

SOCS-proteiner i laksens antivirale forsvar

- til nytte for virus eller vert?

Lisbeth Lindenskov Joensen

Masteroppgave i Fiskehelse (60 stp)

Mai 2014

Forord

Denne oppgaven ble utført ved fakultet for biologi, fiskeri og økonomi, ved Norges Fiskerihøgskole, Universitetet i Tromsø. Oppgaven ble påbegynt i februar 2013 og avsluttet i mai 2014.

Først og fremst vil jeg takke min hovedveileder Jorunn B. Jørgensen for å ha gitt meg mulighet for å jobbe med et utrolig spennende fagfelt. Dette har været en tid med opp og nedturer, men med god veiledning og oppmuntrende ord fra deg er jeg nå sikkert i havn. Takk for at du ga meg tillit til å jobbe med en så utfordrende oppgave, det har lært meg utrolig mye! En stor takk rettes også til mine to fantastiske flinke bi-veiledere Mehrdad Sobhkhez og Guro Strandskog, som har holdt meg i hånden og støttet meg hele veien. Takk for god opplæring på labb og svar på uendelige spørsmål underveis. Jeg vil også rette en takk til Hanna L. Thim og alle de flinke folkene på labben som alltid har tid til et spørsmål eller til å gi en hjelpende hånd.

Tusen takk til alle mine medstudenter for en fantastisk studietid her ved NFH. Takk for at vi har kunnet delt frustrasjoner og gleder vi har møtt i løpet av de siste fem år. Og til min kjære Jóan Karl, takk for at du har stått ved min side og vært den du er. Jeg setter stor pris på at vi har fått mulighet for å oppleve dette eventyret sammen.

Til síðst vil eg takka mínari kærri familju heima í Føroyum, mamma, babba, Guðrun og Boyggja. Takk fyri at tit hava altíð hava stuðlað mær í mínum vali í at blíva fiskaheilsubiologur. Um tit nakrantíð hava ivast, so er mítt heim har tit eru, í Føroyum.

Tromsø 15. mai 2014

Lisbeth Lindenskov Joensen



Sammendrag

Virussykdommer er en stor utfordring for dagens oppdrettsnæring, samtidig som virus og sykdom utgjør et stort problem ut fra et fiskehelseperspektiv. Forebyggende tiltak er i dag det beste redskapet for å bekjempe fiske sykdommer, og all settefisk i Norge vaksineres rutinemessig før utsett. Utfordringen so næringen har med virussykdommer viser likevel at vaksinerne som finnes mot virus ikke er effektive nok. Atlantisk laks (*Salmo salar*) har i utgangspunktet et sterkt medført immunforsvar, og grunnforskning rettet mot å bedre forståelsen av virusforsvaret kan derfor være med på å effektivisere de forebyggende tiltak som i dag anvendes mot virus. Suppressors of cytokine signaling (SOCS) er proteiner som regulerer intracellulære cytokin-induserte signalkaskader, og er dermed regulatorer av interferoner, som er vist å ha en viktig rolle i laksens førstelinjeforsvar mot virus. Virus har vist seg å ha evne til å ta kontroll over SOCSene, og ved å overstyre cytokinsignaleringsen utnytte SOCSene som en mekanisme for å unngå laksens immunforsvar. Siden SOCS bidrar i virusforsvaret, er det viktig å forstå bedre i hvilken grad og hvordan de er involvert i fiskens immunreaksjoner ved virusinfeksjoner. SOCS-proteinene er identifisert hos flere fiskearter, deriblant atlantisk laks, men mye gjenstår å undersøke. Jorunn Jørgensens forskningsgruppe har nylig identifisert 3 medlemmer av SOCS-protein familien, SOCS1, SOCS2 og CISH i atlantisk laks, og formålet med denne masteroppgaven har været å videre karakterisere disse.

Den biologiske rollen til SOCSene hos fisk er lite undersøkt, og i denne masteroppgaven ble det etablert stabilt transfekterte cellelinjer som overuttrykker SOCS1 eller SOCS2. Resultatene viste, at overuttrykk av SOCS1 hemmet Mx, et antiviralt protein, etter stimulering med IFN1 α . Lignende funn er gjort i pattedyr, og viser at funksjonen til SOCS1 er konserverv mellom pattedyr og fisk. Rollen til SOCSene ved infeksjon med virus *in vivo* og *in vitro* ble også undersøkt i denne oppgaven. Resultatene viste at spesielt SOCS1 induseres ved virusinfeksjoner, men våre data gir ikke indikasjoner på at verken SAV3 eller IPNV utnytter SOCSene for å overstyre vertens immunforsvar. CpG og polyI:C er rapportert å ha potensiale som adjuvans i virusvaksiner, og stimulering av primærceller med disse immunostimulantene viste at begge induserer økning i SOCS-transkripter. Resultatene indikerer at SOCS1 og muligvis også CISH er involvert i differensiering av dendritiske celler hos atlantisk laks og dette kan være med på å forklare den effekten CpG og polyI:C har som adjuvans.

Innhold

1. Innledning	1
1.1 Bakgrunn	1
1.1.1 Pankreassykdom	2
1.1.2. Infeksiøs pankreas nekrose	3
1.2 Immunsystemet hos beinfisk	4
1.2.1 Immunologiske organer og celler	4
1.2.2 Det medfødte immunsystemet hos fisk	6
1.2.3 Det adaptive immunsystemet hos fisk	6
1.3 Regulering og modulering av immunreaksjoner mot virus hos fisk – IFN signalering	8
1.3.1 Interferonsystemet hos fisk	8
1.3.2 Signalveier for induksjon av IFN	9
1.3.3 Signalveier for IFN	11
1.4 Negativ regulering av cytokin signalering – SOCS	12
1.4.1 Struktur SOCS-protein	12
1.4.2 Funksjon SOCS-protein	13
1.4.3 Hvordan reguleres SOCS-nivå i celler?	16
1.4.4 SOCS og virale infeksjoner	17
1.5 Problemstilling	19
2. Materiale og Metode	20
2.1 Forsøksfisk og organuttak	20
2.1.1 Forsøksfisk	20
2.1.2 Organuttak	20
2.2 Dyrkning og splitting av Celler:	21
2.3 Isolering og stimulering av leukocytter fra atlantisk laks:	21
2.3.1 Isolering av adherente leukocytter fra hodenyre	22
2.3.2 Stimulering av leukocytter	22
2.4 Infeksjon av TO-celler med SAV3 og IPNV:	23
2.5 Stabil transfektering av CHSE-celler:	24
2.5.1 Etablering av cellelinjer stabilt transfektert med SOCS1 og SOCS2	24
2.5.2 Stimulering av SOCS-transfektete celler	26
2.6 Isolering av totalt RNA fra organer og cellelinjer:	26
2.7 cDNA syntese:	28
2.8 Kvantitativ RT-PCR:	29
2.9 Databehandling:	32
2.9.1 Statistikk	33
2.10 Western blotting	33
2.10.1 SDS-page	33
2.10.2 Blotting	34
2.10.3 Blokking	34
2.10.4 Immunodeteksjon	34
3. Resultater	36
3.1 Normalfordistribusjon av SOCS-mRNA	36
3.2 Uttrykk av SOCS-mRNA i atlantisk laks infisert med SAV3	36
3.3 SOCS-uttrykk i TO-celler infisert med SAV3 og IPNV	38
3.3.1 Infeksjon med SAV3	39
3.3.2 Infeksjon med IPNV	40
3.3.3 Måling av SAV3 nsP1 og IPNV VP2 ved absolutt kvantitativ real-time PCR	41
3.4 SOCS uttrykk i leukocytter isolert fra atlantisk laks.	43
3.4.1 Etterligning av virusinfeksjon	43
3.4.2 Differensiering av dendritiske celler	44
3.5 Etablering av CHSE celler som uttrykker transgen SOCS1 og SOCS2 fra laks	47
3.5.1 Etablering av cellelinjer stabilt transfektert med SOCS1 og SOCS2	47

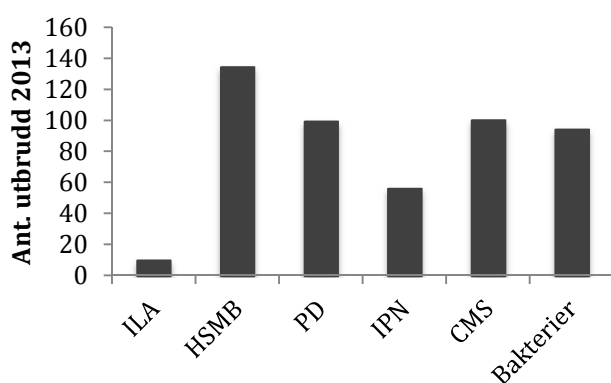
3.5.2 Stimulering av stabilt transfekterte celler med IFN1a	49
4. Diskusjon.....	51
4.2 Normalfordistribusjon av SOCS-mRNA	51
4.3 Rollen til SOCS ved virusinfeksjoner.....	53
4.4 Rollen til SOCS i leukocytter hos atlantisk laks.....	57
4.4.1 Stimulering av leukocytter med CpG og polyI:C	57
4.4.2 Rollen til SOCS ved differensiering av DC.....	59
4.5 Stabil transfektering av celler med SOCS1 og SOCS2.....	62
4.5.1 Etablering av cellelinjer stabilt transfektert med SOCS1 og SOCS2	63
4.5.2 Hva skjer med IFN-signalveien i celler som overuttrykker SOCS1 og SOCS2?	63
4.6 Konklusjoner	65
5. Referanser	66
Appendix I.....	75
Reagenser	75
Appendix II.....	77
Løsninger til Western Blotting.....	77
Appendix III.....	78
RT-qPCR spesifikasjoner for de ulike forsøk	78
Appendix IV	79
Gjennomsnittlige Cq-verdier	79
Uttrykk av SOCS-mRNA i Atlantisk laks infisert med SAV3	79
SOCS-uttrykk i TO-celler infisert med SAV3 og IPNV	80
SOCS uttrykk i Leukocytter isolert fra Atlantisk laks.	81
Stabil transfektering av CHSE-celler med SOCS1 og SOCS2.....	82
Appendix V	83
Absolutt kvantifisering av SAV3 i hjerte, hodenyre og gjelle isolert fra atlantisk laks infisert med SAV3	83
Appendix VI.....	84
Relativ økning i SOCS1-uttrykk i atlantisk laks infisert med SAV3.	84
Appendix VII	85
Infisering av stabilt transfekterte celler som overuttrykker SOCS1 med SAV3.	85

1. Innledning

1.1 Bakgrunn

Oppdrettsnæringen i Norge har siden oppstarten i 1970 vokst seg til å være en av landets største og viktigste næringer. I 2013 ble det eksportert norsk laks for en verdi på nesten 40 milliarder norske kroner, og daglig blir det spist ca. 14 millioner porsjoner med norsk laks rundt om i verden (Kvistad, 2014). FN har estimert at verdens befolkning vil øke til over ni milliarder ved 2050 (UnitedNations, 2013), og en så markant befolkningsøkning vil medføre et økt behov for sunn mat. Marine råvarer betraktes som en god kilde til proteiner og fett, og med en vurdering av at man har nådd maksimal beskatning av verdens naturlige fiskebestander (FAO, 2012), er det stort fokus på at fiskeoppdrett må dekke dette behovet.

Økte produksjonsvolum i den grad som vil bli nødvendig i fremtiden er likevel ikke uten utfordringer. Etter en kraftig økning i produksjonen var sykdom tidlig på 2000-tallet årsak til at den færøyske oppdrettsnæring nesten gikk konkurs, og det samme skjedde i Chile i 2007 (Asche *et al.*, 2009). I begge tilfeller var det virus som var årsaken til de store tapene, og mens man i dag med effektive vaksiner har fått en viss kontroll over bakteriesykdommer, er det stadig virus som skaper de største utfordringene for oppdrettsnæringen. Den årlige innrapporteringen av sykdomsutbrudd til Veterinærinstituttet er summert i figur 1, og illustrerer denne utfordringen.



Figur 1: Registrerte antall utbrudd i norsk lakseoppdrett 2013. ILA, HSMB, PD, IPN og CMS forårsakes av virus. Alle sykdomsutbrudd som er forårsaket av bakterier er lagt sammen og inkluderer: Bakteriell nyresyke (1), Kaltvannsvibriose (13), vibriose (4), Moritella (51), Yersiniose (20) og flavobakterium (5). Fra fiskehelse rapporten 2013 (Hjeltnes, 2014).

Flere virusvaksiner finnes i dag på markedet, men store tap i form av dødelighet og redusert tilvekst forårsaket av virus som det vaksineres mot, indikerer at vaksinene ikke er effektive nok. Årsakene til dette er sammensatte, men de tilgjengelige vaksinene ser ikke ut til å aktivere en cellulær immunrespons som er essensiell for å indusere langvarig beskyttelse mot intracellulære patogener. Utfordringene med å indusere en langvarig, adaptiv immunrespons påpeker derfor behovet for forskning innenfor videre vaksineutvikling, både grunnforskning med tanke på å få en bedre forståelse av fiskens immunologi, og praktisk rettet vaksineutvikling.

Atlantisk laks (*Salmo salar*) har i utgangspunktet vist seg å ha et sterkt medfødt immunforsvar mot de fleste virus, og ved eksperimentell smitte er det vanskelig å oppnå høy dødelighet (Robertsen, 2011). Grunnforskning rettet mot laksens immunsystem kan derfor bidra til bedre forståelse for hvordan vi best utnytter potensialet som ligger i fisken til å optimalisere de konvensjonelle virusvaksinene. "Supressors of cytokine signaling" (SOCS) er en gruppe proteiner som har en nøkkelrolle i regulering av ulike signal i immunsystemet. De fungerer som negative hemmere av cytokinsignaler, og opprettholder dermed homeostasen i et velfungerende immunsystem (Dimitriou *et al.*, 2008). Nyere forskning viser at virus har evne til å ta kontroll over SOCS-proteinene, og øke uttrykket av disse slik at antivirale signal hemmes (Akhtar and Benveniste, 2011). Mye tyder derfor på at SOCS-proteinene kan bidra i kampen i mot virussykdommene, dersom vi får en bedre forståelse av i hvilken grad og hvordan de er involvert i fiskens immunreaksjoner ved virusinfeksjoner.

1.1.1 Pankreassykdom

Pankreassykdom (PD) anses i dag som den viktigste virussykdommen i norsk fiskeoppdrett (Hjeltnes, 2014). Sykdommen forårsakes av Salmonid Alfavirus (SAV), også kalt Salmon pancreas disease virus (SPDV), som tilhører familien *Togaviridae* (Hodneland *et al.*, 2005). Frem til 2010 var alle tilfeller av PD forårsaket av en særnorsk variant av viruset, Norwegian salmonid alphavirus (NSAV), heretter SAV3. SAV3 har siden de første påvisninger i Hordaland først på 1990-tallet spredt seg slik at den nå regnes som endemisk på Vestlandet. Hustadvika i nord har fungert som effektiv barriere mot sykdommen, og utbrudd lengre nord har vært sporadiske (Hjeltnes, 2014). I 2010 ble det imidlertid påvist en ny variant av viruset; sleeping disease virus (SDV), heretter SAV2. Denne ble påvist nord for Hustadvika, og har tidligere været identifisert i forbindelse med utbrudd i Europa, Storbritannia og senere også i

Skottland (Hjortaa *et al.*, 2013). Kliniske utbrudd hos atlantisk laks forårsaket av begge varianter er stort sett identiske, men noe mildere kliniske symptomer og lavere dødelighet observeres ved infeksjon med SAV2 (Jansen *et al.*, 2014). På grunnlag av rask spredning av SAV2, ble en ny sone opprettet mellom Hustadvika i sør og Nordland i nord, hvor SAV2 nå regnes som endemisk (Hjeltnes, 2014).

Utbrudd av PD oppstår året rundt og medfører betydelige tap for næringen i form av økt dødelighet, økte produksjonskostnader samt redusert tilvekst og slaktekvalitet (Aunsmo *et al.*, 2010, Hjeltnes, 2014). Sykdomsforløpet for PD er dynamisk, hvor symptomer ikke er konsekvente igjennom hele forløpet. Klinisk vises sykdommen i den akutte fasen kun ved tap av appetitt. Senere blir fisken letargisk, opphører å svømme i stim, og dødeligheten kan stige til 50 % (Bruno *et al.*, 2013). Viruset har pankreas, hjerte og skjelettmuskulatur som primære målorgan, og histologiske endringer ses først ved nekroser i eksokrin pankreas og hele hjertet. Senere observeres også degenereringer i både rød og hvit skjelettmuskulatur (Bruno *et al.*, 2013, McLoughlin and Graham, 2007). Hos fisk som overlever et utbrudd, regenereres eksokrin pankreas og fisken kan vokse som normalt. En del vil likevel utvikle kroniske skader i pankreas, slik at de fortsetter å mistrives og utvikles til ”pinner” (McVicar, 1987). Antall utbrudd med PD har holdt seg stabil de siste årene, likevel med en ”intern” økning i SAV2-utbrudd og nedgang i SAV3-utbrudd (Hjeltnes, 2014). PD er derfor langt ifra en sykdom som næringen i dag har kontroll på.

1.1.2. Infeksiøs pankreas nekrose

Infeksiøs pankreas nekrose (IPN) er et svært utbredt sykdom, og påvises hos en rekke arter både vill- og oppdrettsfisk i ferskvann og sjøvann (Hill and Way, 1995). IPN forårsakes av det akvatiske birnaviruset, infeksiøs pankreas nekrose virus (IPNV) (Dobos *et al.*, 1979), og sykdommen har de siste tiår vært en av de største tapsårsaker i norsk og internasjonal oppdrett. Stort fokus har derfor vært rettet mot sykdommen, og IPNV regnes i dag som et av de best karakteriserte fiskevirus.

IPN ble opprinnelig regnet som en akutt sykdom som rammet yngel av regnbueørret og laks. Senere har det likevel vist seg at sykdommen også forårsaker dødelighet i sjøvann, vanligvis 7-12 uker etter utsett (Roberts and Pearson, 2005). Fisk i ferskvannsfasen ser ut til å være mest mottakelige mot IPNV, og dødeligheten ved utbrudd kan variere fra 10-20 % hos parr

til 90 % hos små yngel. I sjøfasen opptrer utbrudd som regel 3 måneder etter utsett med en dødelighet rundt 10-25 % og i enkelttilfeller opp mot 50 % (Roberts and Pearson, 2005). Ved akutte utbrudd av IPN observeres ofte en abnormal svømmebevegelse, mørkfarging av huden, og fisken kan bli letargisk og avmagret. Utspilt buk, varierende grad av utstående øyne og bleike gjeller er også typiske funn. I tarmene til infisert fisk skjer en avstøtning av mukosa, som resulterer i et hvitt/gult eksudat som ses som lange hvite tråder fra fiskens gatt. Bukhulen er ofte væskefylt (ascites), og det kan observeres små punktblødninger i fettvevet rundt pylorusblindsekkene. Fisken har ofte en bleik/gul lever og både lever og milt kan være forstørret. Histopatologiske undersøkelser viser fokale nekroser i lever og eksokrin pankreas, samt vakuolisering i nyre (Roberts and Pearson, 2005, Bruno *et al.*, 2013). Hos fisk som overlever et utbrudd kan det utvikles en bærertilstand, hvor viruset fortsetter å replikere og bli utskilt fra verten uten at det kan observeres noen sykdomstegn (Bootland *et al.*, 1991). Fisken kan dermed fortsette å utgjøre en smittekilde både horisontalt og vertikalt. Antall IPN-utbrudd de siste årene har gått drastisk ned fra en topp på 223 utbrudd i 2009, til bare 56 utbrudd i 2013 (Hjeltnes, 2014). Mye tyder derfor på at IPN er en sykdom næringen med målrettet innsats har fått kontroll på. Men siden viruset er så godt karakterisert, utgjør det stadig en viktig modell for karakterisering av andre virus og fiskens immunsystem.

1.2 Immunsystemet hos beinfisk

Å kunne beskytte seg mot infeksjoner og videre å eliminere patogene mikroorganismer, er essensielt for overlevelse hos alle individer, ikke minst hos laks som konstant eksponeres for ulike mikroorganismer i et vandig miljø. Fisk anses som de første vertebratene som innehar et komplekst immunsystem med både medfødte og adaptive responser (Magnadottir, 2010).

1.2.1 Immunologiske organer og celler

Til forskjell fra pattedyr mangler fisk beinmarg og lymfeknuter, som representerer henholdsvis primære og sekundære lymfoide organer hos pattedyr (Press and Evensen, 1999). I stedet regnes de viktigste lymfoide organer hos fisk som hodenyre, baknyre, thymus, milt og mucosa-assosierte lymfevev, som inkluderer tarm-assosiert lymfevev, samt det nylig identifiserte interbrankiale lymfoide vev (ILV) i gjellene (Morrison and Nowak, 2002, Press and Evensen, 1999, Haugarvoll *et al.*, 2008).

Hodenyre og thymus anses som de primære lymfoide organene hos fisk, hvor henholdsvis B- og T-celler modnes (Koppang *et al.*, 2010, Rombout *et al.*, 2005, Zwollo *et al.*, 2005). Hodenyre står også for opptak av blodbårne antigener i det retikuloendoteliale systemet, bestående av melanomakrofagsentre og fagocyterende endotelceller, og kan derfor også regnes som et sekundært lymfeorgan (Press and Evensen, 1999). Kompleksiteten til nyre som immunologisk organ kommer ytterligere til syne ved indikasjoner om at B-celler kan migrere til og aktiveres i baknyre, som dermed også kan regnes som et sekundært lymfeorgan (Zwollo *et al.*, 2005). Milt regnes sammen med hodenyre som det viktigste sekundære lymfeorganet, og består av et nettverk av elipsoider med fagocyterende endotelceller og melanomakrofagsentre tilsvarende de som finnes i hodenyre (Uribe *et al.*, 2011). Det ILV i gjellene er også foreslått som sekundært lymfeorgan, siden en kan påvise anrikning av T-celler her. Fravær av uttrykk av gener som ellers knyttes til primære lymfeorgan styrker denne hypotesen (Koppang *et al.*, 2010). Koppang *et al.* (2010) foreslår ILV som en strategisk plassering av et sekundært lymfeorgan, siden gjellene kontinuerlig utsettes for ulike mikrober, og en rask respons her vil være fordelaktig.

