

# Urinsyrekrystaller som adjuvans i fiskevaksiner

**Bjarte Langhelle**

Masteroppgave i fiskehelse (60 stp) Desember 2013



## Forord

---

Denne oppgaven ble utført ved Norges fiskerihøgskole, Fakultet for biovitenskap, fiskeri og økonomi ved Universitet i Tromsø i perioden januar 2013 til desember 2013.

Først og fremst vil jeg rette en stor takk til hovedveilederen min Roy A. Dalmo. Takk for en god og utfordrende oppgave som har pirret interessen min for immunologi og vaksineutvikling. Du skal også ha takk for svar på alskens spørsmål i planleggingsfasen og konstruktive tilbakemeldinger under skriveprosessen.

Jeg vil også rette en stor takk til Jaya Kumari og Makoto Inami som gjorde dagene med prøveuttak overkommelig. Jeg må kanskje takke dere mest for upåklagelig opplæring i en rekke laboratorieteknikker. En ekstra takk skal dere ha for at dere viste tålmodighet, i tilfeller der en ekstra forklaring var nødvendig.

Noen lovord går også til personell ved Havbruksstasjonen i Tromsø for meget godt stell av forsøksfisk. Kollegaer i "Team Jørgensen" og "Team Robertsen" fortjener også en takk.

Takk til gjengen på kontoret, våren og høsten 2013. Camilla, takk for alle småtipsene og for at du tok deg tid til å lese gjennom oppgaven. En stor takk går også til mackølet og alle andre jeg har blitt godt kjent med i løpet av studietiden i Tromsø.

Sist, men ikke minst, vil jeg takke mamma og pappa for økonomisk bistand og en jevn flyt av oppløftene ord det siste året. Dette har vært viktig.

Bjarte Langhelle

Tromsø, desember 2013



## Sammendrag

---

Vaksinering av fisk er ansett som den sikreste og mest kostnadseffektive strategien for å forebygge smittsomme sykdommer. Dagens vaksiner er dessverre lite effektive mot intracellulære patogener og kan være gjenstand for bivirkninger av ulik grad. Det er derfor nødvendig å utvikle nye og bedre vaksiner. En måte å gjøre dette på, er å prøve ut nye adjuvanter med potensial til å øke immunogeniteten til et antigen. Urinsyre (US) er en liten organisk heterosyklisk komponent som kan være både i løselig og fast (krystallisk) form. Mekanismene som fører til at US går fra å være i oppløst form til å felle ut som US-krystaller, og videre bli omdannet til mononatriumuratkrystaller (eng. monosodium-urate crystals – MSU) er mangfoldige og komplekse *in vivo*. Forsøk gjort på pattedyr har vist at US og MSU innehar immunologiske adjuvansegenskaper. I dette arbeidet har US og MSU blitt utforsket som alternative adjuvanter i fiskevaksiner til atlantisk laks (*Salmo salar* L.).

I første del av oppgaven ble TO-celler stimulert med ulike konsentrasjoner av US og MSU *in vitro*. Resultatene fra forsøket viste ingen sammenheng mellom produksjon av reaktive oksygenintermediater (eng. reactive oxygen species – ROS) i TO-cellene og stimulering med US eller MSU. I andre del av oppgaven ble det utført et *in vivo* forsøk som innbefattet immunisering av fisk med ulike vaksineformuleringer, dette for å kunne vurdere adjuvansegenskapene til US og MSU. Sammenlignet med negativ kontroll (NaCl), viste alle grupper injisert med modellantigenet humant gamma globulin (HGG) en signifikant økning av spesifikke antistoffer 70 dager etter vaksinasjon. Høyest antistoffnivåer ble målt i fisk immunisert med en formulering bestående av FCA + HGG. Antistoffnivåene mellom fisk i gruppene NaCl + HGG, US + HGG og MSU + HGG var relativt like. Dette indikerte at US og MSU innehar adjuvansegenskaper, men som ikke i vesentlig grad øker immunogeniteten til HGG. Resultatene med hensyn til transkripsjonsnivå (mRNA) av ulike cytokiner og transkripsjonsfaktorer indikerte at US og MSU induserer lave medfødte og adaptive immunresponser. I den grad det kan sammenlignes, samsvarer dette med forsøk utført på makrofager isolert fra havkaruss (*Sparus aurata*), da disse også viste lav produksjon av IL-1 $\beta$  etter stimulering med MSU. Dette studiet har vist at US og MSU trolig ikke klarer å aktivere NLRP3-inflammasomet til produksjon av IL-1 $\beta$  på lik linje med hva som er funnet å være tilfelle i forsøk gjort på pattedyr.

# Innhold

---

<b>FORORD</b>		<b>I</b>
<b>SAMMENDRAG</b>		<b>III</b>
<b>INNHold</b>		<b>IV</b>
<b>1. INNLEDNING</b>		<b>1</b>
1.1 KORT HISTORIKK AV NORSK OPPDRETTSNÆRING		1
1.2 IMMUNFORSVARET HOS BEINFISK		2
1.2.1 IMMUNOLOGISKE ORGANER HOS BEINFISK		2
1.2.2 DET MEDFØDTE IMMUNFORSVARET		4
1.2.3 DET ADAPTIVE IMMUNFORSVARET		5
1.2.4 TRANSKRIPSJONSFAKTORER OG CYTOKINER		8
1.3 VAKSINASJON		9
1.4 ADJUVANSER		11
1.4.1 KLASSIFISERING AV ADJUVANSER		12
1.4.2 ADJUVANSER, EN MANGFOLDIG GRUPPE AV FORBINDELSER		12
1.4.3 GENERELLE VIRKNINGSMEKANISMER TIL ADJUVANSER		13
1.4.4 ULEMPER VED BRUK AV OLJEBASERTE ADJUVANSER		14
1.5 URINSYRE OG MONONATRIUMURATKRYSSTALLER		15
1.5.1 HVORDAN OPPSTÅR KRYSSTALLENE?		15
1.5.2 BIOLOGISKE MEKANISMER TILKNYTTET US OG MSU		17
1.5.3 ADJUVANSEGENSKAPER TILKNYTTET US OG MSU		19
1.6 PROBLEMSTILLING		20
<b>2. MATERIALER OG METODER</b>		<b>21</b>
2.1 PREPARERING AV ADJUVANSER		21
2.2 TO-CELLER		21
2.2.1 UTSÅING AV TO-CELLER		21
2.2.2 STIMULERING AV TO-CELLER MED US OG MSU		22
2.3 FORSØKSOPPSETT		23
2.4 PREPARERING AV VAKSINER		23
2.5 IMMUNISERING		24
2.6 PRØVEUTTAK		24
2.7 ELISA		25
2.7.1 GJENNOMFØRELSE AV ELISA		26
2.8 KVANTITATIV RT-PCR		27
2.8.1 PRIMERE		28
2.8.2 RNA-ISOLERING		29
2.8.3 GELELEKTROFORESE AV RNA		30
2.8.4 CDNA SYNTSE		30

## Innhold

---

2.8.5	KVANTITATIV RT-PCR	31
<b>2.9</b>	<b>DATABEHANDLING</b>	<b>31</b>
<b>3.</b>	<b>RESULTATER</b>	<b>33</b>
<b>3.1</b>	<b>MÅLING AV ROS ETTER STIMULERING AV TO-CELLER MED US OG MSU</b>	<b>33</b>
<b>3.2</b>	<b>MÅLING AV ANTISTOFFPRODUKSJON MOT HGG</b>	<b>33</b>
<b>3.3</b>	<b>MÅLING AV MRNA-TRANSKRIPTER</b>	<b>34</b>
3.3.1	MÅLING AV RELATIVT UTTRYKK AV PROINFLAMMATORISKE CYTOKINER	34
3.3.2	MÅLING AV RELATIVT UTTRYKK AV ANTIVIRALE CYTOKINER	36
3.3.3	MÅLING AV RELATIVT UTTRYKK AV TRANSKRIPSJONSFAKTOR T-BET	37
<b>4.</b>	<b>DISKUSJON</b>	<b>39</b>
<b>4.1</b>	<b>EFFEKT ETTER STIMULERING AV TO-CELLER MED US OG MSU</b>	<b>39</b>
<b>4.2</b>	<b>ANTISTOFFRESPONS MOT HGG</b>	<b>40</b>
<b>4.3</b>	<b>EFFEKT AV US OG MSU PÅ EKSPRESJON AV PROINFLAMMATORISKE CYTOKINER</b>	<b>41</b>
<b>4.4</b>	<b>EFFEKT AV US OG MSU PÅ EKSPRESJON AV IL-6</b>	<b>43</b>
<b>4.5</b>	<b>EFFEKT AV US OG MSU PÅ EKSPRESJON AV T-BET OG IFN- <math>\gamma</math></b>	<b>44</b>
<b>4.6</b>	<b>FREMTIDSPERSPEKTIVER</b>	<b>44</b>
<b>5.</b>	<b>KONKLUSJON</b>	<b>45</b>
<b>6.</b>	<b>KILDER</b>	<b>47</b>
<b>APPENDIKS I</b>		<b>61</b>
<b>APPENDIKS II</b>		<b>63</b>
<b>APPENDIKS III</b>		<b>65</b>
<b>APPENDIKS IV</b>		<b>67</b>
<b>APPENDIKS V</b>		<b>69</b>
<b>APPENDIKS VI</b>		<b>73</b>





## 1. Innledning

---

### 1.1 Kort historikk av norsk oppdrettsnæring

Norge er i dag verdens største produsent av atlantisk laks (*Salmo salar* L.) og i 2012 ble det slaktet ut 1,23 millioner tonn [39]. Norsk oppdrettsnæring er også en næring i vekst og i løpet av de siste ti årene har produksjonen av atlantisk laks økt med 37,5 % [39]. Produksjonen har imidlertid aldri vært helt problemfri, og i perioden fra midten av 1980-tallet frem til 1992 rammet de bakterielle infeksjonssykdommene kaldtvannsvibriose (*Aliivibrio salmonicida*) og furunkulose (*Aeromonas salmonicida*) næringen, noe som resulterte i betydelige økonomiske tap. Som et tiltak for å redusere sykdomsutbruddene ble fisken behandlet med store mengder antibakterielle midler. Terapeutisk behandling med antibiotika var den eneste muligheten for å bekjempe sykdommene, og i 1987 nådde antibiotikaforbruket toppen, da omtrent 50 tonn (aktiv substans) ble benyttet [41]. Omfanget av de økonomiske tapene var så store, at oppdrettsnæringen ville hatt store problemer med å fortsette om andre tiltak ikke hadde blitt iverksatt.

Ett av tiltakene inkluderte intensiv forskning på å utvikle vaksiner. I 1987 ble en vannbasert vaksine mot kaldtvannsvibriose tatt i bruk, noe som førte til at antall utbrudd ble redusert. Furunkulose forble imidlertid et problem frem til den oljebaserte vaksinen ble introdusert i 1991. Etter dette sank forbruket av antibiotika betydelig, og mot slutten av 1990-tallet og frem til i dag har forbruket ligget på rundt ett tonn aktiv substans per år [41]. Som et resultat av innførselen av den oljebaserte vaksinen er det i dag relativt små utfordringer knyttet til patogene bakterier. Grunnen til dette, er at tradisjonelle vaksiner er effektive i arbeidet med å bekjempe ekstracellulære bakterier, da de i hovedsak induserer en sterk humoral immunrespons. Vaksinene er imidlertid suboptimale til å indusere cellemedierte immunresponser – responser som er nødvendig for motvirke infeksjon av intracellulære bakterier og virus [60]. Over lengre tid har næringen forsøkt å utvikle effektive vaksiner mot denne type infeksjoner, men arbeidet har vist seg å være problematisk.

Det finnes i dag ingen kommersiell tilgjengelig vaksine mot intracellulære bakterier. De siste fem årene har det imidlertid bare blitt påvist sporadiske utbrudd (0-3 tilfeller per år) av de to intracellulære bakteriesykdommene bakteriell nyresyke (*Renibacterium salmoninarum*) og

piscirickettsiose (*Piscirickettsia salmonis*) [67]. Det er likevel viktig å være klar over at bakteriene er i stand til å påføre oppdrettsnæringen betydelige tap i tilfelle situasjonen skulle komme ut av kontroll [18, 146].

I motsetning til intracellulære bakterier utgjør virussykdommer et betydelig problem i norsk oppdrettsnæring. Kunnskapen om flere alvorlige virussykdommer er fremdeles begrenset, noe som gjenspeiles i antall sykdomsutbrudd. Dette inkluderer også pankreassykdom (eng. pancreas disease – PD), forårsaket av *Salmonid alphavirus*, som har opptrådt endemisk på Vestlandet siden den begynte å spre seg fra kjerneområdet i Hordaland etter 2003 [67]. Til tross for at det helt siden 2002 har vært tilgjengelig en vaksine mot PD og det faktum at mesteparten av fisken vaksineres før sjøutsett, fremstår fortsatt PD som ett av de største sykdomsproblemene på Vestlandet [66, 67]. Dette er bare ett av mange virussykdomsproblemer som ikke lar seg tilstrekkelig forebygge med dagens vaksiner. Som en følge av dette, er det et stort behov for å utvikle nye vaksiner med bedre beskyttende effekt overfor virusinfeksjoner.

### **1.2 Immunforsvaret hos beinfisk**

Grunnleggende kunnskap om immunforsvaret er viktig for å kunne forebygge infeksjøs sykdommer hos oppdrettsfisk på en rasjonell og effektiv måte. Beinfisk innehar som pattedyr, et forsvarssystem som gjør det mulig å overleve og opprettholde integriteten i et miljø bestående av ulike potensielt patogene mikrober. Gjennom evolusjon har dette forsvarssystemet, som utgjør et kompleks av forsvarsmekanismer, utviklet seg til å kunne bekjempe et bredt spekter av patogene organismer.

#### **1.2.1 Immunologiske organer hos beinfisk**

Det er store morfologiske forskjeller på lymfoide organer mellom ulike fiskearter. De fleste marine fiskearter klekkes med lymfoide organer som omtrent er ikke-eksisterende, men det finnes også arter som innehar funksjonelle lymfoide organer rett etter klekking [97]. De viktigste immunologiske forskjellene mellom pattedyr og fisk er at sistnevnte mangler beinmarg og lymfeknuter, komponenter som utgjør de primære lymfoide organer hos pattedyr [97]. Hos fisk er de viktigste lymfoide organene thymus, fornyre, milt og mukosa-assosiert

lymfoide vev (eng. mucosa-associated lymphoid tissues – MALTs) der interbrankialt lymfoide vev (ILT) også inkluderes [52, 72, 116].

Thymus og fornyre er primære lymfoide organ [116], der førstnevnte er hovedsete for T-celle lymfogenese [16, 72], mens B-celler dannes hovedsakelig i fornyren [159]. Milt og fornyre er kjent som filtrerende organer i vaskulærsystemet da de fjerner døende blodceller og fremmede agens. Det er også i disse organene ulike immunresponser utformes og settes i gang [36, 42]. Som følge av evnen til å fange og presentere løselige og partikulære antigener fra blodsirkulasjonen, blir begge disse organene regnet for å være analoge med lymfeknutene til pattedyr (sekundære lymfoide organer) [35]. Selv om B-celler dannes i fornyren, innehar den et lavt innhold av celler som sekreterer antistoffer, og den høyeste andelen modne B-celler er funnet å være i milten [97, 134, 159]. Trolig utvikles heller ikke T-celler i ett og samme organ. Koppang *et al.* (2010) har i forsøk på atlantisk laks vist at T-celler ”oppkonsentreres” i thymus, milt og ILT, der sistnevnte også videre ble foreslått å være et viktig sekundært lymfoide organ [72]. Selv om det ikke er bekreftet, innehar ILT en strategisk posisjon med hensyn til antigenfangning, da gjellene i stor grad eksponeres for antigener [72].

Til tross for de immunologiske forskjellene som eksisterer mellom fisk og pattedyr organer, er medfødte og adaptive celler stort sett morfologisk og funksjonelt like [60]. De viktigste cellene i det medfødte cellulære forsvaret er de fagocytiske cellene (makrofager og nøytrofile granulocytter), samt de ikke-spesifikke cytotoksiske cellene. Andre celler som er funnet i fisk og som er indikert som celler i immunforsvaret, inkluderer de øvrige granulocytene (eosinofile og basofile celler), naturlige drapsceller og trombocytter [111]. I 2012 ble dendrittiske celler (DC) identifisert i regnbueørret (*Oncorhynchus mykiss*) [9]. I dette studiet ble det også vist at DC hadde: en ”trelikenende” morfologi, uttrykk av DC-markører, mulighet til å fagocytisere små partikler og mulighet til å migrere *in vivo* [9]. Det ble i tillegg foreslått at antigenpresentasjon i stor grad skjer i milt og fornyre, men det er ikke funnet bevis for dette [9]. En generell oppsummering av hovedkomponentene i det medfødte og adaptive immunsystemet, funnet i beinfisk, er gjengitt i tabell 1.

**Tabell 1.** En generell oppsummering av hovedkomponentene i det medfødte og adaptive immunsystemet som er funnet i beinfisk. Tabellen er hentet fra Hølvold 2012 [60].

Inndeling	Bestanddel	Utøvende enhet
Lymfoide vev	Primære	Fornyre Thymus
	Sekundære	Fornyre Milt
	Andre	Mukosa assosiert lymfoid vev (MALT) Interbrankialt lymfoid vev (ILT)
Medfødte komponenter	Overflatebarrierer	Mukus, hud, gjeller og tarm
	Cellulære komponenter	Granulocytter Ikke-spesifikke cytotoksiske celler Monocytter/makrofager Naturlige drapsceller Nøytrofile celler Dendritiske celler
	Humorale komponenter	Antimikrobielle peptider Naturlige antistoffer Komplementsystemet Akutt fase proteiner Mønster-gjenkjennende reseptorer (PRR)
Adaptive komponenter	Cellulære komponenter	Cytotoksiske (CD8 <sup>+</sup> ) T-lymfocytter (CTL) CD4 <sup>+</sup> T-hjelpelymfocytter (T <sub>H</sub> -celler) Cytokiner
	Humorale komponenter	B-lymfocytter Antistoffer Cytokiner

### 1.2.2 Det medfødte immunforsvaret

Det er avgjørende at immunforsvaret klarer å skille mellom "selv" og "ikke-selv" for å kunne eliminere inntrengende patogener [38]. Selv om det medfødte immunforsvaret ofte blir omtalt som uspesifikt, har det gjennom evolusjon, tilegnet seg måter å oppdage strukturer som finnes hos et bredt utvalg av patogene organismer. Fagocytter har uttrykt reseptorer for å gjenkjenne fremmede strukturer, slik som for eksempel bakterielt lipopolysakkarid (LPS) eller dobbelttrådig RNA. LPS er en bestanddel i celleveggen til arter av bakterier, mens dobbelttrådig RNA utgjør arvematerialet til mange virus, og ingen av disse strukturene finnes i vertens egne celler [1]. I 1989 foreslo Janeway at antigenpresenterende celler (APC) uttrykker reseptorer som sanser mikrobielle strukturer, og disse strukturene ble kalt "pathogen-associated molecular patterns" (PAMPs) [65]. Disse strukturene gjenkjennes av

mange typer immunceller vha. mønstergjenkjennende reseptorer, ofte kalt "pattern recognition receptors" (PRR) [4]. Godt studerte PRR, som i hovedsak er funnet på celler i det medfødte immunforsvaret inkluderer: Toll-like reseptorer (TLR), NOD-like reseptorer (NLR), dectin-1 og RIG-like helikaser [60]. I 1994 foreslo Matzinger at det medfødte immunforsvaret, representert ved APC, gjenkjenner endogene signaler frigjort av stressede eller nekrotiske celler. Slike signaler ble senere kalt "damage-associated molecular patterns" (DAMPs) [92] og disse signalene kan fremkalle en systemisk immunrespons i fravær av PAMPs [127]. DAMPs er også trodd å stimulere til modning av APC, som videre kan aktivere T-celler [27, 120, 127].

### **1.2.3 Det adaptive immunforsvaret**

Alle de ulike cellene som deltar i immunforsvaret bidrar enten ved å skille ut løselige forbindelser som selv påvirker immunsystemet, eller ved gå direkte til angrep på mikroorganismene. Immunresponsen kan ut fra dette deles inn i en humoral og en cellulær del, der hhv. B- og T-cellene er sentrale. Imidlertid er det en vekselvirkning mellom cellene og deres produkter, og dermed mellom cellulære og humorale responser. Den humorale delen spiller en viktig rolle i bekjempelsen av ekstracellulære patogener, mens den cellemediert delen kan bekjempe intracellulære patogener. Makrofager, B- og T-lymfocytene er de viktigste cellene i kroppen med reseptorer som kan identifisere og binde fremmede strukturer på ulike mikroorganismer. Denne delen av immunforsvaret utmerker seg med sin spesifisitet og hukommelse, i tillegg til særtrekk som mangfold og evnen til å skille mellom "selv" og "ikke-selv" [80].

#### **1.2.3.1 Det humorale immunforsvaret**

Det humorale immunforsvaret består i hovedsak av B-celler og løselige forsvarsmolekyler. Naive B-celler gjenkjenner antigen ved hjelp av en B-cellereseptor (BCR) som består av co-stimulatorer og membranbundne antistoffer, også kalt immunglobuliner (Ig). Tidligere ble det trodd at antistoffrepertoaret i fisk hadde en mindre diversitet i forhold til pattedyr, da IgM lenge var den eneste kjente Ig-isotypen. Det har imidlertid senere blitt vist at fisk også har IgD og IgT/Z [119].

Ig består av to korte- og to lange polypeptidkjeder, også kalt lette og tunge kjeder, som er parvis identiske. Et Ig-molekyl kan skjematiseres som en "Y" der de to øvre delene utgjør "Fragment antigenbinding region" (Fab-region) og den nedre delen utgjør "Fragment crystallizable region" (Fc-region). I enden av på de to Fab-regionene er antistoffmolekylenes antigenbindende områder lokalisert [80].

Når Ig-reseptormolekylene binder antigen, kan det forårsake en stimulering av cellene slik at de gjennomgår en ny utviklingsprosess. Denne omfatter flere runder med celledeling, samt en ytterligere differensiering. Sluttresultatet blir en samling av spesialiserte celler kalt plasmaceller og hukommelsesceller. Plasmacellene er effektorceller som utøver funksjoner direkte knyttet til uskadeliggjøring av fremmed antigen [80]. Plasmacellene skille ut antistoffer, og disse antistoffene innehar samme spesifisitet som den opprinnelige naive BCR som gjenkjente og startet responsen [1].

En BCR kan kjenne igjen en rekke forskjellige antigen: Proteiner, karbohydrater, lipider og andre forbindelser med lav molekylvekt. En T-hjelpecelle ( $T_H$ -celle) gjenkjenner proteinantigener uttrykt på APC og spiller derfor en sentral rolle i forbindelse med B-celleaktivering. I fravær av  $T_H$ -celler vil proteinantigen føre til en svak eller ingen antistoffrespons. Antigen bestående av proteiner blir av den grunn ofte betegnet som T-avhengig, da de er avhengig av  $T_H$ -celler for å oppnå en antistoffrespons. Karbohydrater, lipider og andre ikke-protein antigen stimulerer til antistoffproduksjon uten behov for  $T_H$ -celler. Denne responsen kalles derfor T-uavhengig [1].

### 1.2.3.2 Det cellulære immunforsvaret

En T-celle reseptor (TCR) består av membranbundne proteiner og avviker fra en BCR ved at den ikke kan gjenkjenne- og binde til et antigen direkte. En T-celle reagerer utelukkende med små peptidfragmenter av antigenet når disse befinner seg i bindesetet på "major histocompatibility complex"-molekylene (MHC-molekylene) på APC [80]. I dag regnes makrofagene for å være de viktigste fagocytene i fisk, da de også fungerer som APC, noe som innebærer at de kan prosessere antigen og presentere det enten vha. MHC klasse II eller ved MHC klasse I [30, 31].

