immunrepertoaranalyser kan man beskrive hvilke lymfocyttopulasjoner som aktiveres og engasjeres under en immunrespons, og dermed bidra til å oppnå større forståelse for immunforsvarets ulike egenskaper.

Utfordringen med å analysere immunrepertoar er den enorme diversiteten. Hvis man teoretisk beregner antallet ulike VDJ-rekombinasjoner vil det generere mellom 10^{15} og 10^{20} ulike TCR-

klonotyper hos mennesker (Laydon, Bangham, & Asquith, 2015; Rosati et al., 2017). Det faktiske antallet er langt mindre fordi det er estimert at mennesket inneholder 10^{13} T-celler (Bianconi et al., 2013). Vi skiller mellom TCR som er vanlige hos majoriteten blant folk som kalles «public», og de som er unike som kalles «private». Paradoksalt nok har nylige studier bevist at majoriteten av TCR er unike (Warren, 2011 #130) (Freeman, 2009 #129). Det forteller at det er svært viktig med nøyaktige metoder for å undersøke et komplett individuelt immunrepertoar.

Metodene for TCR-sekvensering grupperes i to: bulksekvensering av immuncellepopulasjoner og analyse på enkeltcellenivå. Førstnevnte er mer vanlig når formålet er å studere TCR-diversiteten og sammenlikne repertoarer i større samlinger. I prinsippet finnes det tre bulksekvenserings-metoder for å lage bibliotekanalyser av TCR-kjeder. De tre metodene heter Multiplex PCR, target enrichment og 5'RACE (Rosati et al., 2017). Multiplex PCR går ut på at primere for J-alleler eller primere fra den konstante regionen i TCR- α og β -kjedene tilsettes i en miks av primere for kjente V-alleler (Okino, 2016 #122). Det fører til en spesifikk amplifisering av CDR3-regionen fra TCR-transkriptet. «Target enrichment» eller målrettet berikelse går ut på å bruke oligonukleotider som er komplementære til den sekvensen man er interessert i (Kozarewa, 2015 #123). Oligonukleotidene vil hybridisere med de riktige gDNA/cDNA-sekvensene i biblioteket, før de fanges opp ved hjelp av magnetiske kuler. Dermed er sekvensene klare for ytterligere amplifisering før sekvensering. 5'RACE er ansett som gullstandarden innenfor bulksekvensering (Rosati et al., 2017). Prinsippet for denne metoden er at under cDNA-syntese, bytter revers transcriptase enzymet templat fra RNA-et til en kjent oligonukleotid sekvens (Matz, 1999 #126). På den måten inkluderes hele mRNA-tråden med 5'-enden i cDNA-syntesen. For analysen kan man velge om man vil levere prøven til et eksternt firma som spesialisere seg på repertoaranalyser eller gjøre det internt på et ikke-spesialisert laboratorium, m.a.o. gjøre det selv. En vanlig måte å gå frem på er å bruke et kommersielt sett for å forberede biblioteket med gensekvenser, og deretter sende det inn til et spesialisert firma som gjør «deep sequencing» (dybdesekvenseringen). Det finnes en rekke forskjellige verktøy og strategier for dataanalyse av immunrepertoar. Et vanlig trinn i analyseringen er å kalkulere fordelingen av V- og J-gener fra ulike prøver eller datasett.

1.8 T-celler hos fisk

I likhet med pattedyr utvikles T-cellene hos fisk i thymus før de migrerer til sekundære lymfoide organer som hodenyre og milt (Nakanishi og Shibasaki, 2015). TRA- og TRB-kjeder ble først identifisert i regnbueørret i 1994 (S. Partula, Fellah, de Guerra, & Charlemagne, 1994) og 1996 (Sylvie Partula, de Guerra, Fellah, & Charlemagne, 1996). Siden den gang har cDNA fra TR blitt rapportert i mange andre teleoster, f.eks. i atlantisk laks (Hordvik, Torvund, Moore, & Endresen, 2004) (Yazawa et al., 2008), atlantehavstorsk (Wermenstam & Pilström, 2001), havabbor (Buonocore et al., 2012), sebrafisk (Haire, Rast, Litman, & Litman, 2000; Meeker et al., 2010), gyllen havkaruss (Randelli et al., 2008), japansk flyndre (Nam, Hirono, & Aoki, 2003), piggvar (Taylor et al., 2005), kanalmalle (Wilson et al., 1998) (Zhou, Bengtén, Miller, Clem, & Wilson, 2003), grønn kulefisk (Fischer et al., 2002), maller (Karsi & Waldbieser, 2004) og *Stegastes partitus*² (Kamper & McKinney, 2002).

I tillegg er mange koreseptorer og cytokiner identifisert. CD8 α og CD8 β er karakterisert i flere «ekte beinfisk» (*teleostei*) som regnbueørret (Hansen & Strassburger, 2000), atlantisk laks (L. Moore, Somamoto, Lie, Dijkstra, & Hordvik, 2005), fugu (Suetake et al., 2007), karpe (Somamoto, Yoshiura, Nakanishi, & Ototake, 2005), atlantisk kveite (Patel, Øvergård, & Nerland, 2008) og havabbor (Buonocore et al., 2006). Det er rapportert at CD8 er høyere uttrykket i thymus og lavere i milt, nyre, tarm og blant blodleukocytter (Hansen & Strassburger, 2000). To typer CD4-molekyler er beskrevet i flere fiskearter, inkludert atlantisk laks: CD4-1 og CD4-2 (L. J. Moore, Dijkstra, Koppang, & Hordvik, 2009). Man har også funnet ortologer av cytokinene IL (interleukin)-2, IL-10, IL-12, IL-18, IFN α , IFN γ og IL-17 som er kjent for å fremme differensiering og effektorfunksjoner til Th1- og Th17-celler (Secombes, 2008) (Díaz-Rosales et al., 2009). Studiene tyder på at fisk, i likhet med pattedyr, også har CTLs og Th-celler og at de responderer på forskjellige måter (Yamaguchi et al. 2019). Problemet er at det fortsatt gjort svært få funksjonelle studier som beviser dette. Heretter forkortes atlantisk laks til kun laks.

Boudinot et al. (Boudinot, Boubekeur, & Benmansour, 2001) demonstrerte den direkte $\alpha\beta$ T-celleresponsen mot viral hemoragisk septikemivirus (VHSV). For å studere modifiseringer i T-cellerepertoaret underveis i en akutt virusinfeksjon i regnbueørret gjorde de spectratyping av CD3-regionen til TCR β -kjeden. De demonstrerte at regnbueørret har et polyklonalt og svært

² *Stegastes partitus* er ikke tildelt et norsk navn, men heter «bicolor damselfish» på engelsk.

mangfoldig naivt T-celle repertoar. Videre identifiserte de CD3-regionprofilene for flere kloner med $V\beta 4J\beta 1$ etter indusering med akutt VHSV-infeksjon. Det betød at det foregikk en ekspansjon av disse T-celleklonene under den primære og den sekundære responsen. De kunne også konkludere med at responsen var offentlig (public) da de observerte ekspansjonen hos samtlige individer. I tillegg var den påfølgende sekundærresponsen betydelig sterkere.

Det er svært få fisk der TR-locuset er blitt analysert og enda færre som i tillegg har analysert TR-repertoaret. Nylig publiserte Edholm et al. (2021) en artikkel om grunnleggende kartlegging og beskrivelse av TR-locuset til TRA/D i laks og de to stammene av regnbueørret: Arlee og Swanson. I likhet med andre virveldyr har laks sammenkoblede TRA- og TRD-gener som er konserverte på et locus. Artikkelen gjør rede for en omfattende og komplett TR-repertoaranalyse av de funksjonelle TRA/D. Kartleggingen sørger for bedre forståelse av mønsteret i uttrykket av TR-isotyper som finnes blant fisk og andre virveldyr. Hensikten er på sikt å etablere et felles nomenklatur for TR-gener. 128 TRAJ-gener i TRA/D-locuset ble identifisert i laks, og majoriteten hadde liknende tilsvarende gener i regnbueørret. Organiseringen av TRA/D-locuset er likt, men det er stor forskjell i antallet TRAV-gener. atlantisk laks har 239 TRAV mens regnbueørret kun har 163 (stamme: Arlee). Denne forskjellen er på grunn av større antall pseudogener i laks. Analyse av funksjonelle gener førte til bestemmelse av 25 undergrupper som er felles for begge artene. En subgruppe defineres ved å ha større enn 75 prosent nukleotididentitet, dermed blir alle gener med mer enn 75 prosent identitet plassert i en subgruppe. Regnbueørret hadde bare én enkelt gruppe som ikke ble funnet i laks, noe som støtter teorien om konservering av TRA/D-repertoar på kryss av ulike laksefisk. Videre indikerte analyse av TRA-repertoaret at de fleste TRAV-subgruppene uttrykkes på mucosalt og systemisk nivå, men hvilke TRV-gener som brukes av TRDC er fortsatt en uløst gåte.

1.9 $\gamma\delta$ T-celler i fisk

Per i dag er genomisk organisering av TRG identifisert og karakterisert i laks (Yazawa et al., 2008), havabbor (Buonocore et al., 2012), kanalmalle (Moulana et al., 2014), og i sebrafisk (Wan et al., 2017). Så vidt vi vet er det siste og eneste som er publisert om TRG-repertoar i laks en artikkel fra 2008 som beskrev en komplett karakterisering og kartlegging av TRG-locus (Yazawa et al., 2008). De kom blant annet frem til at TRG-genene ligger på to ulike locus. Konklusjonen i artikkelen var at identifisering og karakterisering av det funksjonelle TRG-

locus sammen med assosiert TRA/D-locus ga indikasjoner for at laks har funksjonelle $\gamma\delta$ T-celler. Videre at det første locuset har en rekkevidde på 260 kilobasepar (kbp) og inneholder 4 kassetter som består av 1–4 V-gener, 1–2 J-gener og 1 C-gen. Totalt fant de 10 V-gener, 5 J-gener og 5 C-gener. I det andre locuset bestående av totalt 409 kbp fant de én kassett med V-J-C som ikke var uttrykket. Noe som skiller TRG i fisk fra mennesker er at det består av 6 C-gener (ifølge Yazawa et al. 2008), mens mennesker kun har to.

Wan et al. (Wan et al., 2017) publiserte den første studien som demonstrerte $\gamma\delta$ T-cellers funksjonelle rolle i fisk. De beskrev $\gamma\delta$ T-celler i sebrafisk og sørget med det for en oversikt over cellenes rolle i adaptiv humoral immunitet. De fant at $\gamma\delta$ T-celler i sebrafisk utgjør mellom 7,7–20,5 prosent av det totale antallet lymfocytter i milt, hodenyre, perifert blod, hud, gjeller og tarmvev. Resultatene indikerer at $\gamma\delta$ T-celler har vært til stede siden utviklingen av *teleostei* (ekte beinfisk), og bidrar på den måten med verdifulle innsikter om evolusjonen av T-celler. Angående T-celler i fisk er det mye vi ikke vet om hvordan de blir involvert ved virussykdommer. Nyere funn tyder på at $\gamma\delta$ T-celler kan være en kobling mellom det medfødte og det adaptive systemet, og det kan muligens foregå på flere vis. Det er rapportert at $\gamma\delta$ T-celler kan virke som antigenpresenterende celler (APC), som dermed kan aktivere CD4⁺ T-celler (Wan et al., 2017). En annen teori er at $\gamma\delta$ T-celler kan bruke TCRs som PRRs (mønster-gjenkjenningsreseptorer), men det er foreløpig bare diskutert i menneskelige $\gamma\delta$ T-celler (Holtmeier & Kabelitz, 2005).

1.10 Hjerte- og skjelettmuskelbetennelse

Hjerte- og skjelettmuskelbetennelse (HSMB) forårsakes av *Piscine orthoreovirus* (PRV). Sykdommen ble oppdaget i Norge i 1999, men viruset ble ikke identifisert før i 2010 da man beviste sammenhengen mellom PRV og HSMB (Palacios et al., 2010). I 2017 ble det bevist at det er kun PRV-1 som forårsaker HSMB (Wessel et al., 2017). Viruset er nakent, med icosahedral struktur og inneholder segmentert dobbeltrådet RNA.

Det finnes tre genotyper av viruset: PRV-1, PRV-2 og PRV-3. PRV-1 er den vanligste og den som er utbredt i laks i Norge. PRV-1 er også påvist i Canadisk oppdrett, men det er kun i sjeldne tilfeller at man har sett HSMB. Genotypen PRV-2 er ikke påvist i Norge og infiserer Coho-laks (*Oncorhynchus kisutch*) i Japan. PRV-3 har muligens brunørret (sjørørret, *Salmo trutta*) som sin naturlige hovedvert (Garseth et al., 2019), men man har bare klart å påvise viruset i oppdrettet

regnbueørret (*Oncorhynchus mykiss*) (Vendramin et al., 2019). Sekvenssammenstilling av nukleotidene viser at PRV-2 er 80 prosent identisk, og PRV-3 er 89 prosent identisk med PRV-1 (Dhamotharan et al., 2018).

Sykdomstegn på PRV-1 kan være letargisk og anorektisk fisk. Histopatologiske forandringer er inflammasjonsforandringer av mild til alvorlig grad i kompakt og spongiøst lag i myokardet, samt milde tegn på inflammasjon i rød skjelleltmuskel (Dhamotharan et al., 2018). Det er fortsatt usikkerhet knyttet til hvilken infeksjonsvei PRV-1 benytter, men et eksperiment (Hauge et al., 2016) viser at PRV-1 kan angripe via tarmkanalen, i likhet med beslektede orthoreoviruser i pattedyr. Deretter skjer en massiv infeksjon av erythrocytter og høy andel virus i plasma (Wessel, Olsen, Rimstad, & Dahle, 2015). Videre infiserer viruset kardiomyocytter, som trolig inducerer en inflammatorisk respons med CD8⁺ T-celler i hjertet (Mikalsen, Haugland, Rode, Solbakk, & Evensen, 2012, Johansen, 2015 #16). PRV-3 assosieres med inflammasjon i hjertet og anemi (Olsen, Hjortaa, Tengs, Hellberg, & Johansen, 2015; Vendramin et al., 2019). In-vitro studier har vist at PRV-3 studier kan infisere laks, men at det ikke inducerer HSMB.

HSMB forårsaket av PRV-1 medfører normalt moderat dødelighet og kan i alvorlige tilfeller medføre dødelighet på opptil 20 prosent. Fordi sykdommen er så utbredt, utgjør den et stort problem for fiskeoppdrettsnæringen. Effektene av vedvarende infeksjon er diskutert, men sykdommen assosieres med en økning av melaninflekker i skjelettmuskel (Bjørger et al., 2015), hvilket utgjør et kvalitetsproblem for næringen. Det bør nevnes at denne assosiasjonen er kontroversiell, ettersom flere andre studier ikke viser sammenheng med økt mengde melaninflekker.

1.11 PRV-3 inducerer beskyttelse mot PRV-1

En nylig studie fra Veterinærinstituttet, Norges miljø- og biovitenskapelige universitet (NMBU) og Norges arktiske universitet (UiT) (Malik et al., 2021) undersøkte om PRV-3, PRV-2-virus eller en inaktivert PRV-1- (InPRV-1) variant kunne inducere en beskyttende respons mot PRV-1. Dette ble gjort for å undersøke hvilke immunmekanismer som forårsaker beskyttelse. De kom frem til at PRV-3-infeksjon i laks blokkerte sekundær infeksjon med PRV-1, mens PRV-2 og den inaktiverte PRV-1-varianten ga liten til ingen beskyttelse (Malik et al., 2021).

Når et individ får en primær infeksjon med virus av en genotype, danner individet antistoffer mot de spesifikke antigenene for denne genotypen. Dersom de samme antistoffene responderer når individet får en ny virusinfeksjon med liknende genotype, kalles de for kryssbeskyttende antistoffer. I denne studien ble $\sigma 1$ som er et ytre spikeprotein, og det ytre kapsidprotein $\mu 1c$ hos PRV-viruset brukt til å teste spesifikke og uspesifikke kryssbeskyttende antistoffer. Begge disse proteinene virker som antigener hos viruset. Den positive kontrollgruppen som fikk PRV-1 i uke 0, viste produksjon av uspesifikke og spesifikke antistoffene rettet mot $\sigma 1$ og $\mu 1c$ (målt i uke 12–18). Gruppen som ble immunisert med PRV-2 fikk høyere PRV-1 antistoffproduksjon og de som fikk inaktivert PRV-1 fikk noe lavere. I fisk immunisert med PRV-3 ble antistoffnivået redusert etter ny infeksjon med PRV-1, men siden det ble observert at fisken var beskyttet kom disse antistoffene mest sannsynlig fra den første infeksjonen med PRV-3. Dette indikerer at de kryssbeskyttende antistoffene kan være medvirkende til immunitet, men kan ikke forklare den observerte beskyttelsen alene. Andre mekanismer er også involvert.

For å undersøke om cellulære cytotoksiske mekanismer ble aktivert etter eksponering for de ulike subtypene (PRV-1, PRV-2, PRV-3, InPRV-1) så de på genmarkørene CD8 α , IFN γ og granzyme A. I tillegg ble genmarkørene viperin, myxovirus resistans-gen og interferon-stimulert-gen brukt for å undersøke medfødte interferon-medierte antivirale responser. Resultatet viste at PRV-1-infeksjon induserte både cellulære- og medfødte immunresponser, mens PRV-2, PRV-3 og InPRV-1 viste ingen til liten induksjon av de valgte genmarkørene.

I studien fra Veterinærinstituttet (Malik et al., 2021) klarte de ikke å finne alle svar på hvordan PRV-3 induserte immunitet mot PRV-1. Data viser at PRV-3-infeksjon blokkerer PRV-1-infeksjon fullstendig, men hvordan er et uløst mysterie. Trolig er T-celler involvert i immunresponsen. Kanskje er cellulær immunitet nøkkelen til beskyttelse, spesielt ukonvensjonelle T-celler som er lite studert. Antageligvis er en form for hukommelsesfunksjon hos B- og/eller T-cellene også noe av det som bidrar til immunitet.

De aller fleste tidligere studier innenfor immunologi hos fisk har studert medfødte- og humorale (B-celler) responser, derfor er det store kunnskapshull når det kommer til T-celleimmunitet. Det er vist at PRV-1 fører til en sterk medfødt antiviral respons i infiserte erytrocytter. Analyser av genuttrykket indikerer at både humorale- og cellulære responser aktiveres, og det er vist at infiserte fisk produserer spesifikke antistoffer mot det ytre spike-proteinet $\sigma 1$ hos PRV (Teige et al., 2017). Siden det allerede er bevist at PRV-1 medfører cellulære T-celleresponser, er det passende å bruke PRV for å studere responser hos T-celler ytterligere.

1.12 Formålet med oppgaven

Hovedformålet med oppgaven er å karakterisere TRG/D i laks. Først vil jeg kartlegge TRG-locus i ulike arter i laksefamilien og analysere gensekvensene. Deretter vil jeg gjøre en dybdeanalyse av TRD-locus i laks. Til slutt vil jeg undersøke responsen hos TRG i ulike organer ved en virusinfeksjon.

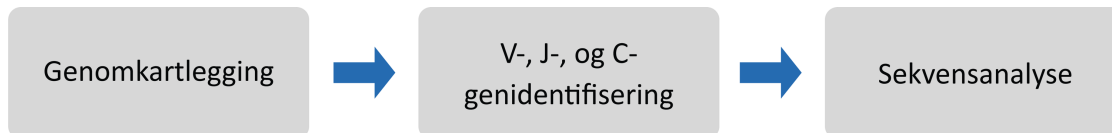
Delmål:

- Kartlegge og gjøre en komparativ analyse av TRG-locuset i laks og regnbueørret
- Identifisere TRG-gener i andre representative arter innenfor laksefamilien (arktisk røye, donaulaks, sik og harr)
- Identifisere T-cellereseptorer sekvenser for gamma (konstante, variable og joining)-gener, og sende inn disse til IMGT for universell og standardisert nomenklatur.
- Undersøke om ulike TCR gamma brukes i ulik frekvens og ulike vev og/eller organer, gjennom analysering av T-cellereseptor gamma i frisk fisk
- Undersøke om ulike TCR-genene induseres i ulik grad etter infeksjon med PRV-1, PRV-2 og PRV-3, og undersøke hypotesen om TCR gamma muligens har noe å gjøre med PRV-3 induisert beskyttelse mot PRV-1.
- Definere hvilke TRV som er identifisert i TRA/D-locus som blir rearrangert til TCR delta-kjeden og i hvilken frekvens TRV-genene brukes.

2 Materialer og metode

Liste over reagenser som er benyttet er oppgitt i Vedlegg 1.

2.1 Kartlegging av TRG-loci



Figur 3. Oversikt over metoder vist steg for steg for kartlegging av TRG-loci.