Mens det er stor morfologisk forskjell på de immunologiske organene hos fisk og pattedyr, er de fleste immuncellene som er påvist hos pattedyr også påvist hos fisk. Fagocyterende celler er nøkkelceller i det medfødte immunsystem, og står for opptak av fremmede antigener og videre aktivering av immunreaksjoner. Monocytter/makrofager og nøytrofile celler er påvist hos fisk, og er vist å produsere reaktive oksygen forbindelser (ROS) i likhet med pattedyrs (Randelli *et al.*, 2008). B-celler hos fisk er også vist å kunne fagocytere og eliminere mikroorgansimer, og indikerer at B-celler også har en viktig funksjon i det medfødte immunsystemet i tillegg til det adaptive (Li *et al.*, 2006). Celler med uspesifikk cytotoksisk funksjon; nonspesifikke cytotoksiske celler (NCC) og natural killer (NK) liknende celler, er også påvist hos fisk, og anses som analoger til NK-celler hos pattedyr (Fischer *et al.*, 2013). Dendritiske celler (DC) er spesialiserte antigen presenterende celler (APC), og fungerer som kobling mellom det medfødte og adaptive immunsystemet. Celler med karakteristikk lik DC er påvist hos laksefisk (Bassity and Clark, 2012, Lovy *et al.*, 2009), men i hvilken grad de fungerer på samme måte som DC hos pattedyr gjenstår å undersøke. De viktigste cellene i det adaptive immunsystemet er T- og B-celler. De aktiveres ved gjenkjenning av henholdsvis major histocompatibility complex (MHC) assosierte peptid-antigener, eller ved binding av antigen til immunoglobulin reseptorer.

1.2.2 Det medfødte immunsystemet hos fisk

Det medfødte immunsystemet er fiskens førstelinjeforsvar mot invaderende mikroorganismer, og reagerer raskt, men relativt uspesifikt mot en rekke inntrengende mikroorganismer. Det inndeles vanligvis i tre seksjoner: den mucosale/epiteliale barriere, de humorale faktorene og de cellulære komponentene. Den mukosale og epiteliale barrieren fungerer først og fremst som en fysisk barriere, men flere humorale komponenter med antimikrobiell funksjon er også påvist i mukus hos laks (Fast *et al.*, 2002, Whyte, 2007). Humorale faktorer inkluderer blant annet komplementsystemet, antivirale proteiner, cytokiner og kjemokiner (Whyte, 2007, Magnadottir, 2006). Komplementsystemet hos fisk har vist seg å være særdeles velutviklet, og fungerer optimalt ved en større temperatur spredning enn hos pattedyr (Whyte, 2007).

De cellulære komponentene består som tidligere beskrevet av fagocyterende celler, NCC/NK-lignende celler og DC. Essensielt for en effektiv og målrettet immunreaksjon forårsaket av disse celler og andre komponenter i det medfødte immunsystem, er gjenkjennelse av fremmede antigener ved hjelp av pattern recognition receptorer (PRR). Disse reseptorene gjenkjenner konserverte molekyler assosiert med patogener, såkalte pathogen associated molecular patterns (PAMPs). Typiske PAMP er polysakkarider/glycoproteiner som f.eks. LPS eller CpG-DNA og virusassosiert dobbeltrådig eller enkelttrådig RNA (Magnadottir, 2010). Toll liknende reseptorer (TLR) er viktige PRRer hos pattedyr, og flere TLR-ekvivalenter er påvist hos fisk (Pietretti and Wiegertjes, 2014). Andre intracellulære PRR viktige for gjenkjenning av dobbeltrådig RNA er påvist hos laks, og inkluderer RIG-1, MDA5 og LGP2 (Chang *et al.*, 2011, Zou *et al.*, 2009). Aktivering av signalveier ved binding av PRR-PAMP frigir en rekke cytokiner og kjemokiner som videre modulerer forløpet av den etterfølgende immunreaksjon. En rekke cytokiner og kjemokiner, essensielle ved inflammasjon og antivirale reaksjoner er påvist hos fisk (Zhu *et al.*, 2013).

1.2.3 Det adaptive immunsystemet hos fisk

Aktivering av det adaptive immunsystemet skjer relativt sakte, men er mer spesifikt og har lengere varighet enn en medfødt respons. Utviklingen av adaptiv immunitet forutsetter en rekke faktorer som sikrer en spesifikk og målrettet respons, og utvikling av thymus, B- og T-celler, RAG (recombination activation gene) enzymer samt MHC regnes som de viktigste (Magnadottir, 2010). Det adaptive immunsystemet inndeles vanligvis i to seksjoner: de

humorale faktorene og de cellulære komponentene, men et klart skille mellom disse er meningsløst, siden de i stor grad er en veksel-virkning mellom cellene og de humorale faktorene.

Den humorale delen består hovedsakelig av antigen bindende immunoglobuliner (Ig), enten som membranbundne B-celle reseptorer (BCR) på overflaten til B-cellene, eller som Ig i plasma utskilt av plasmaceller. Utskilte Ig inaktiverer mikroorganismer ved først å binde spesifikt til fremmede antigen og deretter enten nøytralisere disse, eller aktivere andre eliminerende effektorceller med reseptorer for Ig, f.eks. fagocyterende eller cytotoksiske celler. Tre Ig-klasser er så langt påvist hos fisk, IgM, IgD og IgZ/IgT (Hansen *et al.*, 2005, Wilson *et al.*, 1997, Hikima *et al.*, 2011). I blod, milt og nyre er IgM⁺ celler dominerende, mens IgT⁺ celler dominerer i tarm-assosiert lymfevev (Fillatreau *et al.*, 2013). Isotypebytte er imidlertid ikke påvist hos fisk, og IgM⁺ / IgM⁺IgD⁺ og IgT⁺ celler regnes som to ulike B-celle subtyper (Schorpp *et al.*, 2006). Affinitetsmodning er påvist hos fisk, men i mye mindre grad enn hos pattedyr. Dette anses å være forbundet med lav temperatur og det faktum at det ikke er påvist distinkte germinale sentre hos fisk (Fillatreau *et al.*, 2013).

Den cellulære delen av immunsystemet består av T- og B-celler, som kjenner igjen antigen med henholdsvis T- og B- celle reseptor (TCR og BCR). Høy spesifisitet hos disse reseptorene dannes ved somatisk rearrangering av gen-elementer, og påvisning av de viktigste genene som inngår i denne rearrangering hos fisk, blant annet RAG1/2 og TdT (Terminal deoxynucleotidyl transferase), indikerer at denne prosessen foregår som hos pattedyr (Fillatreau *et al.*, 2013). B-cellene knyttes som beskrevet til den humorale responsen, mens T-cellene knyttes til den cellulære responsen. B-cellene kan etter binding av fritt antigen til BCR og aktivering av ulike ko-reseptorer, stimuleres til celledeling og differensiering til enten hukommelsesceller, eller til plasmaceller som skiller ut store mengder Ig. T-cellene gjenkjenner via TCR bare små peptidfragmenter, som etter prosessering intracellulært i APC uttrykkes i membranen i kompleks med MHC I eller II. Assosiert til TCR er enten CD8⁺ eller CD4⁺ koreseptorer, som gjenkjenner henholdsvis MHC I og II. MHC I uttrykkes på overflaten av celler med kjerne, og presenterer primært peptider derivert fra proteiner i cellens cytosol, blant dem virale proteiner. MHC II derimot uttrykkes kun av spesialiserte APCer, og presenterer peptider etter endosomal nedbrytning av ekstracellulære proteiner. I tillegg til TCR-MHC binding krever aktivering av T-celler også binding av ko-stimulatoriske molekyler som cytokiner og ko-reseptorer uttrykt på makrofager, og disse avgjør hvilken type respons

som blir utløst. Aktivering av en TCR-MHC respons stimulerer T-cellene til deling og differensiering til enten hukommelsesceller, eller effektorceller. De fleste markørene for T-celle aktivitet er påvist hos fisk, og disse inkluderer MHC I og II samt CD8 og CD4 ko-reseptorer (Randelli *et al.*, 2008). MHC I og CD8+ aktivering regnes som spesielt viktige ved virusinfeksjoner, og disse vil eliminere infiserte celler enten ved granulær exocytose eller FasL/Fas interaksjoner. Perforin er en viktig komponent ved granulær exocytose, og er påvist hos laksefisk (Athanasopoulou *et al.*, 2009). FasL er også påvist hos fisk (Fischer *et al.*, 2013) og mekanismene for cellulær eliminering av intracellulære patogener synes derfor å være konserverte mellom fisk og pattedyr.

1.3 Regulering og modulering av immunreaksjoner mot virus hos fisk – IFN signalering

Cytokiner representerer en gruppe proteiner som bidrar til kommunikasjon mellom immunceller. De er avgjørende for at reaksjoner mellom immunceller skjer koordinert og er spesifikt målrettet mot inntrengende mikroorganismer (Savan and Sakai, 2006). De fungerer som en bro mellom det medfødte og adaptive immunsystemet, hvor celler fra den adaptive arm reagerer på signaler fra den medfødte delen og omvendt. Cytokiner produseres av aktiverte immunceller og inndeles i fem kategorier: 1) interleukiner, 2) tumor nekrosefaktor, 3) koloni stimulerende faktor, 4) kjemokiner og 5) interferoner (Sebastián *et al.*, 2012). Ved virusinfeksjoner hos laks har interferonene en nøkkelrolle i førstelinje forsvaret (Collet, 2014), og fokus heretter vil derfor være på disse.

1.3.1 Interferonsystemet hos fisk

Interferoner (IFN) er cytokiner som skilles ut ved en virusinfeksjon og er en viktig del av den medfødte immunresponsen, siden de stimulerer direkte produksjon av antivirale proteiner. Samtidig har de en viktig rolle i det adaptive immunsystem ved å mediere overlevelse av CD8+ T-celler, som er viktige for en antiviral cellulær immunrespons (Kolumam *et al.*, 2005). Viralt RNA kjennes igjen av PRR uttrykt på de fleste celler, og initiere en signaloverføring som resulterer i transkripsjon av IFN-gener og IFN-produksjon. IFN som blir utskilt vil binde seg til IFN-reseptorer, som finnes på de fleste celler, og videre initierer en ny signaloverføring som resulterer i transkripsjon og produksjon av antivirale proteiner fra andre celler (Robertsen, 2006). Tre typer IFN (type I, II og III) er påvist hos pattedyr. Type I og III IFN regnes som viktigst i en tidlig antiviral respons, og bruker samme signalveier for

induksjon av antivirale proteiner (Collet, 2014). Type II IFN, også kalt IFN γ regnes som viktigere i senere antigen induerte cellemedierte responser, og signalerer gjennom en egen reseptor, men med overlappende signalvei tilsvarende IFN I og III (Robertsen, 2006).

Fire IFN I subtyper er påvist hos laks og omfatter totalt 13 gener (IFNa1-3, IFNb1-4, IFNc1-5 og IFNd1), og disse deles videre inn i to grupper etter antall disulfid bindinger, hvor IFNa og IFNd (gruppe I) har *en* binding mens IFNb og IFNc (gruppe II) har to (Svingerud *et al.*, 2012). Genene for IFN I hos fisk inneholder introner (4), noe som gjør de forskjellige fra de hos pattedyr, som ikke har noen (Robertsen *et al.*, 2003). I motsetning til IFN I hos pattedyr som binder samme reseptor, binder gruppe I og II IFN hos fisk to ulike reseptorer (Aggad *et al.*, 2009), men dette er så langt ikke påvist hos laksefisk. IFN γ er påvist hos flere arter inkludert laks. De er genetisk lik IFN γ hos pattedyr og har samme intron/exon struktur samtidig som de induserer de samme cellulære responsene som IFN γ hos pattedyr (Sun *et al.*, 2011). IFN γ hos fisk er også vist å beskytte mot SAV og IPNV ved å indusere de samme antivirale genene som ved en IFN γ -respons hos pattedyr (Sun *et al.*, 2011). I tillegg induserer IFN γ hos fisk en rekke interferon stimulerte gener (ISG), som også induseres av IFN I, og indikerer en kryss-reaksjon mellom de to signalveiene (Zou and Secombes, 2011). IFN III er så langt ikke påvist hos fisk.

1.3.2 Signalveier for induksjon av IFN

For at celler ved en virusinfeksjon skal slå på IFN-produksjon må disse gjenkjenne viralt arvestoff via egne reseptorer (PRR). Disse reseptorene er enten bundet til membraner på cellens overflate og i intracellulære endosomer, eller de finnes som frie reseptorer i cellens cytosol (Zou and Secombes, 2011).

TLR er membranbundne reseptorer og består av tre deler: en "ekstracellulær" N-terminal med repeterte leuciner, som er involvert i gjenkjenning av PAMP, en transmembran region, og et intracellulær C-terminal Toll-IL-1 reseptor (TIR) domenet, som bidrar til signaloverføring (Zhu *et al.*, 2013). Totalt 17 TLRer er påvist hos fisk, og fisk anses å ha homologer til stort sett alle TLR som er påvist hos pattedyr. I tillegg har fisk egne TLR-varianter, inkludert en salmonid TLR22 (Zhang and Gui, 2012, Rebl *et al.*, 2010). Reseptorene som er involvert i gjenkjenning av viralt arvestoff hos fisk inkluderer TLR3/7/8/9, hvor TLR3 binder korte dsRNA, TLR7/8 binder ssRNA og TLR9 binder viralt DNA. TLR3/7/8/9 er lokalisert

intracellulært i cellens endosomer og lysosomer, med LRR inn i lumen, hvor de binder RNA eller DNA fra inntrengende eller fagocyterte virus (Pietretti and Wiegertjes, 2014). TLR22 binder i likhet med TLR3 dsRNA, men i motsetning til TLR3 er TLR22 lokalisert på cellens overflate og binder lengre dsRNA. TLR 22 er vist å inducere IFN via samme signalveier som TLR3 (Matsuo *et al.*, 2008), og forfatterne foreslår TLR22 som et supplement til TLR3 på celleoverflaten, spesielt utviklet som en forsvarsmekanisme i et akvatisk miljø med potensielt store mengder virus.

De frie reseptorer i cellens cytosol tilhører RIG-1 liknende reseptorer (RLR)-familien og består av RIG-1, MDA5 og LGP2 som alle kjenner igjen dsRNA av viral opprinnelse i cellens cytoplasma (Zhu *et al.*, 2013). Alle RLR untatt LGP2 har N-terminalt et caspase aktiverende/rekruterende domene (CARD), som medierer nedstrøms signaloverføring, en DExDH/H box RNA helikase domene involvert i binding av RNA, og et repressor domene ved C-terminal som hemmer nedstrøms signalering (unntatt MDA5). Mens pattedyrs RIG-1 og MDA5 er vist å inducere en IFN-respons er LGP2 vist å hemme RIG-1 og MDA5 (Kawai and Akira, 2008). RIG-1, MDA5 og LGP2 er påvist hos flere fiskearter, deriblant laksefisk, men den direkte signalveien er uklar. RIG1 og MDA5 er foreslått å slå på antivirale responser via samme signalveier som hos pattedyr, og det samme ser ut til å gjelde for LGP2 også (Zhu *et al.*, 2013, Lauksund *et al.*, 2009).

TLR og RLR induserer en signalkaskade i cellene ved å rekruttere primære adaptormolekyler som videre rekrutterer sekundære molekyler inkludert kinaser, og resulterer i fosforylering av enten interferon regulatorisk faktor (IRF) 3 og 7 eller nuklær faktor kappa B (NF- κ B). IRF3/7 og NF- κ B flytter seg deretter til cellekjernen og induserer transkripsjon av henholdsvis antivirale og proinflammatoriske cytokiner (Zhang and Gui, 2012). IFN-responser mediert via TLR er konserverte mellom pattedyr og fisk, og en rekke adaptorprotein og kinaser funnet hos pattedyr, er også påvist hos fisk (Purcell *et al.*, 2006). Hvordan disse proteinene er involvert i TLR-signaleringsen hos fisk er så langt lite kartlagt, men noen studier indikerer delvis konserverte signalspor mellom pattedyr og fisk. MyD88 hos laks er vist å reagere direkte med IRF3 og IRF7/8 hos fisk, men involvering av IL-1 assosierte kinaser (IRAK) som hos pattedyr er ikke påvist (Iliev *et al.*, 2011). Signalering via RLR hos fisk skjer via MAVS/IPS-1 og TBK-1, hvilket indikerer en konservert, men eventuelt forenklet signalspor sammenlignet med pattedyr (Zhang and Gui, 2012). Tabell 1 viser hovedtrekkene i TLR og

RLR signaleringen, og tilhørende adaptorprotein, kinaser og transkripsjonsfaktorer som så langt er påvist hos fisk.

Tabell 1: PRR, primære adaptorproteiner, aktiverte kinaser og transkripsjonsfaktorer involvert i induksjon av IFN I hos fisk (Zhang and Gui, 2012, Iliev *et al.*, 2011, Lauksund *et al.*, 2009, Robertsen, 2008).

PRR	Lokalisering	Adaptorprotein	Aktiverte kinaser	Transkripsjonsfaktorer
TLR				
TLR3	Endosom	TRIF	TBK1	IRF3 IRF7
TLR22	Cellemembran			NF-κB
TLR7/8	Endosom	MYD88		IRF3 IRF7
TLR9	Endosom Lysosom			NF-κB
RLR				
RIG1 MDA5	Cytoplasma	MAVS/IPS-1	TBK1	IRF3 IRF7 NF-κB

For å undersøke IFN-responsene *in-vitro* er det konstruert syntetiske PAMPer, som etterligner virusinfeksjoner ved å aktivere de ulike PRR. PolyI:C og R-848 er syntetiske etterligninger av henholdsvis dsRNA og ssRNA, og begge er vist å aktivere IFN I respons hos laks. PolyI:C er foreslått å produsere IFN α via TLR3/22 og MDA5 mens R-848 binder TLR7 og 8 og aktiverer produksjon av IFN β og IFN γ (Svingerud *et al.*, 2012). CpG er cystein-guanidin dinukleotider i spesifikke DNA-sekvenser som finnes i umetylert form i bakterielt og viralt arvestoff. TLR9 er identifisert som reseptoren som binder CpG hos pattedyr, og nylig ble dette også påvist hos laks (Iliev *et al.*, 2013).

1.3.3 Signalveier for IFN

IFN skilles ut fra den aktiverte cellen, og induserer økt uttrykk av en rekke interferon stimulerede gener (ISG) i uinfiserte naboceller. Hos pattedyr binder alle IFN I variantene til samme IFN reseptor, som består av subenhetene IFNR1 og IFNR2, som tilhører klasse II cytokin reseptor familien CRFB (Zou and Secombes, 2011). Hos pattedyr vil binding av IFN I til IFNR føre til aktivering av Jak kinaser (Jak1 og Tyk 2) som konstitutivt er assosiert til reseptorkjeder. Aktivering av Jak fosforylerer tyrosiner på reseptoren, som videre rekrutterer STAT protein (STAT1 og STAT2) til reseptoren via SH2-domener på STATene. Jak fosforylerer deretter STAT, som dimeriserer og flytter seg til cellekjernen, hvor kommer

sammen med IRF-9 og danner transkripsjonskomplekset ISGF3. ISGF3 binder deretter interferon stimulerede respons elementer (ISRE) og aktiverer transkripsjon av ISGer (Robertsen, 2006). De fleste genene involvert i Jak/STAT signalveien, inkludert Jak1, Tyk2, STAT1, STAT2 og IRF-9 er påvist hos fisk. Dette tilsier at signalveien er konserveret mellom fisk og pattedyr (Zhang and Gui, 2012). STAT1 og Tyk2 er påvist hos atlantisk laks, og funksjonelle studier har vist samme karakteristikk som hos pattedyr. I lakseceller er STAT1 vist å dimeriserer og deretter gå inn i kjernen etter stimulering med IFN. Videre er overuttrykk av Tyk2 vist å oppregulere ISGer (Skjesol *et al.*, 2010, Sobhkhez *et al.*, 2013). Disse studier er med på å underbygge at fisk, deriblant atlantisk laks har et Jak/STAT signalspor med likheter til det som er beskrevet hos pattedyr.

IFN I aktivering av Jak/STAT signalveien fører til uttrykk av mange hundre ulike antivirale proteiner (Robertsen, 2008). Flere homologer til ISGer funnet hos pattedyr er påvist hos fisk, og i tillegg finnes noen fiskespesifikke ISGer (Zhang *et al.*, 2012). Mx-protein var det første ISG som ble påvist hos atlantisk laks, og viste seg å ha antiviral effekt mot IPNV (Robertsen, 2008). Siden er ISGer som ISG15, Viperin og PKR også påvist hos laks (Svingerud *et al.*, 2012).

1.4 Negativ regulering av cytokin signalering – SOCS

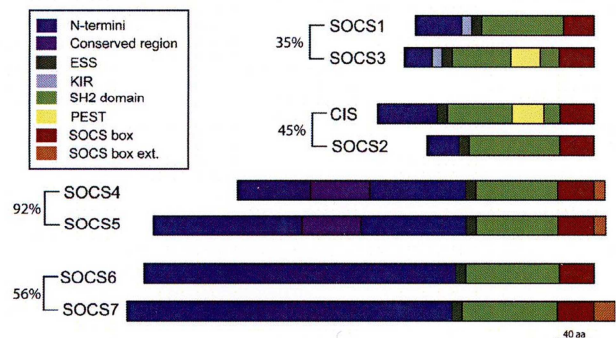
De antivirale signalveiene beskrevet så langt aktiveres alle som følge av positive signaler fra PAMP eller cytokiner. En forutsetning for et velfungerende immunsystem er midlertidig avhengig av at signaleringen kan reguleres, så lengden og styrken av en respons kan justeres. Negativ feedback regulering er derfor avgjørende for både justering og terminering av en immunrespons. SOCS-proteinene har siden oppdagelsen i 1997 markert seg som den viktigste gruppen av intracellulære negative regulatorer av cytokinsignalering i både det medfødte og adaptive immunsystemet (Linossi *et al.*, 2013).

1.4.1 Struktur SOCS-protein

SOCS familien hos pattedyr består av åtte medlemmer, SOCS1-7 samt den cytokin induerte SRC-homolog 2 (SH2) CISH. Fisk uttrykker samtlige SOCSer, og i tillegg fire fiskespesifikke medlemmer: SOCS3b, SOCS5b, SOCS8 og SOCS9 (Jin *et al.*, 2008). De har alle en lik tredelt struktur med et variabel N-terminalt domenet, et sentral SH2-domenet og en konserverte SOCS-boks C-terminalt (Figur 2) (Dimitriou *et al.*, 2008). Den N-terminale delen

varierer i lengde og aminosyre sammensetning, og SOCSene inndeles i to grupper basert på lengden av N-terminal del. SOCS1-3 samt CISH har et kortere N-terminalt domene, og de viser en mer markant respons ved cytokin signalering enn SOCS4-7 som har en lengere N-terminal (Linossi *et al.*, 2013). SOCS1 og SOCS3 har i tilknytning til N-terminal en kinase hemmende region (KIR), som er direkte involvert i hemming av fosforyleringsaktiviteten til Jak. Spesifisiteten til SOCSene ligger i SH2 domenet, som gjenkjenner og binder til fosforylerte tyrosiner på en rekke målproteiner f.eks. Jak, og cytokin reseptorer. SH2 domenet er forlenget N-terminalt med et SH-subdomenet (ESS) som bidrar til å øke affiniteten i bindingen mellom SOCS og målproteinene og ved å bestemme orienteringen til fosfotyrosin bindingsstet for SH2. SOCS-boksen er et 40 aminosyre langt domene som interagerer med en rekke proteiner, og danner en funksjonell E3 ubuquitin ligase (Dimitriou *et al.*, 2008, Yasukawa *et al.*, 1999, Croker *et al.*, 2008).