En T-celle krever to signaler fra en APC for å bli aktivert. Først må T-cellen, vha. TCR binde seg til peptidet som er bundet til MHC-molekylene på overflaten av APC (signal 1). I tillegg til signal 1 er det nødvendig med co-stimulering (signal 2) for spesifikt å aktivere naive T-celler. Slik co-stimulering skjer for eksempel ved at CD28-molekylet på T-cellen binder CD80/86 molekyler på APC. Signal 2 er nødvendig for at T-cellen skal dele seg, samt modnes til en effektorcelle. Dette signalet er også viktig for å sikre at en T-cellen responderer til et fremmed antigen, og ikke til vertens egne komponenter [80].

Naive T-celler kan ikke respondere mot et gitt antigen før de har differensiert til en effektorcelle, enten en  $CD4^+$  T-celle eller en  $CD8^+$  T-celle [1]. En  $CD4^+$  T-celle reagerer med et antigenpeptid når den kommer i kontakt med en profesjonell APC [80]. I forkant av dette har APC bearbeidet antigenet og presentert det på overflaten ved hjelp av MHC klasse II. På denne måten kan en  $CD4^+$  T-celle gjenkjenne mikrobielle antigener og dermed også aktiveres [1]. I 1986 oppdaget Mosmann og Coffman at  $CD4^+$  T-celler ikke var homogene celler, men at de også kunne deles ut fra hvilke cytokiner de skiller ut etter stimulering.  $CD4^+$  T-celler ble derfor delt inn i T-hjelper 1 ( $T_H1$ ) og  $T_H2$  [98]. Disse funnene, som utgjorde en milepæl innen immunologisk forskning, gjorde at det i tiden etter ble forsket iherdig på å oppdage cytokinsignalveier og transkripsjonsfaktorer som kunne påvirke utvikling av  $T_H1$ - og  $T_H2$ -celler. Inndelingen av  $T_H$ -cellene i disse subpopulasjonene reflekterer viktige forskjeller i funksjon [80]. Hos fisk er det fortsatt knyttet usikkerhet rundt forekomsten av  $T_H$ -responser [21]. Dette på tross av at "T-celle systemet" har mange karakteristikk som er relativt likt pattedyrs [60].

I tillegg til cytokinproduserende  $T_H$ -celler kan en annen undergruppe av T-celler utvikle seg til cytotoksiske T-celler. I hovedsak dreier dette seg om T-celler som har CD8-markøren på overflaten. Disse cellene viser derfor MHC klasse I restriksjon og antigenet vil stort sett komme fra cellens cytosol [80]. Aktivering og differensiering av naive  $CD8^+$  T-celler til cytotoksiske T-celler, gjennom prosessering og presentasjon av peptid på MHC klasse I, er et viktig aspekt tilknyttet immunresponsen mot intracellulære patogener [40]. Cytotoksiske T-celler har kapasitet til å respondere mot alle typer celler som uttrykker MHC klasse I, og kan drepe målrettede celler gjennom FasL og eksocytose av perforin og granzymmer fra deres granuler [131]. I tillegg frigjør  $CD8^+$  T-celler kjemokiner og cytokiner, som rekrutterer og aktiverer ytterligere effektorceller, som nøytrofile granulocytter og makrofager [51].  $CD8^+$  T-celler produserer også det mikrobedrepende molekylet granulysin [137].

### 1.2.4 Transkripsjonsfaktorer og cytokiner

En transkripsjonsfaktor er et protein som binder seg til en spesifikk DNA-sekvens og dermed kontrollerer om et gen skal uttrykkes eller ikke. Hos fisk har det blitt gjort funn som tyder på at transkripsjonsfaktorene T-bet og GATA-3 spiller en sentral rolle i arbeidet med å lede differensieringen av hhv.  $T_H1$ - og  $T_H2$ -celler [139, 151, 156]. Det er ikke uvanlig at økt uttrykk av  $T_H1$ -celler fører til nedregulering av  $T_H2$ -celler, eller omvendt. For eksempel vil et økende uttrykk av T-bet i  $T_H1$ -celler resultere i et lavere uttrykk av GATA-3. Interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) vil da transkriberes, mens interleukin-4 (IL-4) vil nedreguleres. Det motsatte vil skje i  $T_H2$ -celler hvor økende uttrykk av GATA-3 vil gi nedregulering av T-bet. IL-4 vil transkriberes mens uttrykket av IFN- $\gamma$  vil nedreguleres [8, 80]. Uttrykket av GATA-3 i atlantisk laks har vist seg å være relativt høyt etter infeksjon og immunstimulering, noe som indikerer at den har en sentral funksjon i fiskens immunsystem [75]. Flere forsøk gjort på fisk, blant annet på atlantisk laks og regnbueørret, har vist at GATA-3 er sterkt uttrykt i thymus, gjeller og hud [75, 144, 151]. T-bet spiller også en viktig rolle i forbindelse med differensiering og proliferering av  $CD8^+$  T-celler [63], og forsøk på fisk har vist at T-bet uttrykkes sterkt i fornyre og milt [143].

Cytokiner er proteiner eller glykoproteiner som virker som kjemiske kommunikasjonsmidler mellom celler [80]. I forbindelse med en immunrespons sekreses mange typer cytokiner av ulike immunceller. Viktige immunceller i den forbindelse inkluderer naturlige drapsceller, T-celler, makrofager og andre fagocytter. Cytokiner påvirker immunresponsen ved å binde seg direkte til reseptorer på immunceller og spiller en viktig rolle i utviklingen av den adaptive immunresponsen. Cytokiner som stimulerer celler (særlig fagocytter og lymfocytter) til å migrere til infiserte områder kalles kjemokiner [60].

Selv om både B-celler og cytotoksiske T-celler kan produsere cytokiner, ansees  $CD4^+$   $T_H$ -celler som de viktigste cytokinprodusentene blant lymfocytene [80]. Valget om å utvikle  $T_H1$  eller  $T_H2$ -dominans blir tatt tidlig i immunresponsforløpet.  $T_H1$ -cytokinene virker hovedsakelig på celler som deltar i betennelsesprosesser og cellulære immunresponser.  $T_H2$ -cytokiner påvirker modningen av B-celler, og er følgelig med å regulere antistoffsvaret [80].

To av de viktigste cytokinene som leder til inflammatoriske responser er interleukin-1 beta (IL-1 $\beta$ ) og tumor nekrose faktor alfa (TNF- $\alpha$ ). Begge blir produsert nærmest umiddelbart etter en infeksjon og spiller en nøkkelrolle i forbindelse med å lede effektorceller til



infeksjonsstedet [130]. I tillegg medvirker disse cytokinene i stor grad til utviklingen av adaptive immunresponser [158]. IL-1 $\beta$  er medlem av IL-1 familien og cytokiner i denne familien er potente regulatorer av både medfødt og adaptiv immunitet i pattedyr [132]. Hos mennesker er trolig IL-1 $\beta$  det cytokinet som trigger til systemisk inflammasjon, noe som fører til stor infiltrasjon av nøytrofile celler og vevsreparasjon [45]. Dette cytokinet, som er funnet i en rekke ulike fiskearter [103, 140, 157], er analogt med pattedyrs [84, 91] og fungerer som immunologisk regulator gjennom stimulering av T-celler [20]. Det har også blitt funnet et sekundært (subtype) IL-1 $\beta$  i vanlig karpe (*Cyprinus Carpo* L.) [33], regnbueørret og atlantisk laks [58]. TNF- $\alpha$  er også et cytokin med proinflammatorisk effekt, da den forårsaker økt produksjonen av blant annet IL-1 $\beta$  [59]. Flere studier gjort på fisk, har vist at TNF- $\alpha$  forårsaker aktivering av makrofager, som igjen kan føre til økt fagocytisk aktivitet [20, 142].

Interleukin-6 (IL-6) er et proinflammatorisk cytokin som spiller en viktig rolle ved en akutt fase respons. En akutt fase respons er en del av det medfødte immunforsvarets respons på akutt sykdom og involverer økt produksjon av blodproteiner kalt akutt fase proteiner (APP). Forsøk utført på fisk har indikert at APP blant annet dannes i hepatocytene, og at de proinflammatoriske cytokinene IL-1 $\beta$  og TNF- $\alpha$  spiller en sentral rolle for at IL-6 skal produseres [10]. Interleukin-10 (IL-10) er trolig et inflammatorisk cytokin, da det har blitt vist at regnbueørret uttrykker dette cytokinet kort tid etter stimulering med LPS [62]. Det samme forsøket viste at IL-10 ble sterkest uttrykt i fornyre og milt [62]. Tradisjonelt er IL-10 kjent som et T<sub>H</sub>2-cytokin som innehar en immunedregulerende funksjon (hemmer syntesen av ulike cytokiner), men hvorvidt dette er tilfelle i fisk er ukjent [61]. IL-10 er også kjent for å være en potent inhibitor av IFN- $\gamma$  i mus. Uten at det er funnet bevis, kan en oppregulering av IL-10 være en mekanisme som kontrollerer (eller begrenser) uttrykket av IFN- $\gamma$  – dette som et forsøk på å skyve immunsystemet fra en T<sub>H</sub>1-respons over til en T<sub>H</sub>2-respons [61]. Det er nødvendig med mer forskning for å klargjøre funksjonene til IL-10 i fisk.

### 1.3 Vaksinasjon

Hensikten med å vaksinere er å forårsake en spesifikk langtidsbeskyttelse mot en gitt sykdom. Det er mulig å vaksinere fisk på lik linje med mennesker og andre pattedyr. Vaksinasjon bygger på prinsippet om at høyerestående dyr som utsettes for sykdomsfremkallende mikroorganismer, reagerer med å utvikle immunitet. Immuniteten innebærer beskyttelse mot nye angrep fra de samme patogene organismene som individet tidligere har blitt eksponert for.

Denne immuniteten er spesifikk, noe som betyr at den bare i liten grad vil beskytte mot andre infeksjonssykdommer [108]. Prosessen som startes i fisken kalles en primær immunrespons, og består i at fiskens immunforsvar produserer antistoffer mot antigenene den er utsatt for. Hukommelseceller som produseres etter et sykdomsutbrudd eller en vaksinasjon vil ved en senere eksponering for antigenet kunne kjenne igjen den invaderende mikroben [12], og produksjonen av denne typen celler resulterer i en hurtigere og kraftigere sekundær immunrespons [1].

I dag er alle oppdrettere pålagt å vaksinere settefisk av arten atlantisk laks mot furunkulose, vibriose (*Aliivibrio anguillarum*) og kaldtvannsvibriose før de settes ut i sjøen (jfr. akvakulturforskriften § 63). Det er imidlertid vanlig at fisken vaksineres med en sekskomponents vaksine, som i tillegg til de nevnte sykdommene, gir beskyttelse mot vintersår (*Moritella viscosa*) og infeksiøs pankreas nekrose (infeksiøs pankreas nekrose virus). I 2012 ble 93,4 % av atlantisk laks og regnbueørret vaksinert med en slik sekskomponents vaksine. Det ble produsert 318 millioner vaksinedoser i 2012 og i tillegg kommer 112,5 millioner vaksinedoser PD-vaksine [107]. Tabell 2 viser de fiskevaksinene med høyest omsetning i 2012.

**Tabell 2.** Oversikt over de fem fiskevaksinene med høyest omsetning i 2012. Sekskomponents vaksiner gir beskyttelse mot fiske sykdommene: furunkulose, kaldtvannsvibriose, vibriose (*Aliivibrio anguillarum* type O1 og O2α), vintersår og infeksiøs pankreas nekrose. Énkomponents vaksine gir beskyttelse mot pankreassykdom (*Salmonid alphavirus* – SAV1 og SAV3). Tallene er målt i veiledende utsalgspris til kunde. Tabellen er modifisert fra legemiddelindustrien (LMI)/Farmastat [81] og Tafalla *et al.* 2013 [141].

#	Legemiddel	Omsetning 2012 (mill kr)	Vaksinetype	Patogener	Adjuvans	Produsent
1	Alpha Ject micro 6	227,0	Seks-komponent	Bakterier og virus	Flytende parafin	Pharmaq
2	Norvax Compact PD	169,2	Én-komponent	Virus	Montanide ISA763A	MSD Animal Health
3	Pentium Forte Plus	48,7	Seks-komponent	Bakterier og virus	Mineralolje	Novartis Animal Health
4	Norvax Minova 6	18,3	Seks-komponent	Bakterier og virus	Flytende parafin	MSD Animal Health
5	Alpha Ject 6-2	10,8	Seks-komponent	Bakterier og virus	Flytende parafin	Pharmaq

Som vist i tabell 2 brukes det store ressurser på å vaksinere fisk hvert år. Dette er likevel helt nødvendig, da manglende vaksinering raskt ville ført til sykdomsproblemer, som igjen hadde gitt uakseptable konsekvenser for dyrevelferd og miljø. Vaksinologi er en samlebetegnelse på

alt som inngår i utviklingen av nye vaksiner. Dette er et fagfelt i utvikling, og oppdrettsnæringen har et stort vinningspotensial på å utvikle nye og bedre vaksiner.

I akvakulturnæringen er det i hovedsak snakk om fire ulike typer vaksiner; vaksiner basert på inaktiverte patogener, subenhetvaksiner, DNA-vaksiner og vaksiner basert på attenuerte patogener. Hovedmengden av de bakterielle virkestoffene i vaksiner produsert til fisk baserer seg på inaktiverte patogener, mens antigen i virusvaksinene enten baserer seg på antigen isolert fra dyrking i cellekultur (med påfølgende inaktivering) eller på rekombinante virusproteiner (VP2 uttrykt i *Escherichia coli*). Denne typen vaksiner inneholder to essensielle komponenter: (1) Hele eller deler av ett eller flere infeksjøs agens, samt (2) en adjuvans. Agenset inaktiveres ved bruk av varme eller formaldehyd slik at infektiviteten fjernes, mens de antigenegenskapene bevares. Overflatestrukturen vil imidlertid forandres litt under denne prosessen, noe som vil føre til lavere effektivitet. Da bruken av både inaktiverte patogener og subenhetvaksiner alene fører til en dårlig adaptiv immunrespons, er det nødvendig å nytte seg av en adjuvans som bidrar til å øke immunogeniteten til antigenet i en vaksine [40]. Immunogenitet er et begrep som beskriver antigenets evne til å fremkalle en immunrespons, eller i hvilken grad et antigen innehar denne egenskapen.

### 1.4 Adjuvanser

I vaksinesammenheng ble adjuvanser benyttet på dyr for første gang i 1920 [32], men potensialet innen akvakultur ble først tatt i bruk mot slutten av 1980-tallet [2]. Selve ordet adjuvans stammer fra det latinske ordet *adjuvare* og betyr å hjelpe. En adjuvans har tradisjonelt blitt definert som hjelpestoffer som øker den spesifikke immunresponsen (potensen) til en vaksine [141]. Ved å tilsette en potent adjuvans i en vaksine, vil altså effektiviteten øke, slik at individet som vaksineres oppnår økt sykdomsbeskyttelse. I dag er de fleste forfattere innen fagfeltet enige om at noen adjuvanser også kan spille en viktig rolle i forbindelse med å lede den adaptive immunrespons mot en gitt patogen, i cellulær eller humoral retning [141]. I dag defineres derfor en adjuvans som grupper av strukturelle heterogene komponenter, med evne til å kunne øke og endre retning på immunogeniteten til et antigen [50, 141].

### 1.4.1 Klassifisering av adjuvanser

Adjuvanser har tidligere blitt foreslått klassifisert ut fra kjemisk sammensetning eller fysiske egenskaper [141]. Dette har vist seg å være ugunstig, da nært beslektede forbindelser kan ha svært forskjellig påvirkningskraft på immunceller. Istedenfor har det bygd seg opp en enighet om å klassifisere ulike adjuvanser ut fra hvilken innflytelse de har på signal 1 eller signal 2 i tilknytning til antigenpresentasjon [50, 60, 114, 141]. Basert på denne to-signal modellen [17, 76] er det nødvendig med både presentasjon av et antigen (signal 1) og et ytterligere tilleggssignal (signal 2) for å aktivere spesifikke T- og B-celler [114]. Adjuvanser som bidrar til å påvirke eller forsterke signal 1 kan bli klassifisert som type A adjuvanser. Type A adjuvanser virker direkte på APC, eller så favoriserer de til økt antigeninnfangning [50]. På denne måten bidrar type A adjuvanser til at APC klarer å presentere flere antigen til T-celler. Type A adjuvanser vil også påvirke det administrerte antigenet i tid, rom og konsentrasjon, som igjen vil øke tilgjengeligheten overfor immunologiske organer og celler [114, 141].

For å utløse en immunrespons er ikke et signal 1 nok i seg selv. Et immunstimulerende signal (signal 2) må også leveres fra en APC til en T-celle før en optimal immunrespons kan starte [50]. Uten aktivering av signal 2 vil responsen avbrytes [60], og T-cellen vil gå inn i en anergifase – en fase der cellen ikke evner til å utøve en immunrespons [114]. Adjuvanser som påvirker eller forsterker signal 2 kan klassifiseres som type B adjuvanser. Type B adjuvanser vil skaffe co-stimulerende signaler etter at et antigen er gjenkjent av APC, noe som vil skaffe et tilfredsstillende miljø for de fleste antigen-spesifikke immunresponser [114, 141]. Det sekundære signalet bestemmer størrelse og kvalitet på den påfølgende adaptive immunreaksjonen. Dette signalet informerer også T-cellen om at det presenterte antigenet er det riktige for å starte en immunrespons [114]. Noen forfattere mener også at det finnes et signal 0 som aktiveres før signal 1 og 2 [50, 141]. Aktivering av APC og orientering av T<sub>H</sub>-respons avhenger av signal 0 og dette signalet blir aktivert når et antigen gjenkjennes av PRR [60]. I dag blir også signal 0 sett på som viktig i forbindelse med aktivering av signal 2 innledningsvis [141].

### 1.4.2 Adjuvanser, en mangfoldig gruppe av forbindelser

Adjuvanser er en mangfoldig gruppe av forbindelser som blant annet inkluderer bakterielle toksiner, mineralsalter, mineraloljer, mikro- og nanopartikler, immunstimulerende komplekser (ISCOMs™), og komponenter isolert fra planteriket [27, 40, 141]. Til tross for mangfoldet er

det kun et fåtall som benyttes i dagens fiskevaksiner. Kommersielt benyttes hovedsakelig mineralolje (flytende parafin) som adjuvans (jfr. tabell 2). I forskningssammenheng brukes hovedsakelig Freundts komplett adjuvans (FCA) og Freundts inkomplett adjuvans (FIA). Disse består av en mineralolje og et tensid (stabiliserer emulsjonen), og skiller seg fra hverandre kun ved at FCA også inneholder varmedrepte mykobakterier [102]. Dessverre kan begge indusere bivirkninger av betydelig grad, og det er ikke alltid de gir tilstrekkelig immunologisk respons. Dette har ført til utvikling av andre typer mineraloljer, som Montanide™ og Alphaject [60]. Disse er utviklet med hensyn på å opprettholde de gunstige effektene som FCA gir samtidig som de reduserer risikoen for alvorlige bivirkninger [25]. Mineraloljer registrert under varemerket Montanide er basert på bruk av mineraloljer, ikke-mineraloljer eller en blanding begge deler. De kan også lages ut fra et spesifikt kjemisk tensid der mannitol oleat (fettsyre-ester) brukes til å fremstille ulike typer emulsjoner; ”vann i olje” (V/O), ”olje i vann” (O/V) eller ”vann i olje i vann” V/O/V [141].

Alum er et dobbeltsulfat bestående av én- og treverdige kationer (for eksempel kalium og ammonium ( $\text{KAl}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ ) og har lenge vært den vanligste adjuvansen i vaksiner til mennesker, da denne induserer en hurtig og vedvarende  $\text{T}_\text{H}2$ -antistoffrespons [49, 147]. Når antigenet blandes med alum, presipiterer det sammen med saltet i små partikler. Injeksjon av dette partikkelpreparatet fører til en at antigenet frigjøres langsommere fra injeksjonsstedet enn det ellers ville gjort. Det er i tillegg antydnet at den partikulære formen bidrar til økt fagocytose og dermed økt presentasjon av antigene peptider via MHC klasse II molekyler [80]. Likevel er de eksakte virkningsmekanismene fortsatt ukjent og på samme måte som en oljebasert adjuvans, blir cytotoxisk T-cellerespons i liten grad stimulert [60].

### 1.4.3 Generelle virkningsmekanismer til adjuvanser

I 1989 betegnet Charles Janeway Jr. vaksineadjuvanser som immunologenes ”skitne lille hemmelighet” [65]. Dette reflekterer datidens generelle mangel på kunnskap rundt virkningsmekanismene til ulike adjuvanser. Adjuvansenes virkningsmekanismer som ligger til grunn for økt immunrespons er ofte svært komplekse, og dagens kunnskap er fortsatt mangelfull, spesielt på det cellulære nivå [114]. Det er likevel grunn til å tro at effekten i hovedsak skyldes en uspesifikk stimulering av immunsystemet (spesielt medfødt immunitet og APC), som bidrar til å forsterke responsen mot det ønskede patogenet [80].

Virkningsmekanismene til mineraloljer ligger dels i at de i ulik grad er lokalirriterende, og gir en betennelsesreaksjon ved injeksjonsstedet. Immunogenet deponeres også i fiskens bukhule, i en form som bidrar til langsom frigjøring, og dermed en langvarig stimulering [108]. Mykobakteriene i FCA har vist å bidra til å aktivere makrofager ved å uttrykke høyere nivåer av MHC klasse II- og co-stimulerende molekyler som CD80/86 i membranen. Dessuten sørger de for å stimulere flere lymfocytter til cytokinproduksjon og proliferasjon, noe som også kan tenkes å ha en virkning på immunresponsen mot det aktuelle antigenet [80].

En adjuvans kan påvirke ulike deler av det medfødte immunforsvaret, som igjen kan påvirke og forme den adaptive immunresponsen [133]. For å aktivere en cytotoksisk T-cellerespons er det nødvendig med en adjuvans som klarer å levere et antigen i APCens cytosol, slik at antigenet kan bearbeides og presenteres via MHC klasse I. I tillegg er det nødvendig at adjuvansen bidrar til en oppregulering av  $T_H1$ -responsen [60].

Tidligere ble det ofte benyttet adjuvanser med mikrobielt opphav som induserte varierende grad av inflammasjon. Inflammasjon er betegnelse på en organismes koordinerte immunrespons mot skadelige stimuli som oppstår i forbindelse med infeksjoner eller vevsskader. Effektiviteten til en adjuvans kan i mange tilfeller koples til graden av lokal inflammasjon. En adjuvans er derfor i stor grad ansvarlig for ødeleggelser av vev og kan medføre ubehag og smerte. Dette er imidlertid helt sentralt i vaksineutvikling og valget av adjuvans er derfor like viktig som antigenet alene. Ved å tilsette en adjuvans økes immunresponsen, noe som gjør det mulig å tilsette en lavere mengde antigen. Det er likevel viktig å balansere forholdet mellom komponentene, ettersom økt mengde adjuvans vil resultere i økt grad av bivirkninger [133].

#### **1.4.4 Ulemper ved bruk av oljebaserte adjuvanser**

Etter hvert som de oljebaserte vaksinene ble introdusert i lakseoppdrett, ble det også oppdaget at de forårsaket uønskede bivirkninger. Blant annet har bruk av oljebasert adjuvans i fiskevaksiner blitt satt i sammenheng med dårligere vekst, ryggradsdeformiteter, kronisk peritonitt, pigmentering, sammenvoksninger mellom organer, og sammenvoksninger mellom organer og bukvegg [47, 73, 95, 109]. Det har også blitt påvist forekomst av autoimmunitet blant fisk vaksinert med en oljebasert vaksine [71]. For mye oljeadjuvans i bukhulen kan også resultere i en økt forekomst av melanomakrofager, noe som kan gi kraftig pigmentering på

bukhinnen og i filet, og dermed økonomisk tap i form av nedklassifisering etter slakt [12]. I dag vil bruk av en oljebasert adjuvans, i de fleste tilfeller, resultere i moderate sammenvoksninger i bukhalen hos atlantisk laks. Dette blir antatt å gi fisken ubehag, i tillegg til at det kan gi funksjonsproblemer i bukhalen. Hovedandelen av fisk har likevel ikke bivirkninger utenfor rammen av det akseptable, og da veies beskyttelse overfor sykdommer høyere enn problemer som følge av bivirkninger. Som følge av det, er det fortsatt en høy andel enkeltfisk og grupper av fisk som har for mye bivirkninger [12].