I denne studien blir TRG-loci fra fem representative arter i laksefamilien (*Salmonidae*) undersøkt. Følgende syv genomsamlinger tilgjengelige via NCBI sin webside (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>) ble brukt til kartleggingen:

- atlantisk laks (*Salmo salar*, ICSASG_v2; GenBank GCA_000233375.4, isolat Sally, hunnkjønn, genotype: dobbel haploid)
- regnbueørret (*Oncorhynchus mykiss*, USDA_OmykA_1.1; GenBank GCA_013265735.3, isolat Arlee, hankjønn)
- arktisk røye (*Salvelinus sp.* ASM291031v2; GenBank GCA_002910315.2, isolat IW2-2015³)
- donaulaks (*Hucho hucho*, ASM331708v1; GenBank GCA_003317085, isolat haploid_2015_munich)
- sik (*Coregonus sp.*, AWG_v2; GenBank GCA_902810595.1, villfanget Coregonus sp. “Balchen” fra Lake Thun)
- harr (*Thymallus thymallus*, ASM434828v1; GenBank GCA_004348285.1, isolat TTM2012, hankjønn)

Tidligere publiserte TRGV-, TRGJ- og TRGC-sekvenser fra laks (Yazawa et al., 2008) ble brukt i søkeverktøyet BLASTn for å identifisere tilsvarende gener i respektive genomsamlinger nevnt over (lokaliseringen av spesifikke gener identifisert i ulike genom er listet i Vedlegg 3). BLASTn er en algoritme som brukes i bioinformatikk for å søke i

³ Opprinnelsen til *Salvelinus* genomet i NCBI nå annotert *Salvelinus*, er potensielt *Salvelinus malma malma* og ikke *Salvelinus alpinus*. (Shedko, 2019 #112)

nukleotiddatabaser ved å bruke kjente nukleotidsekvenser som identifiserer liknende sekvenser. Funn fra BLASTn-søk ble sortert etter posisjonen i det respektive loci og deretter eksaminert, og nye TRG-gener som ble identifisert i det første søket ble kompilert inn i databasen og brukt som «søkeord» i det andre BLASTn-søket. Til slutt ble sorteringsprosessen repetert inntil det ikke var mulig å finne flere nye sekvenser. Verktøyet BLASTn med innstillingen «somewhat similar sequences» ble brukt for å sørge for at vi fant alle TRG-sekvensene i de ulike artene. I tillegg til TRG-sekvenser ble flankerende og mellomliggende gener identifisert ved hjelp av NCBI-verktøyet for eukaryotisk genprediksjon «Gnomon» som gjør en automatisert dataanalyse av genene. I laks ble TRG-gener funnet på kromosom 20 (CM003298.1), i regnbueørret på kromosom 11 (NC_048575.1), i sik på kromosom 18 (LR778270.1), og i harr på kromosom 13B (CM014997.1). For arktisk røye og donaulaks er kromosomet foreløpig ikke annotert, og derfor er TRG-genene foreløpig lokalisert på ulike «scaffolds⁴». For å identifisere variable- (V) og joining- (J)gener er rekombinante signalsekvenser (RSS) manuelt identifisert. For V-gener ble RSS definert som en heptamer (CACAGTG) og en nonamer (CAGAAAACT) som er separert av en 22 bp spacer⁵ (CACAGTGACAACTGCAGTTCACTCCCTGTGCAGAAAACT). For J-gener ble RSS definert som en nonamer og en heptamer som er separert av en 12 bp spacer (ACTTTTTGTCAAGGGAATTTTCACTGTG).

2.2 Sekvensanalyser og regelverk for nomenklatur

Når TRGV-, TRGJ- og TRGC-nukleotidsekvensene ble funnet ved å bruke BLASTn-algoritmen ble de oversatt til aminosyrer ved hjelp av oversettelsesverktøyet ExPasy (<https://web.expasy.org/translate/>). Deretter ble nukleotidssekvensene og aminosyresekvensene sammenliknet ved hjelp av programmet i Clustal Omega (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>). Ved å se på sammenlikningen av de oversatte

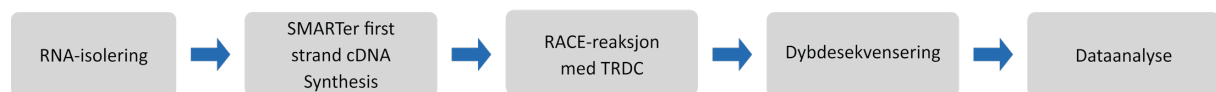
⁴ Scaffold er en genomsekvens som er satt sammen av flere mindre kjente sekvenser, og delvis ukjente regioner. Et kromosom kan representeres av flere scaffolds.

⁵ Spacer er en mellomliggende region i DNAet som ikke koder for noe.

aminosyrene kunne de to typiske TRV-aminosyrene Cystein (CYS-23 og CYS-104) og Tryptofan (TRY-41) defineres.

TRGV- og TRGJ-gener klassifiseres som funksjonelle (F) hvis koderegionen har en åpen leseramme, én konserverv RS-sekvens, og presenterer konserverte nøkkelaminosyrer som CYS-23, CYS-104 og TRY-41. Gener med stoppkodon eller leseramme-mutasjoner innenfor koderegionen ble definert som pseudogener (Ps). Alle identifiserte TRG-gener er kompilert og skal sendes inn til *International immunogenetics (IMGT) information system* (<https://www.imgt.org/>)- for ny navngivning og klassifisering av subgrupper i henhold til standardiserte regler for TR-gener (Lefranc, 2001 #127). IMGT er ansvarlig for å navngi gener og alleler for immunoglobuliner (Ig) eller antistoffer og TRs for alle virveldyr med kjeve.

2.3 TRD- 5' RACE



Figur 4. Trinnsvis oversikt over metodene som ble brukt til repertoaranalyse av TRD-locus.

Rapid Amplification of cDNA Ends (RACE) (Adams, 2020 #1)-metoden gjør det mulig å generere komplett cDNA basert på en enkel genspesifikk primer. I denne studien benyttes SMARTer RACE 5'/3' Kit fra Takara Bio USA, Inc (katalognr. 634860) for å amplifisere alle mulige TRDV-J-C- rearrangeringer ved å bruke en reversprimer for TRDC. Forskjellen på first strand cDNA-syntese for RACE og vanlig cDNA-syntese er at man i forkant av cDNA-syntesen legger til en kjent sekvens (som kalles SMARTer II A Oligonucleotide) som binder til 5'-enden av mRNA-et. Ved first strand cDNA-syntese binder 5'-CDS Primer A til poly-A-halen på 3'-enden av mRNA-et og transkriberer hele mRNA-et inklusiv SMARTer II A Oligonucleotide-sekvensen hvilket resulterer i «RACE klart cDNA».

RACE-reaksjon ble utført i henhold til protokoll fra produsenten og reaksjon ble utført for følgende prøver: hodenyre, gjeller og tarm fra uvaksinert laks (presmolt) fra NLA-stammen som er avlet opp ved klekkeriet på forskningsstasjonen i Kårvika i Troms i Norge. Alle individer testet negativt for patogenene ILAV, SAV, PRV og IPNV ved qPCR. Først ble totalt ti fisk analysert for TRDC-uttrykk og tre fisk ble valgt ut på bakgrunn av at de fikk de laveste

Ct-verdiene ved qPCR med primere mot TRDC. Det ble brukt 0,75 μ g totalt RNA per reaksjon. Før RACE-reaksjonen ble RACE-klart cDNA fortynnet ved tilsetning av 10 μ l trisane-EDTA, og 2,5 μ l med fortynnet RT-produkt som ble brukt i PCR-analyse, i henhold til produsentens protokoll. For å få spesifikk amplifikasjon av TRD-kjeder ble det brukt en spesifikk reversprimer (5'GATTACGCCAAGCTTCACTCTTGTGTAGTGGGGTGAGGATG-3'), for sekvensen ved 5'-enden i TRD sin konstante region.

PCR-syklus ble satt på følgende program: fem sykluser på 94 °C i 30 sek og 72 °C i 2 min; fem sykluser på 94 °C i 30 sek, 70 °C i 30 sek og 72 °C i 2 min; 25 sykluser på 94 °C i 30 sek, 68 °C i 30 sek, og 72 °C i 2 min; og til slutt 72 °C i 10 min. Deretter ble PCR-prøven kjørt gjennom 1,2 % agarose/EtBr gel og resulterende singelbånd ved 750 bp ble ekstrahert og rensset fra gelen ved å bruke NucleoSpin gel og PCR clean-Up Kit (Macherey-Nagel, kat.nr. 740609.10).

Neste steg var å levere de gel-purifiserte prøvene til Genomics Support Center (GSC, UiT) der prøvene til slutt ble bearbeidet. Det er brukt et Qubit-fluorometer 3.0 (Invitrogen) til å kvantifisere mengden DNA som ble benyttet for å lage biblioteker. Biblioteker ble opparbeidet ved hjelp av Nextera XT DNA Sample Preparation Kit (Illumina Inc., San Diego, CA, USA), etter standard protokoll. Hvert bibliotek ble kvalitetssjekket med Agilent 2100 Bioanalyzer (automatisert elektroforeseverktøy). Før sammenslåing og sekvensering ble bibliotekene kvantifisert med PCR ved hjelp av KAPA Library Quantification Kits, etter protokoll fra produsenten. Bibliotekene ble satt sammen (4nM) og fortynnet til 1.8 pM og deretter ble DNA-ender parett sammen ved å bruke Illumina Next Seq550 platform og 300 syklus run chemistry.

2.4 Rådataprosessering og TRD-repertoaranalyse

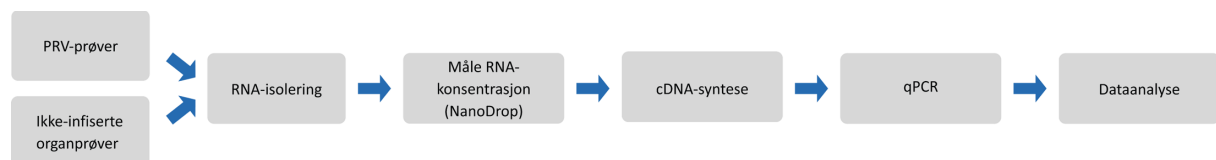
Rådataprosessering av TRD-RACE sekvenser ble gjort av Dr. Christopher Graham Fenton fra GSCT ved UiT.

Illumina-sekvenser (både fremover- og reverssekvenser) ble fusjonert ved hjelp av programvaren Flash, for å produsere komplette FASTA-sekvenser. Dette kan beskrives ved å sette på en strekkode (barcode) på 3'- og 5'-ender på sekvensen. Flashprogramvaren kan håndtere maksimum 300 bp lange sekvenser, men disse var ca. 700 bp lange, derfor brukes en merkelapp for å se hvor sekvensen starter og slutter, og for å dermed unngå overlapping når

sekvensene fusjoneres. Kun sekvenser som totalt ble større enn 150 basepar ble vurdert. Dette for å sikre at de korrekte regionene ble inkludert, og at de hadde tilstrekkelig sekvensinformasjon for å kunne skille mellom ulike J- og V-gensekvenser. Den delen som er amplifisert av 5' TRDC-RACE-primer, består av 30 bp i C-regionen, 70-80 bp i J-regionen, og 300-360 bp i V-regionen. Ved hjelp av seqkit-programvare (Shen, Le, Li, & Hu, 2016) ble alle sekvenser navngitt med respektivt prøvenavn. Deretter ble sekvensene samlet i en stor fasta-fil før den ble brukt til å konstruere en lokal blast-database. TRA/D- C-region-, J-region- og V-regionsekvenser som er identifisert, kartlagt og analysert i en tidligere studie (Edholm et al. 2021 #19) ble brukt som søkeord i den lokale blast-databasen. Kun sekvenser som hadde 97 % eller høyere identitet ble ansett som gyldige C-, J- eller V-funn. Resulterende filer for C, J og V ble lastet opp i et R-dataprogramvare. De sekvensene som oppfylte følgende kriterier, ble godkjent: 99 % treff til 30 bp C-regionen, en komplett J-region med større identitet enn 98 %, og en V-region med identitet minimum 98 % og minimum 50 bp lang.

Gjenstående V- og J-blast-treff ble sortert og duplikat-funn (dvs. sekvenser som møtte de ovennevnte kriteriene mer enn én gang per TRV-søkeord) ble fjernet. De gjenstående gyldige sekvensene inneholder en C-region, en J-region og en V-region som møter de ovennevnte kriteriene. De utvidede og navngitte fasta-sekvensene kan hentes fra «blast_ids». Hver sekvens ble oversatt i alle seks leserammer for å definere produktive og uproduktive sekvenser. Produktive sekvenser er de som er funksjonelle, og uproduktive er dysfunksjonelle som følge av avbrutte leserammer eller stoppkodon.

2.5 PRV-eksperiment



Figur 5. Oversikt over metodene vist steg for steg for PRV-forsøket og prøver som ble brukt til testing av det basale uttrykket av ulike TRG-gener.

Prøvene i forsøket er tatt på Havbruksstasjonen i Kårvika, og kommer fra et tidligere eksperiment utført i samarbeid med Norges miljø- og biovitenskaplige universitet (NMBU), Veterinærinstituttet og Norges arktiske universitet (UiT) (Malik et al., 2021) som er godkjent

av Mattilsynet, og er utført i henhold til gjeldende lovgivning om bruk av forsøksdyr (1996-01-15-23). Studien hadde tre testgrupper: PRV-2, PRV-3 og InPRV-1. I tillegg var det en kontrollgruppe uten virus (mock) og en positiv kontrollgruppe som fikk PRV-1. Det ble tatt ut prøver fra uke 5 og uke 10. Etter prøvetaking i uke 10, ble det tilsatt PRV-1 smittsom fisk til gjenværende individer i gruppene med PRV-2, PRV-3, InPRV-1 og halvparten av mock-gruppen. Til slutt ble det tatt nye prøver i uke 15.

I motsetning til for eksempel SAV (*Salmonid alpha virus*) finnes det ingen metode for å dyrke PRV i laboratorium, derfor ble det brukt blodceller isolert fra PRV-infisert fisk som infeksjonsmateriale. PRV-1-infeksjonsmaterialet kommer fra en laks fra et tidligere eksperimentelt forsøk (Wessel et al., 2017) som brukte virusstammen (PRV-1 NOR2012-V3621). Denne virusstammen kommer opprinnelig fra et HSMB-utbrudd fra regnbueørret i Midt-Norge i 2012. PRV-3-infeksjonsmaterialet kommer fra blodceller isolert fra et utbrudd i 2014 (PRV-3 NOR2014 (Olsen, 2015 #22)). PRV-2-infeksjonsmaterialet kommer opprinnelig fra milt fra Coho-laks (*Oncorhynchus kisutch*) (Takano et al., 2016). Den inaktiverede PRV-varianten (InPRV-1) kommer fra en batch med PRV-1-viruspartikler (PRV-1 NOR2012) utført av PHARMAQ AS. Dette virusmaterialet ble inaktivert med formalin og tilsatt i en løsning av vann og olje, der vann som inneholder PRV-antigener, ble tilsatt i en mineralolje med emulgatorer og stabilisatorer. De negative kontrollprøvene kommer fra blodcellelysat fra et eksperimentelt forsøk med frisk laks.

2.6 Isolering av RNA

RNA ble isolert ved hjelp av Rneasy mini Kit fra Qiagen (katalog nr. 74104). Det ble brukt RNA isolert fra parr fra hodenyre, milt, gjeller, thymus og tarm. I tillegg RNA fra lever, baknyre, midnyre og hud, men qPCR av disse resulterte i høye Ct-verdier for elongeringsfaktoren som indikerte at cDNA-et (eller alternative RNA-prøver) var av for dårlig kvalitet. Dermed ble ikke de prøvene brukt videre. I denne var PRV-infisert RNA fra milt og hjerte isolert på forhånd og lagret i -80 C°.

1 ml Quiagen cellelyseringsbuffer (RLT buffer, Qiagen, kat.nr. 74106) inneholdende 10 µl β-mercaptoethanol ble tilsatt vevsprøvene før homogenisering i TissueLyser. Videre ble prøvene overført til Rneasy spin kolonne der RNA-isolering ble utført i henhold til protokollen hvor det

trinnvis ble tilsatt etanol, vaskebuffer (Buffer RW1) og til slutt eluering med RNase- og DNase-fritt vann.

RNA-prøver ble oppbevart ved $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ frem til neste trinn. Før fortsettelse til DNase-behandling og cDNA-syntese, ble RNA-konsentrasjon og -kvalitet vurdert med Nano Drop ND-1000 spektrofotometer (Thermo Fisher Scientific). RNA-prøvene som ble brukt til å teste basaluttrykket av ulike TRG var isolert på forhånd (Svenning, 2019 #128), og lagret i $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Disse prøvene var ble også vurdert med Nano Drop ND-1000 spektrofotometer (Thermo Fisher Scientific) for å sjekke at RNA-et ikke hadde degradert . RNA-konsentrasjonene varierte fra 90 til 1000 ng/uL.

2.7 Behandling med DNase og syntese av cDNA

I forkant av selve cDNA-syntesen gjør man en behandling med DNase for å fjerne genomisk DNA (gDNA). Fjerning av gDNA gjøres ved å tilsette én enhet av endonuklease-enzym (Thermo Scientific DNase I, Rnase-Free, katalognr. EN0521) per 1 µg RNA. Etter tilsetning av DNase I og DNase-buffer (katalog nr. B43) til RNA-et i et totalt volum på 10 µl RNA-et ble prøvene inkubert i 37 °C i 30 min. Etter inkubering må DNase-enzymet inaktiveres, dette ble utført ved å tilsette 1 µl 50 mM EDTA etterfulgt av 10 minutter inkubering i 65 °C. DNase-behandlet RNA ble reverstranskribert til cDNA ved å bruke MultiScribe Reverse Transcriptase (Invitrogen, katalognr. 8080234), og random hexamers (katalognr. 8080234). Reverstranskripsjon består av tre hovedtrinn: primerbinding (annealing), DNA-polymerisasjon og enzymdeaktivering. Inkubering gjøres på følgende program: 25 °C i 10 min, 37 °C i 30 min, 95 °C i 5 min i Thermal Cycler 2720 (Applied Biosystems). Utvalgte prøver fra hvert cDNA ble behandlet som negative reverstranskriptase (RT)-kontroller og fikk dermed Rnase-fritt vann i stedet for reverstranskriptase-enzym, cDNA-et ble lagret i –20 °C frem til neste bruk. Fra RNA-prøver til testing av basaluttrykk (uten PRV) ble det brukt 1 µg RNA til DNase-behandling og cDNA-syntese i et totalt volum på 20 µl cDNA, som ble fortynnet 1:1 i Ultra Pure Water i forkant av qPCR-analyse. For PRV-prøvene ble det brukt 1 µg RNA til DNase-behandling og cDNA-syntese i et totalt volum på 20 µl cDNA, som ble fortynnet 1:1 for qPCR med EF1β, og deretter fortynnet 1:1 igjen for videre testing med ulike TRGC-spesifikke primere.

2.8 Primerdesign og -effektivitet

Sasa-TRGC-spesifikke primerpar ble manuelt designet og effektivitet av amplifisering ble kalkulert ved å bruke en standardkurve basert på seriefortynninger av cDNA fra thymus i laks, for å sørge for at PCR-primereffektiviteten var sammenliknbar mellom de ulike TRGC-primere. Det ble benyttet gjennomsnittlige Ct-verdier oppnådd fra en firepunktsfortynningsserie til å kalkulere stigningstallet ved å bruke følgende formel:

Stigningstall = (gjennomsnittlig Ct-verdi / log DNA-fortynning)

Beregnet effektivitet med 90 – 110 % som anbefalte minimum- og maksimumsverdier hhv., ved å bruke følgende formel:

$$= (10^{-1/\text{stigningstall}} - 1) \cdot 100$$

TRGC-primereffektivitet varierte fra 99 til 106 % (**Tabell 1**) der hver primer hadde lengde bestående av 24 bp, og med GC-innhold mellom 37 og 62 %. Fremoverprimere er designet slik at de matcher med 3'-enden til respektive C-regioner; TRGC1, TRGC2, TRGC3 og TRGC5. Revers-primere er komplementære og designet for å matche connecting peptide, mens for TRGC4 og TRGC6 rettes revers-primere mot transmembran/cytoplasmisk hale. Alle primere er produsert av Sigma-Aldrich og sekvensene er listet i Vedlegg 1 **Tabell 12**.

Tabell 1. Oversikt over beregnede stigningstall og primereffektivitet i prosent for TRGC-primere.

	TRGC-primere			
	TRGC1	TRGC2	TRGC3	TRGC5
Stigningstall	– 3,5	– 3,3	– 3,3	– 3,2
Primereffektivitet (%)	99,8	100,7	100,5	106,9

2.9 qPCR

SYBR-Green basert kvantitativ PCR (qPCR) ble utført i henhold til protokoll fra Applied Biosystems (Fast SYBR Green Mastermix protocol), og analysen utføres av programmet 7500 Fast Real-Time PCR system (Applied Biosystems). Dersom Ct-verdien er høy indikerer det lav konsentrasjon av spesifikt cDNA i prøven, og lav Ct-verdi indikerer at det er høy cDNA-konsentrasjon i prøven. Denne analysen ble brukt til deteksjon av TRGC1-, TRGC2-, TRGC3-, TRGC4-, TRGC5-, og TRGC6-transkript. Elongeringsfaktor 1 α (EF1 α) ble brukt som referansegen.

Alle prøver ble testet i triplikat i 96-brønners brett (MicroAmp Fast 96-well Reaction Plate (0.1mL) Life Technologies cat nr: 4346907) og det ble brukt 2,5 μ l cDNA, 2,5 μ l primermiks (bestående av forover- og reversprimer) og 5 μ l Fast SYBR Green Master mix (Applied Biosystems katalognr. 4385612) som ga 10 μ l i totalt volum per reaksjon. Samme løsningsforhold ble brukt for negative RT-kontroller.

SYBR Green er et fluoriserende fargestoff som kan binde uspesifikt til dobbeltrådig DNA (dsDNA). For å kontrollere om dette har skjedd lages det en smeltekurve etter at amplifiseringssyklusene er fullført. Dersom det har oppstått uspesifikk binding mellom SYBR Green og dsDNA resulterer det i en smeltekurve med to toppunkter. På denne måten kan man detektere eventuell kontaminering og gDNA.