SOCS1-3 samt CISH er nylig klonet fra atlantisk laks og ørret, og SOCS-strukturen synes å være konservert sammenlignet med andre vertebrater (Wang and Secombes, 2008, Skjesol *et al.*, 2014). Disse studiene viste, at spesielt SOCS-boksen og SH2 domenet har høy sekvenslikhet, også til pattedyr sekvenser, mens ESS og KIR regionene er mer fiskespesifikke.



Figur 2: Domenestruktur hos SOCS-protein. Alle SOCS har et sentralt SH2-domene og en SOCS-boks C-terminalt. SOCS1 og SOCS3 har i tillegg en KIR i tilknytning til N-terminal. SOCSene er arrangert i par, basert på prosentvis sekvenslikheten i SH2-domenet. Figur: Linossi *et al.* (2013).

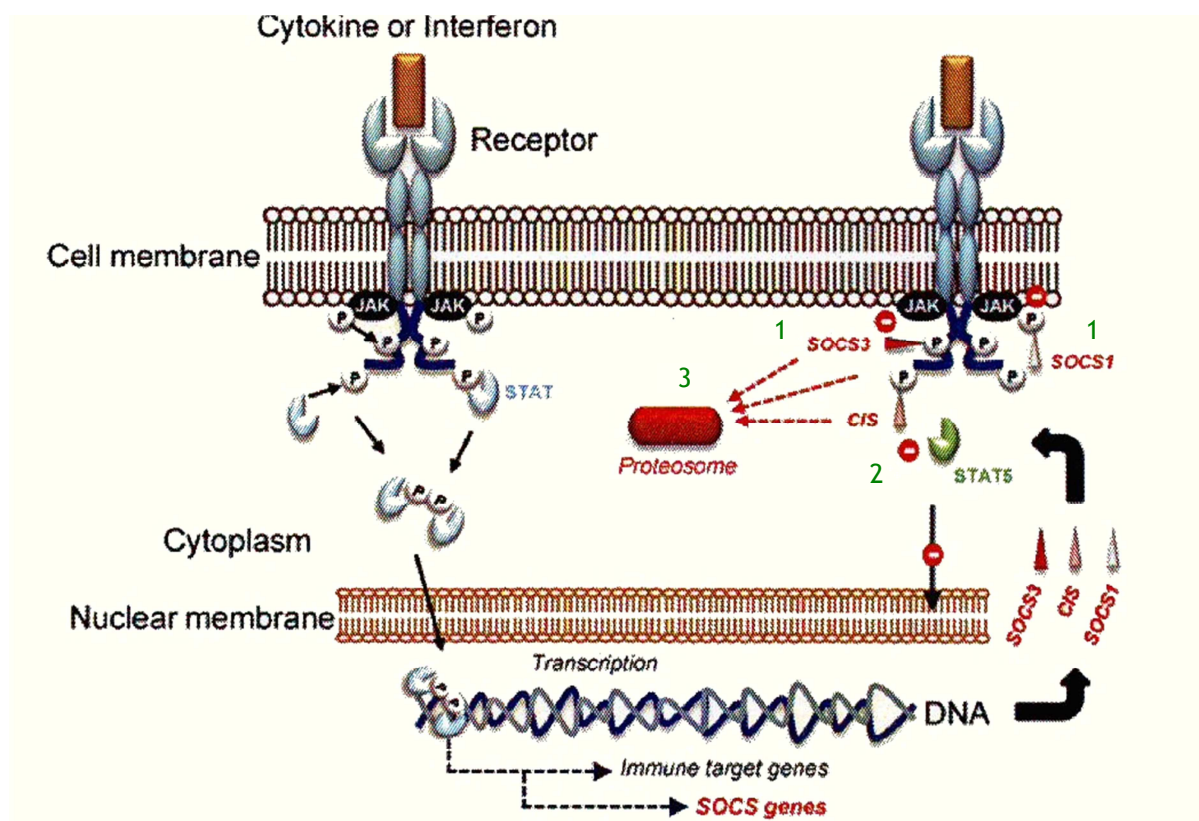
1.4.2 Funksjon SOCS-protein

SOCS-proteinene er vist å ha mange ulike funksjoner, og de deltar blant annet i aktivering og modning av DC, differensiering av T-celler og aktivering av førstelinje forsvaret mot virus (Yoshimura *et al.*, 2007). SOCSene regulerer en rekke signalveier, blant annet de PRR og IFN induerte som beskrevet over. Reguleringen av PRR-induserte signaler retter seg hovedsakelig mot MyD88 uavhengig, NFκB-indusert signalering, mens IRF induert signalering ikke er vist å hemmes av SOCS. I relasjon til antiviralt forsvar og type I IFN signaloverføring, er det derfor først og fremst Jak/STAT signalveien som reguleres via SOCS (Yoshimura *et al.*, 2007, Dimitriou *et al.*, 2008), og denne signalveien er fokus her. Tre mekanismer for hemming av cytokinsignalering er beskrevet for SOCS (Figur 3).

- 1) SOCS1 og 3 er vist å binde direkte til Jak og på den måten hemme fosforyleringsaktiviteten til Jak. Det er foreslått at SOCS fungerer som et pseudosubstrat, siden KIR binder den katalytiske kløften på Jak med høy affinitet, og høy konsentrasjon av KIR-peptid hemmer Jak (Yoshimura and Yasukawa, 2012). Nylig ble det derimot vist at SOCS3 hemmer Jak ved først å binde reseptoren via SH2, hvor etter KIR binder utenfor den katalytiske kløften til Jak. Bindingen viste en ikke-kompetitiv kinetikk, og stemmer derfor ikke med teorien om KIR som pseudosubstrat. Bindingen forårsaker sannsynligvis heller en konformasjonsendring i den katalytiske kløften til Jak og hemmer dermed fosforyleringen av tyrosiner både på reseptorer og på STAT (Babon *et al.*, 2012). Den samme mekanismen er så langt ikke vist for SOCS1, men siden SOCS1 og 3 deler KIR, er en lik virkningsmekanisme sannsynlig.

- 2) SOCSene kan gjennom binding via SH2 domenet direkte blokkere rekruttering av STAT til cytokinreseptoren. SOCS1 og 3 binder som beskrevet over via SH2 til tyrosiner på Jak og blokkerer reseptor og STAT fosforylering. SOCS2, SOCS3 og CISH binder med SH2 domenet direkte til fosfotyrosiner på cytokinreseptoren og blokkerer dermed binding av STAT etter aktivering av Jak (Alexander and Hilton, 2004).

- 3) En siste mekanisme for SOCSene er å ubiquitinere målproteiner for degradering i proteosomene. SOCS-boksen interagerer med Elongin B, Elongin C, Cullin 5 og Rbx2 som deretter rekrutterer en E2 ubiquitin transferase og dermed danner en funksjonell E3 ubiquitin ligase. Spesifisiteten til SH2 domenet bringer målproteiner i kontakt med E3 ubiquitin ligasen som dermed kan merkes for degradering via proteosomet (Alexander and Hilton, 2004). Typiske målproteiner er Jak og cytokin reseptorer, som dermed ikke lenger er i stand til å mediere cytokinsignaler (Dimitriou *et al.*, 2008).



Figur 3: Aktivering av Jak/STAT signalveien og etterfølgende aktivering av SOCS-proteiner. Tre mekanismer for hemming av Jak/STAT signalveien er beskrevet for SOCS. I denne figuren er mekanismene for SOCS1, SOCS3 og CISH (CIS) funksjon vist. 1) Binding og blokkering av Jak-aktivitet 2) blokkering av STAT fosforilysering 3) Ubiquitinering av reseptoren eller Jak for proteosomale degradering. Figur: modifisert fra Delgado-Ortega *et al.* (2013)

Den biologiske rollen til SOCSene i immunsystemet er delvis kartlagt i studier hvor SOCSene i celler eller dyremodeller blir overuttrykte eller slått ut. Disse studiene har vist at spesifikke SOCSer har distinkte funksjoner i noen immunreaksjoner, mens andre reaksjoner påvirkes av flere ulike SOCS (Alexander and Hilton, 2004). Betydningen av SOCS1 i regulering av immunreaksjoner ble tidlig påvist i SOCS1-"knock-out" mus, som døde innen tre uker etter fødsel (Starr *et al.*, 1998). SOCS1 er siden vist å ha en avgjørende rolle i regulering av TLR-signalering og type I og II IFN-signalering (Crocker *et al.*, 2008). Siden SOCS1 i større grad enn de andre SOCS regulerer IFN-responsene, knyttes også SOCS1 til forsvaret mot virus (Akhtar and Benveniste, 2011). Studier med SOCS1 fra fisk indikerer at SOCS1 har funksjonelle likheter med SOCS1 fra pattedyr, og det er derfor sannsynlig at SOCS1 også hos fisk er knyttet til det antivirale forsvaret som et typisk ISG (Skjesol *et al.*, 2014, Nie *et al.*, 2014). SOCS1 er også uttrykt i stor grad i thymus, og er foreslått å regulere balansen mellom utvikling av CD4⁺ og CD8⁺ T-celler. Videre er SOCS1 foreslått regulere balansen i

differensiering av Th1- og Th2-celler (Palmer and Restifo, 2009). SOCS2 er vist å regulere veksthormon signalering, og overuttrykk av SOCS2 fører til ukontrollert vekst samt underutvikling av nervesystemet (Croker *et al.*, 2008). SOCS2 er også vist å kunne hemme aktiviteten til andre medlemmer av SOCS-familien. Det er foreslått at SOCS2 binder andre SOCS og via E3 ubiquitin ligase merker de for proteosomal degradering. Økt degradering av SOCS1 er observert ved økende SOCS2-konsentrasjoner (Piessevaux *et al.*, 2006). CISH knytts i hovedsak til regulering av STAT5-medierte signalspor, og er dermed involvert i hemming av blant annet IL2, som stimulerer differensiering av effektor T-celler (Matsumoto *et al.*, 1997, Palmer and Restifo, 2009). Rollen til CISH i T-celle differensiering er likevel noe uklar, siden overuttrykk av CISH også er vist å stimulere differensiering og overlevelse av CD4⁺ T-celler (Li *et al.*, 2000), samtidig som de ikke er observert noen spesifikke fenotype endringer i CISH-”knock-out” mus. CISH er likevel vist å regulere signalering via granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, som via STAT5 stimulerer celleprolifisering, differensiering og overlevelse av monocytter og makrofager (Lehtonen *et al.*, 2002).

1.4.3 Hvordan reguleres SOCS-nivå i celler?

SOCS proteinene uttrykkes som følge av aktivering av signalveiene via en rekke cytokiner, og hemmer deretter den samme signalkaskaden som aktiverte dem. De fungerer derfor som klassiske negative feedback-hemmere i immunsystemet. Funksjonen til SOCSene rekker likevel utover bare cytokinsignalering, og andre stimuli, som f.eks. lipopolysakkarider (LPS), cyclisk AMP (cAMP) og insulin er også vist å indusere SOCS produksjon (Yoshimura *et al.*, 2007, Palmer and Restifo, 2009). I hvilken grad de ulike SOCSene uttrykkes er i tillegg avhengig av hvilket av SOCS-proteinene som uttrykkes, og hvilken celletype som stimuleres. Samtidig er SOCSene nøye regulert på både post-translasjons og transkripsjons nivå for å unngå overdreven hemming av cytokinsignalering. Ekspresjon av SOCS-proteiner reguleres også ved alternativ spleising og mRNA stabilitet (Palmer and Restifo, 2009). Transkripsjon av SOCS1 er vist å hemmes via et ekstra start codon oppstrøms for SOCS-mRNAets start codon, og krever sannsynligvis binding av et cap-protein sammen med ribosomet for å oppnå transkripsjon (Gregorieff *et al.*, 2000).

Funksjonelle SOCS har generelt kort halveringstid, som forårsakes av en rekke post-transkripsjonelle modifiseringer av SOCS proteinene. SOCS1 og CISH har i tilknytning til

SH2 domenet en PEST sekvens, som er vist å induserer proteolyse av SOCS3 (Babon *et al.*, 2006, Wang *et al.*, 2011). PEST sekvensen er likevel ikke påvist i CISH hos fisk, så det er uvisst om samme regulerings mekanisme eksisterer hos fisk (Nie *et al.*, 2014, Wang *et al.*, 2011). SOCS3 genotyper koder for ett ubiquitinerings sete, som bidrar til proteosomale degradering etter transkripsjon. Ved cellulær stress kan dette setet ekskluderes ved alternativ spleising, og SOCS3 som mangler dette setet er vist å være mer stabilt og aktivt enn villtype SOCS3 (Sasaki *et al.*, 2003). Det er også antatt at SOCS-boksen i stor grad bidrar til SOCS stabilitet via interaksjoner med elongin C. Fosforylering av tyrosiner i SOCS-boksen hos SOCS3 blokkerte interaksjon med elongin C, og induerte proteosomale degradering av SOCS-proteinet (Haan *et al.*, 2003). Enkelte SOCSer, inkludert SOCS2, er vist å kunne kryssreagere med andre SOCS og regulere disse ved proteosomale degradering. SOCS-boksen og binding av Elongin B og C er vist å være essensiell for denne funksjon hos SOCS2, og en ubiquiterings mekanisme er derfor sannsynlig (Piessevaux *et al.*, 2006). Betydningen av en SOCS2 degradering av andre SOCS er likevel uklar, siden både overuttrykk og delesjon av SOCS2 kan stimulere enkelte signaleringsveier (Palmer and Restifo, 2009).

1.4.4 SOCS og virale infeksjoner

Den antivirale IFN-responsen, som er fiskens sterkeste førstelinjeforsvar mot virus, er i utgangspunktet ytterst potent, og uten mekanismer for å unngå denne responsen hadde ikke virus vært noen evolusjonær suksess. Ved å interagere med flere ledd i både PRR-signalerings og Jak/STAT-signalveien har virus utviklet en rekke mekanismer som hemmer den nedstrøms IFN-responsen og følgende produksjon av antivirale proteiner (Weber and Haller, 2007). Forsøk med atlantisk laks har vist at dette også er tilfellet hos fisk, hvor infeksjoner med IPNV i stor grad demper den antivirale IFN-responsen. Likevel er den direkte mekanismen for hvordan de virale proteiner interagerer med IFN-signalerings stort sett ukjent akkurat nå (Lauksund, 2014). SOCSenes nøkkelrolle, spesielt SOCS1, i hemming av IFN-signalerings gjør dem derfor til opplagt mål som virus kan utnytte, og en rekke virus er også vist å kunne inducere SOCS uttrykk og etterfølgende hemme både medfødte og adaptive immunresponser (Akhtar and Benveniste, 2011). I de fleste tilfeller hvor virus er vist å øke SOCS uttrykket, har det vært knyttet til hemming av ulike komponenter i Jak/STAT signalveien, og følgende reduksjon i produksjon av antivirale proteiner (Delgado-Ortega *et al.*, 2013). SOCS1 har også vist seg å være direkte involvert i virus partikkel produksjon og transport av virusprotein i den infiserte cellen. Ubiquitinerings er et viktig ledd i

virusproduksjon for human immunodeficiency virus 1 (HIV-1) og studier har knyttet SOCS1-E3 komplekset til HIV-1 produksjon. Samme studie viste også at SOCS1 var viktig i stabilisering av microtubuli nettverket i cellen som transporterer viruspartikler i cellen (Nishi *et al.*, 2009).

Rollen til SOCS proteinene i virusinfeksjoner hos fisk er så langt lite beskrevet. Økning i SOCS3 uttrykk hos karpe (*Cyprinus carpio* L.) er påvist etter infeksjon med spring vireamia of carp virus (SVCV) (Xiao *et al.*, 2010). SOCS uttrykket ble også målt i hodenyre hos ørret (*Salmo trutta*) etter infeksjon med viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV). Infeksjonen viste en oppregulering i SOCS1 og SOCS3 uttrykket mens uttrykket av SOCS 5 og SOCS7 ble nedregulert (Wang *et al.*, 2011). Nylig utførte studier i cellelinjer fra larver av mandarin fisk (*Synchiropus splendidus*) har vist at genomet til Megalocytivirus koder for virale SOCS-liknende proteiner. SOCS-proteinet manglet SOCS-boksen, men viste seg å hemme Jak/STAT signalering ved å interagere med Jak (Guo *et al.*, 2012).

1.5 Problemstilling

SOCSene er en relativ nyoppdaget komponent i immunforsvaret, og det er derfor mye som gjenstår å kartlegge om funksjonene til disse proteinene, spesielt hos fisk. Selv om de fleste SOCSene som er påvist hos pattedyr også er påvist hos fisk, er det få funksjonelle studier knyttet til hvilke funksjoner SOCSene har i fiskens immunsystem. Beskrivelsen av SOCSene i teksten over, baserer seg i stor grad på studier utført på pattedyr. Enkelte nyere studier på karpe og piggvar (*Scophthalmus maximus*) SOCS3 (Xiao *et al.*, 2010, Zhang *et al.*, 2011), regnbueørret (*Oncorhynchus mykiss*) SOCS1-3 (Wang and Secombes, 2008) og zebrafisk (*Danio rerio*) (Nie *et al.*, 2014) viser at SOCS også hos fisk er ISG og at deres funksjoner sannsynligvis er konserverte mellom pattedyr og fisk. I et nylig publisert studie fra Jorunn Jørgensens forskningsgruppe er 3 medlemmer av SOCS-protein familien, SOCS1, SOCS2 og CISH, identifisert i atlantisk laks (Skjesol *et al.*, 2014). Formålet med dette studie var å videre karakteriseres disse SOCSene, og kartlegge i hvilken grad de har en rolle ved virale infeksjoner.

Delmål 1

Undersøke uttrykk av SOCS-transkripter i vev fra ulike organer i frisk atlantisk laks

Delmål 2

Undersøke uttrykk av SOCS-transkripter i ulike organer fra laks smittet med SAV3.

Delmål 3

Undersøke uttrykk av SOCS og udvalgte ISG-transkripter i TO-celler infisert med SAV3 og IPNV over tid.

Delmål 4

Undersøke uttrykk av SOCS-transkripter i kultiverte lakseleukocytter stimulert med ulike TLR-ligander.

Delmål 5

Etablere en stabilt transfektert CHSE-cellelinje som overuttrykker SOCS1 og SOCS2 og undersøke cellenes respons på stimulering med IFN α .

2. Materiale og Metode

2.1 Forsøksfisk og organuttak

2.1.1 Forsøksfisk

All fisk brukt til organuttak var uvaksinert atlantisk laks *Salmo salar* L. stamme Aqua Gen standard generasjon 2011 holdt på havbruksstasjonen i Tromsø. Fisken ble holdt på sjøvann med et kontinuerlig lysregime og foret med kommersielt for fra Skretting.

2.1.2 Organuttak

For *in vivo* studie av normalekspresjon av de ulike SOCS-proteinene ble det brukt fisk som hadde en gjennomsnittsvekt på 117 gram, og ble holdt ved 5 °C . Fiskene ble avlivet med slag i hodet før organuttak og blodtappet fra *Vena caudalis*. Prøver ble tatt fra seks individer og ti organer (hud, muskel, gjeller, thymus, hjerte, lever, milt, tarm, hodenyre og nyre) fra hver fisk, og de ble dissekert ut og overført til RNA-later for videre analyse.

For *in vivo* studie av ekspresjon av de ulike SOCS-proteinene i SAV-smittet fisk, ble RNA som var isolert i et tidligere utført smitteforsøk ved forskningsgruppen brukt (Fremmerlid, 2012). Fisken hadde en gjennomsnittsvekt på 80 gram og ble holdt ved 10 °C. En kohabitant smittemodell ble benyttet, hvor den friske fisken ble eksponert for fisk smittet intraperitonealt (ip) med SAV3. Det anvendte virusisolatet var SAVH 20/03 med virustiter $5 \times 10^{3.5}$ TCID₅₀/ml. Hver fisk ble injisert med 2,0 ml virussuspensjon fortynt 1:20 i MEM. Totalt 52 fisk inngikk i forsøket, hvorav 10 ble injisert (ip) med virus. Prøver ble tatt fra kohabitanter og kontrollfisk i et separat kar, åtte individer fra hver gruppe, - 17, 21, 28 og 35 dager etter smitte. Gjeller, hjerte og hodenyre ble dissekert ut og overført på RNA-later for videre analyser.

For *in vitro* studier av isolerte cellekulturer fra hodenyre ble det brukt fisk med en gjennomsnittsvekt på omtrent 1 kg som ble holdt ved naturlig sjøtemperatur. Fisken ble avlivet med slag i hodet før organuttak og blodtappet fra *Vena caudalis*. Hodenyre og milt ble sterilt dissekert ut, overført til 15 ml L-15 medium tilsatt heparin og 2 % FBS og transportert på is til labben.

2.2 Dyrkning og splitting av Celler:

Chinook salmon embryo celler (CHSE-214) (Fryer *et al.*, 1965) og TO-celler er to cellelinjer som er mye brukte verktøy i infeksjonsstudier og studier av immunreaksjoner hos laks. TO-cellene er isolert fra fornyre leukocytter fra atlantisk laks (Wergeland and Jakobsen, 2001).

CHSE-214 og TO-celler ble dyrket som monolag ved 20 °C i celleinkubator (Termaks) i Leibovitz's L-15 medium tilsatt 100U/ml penicillin og 60µg/ml streptomycin, (Gibco®, Life technologies) og 8 % fetal bovine serum (FBS) (Biochrom AG).

Arbeidet med celler ble utført i LAF-kabinett (DanLaf, VFRS 1206), som sammen med utstyr ble sterilisert med 70 % etanol før bruk. Cellene ble dyrket til 90-95 % konfluens i 175cm² celledyrkningsflasker (Nunc®, Thermo Scientific) og deretter splittet. Ved splitting fjernes vekstmedium og cellene vaskes med 7 ml fosfat bufret saline (PBS) (Sigma-Aldrich) for å fjerne trypsinhemmere fra FBS i overskuddsmediet. Cellene som er festet til flaskebunnen løses i 2 ml Trypsin/EDTA (0,5g/l trypsin og 0,2 g/l EDTA) (Sigma-Aldrich) med en konsentrasjon på 5x for CHSE-214-celler og 1x for TO-celler. Cellene løsnes etter noen minutter, og dunk med håndflaten i siden av flasken framskynder prosessen så cellene ikke utsettes for trypsin unødvendig lenge. Cellesuspensjonen resuspenderes i 10 ml vekstmedium og antall celler i fortyningen (celler/ml) telles med nucleocounter (Nucleo Counter YC-100, Chemometec) etter protokoll fra produsent. Løsningen fortynnes deretter ytterligere i vekstmedium til ønsket konsentrasjon for videre utsåing i flasker eller brett, avhengig av eksperiment

2.3 Isolering og stimulering av leukocytter fra atlantisk laks:

Leukocytter fra hodenyre ble isolert fra atlantisk laks som beskrevet av Jørgensen *et al.* (Jørgensen *et al.*, 2001). Enkeltsuspensjon av hodenyre og milt sentrifugeres gjennom en diskontinuerlig Perkoll-gradient bestående av colloidale silica partikler. Ulik tetthet av silica partikler danner en tetthetsgradient nedad i kolonnen. Leukocytene vil ved sentrifugering sedimentere ved en kjent likevektstetthet, ulik andre celler, og kan dermed isoleres fra suspensjonen (AmershamBioscience, 2014).