Selv om en oljebasert adjuvans umiddelbart induserer til sterkt uttrykk av proinflammatoriske signaler i atlantisk laks, har forsøk vist at genuttrykket ofte kan være forbigående [54]. Store forskjeller i genuttrykk fisken seg i mellom kan også skyldes det faktum at det administreres små volum vaksinedoser ved vaksinerings [110].

### 1.5 Urinsyre og mononatriumuratkrystaller

Urinsyre (US) er en liten, organisk, heterosyklisk komponent som en finner både i lavere og høyerestående organismer [45]. US kan være både i løselig (US) og fast form (US-krystaller). US-krystaller og mononatriumuratkrystaller (eng. monosodium-urate crystals – MSU) innehar begge en krystallisk form og hydrofil overflate [128, 145]. Med det blotte øyet ses krystallene som to hvite pulveraktige substanser, og under et mikroskop vises en nålelignende symmetri [128]. Hovedandelen forsøk som inkluderer US, US-krystaller og MSU er gjort på pattedyr, med hensyn på å oppklare forhold knyttet til sykdommen artritt (leddgikt). I 2003 ble US oppdaget som et endogent faresignal (DAMPs), som evnet å lede immunresponsen i fravær av mikrobielle stimuli [127]. Etter denne oppdagelsen ble forskning rundt US intensivert, og det stilles spørsmål om urinsyres effekter kan ha forgreininger med stor betydning tilknyttet helse og sykdom [45].

#### 1.5.1 Hvordan oppstår krystallene?

Mekanismene som fører til at US ( $\text{HC}_5\text{H}_3\text{N}_4\text{O}_3$ ) går fra å være i oppløst form til å felle ut som US-krystaller ( $\text{C}_5\text{H}_4\text{N}_4\text{O}_3$ ), og videre bli omdannet til MSU ( $\text{NaC}_5\text{H}_3\text{N}_4\text{O}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ) er mangfoldige og komplekse *in vivo* [128]. US er et intermediat i nedbrytningen av puriner og produseres i stor grad når en celle dør og går i oppløsning. Årsaken til dette er at alle celler i kroppen inneholder DNA og RNA, og dermed nukleotidene adenin og guanin. Adenin og guanin er purinbaser og består av to ringer karbon- og nitrogenatomer. Når en celle dør vil

RNA og DNA blottlegges, og dermed brytes ned. I denne prosessen blir adenin og guanin oksidert til hypoxanthin og xanthin, før de konverteres til US ved hjelp av xanthin oksidase. I de fleste organismer vil US videre bli konvertert til allantoin, en løselig substans av enzymet uricase [128]. Deretter vil allantoin bli konvertert til allantoinesyre via hydrolyse, og til urea ved hjelp av allantoinase, før urease omgjør urea til endeproduktene ammoniakk ( $\text{NH}_3$ ) og karbondioksid ( $\text{CO}_2$ ) [5]. Gikt er en tilstand som kun oppstår i pattedyr etter evolusjonært tap av uricase [45]. Enzymet har blitt funnet i leveren og i hjernen hos atlantisk laks, men ikke i skjellemuskulaturen eller i nyren [6].

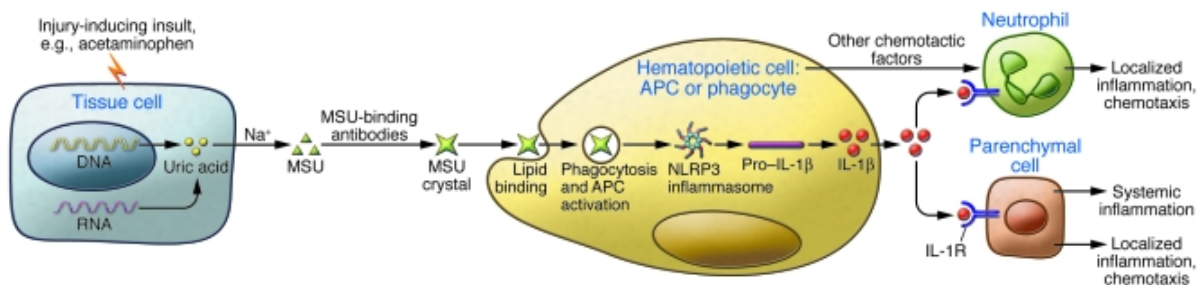
US finnes naturlig i blodet til mennesker og friske mennesker har verdier mellom 30-60  $\mu\text{g/ml}$  [70]. Det har blitt utført noen få studier på US-verdier i fisk. Et forsøk utført av Ciereszko *et al.* (1999) viste at regnbueørret hadde en gjennomsnittlig US-konsentrasjon i serum på 170,3  $\mu\text{M}$ , noe som tilsvarer 28,6  $\mu\text{g/ml}$  [24]. Hos mennesker er det vist at US har svært begrenset løselighet i serum (70  $\mu\text{g/ml}$ ), og dersom US overstiger denne grensen, noe som gjerne er tilfelle når store mengder celler dør, vil det være en fare for at US begynner å krystallisere [70]. Hvordan MSU eksakt oppstår i kroppen er ikke fullstendig klarlagt. Det har blitt foreslått at når US kommer i kontakt med nukleaser i det ekstracellulære miljø, oppstår en krystalliseringsprosess av US som til slutt ender i utfelling av MSU, dersom konsentrasjonen blir høy nok [87, 128]. Det er også dokumentert at nivået av US kan bli veldig høyt inne i en celle [127], men det har ikke blitt rapportert om intracellulær deponering av MSU. En forklaring kan være tilgjengeligheten på natrium, som er vesentlig høyere i serum enn i cytosol [45].

Det er også interessant at høye verdier av US i blodet ikke alltid fører til utfelling av krystaller, og bare rundt 10 % av hyperurikemipasienter opplever giktaktige symptomer [149]. Dette åpner for at flere faktorer er involvert for at MSU skal kunne oppstå. MSU oppstår sjelden i sentrale organer, og vanligvis lokaliseres krystallene til perifere deler av kroppen, et finurlig fenomen som er relatert til temperaturoppgang i de ytre ledd [45]. I løpet av de siste tiårene har det blitt foreslått mange matematiske modeller, som et forsøk på å beskrive eller skissere graden av krystallisering ut fra miljøbetingede faktorer som temperatur, salt, pH og vibrasjon [37, 64, 82]. Til tross for dette finnes det ingen konkret formel for å kunne predikere mengden krystaller som dannes [70].



### 1.5.2 Biologiske mekanismer tilknyttet US og MSU

Med all sannsynlighet, er USs inflammatoriske effekt avhengig av dens evne til å presipitere til MSU [45]. Fritt MSU har vist å indusere en rekke responser når den kommer i kontakt med en vertcelle. Blant annet har det blitt funnet bevis for at krystallene kan bli fagocyttert [86] og at de er i stand til å aktivere APC [128]. I løpet av de siste årene har det blitt utført flere forsøk på å oppklare de biologiske mekanismene som settes i gang når immunceller kommer i kontakt med krystallene [126, 128]. Figur 1 illustrerer hvordan det kan tenkes at MSU oppstår, blir tatt opp av en APC og trigger til inflammasjon. Figur 1 baserer seg imidlertid på studier gjort på pattedyr, mens denne type mekanismer fortsatt er uklare i fisk.



**Figur 1.** Foreslåtte mekanismer til hvordan; (1) MSU oppstår; (2) blir tatt opp av en APC; og (3) trigger til inflammasjon. (1) Celleskade fører til produksjon av US fra puriner via xanthine oksidase. US i ekstracellulært miljø binder til natrium ( $\text{Na}^+$ ), slik at mononatriumurat (eng. monosodium urate – MSU) oppstår. Med assistanse fra MSU-bindende antistoffer (IgM) vil MSU-krystaller felles ut. (2) Krystallene kommer i kontakt med APC, før krystallene blir tatt opp vha. fagocytose og APC aktiveres. (3) MSU-krystallene interagerer med NLRP3-inflammasomet som starter produksjonen IL-1 $\beta$ . IL-1 $\beta$  frigis før de binder seg på parenchymale celler med uttrykk av IL-1 reseptorer, og sammen med andre kjemotaktiske faktorer, så fungerer de som signal for å tiltrekke nøytrofile granulocytter og andre immunceller. Dette vil frembringe en inflammatorisk immunrespons som svar på celleskade. Figuren er hentet fra Shi 2010 [126].

Mekanismene som fører frem til at krystallene klarer å aktivere NLRP3-inflammasomet fremstår som komplekse [26, 57]. Dette inflammasomet, som kan dannes i flere typer immunceller i det medfødte immunforsvaret, er et multiproteinkompleks bestående av ”nucleotide-binding domain and leucine-rich repeat pyrin 3 domain” (NLRP3), ”adaptor molecule apoptosis-associated speck-like protein” (ASC) og caspase-1 [26, 57, 86, 88]. For at inflammasomet kan aktiveres, må NLRP3 rekruttere adopterproteinene ASC, og caspase-1 må deretter binde seg til et bindingssete på ASC [3, 26]. Forsøk gjort på pattedyr har vist at NLRP3-inflammasomet fungerer som en viktig sensor overfor PAMPs og endogene faresignaler som blir frigjort i forbindelse med celleskade og celledød. På den måten aktiverer inflammasomet immunceller [152].

MSU er skadelig for mange typer celler og forårsaker sterk inflammasjon. Muligheten MSU har til å forårsake inflammasjon er avhengig av dens evne til å aktivere NLRP3-inflammasomet [152], og et aktivert inflammasom vil styre produksjonen av IL-1 $\beta$  [87]. Caspase-1 er ansvarlig for omdannelsen av pro-IL-1 $\beta$  til dens aktive form (IL-1 $\beta$ ) i pattedyr [22]. Selv om caspase-1 er trodd å være den viktigste proteasen involvert i modning av IL-1 $\beta$ , har det blitt foreslått at modning kan skje uten tilstedeværelse av enzymet [87]. Forsøk utført av Hornung *et al.* (2008) har vist at fagolysosomer, dannet i makrofager etter fagocytose, kan bli ustabile, noe som kan det medføre frigivelse av krystaller fra fagosomet til cytosol [57]. I dette studiet fant de også ut at frigivelse av krystaller inn i cytosol var etterfulgt av frigivelse av cathepsin B – et enzym som i seg selv kan aktivere NLRP3-inflammasomet [57].

Andre studier på makrofager isolert fra mus har vist at defekter på deler av komplekset vil føre til at kapasiteten til å produsere IL-1 $\beta$  dempes. I tillegg har injeksjon av MSU i mus, med defekter på komplekset, vist en mindre strøm av nøytrofile celler til injeksjonsstedet. Dette indikerer at NLRP3-inflammasomet spiller en viktig rolle i forbindelse med inflammasjon *in vivo* [87, 90, 93].

MSU, alum, asbestkrystaller og silikapartikler kan også indusere en såkalt frustrert fagocytose ved celleoverflaten [86]. Frustrert fagocytose er et fenomen som oppstår når en fagocytt ikke kan fagocyttere målet, fordi målet er fysisk for stort. Dette kan føre til frigivelse av proinflammatoriske stoffer til omgivelsene [148]. Frustrert fagocytose har også blitt assosiert med produksjon av ROS, men mekanismene som ligger bak er uklare [13, 101]. ROS er frie radikaler som inneholder oksygen, og er viktige i reguleringen av de medfødte immunresponsene [86]. Hydrogenperoksid (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) og superoksidanionet (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) er eksempler på ROS. Under inflammasjon og immunrespons hos vertebrater vil fagocytiske celler, som nøytrofile celler, generere et ROS-avhengig utbrudd som er rettet mot invaderende mikrober [14]. I tillegg til å ha en antiseptisk funksjon, vil frigjøring av ROS lede leukocytter til området med vevsskade, og signalere overfor immunsystemet at celler er skadet [100]. ROS har også blitt foreslått å spille en viktig rolle i forbindelse med aktivering av NLRP3-inflammasomet [19, 89]. Det er ikke dokumentert at klassiske NLRP3-inflammasomaktivatorer (ATP, aluminiumkrystaller, MSU), aktiverer inflammasomet direkte, noe som antyder at inflammasomet trolig sanser signaler indirekte [87]. Det er også interessant at de fleste inflammasomaktivatorer (også MSU) trigger til ROS produksjon, samt at antioksidanter har vist å inhibere aktivering av inflammasomet [86, 138].

Til tross for at inflammasomet spiller en nøkkelrolle i å oppdage intracellulære patogener og endogene faresignaler i pattedyr [45, 85, 94, 99], finnes det lite informasjon vedrørende dette i laverestående vertebrater, inklusiv fisk [7]. Det har blitt gjort svært lite forskning på tilstedeværelsen av caspase-1 og dens aktivitet i fisk. Så langt har caspase-1-ortologer (gener i to forskjellige arter som oppsto fra det samme genet i de to artenes felles stamfar) blitt fastslått å være tilstede i to fiskearter: havabbor (*Dicentrarchus labrax*) og havkaruss (*Sparus aurata*) [83, 112].

### 1.5.3 Adjuvansegenskaper tilknyttet US og MSU

Selv om det har blitt utført relativt mye forskning på USs og MSUs evner til å forårsake inflammasjon i pattedyr, eksisterer det lite informasjon hvorvidt US og MSU innehar adjuvansegenskaper. På pattedyr er det imidlertid vist at MSU kan aktivere APC, og på den måten forårsake produksjonen av proinflammatoriske cytokiner, samt oppregulere co-stimulerende molekyler [128]. Dette har vist å kunne resultere i utvikling av CD8<sup>+</sup> T-celler [127] og antistoffproduksjon [11]. Adjuvansegenskapene til MSU avhenger imidlertid av produksjon av IL-1 $\beta$  [87]. Så langt er det ikke publisert noen artikler som beskriver adjuvansegenskapene til US og MSU i fisk.

### 1.6 Problemstilling

Oppdrettsnæringen bruker flere hundre millioner kroner årlig på vaksiner. Til tross for dette, er det fremdeles flere tapsbringende sykdommer dagens vaksiner ikke gir tilstrekkelig beskyttelse mot. US og MSU fått stor oppmerksomhet innen human forskning, da de har blitt satt i sammenheng med inflammatoriske responser og adjuvansaktivitet. I forsøk gjort på mus har det blitt vist at MSU kan aktivere NLRP3-inflammasomet til å starte produksjon av IL-1 $\beta$ . Dette har åpnet for spørsmål hvorvidt US og MSU har egenskaper som kan være gunstige i fiskevaksiner. Det ville derfor vært interessant å undersøke om US og MSU også kan forårsake produksjon av IL-1 $\beta$  i fisk, eller hvorvidt de kan benyttes til å lede den adaptive immunresponsen i cellulær retning. MSU har vist å kunne øke immunogeniteten til et antigen ved intraperitoneal injeksjon i pattedyr, men ingen lignende forsøk er gjort på atlantisk laks. Hypotesen er at US eller MSU innehar adjuvansaktivitet på nivå med en oljebasert adjuvans, og at disse kan ha et potensial til å øke effektiviteten til vaksiner mot intracellulære patogener hos fisk. I denne oppgaven ble adjuvansegenskapene til US og MSU studert i atlantisk laks *in vitro* og *in vivo*.

### Hovedmål

Hensikten er å undersøke om US eller MSU innehar adjuvansaktivitet på nivå med en oljebasert adjuvans.

#### Delmål 1

Undersøke produksjon av ROS i TO-celler etter stimulering med US og MSU.

#### Delmål 2

Undersøke antistoffresponser mot modellantigenet HGG med og uten adjuvans 20 og 70 dager etter immunisering.

#### Delmål 3

Undersøke ekspresjon av utvalgte gener i fornyre og milt 2, 7, 14, 20 og 70 dager etter immunisering.

## 2. Materialer og metoder

---

### 2.1 Preparering av adjuvanser

MSU ble laget i laboratoriet etter prosedyre beskrevet av Kanevets *et al.* (2009) [70]. US (tørrstoff) (Sigma-Aldrich) ble løst i 0,1M boratbuffer til konsentrasjon på 4 mg/ml, og pH kontinuerlig justert til 8,0. Løsningen ble inkubert ved romtemperatur (RT) i syv dager, og deretter filtervasket to ganger med absolutt etanol (99,8 %) (Sigma-Aldrich) og én gang med acetone (Merck). Filteret ble lufttørket før krystallene ble lagret i tildekket glasskolbe frem til bruk.

### 2.2 TO-celler

TO-celler er en fagocytisk cellelinje med opphav i fornyre fra atlantisk laks [153]. Cellene ble dyrket i 645 ml Nuclosurface-kolber (Thermo Scientific) ved 20 °C og splittet når cellene var 90 % konfluente (omtrent hver 7. til 10. dag). Vekstmediet bestod av Leibovitz L-15 medium (Life Technologies Gibco™), tilsatt 40 ml 8 % føtalt kalveserum (Biochrom), 5 ml streptomycin/penicillin (Life Technologies Gibco™) og 5 ml ikke-essensielle aminosyrer (Life Technologies Gibco™). For å unngå kontaminering ble alt celledarbeid utført i sterilkabinett, der det ble benyttet sterilt engangsutstyr, samt laboratorieinstrumenter som på forhånd var desinfisert med 70 % etanol (Sigma-Aldrich).

#### 2.2.1 Utsåing av TO-celler

7 ml PBS ble tilsatt vekstmediet for å fjerne overskuddsproteiner som reduserer effekten av trypsin-EDTA x1 (0,5 g/l trypsin og 0,2 g/l EDTA). PBS ble fjernet og 2 ml trypsin-EDTA x1 ble tilsatt til cellene løsnet. TO-celler er sensitive for trypsin og løsner på under 60 sekunder. For å unngå å eksponere cellene for trypsin unødvendig lenge, ble kolben dunket mot håndflaten etter at de første cellene begynte å løsne. Vekstmedium (8 ml) ble umiddelbart tilsatt, og mediet ble pipettert opp og ned for å få med alle cellene.

200 µl av celledensjonen ble fordelt i to eppendorfrør, hhv. rør én og rør to. Til rør én ble det i tillegg tilsatt 100 µl av reagens A100 (Chemotec) og 100 µl av reagens B (Chemotec). Reagens A100 inneholdt en lysisbuffer som fikk cellene til å gå i oppløsning, for å kunne telle

cellekjernene, og reagens B bestod av en stabiliseringsbuffer. Løsningene ble sugd opp i NucleoCasette™ (Chemotec), overført og kvantitert i Nucleocounter YC-100 (Chemotec). Kassetten med løsningen fra rør én talte antall levende og døde celler, mens kassetten med løsningen fra rør to talte antall døde celler. Antall levende celler ble beregnet, og cellesuspensjonen fortynnet inntil 100 µl inneholdt 200 000 TO-celler. TO-cellene ble sådd ut i fire 96-brønners brett og hver brønn inneholdt 100 µl cellesuspensjon. Cellene ble mikroskopert med Nikon TMS (Interfoto instruments) for å kontrollere at celletettheten var optimal, før de ble inkubert i 24 timer ved 20 °C.

### 2.2.2 Stimulering av TO-celler med US og MSU

US og MSU ble tilsatt vekstmedium til konsentrasjoner på 0,1, 1, 10 og 100 µg/ml. Det ble også laget to bruksløsninger, bruksløsning én og bruksløsning to. Bruksløsning én inneholdt ”phorbol 12-myristate-13-acetate” (PMA) og ”nitroblue tetrazolium” (NBT) med en konsentrasjon på henholdsvis 1 µg/ml og 1 mg/ml. Bruksløsning to inneholdt bare 1 mg/ml NBT (Sigma-Aldrich). PMA (Sigma-Aldrich) og NBT ble løst opp etter protokoll fra produsent, og de riktige brukskonsentrasjonene ble oppnådd ved å fortynne kjemikaliene i L-15 medium.

Vekstmediet i brønnene ble fjernet, og 100 µl av løsningene med US og MSU ble tilsatt. De fire siste kolonnene på brettet ble brukt som negativ kontroll, der 100 µl vekstmedium ble tilsatt. Det ble laget fire identiske brett og oppsettet er vist i tabell 3.

**Tabell 3.** Oversikt over tilsatte mengder av US, MSU og L-15 per brett. US, urinsyre; MSU, mononatriumuratkrystaller; L-15, Leibovitz L-15 medium.

Rad	MSU (µg/ml)				US (µg/ml)				L-15 (kontroll)			
1	0,1	1	10	100	0,1	1	10	100	-	-	-	-
2	0,1	1	10	100	0,1	1	10	100	-	-	-	-
3	0,1	1	10	100	0,1	1	10	100	-	-	-	-
4	0,1	1	10	100	0,1	1	10	100	-	-	-	-
5	0,1	1	10	100	0,1	1	10	100	-	-	-	-
6	0,1	1	10	100	0,1	1	10	100	-	-	-	-
7	0,1	1	10	100	0,1	1	10	100	-	-	-	-
8	0,1	1	10	100	0,1	1	10	100	-	-	-	-

Etter at løsningsene var tilsatt de ulike brønnene ble de inkubert ved 20 °C. De ulike brettene hadde ulik inkubasjonstid (4, 24, 48 og 72 timer) og etter endt inkubasjon ble TO-cellene stimulerte med den løselige stimulant PMA. PMA er kjent for å være en potent aktivator av leukocytter i atlantisk laks [69]. Cellene i rad 1-2 (i tabell 3) ble ikke stimulerte da de ble brukt til celledelling. Rad 3-5 ble tilsatt bruksløsning 1, og rad 6-8 ble tilsatt med bruksløsning 2. Platen ble inkubert ved 20 °C i 30 minutter før cellene suksessivt ble vasket med PBS x 2 og fiksert i 70 % metanol i 3 minutter. Etterpå ble 120 µl kaliumhydroksid (KOH) og 140 µl dimetylsulfoksid (DMSO) (Sigma-Aldrich) tilsatt før cellene ble aspirerte. Optisk tetthet i brønnene ble målt ved 620 nm i Spectramax 190 (Molecular devices) med programvaren SOFT<sub>max</sub> PRO 4.3 (Molecular devices). Som blindprøve ble det benyttet KOH/DMSO. Økt produksjon av ROS i TO-cellene observeres som en lys blåfarge i brønnene, da NBT reduseres til formazan, beskrevet av Secombes (1990) [125].

### 2.3 Forsøksoppsett

Hovedforsøket ble gjennomført i tidsperioden 10. april til 19. juni 2013 på landanlegget ved Havbruksstasjonen i Tromsø, avd. C. Forsøket var på forhånd godkjent av Forsøksdyrutvalget (ID 5101). Det ble benyttet presmolt av atlantisk laks (rogn klekket 6. februar 2012), levert fra AquaGens stamfiskanlegg på Tingvoll. 360 fisk ble fordelt i åtte kar med ferskvann, der vanntemperaturen var justert til 10 °C. Lysstyringen ble satt til kontinuerlig lys under hele forsøksperioden. Ved oppstart av forsøket var fiskens gjennomsnittlige vekt 80,5 g og den ble daglig fôret med SK Nutra 3,0 (Skretting AS).

### 2.4 Preparering av vaksiner

Dagen før immunisering ble åtte ulike vaksiner klargjort. En oversikt over innholdet (per injeksjonsvolum) i de ulike vaksinene er vist i tabell 4. Antigen og adjuvaner ble suspendert i en saltløsning bestående av 10 ml 0,9 % natriumklorid (NaCl). For at løsningsene skulle forbli homogene ble de plassert i en roteringsmaskin (Stuart®rotator), innstilt på 12 rpm, ved 4 °C over natt. I dette forsøket ble vaksiner med innhold av US eller MSU laget slik at 100 µl inneholdt 100 µg. Det ble også laget (V/O) emulsjoner med bruk av FCA (Sigma-Aldrich), med og uten modellantigenet som var humant gamma globulin (HGG). HGG (Sigma-Aldrich) ble benyttet fordi tidligere forsøk gjort i forskningsgruppen har vist at dette antigenet induserer en god antistoffrespons [43]. Emulsjonen ble laget etter produsentens anbefaling. I korthet ble 10 ml saltløsning tilsatt 10 ml FCA og sonikert frem til en emulsjon var oppnådd.