2.10 Statistisk analyse

Ct-verdiene fra qPCR ble brukt til å bestemme det relative basaluttrykket av ulike TRGC-gener i ulike organer fra frisk fisk. For å ta hensyn til variasjonen mellom prøvene ble først Ct-verdien til målgenet normalisert mot referansegnet EF1 α , som ble testet først for alle grupper. Det relative uttrykket ble bestemt ved å beregne ΔCt . ΔCt betyr differansen mellom to tall. Deretter ble ΔCt brukt i formelen for det relative uttrykket.

x = Ct-verdi for spesifikke primerpar

$$\Delta Ct = Ct_x \div Ct_{EF1\alpha}$$

$$\text{Relativt uttrykk} = 2^{-\Delta Ct}$$

I neste steg kunne fold change (og log 2 fold change) beregnes for hver gruppe ved å sammenlikne gjennomsnittet av kontrollens (mock) Ct-verdi, for hver enkelt fisk i hver gruppe fra ulike prøvetakingstidspunkt. Denne metoden ble brukt for forsøket med fisk som var infisert med PRV. Dette ble gjort fordi det var bedre egnet for analysering av dataene for PRV-prøvene som igjen gjorde det visuelt enklere å observere forskjeller i uttrykket av de ulike genene mellom de ulike gruppene (InAc, PRV-1, PRV-2 og PRV-3) over tid.

Fold change = relativt uttrykk / gjennomsnitt (relativt uttrykk av mock)

Log (2) fold change = Log (fold change; 2)

Relativt uttrykk ble kalkulert i Microsoft Excel (versjon 16.60). Statistisk analyse og grafikk ble utført i programvaren GraphPad Prism (versjon 9.3.1). For å estimere ulikheter mellom gruppene ble enveis-ANOVA, etterfulgt av Tukey's Post Hoc test for parvis sammenlikning. Statistisk signifikansnivå ble satt til $p < 0,05$ og ble kalkulert med GraphPad sin Grubbs test.

3 Resultater

3.1 Kartlegging og sammenlikning av TRG-loci i laks og regnbueørret

Tidligere data oppnådd gjennom sekvensering av kunstig bakteriekromosom (BAC) indikerte to ulike TRG-loci i laks. Der første locus, TRG 1 inneholdt ti V-gener, fem J-gener og fem C-gener. Andre locus, TRG 2 inneholdt en singel ikke-uttrykket kassett med V-J-C (Yazawa et al., 2008).

I denne studien er TRG-locuset i laks undersøkt på nytt, denne gangen basert på genomiske sekvenser og fem ekstra representative arter i familien *Salmonidae* er inkludert i analysen av (*Oncorhynchus mykiss* (regnbueørret), *Salvelinus alpinus* (arktisk røye), *Hucho hucho* (donaulaks), *Coregonus* sp. (sik) og *Thymallus thymallus* (harr)). Disse artene er valgt ut som representativer fra tre grupper taksonomisk omtalt som subfamilier; *Coregoninae*, *Thymallinae* og *Salmoninae*. Av de ulike slektene fra *Salmoninae* har vi en art fra *Salmo*, en art fra *Salvelinus*, en art fra *Oncorhynchus*, og en art fra *Hucho*, samt en art fra henholdsvis *Thymallinae* og *Coregoninae* (Scoch CL, et al. 2020). Dette på bakgrunn av at $\gamma\delta$ T-celler i pattedyr har unike og forskjellige egenskaper, men i liten grad er kartlagt hos fisk. Over de siste årene har det skjedd stor fremgang i genomsekvensering og det er ønskelig å bruke det videre for å kartlegge TRG-gener hos flere fiskearter. Grunnleggende kartlegging av TRG-loci som er gjort her er nødvendig for å få et universelt nomenklatur basert på IMGT-standard og -regler (M. P. Lefranc, 2014) over de ulike TRG-gensegmentene, dermed er videre repertoaranalyser lettere å utføre.

3.1.1 TRG-locus i laks

TRG-locus fra laks ble manuelt kartlagt ved å bruke nåværende genomsamling [Ssal_v3.1; GenBank GCA_905237065.2], i tillegg ble det brukt cDNA-data fra GenBank og sekvenser som tidligere er publisert av Yazawa et al. (Yazawa, 2008 #2).

TRG-locuset ligger på kromosom ssa20, i fremoverorientering, definert fra 5'- til 3'-enden av kromosomet og består av totalt 2,7 Megabasepar (Mbp). Det flankeres av gener som koder for *fam81b* på 5'-enden *noelin* på 3'-enden etterfulgt av *formin binding protein 1* (**Figur 6**). Alle TRG-genene er lokalisert på det samme kromosomet, men det er et stort mellomrom bestående av 2,4 Mbp, lokalisert mellom den første kassetten og resterende TRG-gener. Orientering av

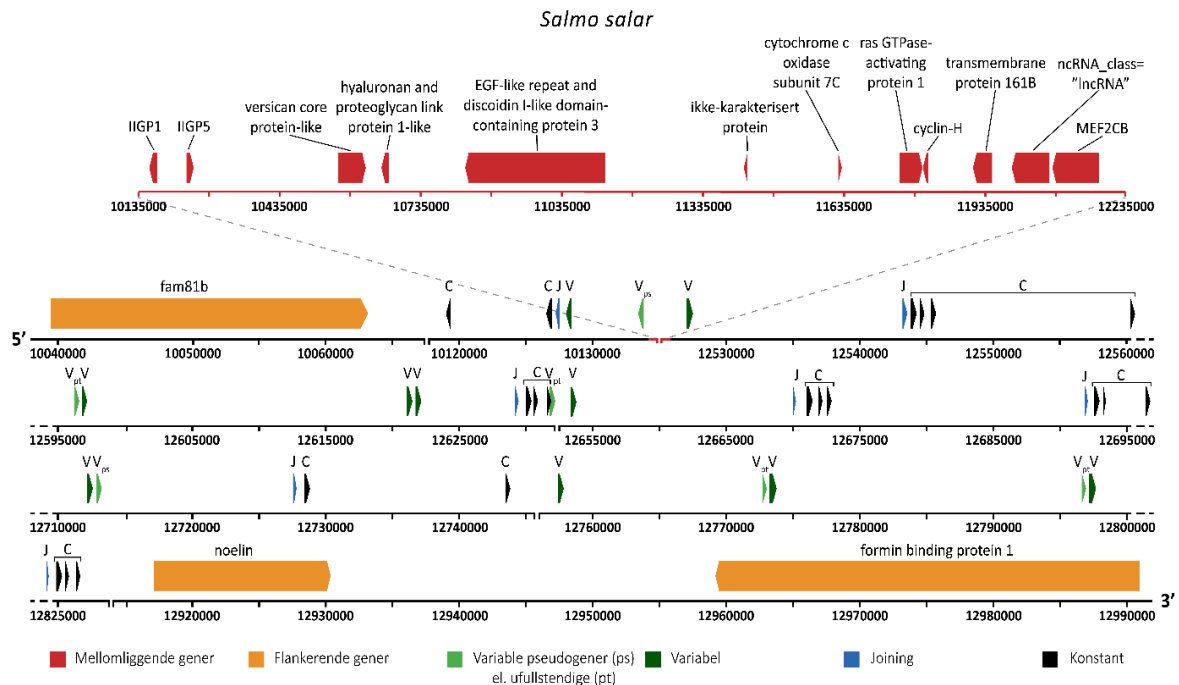
Sasa (*Salmo salar*)-TRG-locuset defineres av den transkripsjonelle orienteringen til hovedandelen av TRG-kassetene, der locuset er i fremoverorientering regnet fra den første kassetten ved 5'-enden. Den første kassetten i reversorientering består av (C γ (E1⁶) – C γ (E3) – J γ – V γ – V γ) og er lokalisert for seg selv på begynnelsen av locuset, etterfulgt av gener som koder for henholdsvis: *Interferon-inducible GTPase 1 (IIGP1)*, *Interferon-inducible GTPase 5 (IIGP5)*, *versican core protein-like*, *hyaluronan and proteoglycan link protein 1-like*, *EGF-like repeat and discoidin I-I-like_domain-containing protein 3*, *uncharacterized protein*, *cytochrome c oxidase subunit 7C mitochondrial*, *ras GTPase activating protein 1*, *cyclin-H*, *transmembrane protein 161B*, *ncRNA_class=lncRNA*, *myocyte enhancer factor 2bc (MEF2CB)*.

IIGP1 og IIGP5 stemmer overens med BAC-sekvensering av Sasa TRG-locus-2 fra tidligere analyse (Yazawa, 2008 #2), men myosin, som ifølge analysen er lokalisert i flankerende region av TRG-2, ble derimot ikke funnet i vårt søk. Etter genet som koder for MEF2CB, ligger andre kassetten bestående av (V γ – J γ – C γ (E1) – C γ (E2A) – C γ (E2B) – C γ (E3)), fulgt av en tredje kassetten (V γ – V γ – V γ – J γ – C γ (E1) – C γ (E2) – C γ (E3)), og fjerde kassetten (V γ – J γ – C γ (E1) – C γ (E2) – C γ (E3)). Den femte kassetten skiller seg ut, fordi den mangler et V-gen (J γ – C γ (E1) – C γ (E2) – C γ (E3)). På slutten ser man igjen normal organisering, der sjette kassetten består av (V γ – V γ – J γ – C γ (E1) – C γ (E3)), og syvende kassetten består av V γ – V γ – V γ – J γ – C γ (E1) – C γ (E2) – C γ (E3). Det er totalt 7 C γ -gener, 7 J γ -gener og 16 V γ -gener fordelt på syv kassetter som vanligvis består av 1–3 V γ , 1 J γ og 1 C γ , m.a.o. en ekstra C γ , en ekstra J γ og en ekstra V γ , sammenliknet med tidligere identifisering (Yazawa, 2008 #2). I tillegg har vi identifisert fire av TRGV-genene som «partial», og tre er pseudogener. Partial, kalles heretter ufullstendig fordi det betyr at kun en liten del av sekvensen ble identifisert.

Det er et nytt TRGC-gen, midlertidig klassifisert som *Sasa-TRGC2-2* (Vedlegg 3) som er lokalisert etter TRGC2-1. Dette genet er potensielt funksjonelt og sammenliknbart med TRGC2-1, TRGC3 og TRGC5. TRGC2-2-genet er organisert i tre eksoner som koder for henholdsvis et konstant domene (E1), et connecting peptide (E2) og en transmembran region/cytoplasmisk hale (E3). Til sammenlikning består TRGC1-genet av totalt fire eksoner som

⁶ E1 = C-gen ekson: konstant domene, E2 = C-gen ekson: connecting peptide, E3 = C gen ekson: transmembran/ cytoplasmisk hale, E4 = C gen ekson: ekstra

koder for et konstant domene, to eksoner som tilsammen koder for et langt connecting peptide og et ekson som koder for transmembran/cytoplasmisk region. TRGC4- og TRGC6-genene har kun to eksoner som koder for det konstante domenet og transmembran/cytoplasmisk region.



Figur 6. Organisering av TRG-locus i laks (*Salmo salar*). Boksene er pilformet for å markere genets orientering. Konstante gener er sorte, joining er blå, variable gener er mørkegrønne, variable pseudogener eller variable ufullstendige gener er lysegrønne, flankerende gener er røde og mellomliggende gener er mørkerøde. Locuset er orientert fremover i retning fra 5'- til 3'-enden.

Det nye genet, TRG2-2-er svært lik TRGC2-1 (Tabell 2. Nukleotidsekvens-identitet) med 97.6 % nukleotidsekvens-identitet (94.6 % AA-identitet). Sammenliknet med de andre TRGC-genene er TRG2-2 83.5 % lik TRG-C6 (70.8 % AA-id), 89.7 % lik TRG-C1 (82.1 % AA-id), 85.9 % lik TRG_C3 (72.5 % AA-id), 84.6 % lik TRG_C4 (74.1 % AA-id), og 84.9 % lik TRG_C5 (75.2 % AA-id), basert på nukleotidsekvensen (Figur 7. AA-sammenlikning, se Vedlegg 2, Figur 22. for nukleotidsammenlikning).

Tabell 2. Nukleotidsekvens-identitet i prosent for C-gener. SASA_TRG2_2 er nytt gen.

	TRG-C6	TRG2-2	TRGC2-1	TRG_C1	TRG_C3	TRG_C4	TRG_C5
TRG-C6	100.00	83.45	83.45	82.30	82.18	84.04	84.14
TRG2-2		100.00	97.63	89.74	85.91	84.95	84.85
TRGC2-1			100.00	89.74	86.11	85.88	85.06
TRG_C1				100.00	82.50	84.03	83.23
TRG_C3					100.00	85.55	88.21
TRG_C4						100.00	86.95
TRG_C5							100.00

```

<C-DOMENE (EXON 1)
Sasa_TRGC1      KPKVTVYSVSKPEPNRKTLL LARDMFPDLVKISWKMVDKNGRTMEVPKAEEMEELEQREEGRRTSMIIIDKDKTYRNKYI SVEHKLGTQDVDIPK
Sasa_TRGC2_1    KPKVTVYPASKPEPNRKTLL LARDMFPDLVKISWKMVDENGQTVEVPKAEERELEQREEGRRTSMIIIDKDKTYRNKYI SVEHEGQPQDVNIPE
Sasa_TRGC2_2    NPKVTVYPASKPEPNRKTLL LARDMFPDLVKISWKMVDKNGRTVEVPKAEERELEQREEGRRTSMIIIDKDKTYSNKYS SVEHEGGPQDVIDIPE
Sasa_TRGC3      KPKVTVYSESNPESNV-NTLL LAGDMFPDLVKISWKMEDENGRAVEVPKAEGEQLEQREEGQTSMIITDKEKIYRNKYI SVEHEGQPQDVYMLK
Sasa_TRGC5      KPKVTVYPASNSNGKTLL LARDMFPDLVKISWKIEDANGRRMEVSKAETEQLQREEGQTSMIIDKDKTYRNKYI SVEHEWGAQQFDIPK
Sasa_TRGC4      KPKVTVYPASNPESNGKTLL LARDMFPDLVKISWKMEDEYGGTVEVSKAETEQLQREEGQTSMIITDKENAYKNKYR SVEHEGDPQDVMMLK
Sasa_TRGC6      KPKVTMYLAFKPELNGKTLL LARDMFPDLVKISWKMEDENGRTVEVPKAEEMEELEQREEGQTSMIIMYQKG-ADAKYI SVEHEAGPEEADTPK

<CONNECTING PEPTIDE (EXON 2A)
Sasa_TRGC1      EEPTEAPPPTMAAPTLLHVTY-----
Sasa_TRGC2_1    EEPTEASPTTMASPTTLQVTN-----
Sasa_TRGC2_2    DEPTEASPTTMAAPTTLQVTN-----
Sasa_TRGC3      DQPTTEAPPPTVAAPTCSFRNDTQOSQSLHLTD
Sasa_TRGC5      -----DTPPTCPFRNDTQEPPLTQFTE
Sasa_TRGC4      -----
Sasa_TRGC6      -----

<CONNECTING PEPTIDE (EXON 2B)
Sasa_TRGC1      EEPTEAPPSTKAAPTALQATN
Sasa_TRGC2_1    -----
Sasa_TRGC2_2    -----
Sasa_TRGC3      -----
Sasa_TRGC5      -----
Sasa_TRGC4      -----
Sasa_TRGC6      -----

<TRANSMEMBRANE/CYTOPLASMISK HALE (EXON 3)
Sasa_TRGC1      DSFQSTCSLNLASLVYTMIVKSMVY CALSLLLHHRNLGSRPSTSRPIH*
Sasa_TRGC2_1    DSLKSIICSLNLASLVYTMIVKSMVY YGLSFLHHRNMGCRPKTCRQIH*
Sasa_TRGC2_2    DSFKSICGLNLASLVYTMIVKSMVY YGLSFLHHRNMGCRPKTCRQIH*
Sasa_TRGC3      DSFQSTFSLNLASILYTMIVKSMVY CGLSILLHHRSLGRGPSTCRHIY*
Sasa_TRGC5      DSFQSTCSLNLASLVYTMIVKSMVY CGLSLLLHHRILGRGPST*
Sasa_TRGC4      DPFQSMCSLNLASLVYTMIVKSMVY CGLSLLLHHRNMGKWTQHL*
Sasa_TRGC6      TTFQSMCSLRLASLVYTMIAKSMLY CGLSLLLHHRNMGNSPPT*

```

Figur 7. AA-sammenlikning av de syv TRGC-genene (oversatt fra nukleotider). Her er genene sortert slik at de enkelte eksonene sammenliknes hver for seg: konstant-domene (ekson 1), connecting peptide (ekson 2A), connecting peptide (ekson 2B), transmembran/ cytoplasmisk hale (ekson 3). Conserved Cysteines- (C) er markert i grønt, og tryptofan- (W) i turkis. Genene er arrangert og sortert etter hverandre for å gi en visuell sammenlikning. Aminosyrene som er markert i grått svarer til primerne som ble brukt i qPCR, pilene viser hvilke primere som er fremover (FRW) og revers (REV).

Genet TRGJ2-2 er lokalisert 648 nukleotider foran TRGC2-2. Sammenliknet med de andre J-genene er den mest lik TRGJ2-1 med 98.7 % nukleotididentitet (100 % AA-id). Deretter 90.8 % lik TRGJ3 (75.0 % AA-id), 89.5 % lik TRGJ1 (68.8 % AA-id), 86.5 % TRGJ5 (80.0% AA-id), 79 % lik TRGJ4 (68.8 % AA-id), og 55,3% lik TRGJ6 (68.8 % AA-id) (Tabell 3. Nukleotidsekvens-identitet, Figur 8. AA sammenlikning, se Vedlegg 2 Tabell 14. AA-sammenlikning).

Tabell 3. Viser nukleotidsekvens-identitet i prosent for J-gener.

	TRGJ6	TRGJ5	TRGJ4	TRGJ3	TRGJ1	TRGJ2_2	TRGJ2_1
TRGJ6	100.00	52.00	48.05	53.95	52.63	55.26	56.58
TRGJ5		100.00	68.67	85.14	82.43	86.49	85.14
TRGJ4			100.00	84.21	75.00	78.95	77.63
TRGJ3				100.00	85.53	90.79	89.47
TRGJ1					100.00	89.47	90.79
TRGJ2_2						100.00	98.68
TRGJ2_1							100.00

TRGJ6	DSGSGTQEILRFSGSKLIITGK---	23
TRGJ1	-----YALLFGSGITLHVTGK---	16
TRGJ5	-----RLEFGSGTTLYVTGKISI	18
TRGJ4	---QESFYAYEFGSGTRLTYVTGSGTR	23
TRGJ2_2	-----YVLVFGSGTKLYVTGK---	16
TRGJ2_1	-----YVLVFGSGTKLYVTGK---	16
TRGJ3	-----YGYVFGSGTRLFVTGK---	16
	***** * : ** .	

Figur 8. AA-sammenlikning av de syv TRGJ-genene (oversatt fra nukleotider).

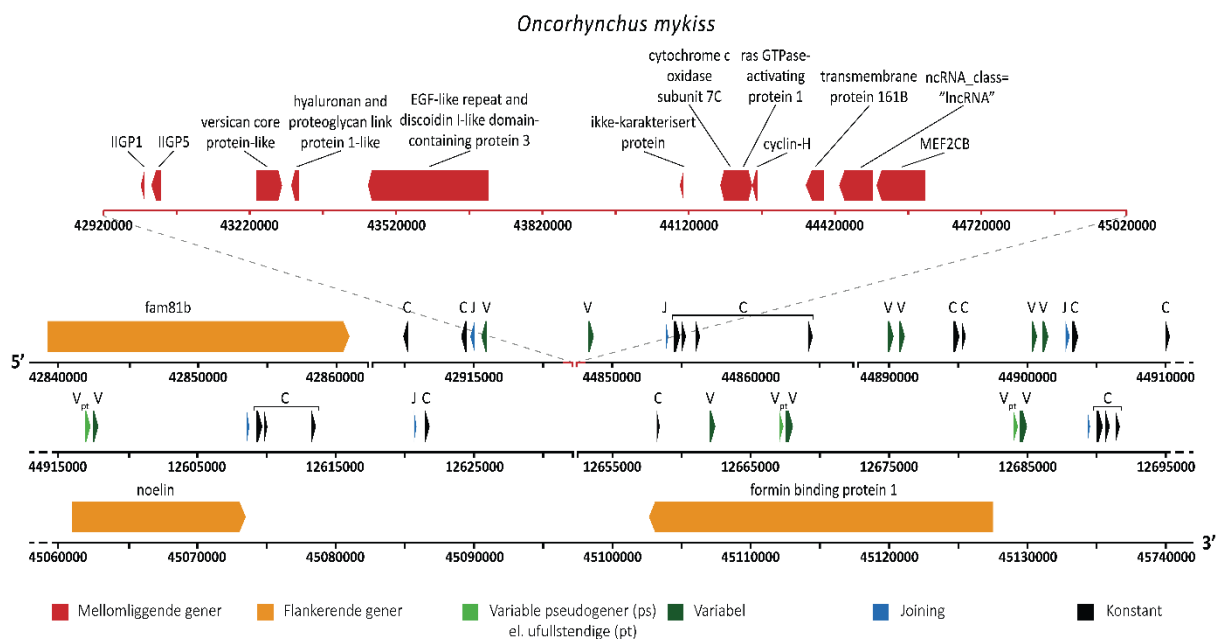
3.1.2 TRG-locus i regnbueørret

Analyse av genomsamlingen fra den klonede arlee-stammen (USDA_OmykA_1.1; GCA_013265735.3) representerer den første rapporten på genomisk organisering av TRG i regnbueørret. TRG-locuset i regnbueørret ligger på kromosom 11 som i laks er orienteringen fremover, og locuset flankeres av gener som koder for *fam81b* og *noelin* fulgt av *formin binding protein 1*. Locuset er 2,1 Mbp langt og mellom den første kassetten ($C\gamma$ (E3) – $C\gamma$ (E1) – $J\gamma$ – $V\gamma$) og de resterende genene finner vi et stort mellomrom på 1,6 Mbp som består av de samme nevnte genene som i laks. I likhet med laks er den første kassetten i reversorientering, og fremoverorientering i de neste.