2.3.1 Isolering av adherente leukocytter fra hodenyre

Hodenyre ble homogenisert gjennom en 100- μ m cellestrainer (Falcon) i L-15 tilsatt penicilin (60 μ g/ml), streptomycin (100 μ g/ml), heparin (20 U/ml) (LEO pharma) og 2 % FBS. Cellesuspensjonen ble overført til en 25/54 % Percoll gradient og sentrifugert i 11 ml sentrifugerør (Nunc) ved 400x g i Multifuge 1S-R (Heraeus) i 40 min ved 4 °C. Percoll gradientene prepareres med en 100 ml utgangsløsning av 90 % ml Percoll (GE healthcare) fortynnet i 9 % NaCl tilsatt 0,4ml heparin 500U/ml. Femtifire % Percoll-løsning lages med fortynning av utgangsløsning i L-15 med tilsetninger som ovenfor, og 25 % lages ved at utgangsløsningen fortynnes med PBS tilsatt 20 U/ml heparin.

Leukocytene vil etter sentrifugering anrikes i den synlige fasen mellom 25 % og 54 %, som høstes med sterilpipette og vaskes to ganger i iskald L-15 medium ved å sentrifugere i 10 min ved 300x g. Cellepelletten resuspenderes i 20-40 ml L-15 tilsatt antibiotika og 0,1 % FBS. Celletallet ble bestemt ved avlesning i en nucleocounter og tettheten justert til 7×10^6 celler/ml i L-15 tilsatt antibiotika og 0,1 % FBS. Cellene ble sådd ut i 24-brønners brett med en tetthet på 7×10^6 celler per brønn. Etter inkubering i 24 timer ved 14 °C ble ikke-adherente celler fjernet ved å vaske brønnene 2 ganger med L-15 tilsatt antibiotika og 5 % FBS.

2.3.2 Stimulering av leukocytter

Celler fra hodenyre ble stimulert med syntetisk dobbeltrådig RNA: polyinosinic-polycytidylic acid (poly I:C) (10 μ g/ml), syntetiske oligodeoxynukleotider (ODN): klasse B CpG ODN(2006T) og non-CpG ODN (2007) (2 μ M), TLR7/8 agonisten R-848 (1 μ g/ml). Kontrollceller ble holdt ubehandlet og kun tilsatt L-15 tilsatt antibiotika og 5 % FBS. Stimulantene ble fortynnet til ønsket konsentrasjon i L-15 m. 5 % FBS, hvoretter det i 24-brønners brett ble tilsatt 0,5 ml stimuleringsløsning og i 96-brønnersbrett ble tilsatt 0,1ml stimuleringsløsning. Alle plater ble inkubert ved 14 °C før og etter stimulering.

To stimuleringsforsøk ble gjennomført. I del en ble leukocytter isolert fra tre individer stimulert med polyI:C, CpG og non-CpG i 8, 24 og 48 timer. I del to ble leukocytter fra to individer stimulert med polyI:C og CpG i 24 og 7 dager. Etter 7 dager ble cellene restimulert med R-848 i 24 timer. Medium på cellene i del to ble skiftet ved dag 6 med L-15 tilsatt 5 % FBS. Alle stimuleringer ble satt opp med en enkelt parallell for hver stimulering. Adherente

celler fra del ble høstet med TRIzol® Reagent (Life technologies) i henhold til protokoll fra produsent. Suspensjonene med lyserte celler ble oppbevart ved -70 °C før videre RNA-isolering. Real time kvantitativ PCR (RT-qPCR) med primere spesifikke for SOCS1, SOCS2 og CISH ble utført for å påvise endring i genuttrykk i cellene

2.4 Infeksjon av TO-celler med SAV3 og IPNV:

For å kartlegge SOCS-uttrykket ved en virusinfeksjon ble TO-celler infisert med salmonid alphavirus 3 (SAV3) og infeksjøs pankreas nekrose virus (IPNV). Isolatene som ble anvendt i studiet var SAVH20/03 (Hodneland *et al.*, 2005) og IPNV stamme N1 serotype Sp (Christie *et al.*, 1988), som stammer fra utbrudd av henholdsvis PD og IPN i Norge.

TO-celler ble sådd ut i 24-brønners brett med en tetthet på 10^5 celler per brønn i L-15 tilsatt 100 U/ml penicillin og 60 µg/ml streptomycin og 8 % FBS og inkubert ved 15 °C over natt. Før infeksjon ble virus fortynnet i L-15 medium tilsatt 100 U/ml penicillin og 60 µg/ml streptomycin i henhold til ønsket multiplicity of infection (MOI) som følgende:

$$\frac{TO\text{-celler} * MOI}{TCID_{50} * 0,7}$$

Forsøket ble satt opp med MOI 2 infeksjøse partikler/celle i TO celler for SAV3 og MOI 2 og 10 for IPNV.

Før smitting ble cellemedium forsiktig fjernet, og 1 ml virussuspensjon tilsatt hver brønn hvoretter brettet ble inkubert ved 15 °C i 3,5 timer for SAV3 infeksjon og 2 timer for IPNV infeksjon. Etter smitte ble virussuspensjonen forsiktig fjernet og 1 ml L-15 m. tilsatt 100 U/ml penicillin og 60 µg/ml streptomycin og 2 % FBS (vedlikeholdsmedium) hvoretter cellene ble inkubert ved 15 °C . Negative kontrollceller ble tilsatt 1 ml vedlikeholdsmedium og positive kontrollceller ble stimulert med polyI:C (1 µg/ml) i vedlikeholdsmedium og inkubert ved de samme betingelser. Infiserte prøver ble satt opp som triplikater og kontroller som duplikater.

Cellene ble høstet etter 2,3,4,7 og 8 dager etter smitte med SAV3 og etter 24, 48, 72 og 120 timer etter smitte med IPNV. Cellene ble høstet med RLT buffer (RNeasy® Mini Kit, Qiagen) tilsatt 0,01 % 2-Mercaptoethanol (Sigma-Aldrich) i henhold til protokoll fra

produsent. Suspensjonen med lyserte celler ble oppbevart ved $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ før videre RNA-isolering.

RTq-PCR primere spesifikke for SOCS1, SOCS2, CISH, IFN1a og Mx-protein ble utført for å påvise endring i genuttrykk i cellene. Mengde virus i hver enkelt prøve ble bestemt med RT-qPCR med primere spesifikke for nsP1 og VP2. Hver enkeltprøve ble analysert mot en standardkurve tillaget ut fra kjent mengde plasmid med henholdsvis nsP1 og VP2 (avsnitt 2.8).

2.5 Stabil transfektering av CHSE-celler:

Transfeksjon er prosessen hvor genetisk materiale, som oftest plasmid-DNA, settes inn i eukaryote celler. Ulike transfeksjonsmetoder finnes, og de baserer seg på kjemiske reaksjoner (kalsiumfosfat, kationiske liposomer), fysisk behandling (elektroporering, magnetofeksjon) eller bruk av virus som bærere av DNAet. Hvilke metoder som gir effektiv transfeksjon varierer mellom cellelinjer. Ved stabil transfeksjon ønsker man at det genetiske materialet blir inkorporert i cellens kromosomer, så cellene og dattercellene vil uttrykke det aktuelle genet. For å kunne selektere de cellene som har tatt opp fremmed DNA, blir mål-DNA ko-transfektet med et markør-gen som gir cellen egenskaper som det kan selekteres for, for eksempel antibiotikaresistens. Dermed vil alle celler som ikke har tatt opp resistensplasmidet dø ved tilsetning av et gitt antibiotikum, mens celler transfektet med dette plasmidet vil overleve. Ved ko-transfeksjon av to ulike plasmider (målgen og resistensmarkør) vil opptak av begge plasmider i samme celle som oftes skje.

2.5.1 Etablering av cellelinjer stabilt transfektet med SOCS1 og SOCS2

Eukaryote ekspressionsvektorer pDEST-GFP (fra dr. T. Lamark, Universitetet i Tromsø) med SOCS1 og SOCS2a promoter koblet til et GFP-reporter konstrukt, beskrevet i Skjesol *et al.* (2014).

CHSE-214 cellene ble transfektet med Lipofektamin® (Life technologies). Lipofektamin® danner et kationisk liposom rundt plasmidet, som fusjonerer med plasmamembranen til CHSE-celle hvoretter plasmidet leveres inn i cellen for eventuell replikering og inkorporering i kromosomet. CHSE-celle ble sådd ut i $12,5\text{ cm}^2$ celledyrkningsflasker (Nunc) med en tetthet på 1,3 mill. celler/flaske fortynnet i 4 ml Minimum Essential Media

(MEM) tilsatt 100 U/ml penicillin og 60µg/ml streptomycin, 1 % non essensielle aminosyrer og 8% FBS, heretter nevnt vekstmedium. Tidligere erfaring til siger at dette vil gi en konfluens på 80 %. Cellene ble inkubert ved 20 °C over natt.

CHSE-214 cellene ble ko-transfektet med GFP-tagget SOCS1 eller SOCS2 og pBABEpuro plasmid, som er bærer av puromycin resistens genet (Addgene, plasmid 1764) med forhold 5:1. I henhold til protokoll fra produsent ble det beregnet 25µg DNA med GFP-tag og 125µg pBABEpuro samt 15µl lipofektamin® per transfeksjon. I forkant av transfeksjonen ble DNA og Lipofektamin® fortynnet hver for seg i 100µl MEM, og blandingen med Lipofektamin® ble stående 5 min ved romtemperatur. Løsningene med DNA og Lipofektamin® ble deretter blandet 1:1 og inkubert i 20 min for å tillate dannelse av liposomer. Vekstmedium på flaskene ble skiftet med MEM uten tilsetninger og DNA/lipofektamin® ble tilsatt. Cellene ble inkubert med CO₂ over natt ved 20 °C (Forma, Thermo Scientific). Dagen etter ble transfeksjonsmedium i hver flaske skiftet med 3 ml vekstmedium tilsatt puromycin. Det ble anvendt en konsentrasjon på 0,001mg puromycin /ml, som har vist seg effektiv i å drepe ulike cellelinjer fra atlantisk laks (Schiotz *et al.*, 2011). Cellene ble inkubert med CO₂ ved 20 °C hvoretter vekstmedium tilsatt puromycin ble skiftet ukentlig.

Ko-transfeksjon av celler med SOCS- og puromycin-resistens plasmid vil ved dyrkning i medie tilsatt puromycin, resultere i en blanding av celler som har tatt opp begge plasmider og celler som bare har tatt opp puromycin-resistens plasmidet. Cellekulturene ble derfor sortert ved hjelp av flow-cytometri og GFP-tag i FACSARIA (Becton Dickinson). Før sortering vaskes cellene med romtemperert PBS for å fjerne rester av FBS, hvoretter de løsnes fra flasken ved å tilsette 5x Trypsin/EDTA (0,5g/l trypsin og 0,2 g/l EDTA) (Sigma-Aldrich) og vaskes i 1 ml vekstmedium ved å sentrifugere celleduspensjonen ved 1000 G i 10 min. Deretter resuspenderes cellene i 1 ml vekstmedium og sorteres. Etter sortering resuspenderes cellene i vekstmedium og dyrkes videre i celledyrkningsflasker som beskrevet over.

Cellene ble observert i mikroskop, hvor fluoriserende signal fra cellene indikerer vellykket ko-transfeksjon. Western blott ble gjennomført for å påvise GFP-tagget SOCS protein med riktig størrelse i cellene (beskrevet nedenfor), noe som vil bekrefte om transfeksjonen har vært vellykket (avsnitt 2.10). RT-qPCR med primere spesifikke for SOCS1 og SOCS2 ble utført for undersøke økt genuttrykk i cellene (avsnitt 2.8).

GFP-SOCS1, SOCS2 GFP-EV transfekterte CHSE-214 celler ble sådd ut på dekkglass i 24-brønners brett og inkubert ved 20 °C og 5 % CO₂, til det kunne observeres 100 % konfluens. Medium ble deretter fjernet og cellene ble vasket med PBS 2x, hvorefter de fikseres med 4 % paraformaldehyd ved 5 °C i 30 min. Cellene ble vasket med PBS i 2x 10 min, og dekkglassene ble forsiktig overført fra brønnen til objektglass med en dråpe 10 % glycerol. Cellene ble avbildet under mikroskop med Leica DM 6000 B.

2.5.2 Stimulering av SOCS-transfektete celler

SOCS1 og SOCS2 transfekterte CHSE-214 celler ble sådd ut i 24-brønners brett med en tetthet på 2×10^5 celler per brønn i 1 ml vekstmedium uten puromycin per brønn og inkubert med CO₂ over natt. Cellene ble stimulert med IFN1a (500 U/ml) (J.B. Jørgensen, personlig meddelelse). Stimuleringsløsningene ble laget i vekstmedium uten puromycin. Hver brønn ble tilsatt 100µl stimuleringsløsning hvorefter brettet ble klappet forsiktig på siden for å blande løsningen med medie i brønnen. Ikke-transfektete CHSE-celler ble anvendt som kontroll og tilsatt 100µl vekstmedium uten puromycin. Alle prøver ble satt opp som triplikater. Cellene ble høstet etter 8 og 24 timer med RLT buffer (RNeasy® Mini Kit, Qiagen) tilsatt 0,01 % 2-Mercaptoethanol (Sigma-Aldrich) i henhold til protokoll fra produsent. Suspensjonen med lyserte celler ble oppbevart ved -70 °C før videre RNA-isolering. RT-qPCR med primere spesifikke for SOCS1, SOCS2 og Mx-protein ble utført for å påvise endring i genuttrykk i cellene (avsnitt 2.8).

2.6 Isolering av totalt RNA fra organer og cellelinjer:

Graden av genuttrykk undersøkes ved å måle mengde av spesifikke mRNA for et gitt gen i celler og vev. Isolering av RNA baseres på metode beskrevet av Chomczynski and Sacchi (1987), hvor RNA fra celler og vev isoleres med en mono-faset løsning av fenol og guanidin isotiocyanat som effektivt lyserer celler og isolerer RNA, samtidig som den ivaretar integriteten til RNAet. RNA degraderes fort av ribonukleaser (RNaser) både endogene og i miljøet, så det benyttes RNase fritt utstyr under hele prosessen. Alle sentrifugeringer ble gjort i Eppendorf centrifuge 5417R ved romtemperatur dersom annet ikke er spesifisert.

Homogenisering og faseeparering av vevsprøver fra frisk fisk, uvaksinert laks ble utført med TRIzol® Reagent (Life Technologies) i henhold til protokoll fra produsent. Vevsprøver på ca. 30 mg og 1000 µl TRIzol® Reagent ble overført til 2 ml Sarstedrør med tre autoklaverte

keramiske kuler og homogenisert ved 5900xg i 15 sek, evt i to omganger i Precellys® 24 Homogenizer (Bertin Technologies). Alle prøver ble holdt på is før og etter homogeniseringen. Homogeniserte prøver ble oppbevart ved -80 °C dersom det ikke umiddelbart ble ekstrahert RNA. Fasesepareringen, hvor RNA separeres fra DNA og protein i homogenatet ved tilsetning av kloroform, ble utført i kombinasjon med isolering av totalt RNA. Fasesepareringen ble utført i centrifuge nedkjølt til 4 °C. Totalt RNA ble isolert fra vevsprøver med Total RNA II kit (Machery-Nagel). RNA-fasen ble overført til 70 % EtOH med forhold 1:1, ca. 475 µl RNA-fase til 475 µl 70 % EtOH. Deretter ble protokoll fra produsenten fulgt.

RNA ble isolert fra vevsprøver fra SAV3 infisert fisk med TRIzol® Reagent (Life technologies) som beskrevet av Fremmerlid (2012).

RNA fra TO-celler infisert med virus og stabilt transfekterte CHSE-celler ble isolert med RNeasy®Mini Kit (250) (Qiagen) i henhold til protokoll fra produsent. For ytterligere rensing av RNA ble ett ekstra trinn for DNA-degradering inkludert ved bruk av RNase-Free DNase Set (Qiagen) i henhold til protokoll fra produsent. Siden RNA konsentrasjonen forventes å være lav ble eluatet kjørt gjennom kolonnen to ganger.

RNA fra celler isolert fra hodenyre ble isolert med TRIzol® Reagent (Life Technologies) kombinert med RNeasy®Mini Kit (250) (Qiagen) som beskrevet over og i henhold til protokoller fra produsentene. Justeringer som beskrevet overfor ved bruk av RNeasy®Mini Kit (250) (Qiagen) ble utført.

Etter isolering ble RNA konsentrasjon og renhet målt med NanoDrop spectrophometer (ND-1000, Thermo Fisher Scientific). A_{260} og A_{280} viser absorpsjonen ved 260nm og 280 nm, som gir et mål for henholdsvis RNA- og protein-konsentrasjon, og som dermed angir dermed forholdet mellom disse. En ratio mellom disse $\geq 1,8$ viser at prøvene ikke inneholder kontaminerende mengde av protein. Prøvene ble oppbevart ved -80 °C (vevsprøver og celler fra hodenyre) eller -70 °C (TO-celleprøver og prøver fra stabilt transfekterte celler) før videre cDNA syntese.

2.7 cDNA syntese:

Isolert og rensset mRNA transkriberes til copy DNA (cDNA) med enzymet revers transkriptase for videre amplifisering. Kopiering av DNA skjer *in vitro* ved hjelp av en rekombinant moloney murine leukemia virus revers transkriptase. Revers transkriptasen binder RNA-tråden ved hjelp av korte oligonukleotider (primere) og syntetiserer en komplementær DNA-tråd hvoretter RNA-tråden degraderes. Syntesen består av tre steg initiert av skift i temperatur, som innebærer: tilhefting, elongering og denaturering, og optimalt resulterer i ss-cDNA med forhold 1:1 til opprinnelig mengde mRNA. Reaksjonen utføres i thermo-cycler (2720 Thermal cycler, Applied biosystems). Etter endt cDNA syntese oppbevares prøvene ved -20 °C før videre analyser.

cDNA ble transkribert fra RNA ved bruk av Taqman Reverse Transcription Kit (Life Technologies). Mengden RNA ble justert med dH₂O i henhold til den målte RNA-konsentrasjon, så mengden RNA i hver prøve ble lik. For oversikt over total mengde RNA som ble transkribert for hvert forsøk se appendix III. For å forhindre degradering av RNA ble RNase hemmer tilsatt og all pipettering ble gjort på is. Følgende pipetteringsskjema ble benyttet for hver 10µl reaksjonsvolum, hvor totalvolumet ble justert etter volumet som trenges for videre qPCR:

10x buffer	1,0
MgCl ₂	2,2
dNTPs	2,0
Random hexamers	0,5
RNase inhibitor	0,2
Multiscribe RT	0,25
RNA	Max 3,85
dH ₂ O	ad 10
Totalt	20,0

Revers transkriptase reaksjonen ble utført i thermocycleren programmert med følgende temperaturregime: 10 min ved 25 °C, 30 min ved 48 °C og 5 min ved 95 °C. Prøvene ble deretter holdt i thermocycleren ved 4 °C til de ble frosset ned og oppbevart ved -20 °C før videre analysering. Ved cDNA-syntese med RNA fra vevsprøver fra ubehandlet fisk, ble

temperaturregimet justert som følgende: 10 min ved 25 °C, 60 min ved 45 °C og 5 min ved 95 °C hvorefter holdt på 4 °C.

2.8 Kvantitativ RT-PCR:

RT-qPCR er basert på PCR hvor spesifikke DNA-sekvenser oppformerer og samtidig kvantifiseres ved hjelp av fluoriserende fargestoff. Metoden anvendes derfor til å måle genuttrykk i celler, blod eller vev (Heid *et al.*, 1996, Higuchi *et al.*, 1993). Den fluoriserende fargen vil øke proporsjonalt med mengden gentranskripter og måles etter hver amplifiseringssyklus. Når fluoresensen øker signifikant fra det som betegnes som bakgrunnsstøy settes en "thresholdet" enten automatisk eller manuelt. Den amplifiseringssyklusen hvor fluoresensen overstiger thresholdet beskrives som thresholdsyklusen (C_q). C_q verdien er inverst relatert til mengden cDNA, og en lav C_q verdi medfører derfor større opprinnelig mengde av cDNA, dvs. høyere uttrykk av gen (LifeTechnologies, 2012).

To ulike assayer med ulik fluorokrom ble brukt; SYBR®Green og TaqMan®. Sybr-Green er et fargestoff som binder til "minor-groove" (fordypninger) som finnes i dobbeltrådig DNA og som gir mye sterkere fluoresens i bunden enn i ubunden tilstand. Fluoresensen fra TaqMan assayet stammer fra en "probe" som spesifikt binder målgenet. "Proben" er koblet til to fluoriserende fargestoffer, en reporterfarge og en "quencher", som når "proben" er intakt absorberer fluoresensen fra reporterfargen. Taq DNA polymerasen har en 5' nukleaseaktivitet, slik at den når målgenet mangfoldiggjøres kløyver den bundne "proben". Etter kløyving av "proben" blir den frie reporterfargen ikke lenger absorbert av "quencheren" og den vil dermed avgi fluoresens (LifeTechnologies, 2012).

For å observere en relativ endring i målgener ble relativ kvantitering benyttet, en metode som anses som egnet for undersøke endringer i genuttrykk (Pfaffl, 2001). Uttrykket av målgenene normaliseres da i henhold til et referansegene, som forventes å være stabilt uttrykt uansett behandling. EF1aB regnes som velegnet referansegene ved undersøgelser av genuttrykk i atlantisk laks (Olsvik *et al.*, 2005), og ble derfor benyttet.

Absolutt kvantifisering er en RT-qPCR metode hvor den absolutte mengden DNA i en ukjent prøve bestemmes ved å analysere den mot en standardkurve tillaget ved fortykning av prøver

med kjent mengde DNA. I dette arbeidet ble virusmengde målt med primere spesifikke for nsP1 for SAV3 og VP2 for IPNV. En ti-folds fortyningsrekke ble laget med 10^6 til 10^1 plasmider med gensekvenser for henholdsvis nsP1 og VP2 og analysert i triplikater med qPCR. Virusmengden i de ukjente prøvene bestemmes deretter fra prøvenes C_q-verdi og den tillagede standardkurven med følgende formel:

$$Q = 10^{(C_q - b)/a} \quad (1)$$

Ligning 1 viser sammenhengen mellom standardkurven og den ukjente prøven. C_q verdien måles i den ukjente prøven, og b og a er verdier for standardkurven tilsvarende $y = ax + b$.