**Tabell 4.** Oversikt over innholdet i ett enkelt injeksjonsvolum fra de ulike vaksinene. HGG, humant gamma globulin; US, urinsyre; MSU, mononatriumuratkrystaller; FCA, Freundts komplett adjuvans. FCA inneholdt inaktiverede mykobakterier (*Mycobacterium tuberculosis*) i olje. Mykobakteriene i en ”vann i olje” (V/O) emulsjon hadde en konsentrasjon på 25 µg/100 µl.

Vaksine	Antigen	Adjuvans			Totalt injeksjonsvolum
	HGG	US	MSU	FCA	
1	-	-	-	-	100 µl
2	-	100 µg	-	-	100 µl
3	-	-	100 µg	-	100 µl
4	-	-	-	50 µl	100 µl
5	500 µg	-	-	-	100 µl
6	500 µg	100 µg	-	-	100 µl
7	500 µg	-	100 µg	-	100 µl
8	500 µg	-	-	50 µl	100 µl

## 2.5 Immunisering

Før immunisering ble fisken anestesert med 40 mg L<sup>-1</sup> benzokain (Benzoak® Vet., ACD Pharmaceuticals). Når fisken var tilstrekkelig anestesert ble 0,1 ml injisert intraperitonealt, omtrent én finnelengde cranialt for bukfinnene. Arbeidet ble utført med sterile 1 ml sprøyter med tilhørende 7 mm kanyler (Unimed®). For å kontrollere at vaksinen ble riktig deponert, ble et utvalg fisk avlivet slik at deponeringsstedet kunne vurderes. Fisken ble avlivet med en overdose benzokain (80 mg L<sup>-1</sup>) og et påfølgende slag mot hodet. Denne avlivningsmetoden ble benyttet ved samtlige prøveuttak.

## 2.6 Prøveuttak

En oversikt over forsøksoppsettet er vist i tabell 5. Som tabellen viser ble det høstet prøver 2, 7, 14, 20 og 70 dager etter injeksjon. For hvert prøveuttak ble prøver samlet fra seks fisk fra hver av gruppene A-H. Det ble tatt ut prøver fra fornyre, milt, lever, gjelle, fortarm og baktarm for senere qPCR analyser. 50-100 mg vev av hvert enkelt organ ble overført til separate rør som inneholdt 1 ml RNAlater® (Ambion). Prøvene ble holdt i kjøleskap natten over, før de ble overført til -20 °C.



**Tabell 5.** Forsøksoppsett for behandlingsgruppene. HGG, humant gamma globulin; US, urinsyre; MSU, mononatriumuratkrystaller; FCA, Freundts komplett adjuvans.

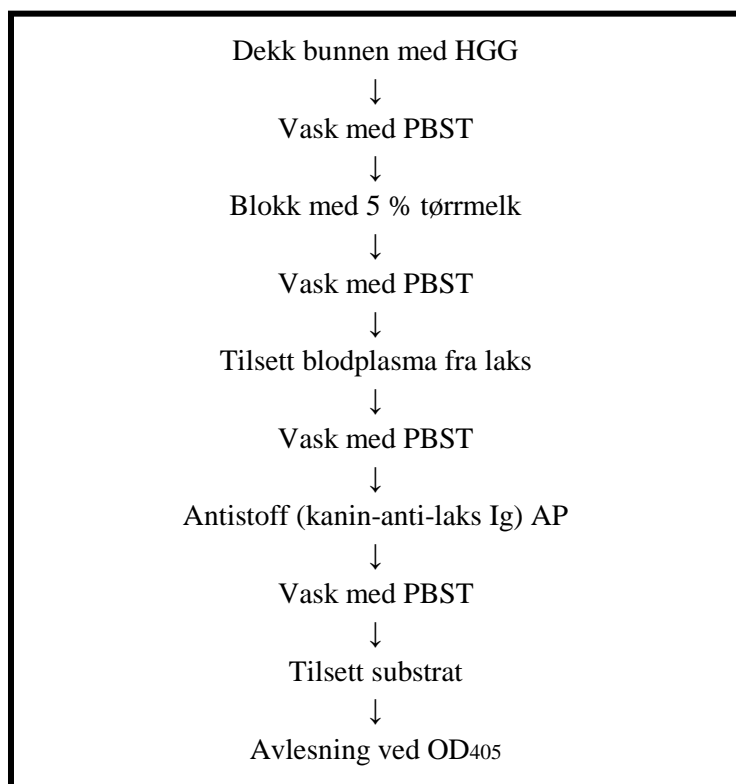
Gruppe	Antigen	Adjuvans	Uttak (dager etter vaksinerings)		Organprøver
			qPCR	ELISA	qPCR
A	-	-	2, 7, 14, 20, 70	20, 70	Fornyre, milt lever, gjelle, fortarm og baktarm ble høstet fra seks fisk og lagret på RNAlater
B	-	US	2, 7, 14, 20, 70	20, 70	
C	-	MSU	2, 7, 14, 20, 70	20, 70	
D	-	FCA	2, 7, 14, 20, 70	20, 70	
E	HGG	-	2, 7, 14, 20, 70	20, 70	
F	HGG	US	2, 7, 14, 20, 70	20, 70	
G	HGG	MSU	2, 7, 14, 20, 70	20, 70	
H	HGG	FCA	2, 7, 14, 20, 70	20, 70	

Ved dag 0 ble det tatt ut blodprøver av 15 ikke-immuniserte fisk (ikke vist i tabell 5). Dette ble brukt som referanse i senere antistoffrespons analyser. Ved dag 20 og 70 ble det tatt blodprøver fra 13 fisk fra hver gruppe. Blodet ble tatt ut med vacutainer (BD Vacutainer® Clot Activator Tube) fra *vena caudalis* og oppbevart i RT i 15-20 minutter for at blodet skulle koagulere. Deretter ble blodet lagret på is frem til sentrifugering. Prøvene ble sentrifugert i Multifuge® 1 S-R (Heraeus Instruments) på 2000 x g i 10 minutter og plasma ble pipettert ut, alikvotert og fryst ned ved -20 °C.

## 2.7 ELISA

Enzym-linked immunosorbent assay (ELISA) er en teknikk som kan brukes til å måle den spesifikke antistoffresponsen mot et antigen. Sammenlignet med varmblodige dyr produserer fisk lave mengder antistoffer [74]. I dette forsøket ble spesifikke antistoffer mot HGG i plasma analysert ved bruk av indirekte ELISA, en sensitiv teknikk som er godt egnet til å kvantifisere antistoffnivåer i blodplasma fra fisk.

### 2.7.1 Gjennomførelse av ELISA



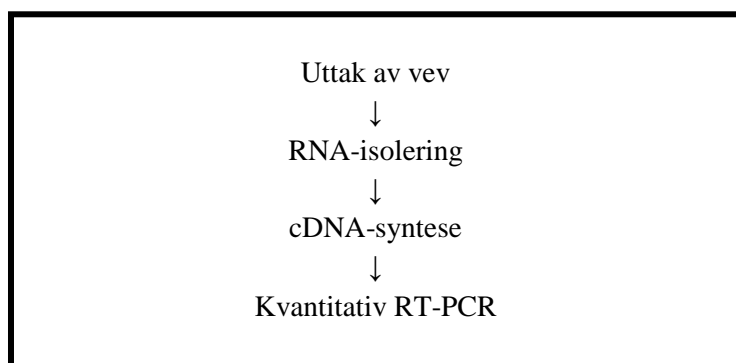
**Figur 2.** Flytskjema over hovedstegene i ELISA.

Prosedyren er basert på en metode som har vært mye benyttet i forskningsgruppen og som har vist gode resultater. En oversikt over innholdet i de ulike løsningene brukt i utførelsen av ELISA er vist i appendiks II. Hver enkelt brønn i et 96-brønnersbrett (Nunc™) ble dekket med 100 µl av en løsning bestående av 5 µg/mg HGG løst i 0,1 M karbonatbuffer (pH 9,6) og inkubert ved 4 °C natten over. Brønnene ble vasket med 200 µl PBST x 3 mellom hvert trinn, dersom annet ikke er nevnt. For å hindre uspesifikk binding av antistoffer til platen, ble 200 µl av en løsning bestående av 5 % tørrmelk (Normilk AS) tilsatt hver enkelt brønn, og platen ble inkubert ved RT i to timer.

Det ble først kjørt et optimaliseringsforsøk for å kalkulere hvor mye de enkelte plasmaprøvene måtte fortynnes. Dette for å finne en plasmakonsentrasjon som var innenfor følsomhetsgrensen til analysemaskinen, Spectra Max Pro (Molecular devices). Blodplasma ble da fortynnet 1:25, 1:50, 1:100 og 1:200 i en løsning bestående av PBST og 1 % tørrmelk. Blodplasma fortynnet 1:200 viste seg å være optimal, og ble derfor brukt ved hovedanalysene.

Blodplasma fra ti individer per gruppe ble analysert. Plasma ble da tilsatt 100 µl/brønn før platene ble inkubert over natt ved 4 °C. 1 % tørrmelk, NaCl og FCA + HGG ble benyttet som hhv. brettkontroll, negativ kontroll og positiv kontroll. Det primære antistoffet, alkalisk fosfatase-konjugert kanin-anti-laks Ig (laget av Stein Tore Solem, NFH) ble fortynnet 1:800 i 1 % tørrmelk. Fra denne løsningen ble det tilsatt 100 µl/brønn og brettene ble inkubert i RT i én time. Som substrat ble det benyttet Sigmafast™ p-nitrofenylfosfat tabletter (Sigma-Aldrich). Tablettene ble løst opp i dH<sub>2</sub>O i henhold til protokoll. Substratløsningen ble tilsatt 200 µl/brønn og inkubert 30 minutter i mørkeskap ved RT. Reaksjonen ble stoppet ved bruk av 50 µl 3M NaOH per brønn. Prøvene ble avleste på Spectra Max Plus på OD<sub>405</sub> med programvaren SOFT<sub>max</sub> PRO v5. For å forminske eksperimentell variasjon ble måledataene normalisert mot en intern brettkontroll.

## 2.8 Kvantitativ RT-PCR



**Figur 3.** Flytskjema over hovedstegene i qPCR.

Kvantitativ real-time revers transkriptase polymerase chain reaction (qRT-PCR), heretter qPCR, er en teknikk som kan brukes til å detektere og kvantifisere spesifikke DNA-sekvenser fra organer tatt ut i fra fisk. En mer utfyllende beskrivelse av denne teknikken er gjengitt i appendiks IV. I appendiks III finnes en oversikt over innholdet av alle de ulike løsningene brukt i utførelsen av qPCR.

Endring i genuttrykk ble kvantifisert ved hjelp av SYBR®Green (Applied Biosystems). Dette fargestoffet binder seg til alt dsDNA, inkludert primer-dimers og andre uspesifikke reaksjonsprodukter. Primer-dimers oppstår når to PCR-primere binder seg til hverandre i stedet for til DNA-tråden. Uspesifikke reaksjonsprodukter kan være genomisk DNA (gDNA) som kommer inn med cDNA, og vil resultere i en overestimert av genuttrykket. For å

kontrollere at det ikke var forekomst av primer-dimer eller uspesifikk binding, ble det kjørt et smeltekurveprogram etter at hver reaksjon var ferdig. I denne prosessen vil dsDNA (med SYBR®Green inkorporert) dissosieres eller ”smeltes” til ssDNA etter hvert som temperaturen i reaksjonen øker, og dette registreres som et brått fall i fluorescens. Datamaskinen plottet nivået av fluorescens mot temperatur, slik at det hele til slutt ble grafisk fremstilt. Ut fra ulikheter i kurvemønstre ble det dermed mulig å vurdere forekomst av primer-dimer eller uspesifikk binding. Programvareinnstillinger brukt i ABI 7500 qPCR maskinen er vist i tabell 6.

**Tabell 6.** Oversikt over temperatur, varighet og antall sykluser kjørt av de ulike stegene i qPCR program.

Steg	Temperatur (°C)	Varighet (sekunder)	Antall sykluser
1) Denaturering	95	20	Hold
2) Denaturering	95	3	40
3) Amplifisering og ekstensjon	60	30	40
4) Smeltekurve	95	15	Kontinuerlig
	60	60	
	95	15	
	60	15	

### 2.8.1 Primere

Alle primere brukt til qPCR var på forhånd designet av Jaya Kumari (NFH/Nofima). Primereffektiviteten for hvert primerpar ble kalkulert ut fra en standardkurve direkte i ABI qPCR maskinen. Det ble laget en tofolds fortykning av en kjent mengde cDNA i en rekke på syv. Primereffektiviteten (E) ble regnet ut etter formelen  $E = 10^{(-1/\text{stigningstallet})}$ . En effektivitet på 100 % indikerer en dobling av mengden DNA i hver syklus, slik at under ”perfekte” reaksjonsbetingelser vil effektiviteten ha en verdi på 2 [106]. Pearsons korrelasjonskoeffisient ( $R^2$ ) ble også regnet ut direkte i ABI qPCR maskinen og er en indikator på hvor godt verdiene fra fortykningsrekken treffer en rett linje. En  $R^2$ -verdi på 1 indikerer en perfekt korrelasjon mellom de ulike variablene (X,Y) i fortykningsrekken. Med andre ord, når  $R^2 = 1$ , indikerer det at verdiene fra fortykningsrekken er løsningen på ligningen ( $Y = aX + b$ ) som definerer kurven. En  $R^2$ -verdi på 1 vil dermed også indikere at det er lineær sammenheng mellom de to variablene i ligningen [28]. Elongeringsfaktor  $1\alpha$  (EF1 $\alpha$ ) ble brukt som referanseggen for å normalisere eksperimentell variasjon. Spesifikk informasjon knyttet til hver enkelt primer er vist i tabell 7. Oligonukleotidene ble tilsatt TE-buffer (Qiagen), slik at hver enkelt primer

opnådde en konsentrasjon på 100  $\mu\text{M}$ . Etter dette ble de fryst ned ved  $-20\text{ }^\circ\text{C}$ . Før bruk ble hver enkelt primer fortynnet til 6  $\mu\text{M}$  med Ultra Pure Water (Biochrom).

**Tabell 7.** Oversikt over primere, primersekvens, amplikonlengde (bp), genbank nr., effektivitet og Pearsons korrelasjonskoeffisient ( $R^2$ ) for genene brukt i qPCR. EF1 $\alpha$ , elongeringsfaktor 1 $\alpha$ ; IL-1 $\beta$ , interleukin-1 $\beta$ ; IL-10, interleukin-10; IL-6, interleukin-6; T-bet, "T-box 21 expressed in T-cells"; IFN- $\gamma$ , interferon- $\gamma$ ; TNF- $\alpha$ , tumor nekrose faktor  $\alpha$ ; GATA-3, "GATA binding protein 3". Alle primere ble levert av Sigma-Aldrich. Hver reaksjon inneholdt 300 nM av hver primer.

Gen	Sekvens (5'-3')	(bp)	GenBank nr.	Effektivitet (%)	$R^2$
EF1 $\alpha$ For	TCGTTTTGCTGTGCGTGAC	98	AF308735	95,650	0,999
EF1 $\alpha$ Rev	CAGACTTTGTGACCTTGCCG				
IL-1 $\beta$ For	AGGACAAGGACCTGCTCAACT	72	AY617117	94,645	0,999
IL-1 $\beta$ Rev	CCGACTCCAACCTCCAACACTA				
IL-10 For	CTGTTGGACGAAGGCATTCTAC	129	EF165028	106,590	0,996
IL-10 Rev	GTGGTTGTTCTGCGTTCTGTTG				
IL-6 For	TGGTGGTGGAGCAAAGAGTCT	101	TC61685	92,773	0,995
IL-6 Rev	GGAGGAGGTTTCAGAAGCCCG				
T-bet For	GGCATAGGTGGCAATCTTTACC	108	GU979861	97,501	0,996
T-bet Rev	GTGCCGATCCGCCCTGTC				
IFN- $\gamma$ For	CGTGTATCGGAGTATCTTCAACCA	94	AJ841811	102,044	0,997
IFN- $\gamma$ Rev	CTCCTGAACCTTCCCCTTGAC				
TNF- $\alpha$ For	CGTGGTGTGACGATGGAAGA	64	NM00112359	94,544	0,997
TNF- $\alpha$ Rev	AGTATCTCCAGTTGAGGCTCCATT				
GATA-3 For	CCCAAGCGATCCGCCCTGTC	67	EU418015	100,601	0,996
GATA-3 Rev	TCGTGCTCGTTTGACAGTTTGC				

## 2.8.2 RNA-isolering

RNA fra vevsprøvene ble isolert ved hjelp av RNeasy® Mini Kit (Qiagen). Som følge av at RNA er svært sensitiv for RNaser ble arbeidet utført med hansker og RNase fritt utstyr i avtrekkskap, som på forhånd var rengjort med RNase AWAY® (VWR). Vevsprøver på  $\leq 30$  mg ble fjernet fra RNAlater®, for så å bli overført til rør tilsatt 600  $\mu\text{l}$  RLT lysisbuffer (Qiagen) tilsatt 1 % 2-mercaptoetanol (Sigma-Aldrich) og keramiske kuler (Precellys), og homogenisert i Precellys® 24 Homogenizer (Bertin Technologies). Rørene ble homogenisert på 5300 x g i to omganger på 10 sekunder. For å fjerne skum som eventuelt måtte ha oppstått, ble rørene oppholdt 5 minutter i RT før de ble sentrifugert i 3 minutter på 20 000 x g. Alle sentrifugeringer ble gjort i Eppendorf Centrifuge 5417R ved  $4\text{ }^\circ\text{C}$ . Supernatanten ble overført til 2 ml eppendorfrør og tilsatt 600  $\mu\text{l}$  70 % etanol (Sigma-Aldrich) og videre overført til en spinnkolonne (Qiagen). Kolonnen ble deretter vasket med 350  $\mu\text{l}$  RW1 buffer (Qiagen) før 80  $\mu\text{l}$  DNase inkubasjonsmiks (Qiagen) ble tilsatt direkte på kolonnenmembranen.

Spinnkolonnene ble DNase behandlet i RT i 15 minutter. Dette trinnet ble inkludert for å bryte ned eventuelle rester av gDNA som måtte være i prøven. Videre ble kolonnene suksessivt vasket med 350 µl RW1 buffer og 2 x 500 µl RPE buffer (Qiagen). For å fjerne rester av bufferen ble spinnkolonnene overført til nye oppsamlingsrør og tørrsentrifugert. Til slutt ble kolonnene overført til 2 ml eppendorfrør og RNA ble eluert ved bruk av 30 µl Ultra Pure Water (Biochrom). Rørene ble umiddelbart plassert på is og kvantitet og kvalitet av RNA ble målt ved hjelp av NanoDrop® ND-1000 Spektrofotometer (Thermo Scientific).  $A_{260}$  og  $A_{280}$  er absorpsjonsverdier målt ved henholdsvis 260 nm og 280 nm.  $A_{260}$  måler RNA-konsentrasjonen og  $A_{280}$  måler proteinkonsentrasjonen, slik at  $A_{260}/A_{280}$  angir forholdet mellom RNA og proteinkontaminering. RNA-prøver hvor verdier var over 1,9 ble ansett som rene [46]. Tilfeldig utvalgte RNA-prøver ble i tillegg analysert ved gelelektroforese. RNA ble holdt på is frem til syntetisering av komplementært DNA (cDNA) og eventuelt overskudds RNA ble alikvotert og fryst ned på -80 °C.

### 2.8.3 Gelelektroforese av RNA

Som en kontroll på at RNA ikke var degradert eller kontaminert med DNA, ble et tilfeldig utvalg RNA-prøver analysert ved gelelektroforese. Det ble laget reaksjonsløsninger bestående av 2 µl RNA, 4 µl formaldehyd "loading buffer" og 4 µl dH<sub>2</sub>O. Løsningene ble overført til brønnene i en 1 % agarosegel tilsatt 3,5 µl etidium bromid (Sigma-Aldrich). Elektroforesen ble satt opp og kjørt i XcellSureLock™ ved 230 V i 12 minutter og visualisert i GeneGenious Bio Imaging Systems (Syngene). RNA ble ansett som intakt når båndene 28S rRNA og 18S rRNA hadde et størrelsesforhold på 2:1.

### 2.8.4 cDNA syntese

Til syntetisering av cDNA ble Quantitect Reverse Transcription Kit (Qiagen) benyttet, og hele prosessen ble utført etter protokoll fra produsent. Hver reaksjon som ble satt opp inneholdt 1 µg RNA. Først ble templatet DNase behandlet på 42 °C i 2 minutter for å eliminere gDNA. Revers-transkripsjon master mix ble tilsatt og RNA ble revers transkribert på 42 °C i 20 minutter. Til slutt ble enzymet revers transkriptase inaktivert når prøvene ble kjørt på 95 °C i 3 minutter. Alle inkubasjoner ble utført i 2720 Thermal Cyclers (Applied Biosystems). cDNA ble midlertidig lagret i kjøleskap før det ble fortynnet 1:20, alikvotert og oppbevart ved -20 °C inntil videre bruk.

### 2.8.5 Kvantitativ RT-PCR

For kvantitativ bestemmelse av genuttrykk ble det benyttet Fast SYBR®Green Master Mix (Applied Biosystems®). Arbeidet ble utført i henhold til protokoll fra produsent og prøvene ble analysert i ABI 7500 qPCR. Hver enkelt reaksjon ble tillaget i MicroAmp® Optical 96-brønners brett (Applied Biosystems®), og inneholdt 6 µl (15 ng) cDNA og 14 µl mastermix. Mastermixen inneholdt 10 µl fast SYBR®Green, 2 µl Ultra Pure Water (Biochrom), 1 µl forward primer (6 µM) og 1 µl revers primer (6 µM). Det ble kjørt triplikate av samtlige prøver. Før analyse ble brettene forseglest med MicroAmp® Optical Adhesive Film (Applied Biosystems®) og sentrifugert i MPS mini plate spinner 1000 (Labnet). For å avdekke uregelmessigheter i form av kontaminering og uspesifikk binding ble det kjørt tre forskjellige kontroller. Alle brett inneholdt et triplikate med negativ kontroll, der templatet ble utelatt fra reaksjonen og erstattet med 6 µl Ultra Pure Water. Dersom Ct-verdiene i negativ kontroll var <35 ble prøvene ansett som kontaminert av cDNA, SYBR®Green, primere eller vann og et nytt brett ble laget. Hvert brett inkluderte også et triplikate av en cDNA-pool, og denne poolen fungerte som en kontroll på at alle brettene ble kjørt under like betingelser. Ved å inkludere et tilfeldig utvalg DNase-behandlet RNA-prøver i noen plater, ble det også kontrollert at RNA ikke inneholdt gDNA.

### 2.9 Databehandling

Data fra samtlige analyser ble behandlet i Microsoft Excel. Programmet 7500 Software Relative Quantification Study Application (v.2.0.6, Applied Biosystems) ble brukt til å bestemme Ct-verdier og terskelverdien ble manuelt satt til 0,2. Relativt uttrykk av mRNA transkripter ble beregnet etter Pfaffl (2001) [106] og metoden er vist i likning 1.

#### Likning 1.

$$\text{ratio} = \frac{(E_{\text{mål}})^{\Delta\text{Ct}_{\text{mål}(\text{kontroll} - \text{prøve})}}}{(E_{\text{ref}})^{\Delta\text{Ct}_{\text{ref}(\text{kontroll} - \text{prøve})}}}$$

Likning 1 er en matematisk modell som angir relativt uttrykk av et målgen sammenlignet mot et referansegene, der det blir tatt hensyn til forskjeller i primereffektivitet.  $E_{\text{mål}}$  er primereffektiviteten til målgenet, mens  $E_{\text{ref}}$  er primereffektiviteten til referansegene.  $\Delta C_{\text{t}_{\text{mål}}}$  er Ct-verdien til kontrollgenet subtrahert mot Ct-verdien til målgenet, mens  $\Delta C_{\text{t}_{\text{ref}}}$  er Ct-verdien til kontrollgenet subtrahert mot Ct-verdien til referansegene.