Etter MEF2CB ligger andre kassetten bestående av ($V\gamma$ – $J\gamma$ – $C\gamma$ (E1) – $C\gamma$ (E2A) – $C\gamma$ (E2B) – $C\gamma$ (E3)). Den er spesiell fordi dette TRGC-genet, i likhet med TRGC1 i laks inneholder to eksoner som koder for connecting peptide, og medfører en ekstra lang connecting peptide (i TR-strukturen). Deretter følger tredje kassetten ($V\gamma$ – $V\gamma$ – $C\gamma$ (E1) – $C\gamma$ (E2)), som muligens ikke er funksjonell. Det kan det være to grunner til, enten så mangler den eksonet som koder for transmembran region, eller så er gensekvensen så ulik den som ble brukt i BLASTn-søket at den ikke ble identifisert. I den fjerde kassetten ($V\gamma$ – $V\gamma$ – $J\gamma$ – $C\gamma$ (E1) – $C\gamma$ (E3)) mangler det et ekson for connecting peptide. Deretter kommer femte kassetten ($V\gamma$ – $V\gamma$ – $J\gamma$ – $C\gamma$ (E1) – $C\gamma$ (E2) – $C\gamma$ (E3)) og sjette kassetten ($J\gamma$ – $C\gamma$ (E1) – $C\gamma$ (E3)). Til slutt er den syvende kassetten ($V\gamma$ – $V\gamma$ – $V\gamma$ – $V\gamma$ – $V\gamma$ – $J\gamma$ – $C\gamma$ (E1) – $C\gamma$ (E2) – $C\gamma$ (E3)) som har to ufullstendige V-gener.

Locuset inneholder totalt 7 TRGC-gener, 6 TRGJ-gener og 13 TRGV-gener. Blant de 13 TRGV-genene, er 7 av dem funksjonelle, 3 er pseudogener og 3 andre er ufullstendige. Til sammenlikning har laks totalt 7 TRGC-gener, 7 TRGJ-gener og 16 TRGV-gener, hvorav 9 TRGV er funksjonelle, 3 er pseudo og 4 er ufullstendige. Altså har samme antall TRGC-gener som i laks, men regnbueørret har færre TRGJ og færre TRGV. Dessuten er det færre funksjonelle TRGV i regnbueørret. Locuset i regnbueørret er også kortere enn i laks.

Den tredje kassetten inneholder færre gener, og to C og en V er pseudogener, mens den tredje kassetten i laks har kun et V-pseudogen. Den fjerde kassetten har også et V-pseudogen som ikke er i laks. I den femte kassetten mangler regnbueørret et V-pseudogen som er i laks. Den femte kassetten i regnbueørret tilsvarer femte og sjette kassetten i laks. I laks er mellomrommet mellom femte og sjette kassetten større enn mellomrommet mellom de to gruppene i den femte kassetten i regnbueørret.



Figur 9. Organisering av TRG-locus i regnbueørret (*Oncorhynchus mykiss*). Boksene er pilformet for å markere genets orientering. Konstante gener er sorte, joining er blå, variable gener er mørkegrønne, variable pseudogener eller variable ufullstendige gener er lysegrønne, flankerende gener er røde og mellomliggende gener er mørkerøde. Locuset er orientert fremover i retning fra 5'- til 3'-enden.

3.1.3 Identifisering av TRG-gener i arktisk røye, donaulaks, sik og harr

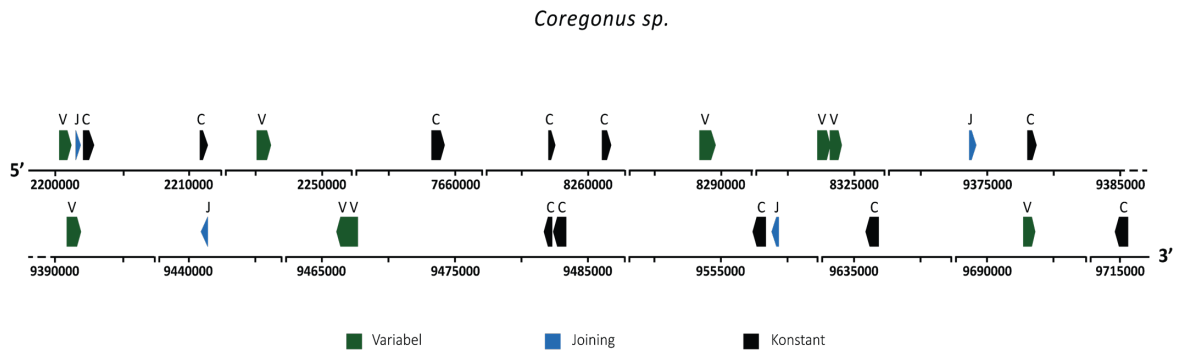
Analyse av genomsamlinger fra arktisk røye (ASM291031v2), donaulaks (ASM331708v1), sik (AWG_v2), og harr (ASM434828v1) representerer den første rapporten på genomisk organisering av TRG-gener i disse artene. Som sagt er kromosomet til TRG-loci i arktisk røye

og donaulaks foreløpig ikke kartlagt, og derfor er TRG-genene foreløpig lokalisert på ulike «scaffolds» og «linkage groups» (LG). Mens figurene som illustrerer genorganiseringen for laks og regnbueørret er nøyaktige, er de for sik og harr kun foreløpige antagelser, og det er fortsatt rom for forbedring. Noen gener er muligens orientert en annen retning enn det som er vist, og dette bør sjekkes i fremtiden. For donauslaks og arktisk røye er det ikke inkludert figurer som illustrerer genorganiseringen på grunn av utilstrekkelig oversikt over organiseringen.

TRG-locuset i donaulaks består av 180 kbp. Locuset inneholder 8 C-, og 4 J- og 9 V-gener. De 8 C-regionene er fordelt på 6 scaffolds (to C-regioner på scaffold 3184, to på scaffold 735, en på scaffold 26784, en på scaffold 37453, en på scaffold 31192 og en på scaffold 803).

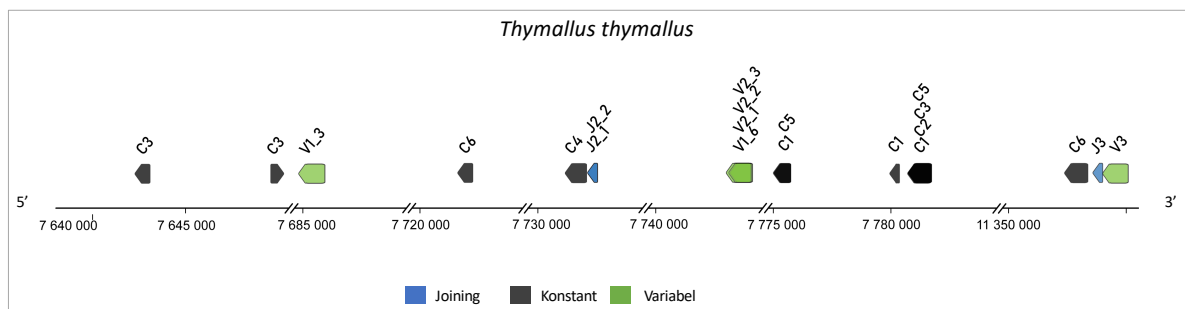
TRG-locus i arktisk røye inneholder 8 C-, 7 J- og 13 V-gener, hvorav to V-gener er såkalt ufullstendige gener (pt). Hovedandelen av locuset har fått en midlertidig lokalisering på LG33. 6 av C-genene, 5 av J-genene og 11 av V-genene ligger på LG33. De første kassetene i reversorientering kan deles i følgende: første ($C\gamma(E3) - C\gamma(E1) - J\gamma - V\gamma$), andre ($V\gamma - C\gamma(E1) - J\gamma$), og tredje ($V - V - C\gamma - V\gamma$), etterfulgt av et mellomrom før de neste tre kassetene i fremoverorientering: fjerde ($V\gamma - J\gamma - C\gamma(E1) - C\gamma(E2) - C\gamma(E3)$), femte ($V\gamma - J\gamma - C\gamma(E1) - C\gamma(E3) - V\gamma - V\gamma$), og sjette ($V\gamma - V\gamma - J\gamma - C\gamma(E1) - C\gamma(E2) - C\gamma(E3)$). De resterende genene som er på scaffold 1449 deles i to kassetter som også er i fremoverorientering: ($J\gamma - C\gamma(E1) - C\gamma(E2A) - C\gamma(E2B) - C\gamma(E3) - V\gamma$), etterfulgt av ($V\gamma - J\gamma - C\gamma(E1) - C\gamma(E2) - C\gamma(E3)$). De flankerende genene er ikke undersøkt hos arktisk røye i denne oppgaven, men det er noe som kan studeres videre i fremtiden.

TRG-locuset i sik er lokalisert på kromosom 18 og består av ca. 7,5 Mbp (**Figur 10**). Totalt består det av 5 C-, 4 J- og 8 V-gener. Første kassett består av ($V\gamma - J\gamma - C\gamma(E1) - C\gamma(E2) - V\gamma$). Deretter et mellomrom bestående av ca. 6,5 Mbp. Så sees andre kassett ($C\gamma(E1) - C\gamma(E2) - C\gamma(E3) - V\gamma - V\gamma - V\gamma - J\gamma$), etterfulgt av tredje kassett ($C\gamma(E3) - V\gamma - J\gamma - V\gamma$), fjerde kassett ($C\gamma(E1) - C\gamma(E2) - C\gamma(E3) - C\gamma(E4) - J\gamma$) og en siste femte kassett ($J\gamma - C\gamma(E1) - V\gamma(E2) - C\gamma(E3)$). Her er den fjerde og femte kassetten i revers orientering.



Figur 10. Organisering av TRG-locus i sik (*Coregonus sp.*). Konstante gener er sorte, joining er blå, og variable gener er grønne. Locuset er orientert fremover i retning fra 5'- til 3'-enden.

TRG-locuset i harr er lokalisert på kromosom 13B, og består av 3,7 Mbp (**Figur 11**). Det består av totalt 6 C-, 2 J- og 4 V-gener. Kassetene kan deles inn på følgende måte: Første kassett (C γ – C γ – V γ), andre kassett (C γ – C γ – J γ – V γ), tredje kassett (V γ – C γ – C γ – C γ) etterfulgt av mellomrom bestående av ca. 3,6 Mbp, og til slutt fjerde kassett (J γ – C γ – V γ). Her er alle genene bortsett fra ett i revers orientering.



Figur 11. Organisering av TRG-locus i harr (*Thymallus thymallus*). Konstante gener er sorte, joining er blå, og variable gener er grønne. Locuset er orientert fremover i retning fra 5'- til 3'-enden.

3.2 TRG-uttrykk i laks

Funksjonaliteten og det relative uttrykket av TRGC-gener ble undersøkt ved å bruke qPCR med fokus på to mucosale (gjeller og tarm) og to immunologiske organer (hodenyre (HK), og milt). Spesifikke primere for hver C-region ble designet, og effektiviteten av hver primer ble bestemt (**Tabell 1**). På grunn av høy nukleotididentitet mellom TRG2-1 og TRG2-2 var det ikke mulig å designe primerpar som kunne skille mellom disse genene, og dermed ble en felles primer som amplifiserte både TRG2-1 og TRG2-2 brukt. Totalt ble tre ulike primerpar (Vedlegg 1, **Tabell 12**) testet for TRGC4, og et primerpar for TRGC6 i thymus, men ingen av disse resulterte i

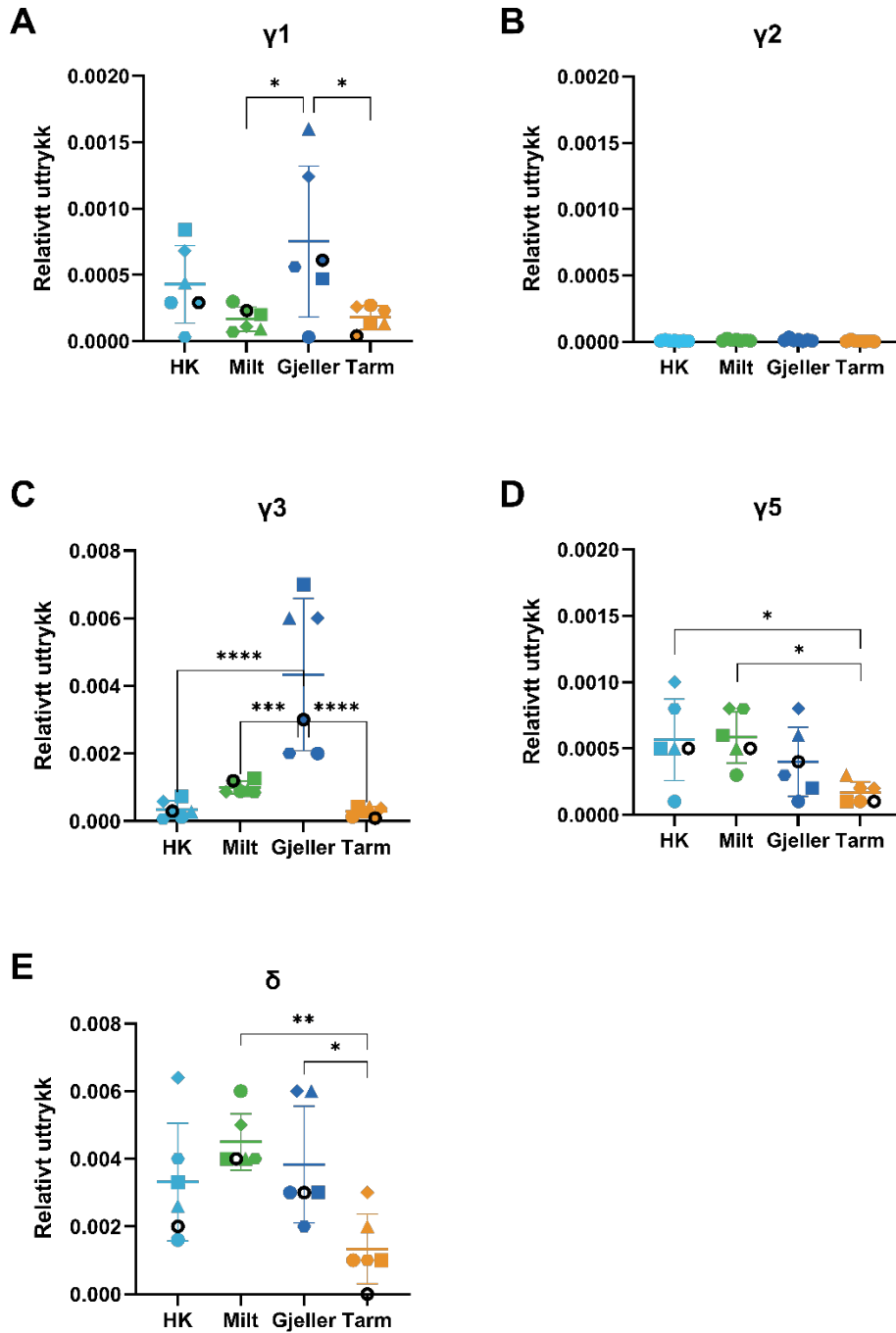
amplifikasjon i prøver fra gjeller, hodenyre, milt og tarm. Det indikerer at TRGC4 og TRGC6 ikke uttrykkes i vevet, noe som er overaskende med tanke på at Yazawa et al. (2008) hevdet det motsatte. I motsetning testet Yazawa et al. kun ett primerpar for TRGC4.

Figur 12 (A-E) viser basaluttrykket av TRGC1, TRGC2-1/TRGC2-2, TRGC3 og TRGC5 i hodenyre (HK), milt, gjeller og tarm fra seks uvaksinerte presmolt laks, og det relative uttrykket av TRDC.

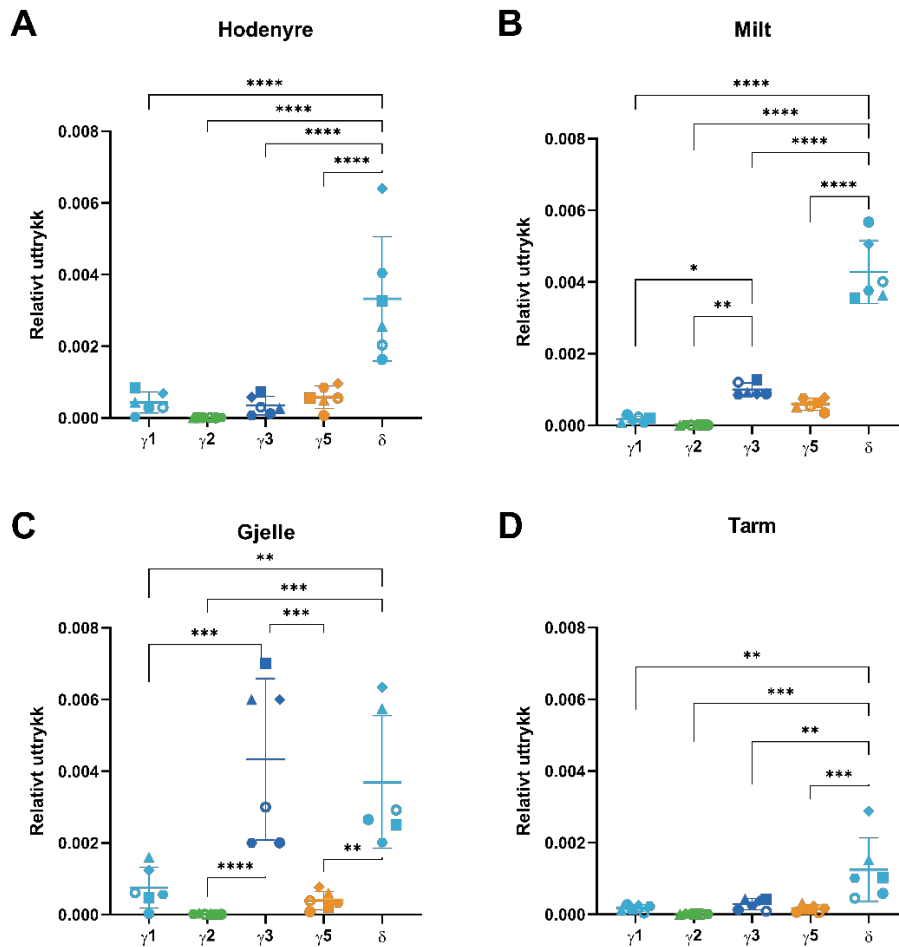
TRGC-genene er uttrykket i de fire organene som ble undersøkt, men TRGC2 (**Figur 12B**) har svært lavt uttrykk i alle organene (Ct verdier: 30,8- 37,5).

Av disse er TRGC3 høyest uttrykket med statistisk signifikante forskjeller mellom gjelle og de andre organene (Ct verdier: 25,8- 38,1) (**Figur 12C**). TRGC1 (**Figur 12A**) er høyest uttrykket i gjeller etterfulgt av hodenyre (Ct verdier: 27,0- 34,6). TRGC5 (**Figur 12D**) har jevnt uttrykk i hodenyre, milt og gjeller, og det er statistiske signifikante forskjeller mellom både hodenyre – tarm og milt – tarm . (Ct verdier: 24,9-33,4). TRD (**Figur 12E**) har høyt uttrykk i alle organer, med statistisk signifikante forskjeller mellom gjeller – tarm og milt –tarm (Ct verdier: 22,6- 29,8).

I **Figur 13** kan man se en oversikt over distribusjonen av hver enkelt reseptor i hvert enkelt av organ. Generelt viser figuren at det er statistisk signifikante forskjeller mellom TRD og de andre TRGC-genene i alle organene. **Figur 13C** viser at TRGC3 i gjelle skiller seg ut og har statistisk signifikante forskjeller mellom TRGC3 og hver av de andre: TRGC1, TRGC2 og TRGC5. I tillegg viser **figur 13B** for milt statistisk signifikante forskjeller mellom TRGC1 og TRGC3, og mellom TRGC2 og TRGC3.



Figur 12. Basaluttrykk av (A) γ_1 (TRGC1), (B) γ_2 (TRGC2), (C) γ_3 (TRGC3), (D) γ_5 (TRGC5) og (E) δ (TRD) i hodenyre (HK), milt, gjeller og tarm. Legg merke til at skalaen på y-aksen er ulik på: A, B, D, og C, D. Hver prikk representerer en individuell fisk. Stjerne indikerer graden av signifikans sammenliknet med indikerte grupper, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p = 0.001$, **** $p < 0.0001$



Figur 13. Relativt basaluttrykk av TRG-primere og TRD-primere i ulike organer. A) Hodenyre, B) milt, C) gjelle, og D) tarm. Hver prikk representerer en individuell fisk. Stjerne indikerer graden av signifikans sammenliknet med indikerte grupper, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p = 0.001$, **** $p < 0.0001$

3.3 Uttrykk av TRG- og TRD-gener etter PRV-infeksjon

Som nevnt tidligere viste studien fra Veterinærinstituttet (Malik, 2021 #8) at PRV-3-infeksjon i laks inducerer komplett beskyttelse mot PRV-1, men studiet kunne ikke gi full forklaring om hvilke mekanismer som var involvert i tillegg til kryssbeskyttende antistoffer.