En real-time PCR reaksjon består av 40 sykluser med oppformering av cDNAet. Hver syklus består av tre steg regulert med skift i temperatur; denaturering, amplifisering og ekstensjon, og ved optimale betingelser vil mengden cDNA fordobles for hver syklus. Høg temperatur i denaturasjonsfasen splitter dsDNA til ssDNA. I amplifikasjonsfasen senkes temperaturen og tillater primere å feste seg til DNA-tråden. I ekstensjonsfasen tilpasses temperaturen til DNA-polymerasen sin optimale temperatur, hvor den syntetiserer en ny DNA-tråd. Ved bruk av SyberGreen assay tilføyes en ekstra smeltekurve for å detektere amplifisering av uønsket DNA, dette fordi SybrGreen binder uspesifikt til alt dsDNA (LifeTechnologies, 2012). Ved å øke temperaturen over smeltepunktet til DNA-et vil trådene dissosiere, og man vil kunne observere en sterk reduksjon i fluoresens. Ulike gensekvenser vil ha ulike smeltepunkt, og ved amplifisering av uønsket DNA vil en derfor kunne observere flere utslag på smeltekurven. Oversikt over antall sykluser, temperatur og varighet av ulike steg er vist i tabell 2.

Tabell 2: RT-PCR program for SYBR®Green og TaqMan®. Smeltekurven inkluderes ved kjøring med SYBR®Green assay.

Steg	Temperatur (°C)	Varighet (sekunder)	Antall sykluser
Denaturering	95	20	Hold
Denaturering	95	3	40
Amplifisering og ekstensjon	60	30	40

Smeltekurve	95	15	kontinuerlig
	60	60	
	95	15	
	60	15	

Den kvantitative bestemmelsen av genuttrykk, ble gjennomført med Fast SYBR®Green Master Mix, SYBR®Green PCR Master Mix eller TaqMan® fast universal PCR Master Mix, se appendix III for oversikt. Den absolutte kvantifiseringen ble gjennomført med TaqMan® fast universal PCR Master Mix.

Primere og prober som ble anvendt er vist i tabell 3. Primereffektiviteten er tidligere bestemt i forskningsgruppen etter metode beskrevet av Pfaffl (2001). Oppsettet for Fast SYBR®Green Master Mix og SYBR®Green PCR Master Mix var det samme. Hver reaksjon på totalt 20 µl ble tilsatt 10 µl mastermix og 188 nM av hver primer. cDNA prøvene ble fortynnet som vist i appendix III, og 5 µl cDNA ble tilsatt hver reaksjon hvoretter resterende reaksjonsvolum ble utfyllt av H₂O. Oppsett med TaqMan® fast universal PCR Master Mix var følgende: hver reaksjon på 20 µl ble tilsatt 10 µl TaqMan buffer, 900 nM av hver primer og 250 nM probe. cDNA prøvene ble fortynnet som vist i appendix III, og 2,5 µl cDNA ble tilsatt hver reaksjon hvoretter resterende reaksjonsvolum ble utfyllt av H₂O. To negative og en positiv kontroll ble inkludert på hver plate. De negative kontrollene inkluderte cDNA som ble erstattet med vann for å avdekke uspesifikk binding som følge av kontaminering med cDNA. For å utelukke kontaminering med genomisk DNA ble det enten tatt med en prøve som ved cDNA syntesen ikke ble tilsatt revers transcriptase, eller en prøve med isolert RNA som ble fortynnet likt med cDNA-prøvene. Den positive kontrollen inneholdt cDNA fra en pool med kjent uttrykk. Flere plater kunne dermed kjøres med same materiale og gener og deretter sammenliknes ut fra den positive kontrollen. Alle prøvene ble analysert i duplikater (SOCS1, SOCS2, CISH, EF1aB, IFN1a, Mx) eller i noen tilfeller triplikater (EF1aB) med 7500 Fast Real-Time PCR system (Applied Biosystems). “Threshold” verdien ble satt til 0,2 for sammenlikning av gener og kontroller.

Tabell 3: Primer- og probe sekvenser for qPCR, Genbanknr. og PCR-effektivitet. Primere for Sybergreen oppsett ble fortynnet fra stock på 100 µM til 3,75 µM med H₂O i en felles ”primermix”. Hver reaksjon ble deretter tilsatt 188 nM av hver primer. Primere og probe for Taq-man oppsett ble tilsatt direkte fra stock med 900nM av hver primer og 250 nM av probe.

Gen	Sekvens (5-3')	Genbank nr.	Effektivitet
SYBR®Green			
EF1aB FW	GCCCCTCCAGGATGTCTAC	BG933897	2,16
EF1aB RW	CACGGCCCACAGGTACTG		
SOCS1 FW	TTCTTGATCCGGGATAGTCG	KF699315	2,155
SOCS1 RW	TGTTTCCTGCACAGTTCCTG		
SOCS2 FW	CACTGCCAACGAAGCCAAAGAGAT	KF699316	2,182
SOCS2 RW	CAAACCTGCTTCAGCTTGGGCTTGA		
CISH FW	CTCCTCACCTCACTGCCTTC	KF699318	2,097
CISH RW	CACCTTCCTCGTTGGTCCTA		
IFN1a FW	CCTTTCCTTGCTGGACCA	AY2169594	2,0
IFN1a RW	TGTCTGTAAAGGGATGTTGGGAAAA	AY2169595	
Mx FW	GATGCTGCACCTCAAGTCCTATTA	U66475	2,0
Mx RW	CGGATCAACCATGGGAATCTGA	U66476	
TaqMan®			
EF1aB FW	TGCCCTCCAGGATGTCTAC	BG933897	2,09
EF1aB RW	CACGGCCCACAGGTACTG		
EF1aB Probe	AAATCGGCGGTATTGG		
Mx FW	GATGCTGCACCTCAAGTCCTATTA	U66475	2,13
Mx RW	CGGATCAACCATGGGAATCTGA	U66476	
Mx Probe	CAGGATATCCAGTCAACGTT		
Q_nsP1 FW	CCGGCCCTGAACCAAGTT	AY604235	
Q_nsP1 Rew	GTAGCCAAGTGGGAGAAAGCT		
Q_nsP1 probe	CTGGCCACCACTTCG		
Q_VP2 FW	GCCAAGATGACCCAGTCCAT	AJ877117	
Q_VP2 RW	TGACAGCTTGACCCTGGTGAT		
Q_VP2 probe	CCGACCGAGAACAT		

2.9 Databehandling:

Data fra samtlige analyser ble analysert i Microsoft Excel. Relativt genuttrykk ble beregnet etter Pfaffl (2001)

$$\text{Ratio} = \frac{(E_{\text{mål}})^{\Delta Cq} \text{mål}^{(\text{kontroll-prøve})}}{(E_{\text{ref}})^{\Delta Cq} \text{ref}^{(\text{kontroll-prøve})}} \quad (2)$$

Ligning 2 viser den matematiske modellen for relativ endring av et målgene i forhold til et referansegen, i den stimulerede gruppen i forhold til kontrollgruppen. Ligningen tar hensyn til primereffektiviteten, hvor $E_{\text{mål}}$ er effektiviteten til primerne for målgene mens E_{ref} er effektiviteten til primerne for referansegenet. ΔC_t er differansen mellom gjennomsnittet av C_t -verdiene for kontrollgruppen og C_t verdiene for enkeltprøvene i den stimulerede gruppen (Pfaffl, 2001). Ved isolering av leukocytter fra hodenyre fra laks, stammer kontroller og

stimulerte celler fra samme organ, og de knyttes derfor direkte til hverandre. ΔCt betegner da differansen mellom Ct-verdiene fra de individuelle kontrollene og stimulerte cellene.

2.9.1 Statistikk

For å påvise forskjeller mellom SOCS-uttrykk i vev fra uvaksinert frisk fisk, ble der benyttet en enveis ANOVA hvoretter Turkey's multiple comparison test identifiserte vevene som er signifikant forskjellige.

For å påvise en korrelasjon mellom virusmengde og genuttrykk etter infeksjon med SAV3 *in vivo* og *in vitro* ble resultatene analysert med en Spearman test, hvoretter signifikant korrelasjon ble testet med en student T-test. Data med p-verdi mindre enn 0,05 ble anset som signifikant, mens p-verdier mindre enn 0,001 ble anset som meget signifikante.

2.10 Western blotting

Western blott er en teknikk basert på metode beskrevet av Towbin *et al.* (1979), som anvendes for påvisning av spesifikke proteiner i en prøve ved hjelp av antistoffer. Protein fra en prøve separeres etter molekylvekt i en polyakrylamid gel og overføres deretter til en membran hvor de blir tilsatt antistoffer spesifikke for proteinene som videre kan detekteres. Metoden ble i dette arbeidet anvendt til å påvise GFP-taggede SOCS1 og SOCS2 proteiner for å bekrefte stabil transfeksjon i CHSE-celler. Sammensetning av anvendte løsninger er vist i appendix II.

2.10.1 SDS-page

Etter utsåing av stabilt transfekterte CHSE-celler i forbindelse med forsøket beskrevet tidligere (avsnitt 2.5) ble resterende celler analysert med Western blott. Proteiner i cellelysatet ble denaturert ved tilsetning av 2x NuPAGE® LDS sample buffer (Novex®) tilsatt 1x Reducing Agent (Novex®) hvoretter lysatet ble utsatt for ultralyd i 5 sek og oppvarmet til 85-90 °C i 10 min. LDS bryter disulfid bindinger i proteinprøvene samtidig som det bidrar til å gi proteinet en netto negativ ladning. Gelelektroforese ble utført i 1mm 12 brønners NuPAGE® Novex® 4-12 % Bis-Tris Mini gel (Novex®) med NuPAGE MOPS SDS Running Buffer (Novex®). Hver proteinprøve på 25 µl ble applisert i brønnen. Som størrelsesmarkør ble det tilsatt 1,5 µl SeeBlue Plus2 Pre-stained Protein Standard (Novex®) og MagicMark® XP

Western Protein Standard (Novex®). Elektroforesen ble kjørt ved 200 V og 120 mA/gel i 40 min i Invitrogen NuPAGE-system.

2.10.2 Blotting

Proteiner i gelen overføres til en polyvinyl difluoride (PVDF) membran (Immobilon®-P, Millipore) i et elektrisk felt hvor gelen lokaliseres mot katoden og membranen mot anoden. Proteinene vil dermed overføres til membranen pga. den negative ladningen fra LDS. Membranen ble aktivert i metanol (Sigma Aldrich) i ett minutt, vasket i dH₂O i ett minutt og deretter oppbevart i blottebuffer inntil bruk. Gel og membran ble arrangert som en sandwich med svamper mettet med blottebuffer på begge og plassert i ett elektrisk felt. Blottingen ble utført ved 25 V og 160 mA i 60 min Invitrogen NuPAGE-system.

2.10.3 Blokking

PVDF-membranen har høy affinitet for proteiner og må derfor blokkes for å hindre uspesifikk binding av antistoff. Membranen blokkeres med 5 % Bovine Serum Albumin (BSA) (Sigma Aldrich) løst i Tris Buffered Saline Tween (TBS-T) ved kontinuerlig rotasjon over natt ved 4 °C.

2.10.4 Immunodeteksjon

Primærantistoffet, anti-GFP (Abcom, Ab 290) ble fortynnet 1:10.000 i TBS-T med 5 % BSA, hvorefter membranen ble inkubert i fortynningen i 60 min ved romtemperatur. Etter endt inkubering ble membranen vasket i 3×5 min med TBS-T for å fjerne ubundet antistoff. Det sekundære antistoffet, et horseraddish peroxidase (HRP) konjugert anti-kanin antistoff (Goat antiRabbit IgG-HRP, Sc 2004 Santa Cruz Biotechnologies), ble fortynnet 1:10.000 i TBS-T. Membranen ble inkubert med det sekundære antistoffet i 60 min ved romtemperatur, hvorefter den ble vasket i 3×5 min med TBS-T. Anti-aktin antistoff (Sigma Aldrich, A2066) ble brukt som loading kontroll. Antistoffet ble fortynnet 1:500 i TBS-T og membranen ble inkubert i fortynningen over natt ved 4 °C .

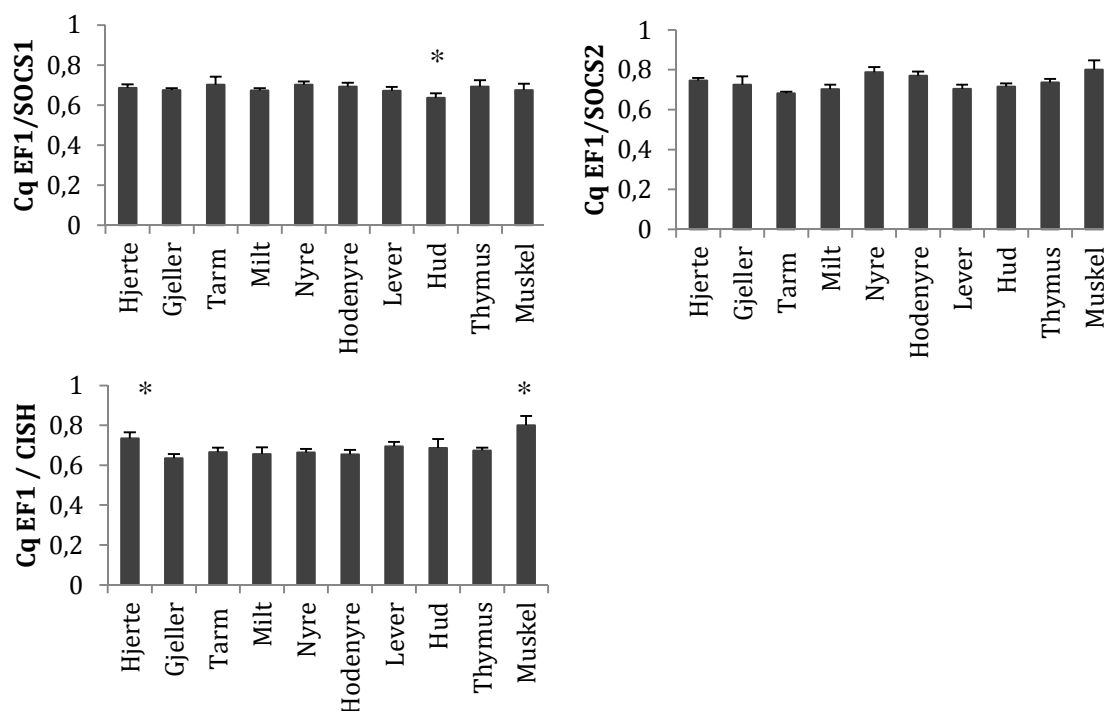
Den antistoff-konjugerte HPR-enzymet vil kunne binde og omsettes substrat som videre medfører produksjon av kjemoluminisens. Intensiteten av luminisens vil gjenspeile mengden antistoff-bundet GFP-SOCS protein og dermed vise om proteinet er tilstede i prøven og i

hvilket omfang. Etter endt inkubering ble membranen overført til en fremkallingsfolder og detektert med totalt 1 ml SuperSignal West Pico Chemoluminescent (thermo Scientific) i Carestream Kodak image station 4000MM Pro (Fischer Scientific).

3. Resultater

3.1 Normalfordistribusjon av SOCS-mRNA

Ti vev ble undersøkt med RT-qPCR for å undersøke nivået av SOCS1, SOCS2 og CISH mRNA i ulike vev fra frisk, uvaksinert atlantisk laks. Samtlige organer viste et jevnt uttrykk av SOCS1, SOCS2 og CISH. Figur 4 viser uttrykket av disse relativt til EF1aB i hjerte, gjelle, tarm, milt, baknyre, hodenyre, lever, hud, tymus og muskel. SOCS1 var signifikant lavere uttrykt i hud sammenliknet med hjerte, lever, tarm, baknyre, hodenyre, og tymus ($p < 0,05$). Uttrykket av SOCS2 var høyst i baknyre, hodenyre, muskel, hjerte og gjelle uten at dette er signifikant, mens uttrykket av CISH var signifikant høyest i muskel og hjerte ($p < 0,05$).

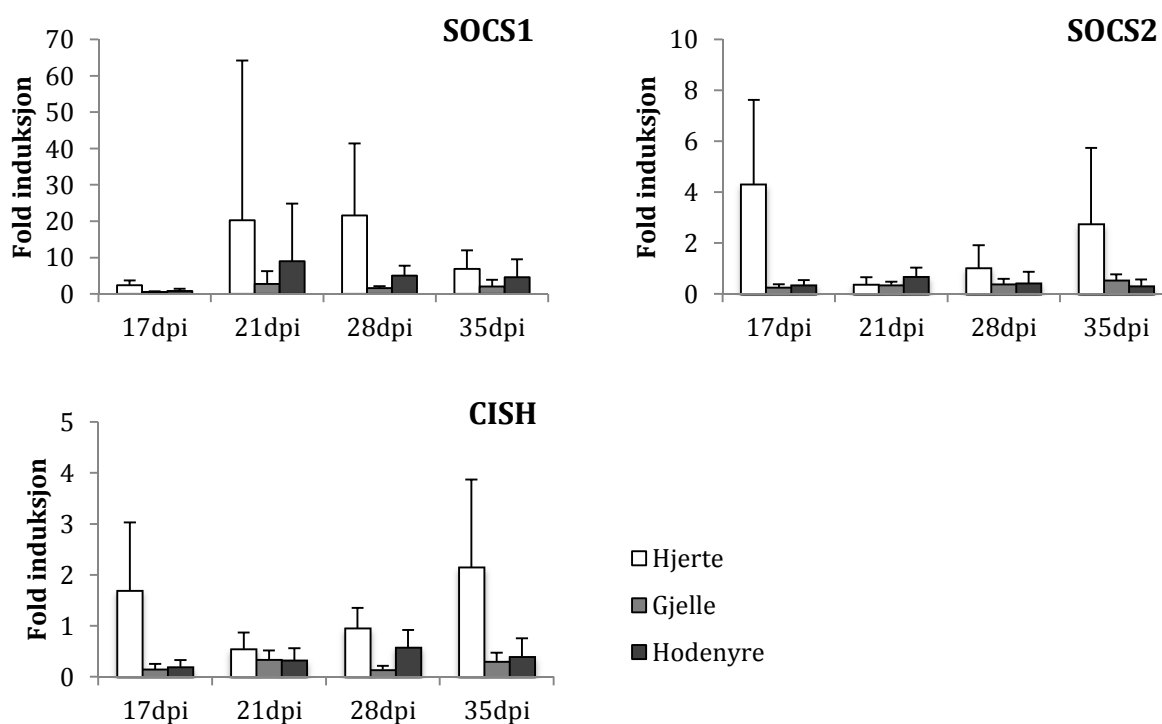


Figur 4: Genuttrykk av SOCS i forhold til referansegene i organer fra frisk uvaksinert fisk. Søylene viser uttrykk av SOCS1 (A), SOCS2 (B) og CISH (C) i forhold til EF1aB ($Cq\ EF/Cq\ SOCS$) i hjerte, gjeller, tarm, milt, baknyre, hodenyre, lever, hud, tymus og muskel. Genuttrykk ble målt med RT-qPCR. Søylene viser gjennomsnittverdier \pm standardavvik ($n=6$). * indikerer organer som har signifikant lavere eller høyere uttrykk enn andre organer ($p < 0,05$).

3.2 Uttrykk av SOCS-mRNA i atlantisk laks infisert med SAV3

For å undersøke SOCS-uttrykket ved en virusinfeksjon *in vivo*, ble det benyttet materiale fra et tidligere gjennomført smitteforsøk ved forskningsgruppen (Fremmerlid, 2012). Frisk fisk

ble kohabitant smittet med SAV3, og prøver av hjerte, gjelle og hodenyre ble tatt ut ved 17, 21, 28 og 35 dager etter smitte (dpi). Histopatologiske undersøkelser viste endringer ved 28 dpi som er typiske for en akutt fase av SAV-infeksjon, med akutt hemoragisk nekrose i eksokrin pankreas og mildere forandringer i hjerte og skjelettmuskel. Ved 35 dpi var endringene typiske for akutt til subakutt SAV3 infeksjon med betydelig tap av eksokrint pankreasvev, moderat til alvorlig degenerering av hjerte, og milde lesjoner i skjelettmuskulatur (Fremmerlid, 2012). Økning i genuttrykk av SOCS1, SOCS2 og CISH i hjerte, gjeller og hodenyre ble målt med RT-qPCR, og sammenlignet med nivået i ubehandlet kontrollfisk (figur 5). Alle SOCSene viste generelt lavt uttrykk ($C_q > 27$) i både infisert og uinfisert fisk (appendix IV). Største endringer i uttrykket av samtlige gener ble observert i hjerte.



Figur 5: Relativ økning i genuttrykk av SOCS1, SOCS2 og CISH i hjerte, gjelle, hodenyre etter *in-vivo* infeksjon av laks med SAV3. Frisk, uvaksinert fisk ble utsatt for en kohabitant smittemodell med SAV3. Hjerte, gjeller og hodenyre ble tatt ut ved 17, 21, 28 og 35 dager etter smitte. Forandring i genuttrykk ble målt med RT-qPCR i forhold til ubehandlet kontroll. Søylene viser gjennomsnittverdier \pm standardavvik ($n=8$).

For SOCS1 ble det observert en økning av uttrykk i hjerte etter 21 dpi, som holdt seg til 28 dpi og deretter gikk noe ned ved 35 dpi. En liten økning ble observert i gjelle og hodenyre i løpet av infeksjonen etter 21, 28 og 35 dpi. SOCS2 og CISH viste samme mønster i endring av genuttrykk, men induksjonen var mindre enn i hjertet. For begge genene ble det observert en økning i hjerte etter 17 dpi og 35 dpi, mens ved 28 dpi var uttrykket det samme som for kontrollfisken. I de andre organene var det en nedgang i genuttrykket av SOCS2 og CISH ved samtlige tidspunkter i den SAV-infiserte fisken.

Absolutt RT-qPCR for deteksjon av SAV3nsP1 RNA i organene viste generelt høy prevalens av virus i hjerte, mens lavere prevalens ble observert i gjeller, og hodenyre (appendix V). I hjerte økte prevalensen av virus RNA fra første påvisning ved 21 dpi til 35 dpi. En lavere økning ble observert i gjeller i samme tidsrom. Prevalensen av virus i hodenyre holdt seg lav gjennom hele perioden. SAV3 RNA ble ikke detektert i en sammensatt prøve fra materiale fra ikke-infisert kontroll fisk (H. L. Thim, personlig meddelelse). Prevalens av virus viste store individuelle variasjoner, samtidig som figur 5 viser at det er stor individuell variasjon i uttrykk av SOCSene. Variasjonen i SOCS-uttrykket er spesielt synlig ved SOCS1 nivået i hjerte ved 21 dpi, hvor to individer i gruppen viste en økning i SOCS1 uttrykket, mens SOCS1 nivået for resten av gruppen var uforandret (appendix VI). De samme individene viste høy prevalens av virus RNA i hjerte i motsetning til resten av gruppen (appendix V). Dette indikerer en sterk sammenheng mellom virusprevalens og SOCS-uttrykk, og en Spearman test som inkluderte alle tidspunktene viste en signifikant sammenheng mellom økende virusnivå og økende SOCS1-uttrykk ($r = 0,48$, $p \leq 0,01$, $n = 29$).