For å beregne om det var signifikante forskjeller mellom de ulike gruppene i resultatene som framkom etter qPCR og antistoffresponsmålingene ble det benyttet en parett-test. Ulikheter hvor  $p$ -verdier  $\leq 0,05$  ble ansett som signifikante, mens ulikheter hvor  $p$ -verdier  $\leq 0,001$  ble ansett som svært signifikante.



### 3. Resultater

---

#### 3.1 Måling av ROS etter stimulering av TO-celler med US og MSU

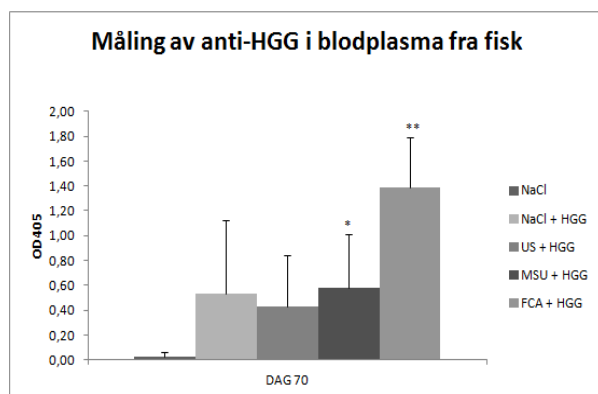
De eksperimentelle betingelsene ga ingen detekterbar produksjon av ROS i TO-celler ved bruk av NBT-assay. Resultatene ble regnet ut som gjennomsnitt av triplikatet fra måledataene og subtrahert mot gjennomsnitt av triplikatet fra kontrolldataene. Uavhengig av dose, ble det ikke vist noen sammenheng mellom produksjon av ROS i TO-cellene og stimulering med US eller MSU. De avleste verdiene av optisk tetthet var generelt veldig lave og fremstilling av resultatene er derfor utelatt.

#### 3.2 Måling av antistoffproduksjon mot HGG

Indirekte ELISA ble benyttet for å vurdere de ulike gruppens produksjon av spesifikke antistoffer mot antigenet HGG. Blodplasma fra gruppene NaCl, NaCl + HGG, US + HGG, MSU + HGG og FCA + HGG ble fortynnet 1:200 og analysert ved dag 20 og 70. Alle data ble normalisert mot gjennomsnitt av brettkontroll.

Alle gruppene viste svært lav respons mot HGG 20 dager etter immunisering (data ikke vist). 70 dager etter vaksinasjon viste gruppene MSU + HGG og FCA + HGG en signifikant økning i immunrespons mot HGG sammenlignet mot fisk injiserte med NaCl (se figur 4). Produksjonen av spesifikke antistoff mot HGG var størst i fisk injisert med FCA + HGG. Denne gruppen viste en signifikant høyere ( $p \leq 0,001$ ) antistoffproduksjon sammenlignet med negativ kontroll (NaCl), og en signifikant ( $p \leq 0,05$ ) høyere antistoffproduksjon sammenlignet med de øvrige gruppene injisert med HGG. Verdiene av anti-HGG i denne gruppen var også stabilt høye på individnivå.

I gruppen NaCl + HGG hadde hovedmengden fisk ( $n = 7$ ) lave antistoffverdier ( $OD < 0,3$ ), men enkeltfisk ( $n = 3$ ) bidro til å dra opp gjennomsnittet. Hovedmengden fisk ( $n = 6$ ) hadde også lave antistoffverdier ( $OD < 0,3$ ) i gruppen US + HGG, mens enkeltfisk bidro også her til å dra opp gjennomsnittet. I gruppen MSU + HGG hadde hovedmengden fisk ( $n = 7$ ) antistoffverdier, gjengitt som OD, fra 0,3 til 1,4, men av disse ble det hovedsakelig observert antistoffverdier nærmere 0,3 enn 1,4.



**Figur 4.** Antistoff mot HGG i blodplasma (fortynnet 1:200) 70 dager etter injeksjon med ulike vaksineformuleringer. Søylen viser gjennomsnitt ( $n = 10$ ) med positivt standardavvik. Statistiske forskjeller ( $p \leq 0,05$  og  $p \leq 0,001$ ) mellom behandlet gruppe og kontrollgruppe (NaCl) er indikert med hhv. \* og \*\* over kolonnene.

### 3.3 Måling av mRNA-transkripter

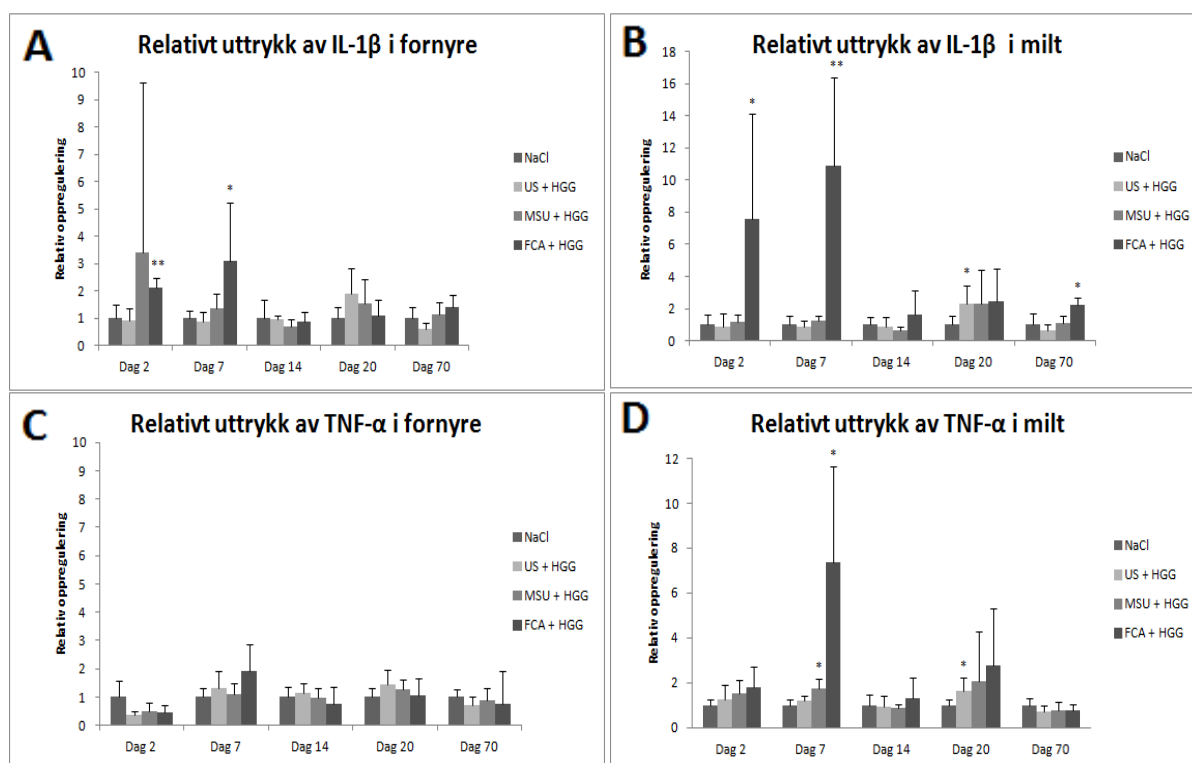
qPCR ble gjennomført for å måle uttrykk av ulike cytokiner og transkripsjonsfaktorer. Valget av cytokiner og transkripsjonsfaktorer ble gjort med bakgrunn i problemstillingen. Det var viktig å inkludere cytokiner og transkripsjonsfaktorer som uttrykkes både i humorale og cellulære immunresponser. Valget falt på IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , GATA-3, T-bet, IFN- $\gamma$ , IL-10 og IL-6, der de fem førstnevnte ble analysert 2, 7, 14, 20 og 70 dager etter vaksinasjon. IL-6 ble undersøkt to og syv dager etter vaksinasjon og IL-10 ble undersøkt syv dager etter vaksinasjon – da ekspresjon av begge cytokinene i tidligere forsøk har vist å oppreguleres relativt tidlig i et immuniseringsforløp. Fornyre og milt ble prioritert undersøkt da de er viktige sekundære immunologiske organer. Enkeltindivider med ekstreme utslag av genuttrykk ble inkludert i beregningene. Dette gjaldt ikke i tilfeller der det ble påvist ekstreme utslag av referansegenet (EF1 $\alpha$ ), og disse ble derfor ekskludert fra beregningene. Grensen for hva som ble regnet som ekstremt utslag, ble satt til to Ct-verdier over eller under gjennomsnittsverdien fra en enkelt gruppe, ved et gitt tidspunkt. Samtlige resultater ble normalisert mot NaCl for lettere å kunne sammenligne genuttrykket mellom gruppene. Resultater fra qPCR ansett som mindre interessante er lagt ved i appendiks V.

#### 3.3.1 Måling av relativt uttrykk av proinflammatoriske cytokiner

Ekspresjon av IL-1 $\beta$  i fornyre var signifikant høyere hos fisk injiserte med FCA + HGG sammenlignet mot NaCl, to og syv dager etter injeksjon. Det samme var tilfelle i milt, men her var det også en signifikant forskjell mellom FCA + HGG og NaCl 70 dager etter immunisering. I milt og fornyre økte uttrykket av IL-1 $\beta$  i gruppene US + HGG og MSU +

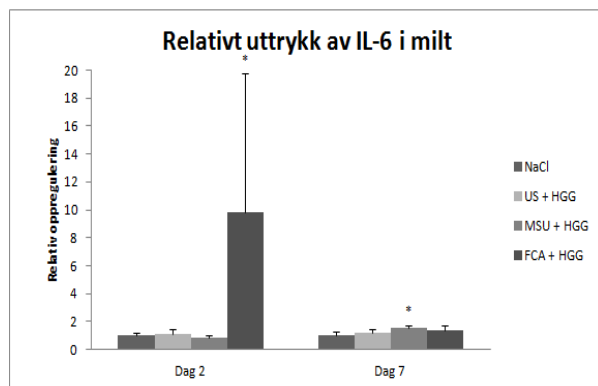
HGG 20 dager etter immunisering, men bare uttrykket av US + HGG i milt var signifikant forskjellig fra NaCl. I gruppen som var injisert med MSU + HGG viste ett individ en relativ oppregulering av IL-1 $\beta$  på 17,58 i fornyre to dager etter immunisering. Dette er årsaken til det høye standardavviket for denne gruppen, vist i figur 5A.

I fornyre ble det ikke observert en signifikant forskjell i genuttrykk av TNF- $\alpha$  mellom prøvegruppene og kontrollgruppe. Ekspresjon av TNF- $\alpha$  i milt, syv dager etter vaksinasjon var signifikant høyere for gruppene som var injisert med MSU + HGG og FCA + HGG, sammenlignet med NaCl. Det var også signifikant høyere uttrykk av TNF- $\alpha$  i milt hos US + HGG 20 dager etter vaksinasjon. Genuttrykket av TNF- $\alpha$  i milt var likevel lavere for US + HGG enn hva som var tilfelle for MSU + HGG og FCA + HGG 20 dager etter vaksinasjon.



**Figur 5.** Relativt uttrykk av proinflammatoriske cytokiner; A) IL-1 $\beta$  i fornyre, B) IL-1 $\beta$  i milt, C) TNF- $\alpha$  i fornyre, D) TNF- $\alpha$  i milt. Søylene viser gjennomsnitt ( $n = 5-6$ ) med positivt standardavvik. Statistiske forskjeller ( $p \leq 0,05$  og  $p \leq 0,001$ ) mellom behandlet gruppe og kontrollgruppe (NaCl) er indikert med hhv. \* og \*\* over kolonnene. Alle verdier er normalisert mot NaCl, slik at kontrollgruppe alltid har verdien én. Gjennomsnittlige Ct-verdier for alle behandlingsgruppene er lagt ved i appendiks VI.

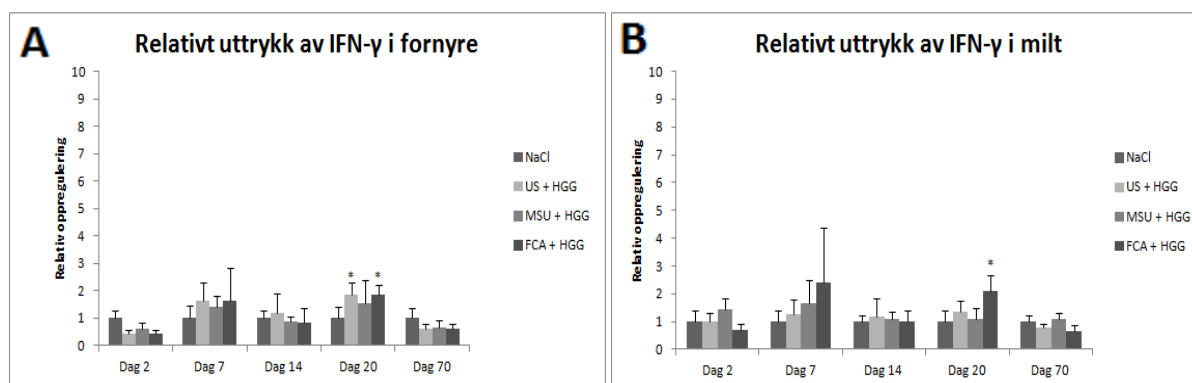
Det relative uttrykket av IL-6 i milt var signifikant høyere hos fisk injisert med FCA + HGG sammenlignet mot NaCl to dager etter vaksinasjon. Det var også en signifikant forskjell mellom MSU + HGG og NaCl syv dager etter vaksinasjon.



**Figur 6.** Relativt uttrykk av IL-6 i milt. Søylen viser gjennomsnitt ( $n = 6$ ) med positivt standardavvik. Statistiske forskjeller ( $p \leq 0,05$ ) mellom behandlet gruppe og kontrollgruppe (NaCl) er indikert med \* over kolonnene. Alle verdier er normalisert mot NaCl, slik at kontrollgruppe alltid har verdien én. Gjennomsnittlige Ct-verdier for alle behandlingsgruppene er lagt ved i appendiks VI.

### 3.3.2 Måling av relativt uttrykk av antivirale cytokiner

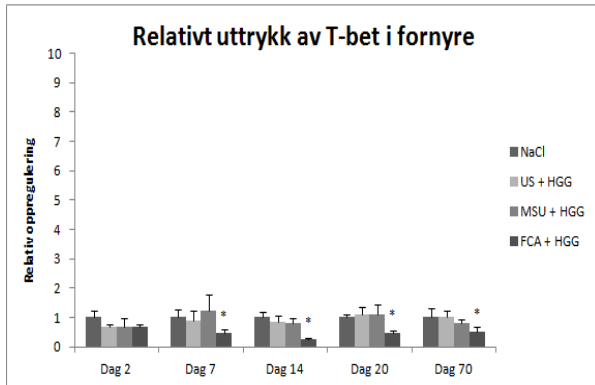
Det relative uttrykket av IFN- $\gamma$  i fornyre var signifikant høyere hos US + HGG og FCA + HGG, sammenlignet mot NaCl 20 dager etter immunisering. Dette ble også vist for FCA + HGG i milt.



**Figur 7.** Relativt uttrykk av cytokinet IFN- $\gamma$ ; A) IFN- $\gamma$  i fornyre, B) IFN- $\gamma$  i milt. Søylen viser gjennomsnitt ( $n = 5-6$ ) med positivt standardavvik. Statistiske forskjeller ( $p \leq 0,05$ ) mellom behandlet gruppe og kontrollgruppe (NaCl) er indikert med \* over kolonnene. Alle verdier er normalisert mot NaCl, slik at kontrollgruppe alltid har verdien én. Gjennomsnittlige Ct-verdier for alle behandlingsgruppene er lagt ved i appendiks VI.

### 3.3.3 Måling av relativt uttrykk av transkripsjonsfaktor T-bet

Gruppe FCA + HGG viste en signifikant nedregulering av transkripsjonsfaktor T-bet 7, 14, 20 og 70 dager etter injeksjon, sammenlignet mot NaCl.



**Figur 8.** Relativt uttrykk av T-bet mRNA transkripter i fornyre. Søylene viser gjennomsnitt ( $n = 5-6$ ) med positivt standardavvik. Statistiske forskjeller ( $p \leq 0,05$ ) mellom behandlet gruppe og kontrollgruppe (NaCl) er indikert med \* over kolonnene. Alle verdier er normalisert mot NaCl, slik at kontrollgruppe alltid har verdien én. Gjennomsnittlige Ct-verdier for alle behandlingsgruppene er lagt ved i appendiks VI.



## 4. Diskusjon

---

US og MSU fått stor oppmerksomhet innen human forskning, da de har blitt satt i sammenheng med aktivering av ulike inflammatoriske responser [23, 56, 90, 121, 124]. Det har også blitt vist at MSU har adjuvansaktivitet med potensial til å kunne bli brukt i vaksinesammenheng [87, 115, 127]. Det foreligger imidlertid ingen rapporter som beskriver adjuvansegenskapene til US og MSU etter intraperitoneal injeksjon i fisk. Det har derimot blitt utført et fåtall *in vitro* forsøk som beskriver MSUs virkning på ulike cellekomponenter i makrofager fra fisk [7, 26]. Som følge av dette, er det lite kjennskap til de immunologiske mekanismene som iverksettes i fisk etter injeksjon av US og MSU.

### 4.1 Effekt etter stimulering av TO-celler med US og MSU

I dette forsøket ble TO-celler stimulert med ulike konsentrasjoner av US og MSU, men cellene produserte ikke ROS, målt som reduksjon av "nitroblue tetrazolium", ved noen av tidspunktene. Dette samstemte ikke med forsøk gjort med makrofager isolert fra mus, da det har vist produksjon av ROS etter stimulering med MSU [135].

TO-celler har fra tidligere studier blitt antydnet å være en dendrittisk cellelinjetype, opprinnelig isolert fra fornyre hos atlantisk laks [53]. Et forsøk utført av Pettersen *et al.* (2008) har vist at denne celletypen innehar svært høy fagocytisk kapasitet overfor partikulært materiale [105]. I det samme forsøket ble cellene stimulert med LPS og *Aeormonas salmonicida*, før nivået av ROS ble målt spektrofotometrisk. Resultatene viste lav produksjon av ROS og det ble antydnet at cellene hadde dårlige egenskaper til å produsere ROS, noe som blir ansett som en viktig forbindelse med drap av mikroorganismer [105]. Dette forsøket forsterket teorien om at TO-celler har dårlige egenskaper til å produsere ROS, men sa imidlertid ingenting om TO-celler innehar andre effektive drapsmekanismer som ikke inkluderer produksjon av ROS.

Selv om TO-celler har vist å ha gode fagocytiske egenskaper, gav ikke dette forsøket noe informasjon om hvorvidt TO-cellene faktisk klarte å fagocyttere krystallene. Størrelsen på partiklene ble ikke målt før tilsetning. Dersom TO-cellene ikke kunne fagocyttere krystallene som følge av størrelse, er det en mulighet for at ROS kan ha blitt produsert gjennom frustert

fagocytose. Dette er likevel lite sannsynlig da dette er et fenomen assosiert med produksjon og frigivelse av ROS [13, 101].

Tidligere arbeid har indikert at mononukleære celler responderer på MSU ut fra hvilket stadium i celledifferensieringen de måtte befinne seg i. Det har i den forbindelse blitt avdekket at nyisolerte monocytter og umodne makrofagcellelinjer sekreterer forskjellige inflammatoriske cytokiner etter stimulering med MSU, mens differensierte monocytter og cellelinjer bestående av modne makrofager ikke har klart dette [79, 155]. I dette forsøket ble det benyttet TO-celler som har gjennomgått svært mange passasjer med celledifferensiering. Som følge av dette, kan det ikke utelukkes at noen av cellens opprinnelige egenskaper kan ha blitt borte [105]. Det beste ville ha vært å isolere makrofager fra fornyre fra uvaksinert laksefisk, og deretter stimulert cellene med US og MSU, men dette ble ikke prioritert i denne oppgaven.

### **4.2 Antistoffrespons mot HGG**

I dette studiet ble antistoffproduksjonen for gruppene injisert med HGG sammenlignet opp mot hverandre 20 og 70 dager etter immunisering. Dette ble gjort for å vurdere adjuvansenes evne til å øke antistoffproduksjonen mot det tilsatte antigenet.

Som forventet klarte ingen av gruppene å fremkalle antistoffproduksjon mot HGG 20 dager (200 døgngrader) etter vaksinerings. Tidligere har det blitt utført flere forsøk på laksefisk som omhandler antistoffproduksjon mot et bredt spekter av antigen [34, 55, 77, 136]. I disse forsøkene har det blitt vist at immunforsvaret trenger tid på å komme i gang med produksjonen av spesifikke antistoffer mot det injiserte antigenet, samt at vanntemperaturen påvirker hastigheten på antistoffproduksjon i betydelig grad [117].

Det spesifikke antistoffnivået mot HGG ble også målt 70 dager (700 døgngrader) etter vaksinerings. Litt overraskende viste alle gruppene injisert med HGG produksjon av spesifikke antistoffer mot antigenet. NaCl + HGG viste antistoffrespons på nivå med US + HGG og MSU + HGG, noe som betydelig svekker teorien om at US og MSU har bedre adjuvansegenskaper enn saltvann i seg selv. Det kan imidlertid ikke utelukkes at US og MSU innehar adjuvansegenskaper, da det ble registrert relativt like antistoffnivåer i gruppene US + HGG og MSU + HGG sammenlignet med FCA + HGG.



Resultatene tilsier likevel at andre faktorer kan ha forårsaket antistoffproduksjonen. Bowden *et al.* (2003) viste i et forsøk at injeksjon med PBS + HGG ikke resulterte i produksjon av spesifikke antistoff mot HGG i kveite [15]. Nivået av injiserte antigenprotein var i dette forsøket beskjedent; 10 µg/fisk [15]. Fisken i gruppene som ble injisert med HGG, fikk administrert en løsning som var forholdsvis mettet med antigen. En forklaring på hvorfor immunisering med NaCl + HGG resulterte i produksjon av antistoffer mot HGG kan være at antigenet ikke var fullstendig oppløst før injeksjon. Forsøk har vist at proteinpartikler kan forårsake antistoffproduksjon på linje med eller bedre enn løselig antigen [118].

En del av antistoffproduksjonen i gruppen FCA + HGG kan også skyldes tilstedeværelse av HGG i partikkelform, men det ble ikke gjort studier for å undersøke dette. FCA har imidlertid vist å være en potent adjuvans med evne til å øke immunogeniteten mot svært mange ulike antigener, inklusivt HGG [43]. Dette er trolig årsaken til at FCA + HGG viste en signifikant høyere antistoffproduksjon mot HGG enn de øvrige gruppene injisert med HGG.

### **4.3 Effekt av US og MSU på ekspresjon av proinflammatoriske cytokiner**

Evnen til å kunne starte en medfødt immunrespons er en sentral egenskap for alle adjuvanter. Vaksineformuleringer med innhold av mineraloljer viser ofte at de proinflammatoriske cytokinene IL-1 $\beta$  og TNF- $\alpha$  oppreguleres kort tid etter injeksjon, før genuttrykket etter hvert synker tilbake til basalnivået [60]. I dette studiet viste FCA + HGG et uttrykk av IL-1 $\beta$  i fornyre og milt som var signifikant høyere sammenlignet med NaCl to og syv dager etter vaksinerings. 14 dager etter vaksinasjon var verdiene tilbake på nivå med NaCl. I gruppen FCA + HGG ble TNF- $\alpha$  sterkt uttrykt i milt syv dager etter vaksinasjon, men ved de øvrige tidspunktene i milt, samt i fornyre, var uttrykket lavt. Det er kjent fra studier på menneske at MSU forårsaker ekspresjon og produksjon av TNF- $\alpha$  [29]. Hvorfor den generelle ekspresjonen av TNF- $\alpha$  hos atlantisk laks i dette forsøket var lavt er uklart.