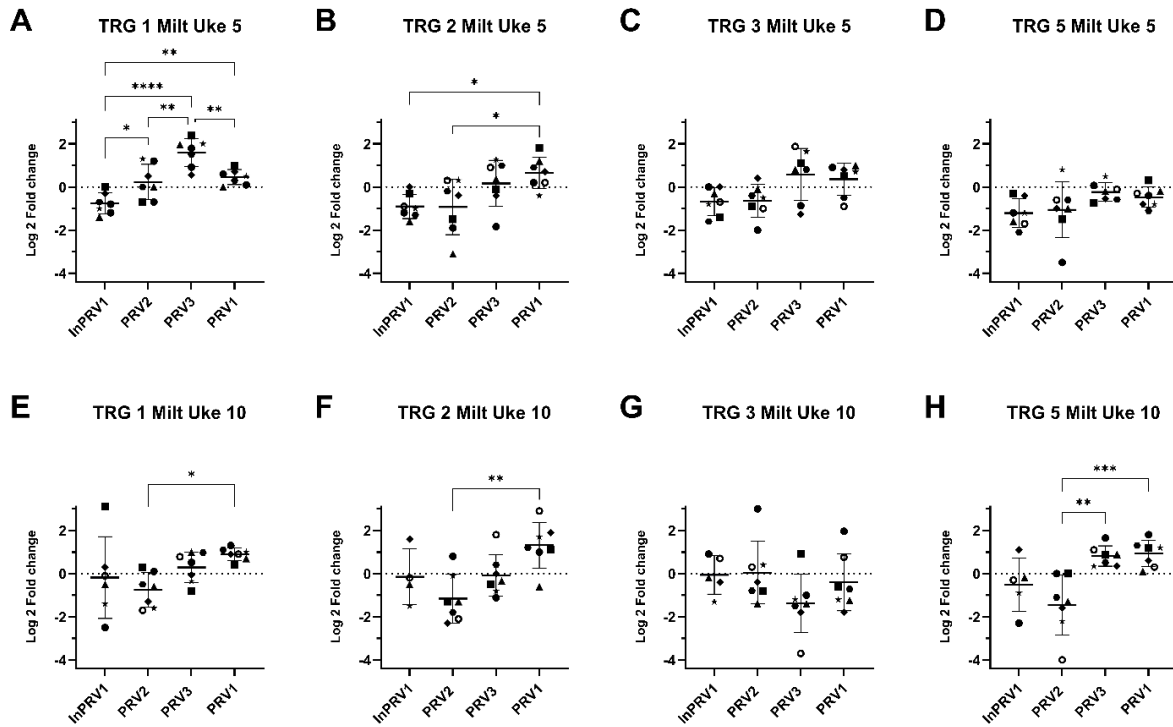
I sammenheng med dette studiet ble det undersøkt om $\gamma\delta$ T-celler kan være involvert i responsen, og på denne måten finne ut om uttrykket av de ulike TRGC-genene blir opp- eller nedregulert i respons mot viruset. Uttrykket av TRGC-genene ble målt i milt på grunn av at det er et immunologisk organ, og det er vist at det inneholder blant annet T-celler som har en viktig rolle i å bekjempe virus. I tillegg ble det vist at TRGC-genene uttrykkes på basalt nivå i disse organene (Figur 12). I forsøket ble uttrykket av de ulike TRGC-genene etter en PRV-

infeksjon undersøkt, både 5 og 10 uker etter primærinfeksjon med PRV-2, PRV-3 og InPRV-1. Deretter ble uttrykket av TRGC-genene undersøkt 5 uker etter sekundær infeksjon med PRV-1 (eksperimentuke 15). Resultater for TRG-uttrykk 5 og 10 uker etter infeksjon (**Figur 14** og **Figur 15**) er kalkulert ved log 2 fold change, basert på en kontrollgruppe (NC). Resultater for TR-uttrykket 5 uker etter sekundærinfeksjon er kalkulert ved log 2 fold change basert på den negative kontrollgruppen (NC) 5 uker etter infeksjon.

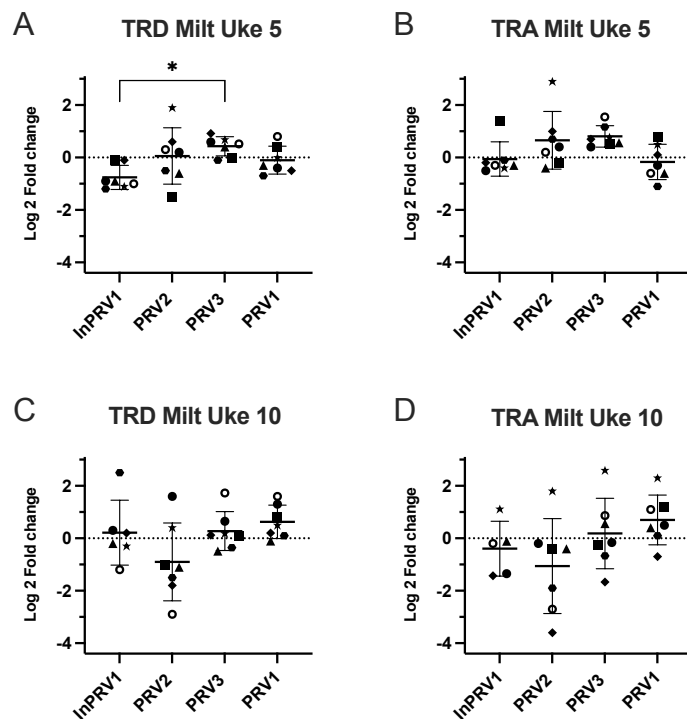
3.3.1 TRG-uttrykk 5 og 10 uker etter PRV-infeksjon

Figur 14 viser utviklingen i responser fra TRGC mot de ulike PRV-variantene (PRV-1, PRV-2, PRV-3, InPRV-1). Generelt ser man høyest endring i uttrykket etter infeksjon med PRV-1 og PRV-3, med størst transkripsjonell indusering for TRGC1 i uke 5, og TRGC5 i uke 10. Hverken TRGC eller TRD viste signifikante endringer i respons mot InPRV-1 (inaktivert PRV-1). Sammenliknet med InPRV-1 induserte alle de andre subtypene (PRV-1, PRV-2, og PRV-3) en statistisk signifikant oppregulering av TRGC1 i milt 5 uker etter infeksjon, som ble universelt redusert 10 uker etter infeksjon. Til notering induserte PRV-3 infeksjon signifikant høyere verdier av TRGC1, sammenliknet med de tre andre subtypene i uke 5. Til sammenlikning var den største økningen av TRGC2 observert i respons mot PRV-1, som fikk en signifikant oppregulering sammenliknet med PRV-2 og InPRV-1, 5 uker etter infeksjon. TRGC3 hadde ingen signifikante endringer, men uttrykket nedreguleres i respons mot PRV-3 fra uke 5 til uke 10 i motsetning til de andre subtypene. Uttrykket av TRGC5 økes signifikant, i respons mot PRV-3- og PRV-1-infeksjon sammenliknet med PRV-2 (men ikke InPRV-1) 10 uker etter infeksjon. Generelt er det større individuell variasjon (større spredning mellom hver prikk) i uke 10 enn i uke 5.

Figur 15 - TRD- og TRA-uttrykk etter 5 og 10 uker viser at TRA-uttrykket i respons mot PRV-3 er signifikant større enn mot InPRV-1. Det er minimale endringer i uttrykket av både TRA og TRD mot PRV-1 og PRV-3.



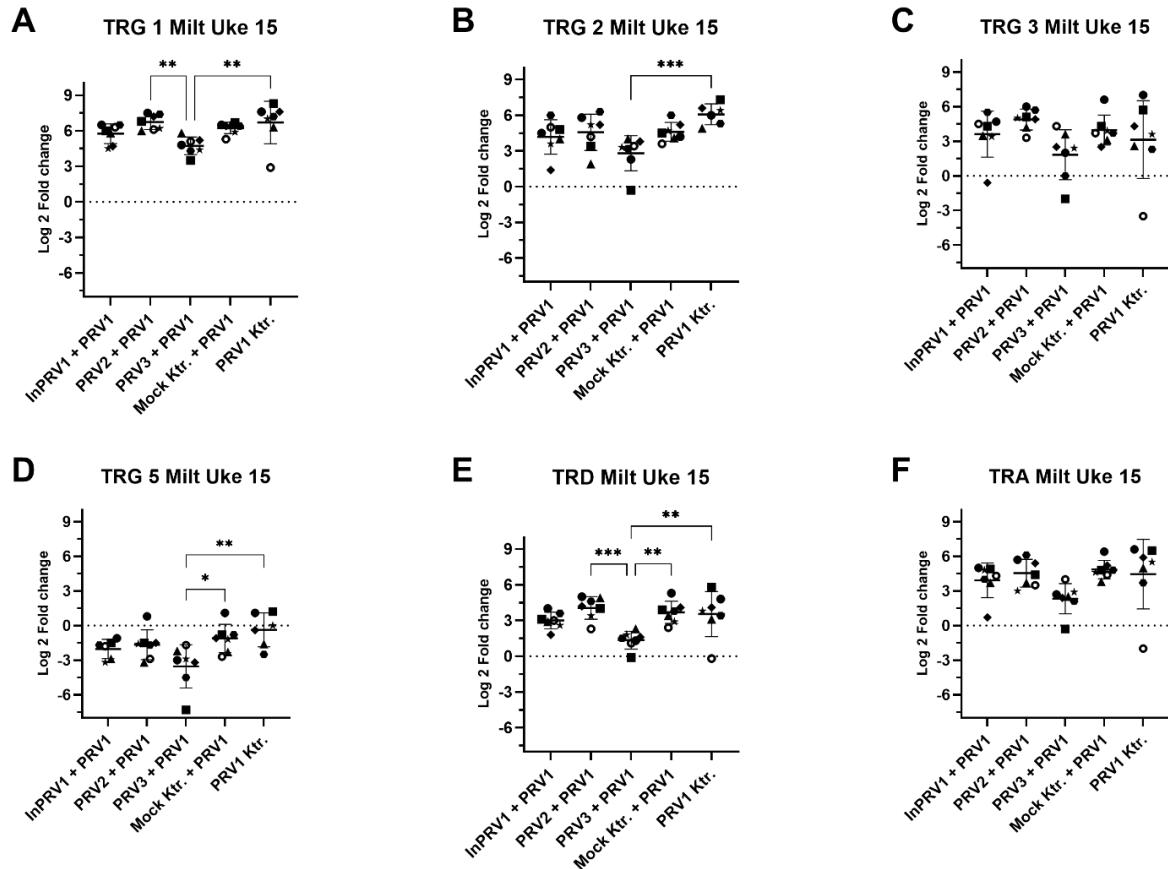
Figur 14. TRGC-uttrykk etter 5 og 10 uker etter i.p. PRV-infeksjon. Presmolt laks ble infisert med ulike PRV-subtyper, inaktivert PRV eller blodcellelysat fra frisk fisk. Prøver ble tatt ut 5 (A–D) og 10 uker (E–H) etter infeksjon. Uttrykket er målt i log₂ fold change som er basert på verdier fra infiserte kontrollindivider. InPRV1 = Inaktivert PRV1. Hver prikk representerer en individuell fisk. Stjerne indikerer graden av signifikans sammenliknet med indikerte grupper, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p = 0.001$, **** $p < 0.0001$



Figur 15. TRD- og TRA-uttrykk etter 5 og 10 uker etter i.p. PRV-infeksjon. Presmolt laks ble infisert med ulike PRV-subtyper, inaktivert PRV eller blodcellelysat fra frisk fisk. Prøver ble tatt ut 5 (A–D) og 10 uker (E–H) etter infeksjon. Uttrykket er målt i log₂ fold change som er basert på verdier fra infiserte kontrollindivider. InPRV1 = Inaktivert PRV1. Hver prikk representerer en individuell fisk. Stjerne indikerer graden av signifikans sammenliknet med indikerte grupper, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p = 0.001$, **** $p < 0.0001$

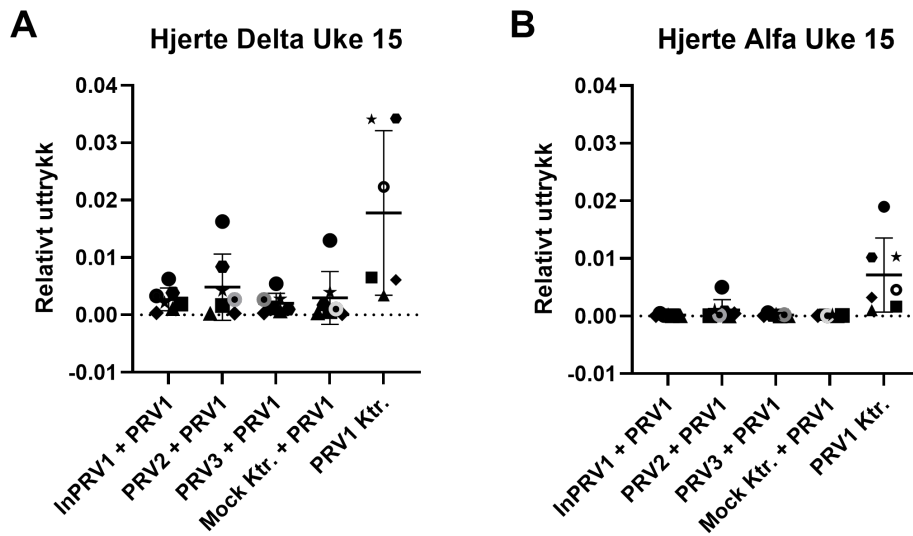
3.3.2 TRGC-uttrykk 5 uker sekundær PRV-infeksjon

Figur 16 viser uttrykket av TRGC-gener 5 uker etter at PRV-1-smittet fisk ble tilsatt gruppene. Ved sammenlikning av alle de andre gruppene har PRV-3 + PRV-1-gruppen en trend mot lavere uttrykk av alle TRGC-genene og TRD- og TRA-genene. For TRGC1-genet er det signifikant forskjell mellom PRV-1 Ktr. og PRV-3 + PRV-1, og mellom PRV-2 + PRV1 og PRV-3 + PRV-1. TRGC2 har også en signifikant forskjell mellom PRV-1 Ktr. og PRV-3 + PRV-1.



Figur 16. TRG- (A-D), TRD- (E) og TRA-uttrykk (F) i milt 5 uker etter sekundær PRV-1-infeksjon. Presmolt laks ble infisert med ulike PRV-subtyper, inaktivert PRV eller blodcellelysat fra frisk fisk. Etter uke 10 ble fisk i alle grupper utsatt for sekundær infeksjon med PRV1. Prøver ble tatt 15 uker etter primær (5 uker etter sekundær) infeksjon. Uttrykket er målt i log 2 fold change som er basert på verdier fra infiserte kontrollindivider. InPRV1 = Inaktivert PRV1. Hver prikk representerer en individuell fisk. Stjerne indikerer graden av signifikans sammenliknet med indikerte grupper, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$

På bakgrunn av resultatene der man så en universell nedregulering av TR-gener i milt i uke 15, ble det gjort et innledende forsøk med prøver fra hjerte (virusets hovedsted for replikasjon) fra uke 15. Dette ble gjort for å undersøke muligheten for at T-celler kan ha migrert fra milt til hjerte. Det innledende forsøket viste ingen oppregulering i TRDC- eller TRAC-uttrykk i hjerte på dette tidspunktet. Figur 23 viser det relative uttrykket for TRA- og TRD-gener fra hjerte i uke 15.



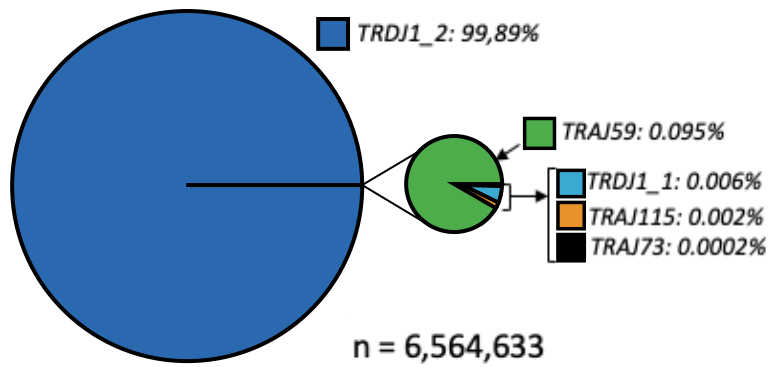
Figur 17. TRD- og TRD-uttrykk 5 uker etter sekundær PRV-1-infeksjon. Presmolt laks ble smittet ved at PRV-1-infisert fisk ble tilsatt gruppene. Prøver ble tatt ut 5 (A–D) og 10 uker (E–H) etter infeksjon. Uttrykket er målt i log 2 fold change som er basert på verdier fra infiserte kontrollindivider. InPRV1 = Inaktivert PRV1. Hver prikk representerer en individuell fisk. Stjerne indikerer graden av signifikans sammenliknet med indikerte grupper, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p = 0.001$, **** $p < 0.0001$

regionen, og at sekvensen er funksjonell, m.a.o. ikke inneholder avbrutte leserammer eller stoppkodon. Som nevnt i Kap. 2.3 ble sekvensene som oppfylte disse kriteriene godkjent: 99 % treff til den amplifiserte 30 bp C-regionsekvensen, en komplett J-region med større identitet enn 98 %, og en V region med identitet minimum 98 % og minimum lengde på 50 bp.

Resultatet av antallet sekvenser som kommer fra de ulike prøvene er listet i **Figur 17 B**. I gjelleprøvene ble det identifisert mellom 518 til 587 tusen J-gener. I hodenyre ble det identifisert mellom 690 og 975 tusen J-gener, og i tarm mellom 800 tusen og 1 million J-gener.

Ved å kombinere de ulike datasettene, er det relative uttrykket av alle produktive og uproduktive sekvenser for alle TRDV/TRDJ-kombinasjoner representert i **Figur 15**. Som forventet ser vi en skjev fordeling, der 99,89 % av TRD-kjeden bruker TRDJ1_2-genet. Ett fåtall av sekvensene som inneholder TRDC bruker noen av TRAJ-genene. Av de 128 TRAJ-genene, som er gener funnet i en genomisk region mellom TRAC- og TRDC-gener, fant vi representative produktive sekvenser bestående av TRDC kombinert med TRAJ115, TRAJ59 og TRAJ73, samt én enkelt sekvens med TRAJ60. Alle TRAJ115 gener fra gjelle stammer fra et individ. Alle TRAJ73 kommer fra gjelle fra fisk 5.

A



B

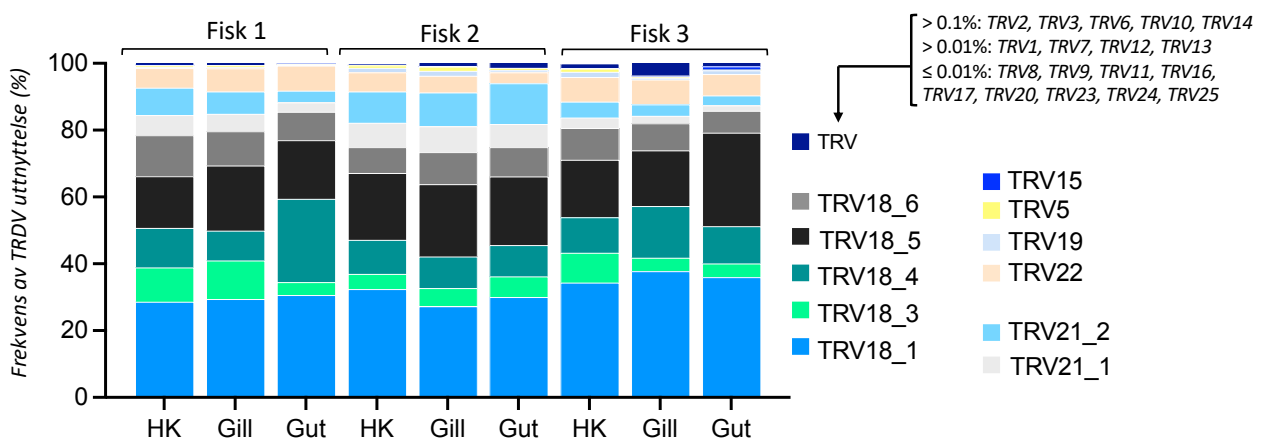
	TRAJ115	TRAJ59	TRAJ60	TRAJ73	TRDJ1_1	TRDJ1_2	Total
G3D	-	1	-	-	-	586 881	586 882
G4D	100	-	1	-	-	615 133	615 234
G5D	-	6218	-	10	-	511 713	517 941
HK3D	-	-	-	-	3	689 590	689 593
HK4D	-	1	-	-	7	739 995	740 003
HK5D	-	-	-	-	10	974 675	974 685
I3D_2	-	17	-	-	21	803 972	804 010
I4D_2	-	-	-	-	253	624 359	624 612
I5D_2	-	-	-	-	119	1 011 555	1 011 674

Figur 19. A) Kakediagrammet illustrerer bruken av ulike J gener fra alle datasett fra tre ulike individer og tre ulike vev. $n = 6,564,633$ er det totale antallet TRDJ-sekvenser. **B)** Tabellen inneholder verdier som samsvarer med A). G3D = Gjelle 3 delta, HK3D = hodenyre 3 Delta, I3_2 = Tarm 3 Delta_2

3.4.1 Uttrykk av TRDV-Gener

Blant 103 funksjonelle og 12 åpne leserammer i TRV-genene funnet i TRA/D-loci, uttrykkes kun et fåtall av TRV-genene sammen med TRDC-kjeden. **Figur 20** viser et representativt uttrykk av TRDV-gener i hodenyre (HK), gjeller (gill) og tarm (gut) fra tre ulike fisk. Resultatet viser at det store flertallet av TRD-kjeder bruker en TRV som tilhører en av tre ulike TRV-familier (TRV18, TRV21 and TRV22), og totalt åtte gener. Uttrykket av de ulike TRV-genene i HK fra fisk 1, 2 og 3 er henholdsvis følgende: **TRV18_1** (28,6 %, 32,4 %, 34,4 %). **TRV18_3** (10,2 %, 4,5 %, 8,9 %). **TRV18_4** (11,4 %, 10,2 %, 10,6 %). **TRV18_5** (15,4 %, 20,0 %, 17,2 %). **TRV18_6** (12,3 %, 7,7 %, 9,5 %). **TRV21_1** (8,2 %, 9,4 %, 4,8 %). **TRV21_2** (5,9 %, 5,7 %, 7,4 %). **TRV22** (5,9 %, 5,7 %, 7,4 %).