3.3 SOCS-uttrykk i TO-celler infisert med SAV3 og IPNV

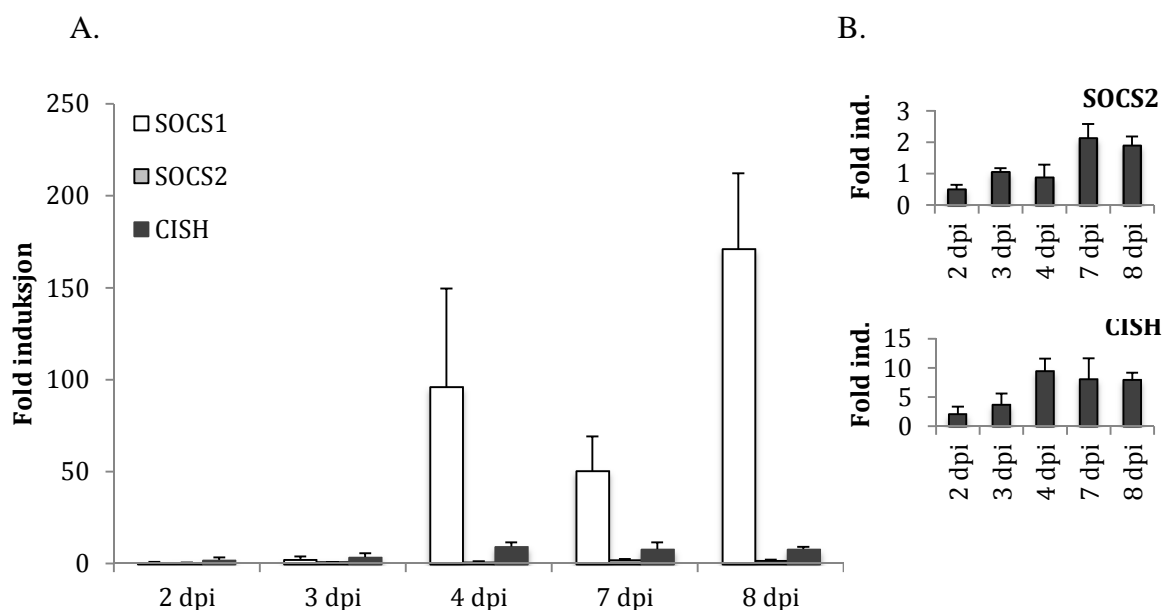
For å undersøke SOCS-responsen ved en virusinfeksjon i celler, ble TO-celler infisert med SAV3 og IPNV. SAV3 har tidligere vist seg å indusere uttrykk av IFN I og ISG'er som f.eks. Mx (Xu *et al.*, 2012), mens en etablert IPNV infeksjon har vist seg å hemme IFN-responser (Skjesol *et al.*, 2009). Det var derfor interessant å undersøke hvordan SOCSene, spesielt SOCS1, som ISG og hemmer av IFN-induserte signalveier, uttrykkes som følge av infeksjon med disse to virusene.

TO-celler ble infisert med virus, SAV3 (MOI=2) og IPNV (MOI=1 og MOI=10) og høstet ved henholdsvis 2, 3, 4, 7 og 8 dager for SAV3 og 24, 48, 72 og 120 timer for IPNV.

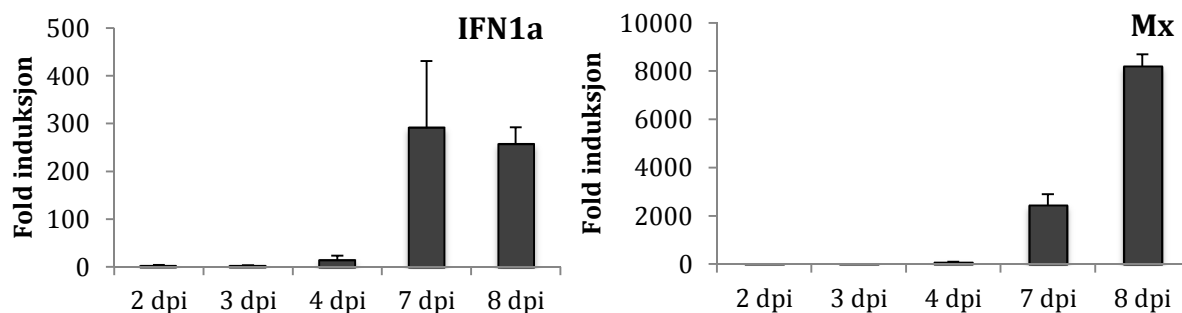
Parallelt med IPNV forsøket ble TO-celler stimulert med polyI:C (1 µg/ml) som positiv kontroll. Økning i genuttrykk av SOCS1, SOCS2, CISH, IFN1a og Mx ble målt med RT-qPCR i forhold til ubehandlede kontrollceller.

3.3.1 Infeksjon med SAV3

Etter infeksjon med SAV3 (figur 6) er det uttrykket av SOCS1 mRNA som viste størst endringer i løpet av infeksjonen. Etter 4 dager ga SOCS1 den mest markante økningen til 95x økning og øker til dag 8 til 170x økning med liten nedgang ved dag 7 til 50x økning. SOCS2 var stort sett uendret med en liten økning ved dag 7 og 8. CISH økte sakte fra dag 2 til maksimum på 9x økning ved dag 4 og gikk deretter ned til 8x økning ved dag 8. For å påvise en respons på virusinfeksjonen ble uttrykket av IFN1a og Mx målt med RT-qPCR i forhold til ubehandlede kontrollceller. Etter infeksjon med SAV3 (figur 7) begynner IFN1a uttrykket å øke ved dag 4 og øker brått til 290x etter dag 7 og går noe ned ved dag 8 til 256x. Mx begynner å øke ved dag 4 til 69x, og fortsetter å øke til dag 7 og dag 8 til henholdsvis 2400x og 8200x.



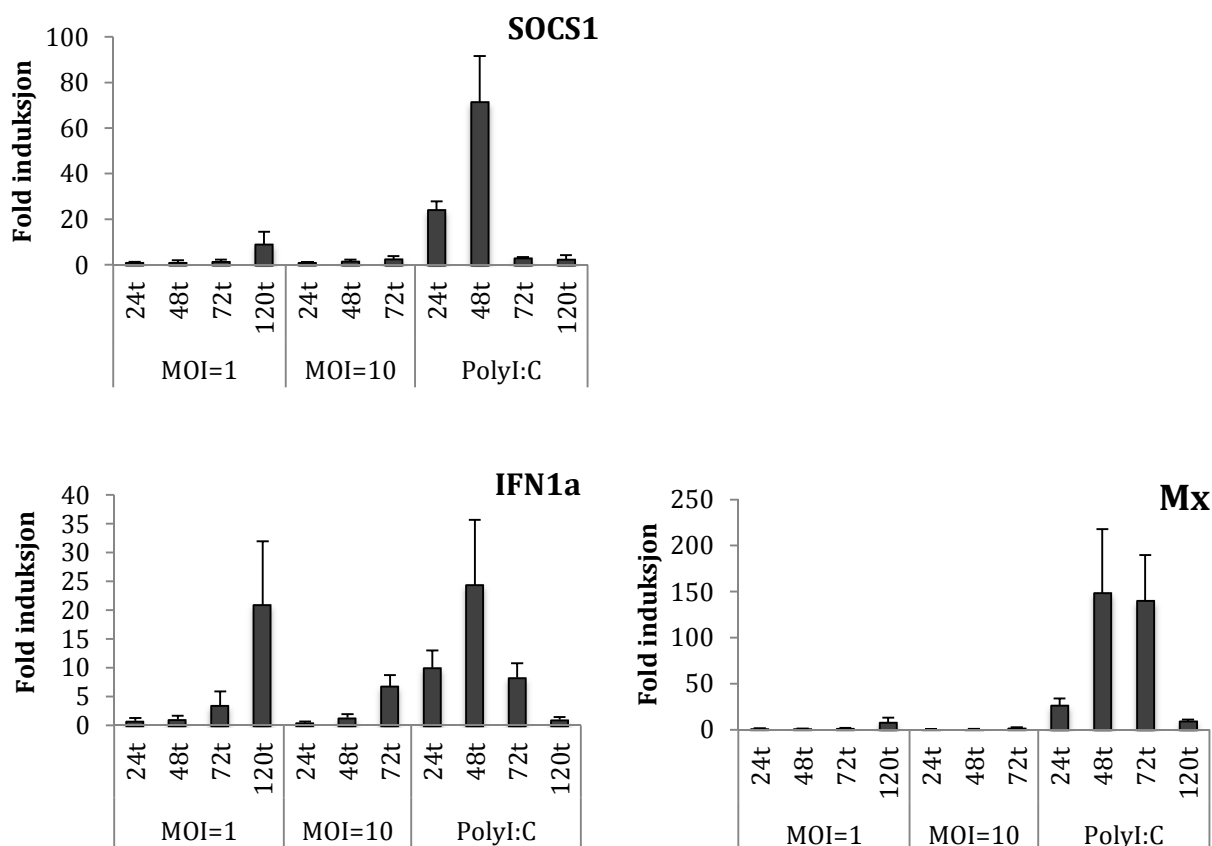
Figur 6: Relativ økning i genuttrykk av SOCS1, SOCS2 og CISH i TO-celler etter *in-vitro* smitte med SAV3. TO-celler ble smittet med SAV3 (MOI=2) i 2, 3, 4, 7 og 8 dager. A) økning i SOCS1, SOCS2 og CISH nivå. B) økning i SOCS2 og CISH nivå med utvidet y-akse. Forandring i genuttrykk ble målt med RT-qPCR i forhold til ubehandlet kontroll. Søylen viser gjennomsnitt ± standardavvik (n=3).



Figur 7: Relativ økning i genuttrykk av IFN1a og Mx i TO-celler etter *in vitro* smitte med SAV3. TO-celler ble smittet med SAV3 (MOI=2) i 2, 3, 4, 7 og 8 dager. Forandring i genuttrykk ble målt med RT-qPCR i forhold til ubehandlet kontroll. Søylene viser gjennomsnitt ± standardavvik (n=3).

3.3.2 Infeksjon med IPNV

Etter infeksjon med IPNV (figur 8) kunne det ikke observeres noen endring i SOCS1 mRNA uttrykket, med unntak av MOI=1 ved 120 timer, hvor det var en 9x økning. MOI=10 ved 120 timer er ikke representert, siden det ikke kunne ekstraheres RNA ved tidspunktet. Utstrakt CPE ble observert i mikroskop ved dette tidspunktet med MOI=10. Uttrykket av IFN1a ved MOI=1 viste en liten økning etter 72 timer og økte videre ved 120 timer (totalt 21x). Ved MOI=10 kunne det observeres en beskjeden økning i IFN1a uttrykket (7x). Uttrykket av Mx viste ingen endring med unntak av MOI=1 ved 120 timer (8x økning). Uttrykket av samtlige gener økte etter stimulering med polyI:C, hvilket indikerer at cellene responderer normalt, og derfor sannsynligvis også har respondert på smitten.

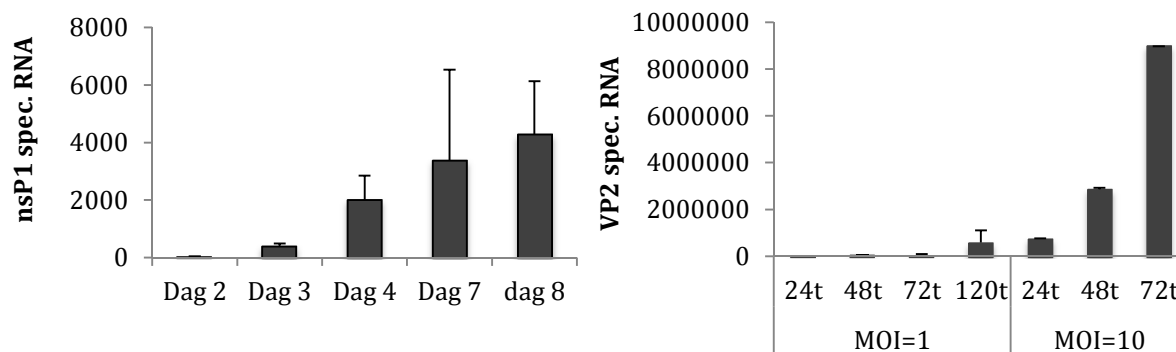


Figur 8: Relativ økning i genuttrykk av SOCS1, IFN1a og Mx i TO-celler etter IPNV infeksjon eller polyI:C behandling. TO celler ble smittet med IPNV (MOI=1 og MOI=10) eller stimulert med polyI:C (1 µg/ml) i 24, 48, 72 og 120 timer. Forandring i genuttrykk ble målt med RT-qPCR i forhold til ubehandlet kontroll. Søylen viser gjennomsnittverdier ± standardavvik fra (n=3). NB: MOI=10 ved 120 timer er ikke representert siden det ikke kunne ekstraheres RNA ved tidspunktet pga. CPE.

3.3.3 Måling av SAV3 nsP1 og IPNV VP2 ved absolutt kvantitativ real-time PCR

Absolutt RT-qPCR ble utført for å observere om infeksjonen var vellykket og om virus replikerer i cellene i løpet av infeksjonsforløpet. Figur 9 viser at etter både SAV3 og IPNV infeksjon er virus tilstede ved første tidspunkt, med henholdsvis 10.800 nsP1- og 753.000 VP2 spesifikt RNA. Antallet transkripter øker videre utover i begge infeksjonsforløpene, og størst antall transkripter observeres ved siste prøvetidspunkt med henholdsvis 584.600 nsP1 og 8.945.600 VP2 transkripter. Påvisning av transkripter ved første prøvetidspunkt, og økningen utover i infeksjonsforløpet, tilsier at infeksjonen er vellykket og at virus replikerer i cellene. Intet SAV eller IPNV RNA ble detektert i noen av de ikke infiserte kontroll cellene.

Resultater



Figur 9: Økning i mengden nsP1 og VP2 spesifikt RNA i TO-celler etter infeksjon med henholdsvis SAV3 og IPNV. TO-celler ble smittet med SAV3 (MOI=2) i 2, 3, 4, 7 og 8 dager eller med IPNV (MOI=1 og MOI=10) i 24, 48, 72 og 120 timer. Antall nsP1 og VP2 transkripter ble målt med real-time PCR og kvantifisert ut fra tillaget standardkurve. Søylene viser gjennomsnittsverdier \pm standardavvik fra (n=3). Kvantifisering av nsP1 ved MOI=10 ved 120 timer er ikke representert, siden det ikke kunne ekstraheres RNA ved tidspunktet pga. CPE.

En Spearman test ble kjørt for å bestemme en eventuell monoton sammenheng mellom mengden virus og endring i genuttrykket (tabell 4). Etter infeksjon med SAV3 viser SOCS1 og Mx en signifikant positiv sammenheng med økning i nsP1 transkripter, og etter infeksjon med IPNV viser SOCS1, IFN1a og Mx en signifikant positiv sammenheng med antall VP2 transkripter. Korrelasjons-koeffisienten viser styrken av den positive sammenheng, dvs. høyere koeffisient gir sterkere positiv sammenheng mellom variablene.

Tabell 4: Sammenhengen mellom virusmengden i cellene og økning i genuttrykket testet med en Spearman test. Korrelasjonskoeffisient angir styrken av sammenhengen og p-verdien bestemmer signifikansen av sammenhengen.

	Korrelasjons koeffisient	Signifikans (P-verdi)
SAV3 – nsP1 (n=15)		
SOCS1	0,714	< 0,05
SOCS2	0,489	> 0,05
CISH	0,371	> 0,05
IFN1a	0,485	> 0,05
Mx	0,7761	< 0,001
IPNV – VP2 (n=21)		
SOCS1	0,620	< 0,05
IFN1a	0,855	< 0,001
Mx	0,560	< 0,05

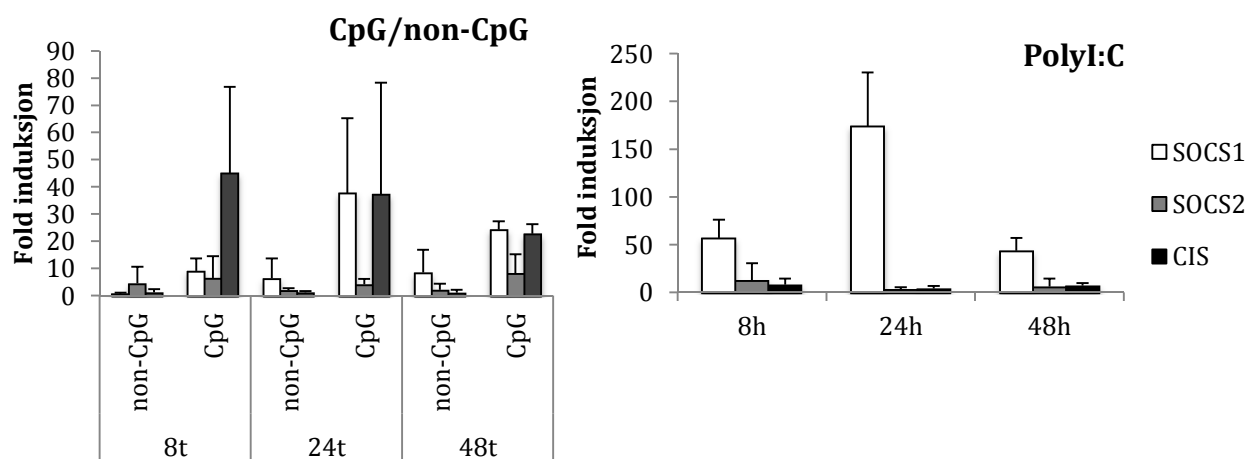
3.4 SOCS uttrykk i leukocytter isolert fra atlantisk laks.

Primærceller vil i utgangspunktet være bedre modeller å undersøke cellulære responser enn etablerte cellelinjer som f.eks. TO-celler, siden de i større grad vil reflektere en *in vivo* respons. Derfor benyttet vi leukocytter fra hodenyre hos atlantisk laks, og disse ble stimulert med ulike immunostimulanter for videre å studere den følgende SOCS-responsen. Leukocytter ble isolert fra hodenyre fra frisk, uvaksinert atlantisk laks ved sentrifugering av celleduspensjon gjennom en 25 % / 54 % diskontinuerlig Perkoll gradient. Cellene ble sådd ut og stimulert *in vitro*, og deretter ble forandring i genuttrykk ble målt med RT-qPCR.

3.4.1 Etterligning av virusinfeksjon

Formålet med dette forsøket var å observere endringer i SOCS-uttrykket som følge av stimulering med polyI:C eller CpG, som simulerer infeksjoner med ulike typer virus. Leukocytter ble derfor behandlet med CpG (2006T) (2 μ M), nonCpG (2007) (2 μ M) og polyI:C (2 μ g/ml) i 8, 24 og 48 timer. Figur 10 viser, at etter stimulering med CpG økte CISH uttrykket raskt etter 8 timer (45x) og gikk gradvis ned i løpet av 48 timer (23x). SOCS1 økte ved 8 timer (9x) til et maksimum ved 24 timer (40x) og gikk deretter noe ned ved 48 timer (24x økning). SOCS2 viste en svak men jevn oppregulering ved alle tidspunkter (rundt 6x). Stimulering med non-CpG som kontroll viste stort sett uendret SOCS-genuttrykk, men en oppregulering av SOCS1 på 6x og 8x kunne observeres ved henholdsvis 24 og 48 timer. En svak oppregulering av SOCS2 på 3x kunne observeres ved alle tidspunkter. Uttrykket av CISH i leukocytene var i utgangspunktet svært lavt ($C_q > 36$), sammenlignet med uttrykket av SOCS1 som var litt høyere (C_q 31-34) (appendix IV). Økningen i CISH-uttrykket etter stimulering med CpG gjenspeiler derfor ikke en større kvantitativ økning i CISH sammenlignet med SOCS1.

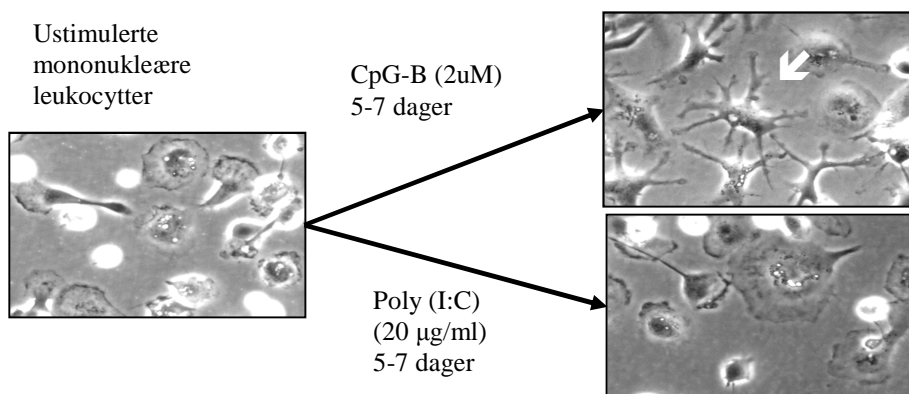
Etter stimulering med polyI:C (figur 10) viste SOCS1 største økning i uttrykk, og nivået gikk fra en økning fra 57x ved 8 timer til maksimum på 178x ved 24 timer hvoretter det går ned til 41x ved 48 timer. SOCS2 og CISH viste en lavere økning ved 8 timer på 13x og holdt seg deretter stabilt lave i løpet av forsøksperioden.



Figur 10: Relativ økning i genuttrykk av SOCS1, SOCS2 og CIS i leukocytter isolert fra hodenyre etter stimulering *in vitro* med CpG, non-CpG og polyI:C. Leukocytter ble isolert fra hodenyre fra frisk, uvaksinert fisk og sådd ut og stimulert *in-vitro* med CpG (2006T) (2 μ M), nonCpG (2007) (2 μ M) og PolyI:C (2 μ g/ml) i 8, 24 og 48 timer. Forandring i genuttrykk ble målt med RT-qPCR i forhold til ubehandlet kontroll. Søylen viser gjennomsnittsverdier \pm standardavvik fra (n=3).