Sammenlignet med FCA + HGG viste gruppene injisert med US + HGG og MSU + HGG et lavt uttrykk av IL-1 $\beta$  og TNF- $\alpha$ , to og syv dager etter vaksinasjon. Én fisk injisert med MSU + HGG viste imidlertid et svært høyt uttrykk av IL-1 $\beta$  i fornyre to dager etter injeksjon. I forskningssammenheng er det ønskelig å benytte fisk med felles opphav for å oppnå mest mulig like biologiske betingelser. Det er imidlertid kjent at enkeltindivider med samme genetisk opphav kan vise variasjon i genuttrykk [154]. Med bakgrunn i dette blir det vanskelig

å vurdere om det ekstreme uttrykket av IL-1 $\beta$  i ett enkeltindivid i gruppen MSU + HGG to dager etter injeksjon skyldes innholdet i vaksinen, injisert dose eller om dette skyldes naturlige biologiske prosesser.

Det eksisterer flere publikasjoner som delvis forklarer hvorfor fisk ikke uttrykker IL-1 $\beta$  på nivå med pattedyr [83, 104, 113, 150], også etter stimulering med MSU [7, 26]. Angosto *et al.* (2012) har vist at caspase-1 i makrofager isolert fra havkaruss, ikke evner å konvertere pro-IL-1 $\beta$  til dens aktive form etter stimulering med kjente NLRP3-inflammasomaktivatorer (deriblant MSU) i pattedyr [7]. Hos fisk har det blitt indikert at NLRP3-inflammasomet, nærmere bestemt caspase-1, mangler en omdanningsplattform som omdanner pro-IL-1 $\beta$  til IL-1 $\beta$  [83, 104]. Dette åpner for spørsmål rundt rollen til caspase-1 i forbindelse med regulering av immunresponsen blant laverestående vertebrater. Angosto *et al.* (2012) foreslo videre at IL-1 $\beta$  kan bli dannet gjennom en caspase-1-uavhengig mekanisme i fagocytter, mens en mer avansert totrinns mekanisme, som involverer en inflammasomavhengig aktivering av caspase-1, oppstod etter at fisk og tetrapoder skilte utviklingsretning for omtrent 450 millioner år siden [7].

20 dager etter vaksinasjon viste gruppene US + HGG, MSU + HGG og FCA + HGG en oppregulering av IL-1 $\beta$  i milt på henholdsvis 2,28, 2,31 og 2,42. Det var variasjon i genuttrykket mellom individene i hver av gruppene, men i førstnevnte gruppe var uttrykket signifikant forskjellig fra NaCl. Årsaken til økningen i disse tre gruppene er uvisst, men vaksineinnholdet kan hatt en innvirkning. Det er også interessant at immunforsvaret ikke hadde produsert spesifikke antistoffer mot HGG på dette tidspunktet. Dette indikerer at IL-1 $\beta$  kan ha blitt produsert fra cellekomponenter i det medfødte immunforsvaret.

En teori på hvorfor det ble registrert økt uttrykk av IL-1 $\beta$  i gruppene US + HGG og MSU + HGG, 20 dager etter vaksinasjon, kan være at US og MSU har forårsaket forstyrrelser i osmolariteten intracellulært. Det er vist at makrofager stimulert med en hypoton løsning (90 mOsm) fører til aktivering av NLRP3-inflammasomet både i pattedyr og fisk [26]. Hyperosmotisk behandling av makrofager forårsaket imidlertid ingen oppregulering av IL-1 $\beta$  [26]. På mus er det vist at MSU er i stand til å utsette makrofager for et hypotonisk miljø, og på den måten aktivere NLRP3-inflammasomet, anført av caspase-1, til å starte produksjon av IL-1 $\beta$  [122]. Det er imidlertid uvisst om MSU kan utsette makrofager hos atlantisk laks for et hypotonisk miljø. En nylig fylogenetisk studie har vist at fisk innehar tre ulike NLR-

underfamilier. To reseptorer har likhetstrekk med reseptorer funnet i pattedyr og én reseptor som er unik for fisk [7, 78]. Hvorvidt en økt diversitet blant NLR kan ha en innvirkning på NLRP3-inflammasomets funksjon er uvisst. Det er også uvisst hvorvidt den unike reseptoren er involvert i aktiveringen av inflammasomet i tilfeller der det oppstår et hypotonisk miljø i cellen.

#### 4.4 Effekt av US og MSU på ekspresjon av IL-6

IL-6 er et akutt fase cytokin som induseres blant annet ved akutt inflammasjon [96]. Det er motstridene observasjoner om hvorvidt MSU kan øke uttrykket av IL-6 i immunceller hos pattedyr. Ett forsøk har vist økt uttrykk av IL-6 fra nøytrofile celler etter stimulering med MSU [48], mens et annet viste ingen signifikant økning etter at nøytrofile celler og monocytter ble stimulering med MSU [123]. Dette er det første studiet som har undersøkt ekspresjon av IL-6 hos fisk etter injeksjon av US og MSU.

I milt ble det observert en signifikant økning i genuttrykket av IL-6 i gruppe MSU + HGG syv dager etter vaksinasjon. Forskjellene mellom MSU + HGG og NaCl må likevel anses som beskjedne. Relativt lite forskning er gjort på dette cytokinet i fisk. Jørgensen *et al.* (2000) og Bayne *et al.* (2001) har imidlertid vist at IL-1 $\beta$  og TNF- $\alpha$  styrer uttrykket av IL-6 i betydelig grad [10, 68]. I dette forsøket ble det registrert et generelt lavt uttrykk av IL-1 $\beta$  og TNF- $\alpha$  i gruppe MSU + HGG to og syv dager etter vaksinasjon, og det er derfor usikkert hvilke cellulære mekanismer som kan ha forårsaket et økt IL-6 uttrykk. Resultatene fra gruppe FCA + HGG viste en kraftig økning i uttrykket av IL-6 i milt to dager etter vaksinasjon. Ved dette tidspunktet var også uttrykket av IL-1 $\beta$  høyt, mens uttrykket av TNF- $\alpha$  var forholdsvis lavt. Syv dager etter vaksinasjon ble det imidlertid observert et sterkt uttrykk av TNF- $\alpha$ . Dette resultatet samsvarer dermed rimelig bra med tidligere forsøk som har vist at økt uttrykk av IL-6, avhenger av økt uttrykk av IL-1 $\beta$  og TNF- $\alpha$  [10, 68]. Som følge av generelt lavt uttrykk av IL-6 i US + HGG og MSU + HGG er det nærliggende å indikere at verken US eller MSU innehar egenskaper som induserer høy grad av akutt inflammasjon hos atlantisk laks. Hos fisk er lever, nærmere bestemt hepatocytene, antatt å produsere en større andel APP [10]. Nivåene av IL-6 i lever ble imidlertid ikke analysert i dette studiet.

#### **4.5 Effekt av US og MSU på ekspresjon av T-bet og IFN- $\gamma$**

En av utfordringene med å lage en effektiv vaksine mot intracellulære patogener er å få vaksinen til å stimulere det cellulære immunforsvaret. Det er ikke utført studier med hensyn på ekspresjon av antivirale cytokiner etter injeksjon av US og MSU. Det er imidlertid gjort ett forsøk på mus som indikerer at endogene signaler frigjort ved celledøde stimulerer til cytotoksiske T-celleresponser [129]. I dette studiet ble det undersøkt om US eller MSU kunne lede immunresponsen i cellulær retning.

Resultatene for samtlige grupper viste imidlertid et generelt lavt uttrykk av IFN- $\gamma$  i milt og fornyre ved alle tidspunkt. T-bet som i stor grad påvirker uttrykket av IFN- $\gamma$ , viste også et lavt uttrykk i fornyre ved samtlige tidspunkt. I FCA + HGG var genuttrykket av T-bet signifikant lavere sammenlignet med NaCl ved 7, 14, 21 og 70 dager etter vaksinasjon. Tidligere forsøk har vist at FCA ikke oppregulerer T-bet og IFN- $\gamma$  i atlantisk laks [44]. Generelt lave genuttrykk av IFN- $\gamma$  og T-bet i gruppene US + HGG og MSU + HGG antyder at US og MSU innehar sub-optimale egenskaper til å lede immunresponsen i cellulær retning. Når dette er sagt, bør funksjonelle studier med fenotypisk karakterisering av aktiverte og differensierte T<sub>H</sub>-celler sammen med cytokinprofilene undersøkes etter immunisering med for eksempel MSU + antigen. Dette kan gjøres dersom det foreligger et større repertoar av ulike antistoffer mot T<sub>H</sub>-cellemarkører.

#### **4.6 Fremtidsperspektiver**

Da US og MSU sannsynligvis viste liten evne til å aktivere NLRP3-inflammasomet til å starte produksjon av IL-1 $\beta$ , og dermed ikke forårsake inflammasjon, er det videre behov å lete etter andre potensielle adjuvanser med slike egenskaper. Det kan imidlertid tenkes at US eller MSU kan benyttes i kombinasjon med for eksempel PAMP i vaksiner for å øke eller styre T-celleresponsen. Her kan ligander for TLR-3, -7 og -9 benyttes, da de har vist å ha antiviral effekt hos dyr inkludert fisk [141]. Det er stor sannsynlighet for at det i fremtiden vil bli utviklet vaksineadjuvanser som er mer målrettet og effektive overfor intracellulære patogener, da det vil resultere i en betydelig økonomisk gevinst.

### 5. Konklusjon

---

I dette studiet ble det ikke observert produksjon av ROS etter at TO-celler ble stimulert med ulike konsentrasjoner av US og MSU.

Det ble observert antistoffrespons mot HGG 70 dager etter vaksinasjon i alle grupper injisert med HGG. Antistoffnivåene til US + HGG og MSU + HGG var imidlertid på nivå med NaCl + HGG, noe som svekket teorien om at US og MSU innehar adjuvansegenskaper i atlantisk laks.

Med få unntak var det generelt lave genuttrykk av proinflammatoriske cytokiner i gruppene injisert med US + HGG og MSU + HGG i milt og fornyre. Resultatene fra dette forsøket støtter derfor teorien om at NLRP3-inflammasomet ble utviklet som omdanningsplattform for IL-1 $\beta$  etter at beinfisk og tetrapoder skilte lag tidlig i evolusjonen.

Selv om det ble funnet relativt lave uttrykk av gener for proinflammatoriske cytokiner, viste ELISA at det ble dannet spesifikke antistoffer etter immunisering, noe som tydet på at en immunrespons var til stede.

Gruppene injisert med US + HGG og MSU + HGG viste lavt uttrykk av IFN- $\gamma$  og T-bet ved samtlige tidspunkt. Dette indikerte at adjuvansene ikke innehar optimale egenskaper i å lede immunresponsen i cellulær retning.



## 6. Kilder

---

1. Abbas, A.K. og Lichtman, A.H. (2009). *Basic Immunology - Functions and Disorders of the Immune System*. Philadelphia: Saunders Elsevier.
2. Adams, A., Auchinachie, N., Bundy, A., Tatner, M.F. og Horne, M.T. (1988). The potency of adjuvanted injected vaccines in rainbow trout (*Salmo gairdneri* Richardson) and bath vaccines in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) against furunculosis. *Aquaculture*. **69**: s. 15-26.
3. Agostini, L., Martinon, F., Burns, K., McDermott, M.F., Hawkins, P.N. og Tschopp, J. (2004). NALP3 forms an IL-1beta-processing inflammasome with increased activity in Muckle-Wells autoinflammatory disorder. *Immunity*. **20**(3): s. 319-325.
4. Akira, S., Uematsu, S. og Takeuchi, O. (2006). Pathogen recognition and innate immunity. *Cell*. **124**(4): s. 783-801.
5. Alvarez-Lario, B. og Macarron-Vicente, J. (2010). Uric acid and evolution. *Rheumatology (Oxford)*. **49**(11): s. 2010-2015.
6. Andersen, O., Aas, T.S., Skugor, S., Takle, H., van Nes, S., Grisdale-Helland, B., Helland, S.J. og Terjesen, B.F. (2006). Purine-induced expression of urate oxidase and enzyme activity in Atlantic salmon (*Salmo salar*). Cloning of urate oxidase liver cDNA from three teleost species and the African lungfish (*Protopterus annectens*). *FEBS J*. **273**(13): s. 2839-2850.
7. Angosto, D., Lopez-Castejon, G., Lopez-Munoz, A., Sepulcre, M.P., Arizcun, M., Meseguer, J. og Mulero, V. (2012). Evolution of inflammasome functions in vertebrates: Inflammasome and caspase-1 trigger fish macrophage cell death but are dispensable for the processing of IL-1beta. *Innate Immun.* **18**(6): s. 815-824.
8. Aune, T.M., Collins, P.L. og Chang, S. (2009). Epigenetics and T helper 1 differentiation. *Immunology*. **126**(3): s. 299-305.
9. Bassity, E. og Clark, T.G. (2012). Functional identification of dendritic cells in the teleost model, rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *PLoS One*. **7**(3): s. e33196.
10. Bayne, C.J. og Gerwick, L. (2001). The acute phase response and innate immunity of fish. *Dev Comp Immunol*. **25**(8-9): s. 725-743.
11. Behrens, M.D., Wagner, W.M., Krco, C.J., Erskine, C.L., Kalli, K.R., Krempsi, J., Gad, E.A., Disis, M.L. og Knutson, K.L. (2008). The endogenous danger signal,

- crystalline uric acid, signals for enhanced antibody immunity. *Blood*. **111**(3): s. 1472-1479.
12. Berg, A., Bergh, Ø., Fjellidal, P.G., Hansen, T., Juell, J.E. og Nerland, A. (2006). Dyrevelferdsmessige konsekvenser av vaksinasjon av fisk – effekter og bivirkninger. *Fisken og havet*. **9**: Havforskningsinstituttet: s. 4-30.
  13. Bergstrand, H. (1990). The generation of reactive oxygen-derived species by phagocytes. *Agents Actions Suppl.* **30**: s. 199-211.
  14. Bogdan, C., Rollinghoff, M. og Diefenbach, A. (2000). Reactive oxygen and reactive nitrogen intermediates in innate and specific immunity. *Curr Opin Immunol.* **12**(1): s. 64-76.
  15. Bowden, T.J., Adamson, K., MacLachlan, P., Pert, C.C. og Bricknell, I.R. (2003). Long-term study of antibody response and injection-site effects of oil adjuvants in Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.). *Fish Shellfish Immunol.* **14**(4): s. 363-369.
  16. Bowden, T.J., Cook, P. og Rombout, J.H. (2005). Development and function of the thymus in teleosts. *Fish Shellfish Immunol.* **19**(5): s. 413-427.
  17. Bretscher, P. og Cohn, M. (1970). A theory of self-nonsel self discrimination. *Science*. **169**(3950): s. 1042-1049.
  18. Bruno, D.W. (2004). Prevalence and diagnosis of bacterial kidney disease (BKD) in Scotland between 1990 and 2002. *Dis Aquat Organ.* **59**(2): s. 125-130.
  19. Bryant, C. og Fitzgerald, K.A. (2009). Molecular mechanisms involved in inflammasome activation. *Trends Cell Biol.* **19**(9): s. 455-464.
  20. C. Uribe, H. Folch, R. Enriquez og Moran, G. (2011). Innate and adaptive immunity in teleost fish: a review. *Veterinarni Medicina.* **56**: s. 486–503.
  21. Castro, R., Bernard, D., Lefranc, M.P., Six, A., Benmansour, A. og Boudinot, P. (2011). T cell diversity and TcR repertoires in teleost fish. *Fish Shellfish Immunol.* **31**(5): s. 644-654.
  22. Cerretti, D.P., Kozlosky, C.J., Mosley, B., Nelson, N., Van Ness, K., Greenstreet, T.A., March, C.J., Kronheim, S.R., Druck, T. og Cannizzaro, L.A. (1992). Molecular cloning of the interleukin-1 beta converting enzyme. *Science*. **256**(5053): s. 97-100.
  23. Chen, C.J., Shi, Y., Hearn, A., Fitzgerald, K., Golenbock, D., Reed, G., Akira, S. og Rock, K.L. (2006). MyD88-dependent IL-1 receptor signaling is essential for gouty inflammation stimulated by monosodium urate crystals. *J Clin Invest.* **116**(8): s. 2262-2271.



24. Ciereszko, A., Dabrowski, K., Kucharczyk, D., Dobosz, S., Goryczko, K. og Glogowski, J. (1999). The presence of uric acid, an antioxidative substance, in fish seminal plasma. *Fish Physiology and Biochemistry*. **21**: s. 313-315.
25. Coffman, R.L., Sher, A. og Seder, R.A. (2010). Vaccine adjuvants: putting innate immunity to work. *Immunity*. **33**(4): s. 492-503.
26. Compan, V., Baroja-Mazo, A., Lopez-Castejon, G., Gomez, A.I., Martinez, C.M., Angosto, D., Montero, M.T., Herranz, A.S., Bazan, E., Reimers, D., Mulero, V. og Pelegrin, P. (2012). Cell volume regulation modulates NLRP3 inflammasome activation. *Immunity*. **37**(3): s. 487-500.
27. Cox, J.C. og Coulter, A.R. (1997). Adjuvants--a classification and review of their modes of action. *Vaccine*. **15**(3): s. 248-256.
28. Craig, B.A., Moore, D.S. og McCabe, G.P. (2009). Introduction to the practice of statistics. New York: W. H. Freeman and Company.
29. di Giovine, F.S., Malawista, S.E., Thornton, E. og Duff, G.W. (1991). Urate crystals stimulate production of tumor necrosis factor alpha from human blood monocytes and synovial cells. Cytokine mRNA and protein kinetics, and cellular distribution. *J Clin Invest*. **87**(4): s. 1375-1381.
30. Dijkstra, J.M., Fischer, U., Sawamoto, Y., Ototake, M. og Nakanishi, T. (2001). Exogenous antigens and the stimulation of MHC class I restricted cell-mediated cytotoxicity: possible strategies for fish vaccines. *Fish Shellfish Immunol*. **11**(6): s. 437-458.
31. Dixon, B. og Stet, R.J. (2001). The relationship between major histocompatibility receptors and innate immunity in teleost fish. *Dev Comp Immunol*. **25**(8-9): s. 683-699.
32. Ellis, A.E. (1988). Current aspects of fish vaccination. *Dis Aquat Organ*. **4**: s. 159-164.
33. Engelsma, M.Y., Stet, R.J., Saeij, J.P. og Verburg-van Kemenade, B.M. (2003). Differential expression and haplotypic variation of two interleukin-1beta genes in the common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Cytokine*. **22**(1-2): s. 21-32.
34. Erdal, J.I. og Reitan, J.L. (1992). Immune response and protective immunity after vaccination of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) against furunculosis. *Fish & Shellfish Immunology*. **2**: s. 99-108.
35. Espenes, A., Press, C.M., Reitan, L.J. og Landsverk, T. (1996). The trapping of intravenously injected extracellular products from *Aeromonas salmonicida* in head

- kidney and spleen of vaccinated and nonvaccinated Atlantic salmon, *Salmo salar* L. *Fish Shellfish Immunol.* **6**: s. 413-426.
36. Ferguson, H.W. (1989). Systemic pathology of fish: A text and atlas of comparative tissue responses in disease of teleosts.
37. Fiddis, R.W., Vlachos, N. og Calvert, P.D. (1983). Studies of urate crystallisation in relation to gout. *Ann Rheum Dis.* **42 Suppl 1**: s. 12-15.
38. Fischer, U., Koppang, E.O. og Nakanishi, T. (2013). Teleost T and NK cell immunity. *Fish Shellfish Immunol.* **35**(2): s. 197-206.
39. Fiskeridirektoratet. (2013). Statistikk for akvakultur / Laks, regnbueørret og ørret - "Salg 1994-2012". Tilgjengelig fra:  
<http://www.fiskeridir.no/statistikk/akvakultur/statistikk-for-akvakultur/laks-regnbueoerret-og-oerret>.
40. Foged, C., Hansen, J. og Agger, E.M. (2012). License to kill: Formulation requirements for optimal priming of CD8(+) CTL responses with particulate vaccine delivery systems. *Eur J Pharm Sci.* **45**(4): s. 482-491.
41. Folkehelseinstituttet. (2013). Grossistbasert legemiddelstatistikk. Tilgjengelig fra:  
<http://www.fhi.no/tema/legemidler/legemidler-i-fiskeoppdrett>.
42. Fredriksen, B.N. (2012). PLGA and PLA particles as vaccine delivery systems for Atlantic salmon. **Doktoravhandling**, Norges Fiskerihøgskole, Tromsø.
43. Fredriksen, B.N. og Grip, J. (2012). PLGA/PLA micro- and nanoparticle formulations serve as antigen depots and induce elevated humoral responses after immunization of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Vaccine.* **30**(3): s. 656-667.
44. Fredriksen, B.N., Saevareid, K., McAuley, L., Lane, M.E., Bogwald, J. og Dalmo, R.A. (2011). Early immune responses in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) after immunization with PLGA nanoparticles loaded with a model antigen and beta-glucan. *Vaccine.* **29**(46): s. 8338-8349.
45. Ghaemi-Oskouie, F. og Shi, Y. (2011). The role of uric acid as an endogenous danger signal in immunity and inflammation. *Curr Rheumatol Rep.* **13**(2): s. 160-166.
46. Glasel, J.A. (1995). Validity of nucleic acid purities monitored by 260nm/280nm absorbance ratios. *Biotechniques.* **18**(1): s. 62-63.
47. Grini, A., Hansen, T., Berg, A., Wargelius, A. og Fjellidal, P.G. (2011). The effect of water temperature on vertebral deformities and vaccine-induced abdominal lesions in Atlantic salmon, *Salmo salar* L. *J Fish Dis.* **34**(7): s. 531-546.

48. Guerne, P.A., Terkeltaub, R., Zuraw, B. og Lotz, M. (1989). Inflammatory microcrystals stimulate interleukin-6 production and secretion by human monocytes and synoviocytes. *Arthritis Rheum.* **32**(11): s. 1443-1452.
49. Gupta, R.K. (1998). Aluminum compounds as vaccine adjuvants. *Adv Drug Deliv Rev.* **32**(3): s. 155-172.
50. Guy, B. (2007). The perfect mix: recent progress in adjuvant research. *Nat Rev Microbiol.* **5**(7): s. 505-517.
51. Harty, J.T. og Bevan, M.J. (1999). Responses of CD8(+) T cells to intracellular bacteria. *Curr Opin Immunol.* **11**(1): s. 89-93.
52. Haugarvoll, E., Bjerkas, I., Nowak, B.F., Hordvik, I. og Koppang, E.O. (2008). Identification and characterization of a novel intraepithelial lymphoid tissue in the gills of Atlantic salmon. *J Anat.* **213**(2): s. 202-209.
53. Haugland, G.T., Pettersen, E.F., Sviland, C., Ronneseth, A. og Wergeland, H.I. (2010). Immunostaining of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) leucocytes. *J Immunol Methods.* **362**(1-2): s. 10-21.
54. Haugland, O., Torgersen, J., Syed, M. og Evensen, O. (2005). Expression profiles of inflammatory and immune-related genes in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) at early time post vaccination. *Vaccine.* **23**(48-49): s. 5488-5499.
55. Hoel, K., Salonius, K. og Lillehaug, A. (1997). Vibrio antigens of polyvalent vaccines enhance the humoral immune response to *Aeromonas salmonicida* antigens in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Fish Shellfish Immunol.* **7**: s. 71-80.
56. Hoffman, H.M., Scott, P., Mueller, J.L., Misaghi, A., Stevens, S., Yancopoulos, G.D., Murphy, A., Valenzuela, D.M. og Liu-Bryan, R. (2010). Role of the leucine-rich repeat domain of cryopyrin/NALP3 in monosodium urate crystal-induced inflammation in mice. *Arthritis Rheum.* **62**(7): s. 2170-2179.
57. Hornung, V., Bauernfeind, F., Halle, A., Samstad, E.O., Kono, H., Rock, K.L., Fitzgerald, K.A. og Latz, E. (2008). Silica crystals and aluminum salts activate the NALP3 inflammasome through phagosomal destabilization. *Nat Immunol.* **9**(8): s. 847-856.
58. Husain, M., Bird, S., van Zwieten, R., Secombes, C.J. og Wang, T. (2012). Cloning of the IL-1beta3 gene and IL-1beta4 pseudogene in salmonids uncovers a second type of IL-1beta gene in teleost fish. *Dev Comp Immunol.* **38**(3): s. 431-446.