TRV18_1 er gjennomgående det V-genet som er mest dominerende i alle individer og i alle testede organer. Generelt utgjør de nevnte 8 V-genene 94-99 % av produktive TRD-sekvenser. Individuelle forskjeller gjør at det er ulikt hvor dominerende de enkelte genene er i de ulike individene og organene.



Figur 20. TRDV-uttrykk i hodenyre (HK), gjeller (Gill), og tarm (gut) fra fisk 1, 2 og 3. y-aksen angir frekvensen av TRDV-gener.

3.4.2 Uttrykk av TRAV kombinert med TRDC

I tillegg til de ovennevnte dominerende genene TRV18, TRV21 og TRV22 er det påvist at en liten andel av TRDC-rearrangeringene er kombinert med andre TRV-gener. Majoriteten av de var kombinert med TRDJ-2, men det var noen som kombinerte med TRAJ-gener. **Feil! Fant ikke referanse-kilden.** er en oversikt over de TRAV-kombinasjonene som ble funnet med TRDC i RACE-analysen. Med unntak av de åtte dominerende TRV-genene ble 92 av 107

kombinasjoner med TRAV19_5, elleve kombinasjoner med TRAV19_8, og tolv kombinasjoner med TRAV19_9. TRAJ73 har totalt ti JV-kombinasjoner hvorav fem er med TRAV7-5, fire kombinasjoner med TRAV5_1, og én kombinasjon med TRAV5_2. Til slutt har vi TRAJ60 som kun har én kombinasjon blant de 100 V-genene, det er med TRAV19_8.

Videre er det 14 859 kombinasjoner med TRAV21_2, 14 466 kombinasjoner med TRAV21_1, 628 kombinasjoner med TRAV18_5, 553 kombinasjoner med TRAV18_1, 412 kombinasjoner med TRAV18_4, 294 kombinasjoner med TRAV21_1, 248 kombinasjoner med TRAV18_3. Det er én kombinasjon med følgende: TRAV14_3, TRAV14_6, TRAV15_1, TRAV5_2.

4 Diskusjon

TR-repertoaret i fisk er fortsatt krevende å studere, og mere innsats er nødvendig for å få en oversikt over kartleggingen og lage en standardisert database med sekvenser. Laksefisk er nøkkelarter i fiskeoppdrett verden over, og de har siden blitt viktige modeller for å studere fiskeimmunologi. I dag er flere genomsamlinger med høy kvalitet tilgjengelig for flere arter og ulike stammer av laksefisk. Vi valgte å se på beskrivelse og kartlegging av TRG-locuset i laks og sammenlikne dette med andre laksefisk. Dette ble utført med tanke på å etablere et felles nomenklatur for TRG i laksefisk.

Derfor er TRG-locuset i laks med C-, V- og J-regioner kartlagt og undersøkt på nytt. Prosedyren gikk ut på å gjøre en digital kartlegging av TRG-locuset ved hjelp NCIB sitt søkeverktøy for å finne ut lokasjonen til de ulike TRG-genene (for laks og fire andre laksefisk). Parallelt med dette ble primersekvenser fra TRG-genene fra laks plukket ut og brukt i qPCR-forsøk for å sjekke hvilke som uttrykkes og ikke. Ulike gener fra TRG-kjeden er testet mot PRV-prøver og gir sterke indikasjoner på at $\gamma\delta$ T-celler er involvert i antivirale immunresponser. I tillegg er det gjort en TRD-repertoaranalyse og resultatene indikerer at blant eksisterende TRADV- og TRDJ-gener brukes det bare et lite fåtall av hele TRD-locuset.

4.1 Genomisk organisasjon av TRG i laksefisk

Denne studien ga andre resultater enn den første publiserte kartleggingen av TRG-locuset i laks av Yazawa et al. (2008), og årsaken til det har sannsynligvis å gjøre med bruk av ulike metoder. Den store fremgangen innen genomsekvensering hos fisk siden 2008 har gjort det relativt enkelt å kartlegge TRG-gener *in silico*, og finne riktige primerpar fra de aktuelle regionene, for deretter å teste hvilke gener som uttrykkes i realiteten. Yazawa et al. fant at TRG var lokalisert på to ulike locus hvor TRG-kassetten nærmest 5'-enden var separert fra resten av genene med en lang genomisk region imellom. I motsetning er det vist i dette studiet at TRG er lokalisert på det samme kromosomet, men at det inneholder et stort mellomrom der TRG-kassetten nærmest 5'-enden tilsvarer det Yazawa identifiserte som TRG-locus 2 og de andre kassetene etter mellomrommet svarer til det Yazawa identifiserte som TRG-locus 1.

Årsaken til ovennevnte resultat var trolig på grunn av den kunstige bakteriekromosom-metoden de brukte som gir et mindre ryddig bilde og lett fører til overlapping av sekvenser. En annen mulig årsak er at det kan være store genetiske forskjeller pga. forskjellig genetisk bakgrunn,

mellom genomet som ble testet her og den fisken som *Yazawa et al.* testet. Av denne grunn bør genomer fra flere individer analyseres for å avklare hva som er riktig. Et argument for at resultatet i denne oppgaven er riktig er at blant de tre ulike genomsekvenseringene av laks som finnes i NCBI er organiseringen lik som her. Et annet argument er at NCBI-søket viste at mellomrommet som skiller den første og andre kassetten inneholder de samme genene (IIGP1 og IIGP5) som var rapportert på TRG-locus 2 i *Yazawa et al.* sin artikkel.

I tillegg er den generelle organiseringen som er observert i laks der den første TRG-kassetten er i revers transkripsjonell orientering, også identifisert i regnbueørret. Vi så at TRG-locuset i laks og regnbueørret både har de samme mellomliggende genene og de samme flankerende genene. Det indikerer at den genomiske organisasjonen av TRG er konservert mellom laks og regnbueørret. Regnbueørret og laks er de artene som har flest likhetstrekk i TRG-locuset. Begge har syv C-regioner, men den siste i regnbueørret er sannsynligvis ikke funksjonell på grunn av at den mangler eksonet som koder for transmembran region/ cytoplasmisk hale. Rekkefølgen av genene er identisk, men locuset er kortere (2,0 Mbp) i regnbueørret. TRG-locuset er mer konservert mellom artene på ytterkantene i locuset, da kassetten likner mer på hverandre i ytterkantene og variasjonen er større i kassetten som er midt i.

Når det gjelder andre arter i laksefamilien er det forskjeller i lengde, antall gener og lokaliseringen av dem fra art til art. Den nye informasjonen som er identifisert for TRG i atl. laks og regnbueørret skal sendes inn til IMGT for ny navngivning og klassifisering av V-familier. Det neste steget blir å undersøke sammenhengene mellom gener i ulike arter, og se om f.eks. TRGC som er identifisert i laks har homologe gener i regnbueørret. Generelt ser det ut som at TRGC6 i atl. laks er svært lik en eller flere TRG-gener i andre arter. Hvis det faktisk er sant, betyr det at genet er konservert og dermed vil det bli kalt TRGC6 i andre arter også.

Den generelle organiseringen av TRG i laksefisk med flere $V_{(n=1-4)}-J-C$ -kassetter på rad likner på det som er observert i kanalmalle (*Ictalurus punctatus*) (Crider, 2021 #132). TRG-locuset i kanalmalle består av 151 kbp og består av fire repeterte $V-J-C$ -kassetter. Totalt inneholder locuset femten TRGV-gener, ti TRGJ-gener og fire TRGC-gener, til sammenlikning har laks tolv TRGV-gener, syv TRGJ-gener og syv C-gener. Når det er sagt er denne organiseringen av flere repeterte kassetter forskjellig fra det som er rapportert i sebrafisk som har en singel kassetten bestående av syv TRGV, syv TRGJ og en TRGC ($V_7 - J_7 - C$) (Crider, 2021 #132). Dette understreker variasjon i organiseringen av TRGC-locuset fra art til art (omtalt av Antonacci, 2020 #40).

Måten TRG er organisert i kassetter i laksefisk og kanalmalle skiller seg på mange måter fra mennesker. Menneske og laks har ca. like mange V-gener (laks: 12 og menneske: 12-15), men utenom dette er det ganske forskjellig. Laks har mer komplisert organisering på grunn av flere C-gener, og dermed flere kassetter. Laks har syv C-gener og menneske to. Mens mennesker har alle V-genene samlet for seg selv i første delen av locuset ved 5'-enden, har laks de mer spredt utover med 1-3 V-gener i hver kassett. Laks har syv J, mens mennesker har fem J som alle er lokalisert ved 3'-enden. I mennesket er alle genene i TRG-locuset i revers orientering (Antonacci et al., 2020), men i laks er kun den første kassetten i revers orientering. Menneske har i motsetning til laks ikke et mellomrom som avbryter TRG-locuset.

Det faktum at laks har så mange TRGC-gener sammenliknet med mennesker, mus og andre fiskearter har sannsynligvis betydning for immunresponsen, men på hvilken måte er umulig å si. På grunn av at det er såpass mange C-gener er det en teori at det finnes ulike TRG-populasjoner, og at $\gamma\delta$ T-cellepopulasjonene muligens er mer uttalte i disse artene. Det er antydning at arter som har større diversitet i TR-genene som f.eks. drøvtyggere også har høyere nivåer av $\gamma\delta$ T-celler sammenliknet med arter som har lavere nivåer av $\gamma\delta$ T-celler som f.eks. mus og mennesker (Herzig, 2006 #134).

Noe annet som er spesielt for TRG-locuset er kassetten med C3 og J3 som ikke inkluderer et eget V-gen, dette skiller seg fra den typiske TRG-organiseringen i fisk. Dette bør undersøkes videre i forhold til om det er likt eller ulikt i andre arter i laksefamilien. Uttrykket av TRGC3-genet indikerer at V-J-kombinasjoner forekommer i de ulike kassetene. Det kan stilles spørsmål om V-genene alltid er lokalisert foran spesifikke J-gener, og om disse rekombineres med hverandre, eller om de kan «hoppe» til andre kassetter. Yazawa et al. (2008) så på dette og observerte at primere fra ulike V-gener kan kombinere med ulike C-gener. Flere studier på dette feltet er nødvendig.

4.2 Uttrykk av TRGC-gener

Primere for TRGC-, -1, -2, -3 og -5 hadde god primereffektivitet mellom 90-110 prosent. Det betyr at når en ser på responsen av disse i basalforsøket og PRV-forsøket kan responsen fra hvert gen sammenliknes direkte. Det var en overraskende observasjon at hverken TRGC4 eller TRGC6 ikke uttrykkes i det hele tatt, siden Yazawa (2008 #2) rapporterte det motsatte. I forsøket ble det testet tre ulike primerpar for TRGC4, og ingen av de virket. Det er en teori om

at de ulike TRGC-genene som er beskrevet for laks alle har unike connecting peptider som kanskje påvirker den tredimensjonale strukturen av reseptoren. Forskjellige mønstre i genuttrykk medfører ulike cellulære responser (Yazawa, 2008 #2). Det betyr at forskjellig struktur, sannsynligvis medfører at de fungerer på ulike måter.

Som regel består TRGC-regionene av tre eksoner hver: constant region, connecting peptide region og transmembran region, men det er noen unntak som at TRGC4 og TRGC6 mangler connecting peptide. TRGC1 har i tillegg et ekstra ekson som resulterer i en forlenget connecting peptide. En teori er sammenheng mellom tilstedeværelse av connecting peptide og uttrykk av genet, på grunn av at både TRG 4 og TRG 6 mangler connecting peptide og ingen av de uttrykkes. Connecting peptide kan også ha en betydning i forhold til gjenkjenning av antigener, og kan være med å gi fleksibilitet. For α -kjeden er det rapportert at connecting peptide har en funksjon i å fremme forbindelse til CD8, og dermed bidrar til effektiv signaltransduksjon (Mallaun et al., 2008). De fleste $\gamma\delta$ T-celler er CD8-negative i pattedyr, men i fisk er det usikkert.

Her er det også interessant å bemerke at TRGC2-genet uttrykkes svært lavt. Det kan indikere at dette genet er mindre viktig i immunresponser, men dette er noe som bør undersøkes ytterligere. Selv om TRGC2 hadde god primereffektivitet var uttrykket svært lavt i alle forsøk, og det er vanskelig å peke på noen grunn som kan forklare hvorfor. I **Figur 6** så vi at TRGC2 hører til i en kassett sammen med en J- og 3 V-gener, og i nukleotidsekvensen til TRGC2 (**Vedlegg 2 Figur 22**) ser man at den inneholder både connecting peptide, constant og transmembran region, i likhet med TRGC1, TRGC3 og TRGC5. Det er usikkert om TRGC2 uttrykket faktisk er for TRGC2-1 eller TRGC-2 (det nye), på grunn av at primerne potensielt kunne amplifisere begge to. Dermed er det fortsatt usikkert om begge to uttrykkes, og i hvilken grad. Basert på den høye nukleotididentiteten mellom TRGC2_1 og TRGC2_2 er det mulig at det kan ha skjedd en genduplikasjon i atlantisk laks. Det er et spørsmål om dette skjedde i en tidligere stamfar i laksefamilien eller om det har skjedd senere i utviklingen spesifikt i atlantisk laks.

I forsøket der basaluttrykket ble testet ble resultatet at TRGC1 og TRGC3 er ganske høyt uttrykt, TRGC5 ligger litt lavere og TRGC2 er nesten ikke uttrykt i det hele tatt (**Figur 12**). TRGC3 er særlig høy i gjellene, men TRGC1 og TRGC5 og TRD viser også et merkelig uttrykk i gjellene. Det er ikke usannsynlig at det finnes spesifikke populasjoner av TR $\gamma\delta$ i gjellene, det med tanke på at gjellene er et mucosalt organ, og som det er rapportert i pattedyr

finnes majoriteten av TR $\gamma\delta$ i mucosale vev. Det er også interessant med tanke på lokaliseringen av gjellene og at gjellene har en enorm overflate som gjør at det utsettes for et stort omfang av patogener. Dette bør det forskes mer på for å kunne sies med sikkerhet.

Repertoaret, det vil si antallet av V- og J-gener og hvordan de er kombinert bestemmer hva slags form antigenbindingssettet til T-cellereseptoren får. På den måten er V- og J-repertoaret av betydning for immunresponsen ved en eventuell infeksjon. Det er hovedsakelig antallet gener og «junctional» diversitet som påvirker repertoaret, lokalisering av de ulike genene har sannsynligvis ikke betydning.

4.3 TRD-repertoaranalyse

Analysen viste at utnyttelsen av TRDV-genene har en skjevfordelt distribusjon. Vi så at åtte gener (TRAV18_1, TRAV18_3, TRAV18_4, TRAV_18_5 og TRAV18_6, og TRAV21_1, TRAV21_2, TRAV22_1) utgjør så mye som 94-99 prosent av alle V-gener i TRD, mens de resterende V-genene er mer eller mindre ubetydelige. Hvorfor så få av TRDV genene utnyttes er vanskelig å svare på. J-genene hadde enda mer ensidig distribusjon da ett gen (TRDJ1_2) utgjør 99-100 prosent av de genene som utnyttes. Dette var som forventet da organiseringen av TRAD-locuset indikerte at spesifikke J kombineres med TRDC. Noe som var mer overraskende var at vi fant noen kombinasjoner bestående av TRDC og TRAJ. Disse resultatene står i motsetning til det repertoaret som er observert for TRA. I en studie av Edholm et al. (2021) der de kartla TRA/TRD; V- og J-gener i laks og regnbueørret, viste en liknende RACE-analyse at utnyttede TRAV er jevnere distribuert og de fleste genene uttrykkes på mucosalt og systemisk nivå.

Når en ser på resultatene fra RACE bør det minnes om hvordan det oppstår diversitet blant T-cellene; Når V og J rearrangeres under modningen av TCR skapes det diversitet på to måter; kombinatorisk diversitet som bestemmes av antall mulige kombinasjoner og junctional diversitet der det oppstår mellomrom og så legges det til tilfeldige N-nukleotider. Fremtidige analyser av disse RACE-resultatene kommer til å fokusere på analyse av CDR3-regionen, som er den med mest variasjon og er en nøkkelposisjon for antigenbinding. CD3-regionen er også sentral for å se på utnyttelse av TRDD i TRDC-sekvensene. Vi vil også se på er forskjeller i diversiteten mellom TRD-kjedene som bruker TRDV18, TRDV21 eller TRDV22.

Det finnes bare én type TRD, mens det uttrykkes fire funksjonelle TRGC (1, 2, 3 og 5). Slik at TRD kan kombinere med en av de fire funksjonelle TRGC. Det er på sikt et mål å kunne identifisere hvilke TRG/D-populasjoner som finnes i fisk og i hvilke organer man finner dem. Man vet fra pattedyr at TRG/D befinner seg i mucosale vev og overflater, som i fisk kan være hud, gjeller, magesekk, tarm og blindsekker. Med RACE-resultatene fra dette forsøket har man kommet et lite steg på veien, ved å finne hvilke gener som er dominerende i δ -kjeden i milt, hodenyre og tarm. Det gjenstår altså å gjøre det samme for TRG-kjeden. Neste trinn er å undersøke TRD- og TRG-repertoaret etter en virusinfeksjon for å se på den totale responsen fra $\gamma\delta$ T-celler, og hvordan de opererer. Dette bringer oss over til neste kapittel der vi brukte qPCR for å undersøke endringer i uttrykket av TRD- og TRGC-regioner.

4.4 Uttrykk av TRG- og TRD-kjeder etter PRV-infeksjon

Uttrykket av TRG- og TRD-kjeder ble målt i milt etter infeksjon med PRV. Milt ble valgt på bakgrunn av at det er et sekundært immunologisk organ, og det foregår trolig antigengjenkjenning her (Zapata, 2006 #135). I tillegg fordi det ble det vist i forsøket der basaluttrykket av TRG- og TRD ble undersøkt at de uttrykkes i milt (**Figur 12**, **Figur 13**).

I fremtidige forsøk hadde det vært interessant å undersøke uttrykket av TRG- og TRD etter en virusinfeksjon med tanke på at de helst befinner seg i mucosale vev. Det ble observert at særlig TRGC3 hadde høyt uttrykk i gjellene hos frisk fisk (**Figur 12**). Dessuten så ligger det nyoppdagede organet; interbranchialt lymfoid vev (ILT) i nær relasjon til gjellefilamentene. Det er bevist at ILT har T-celler (Haugarvoll, 2008 #32), men distribusjonen av TCR $\alpha\beta$ og TCR $\gamma\delta$ er foreløpig ukjent.

PRV-2 og PRV-3, er henholdsvis 80 og 89 prosent lik som PRV-1, men forårsaker ikke sykdom i laks. Poenget med å bruke levende virus som likner på det sykdomsfremkallende viruset er at det er den ultimate triggeren for å aktivere mekanismene som trengs for å bekjempe viruset. Når en bruker relaterte lav-virulente virus for å få en immuniserende effekt kalles det kryssbeskyttelse. Metoden innebærer potensielt farlige faktorer, og brukes derfor ikke i kommersielle vaksiner. Bruk av levende virus innebærer risiko for at viruset utvikler økt virulens over tid eller angriper nye arter, hvis det brukes til immunisering av større populasjoner. I et kontrollert eksperiment som dette er risikoen for utvikling av økt virulens minimal, men i teorien er det mulig at to segmenterte genotyper (f.eks. PRV-1 og PRV-3)

infiserer samme celle, og dermed kan reassortering av segmenter oppstå og danne rekombinanter med uforutsette og potensielt patogene egenskaper.

Mock Ktr. + PRV-1 og PRV-1 Ktr. er kontrollgrupper. Siden Mock Ktr. + PRV-1 ble introdusert for viruset for første gang i uke 10 har denne gruppen en primærrespons, og man forventet noe høyere verdier for denne gruppen. PRV-1 Ktr.-gruppen har også kun en primærinfeksjon, men denne gruppen har allerede vært infisert i 15 uker ved prøvetaking. Hos PRV-2 + PRV-1-gruppen ser man ingen respons sammenliknet med kontrollgruppene, noe som er forventet. For InPRV-1 + PRV-1-gruppen var det heller ikke forventet å se en tydelig respons, da man vet at denne formen for immunisering har dårlig effekt.