3.4.2 Differensiering av dendritiske celler

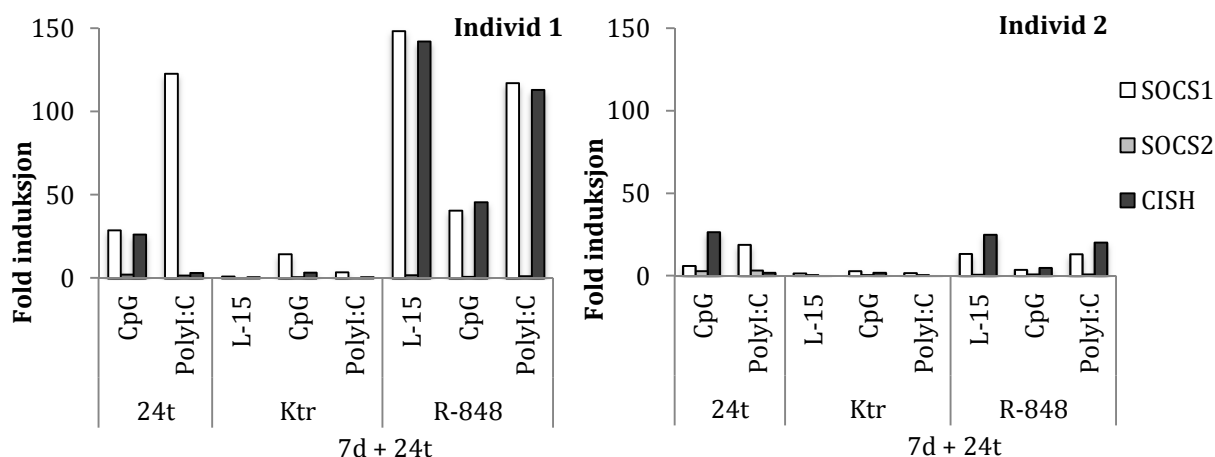
Adherente celler fra fornyre er vist å differensiere til celler med DC karakteristika etter 5-7 dagers stimulering med CpG, men ikke etter stimulering med PolyI:C (Iliev, upublisert). Formålet med dette forsøket var å undersøke SOCS-uttrykket i adherente mononukleære leukocytter som har vært forbehandlet med nevnte TLR-ligander, og som etter 7 dager i kultur ble stimulert med TLR 7/8 liganden R-848, som etterligner en virusinfeksjon. Leukocytter ble derfor først stimulert med CpG (2006T) (2 μ M) og polyI:C (2 μ g/ml) i 24 timer og 7 dager. Etter prestimulering med CpG og polyI:C ble cellene observert i mikroskop, og celler med DC karakteristika kunne observeres de CpG stimulerte cellene (Figur 11). Etter 7 dager ble cellene restimulert med R 848 (1 μ g/ml) i 24 timer. Samtlige resultater er normalisert mot ustimulerte kontrollceller kun tilsatt L-15, ved 24 timer.



Figur 11: adherente mononukleære celler differensierer til celler med DC karakteristika etter behandling med CpG. Bilde av ustimulerte mononukleære leukocytter stimulert med CpG (2 μ M) og polyI:C (20 μ g/ml) i 7 dager. Pilen indikerer en typisk DC-liknende celle etter CpG stimulering. Figur vennligst utlånt av D. Iliev.

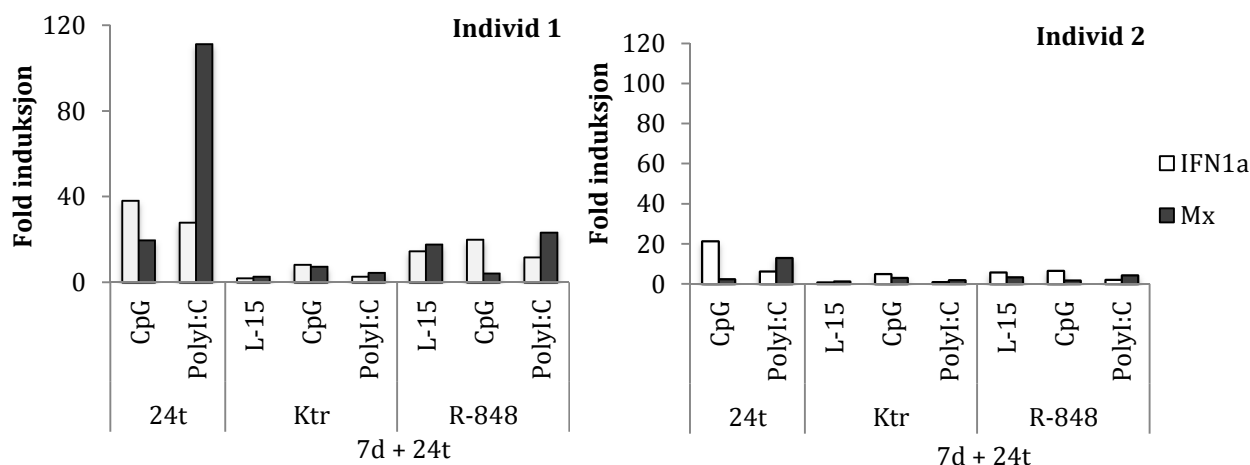
Forsøket ble utført med primærceller fra bare to individer. Individene viste stor variasjon i respons på stimuleringen, og resultatene er derfor fremstilt for hvert individ. Figur 12 og 13 viser at individ 1 generelt utviste større respons på stimuleringen, mens individ 2 viste en lavere respons. Likevel kunne de samme mønstrene i økning av nivået av SOCSene, IFN1a og Mx observeres hos de to individene, både ved prestimulering med CpG og polyI:C. Etter stimulering med CpG viser SOCS1 og CISH en liten økning ved 24 timer, mens SOCS2 holdt seg uendret. Etter 7 dager og restimulering med R-848 viste cellene kun tilsatt L-15 en kraftig økning i SOCS1 og CISH uttrykk, spesielt hos individ 1. En lavere økning kunne observeres i cellene som ble prestimulert med CpG, og spesielt for SOCS1 var nivået høyere sammenlignet med kontroll og polyI:C stimulerte celler ved samme tidspunkt. SOCS2 uttrykket var nedregulert i alle kontrollceller og i celler som var prestimulert med CpG. Figur 13 viser at etter restimulering med R-848, ble både IFN og Mx oppregulert i celler som kun var tilsatt L-15, mens celler prestimulert med CpG viste en liknende økning i IFN, men mindre økning i Mx. Det bør likevel bemerkes at det er en moderat økning av både IFN og Mx i kontrollcellene stimulert med CpG.

Resultater



Figur 12: Relativ økning i genuttrykk av SOCS1, SOCS2 og CISH i adherente mononukleære leukocytter isolert fra hodenyre etter stimulering med CpG eller polyI:C og restimulering med R 848. Leukocytter ble isolert fra hodenyre fra frisk, uvaksinert fisk som beskrevet i M&M. Cellene ble sådd ut og stimulert *in vitro* med CpG (2006T) (2 μ M) eller polyI:C (2 μ g/ml), i 24 timer og 7 dager. Kontrollceller ble holdt ubehandlet kun tilsatt L-15. Etter 7 dager ble prestimulerte celler samt ikke-prestimulerte kontroll celler, restimulert med R 848 (1 μ g/ml) i 24 timer. Forandring i genuttrykk ble målt med RT-qPCR i forhold til ubehandlet kontroll ved 24 timer.

Etter stimulering med polyI:C økte uttrykket av SOCS1, IFN1a og Mx etter 24 timer, hvor størst økning kunne observeres for SOCS1 og Mx. Ved restimulering med R-848 kunne en økning i uttrykket av SOCS1 og CISH observeres, mens uttrykket av SOCS2 var uendret. Restimuleringen viste også en liten økning i IFN1a og Mx uttrykk i både celler som kun ble tilsatt L-15 og i celler som ble prestimulert med polyI:C.



Figur 13: Relativ økning i genuttrykk av IFN1a og Mx i adherente mononukleære leukocytter isolert fra hodenyre etter stimulering med CpG eller polyI:C og restimulering med R 848. Leukocytter ble isolert fra hodenyre fra frisk, uvaksinert fisk som beskrevet i M&M. Cellene ble sådd ut og stimulert *in vitro* med CpG (2006T) (2 μ M) eller polyI:C (2 μ g/ml), i 24 timer og 7 dager. Kontrollceller ble holdt ubehandlet kun tilsatt L-15. Etter 7 dager ble prestimulerte celler samt ikke-prestimulerte kontroll celler, restimulert med R 848 (1 μ g/ml) i 24 timer. Forandring i genuttrykk ble målt med RT-qPCR i forhold til ubehandlet kontroll ved 24 timer.

3.5 Etablering av CHSE celler som uttrykker transgen SOCS1 og SOCS2 fra laks

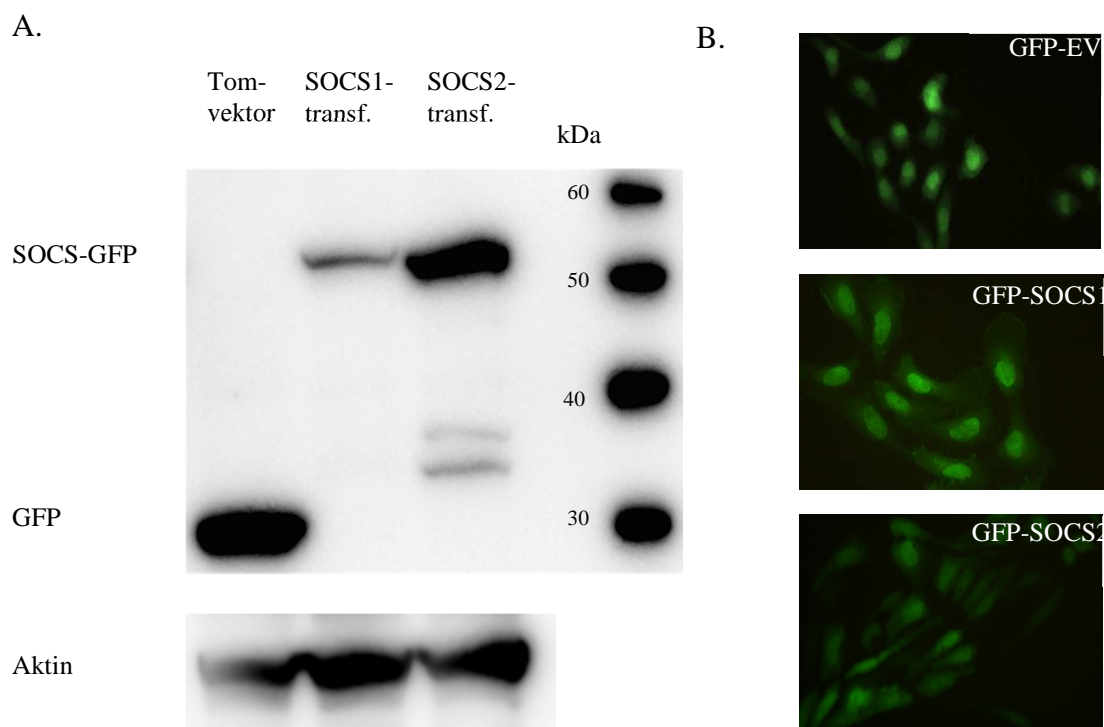
Stabilt transfekterte cellelinjer er viktige verktøy for å studere funksjoner til spesifikke gener og proteinene de koder for. En cellelinje som overuttrykker SOCS1 og SOCS2 vil kunne vise i hvilken grad disse proteiner bidrar i reguleringen av ulike cytokin-induserte signalveier. Formålet med dette forsøket var derfor å etablere to cellelinjer som stabilt overuttrykker SOCS1 eller SOCS2. CHSE celler ble transfektert med eukaryote ekspresjonsvektorer med SOCS1 eller SOCS2 genene koblet til GFP-tag. Cellene ble ko-transfektet med antibiotika-resistens plasmid, for å ha en selekterbar markør, og celler som uttrykker resistensen ble selektert ved dyrkning av cellene over tid i medium tilsatt antibiotika. Celler som er kompetente for å ta opp plasmid, tar gjerne opp flere, som gjør det sannsynlig at vi også vil selektere for celler som uttrykker begge plasmidene.

3.5.1 Etablering av cellelinjer stabilt transfektert med SOCS1 og SOCS2

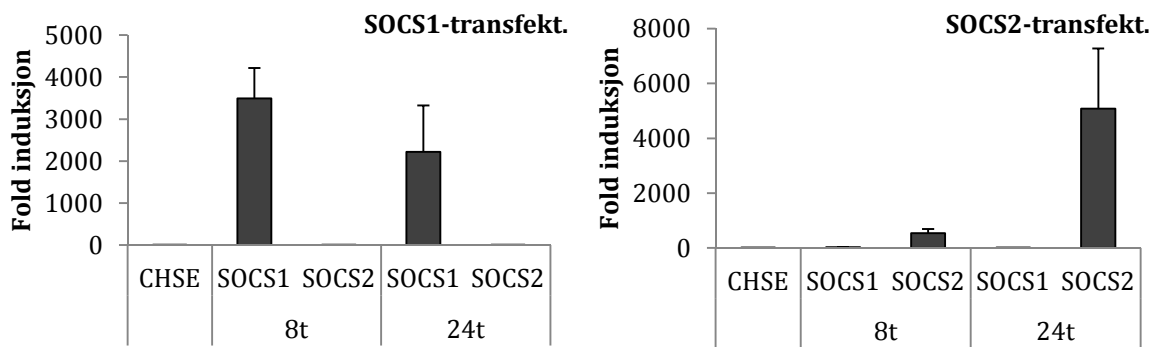
Cellene ble observert under fluorescens mikroskop i løpet av seleksjonsperioden, og tilstedeværelsen av grønn fluorescens indikerte at cellene uttrykte resistensvektoren. GFP-tagen ble også brukt til å sortere bort celler som bare var transfektet med resistensvektoren og ikke uttrykker GFP. For å undersøke om det GFP-konjugerte SOCS proteinet uttrykkes i cellene, ble cellelysate høstet fra cellene og Western Blotting med anti-GFP antistoff utført. I dette forsøket ble også celler kun transfektet med GFP-tomvektor inkludert, fordi vi ønsker å bruke denne som negativ kontroll i videre eksperimenter. I tillegg ble et anti-aktin antistoff brukt som intern "loading"-kontroll. Figur 14 viser at GFP-protein blir uttrykt i både de SOCS1 og SOCS2 transfektet cellene sammenlignet med de SOCS1-transfektet, samtidig som de to cellelinjene har omtrent samme aktin-uttrykk. Cellene transfektet med kun tomvektor viser høyere uttrykk av transgent plasmid sammenlignet med de som uttrykker SOCS1-plasmidene. Disse cellene kan brukes som negativ kontroll ved fremtidige forsøk med cellelinjene. Teoretisk størrelse på SOCS proteinene ble beregnet ved hjelp av http://web.expasy.org/compute_pi/, som gir en størrelse på 25,2 kDa for SOCS1 og 22,5 kDa SOCS2a. Sammen med forventet størrelse på GFP-tomvektor på 27 kDa stemmer dette med båndene som observeres i figur 14 ved 52,2 kDa for SOCS1 og 49,5 kDa for SOCS2.

For å bekrefte at cellene uttrykte det transfektet gen, ble celler sådd ut og høstet etter 8 og 24 timer, hvoretter genuttrykket ble målt med RT-qPCR. Figur 15 viser at de SOCS1-transfektet cellene har mye høyere SOCS1 uttrykk enn ikke-transfektet CHSE-celler,

mens SOCS2-uttrykket er uendret i disse cellene. Cellene som var stabilt transfekterte med SOCS2 viste tilsvarende mye høyere SOCS2-uttrykk sammenlignet med ikke-transfektete CHSE-celler og celler transfektert med SOCS1.



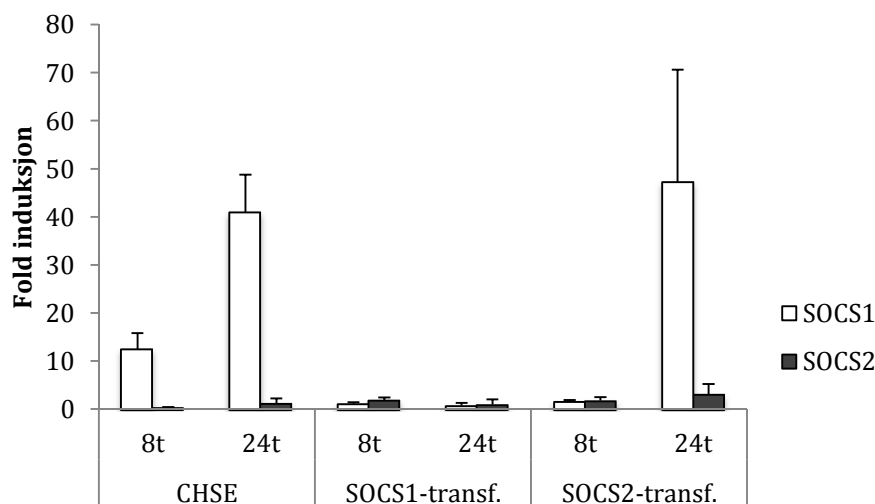
Figur 14: Proteinuttrykk i celler transfektert med SOCS1- eller SOCS2-GFP vektorer eller tom-GFP. Ekspresjonsvektorer med SOCS1, SOCS2 eller tomvektor (25mg) og pBABEpuro (125mg) ble ko-transfektet i CHSE-214 celler ved hjelp av Lipofectamin®. Stabilt transfektete celler ble selektert med puromycin og sortert ved hjelp av GFP-tag. A) Proteinuttrykk i cellene ble målt med western blott. MagicMark® ladder viser størrelse på proteinene. B) Grøn fluorescens indikerer graden av genuttrykk i celler transfektert med tomvektor (EV), SOCS1 og SOCS2.



Figur 15: Relativ økning i genuttrykk av SOCS1 og SOCS2 i celler stabilt transfektert med SOCS1 eller SOCS2. Ekspresjonsvektorer med SOCS1 eller SOCS2 (25mg) og pBABEpuro (125mg) ble ko-transfektet i CHSE-214 celler ved hjelp av lipofectamin®. Stabilt ko-transfektete celler ble selektert med purmycin og sortert ved hjelp av GFP-tag. Celler ble sådd ut i 24-brønners Brett med tetthet på 200.000 celler/brønn og høstet etter 8 og 24 timer. Forandring i genuttrykk ble målt med RT-qPCR i forhold til ubehandlede CHSE-celler ved de to tidspunktene. Søylene viser gjennomsnittsverdier \pm standardavvik fra

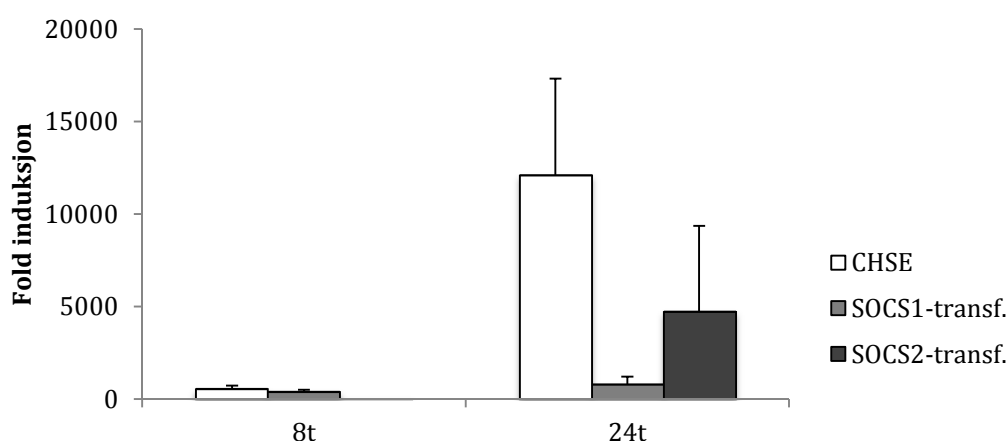
3.5.2 Stimulering av stabilt transfektete celler med IFN1a

Siden SOCSene er hemmere av cytokin-induserte signalveier kan det forventes at overuttrykk av disse i stor grad vil blokkere signalveiene. Formålet med dette forsøket var derfor å stimulere de transfektete cellene, som tidligere er påvist å overuttrykke SOCS, med IFN1a og observere om dette gir noen endring i antivirale responser i cellene. Stabilt transfektete celler ble sådd ut og stimulert med IFN1a (500U/ml) i 8 og 24 timer, hvoretter endring i genuttrykk ble målt med RT-qPCR. Figur 16 viser at IFN1a stimulerer SOCS1 uttrykket i CHSE-cellene og de SOCS2-transfektete, mens SOCS1 uttrykket i de SOCS1-transfektete er uendret. SOCS2 uttrykket i alle cellene er i liten grad uendret etter stimulering med IFN1.



Figur 16: Relativ økning i genuttrykk av SOCS1 og SOCS2 i CHSE-celler transfektert med SOCS1- eller SOCS2-GFP etter stimulering med IFN1a. Ekspresjonsvektorer med SOCS1 eller SOCS2 (125µg) og pBABEpuro (25µg) ble ko-transfektet i CHSE-214 celler ved hjelp av Lipofectamin®. Stabilt ko-transfektet celler ble selektert med puromycin og sortert ved hjelp av GFP-tag. Celler ble sådd ut i 24-brønners Brett med tetthet på 200.000 celler/brønn og stimulert med IFN1a (500 U/ml) dose i 8 og 24 timer. Forandring i genuttrykk ble målt med RT-qPCR i forhold til ubehandlede kontroll ved de to tidspunktene. Søylen viser gjennomsnittsverdier ± standardavvik (n=3).

Figur 17 viser økning i Mx-uttrykk etter stimulering med IFN1a. Endringene ses først etter 24 timer, og de største endringene kan observeres i CHSE- og de SOCS2- transfektete cellene, hvor Mx-uttrykket øker til henholdsvis 12.000x og 4700x. Mx-uttrykket i de SOCS1- transfektete øker i mye mindre grad (800x).



Figur 17: Relativ økning i Mx-transkripter i CHSE-celler transfektert med SOCS1 eller SOCS2 og ikke transfektete kontroll celler etter stimulering med IFN1a. Ekspresjonsvektorer med SOCS1 eller SOCS2 (125µg) og pBABEpuro (25ug) ble ko-transfektet i CHSE-214 celler ved hjelp av lipofectamin®. Stabilt ko-transfektet celler ble selektert med puromycin og sortert ved hjelp av GFP-tag. Celler ble sådd ut i 24-brønners Brett med tetthet på 200.000 celler/brønn og stimulert med IFN1a (500 U/ml) i 8 og 24 timer. Forandring i genuttrykk ble målt med RT-qPCR i forhold til ubehandlede kontroll ved de to tidspunktene. Søylen viser gjennomsnittsverdier ± standardavvik (n=3).

4. Diskusjon

Virussykdommer regnes i dag som en av de største hindringene for at oppdrettsnæringen, som er en av Norges viktigste og største næringer skal kunne vokse enda mer, og være med til å dekke det økende behovet for sunn sjømat på verdensbasis. Samtidig har det stor betydning ut fra et fiskevelferdseperspektiv å få kontroll på sykdomssituasjonen. Virusvaksinene som finnes i dag er ikke effektive nok, og det er derfor et stort behov for å forbedre disse, eller på andre måter styrke fiskens beskyttelse mot virus. Å løse disse utfordringene forutsetter en bedre forståelse av fiskens immunsystem, og det samspillet som skjer mellom immunforsvaret og virus etter en infeksjon. SOCS-proteinene, som regulerer IFN-responser er viktige proteiner i denne sammenheng, og det er foreslått at virus ”utnytter” SOCSene for å unngå vertens virusforsvar (Akhtar and Benveniste, 2011). SOCS1 og SOCS3 er i større grad enn de andre SOCSene knyttet til regulering av IFN-responser (Alexander, 2002, Croker *et al.*, 2008, Linossi *et al.*, 2013), og er derfor interessante i forbindelse med virusinfeksjoner. Jorunn Jørgensens forskningsgruppe har nylig klonet SOCS1, SOCS2 og CISH fra atlantisk laks, og funksjonelle studier viser at SOCS1 hos fisk har en lignende funksjon som hos pattedyr (Skjesol *et al.*, 2014, Nie *et al.*, 2014). Det er derfor sannsynlig at SOCS1 hos laks, som hos pattedyr, også er et protein som virus kan utnytte til egen fordel. Dette gjør det interessant å studere SOCS1 sin rolle ved virusinfeksjoner i laks.