59. Hynes, N.A., Furnes, C., Fredriksen, B.N., Winther, T., Bogwald, J., Larsen, A.N. og Dalmo, R.A. (2011). Immune response of Atlantic salmon to recombinant flagellin. *Vaccine*. **29**(44): s. 7678-7687.
60. Hølvold, L.B. (2012). PLGA (poly(D,L-lactic-co-glycolic)acid)particles as DNA carriers in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). **Doktoravhandling**, Norges fiskerihøgskole, Tromsø.
61. Ingerslev, H.C., Ronneseth, A., Pettersen, E.F. og Wergeland, H.I. (2009). Differential expression of immune genes in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) challenged intraperitoneally or by cohabitation with IPNV. *Scand J Immunol*. **69**(2): s. 90-98.
62. Inoue, Y., Kamota, S., Ito, K., Yoshiura, Y., Ototake, M., Moritomo, T. og Nakanishi, T. (2005). Molecular cloning and expression analysis of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) interleukin-10 cDNAs. *Fish Shellfish Immunol*. **18**(4): s. 335-344.
63. Intlekofer, A.M., Takemoto, N., Wherry, E.J., Longworth, S.A., Northrup, J.T., Palanivel, V.R., Mullen, A.C., Gasink, C.R., Kaech, S.M., Miller, J.D., Gapin, L., Ryan, K., Russ, A.P., Lindsten, T., Orange, J.S., Goldrath, A.W., Ahmed, R. og Reiner, S.L. (2005). Effector and memory CD8<sup>+</sup> T cell fate coupled by T-bet and eomesodermin. *Nat Immunol*. **6**(12): s. 1236-1244.
64. Iwata, H., Nishio, S., Yokoyama, M., Matsumoto, A. og Takeuchi, M. (1989). Solubility of uric acid and supersaturation of monosodium urate: why is uric acid so highly soluble in urine? *J Urol*. **142**(4): s. 1095-1098.
65. Janeway, C.A., Jr. (1989). Approaching the asymptote? Evolution and revolution in immunology. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*. **54 Pt 1**: s. 1-13.
66. Jansen, M.D., Wasmuth, M.A., Olsen, A.B., Gjerset, B., Modahl, I., Breck, O., Haldorsen, R.N., Hjelmeland, R. og Taksdal, T. (2010). Pancreas disease (PD) in sea-reared Atlantic salmon, *Salmo salar* L., in Norway; a prospective, longitudinal study of disease development and agreement between diagnostic test results. *J Fish Dis*. **33**(9): s. 723-736.
67. Johansen, R. (2012). (red) Fiskehelserapporten 2012. Veterinærinstituttet: s. 6-20.
68. Jorgensen, J.B., Lunde, H., Jensen, L., Whitehead, A.S. og Robertsen, B. (2000). Serum amyloid A transcription in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) hepatocytes is enhanced by stimulation with macrophage factors, recombinant human IL-1 beta, IL-6 and TNF alpha or bacterial lipopolysaccharide. *Dev Comp Immunol*. **24**(6-7): s. 553-563.

69. Kalgraff, C.A., Wergeland, H.I. og Pettersen, E.F. (2011). Flow cytometry assays of respiratory burst in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) and in Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) leucocytes. *Fish Shellfish Immunol.* **31**(3): s. 381-388.
70. Kanevets, U., Sharma, K., Dresser, K. og Shi, Y. (2009). A role of IgM antibodies in monosodium urate crystal formation and associated adjuvanticity. *J Immunol.* **182**(4): s. 1912-1918.
71. Koppang, E.O., Bjerkas, I., Haugarvoll, E., Chan, E.K., Szabo, N.J., Ono, N., Akikusa, B., Jirillo, E., Poppe, T.T., Sveier, H., Torud, B. og Satoh, M. (2008). Vaccination-induced systemic autoimmunity in farmed Atlantic salmon. *J Immunol.* **181**(7): s. 4807-4814.
72. Koppang, E.O., Fischer, U., Moore, L., Tranulis, M.A., Dijkstra, J.M., Kollner, B., Aune, L., Jirillo, E. og Hordvik, I. (2010). Salmonid T cells assemble in the thymus, spleen and in novel interbranchial lymphoid tissue. *J Anat.* **217**(6): s. 728-739.
73. Koppang, E.O., Haugarvoll, E., Hordvik, I., Aune, L. og Poppe, T.T. (2005). Vaccine-associated granulomatous inflammation and melanin accumulation in Atlantic salmon, *Salmo salar* L., white muscle. *J Fish Dis.* **28**(1): s. 13-22.
74. Krantz, G.E., Reddecliff, J.M. og Heist, C.E. (1963). Development of Antibodies against *Aeromonas Salmonicida* in Trout. *J Immunol.* **91**: s. 757-760.
75. Kumari, J., Bogwald, J. og Dalmo, R.A. (2009). Transcription factor GATA-3 in Atlantic salmon (*Salmo salar*): molecular characterization, promoter activity and expression analysis. *Mol Immunol.* **46**(15): s. 3099-3107.
76. Lafferty, K.J. og Cunningham, A.J. (1975). A new analysis of allogeneic interactions. *Aust J Exp Biol Med Sci.* **53**(1): s. 27-42.
77. Lafrentz, B.R., Lapetra, S.E., Jones, G.R., Congleton, J.L., Sun, B. og Cain, K.D. (2002). Characterization of serum and mucosal antibody responses and relative percent survival in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), following immunization and challenge with *Flavobacterium psychrophilum*. *Journal of Fish Diseases.* **25**: s. 703-713.
78. Laing, K.J., Purcell, M.K., Winton, J.R. og Hansen, J.D. (2008). A genomic view of the NOD-like receptor family in teleost fish: identification of a novel NLR subfamily in zebrafish. *BMC Evol Biol.* **8**: s. 42.
79. Landis, R.C., Yagnik, D.R., Florey, O., Philippidis, P., Emons, V., Mason, J.C. og Haskard, D.O. (2002). Safe disposal of inflammatory monosodium urate monohydrate crystals by differentiated macrophages. *Arthritis Rheum.* **46**(11): s. 3026-3033.

80. Lea, T. (2006). Immunologi og immunologiske teknikker. Vol. 2. Bergen: Fagbokforlaget Vigmostad & Bjørke AS.
81. Legemiddelforeningen. (2013). De 10 veterinærlegemidlene til akvakultur med høyest omsetning. Tilgjengelig fra:  
[http://www.legemiddelstatistikk.com/2013/kap\\_4/401.html](http://www.legemiddelstatistikk.com/2013/kap_4/401.html).
82. Loeb, J.N. (1972). The influence of temperature on the solubility of monosodium urate. *Arthritis Rheum.* **15**(2): s. 189-192.
83. Lopez-Castejon, G., Sepulcre, M.P., Mulero, I., Pelegrin, P., Meseguer, J. og Mulero, V. (2008). Molecular and functional characterization of gilthead seabream *Sparus aurata* caspase-1: the first identification of an inflammatory caspase in fish. *Mol Immunol.* **45**(1): s. 49-57.
84. Magnadottir, B. (2010). Immunological control of fish diseases. *Mar Biotechnol (NY)*. **12**(4): s. 361-379.
85. Martinon, F. (2010). Mechanisms of uric acid crystal-mediated autoinflammation. *Immunol Rev.* **233**(1): s. 218-232.
86. Martinon, F. (2010). Signaling by ROS drives inflammasome activation. *Eur J Immunol.* **40**(3): s. 616-619.
87. Martinon, F. (2010). Update on biology: uric acid and the activation of immune and inflammatory cells. *Curr Rheumatol Rep.* **12**(2): s. 135-141.
88. Martinon, F., Burns, K. og Tschopp, J. (2002). The inflammasome: a molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL-beta. *Mol Cell.* **10**(2): s. 417-426.
89. Martinon, F., Mayor, A. og Tschopp, J. (2009). The inflammasomes: guardians of the body. *Annu Rev Immunol.* **27**: s. 229-265.
90. Martinon, F., Pettrilli, V., Mayor, A., Tardivel, A. og Tschopp, J. (2006). Gout-associated uric acid crystals activate the NALP3 inflammasome. *Nature.* **440**(7081): s. 237-241.
91. Mathew, J.A., Guo, Y.X., Goh, K.P., Chan, J., Verburg-van Kemenade, B.M. og Kwang, J. (2002). Characterisation of a monoclonal antibody to carp IL-1beta and the development of a sensitive capture ELISA. *Fish Shellfish Immunol.* **13**(2): s. 85-95.
92. Matzinger, P. (1994). Tolerance, danger, and the extended family. *Annu Rev Immunol.* **12**: s. 991-1045.

93. Mayor, A., Martinon, F., De Smedt, T., Petrilli, V. og Tschopp, J. (2007). A crucial function of SGT1 and HSP90 in inflammasome activity links mammalian and plant innate immune responses. *Nat Immunol.* **8**(5): s. 497-503.
94. McNeela, E.A., Burke, A., Neill, D.R., Baxter, C., Fernandes, V.E., Ferreira, D., Smeaton, S., El-Rachkidy, R., McLoughlin, R.M., Mori, A., Moran, B., Fitzgerald, K.A., Tschopp, J., Petrilli, V., Andrew, P.W., Kadioglu, A. og Lavelle, E.C. (2010). Pneumolysin activates the NLRP3 inflammasome and promotes proinflammatory cytokines independently of TLR4. *PLoS Pathog.* **6**(11): s. e1001191.
95. Midtlyng, P.J. (1998). Evaluation of furunculosis vaccines in Atlantic salmon. Experimental and field studies for assessment of protection and side-effects. **Doktoravhandling**, Norges Veterinærhøgskole, Oslo.
96. Mizel, S.B. (1989). The interleukins. *FASEB J.* **3**(12): s. 2379-2388.
97. Morrison, R.N. og Nowak, B.F. (2002). The antibody response of teleost fish. *Semin Avin Exot Pet II.* **11**: s. 46-54.
98. Mosmann, T.R., Cherwinski, H., Bond, M.W., Giedlin, M.A. og Coffman, R.L. (1986). Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J Immunol.* **136**(7): s. 2348-2357.
99. Ng, G., Chau, E.M. og Shi, Y. (2010). Recent developments in immune activation by uric acid crystals. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz).* **58**(4): s. 273-277.
100. Niethammer, P., Grabher, C., Look, A.T. og Mitchison, T.J. (2009). A tissue-scale gradient of hydrogen peroxide mediates rapid wound detection in zebrafish. *Nature.* **459**(7249): s. 996-999.
101. O'Neill, L.A. (2008). Immunology. How frustration leads to inflammation. *Science.* **320**(5876): s. 619-620.
102. Opie, E.L. og Freund, J. (1937). An Experimental Study of Protective Inoculation with Heat Killed Tubercle Bacilli. *J Exp Med.* **66**(6): s. 761-788.
103. Overgard, A.C., Nepstad, I., Nerland, A.H. og Patel, S. (2012). Characterisation and expression analysis of the Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.) cytokines: IL-1beta, IL-6, IL-11, IL-12beta and IFNgamma. *Mol Biol Rep.* **39**(3): s. 2201-2213.
104. Pelegrin, P., Chaves-Pozo, E., Mulero, V. og Meseguer, J. (2004). Production and mechanism of secretion of interleukin-1beta from the marine fish gilthead seabream. *Dev Comp Immunol.* **28**(3): s. 229-237.
105. Pettersen, E.F., Ingerslev, H.C., Stavang, V., Egenberg, M. og Wergeland, H.I. (2008). A highly phagocytic cell line TO from Atlantic salmon is CD83 positive and M-CSFR

- negative, indicating a dendritic-like cell type. *Fish Shellfish Immunol.* **25**(6): s. 809-819.
106. Pfaffl, M.W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* **29**(9): s. 45.
107. PHARMAQ. (2013). Fiskevaksiner i Norge - desember 2012. Tilgjengelig fra: [http://www.pharmaq.no/sfiles/6/78/3/file/vaccines\\_norway\\_2012-12\\_no.pdf](http://www.pharmaq.no/sfiles/6/78/3/file/vaccines_norway_2012-12_no.pdf).
108. Poppe, T. (1999). Fiskehelse og fiskesykdommer. Oslo: Universitetsforlaget.
109. Poppe, T.T., Breck, O. (1997). Pathology of Atlantic salmon *Salmo salar* intraperitoneally immunized with oiladjuvated vaccine. A case report. *Diseases of Aquatic Organisms.* **29**: s. 219-226.
110. Press, C.M. og Lillehaug, A. (1995). Vaccination in European salmonid aquaculture: a review of practices and prospects. *Br Vet J.* **151**(1): s. 45-69.
111. Randelli, E., Buonocore, F. og Scapigliati, G. (2008). Cell markers and determinants in fish immunology. *Fish Shellfish Immunol.* **25**(4): s. 326-340.
112. Reis, M.I., do Vale, A., Pereira, P.J., Azevedo, J.E. og Dos Santos, N.M. (2012). Caspase-1 and IL-1beta processing in a teleost fish. *PLoS One.* **7**(11): s. 1-14.
113. Reis, M.I., do Vale, A., Pereira, P.J., Azevedo, J.E. og Dos Santos, N.M. (2012). Caspase-1 and IL-1beta processing in a teleost fish. *PLoS One.* **7**(11): s. e50450.
114. Ribeiro, C.M. og Schijns, V.E. (2010). Immunology of vaccine adjuvants. *Methods Mol Biol.* **626**: s. 1-14.
115. Rock, K.L., Latz, E., Ontiveros, F. og Kono, H. (2010). The sterile inflammatory response. *Annu Rev Immunol.* **28**: s. 321-342.
116. Rombout, J.H., Huttenhuis, H.B., Picchiatti, S. og Scapigliati, G. (2005). Phylogeny and ontogeny of fish leucocytes. *Fish Shellfish Immunol.* **19**(5): s. 441-455.
117. Romstad, A.B., Reitan, L.J., Midtlyng, P., Gravningen, K. og Evensen, O. (2012). Development of an antibody ELISA for potency testing of furunculosis (*Aeromonas salmonicida* subsp *salmonicida*) vaccines in Atlantic salmon (*Salmo salar* L). *Biologicals.* **40**(1): s. 67-71.
118. Rosenberg, A.S. (2006). Effects of protein aggregates: an immunologic perspective. *AAPS J.* **8**(3): s. E501-507.
119. Salinas, I., Zhang, Y.A. og Sunyer, J.O. (2011). Mucosal immunoglobulins and B cells of teleost fish. *Dev Comp Immunol.* **35**(12): s. 1346-1365.
120. Schijns, V.E. (2000). Immunological concepts of vaccine adjuvant activity. *Curr Opin Immunol.* **12**(4): s. 456-463.



121. Schiltz, C., Liote, F., Prudhommeaux, F., Meunier, A., Champy, R., Callebert, J. og Bardin, T. (2002). Monosodium urate monohydrate crystal-induced inflammation *in vivo*: quantitative histomorphometric analysis of cellular events. *Arthritis Rheum.* **46**(6): s. 1643-1650.
122. Schorn, C., Frey, B., Lauber, K., Janko, C., Stryio, M., Keppeler, H., Gaipf, U.S., Voll, R.E., Springer, E., Munoz, L.E., Schett, G. og Herrmann, M. (2011). Sodium overload and water influx activate the NALP3 inflammasome. *J Biol Chem.* **286**(1): s. 35-41.
123. Schreiner, O., Wandel, E., Himmelsbach, F., Galle, P.R. og Marker-Hermann, E. (2000). Reduced secretion of proinflammatory cytokines of monosodium urate crystal-stimulated monocytes in chronic renal failure: an explanation for infrequent gout episodes in chronic renal failure patients? *Nephrol Dial Transplant.* **15**(5): s. 644-649.
124. Schroder, K. og Tschopp, J. (2010). The inflammasomes. *Cell.* **140**(6): s. 821-832.
125. Secombes, C. (1990). Isolation of salmonid macrophages and analysis of their killing activity. *Techniques in fish immunology, SOS Publication, Fair Haven.* **1**: s. 137-154.
126. Shi, Y. (2010). Caught red-handed: uric acid is an agent of inflammation. *J Clin Invest.* **120**(6): s. 1809-1811.
127. Shi, Y., Evans, J.E. og Rock, K.L. (2003). Molecular identification of a danger signal that alerts the immune system to dying cells. *Nature.* **425**(6957): s. 516-521.
128. Shi, Y., Mucsi, A.D. og Ng, G. (2010). Monosodium urate crystals in inflammation and immunity. *Immunol Rev.* **233**(1): s. 203-217.
129. Shi, Y., Zheng, W. og Rock, K.L. (2000). Cell injury releases endogenous adjuvants that stimulate cytotoxic T cell responses. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **97**(26): s. 14590-14595.
130. Shimizu, Y., Newman, W., Tanaka, Y. og Shaw, S. (1992). Lymphocyte interactions with endothelial cells. *Immunol Today.* **13**(3): s. 106-112.
131. Shresta, S., Pham, C.T., Thomas, D.A., Graubert, T.A. og Ley, T.J. (1998). How do cytotoxic lymphocytes kill their targets? *Curr Opin Immunol.* **10**(5): s. 581-587.
132. Sims, J.E. og Smith, D.E. (2010). The IL-1 family: regulators of immunity. *Nat Rev Immunol.* **10**(2): s. 89-102.
133. Singh, M. (2007). *Vaccine Adjuvants and Delivery Systems.* John Wiley & Sons, Inc. 53-79.

134. Solem, S.T. og Stenvik, J. (2006). Antibody repertoire development in teleosts--a review with emphasis on salmonids and *Gadus morhua* L. *Dev Comp Immunol.* **30**(1-2): s. 57-76.
135. Sorbara, M.T. og Girardin, S.E. (2011). Mitochondrial ROS fuel the inflammasome. *Cell Res.* **21**(4): s. 558-560.
136. Steine, N.O., Melingen, G.O. og Wergeland, H.I. (2001). Antibodies against *Vibrio salmonicida* lipopolysaccharide (LPS) and whole bacteria in sera from Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) vaccinated during the smolting and early post-smolt period. *Fish Shellfish Immunol.* **11**(1): s. 39-52.
137. Stenger, S., Mazzaccaro, R.J., Uyemura, K., Cho, S., Barnes, P.F., Rosat, J.P., Sette, A., Brenner, M.B., Porcelli, S.A., Bloom, B.R. og Modlin, R.L. (1997). Differential effects of cytolytic T cell subsets on intracellular infection. *Science.* **276**(5319): s. 1684-1687.
138. Stutz, A., Golenbock, D.T. og Latz, E. (2009). Inflammasomes: too big to miss. *J Clin Invest.* **119**(12): s. 3502-3511.
139. Szabo, S.J., Kim, S.T., Costa, G.L., Zhang, X., Fathman, C.G. og Glimcher, L.H. (2000). A novel transcription factor, T-bet, directs Th1 lineage commitment. *Cell.* **100**(6): s. 655-669.
140. Taechavasonyoo, A., Kondo, H., Nozaki, R., Suzuki, Y. og Hirono, I. (2013). Identification of novel interleukin 1 beta family genes in Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. *Fish Shellfish Immunol.* **34**(1): s. 393-396.
141. Tafalla, C., Bogwald, J. og Dalmo, R.A. (2013). Adjuvants and immunostimulants in fish vaccines: Current knowledge and future perspectives. *Fish Shellfish Immunol.*
142. Tafalla, C. og Novoa, B. (2001). Respiratory burst of turbot (*Scophthalmus maximus*) macrophages in response to experimental infection with viral haemorrhagic septicaemia virus (VHSV). *Fish Shellfish Immunol.* **11**(8): s. 727-734.
143. Takizawa, F., Araki, K., Kobayashi, I., Moritomo, T., Ototake, M. og Nakanishi, T. (2008). Molecular cloning and expression analysis of T-bet in ginbuna crucian carp (*Carassius auratus langsdorfii*). *Mol Immunol.* **45**(1): s. 127-136.
144. Takizawa, F., Koppang, E.O., Ohtani, M., Nakanishi, T., Hashimoto, K., Fischer, U. og Dijkstra, J.M. (2011). Constitutive high expression of interleukin-4/13A and GATA-3 in gill and skin of salmonid fishes suggests that these tissues form Th2-skewed immune environments. *Mol Immunol.* **48**(12-13): s. 1360-1368.

145. Terkeltaub, A.R. (2012). Gout and other crystal arthropathies. Philadelphia: Saunders Elsevier.
146. Tobar, J.A., Jerez, S., Caruffo, M., Bravo, C., Contreras, F., Bucarey, S.A. og Harel, M. (2011). Oral vaccination of Atlantic salmon (*Salmo salar*) against salmonid rickettsial septicaemia. *Vaccine*. **29**(12): s. 2336-2340.
147. Tritto, E., Mosca, F. og De Gregorio, E. (2009). Mechanism of action of licensed vaccine adjuvants. *Vaccine*. **27**(25-26): s. 3331-3334.
148. Underhill, D.M. og Goodridge, H.S. (2012). Information processing during phagocytosis. *Nat Rev Immunol*. **12**(7): s. 492-502.
149. Vitart, V., Rudan, I., Hayward, C., Gray, N.K., Floyd, J., Palmer, C.N., Knott, S.A., Kolcic, I., Polasek, O., Graessler, J., Wilson, J.F., Marinaki, A., Riches, P.L., Shu, X., Janicijevic, B., Smolej-Narancic, N., Gorgoni, B., Morgan, J., Campbell, S., Biloglav, Z., Barac-Lauc, L., Pericic, M., Klaric, I.M., Zgaga, L., Skaric-Juric, T., Wild, S.H., Richardson, W.A., Hohenstein, P., Kimber, C.H., Tenesa, A., Donnelly, L.A., Fairbanks, L.D., Aringer, M., McKeigue, P.M., Ralston, S.H., Morris, A.D., Rudan, P., Hastie, N.D., Campbell, H. og Wright, A.F. (2008). SLC2A9 is a newly identified urate transporter influencing serum urate concentration, urate excretion and gout. *Nat Genet*. **40**(4): s. 437-442.
150. Vojtech, L.N., Scharping, N., Woodson, J.C. og Hansen, J.D. (2012). Roles of inflammatory caspases during processing of zebrafish interleukin-1beta in *Francisella noatunensis* infection. *Infect Immun*. **80**(8): s. 2878-2885.
151. Wang, T., Holland, J.W., Martin, S.A. og Secombes, C.J. (2010). Sequence and expression analysis of two T helper master transcription factors, T-bet and GATA3, in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* and analysis of their expression during bacterial and parasitic infection. *Fish Shellfish Immunol*. **29**(5): s. 705-715.
152. Watanabe, A., Sohail, M.A., Gomes, D.A., Hashmi, A., Nagata, J., Sutterwala, F.S., Mahmood, S., Jhandier, M.N., Shi, Y., Flavell, R.A. og Mehal, W.Z. (2009). Inflammasome-mediated regulation of hepatic stellate cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. **296**(6): s. G1248-1257.
153. Wergeland, H.I. og Jakobsen, R.A. (2001). A salmonid cell line (TO) for production of infectious salmon anaemia virus (ISAV). *Dis Aquat Organ*. **44**(3): s. 183-190.
154. Whitehead, A. og Crawford, D.L. (2005). Variation in tissue-specific gene expression among natural populations. *Genome Biol*. **6**(2): s. R13.