Forsøket der TRG-uttrykket ble målt 5 uker etter sekundærinfeksjon (**Figur 16**) førte til markant høyere log₂ fold change-verdier enn 5 og 10 uker etter primærinfeksjon (**Figur 14**). Det er fordi resultatene er kalkulert ved å sammenlikne med NC-gruppen fra uke 5 som ikke var infisert med noe virus. Ideelt skulle kontrollprøvene tatt ut samtidig med de andre i uke 15 fra fisk som ikke har gått gjennom noe infeksjon overhodet i helet forløpet.

PRV-forsøket viste at hos fisken som på forhånd ble immunisert med PRV-3 gikk uttrykket av alle TRGC (1, 2, 3 og 5) og TRA og TRD ned. Denne reduksjonen kan reflektere ulike scenario, som at T-celler i milt hos fisk immunisert med PRV-3 uttrykker TRGC-genene i mindre grad, og dermed har færre TCRs på overflaten etter PRV-1-infeksjonen, sammenliknet med fiskegruppene som ble immunisert med PRV-2 og InPRV-1. Et annet scenario er migrasjon av celler, enten at T-celler migrerer inn i milt eller at de migrerer til fra milt til andre organer og vev. Basert på dette var det en teori at man kunne få økt $\gamma\delta$ T-cellerespons i hjertet, på bakgrunn av at PRV er kjent for å angripe myokardceller i hjertet. Derfor ble det gjort et forsøk med PRV-infiserte hjerteprøver (eksperimentuke 15), men resultatene indikerte ikke at TRG ble oppregulert. qPCR resulterte i høye Ct-verdier for EF1 α som antydte at enten RNA-et eller cDNA-et hadde dårlig kvalitet. Dette er bare foreløpige resultater så forsøket må gjentas for å finne ut om $\gamma\delta$ T-celler har antivirale funksjoner i hjertet. En annen mulig, men mindre sannsynlig årsak til at man ikke så oppregulering kan muligens være at viruset ikke hadde kommet til det stadiet der det infiltrerer hjertet. Dersom TRA hadde blitt oppregulert, men ikke TRD (og TRG) kunne dette antydte at $\alpha\beta$ T-celler har en funksjon ved en PRV-infeksjon. Det er ikke tilfelle her siden TRD må kombinere med TRG så ville en økt respons fra TRD trolig betydd at man skulle sett en økt respons fra TRG også.

Med dette forsøket har vi dannet grunnlaget for å studere $\gamma\delta$ T-celleresponser enda mer i detalj. Nå vet vi at $\gamma\delta$ T-celler reguleres i milt etter virusinfeksjon både 5, 10 og 15 uker etter infeksjon. I tillegg indikerte forsøket at $\gamma\delta$ T-celler er involvert i den beskyttende responsen mot PRV-1 som ble observert som følge av immunisering med PRV-3.

5 Konklusjon

Oppgaven gjør rede for den andre kartleggingen av genomisk organisering av TRG-locus i laks, og den aller første rapporteringen av den genomiske organiseringen av TRG i regnbueørret. Sammenlikning mellom de to artene er beskrevet. TRG har annerledes organisering enn tidligere antatt, da TRG hos laksefisk er funnet lokalisert på et locus, ikke to ulike loci. Det er blant annet oppdaget et nytt J-gen og ett nytt C-gen. Kartleggingen tyder på at TRG-gener til en viss grad er konserverte mellom laks og regnbueørret. Videre er det funnet ut at de flankerende og mellomliggende genene er fullt konserverte mellom laks og regnbueørret.

Det neste steget er å fylogenetisk analysere sekvensene mellom arter for å finne ut om de ulike TRG-genene som er identifisert hos de ulike artene i laksefamilien er konserverte, eller om den relative distribusjonen av gener varierer fra art til art. Vi lurte blant annet på om TRGC1-genet finnes i regnbueørret.

Oppgaven har vist at laks har syv funksjonelle TRGC-gener som uttrykkes i vevet: TRGC1, TRGC2-1, TRGC2-2, TRGC3, TRGC4, TRGC5 og TRGC6. TRGC2 uttrykkes i liten grad, og det er usikkert om det er TRGC2-1 eller TRGC2-2 som uttrykkes.

Det er vist at TRGC-genene reguleres i milt etter infeksjon med PRV. Det tyder på at T-celler muligens migrerer ut av milt til andre vev og organer. Det kan være at de ikke migrerer til hjertet, men til andre organer.

Vi så at TRD-uttrykket har en fordeling av TRV- og TRJ-gener som er meget skjevt distribuert, noe som er totalt annerledes sammenliknet med TRA-uttrykket.

For å konkludere er det komplette TRG-locuset i laks og regnbueørret kartlagt, som er viktige trinn for å bedre definere og forstå hvordan disse TR-genene uttrykkes hos laksefisk. Funnene som er gjort kan på sikt bidra til bedre forståelse av immunsystemet i fisk, som gjør at det

forhåpentligvis vil bli mulig å utvikle virusvaksiner med bedre effektivitet enn de som er tilgjengelig i dag.

Referanseliste

- Abbas, A. K., Lichtman, A. H., & Pillai, S. (2019). *Basic Immunology Functions and Disorders of the Immune System* (6 ed.): Elsevier.
- Adams, G. (2020). A beginner's guide to RT-PCR, qPCR and RT-qPCR. *The Biochemist*, 42(3), 48-53. doi:10.1042/bio20200034
- Antonacci, R., Massari, S., Linguiti, G., Caputi Jambrenghi, A., Giannico, F., Lefranc, M.-P., & Ciccarese, S. (2020). Evolution of the T-Cell Receptor (TR) Loci in the Adaptive Immune Response: The Tale of the TRG Locus in Mammals. *Genes*, 11(6), 624. Retrieved from <https://www.mdpi.com/2073-4425/11/6/624>
- Bernard, D., Six, A., Rigottier-Gois, L., Messiaen, S., Chilmonczyk, S., Quillet, E., . . . Benmansour, A. (2006). Phenotypic and functional similarity of gut intraepithelial and systemic T cells in a teleost fish. *J Immunol*, 176(7), 3942-3949. doi:10.4049/jimmunol.176.7.3942
- Bianconi, E., Piovesan, A., Facchin, F., Beraudi, A., Casadei, R., Frabetti, F., . . . Canaider, S. (2013). An estimation of the number of cells in the human body. *Annals of Human Biology*, 40(6), 463-471. doi:10.3109/03014460.2013.807878
- Bjørngen, H., & Koppang, E. O. (2021). Anatomy of teleost fish immune structures and organs. *Immunogenetics*, 73(1), 53-63. doi:10.1007/s00251-020-01196-0
- Bjørngen, H., Løken, O. M., Aas, I. B., Fjellidal, P. G., Hansen, T., Austbø, L., & Koppang, E. O. (2019). Visualization of CCL19-like transcripts in the ILT, thymus and head kidney of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Fish & Shellfish Immunology*, 93, 763-765. doi:<https://doi.org/10.1016/j.fsi.2019.08.044>
- Bjørngen, H., Wessel, Ø., Fjellidal, P. G., Hansen, T., Sveier, H., Sæbø, H. R., . . . Koppang, E. O. (2015).
- Piscine orthoreovirus (PRV) in red and melanised foci in white muscle of Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Veterinary Research*, 46(1), 89. doi:10.1186/s13567-015-0244-6
- Boudinot, P., Boubekeur, S., & Benmansour, A. (2001). Rhabdovirus Infection Induces Public and Private T Cell Responses in Teleost Fish. *The Journal of Immunology*, 167(11), 6202-6209. doi:10.4049/jimmunol.167.11.6202
- Brandes, M., Willimann, K., Bioley, G., Lévy, N., Eberl, M., Luo, M., . . . Moser, B. (2009). Cross-presenting human gammadelta T cells induce robust CD8+ alphabeta T cell responses. *Proc Natl Acad Sci USA*, 106(7), 2307-2312. doi:10.1073/pnas.0810059106
- Buonocore, F., Castro, R., Randelli, E., Lefranc, M.-P., Six, A., Kuhl, H., . . . Scapigliati, G. (2012). Diversity, molecular characterization and expression of T cell receptor γ in a teleost fish, the sea bass (*Dicentrarchus labrax*, L.). *PLOS ONE*, 7(10), e47957.
- Buonocore, F., Randelli, E., Bird, S., Secombes, C. J., Costantini, S., Facchiano, A., . . . Scapigliati, G. (2006). The CD8 α from sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.): cloning, expression and 3D modelling. *Fish & Shellfish Immunology*, 20(4), 637-646.
- Chen, C., Hsu, H., Hudgens, E., Telfer, J. C., & Baldwin, C. L. (2014). Signal Transduction by Different Forms of the $\gamma\delta$ T Cell-Specific Pattern Recognition Receptor WC1. *The Journal of Immunology*, 193(1), 379-390. doi:10.4049/jimmunol.1400168
- Chilmonczyk, S. (1983). The thymus of the rainbow trout (*Salmo gairdneri*). Light and electron microscopic study. *Dev Comp Immunol*, 7(1), 59-68. doi:10.1016/0145-305x(83)90055-1
- Dalmo, A. R., & Bøgvold, J. (2020). Historisk blick - og nåværende vaksiner i norsk fiskeoppdrett. *Naturen*(5), 207-213. doi:10.18261/issn.1504-3118-2020-05-09
- Dalum, A. S., Austbø, L., Bjørngen, H., Skjødt, K., Hordvik, I., Hansen, T., . . . Koppang, E. O. (2015). The interbranchial lymphoid tissue of Atlantic Salmon (*Salmo salar* L.) extends

- as a diffuse mucosal lymphoid tissue throughout the trailing edge of the gill filament. *J Morphol*, 276(9), 1075-1088. doi:10.1002/jmor.20403
- Dhamotharan, K., Vendramin, N., Markussen, T., Wessel, Ø., Cuenca, A., Nyman, I. B., . . . Rimstad, E. (2018). Molecular and Antigenic Characterization of Piscine orthoreovirus (PRV) from Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Viruses*, 10(4), 170. Retrieved from <https://www.mdpi.com/1999-4915/10/4/170>
- Díaz-Rosales, P., Bird, S., Wang, T. H., Fujiki, K., Davidson, W. S., Zou, J., & Secombes, C. J. (2009). Rainbow trout interleukin-2: cloning, expression and bioactivity analysis. *Fish Shellfish Immunol*, 27(3), 414-422. doi:10.1016/j.fsi.2009.06.008
- 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. *Front Immunol*, 12, 753960-753960. doi:10.3389/fimmu.2021.753960
- Fischer, C., Bouneau, L., Ozouf-Costaz, C., Crnogorac-Jurcevic, T., Weissenbach, J., & Bernot, A. (2002). Conservation of the T-Cell Receptor α/δ Linkage in the Teleost Fish *Tetraodon nigroviridis*. *Genomics*, 79(2), 241-248. doi:<https://doi.org/10.1006/geno.2002.6688>
- Flajnik, M. F., & Kasahara, M. (2010). Origin and evolution of the adaptive immune system: genetic events and selective pressures. *Nature Reviews Genetics*, 11(1), 47-59. doi:10.1038/nrg2703
- Forster, A., Huck, S., Ghanem, N., Lefranc, M. P., & Rabbitts, T. H. (1987). New subgroups in the human T cell rearranging V gamma gene locus. *Embo j*, 6(7), 1945-1950.
- Garseth, Å. H., Moldal, T., Gåsnes, S. K., Hjortaa, M. J., Sollien, V. P., & Gjevre, A.-G. (2019). Piscine orthoreovirus-3 is prevalent in wild seatrout (*Salmo trutta* L.) in Norway. *Journal of Fish Diseases*, 42(3), 391-396. doi:<https://doi.org/10.1111/jfd.12943>
- Haire, R. N., Rast, J. P., Litman, R. T., & Litman, G. W. (2000). Characterization of three isotypes of immunoglobulin light chains and T-cell antigen receptor α in zebrafish. *Immunogenetics*, 51(11), 915-923.
- Hansen, J. D., & Strassburger, P. (2000). Description of an Ectothermic TCR Coreceptor, CD8 α , in Rainbow Trout. *The Journal of Immunology*, 164(6), 3132-3139. doi:10.4049/jimmunol.164.6.3132
- Haugarvoll, E., Bjerkås, I., Nowak, B. F., Hordvik, I., & Koppang, E. O. (2008). Identification and characterization of a novel intraepithelial lymphoid tissue in the gills of Atlantic salmon. *Journal of Anatomy*, 213(2), 202-209. doi:<https://doi.org/10.1111/j.1469-7580.2008.00943.x>
- Hauge, H., Dahle, M., Moldal, T., Thoen, E., Gjevre, A.-G., Weli, S., . . . Grove, S. (2016). Piscine orthoreovirus can infect and shed through the intestine in experimentally challenged Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Veterinary Research*, 47(1), 57. doi:10.1186/s13567-016-0343-z
- Holtmeier, W., & Kabelitz, D. (2005). $\gamma\delta$ T cells link innate and adaptive immune responses. *Chem Immunol Allergy*, 86, 151-183. doi:10.1159/000086659
- Hordvik, I., Torvund, J., Moore, L., & Endresen, C. (2004). Structure and organization of the T cell receptor alpha chain genes in Atlantic salmon. *Molecular immunology*, 41(5), 553-559.
- Janeway Jr, C. A., Travers, P., Walport, M., & Shlomchik, M. J. (2001). T-cell receptor gene rearrangement. In *Immunobiology: The Immune System in Health and Disease*. 5th edition: Garland Science.
- Kamper, S. M., & McKinney, C. E. (2002). Polymorphism and evolution in the constant region of the T-cell receptor beta chain in an advanced teleost fish. *Immunogenetics*, 53(12), 1047-1054.

- Karsi, A., & Waldbieser, G. (2004). PARTIAL CLONING OF T-CELL RECEPTOR ALPHA (TCRA) GENE AND ASSIGNMENT TO TCRA AND TCRB GENES TO THE CATFISH LINKAGE MAP. *Animal genetics*, 35, 150-151.
- Koppang, E. O., Fischer, U., Moore, L., Tranulis, M. A., Dijkstra, J. M., Köllner, B., . . . Hordvik, I. (2010). Salmonid T cells assemble in the thymus, spleen and in novel interbranchial lymphoid tissue. *J Anat*, 217(6), 728-739. doi:10.1111/j.1469-7580.2010.01305.x
- Kühl, A. A., Pawlowski, N. N., Grollich, K., Blessenohl, M., Westermann, J., Zeitz, M., . . . Hoffmann, J. C. (2009). Human peripheral gammadelta T cells possess regulatory potential. *Immunology*, 128(4), 580-588. doi:10.1111/j.1365-2567.2009.03162.x
- Laydon, D. J., Bangham, C. R. M., & Asquith, B. (2015). Estimating T-cell repertoire diversity: limitations of classical estimators and a new approach. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 370(1675), 20140291. doi:doi:10.1098/rstb.2014.0291
- Lea, T. (Ed.) (2002). *Immunologi og immunologiske teknikker* (3. ed.). Bergen: Fagbokforlaget Vigmostad & Bjørke AS.
- Lefranc, M. (2000). Locus maps and genomic repertoire of the human T-cell receptor genes. *Immunologist*, 8(3), 72-79.
- Lefranc, M.-P. (2006). Using bioinformatics tools for the sequence analysis of immunoglobulins and T cell receptors. In (pp. Appendix 1W). [New York] .:
- Lefranc, M. P. (2014). Immunoglobulin and T Cell Receptor Genes: IMGT(®) and the Birth and Rise of Immunoinformatics. *Front Immunol*, 5, 22. doi:10.3389/fimmu.2014.00022
- Lefranc, M. P., & Rabbits, T. H. (1990). Genetic organization of the human T-cell receptor γ and δ loci. *Research in Immunology*, 141(6), 565-577. doi:[https://doi.org/10.1016/0923-2494\(90\)90058-7](https://doi.org/10.1016/0923-2494(90)90058-7)
- Lefranc, M. P., & Rabbits, T. H. (1985). Two tandemly organized human genes encoding the T-cell gamma constant-region sequences show multiple rearrangement in different T-cell types. *Nature*, 316(6027), 464-466. doi:10.1038/316464a0
- Løken, O. M., Bjørgen, H., Hordvik, I., & Koppang, E. O. (2020). A teleost structural analogue to the avian bursa of Fabricius. *Journal of Anatomy*, 236(5), 798-808. doi:<https://doi.org/10.1111/joa.13147>
- Malik, M. S., Teige, L. H., Braaen, S., Olsen, A. B., Nordberg, M., Amundsen, M. M., . . . Dahle, M. K. (2021). Piscine Orthoreovirus (PRV)-3, but Not PRV-2, Cross-Protects against PRV-1 and Heart and Skeletal Muscle Inflammation in Atlantic Salmon. *Vaccines*, 9(3), 230. Retrieved from <https://www.mdpi.com/2076-393X/9/3/230>
- Mallaun, M., Naeher, D., Daniels, M. A., Yachi, P. P., Hausmann, B., Luescher, I. F., . . . Palmer, E. (2008). The T Cell Receptor's α -Chain Connecting Peptide Motif Promotes Close Approximation of the CD8 Coreceptor Allowing Efficient Signal Initiation. *The Journal of Immunology*, 180(12), 8211-8221. doi:10.4049/jimmunol.180.12.8211
- Meeker, N. D., Smith, A. C., Frazer, J. K., Bradley, D. F., Rudner, L. A., Love, C., & Trede, N. S. (2010). Characterization of the zebrafish T cell receptor β locus. *Immunogenetics*, 62(1), 23-29.
- Mikalsen, A. B., Haugland, O., Rode, M., Solbakk, I. T., & Evensen, O. (2012). Atlantic Salmon Reovirus Infection Causes a CD8 T Cell Myocarditis in Atlantic Salmon (*Salmo salar* L.). *PLOS ONE*, 7(6), e37269. doi:10.1371/journal.pone.0037269
- Moore, L., Somamoto, T., Lie, K., Dijkstra, J., & Hordvik, I. (2005). Characterisation of salmon and trout CD8 α and CD8 β . *Molecular immunology*, 42(10), 1225-1234.
- Moore, L. J., Dijkstra, J. M., Koppang, E. O., & Hordvik, I. (2009). CD4 homologues in Atlantic salmon. *Fish & Shellfish Immunology*, 26(1), 10-18. doi:<https://doi.org/10.1016/j.fsi.2008.09.019>

- Moulana, M., Taylor, E. B., Edholm, E.-S., Quiniou, S. M. A., Wilson, M., & Bengtén, E. (2014). Identification and characterization of TCR γ and TCR δ chains in channel catfish, *Ictalurus punctatus*. *Immunogenetics*, *66*(9), 545-561. doi:10.1007/s00251-014-0793-2
- Nam, B.-H., Hirono, I., & Aoki, T. (2003). The four TCR genes of teleost fish: the cDNA and genomic DNA analysis of Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) TCR α -, β -, γ -, and δ -chains. *The Journal of Immunology*, *170*(6), 3081-3090.
- Olsen, A. B., Hjortaas, M., Tengs, T., Hellberg, H., & Johansen, R. (2015). First Description of a New Disease in Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss* (Walbaum)) Similar to Heart and Skeletal Muscle Inflammation (HSMI) and Detection of a Gene Sequence Related to Piscine Orthoreovirus (PRV). *PLOS ONE*, *10*(7), e0131638. doi:10.1371/journal.pone.0131638
- Palacios, G., Lovoll, M., Tengs, T., Hornig, M., Hutchison, S., Hui, J., . . . Lipkin, W. I. (2010). Heart and Skeletal Muscle Inflammation of Farmed Salmon Is Associated with Infection with a Novel Reovirus. *PLOS ONE*, *5*(7), e11487. doi:10.1371/journal.pone.0011487
- Partula, S., de Guerra, A., Fellah, J. S., & Charlemagne, J. (1996). Structure and diversity of the TCR alpha-chain in a teleost fish. *The Journal of Immunology*, *157*(1), 207-212.
- Partula, S., Fellah, J. S., de Guerra, A., & Charlemagne, J. (1994). [Characterization of cDNA of T-cell receptor beta chain in rainbow trout]. *Comptes rendus de l'Academie des sciences. Serie III, Sciences de la vie*, *317*(8), 765-770. Retrieved from <http://europepmc.org/abstract/MED/7882160>
- Patel, S., Øvergård, A.-C., & Nerland, A. H. (2008). CD8 α and CD8 β in Atlantic halibut, *Hippoglossus hippoglossus*: cloning, characterization and gene expression during viral and bacterial infection. *Fish & Shellfish Immunology*, *25*(5), 570-580.
- Press, C. M., & Evensen, Ø. (1999). The morphology of the immune system in teleost fishes. *Fish & Shellfish Immunology*, *9*(4), 309-318. doi:<https://doi.org/10.1006/fsim.1998.0181>
- Qin, G., Mao, H., Zheng, J., Sia, S. F., Liu, Y., Chan, P. L., . . . Tu, W. (2009). Phosphoantigen-expanded human gammadelta T cells display potent cytotoxicity against monocyte-derived macrophages infected with human and avian influenza viruses. *J Infect Dis*, *200*(6), 858-865. doi:10.1086/605413
- Randelli, E., Scala, V., Casani, D., Costantini, S., Facchiano, A., Mazzini, M., . . . Buonocore, F. (2008). T cell receptor beta chain from sea bream (*Sparus aurata*): molecular cloning, expression and modelling of the complexes with MHC class I. *Molecular immunology*, *45*(7), 2017-2027.
- Rombout, J. H., Huttenhuis, H. B., Picchietti, S., & Scapigliati, G. (2005). Phylogeny and ontogeny of fish leucocytes. *Fish Shellfish Immunol*, *19*(5), 441-455. doi:10.1016/j.fsi.2005.03.007
- Rosati, E., Dowds, C. M., Liaskou, E., Henriksen, E. K. K., Karlsen, T. H., & Franke, A. (2017). Overview of methodologies for T-cell receptor repertoire analysis. *BMC Biotechnol*, *17*(1), 61-61. doi:10.1186/s12896-017-0379-9
- Secombes, C. (2008). Will advances in fish immunology change vaccination strategies? *Fish Shellfish Immunol*, *25*(4), 409-416. doi:10.1016/j.fsi.2008.05.001
- Shen, W., Le, S., Li, Y., & Hu, F. (2016). SeqKit: A Cross-Platform and Ultrafast Toolkit for FASTA/Q File Manipulation. *PLOS ONE*, *11*(10), e0163962. doi:10.1371/journal.pone.0163962
- Somamoto, T., Yoshiura, Y., Nakanishi, T., & Ototake, M. (2005). Molecular cloning and characterization of two types of CD8 α from ginbuna crucian carp, *Carassius auratus langsdorfii*. *Developmental & Comparative Immunology*, *29*(8), 693-702.

- Suetake, H., Araki, K., Akatsu, K., Somamoto, T., Dijkstra, J. M., Yoshiura, Y., . . . Suzuki, Y. (2007). Genomic organization and expression of CD8 α and CD8 β genes in fugu *Takifugu rubripes*. *Fish & Shellfish Immunology*, *23*(5), 1107-1118.
- Takano, T., Nawata, A., Sakai, T., Matsuyama, T., Ito, T., Kurita, J., . . . Nakayasu, C. (2016). Full-Genome Sequencing and Confirmation of the Causative Agent of Erythrocytic Inclusion Body Syndrome in Coho Salmon Identifies a New Type of Piscine Orthoreovirus. *PLOS ONE*, *11*(10), e0165424. doi:10.1371/journal.pone.0165424
- Takizawa, F., Dijkstra, J. M., Kotterba, P., Korytář, T., Kock, H., Köllner, B., . . . Fischer, U. (2011). The expression of CD8 α discriminates distinct T cell subsets in teleost fish. *Developmental & Comparative Immunology*, *35*(7), 752-763. doi:<https://doi.org/10.1016/j.dci.2011.02.008>
- Taylor, I. S., Adam, B., Veverková, M., Tatner, M. F., Low, C., Secombes, C., & Birkbeck, T. H. (2005). T-cell antigen receptor genes in turbot (*Scophthalmus maximus* L.). *Fish and Shellfish Immunology*, *18*, 445-448.
- Teige, L. H., Lund, M., Haatveit, H. M., Røsæg, M. V., Wessel, Ø., Dahle, M. K., & Storset, A. K. (2017). A bead based multiplex immunoassay detects Piscine orthoreovirus specific antibodies in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Fish Shellfish Immunol*, *63*, 491-499. doi:10.1016/j.fsi.2017.02.043
- Tort, L. (2011). Stress and immune modulation in fish. *Dev Comp Immunol*, *35*(12), 1366-1375. doi:10.1016/j.dci.2011.07.002
- Toulon, A., Breton, L., Taylor, K. R., Tenenhaus, M., Bhavsar, D., Lanigan, C., . . . Havran, W. L. (2009). A role for human skin-resident T cells in wound healing. *J Exp Med*, *206*(4), 743-750. doi:10.1084/jem.20081787
- Vendramin, N., Kannimuthu, D., Olsen, A. B., Cuenca, A., Teige, L. H., Wessel, Ø., . . . Olesen, N. J. (2019). Piscine orthoreovirus subtype 3 (PRV-3) causes heart inflammation in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Veterinary Research*, *50*(1), 14. doi:10.1186/s13567-019-0632-4
- Vijaykrishna, D., Mukerji, R., & Smith, G. J. D. (2015). RNA Virus Reassortment: An Evolutionary Mechanism for Host Jumps and Immune Evasion. *PLoS pathogens*, *11*(7), e1004902-e1004902. doi:10.1371/journal.ppat.1004902
- Wan, F., Hu, C.-b., Ma, J.-x., Gao, K., Xiang, L.-x., & Shao, J.-z. (2017). Characterization of $\gamma\delta$ T Cells from Zebrafish Provides Insights into Their Important Role in Adaptive Humoral Immunity. *Frontiers in Immunology*, *7*. doi:10.3389/fimmu.2016.00675
- Wang, F., Herzig, C., Ozer, D., Baldwin, C. L., & Telfer, J. C. (2009). Tyrosine phosphorylation of scavenger receptor cysteine-rich WC1 is required for the WC1-mediated potentiation of TCR-induced T-cell proliferation. *European Journal of Immunology*, *39*(1), 254-266. doi:<https://doi.org/10.1002/eji.200838472>
- Wermenstam, N., & Pilström, L. (2001). T-cell antigen receptors in Atlantic cod (*Gadus morhua* L.): structure, organisation and expression of TCR α and β genes. *Developmental & Comparative Immunology*, *25*(2), 117-135.
- Wessel, Ø., Braaen, S., Alarcon, M., Haatveit, H., Roos, N., Markussen, T., . . . Rimstad, E. (2017). Infection with purified Piscine orthoreovirus demonstrates a causal relationship with heart and skeletal muscle inflammation in Atlantic salmon. *PLOS ONE*, *12*(8), e0183781. doi:10.1371/journal.pone.0183781
- Wessel, Ø., Olsen, C. M., Rimstad, E., & Dahle, M. K. (2015). Piscine orthoreovirus (PRV) replicates in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) erythrocytes ex vivo. *Veterinary Research*, *46*(1), 26. doi:10.1186/s13567-015-0154-7
- Wilson, M., Zhou, H., Bengten, E., Clem, L., Stuge, T., Warr, G., & Miller, N. W. (1998). T-cell receptors in channel catfish: structure and expression of TCR α and β genes. *Molecular immunology*, *35*(9), 545-557.

- Workalemahu, G., Foerster, M., Kroegel, C., & Braun, R. K. (2003). Human gamma delta-T lymphocytes express and synthesize connective tissue growth factor: effect of IL-15 and TGF-beta 1 and comparison with alpha beta-T lymphocytes. *J Immunol*, *170*(1), 153-157. doi:10.4049/jimmunol.170.1.153
- Wu, Y., Wu, W., Wong, W. M., Ward, E., Thrasher, A. J., Goldblatt, D., . . . Gustafsson, K. (2009). Human $\gamma\delta$ T Cells: A Lymphoid Lineage Cell Capable of Professional Phagocytosis. *The Journal of Immunology*, *183*(9), 5622. doi:10.4049/jimmunol.0901772
- Yazawa, R., Cooper, G. A., Beetz-Sargent, M., Robb, A., McKinnel, L., Davidson, W. S., & Koop, B. F. (2008). Functional adaptive diversity of the Atlantic salmon T-cell receptor gamma locus. *Mol Immunol*, *45*(8), 2150-2157. doi:10.1016/j.molimm.2007.12.007
- Zhou, H., Bengtén, E., Miller, N. W., Clem, L. W., & Wilson, M. (2003). The T cell receptor β locus of the channel catfish, *Ictalurus punctatus*, reveals unique features. *The Journal of Immunology*, *170*(5), 2573-2581.
- Zwollo, P., Cole, S., Bromage, E., & Kaattari, S. (2005). B cell heterogeneity in the teleost kidney: evidence for a maturation gradient from anterior to posterior kidney. *J Immunol*, *174*(11), 6608-6616. doi:10.4049/jimmunol.174.11.6608

Vedlegg 1

Tabell 4. Viser alle kit som ble benyttet med produsent og katalognummer

Kit	Produsent
NucleoSpin Gel and PCR Clean-Up	Macherey-Nagel (kat.nr. 740609.10)
RNeasy Mini Kit	Quiagen (kat.nr. 74106)
SMARTer RACE 5'/3' Kit Components	Takara (kat.nr. 634860)
TaqMan Reverse Transcription Reagents	Termo Fischer Scientific (kat.nr. N8080234)

Tabell 5. Viser alle benyttede kjemikalier og reagenser med produsent og katalognummer

Kjemikalier og reagenser	Produsent
1 kb Plus DNA Ladder	Invitrogen (kat. nr. 10787-018)
10X RT Buffer	Termo Fischer Scientific (kat. nr. N8080234)
50 mM EDTA	Termo Fischer Scientific
6X Trirack Loading Dye	Termo Scientific (kat. nr. R1161)
dNTP mix 10 nM	Termo Fischer Scientific (kat. nr. N8080234)
Etanol	Sigma-Aldrich
Fast SYBR Green Master Mix	Applied Biosystems (kat. nr. 4385612)
MgCl ₂ Solution	Termo Fischer Scientific (kat. nr. N8080234)
Multiscribe Reverse Transcriptase	Termo Fischer Scientific (kat. nr. 4311235)
Random Hexamer	Termo Fischer Scientific (kat. nr. N8080127)
RNase Inhibitor	Termo Fischer Scientific (kat. nr. N8080119)
Topvision Agarose	Termo Scientific
DNase I, RNase-free	Termo Scientific (kat. nr. EN0521)
10X reaction buffer with MgCl ₂	Termo Scientific (kat. nr. B43)

Tabell 6. Viser reagenser og volum brukt i cDNA-syntese

Reagenser brukt i cDNA-syntese	Volum per reaksjon
DNase-behandlet RNA	1000 ng (9,6 µl)

50 mM EDTA	1 μ l
10X RT Buffer	2,0 μ l
dNTP mix 10 nM	4,0 μ l
MgCl ₂ Solution	1,4 μ l
Multiscribe Reverse Transcriptase	1,0 μ l
RNase Inhibitor	1,0 μ l
Random Hexamer	1,0 μ l
Totalt	20 μl

Tabell 7. Viser reagenser og volum brukt i qPCR-reaksjon

Løsning for qPCR-reaksjon	Volum per reaksjon
Mix m/ forward og reverse primer	2,5 μ l 10 nM
Fast SYBR Green Master Mix	5 μ l
cDNA	2,5 μ l
Totalt	10 μl

Tabell 8. Reagenser og volum brukt i first-strand cDNA-syntese

Buffermiks-reagenser	Volum per reaksjon
5X First-Strand Buffer	4 μ l
Dithiothreitol (DTT) (100nM)	0,5 μ l
dNTP mix (20 nM)	1,0 μ l
Totalt	5,5 μl
RNA	750 ng (1,0-10 μ l)
5' RACE CDS Primer A	1,0 μ l
Ultra pure H ₂ O	0-9 μ l
SMARTer II A Oligonucleotide	1 μ l
Mastermiks for RACE-klart cDNA	

Buffermiks	5,5 μ l
RNase Inhibitor (40 U/ μ l)	0,5 μ l
SMARTScribe Reverse Transcriptase (100 U)	2,0 μ l
Totalt	20 μl

Tabell 9. Reagenser og volum som ble brukt i RACE-reaksjon

Reagenser i RACE-reaksjon	Volum
Mastermiks	
PCR-grade H ₂ O	93 μ l
2X SeqAmp Buffer	150 μ l
SeqAmp DNA Polymerase	6 μ l
Totalt	249 μl
PCR-løsning	
5' RACE-klart cDNA	2,5 μ l
10X UPM (Universal Primer Mix)	5 μ l
5' GSP (10 μ M) (Gene specific primer)	1 μ l
Mastermiks	41,5 μ l
Totalt	50 μl

Tabell 10. Oversikt over PCR-programmet brukt i RACE-metoden for amplifisering av TRD.

	5 sykluser	5 sykluser	25 sykluser
1. Dissosieringsfase	94 °C 30 sek	94 °C 30 sek	94 °C 30 sek
2. Annealing	72 °C 2 min	70 °C 30 sek	68 °C 30 sek
3. Ekstensjon		72 °C 2 min	72 °C 2 min

Tabell 11. Temperaturprogram for RACE-PCR

5 sykluser:	5 sykluser:	25 sykluser:
94 °C 30 sek	94 °C 30 sek	94 °C 30 sek
72 °C 2 min	70 °C 30 sek	68 °C 30 sek
	72 °C 2 min	72 °C 2 min

Tabell 12. Primere brukt i basalforsøk og PRV-forsøk. F for fremover- og R for revers.

Primer	Sekvens	Produsent: Sigma-Aldrich
Elongeringsfaktor 1 α F	CCCCTCCAGGACGTTTACA	
Elongeringsfaktor 1 α R	CACACGGCCACAGGTACA	
TRGC1 F	TTGGGCACTCAAGATGTTGACATA	
TRGC1 R	TGGATCCTCATAGGTAACGTGCAG	
TRGC2 F	GGCCCTCAAGATGTAAACATACCA	
TRGC2 R	GGACTTTAATGAATCGTTGGTAAC	
TRGC3 F	GGCCCTCAAGATGTTTACATGCTA	
TRGC3 R	CTGTGTGTCATTTCTGAACGAACA	
TRGC4 F	TGATAAAGAGAATGCGTACAAGAA	
TRGC4 R	ATGAAGGAGAAGGGATCTTTTAGC	
TRGC4 R2	CAGGTGTTGTGTCCACTTCCCCAT	
TRGC4 R3	CAGACTGCACATGAAGGAGAAGGG	
TRGC5 F	GTCTGTTCTGTGGAGCATGAATGG	
TRGC5 R	CTGCAGAGTCAGTGGCTCCTGCGT	
TRGC6 F	GTATCAAGGAAAGGCAGATGCCA	
TRGC6 R	AGGTTGTTTGGCTACCTTTTGAT	
GSP2	5' <u>GATTACGCCAAGCTT</u> CACTCTTGTGTAGTGGGGTGAG GATG	

Vedlegg 2

SALSAL_TRG_C6	AGCCCCCTACCTGA-----	435
SASA_TCRG2_2	AGACCCAAAACCTGTAGACAAATTCATTGA	507
SALSAL_TRG_C2	AGACCCAAAACCTGTAGACAAATTCATTGA	507
SALSAL_TRG_C1	AGACCCAGCACCAGTAGACCCATACATTGA	570
SALSAL_TRG_C3	GGACCCAGCACCTGTAGACACATTTATTGA	537
SALSAL_TRG_C4	TGGACACAACACCTGTAG-----	432
SALSAL_TRG_C5	GGACCCAGCACCTGA-----	495

Figur 22. Sammenlikning av TRGC-nukleotider. Connecting peptide er markert i rosa og ekstra ekson i blått.

```

>SASA TCRG2 2
NPKVTVYPASKPEPNRKTLLCLARDMFPDLVKISWKMDKNGRTVEVPKAERELEQREEGRITSMIIIDKDKTYSNKYS
CSVEHEGGPQDVDIPEDEPTEASPTTMAAPTTLQVTNDSFKSICGLNLASLVYTVMIVKSMVYCYGLSFLHYRNMGCRPK
TCRQIH-

>SALSAL TRG C1
KPKVTVYSVSKPEPNRKTLLCLARDMFPDLVKISWKMDKNGRTMEVPKAEMEELEQREEGRITSMIIIDKEKTYRNKYI
CSVEHKLGTQDVDIPEDEPTEAPPTTMAAPTTLHVTYEDPTEAPPSTKAAPTALQATNLSFQSTCSLNLASLVYTVMIVKS
MVYCCALSLLLHKRNLGSRPSTSRPIH-

>SALSAL TRG C2 1
KPKVTVYPASKPEPNRKTLLCLARDMFPDLVKISWKMDENGQTVVEVPKAERELEQREEGRITSMIIIDKDKTYRNKYS
CSVEHEGGPQDVNIPEDEPTEASPTTMAAPTTLQVTNDSLKSICSLNLASLVYTVMIVKSMVYCYGLSFLHYRNMGCRPK
TCRQIH-

>SALSAL TRG C3
KPKVTVYSESNPESNVNTLLCLAGDMFPDLVKISWKMEDENGRAVEVPKAEGEQLEQREEGQTTSMIITDKEKIYRNKYIC
SVEHEGGPQDVYMLKDEPTEAPPTTVAAPTCFRNDTQSQSLHLTDLSFQSTFSLNLASILYTVMIVKSMVYCCGLSILL
HHRSLGRGPSTCRHIY-

>SALSAL TRG C4
KPKVTVYPASNPESENGKTLLCLARDMFPDLVKISWKMEDEYQTVVEVSKAETEQLQREEGQTTSMIIDKENAYKNKYR
CYVEHEGDPQDVDMKLDFFSFMCSLNLASLVYTVMIVKSMVYCCGLSLLLHHRNMGKWTQHL-

>SALSAL TRG C5
KPKVTVYPASNSESENGKTLLCLARDMFPDLVKISWKIEDANGRRMEVSKAETEQLQREEGQTTSMIIDKEKTYRNKYV
CSVEHEWGAQQFDIPEDEPPTCPFRNDTQEPPLTLOFTEDLSFQSTCSLNLASVVYTVMIVKSMVYCCGLSLLLHHRILGRGP
ST-

>SALSAL TRG C6
KPKVTVMYLAFKPELNGKTLLCLARDMFPDLVKISWKMEDENGRTVEVPKAEMEQLQREEGQTTSMIIMYQ GKADAKYIC
SVEHEAGPEEADTPKGSQTFQSMCSLRLASLVYTVMIAKSMLYCCGLSLLLHHRNMGNSPPT-

```

Figur 23. TRGC-aminosyrer. Grønn = constant region, rosa = connecting peptide, gult = transmembran region, blått = ekstra ekson

TRGJ6	Cgtttttgcctaggatttacttggagtggtgattctggatctgggacacaggagattttgc	60
TRJ5	Actttttgagaaggga-----attttcaactgtga--aggctcg	36
TRGJ4	Acttattgacaagaga-----gttttcacagtgatgcttatg	38
TRGJ3	Actttttgacaaggga-----attttcaactgtgatggttatg	38
TRGJ1	Actttttgtcaaggga-----attttcaactgtgatgcaacttt	38
TRGJ2_2	Actttttgacaaggga-----attttcaactgtgatgtacttg	38
TRGJ2_1	Actttttgacaaggga-----attttcaactgtgatgtacttg	38
	** **	* ** *
TRGJ6	ggtttgatccggctcaaaactcatcatcactggtaagg-----	99
TRJ5	aatttggctctggcagcagactttatgtgacaggtaagatccattc	84
TRGJ4	aatttggctctggtagcagactctatgtgacaggctctggtagcaga-	85
TRGJ3_NC	tatttggctctggtagcagactttttgtgacaggtaag-----	76
TRGJ1	tatttggctctggtagcagactttatgtgacaggtaag-----	76
TRGJ2_2_NC	tatttggatctggtagcagactttatgtgacaggtaag-----	76
TRGJ2_1_NC	tatttggatctggtagcagactttatgtgacaggtaag-----	76

Figur 24. Sammenlikning av TRGJ-nukleotider. Det gule er RSS.

```

>TRGJ1
YALLFGSGITLHVTGK
>TRGJ2_2
YVLVFGSGTKLYVTGK
>TRGJ2_1
YVLVFGSGTKLYVTGK
>TRGJ3
YGYVFGSGTRLFVTGK
>TRGJ4
QESFYAYEFGSGTRLYVTGSGTR
>TRGJ5
RLEFGSGTTLYVTGKISI
>TRGJ6
RIYLILDLGHRRFCGLDPAQNSSLVR

```

Figur 25. TRGJ-aminosyrer

TRGJ6	RIYLILDLGHRRFCGLDPAQNSSLVR-----	27
TRGJ1	-----YALLFGSGITLHVTGK---	16
TRGJ5	-----RLEFGSGTTLYVTGKISI	18
TRGJ4	-----QESFYAYEFGSGTRLYVTGSGTR	23
TRGJ2_2	-----YVLVFGSGTKLYVTGK---	16
TRGJ2_1	-----YVLVFGSGTKLYVTGK---	16
TRGJ3	-----YGYVFGSGTRLFVTGK---	16

... *

Figur 26. Sammenlikning av TRGJ-aminosyrer

Tabell 13. AA-identitet for TRGC-gener

	C6	C1	C2_2	C2_1	C3	C4	C6
SALSAL_TRG_C6	100.00	71.53	70.83	70.83	69.93	72.14	71.53
SALSAL_TRG_C1	71.53	100.00	82.14	81.55	70.79	71,33	74,39
SASA_TCRG2_2	70.83	82.14	100.00	94.64	72.46	74.13	75.16
SALSAL_TRG_C2_1	70.83	81.55	94.64	100.00	72.46	75.52	74.51
SALSAL_TRG_C3	69.93	70.79	72.46	72.46	100.00	73.24	77.30
SALSAL_TRG_C4	72.14	71.33	74.13	75.52	73.24	100.00	76.76
SALSAL_TRG_C5	71.53	74.39	75.16	74.51	77.30	76.76	100.00

Tabell 14. AA-identitet i prosent for TRGJ-gener.

	TRGJ1	TRGJ5	TRGJ4	TRGJ3	TRGJ1_1	TRGJ2_2	TRGJ2_1
TRGJ6	100.00	14.29	15.38	11.11	14.29	14.29	14.29
TRGJ1	14.29	100.00	73.33	62.50	68.75	68.75	62.50
TRGJ5	15.38	73.33	100.00	61.11	80.00	80.00	66.67
TRGJ4	11.11	62.50	61.11	100.00	68.75	68.75	75.00
TRGJ2_2	14.29	68.75	80.00	68.75	100.00	100.00	75.00
TRGJ2_1	14.29	68.75	80.00	68.75	100.00	100.00	75.00
TRGJ3	14.29	62.50	66.67	75.00	75.00	75.00	100.00