155. Yagnik, D.R., Hillyer, P., Marshall, D., Smythe, C.D., Krausz, T., Haskard, D.O. og Landis, R.C. (2000). Noninflammatory phagocytosis of monosodium urate monohydrate crystals by mouse macrophages. Implications for the control of joint inflammation in gout. *Arthritis Rheum.* **43**(8): s. 1779-1789.
156. Zheng, W. og Flavell, R.A. (1997). The transcription factor GATA-3 is necessary and sufficient for Th2 cytokine gene expression in CD4 T cells. *Cell.* **89**(4): s. 587-596.
157. Zou, J., Cunningham, C. og Secombes, C.J. (1999). The rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* interleukin-1 beta gene has a differ organization to mammals and undergoes incomplete splicing. *Eur J Biochem.* **259**(3): s. 901-908.
158. Zou, J., Peddie, S., Scapigliati, G., Zhang, Y., Bols, N.C., Ellis, A.E. og Secombes, C.J. (2003). Functional characterisation of the recombinant tumor necrosis factors in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Dev Comp Immunol.* **27**(9): s. 813-822.
159. Zwollo, P., Cole, S., Bromage, E. og Kaattari, S. (2005). B cell heterogeneity in the teleost kidney: evidence for a maturation gradient from anterior to posterior kidney. *J Immunol.* **174**(11): s. 6608-6616.

## Appendiks I

### Reagenser

Reagenser	Produsent
Aceton	Merck
Agarose	Sigma-Aldrich
Antistoff (kanin-anti-laks Ig) AP	Stein Tore Solem
Benzoak® (Vet. 200 mg benzokain/ml, 20 %)	ACD SA, Leknes, Norge
Borsyre	Merck
Boratbuffer	NFH
Dimethylsulfoksid	Sigma-Aldrich
Etanol 96 %	Sigma-Aldrich
Etanol absolutt 99,8 %	Sigma-Aldrich
Etidium bromid	Sigma-Aldrich
Fast SYBR®Green Master Mix	Applied Biosystems
Føtalt kalveserum 8 %	Biochrom
Formaldehyd "loading buffer"	NFH
Formaldehyd 37 %	Sigma-Aldrich
Fosfat bufret saline	Sigma-Aldrich
Freunds komplett adjuvans	Sigma-Aldrich
Humant gamma globulin	Sigma-Aldrich
Ikke-essensielle aminosyrer	Life Technologies Gibco™
Kaliumhydroksid	NFH
Leibovitz's L-15 medium	Life Technologies Gibco™
Loading dye	Invitrogen
Metanol 99,8 %	Sigma-Aldrich
Mononatriumuratkrystaller	NFH
Natriumhydroksid	Merck
Natriumkarbonat	Merck
Natriumhydrogenkarbonat	Sigma-Aldrich
Natriumklorid	Fluka chemica

<b>Reagenser</b>	<b>Produsent</b>
Nitroblue tetrazolium	Sigma-Aldrich
Phorbol 12-myristate 13-acetate	Sigma-Aldrich
Primere	Sigma-Aldrich
Reverse transcription kit	Qiagen
RNAeasy® Mini Kit	Qiagen
RNAlater®	Ambion
RNase AWAY®	VWR
RNase-Free DNase Set	Qiagen
Saltløsning (0,9 % natriumklorid)	NFH
SIGMAFAST™ p-nitrophenyl phosphate tablets	Sigma-Aldrich
Streptomycin/penicillin	Life Technologies Gibco™
Tris base, Acetic acid, EDTA (TAE) buffer, x10	NFH
Tris EDTA-buffer (TE-buffer)	Qiagen
Trypsin-EDTA x1	Sigma-Aldrich
Tween® 20	Sigma-Aldrich
Tørrmelk (fettfri)	Normilk AS
Urinsyre ≥99 % renhet	Sigma-Aldrich
Ultra Pure Water	Biochrom
1 kb Plus DNA Ladder	Invitrogen
2-Mercaptoetanol	Sigma-Aldrich

## Appendiks II

---

### Løsninger til ELISA

---

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

---

Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	0,795 g
NaHCO <sub>3</sub>	1,465 g
dH <sub>2</sub> O etterfylles slik at det totale volumet blir 500 ml	

---

#### PBST

---

10x PBS	100 ml
destillert vann	900 ml
Tween® 20 (0,05 %)	0,5 ml

---

#### 1 % tørrmelk

---

Fettfri tørrmelk	0,5 g
PBST etterfylles slik at det totale volumet blir 50 ml	

---

#### Blokkeringsbuffer 5 % tørrmelk

---

Fettfri tørrmelk	2,5 g
PBST etterfylles slik at det totale volumet blir 50 ml	

---

---

**Substratløsning**

---

pNPP tablett	1 tablett
Tris buffer tablett	1 tablett
dH <sub>2</sub> O etterfylles slik at det totale volumet blir 5 ml	

---

---

**3M NaOH**

---

Natriumhydroksid	24 g
dH <sub>2</sub> O etterfylles slik at det totale volumet blir 200 ml	

---



## Appendiks III

---

### Løsninger til qPCR

---

#### 1 % agarosegel

---

Agarose	0,5 g
TAE x10 buffer	50 ml
Etidium bromid	3,5 µl

---

#### DNA-ladder

---

TE-buffer (pH 7,5)	80 µl
DNA-ladder (Invitrogen)	10 µl
Loading dye 5x	5 µl

---

#### Eliminering av genomisk DNA I

---

DNase løsning	10 µl x antall prøver
Buffer RDD	70 µl x antall prøver
Totalt reaksjonsvolum	80 µl

---

---

**Eliminering av genomisk DNA II**

---

gDNA Wipeout Buffer, x7	2 µl x antall prøver
RNase fritt vann	10 µl x antall prøver
Templat RNA	2 µl x antall prøver
<hr/>	
Totalt reaksjonsvolum	14 µl

---



---

**Reverse-transcription master mix**

---

Quantiscript Reverse Transcriptase	1 µl x antall prøver
Quantiscript RT Buffer	5x4 µl x antall prøver
RT Primer Mix	1 µl x antall prøver
Templat RNA	14 µl
<hr/>	
Totalt reaksjonsvolum	20 µl

---



---

**Master mix for kvantitativ RT-PCR**

---

Fast SYBR®Green Master Mix	10 µl x antall prøver
Primer FW	1 µl x antall prøver
Primer RW	1 µl x antall prøver
cDNA templat	6 µl x antall prøver
dH <sub>2</sub> O	2 µl x antall prøver
<hr/>	
Totalt reaksjonsvolum	20 µl

---

## Appendiks IV

---

### Metodikk – qPCR

---

Ved qPCR vil den spesifikke DNA-sekvensen amplifiseres i en syklus bestående av tre steg; denaturering, amplifisering og ekstensjon. Under denatureringen sørger høy temperatur for at dsDNA splittes til ssDNA. I amplifiseringsfasen senkes temperaturen, slik at spesifikke primere kan feste seg til DNA-tråden. I ekstensjonsfasen vil DNA-polymerase binde til primere bundet til templatet, og syntetisere en ny komplementær DNA-tråd. Når en syklus er over, kvantifiseres antall spesifikke DNA-sekvenser, og derav kommer ordet real-time. Mengden genuttrykk kan måles ved hjelp av SYBR®Green (Applied Biosystems), som er et fargestoff som "fluoriserer" når det er "bundet" til dsDNA, men ikke i fri form. Mengden fluorescens er proporsjonalt med mengden nydannet dsDNA, og ved å måle nivået av fluorescens ved hver syklus, er det mulig å måle nivået av genuttrykket i den eksponentielle fasen – der den første signifikante økningen av DNA-sekvenser korrelerer til mengden starttemplat.

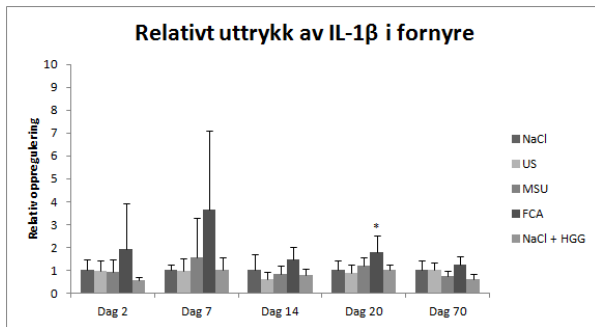
---



## Appendiks V

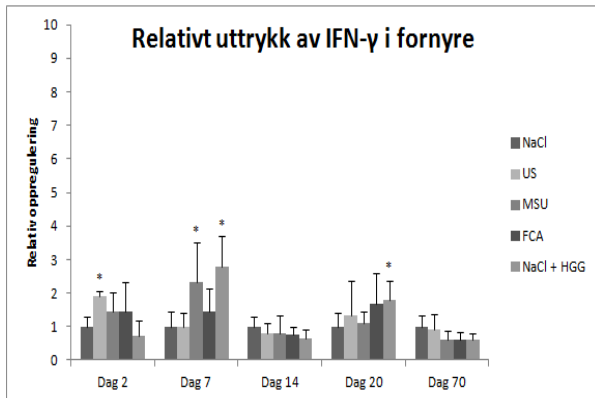
### Resultater qPCR

#### IL-1 $\beta$



**Figur 9.** Relativt uttrykk av IL-1 $\beta$  i fornyre. Søylene viser gjennomsnitt ( $n = 5-6$ ) med positivt standardavvik. Statistiske forskjeller ( $p \leq 0,05$ ) mellom kontroll og behandlet gruppe er indikert med \* over kolonnene. Alle verdier er normalisert mot NaCl, slik at kontrollgruppe alltid har verdien én.

#### IFN- $\gamma$

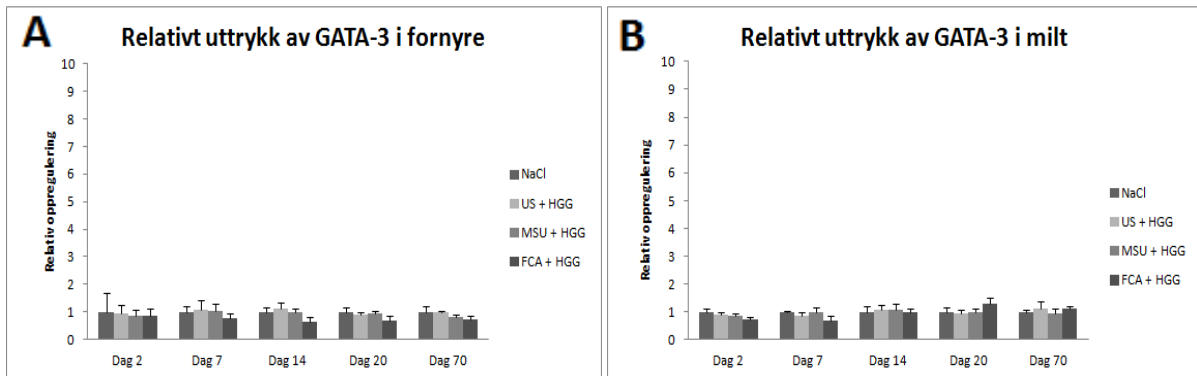


**Figur 10.** Relativt uttrykk av IFN- $\gamma$  i fornyre. Søylene viser gjennomsnitt ( $n = 5-6$ ) med positivt standardavvik. Statistiske forskjeller ( $p \leq 0,05$ ) mellom kontroll og behandlet gruppe er indikert med \* over kolonnene. Alle verdier er normalisert mot NaCl, slik at kontrollgruppe alltid har verdien én.

---

**GATA-3**

---

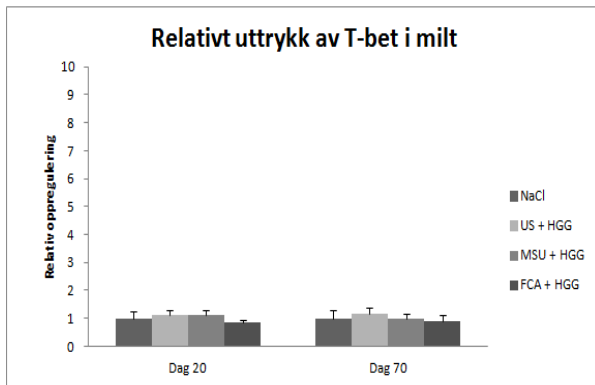


**Figur 11.** Relativt uttrykk av GATA-3; A) GATA-3 i fornyre, B) GATA-3 i milt. Søylen viser gjennomsnitt ( $n = 5-6$ ) med positivt standardavvik. Statistiske forskjeller ( $p \leq 0,05$ ) mellom kontroll og behandlet gruppe er indikert med \* over kolonnene. Alle verdier er normalisert mot NaCl, slik at kontrollgruppe alltid har verdien én.

---

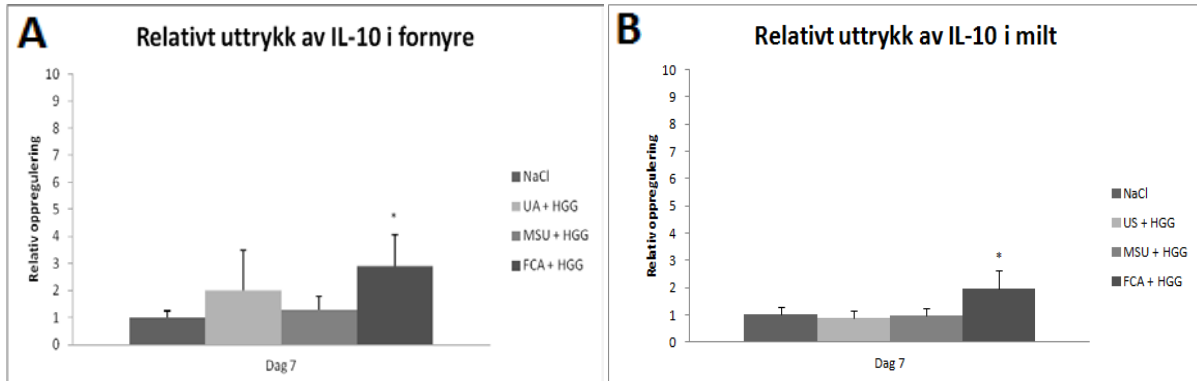
**T-bet**

---



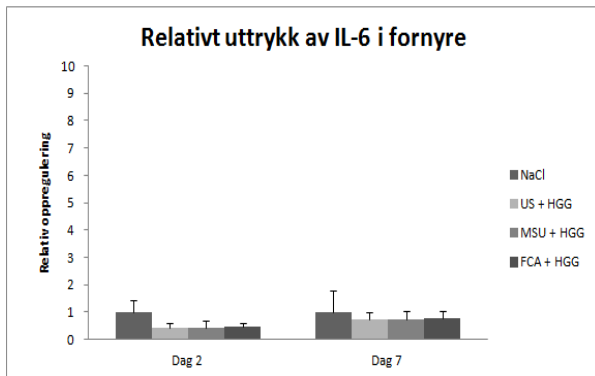
**Figur 12.** Relativt uttrykk av T-bet mRNA transkripter i milt. Søylen viser gjennomsnitt ( $n = 5-6$ ) med positivt standardavvik. Statistiske forskjeller ( $p \leq 0,05$ ) mellom kontroll og behandlet gruppe er indikert med \* over kolonnene. Alle verdier er normalisert mot NaCl, slik at kontrollgruppe alltid har verdien én.

**IL-10**



**Figur 13.** Relativt uttrykk av det inflammatoriske cytokinet IL-10; A) IL-10 i fornyre, B) IL-10 i milt. Søylen viser gjennomsnitt ( $n = 5-6$ ) med positivt standardavvik. Statistiske forskjeller ( $p \leq 0,05$ ) mellom kontroll og behandlet gruppe er indikert med \* over kolonnene. Alle verdier er normalisert mot kontrollgruppe (NaCl), slik at kontrollgruppe alltid har verdien 1.

**IL-6**



**Figur 14.** Relativt uttrykk av IL-6 i fornyre. Søylen viser gjennomsnitt ( $n = 5-6$ ) med positivt standardavvik. Statistiske forskjeller ( $p \leq 0,05$ ) mellom kontroll og behandlet gruppe er indikert med \* over kolonnene. Alle verdier er normalisert mot kontrollgruppe (NaCl), slik at kontrollgruppe alltid har verdien 1.





## Appendiks VI

### Gjennomsnittlige Ct-verdier

**Tabell 8.** Gjennomsnittlige Ct-verdier ( $n = 6$ ) for ulike behandlingsgrupper i milt og fornyre 2, 7, 14, 20 og 70 dager etter vaksinerings. \* indikerer  $n = 5$ .

Uttak (dager etter vaksinerings)	Gruppe	Primer	Gjennomsnittlig Ct-verdi	
			Milt	Fornyre
2	NaCl	EF1 $\alpha$	16,52	16,49
7	NaCl	EF1 $\alpha$	16,13	16,36
14	NaCl	EF1 $\alpha$	16,15	15,75
20	NaCl	EF1 $\alpha$	15,97	15,69
70	NaCl	EF1 $\alpha$	15,97	15,52
2	US + HGG	EF1 $\alpha$	16,45	16,00
7	US + HGG	EF1 $\alpha$	16,10	15,75
14	US + HGG	EF1 $\alpha$	15,97	15,81
20	US + HGG	EF1 $\alpha$	15,79	15,21
70	US + HGG	EF1 $\alpha$	15,95	15,53
2	MSU + HGG	EF1 $\alpha$	16,45	16,02
7	MSU + HGG	EF1 $\alpha$	16,23	15,64*
14	MSU + HGG	EF1 $\alpha$	16,05	15,52
20	MSU + HGG	EF1 $\alpha$	15,90	15,46
70	MSU + HGG	EF1 $\alpha$	15,92	15,97
2	FCA + HGG	EF1 $\alpha$	16,55	15,89
7	FCA + HGG	EF1 $\alpha$	16,38	15,95
14	FCA + HGG	EF1 $\alpha$	16,02	15,47
20	FCA + HGG	EF1 $\alpha$	16,15	15,47
70	FCA + HGG	EF1 $\alpha$	16,14	15,64*
2	NaCl	IL-1 $\beta$	29,59	28,98
7	NaCl	IL-1 $\beta$	29,68	29,39
14	NaCl	IL-1 $\beta$	28,57	28,35
20	NaCl	IL-1 $\beta$	29,07	28,66
70	NaCl	IL-1 $\beta$	29,30	28,27
2	US + HGG	IL-1 $\beta$	29,81	28,65
7	US + HGG	IL-1 $\beta$	29,77	29,06
14	US + HGG	IL-1 $\beta$	28,64	28,25
20	US + HGG	IL-1 $\beta$	27,63	27,25
70	US + HGG	IL-1 $\beta$	29,96	29,00
2	MSU + HGG	IL-1 $\beta$	29,14	28,01
7	MSU + HGG	IL-1 $\beta$	29,28	28,28*
14	MSU + HGG	IL-1 $\beta$	29,11	28,46
20	MSU + HGG	IL-1 $\beta$	28,16	27,88
70	MSU + HGG	IL-1 $\beta$	29,00	28,53
2	FCA + HGG	IL-1 $\beta$	26,80	27,12
7	FCA + HGG	IL-1 $\beta$	26,41	27,62
14	FCA + HGG	IL-1 $\beta$	28,02	28,15
20	FCA + HGG	IL-1 $\beta$	28,08	28,37
70	FCA + HGG	IL-1 $\beta$	28,04	27,81*

## Appendiks

**Tabell 9.** Gjennomsnittlige Ct-verdier ( $n = 6$ ) for ulike behandlingsgrupper i milt og fornyre 2, 7, 14, 20 og 70 dager etter vaksinerings. \* indikerer  $n = 5$ .

Uttak (dager etter injeksjon)	Gruppe	Primer	Gjennomsnittlig Ct-verdi	
			Milt	Fornyre
2	NaCl	TNF- $\alpha$	31,98	31,28
7	NaCl	TNF- $\alpha$	31,46	31,79*
14	NaCl	TNF- $\alpha$	30,57	31,57
20	NaCl	TNF- $\alpha$	31,30	32,16
70	NaCl	TNF- $\alpha$	31,64	31,64
2	US + HGG	TNF- $\alpha$	31,73	32,17
7	US + HGG	TNF- $\alpha$	31,11	31,34
14	US + HGG	TNF- $\alpha$	30,54	31,40
20	US + HGG	TNF- $\alpha$	30,40	31,09
70	US + HGG	TNF- $\alpha$	32,19	32,19
2	MSU + HGG	TNF- $\alpha$	31,35	31,93
7	MSU + HGG	TNF- $\alpha$	30,71	31,50*
14	MSU + HGG	TNF- $\alpha$	30,55	31,39
20	MSU + HGG	TNF- $\alpha$	30,70	31,53
70	MSU + HGG	TNF- $\alpha$	32,04	31,93*
2	FCA + HGG	TNF- $\alpha$	31,21	31,83
7	FCA + HGG	TNF- $\alpha$	28,93	31,03
14	FCA + HGG	TNF- $\alpha$	30,11	31,74
20	FCA + HGG	TNF- $\alpha$	30,32	31,93
70	FCA + HGG	TNF- $\alpha$	32,16	32,16
2	NaCl	IFN- $\gamma$	27,56	29,20
7	NaCl	IFN- $\gamma$	27,11	29,78*
14	NaCl	IFN- $\gamma$	27,25	29,00
20	NaCl	IFN- $\gamma$	28,02	30,63
70	NaCl	IFN- $\gamma$	27,57	29,49
2	US + HGG	IFN- $\gamma$	27,44	29,95
7	US + HGG	IFN- $\gamma$	26,76	29,06
14	US + HGG	IFN- $\gamma$	27,06	29,06
20	US + HGG	IFN- $\gamma$	27,37	29,24
70	US + HGG	IFN- $\gamma$	27,92	30,09
2	MSU + HGG	IFN- $\gamma$	26,93	29,52
7	MSU + HGG	IFN- $\gamma$	26,51	29,07*
14	MSU + HGG	IFN- $\gamma$	27,01	28,98
20	MSU + HGG	IFN- $\gamma$	27,82	29,89
70	MSU + HGG	IFN- $\gamma$	27,42	30,53
2	FCA + HGG	IFN- $\gamma$	28,07	29,88
7	FCA + HGG	IFN- $\gamma$	26,44	29,41
14	FCA + HGG	IFN- $\gamma$	27,14	29,21
20	FCA + HGG	IFN- $\gamma$	27,08	29,46
70	FCA + HGG	IFN- $\gamma$	27,82	30,30

## Appendiks

**Tabell 10.** Gjennomsnittlige Ct-verdier ( $n = 6$ ) for ulike behandlingsgrupper i milt og fornyre 2, 7, 14, 20 og 70 dager etter vaksinerings. \* indikerer  $n = 5$ .

Uttak (dager etter injeksjon)	Gruppe	Primer	Gjennomsnittlig Ct-verdi	
			Milt	Fornyre
2	NaCl	IL-6	31,38	
7	NaCl	IL-6	31,82	
14	NaCl	IL-6		
20	NaCl	IL-6		
70	NaCl	IL-6		
2	US + HGG	IL-6	31,26	
7	US + HGG	IL-6	31,54	
14	US + HGG	IL-6		
20	US + HGG	IL-6		
70	US + HGG	IL-6		
2	MSU + HGG	IL-6	31,61	
7	MSU + HGG	IL-6	31,24	
14	MSU + HGG	IL-6		
20	MSU + HGG	IL-6		
70	MSU + HGG	IL-6		
2	FCA + HGG	IL-6	28,67	
7	FCA + HGG	IL-6	31,57	
14	FCA + HGG	IL-6		
20	FCA + HGG	IL-6		
70	FCA + HGG	IL-6		
2	NaCl	T-bet		23,92
7	NaCl	T-bet		24,04*
14	NaCl	T-bet		23,81
20	NaCl	T-bet		24,31
70	NaCl	T-bet		23,90
2	US + HGG	T-bet		24,01
7	US + HGG	T-bet		24,17
14	US + HGG	T-bet		24,14
20	US + HGG	T-bet		23,69
70	US + HGG	T-bet		23,83
2	MSU + HGG	T-bet		24,11
7	MSU + HGG	T-bet		23,61*
14	MSU + HGG	T-bet		23,95
20	MSU + HGG	T-bet		23,96
70	MSU + HGG	T-bet		24,82
2	FCA + HGG	T-bet		23,94
7	FCA + HGG	T-bet		25,30
14	FCA + HGG	T-bet		25,63
20	FCA + HGG	T-bet		25,17
70	FCA + HGG	T-bet		25,00