4.2 Normalfordistribusjon av SOCS-mRNA

Uttrykket av SOCS1, SOCS2 og CISH i frisk uvaksinert laks viste at SOCSene var tilstede og jevnt uttrykt i alle organer som ble undersøkt. At SOCSene generelt blir uttrykt i ulike organer er også vist hos regnbueørret og delvis hos *Tetraodon nigroviridis* (Wang *et al.*, 2011). Hos tetraodon ble CISH ikke påvist i milt og tarm og SOCS2 ble bare påvist i enkelte organer (Jin *et al.*, 2008). Våre resultater viste også at SOCS1 og SOCS2 viser høyere uttrykk i tarm, hodenyre, baknyre tarm og thymus (bare SOCS1) og gjelle (bare SOCS2), og indikerer at SOCS1 og SOCS2 har viktige funksjoner i de immunologiske organene hos fisk. Spesielt SOCS1 er knyttet til en antiviral immunrespons, og et basalt nivå av SOCS1 i immunologisk viktige organer er forventet. Pattedyr SOCS1 er vist å være mest uttrykt i thymus, og reflekterer den viktige rollen til SOCS1 i regulering av T-celle modning (Starr *et al.*, 1997). Resultatene våre kan derfor indikere en lignende rolle for SOCS1 hos laks.

Nivåene av CISH var høyest i hjerte og muskel, som ikke regnes som direkte immunologiske organer. CISH knyttes i hovedsak til regulering av STAT5-medierte signalspor, og fire bindingssteder for STAT5 er påvist i CISH-promotoren (Matsumoto *et al.*, 1997, Verdier *et al.*, 1998). CISH er dermed involvert i hemming av blant annet IL-2, som stimulerer differensiering av effektor T-celler. Samtidig er CISH også vist å bidra i regulering av andre typer responser, for eksempel veksthormoner, EPO og leptin, som ikke direkte er knyttet til immunologiske responser (Ihle, 2001, Lavens *et al.*, 2006). En regulerende rolle utenom immunsystemet i forbindelse med de ovenfor nevnte hormoner er derfor ikke usannsynlig.

SOCS2 knyttes hovedsakelig til regulering av veksthormoner, og aktivering av veksthormonreseptorer aktiverer STAT5b, som videre direkte binder STAT5b-bindings steder i SOCS2 promotoren (Vidal *et al.*, 2007). Aktivering via flere cytokiner er også beskrevet, og SOCS2 er derfor også involvert i regulering av en rekke signalveier utenom immunsystemet tilsvarende CISH (Rico-Bautista *et al.*, 2006). SOCS2 er likevel nylig blitt knyttet direkte til immunologiske responser, og er vist og induseres etter stimulering med LPS via IRF3/7 og type I IFN signalering. Type I IFN responser førte til økt SOCS2 transkripsjon via STAT3 og STAT5. Samme studie foreslo at SOCS2 initieres relativt seint som følge av IFN I aktivering (Hu *et al.*, 2012). SOCS2 er i midlertid ikke i stand til å hemme IFN-signalering direkte (Song and Shuai, 1998), men er heller foreslått å regulere andre SOCSer, og er vist å kunne degradere SOCS1 (Piessevaux *et al.*, 2006). En sein SOCS2-respons som beskrevet av Hu *et al.* (2012) kan derfor være en mekanisme for å redusere hemmende effekt av andre SOCSer, deriblant SOCS1 i cellene, og gjendanne normale tilstander, hvor cellen kan respondere optimalt på IFN-signalering.

Siden våre resultater viser, at det finnes et basalt uttrykk av SOCS i alle organer i frisk, uvaksinert atlantisk laks, er det grunn til å tro at SOCSene er viktige regulatoriske proteiner i alle organer. At enkelte SOCSer har et høyere uttrykk i enkelte organer kan reflektere at SOCSene regulerer ulike cytokin-medierte biologiske funksjoner i ulike organer. Det må likevel tas i betraktning, at SOCS-uttrykket hos fisk, både basaluttrykket og som følge av en immunreaksjon viser variasjoner mellom organer, art og kjønn (Wang and Secombes, 2008, Shepherd *et al.*, 2012, Wang *et al.*, 2011), og en generalisering er derfor upålitelig. Wang *et al.* (2011) påpeker at det ulike basaluttrykk av SOCS1 mellom regnbueørret og ørret, kan reflektere forskjeller som er observert i sykdomsmotstand imellom de to artene. Et lavt basalnivå av SOCS1 kan muligvis bidra til økt sykdomsmotstand mot virus hos enkelte arter,

og SOCS1-nivået kan derfor fungere som en markør for generell motstand hos fisken. Dette er en observasjon som er interessant å undersøke videre, og kan ha betydning for forståelsen for hvordan ulike faktorer påvirker fiskens sykdomsmotstand. For eksempel er ulike stadier av stress foreslått å påvirke basaluttrykket av enkelte SOCSer (Wang *et al.*, 2010), og siden stress øker mottakeligheten hos fisken overfor patogener (Pickering and Pottinger, 1989) kan SOCS1 spille en rolle i denne sammenheng.

4.3 Rollen til SOCS ved virusinfeksjoner

SAV og IPNV er to virus som rammer norsk lakseoppdrett, og mekanismer for å unngå fiskens antivirale forsvar er en forutsetning for en så vellykket infeksjonsstrategi. Det er kjent for både pattedyr og fisk, at virus innehar en rekke mekanismer for å unngå vertens immunforsvar (Workenhe *et al.*, 2010), og IPNV er vist å være en potent hemmer av IFN I induksjon samt induksjon av ISG hos atlantisk laks (Lauksund, 2014). Utnyttelse av SOCSene, som en mekanisme for virus å unngå vertens IFN-system er vist for en rekke virus (Akhtar and Benveniste, 2011), men hvilken betydning de har og hvordan virus utnytter SOCSene er fortsatt uklart. Resultatene i dette arbeidet kartlegger SOCS-uttrykk etter infeksjon med SAV3 og IPNV *in vitro*, samt etter infeksjon med SAV3 *in vivo*. Både *in vitro* og *in vivo* infeksjon med SAV3 viser størst endringer i SOCS1-uttrykket, mens SOCS2 og CISH bare viser moderate endringer. En økning i SOCS1 uttrykket er som forventet, siden SOCS1 regnes som et typisk ISG og induseres ved en antiviral IFN-respons (Akhtar and Benveniste, 2011).

Smitteforsøket med SAV3 viste patologiske endringer tilsvarende akutt og akutt/subakutt fase etter henholdsvis 28 og 35 dpi, som stemmer med tidligere observasjoner for kobitante smitteforsøk med SAV3 (Graham *et al.*, 2011). En økende prevalens av virus ble observert i hjertet, som er et viktig målorgan for SAV3 (McLoughlin and Graham, 2007), mens gjelle og hodenyre viste generelt lav prevalens og liten økning over tid. Prevalensen av virus økte ved 28 dpi og videre til 35 dpi, som sammenfaller med de patologiske endringene som ble observert. At prevalensen av virus sammenfaller med patologiske endringer er også vist i tidligere forsøk med SAV3 (Xu *et al.*, 2012, Graham *et al.*, 2011). SOCS1-uttrykket ble målt i tre organer hvor størst endring ble observert i hjerte. Dette sammenfaller med høy prevalens av virus, og det kunne påvises en signifikant sammenheng mellom økende virusnivå og økende SOCS1 uttrykk. Økningen av SOCS1 i hjerte sammenfaller med at det også ble

observert størst økning i Mx i hjerte (Fremmerlid, 2012). Både Mx og SOCS1 er ISGer, og de induseres som følge av en IFN-respons. ISRE er funnet i Mx-promoteren hos laksefisk (Collet and Secombes, 2001), og det er sannsynlig at et slikt element også finnes hos SOCS1 siden SOCS1-transkripsjon øker ved IFN stimulering (Skjesol *et al.*, 2014). En sammenheng mellom økning i prevalens av virus og induksjon av antivirale ISGer ble også observert av Xu *et al.* (2012). Smitteforsøk med SAV3 og IPNV *in vitro* i dette arbeidet støtter den observerte sammenheng mellom målt virusnivå og ISGer, hvor økende prevalens av begge virus viste en signifikant sammenheng med økning av SOCS1 og Mx. Både *in vivo* og *in vitro* forsøkene viser at etter SAV3 infeksjon induseres IFN, SOCS1 og Mx ved samme tidspunkt henholdsvis ved 21 dpi og dag 4, men kinetikken for SOCS1 og Mx er forskjellig i løpet av infeksjonen. Mens SOCS1 uttrykket nedreguleres *in vivo* ved 35 dpi, er Mx-uttrykket høyest ved dette tidspunktet. *In vitro* stabiliseres SOCS1 uttrykket etter økning ved dag 4 mens Mx fortsetter å øke til dag 8. Dette indikerer en nedregulering av SOCS1 *in vivo* samtidig som Mx-uttrykket opprettholdes, som viser at transkripsjonsnivået av disse to molekylene reguleres ved forskjellige mekanismer. IFN-uttrykket holder seg jevnt gjennom hele perioden, hvilket indikerer en IFN-uavhengig nedregulering av SOCS1. En nedregulering av SOCS1 kort tid etter induksjon er ikke uventet, siden SOCS1 er vist å ha kort halveringstid, og Costa *et al.* (2011) viste en nedregulering av SOCS1 allerede 6 timer etter stimulering med IL-6 i celler fra regnbueørret. Mekanismer for nedregulering av SOCS1 er så langt lite beskrevet, men enkelte studier har påpekt SOCS2 som en mulig hemmer av SOCS1 nivået (Piessevaux *et al.*, 2006). SOCS2 induseres relativt seint som følge av en IFN-respons, og kan tenkes å ha en hemmende effekt på SOCS1 som induseres tidligere (Hu *et al.*, 2012). Det ble observert en liten økning av SOCS2 seint ute i både *in vivo* og *in vitro* infeksjonen med SAV3, hvilket kan indikere at det er en sammenheng mellom økning i SOCS2 og nedgang i SOCS1 uttrykket. Men dette er meget moderate økninger, og det er uvisst om nivåene av SOCS2 i cellene er tilstrekkelige til å kunne forårsake den nedgangen som observeres for SOCS1 i disse forsøkene.

Av alle SOCSene som ble undersøkt er det tydeligvis SOCS1 som utløser størst respons ved en virusinfeksjon. Ved de tidspunktene hvor den sterkeste SOCS1 responsen observeres, ser det likevel ut til at skje en endring med SOCS2 og CISH, hvor nivået av begge nedreguleres. Faktisk er SOCS2 og CISH nedregulert ved alle tidspunkter i de immunologisk viktige organene, hodenyre og gjelle, og tilsier at også SOCS2 og CISH har en betydning i regulering av immunreaksjoner ved en virusinfeksjon. Nedreguleringen av SOCS2 kan ses i

sammenheng med den tidligere nevnte reguleringen av SOCS1, og en nedregulering av SOCS2 vil da tillate en sterkere effekt av SOCS1. CISH er rapportert å stimulere differensiering av CD4+ T-celler (Li *et al.*, 2000), og ved infeksjon av virus vil CD8+ T-celler være mer effektive. En nedregulering av CISH kan derfor tenkes å favorisere modning av CD8+ T-celler. I motsetning til dette er også vist at oppregulering av CISH i løpet av modning av dendritiske celler er viktig for cellenes evner til å aktivere CD8+ celler (Miah *et al.*, 2012). En nedregulering av CISH vil da ikke aktivere den ønskede CD8+ T-celle responsen. Siden rollen til CISH generelt er omdiskutert, er det derfor vanskelig å knytte CISH til noen av endringene som følge av virusinfeksjonen som undersøkes i dette arbeidet.

Gjennom evolusjonen har virus utviklet ulike strategier for å unngå vertens forsvar mot virus. Forsøk med SAV3 og IPNV kan tyde på at disse virusene har strategier for å unngå vertens antivirale forsvar, hvor infeksjon med SAV3 har vist å inducere en IFN-respons, mens IPNV på den andre siden ikke aktiverer vertens IFN-signalering (Xu *et al.*, 2012, Skjesol *et al.*, 2009). Virus med så ulike strategier kan være gode modeller for å studere om SOCS1 ved virale infeksjoner fungerer som en mekanisme for virus til å unngå vertens immunforsvar, eller om fungerer som en naturlig negativ feedback hemmer av IFN responser.

Etter infeksjon med SAV3 og IPNV i TO-celler kunne det observeres en økning i virus spesifikt RNA allerede ved første prøvetidspunkt, og dette indikerer at både IPNV og SAV3 begynner umiddelbart å replikere. Det er rapportert at 8-12 timer etter infeksjon med IPNV kan det detekteres viralt RNA i cellene, samtidig som de første viruspartiklene, inkludert VP2, kan detekteres (Villanueva *et al.*, 2004). Det er også vist at en full replikasjonsyklus til IPNV tar 18-24 timer i RTG2-celler, hvoretter virus skilles ut fra cellene (Malsberger and Cerini, 1965). I vårt forsøk ble celler stimulert med syntetisk dsRNA, polyI:C, som er vist å inducere IFN hos atlantisk laks (Robertsen *et al.*, 2003). En økning i IFN1a uttrykket i cellene kunne observeres etter 24 timer, og indikerer at cellene responderer umiddelbart på dsRNA. Likevel ble det i de virusinfiserte cellene ikke observert en IFN-respons etter 8-12 timer hvor Villanueva *et al.* (2004) kunne detektere viralt RNA i cellene, men først etter 72 timer. En sein IFN-respons kunne også observeres etter infeksjon med SAV3. Dette kan indikere en seinere replikasjon for virusene i TO-celler, som ikke er uventet, siden TO-celler stammer fra hodenyre hos laks (Wergeland and Jakobsen, 2001), og derfor kan tenkes å initiere en sterkere immunreaksjon mot virusene enn andre cellelinjer.

Etter IFN-responsen kunne det i de SAV3 infiserte cellene observeres en økning i både SOCS1 og Mx, mens det bare kunne observeres en meget moderat økning i SOCS1 og Mx ved 120 timer etter infeksjon med IPNV. Dette viser at SOCS1 og Mx følger samme mønster i aktivering av IFN for begge virus. En økning i SOCS-uttrykket som observeres ved SAV3 infeksjonene både *in vitro* og *in vivo* er rapportert i andre forsøk med fisk. Wang *et al.* (2011) observerte en økning i SOCS1 og SOCS3 etter infeksjon med VHSV i ørret, og Xiao *et al.* (2010) kunne påvise en økning av SOCS3 i organer som var rammet av inflammasjon etter infeksjon med SVCV hos karpe. Det er derfor interessant at det ikke kan observeres en økning i SOCS1 uttrykket etter infeksjon med IPNV i dette forsøket. Det at Mx sammen med SOCS1 heller ikke induseres, samtidig som det observeres en induksjon av IFN, er i samsvar med tidligere resultater som viser at IPNV unngår det antivirale forsvaret ved å tillate IFN-produksjon, men deretter hemmer Jak/STAT signalveien (Skjesol *et al.*, 2009). Enkelte virus er vist å kunne utnytte SOCS til å hemme Jak/STAT signalveien (Akhtar and Benveniste, 2011), men siden SOCS1 ikke oppreguleres etter infeksjon med IPNV, kan resultatene indikere at dette ikke er tilfellet med IPNV.

I disse forsøkene er det ikke utført statistiske analyser på datasettene, utenom den beskrevne korrelasjonsanalysen. Dette skyldes at datasettet i utgangspunktet er lite, og variasjonen stor, og i biologiske forsøk kan dette medføre at målte responser ikke er signifikant forskjellige, selv om de har en biologisk betydning. For *in vivo* smitteforsøket er dette spesielt tydelig i SOCS1 uttrykket i hjerte ved 21 dpi, hvor to individer skaper variasjon i datasettet (appendix VI). En årsak til dette er at det er benyttet en kohabitant smittemodell, hvor det ikke etableres en infeksjon i samtlige individer samtidig. Variasjoner i infeksjonsforløp vil følgende skape variasjon i vertsresponsene som det måles på og evt. utføres statistikk på. Dette understøttes av den utførte korrelasjonsanalysen, som tar utgangspunkt i alle individene i vårt forsøk, og viser at det er en sammenheng mellom virusmengde og SOCS1 uttrykket. Videre i denne oppgaven ble det fravalgt å utføre statistikk på datasett med lite grunnlag og stor variasjon, siden dette ikke vil reflektere den biologiske betydningen av datasettet.

Alt i alt viser resultatene at SAV3 og IPNV er to virus som har forskjellig strategi for å unnsnippe vertens immunforsvar. SAV3 induserer en antiviral IFN-respons, med etterfølgende oppregulering av ISGer både *in vivo* og *in vitro*, mens IPNV *in vitro* induserer oppregulering av IFN, men ikke ISGer. Siden SOCS1 etter infeksjon med begge virus ikke viser en annen respons enn som forventet for et ISG, støtter resultatene ikke hypotesen om at SAV3 og IPNV

induserer SOCS1 som en mekanisme for å unngå vertens immunforsvar. Det er mer sannsynlig at SOCS1 induseres som en naturlig negativ feedback hemmer av vertens immunsystem for å gjendanne cellenes følsomheten overfor IFN.

4.4 Rollen til SOCS i leukocytter hos atlantisk laks

I denne masteroppgaven har vi videreført studier av SOCS proteinene som tidligere er påvist hos atlantisk laks (Skjesol *et al.*, 2014). For å avdekke flere funksjoner for SOCS1, SOCS2 og CISH i laksens immunsystem, var en interessant problemstilling å undersøke hvordan patogene substanser påvirker SOCS-uttrykket i immunceller. Derfor ble nivået av SOCS-transkripter i leukocytter fra atlantisk laks etter stimulering med ulike PRR-ligander studert. CpG og polyI:C er syntetiske nukleinsyrer, som ved å fungere som kopier av bakterielt og viralt arvestoff induserer immunologiske reaksjoner i lakseceller (Svingerud *et al.*, 2012, Iliev *et al.*, 2013).

4.4.1 Stimulering av leukocytter med CpG og polyI:C

Stimulering av leukocytter med CpG viste en tidsavhengig oppregulering av både SOCS1 og CISH, mens SOCS2 holdt seg uendret. En oppregulering av SOCS etter stimulering med CpG er i overensstemmelse med tidligere forsøk av Dalpke *et al.* (2001), som kunne påvise en oppregulering av SOCS1 og SOCS3 i APC behandlet med CpG. I vårt forsøk så vi en umiddelbar økning i CISH uttrykket som nådde maksimum etter 8 timer, hvoretter økningen ble redusert. SOCS1 derimot har en mer langsom kinetikk, og når sitt maksimale nivå ved 24 timer. En beskjeden økning i SOCS1-uttrykket på 6x og 8x i non-CpG stimulerte celler kunne observeres ved henholdsvis 24 og 48 timer, og kan indikere DNA-indusert aktivering av andre PRR enn TLR9. Forsøk med atlantisk laks har vist at CpG induserer type I IFN-signalering, og etterfølgende øker nivåene av Mx (Jørgensen *et al.*, 2003, Strandskog *et al.*, 2008). En økning i SOCS1 uttrykket, som observeres i vårt arbeid stemmer derfor med forventningene til et ISG. Det er interessant at det observeres en så markant økning i CISH-uttrykket, og at kinetikken til SOCS1 og CISH forskjellig. Kimura *et al.* (2005) har vist at CpG kan aktivere STAT5, så induksjonen av CISH, som er et STAT5-indusert gen, er derfor ikke uventet. Kinetikken til ulike SOCS fra fisk er tidligere vist å være ulik, og Wang *et al.* (2010) rapporterte at etter stimulering med LPS induseres SOCS1 relativt hurtig, mens CISH induseres noe seinere. CpG og LPS binder ikke samme PRR, og studier har vist at de induserer samme cytokiner, men med ulik kinetikk (Hartmann and Krieg, 1999). CISH ble

opprinnelig identifisert som et "immediate early gene", og en tidlig oppregulering av CISH av en bred aktivator som CpG kan derfor forventes (Matsumoto *et al.*, 1997).

Stimulering av leukocytter med polyI:C viste en kraftig oppregulering av SOCS1, mens SOCS2 og CISH holder seg stort sett uendret og viste kun en moderat økning ved det tidligste tidspunktet. En oppregulering av SOCS1 etter stimulering med polyI:C er tidligere observert i keratinocytter fra mennesker (Dai *et al.*, 2006), og dette studiet viste videre at SOCS1 hemmet fosforylering av STAT1 og dermed ble Jak/STAT signaleringen i cellene hemmet. En oppregulering av ISG etter stimulering med polyI:C er også observert etter stimulering av hodenyreleukocytter fra atlantisk laks (Strandskog *et al.*, 2008). Den moderate økningen av SOCS2 og CISH indikerer at polyI:C spesifikt inducerer ISG, som reflekteres i det høye SOCS1 nivået mens andre signalveier, som ville medført økning av SOCS2 og CISH ikke aktiveres.

Forskjellene som observeres her i SOCS-uttrykket ved henholdsvis CpG og polyI:C stimulering indikerer at disse to ligandene aktiverer immunreaksjoner ved å stimulere ulike signalveier. CpG er vist å inducere en rekke signalveier, blant annet IRF, mitogen aktiverte protein kinaser (MAPK) og NFκB, som videre medierer utskillelse av cytokiner eller direkte aktivering av en rekke immunceller (Krieg, 2000). CpG vil derfor inducere ett bredere repertoar av gener, enn polyI:C som hovedsakelig medierer signaler via IRF3 og inducerer ISG (Sun *et al.*, 2010). Dette reflekteres i våre resultater hvor stimulering med CpG medfører en økning av både SOCS1 og CISH, mens ved polyI:C stimulering er det kun SOCS1 som øker. Sistnevnte ser også ut til å gi en sterkere induksjon av SOCS1 (180x økning), mens i de CpG stimulerende cellene er økningen kun 40x. (Iliev, upublisert) har i likhet med disse resultatene vist at stimulering av hodenyreleukocytter med CpG inducerer en rekke proinflammatoriske cytokiner som for eksempel TNF, mens polyI:C stimulering gir en mer markant induksjon av ISG enn CpG gir.

I sammenheng med SOCS-uttrykket i våres arbeid hadde det derfor vært interessant å undersøke om forskjellen i aktivering av henholdsvis CpG og polyI:C også reflekteres i uttrykket av andre gener.

I våre data kunne det en maksimal økning i SOCS1 observeres etter 24 timer, samtidig som økningen av SOCS1 etter stimulering med polyI:C gir en større økning enn stimulering med

CpG både etter 24 og 48 timer. Man vil derfor kunne anta at Jak/STAT signalveien blir sterkere hemmet av SOCS1 i polyI:C-stimulerte celler og at ISG-uttrykket derfor vil hemmes mer over tid. Strandskog *et al.* (2008) undersøkte uttrykket av IFN α og Mx etter injisering av CpG og polyI:C i bukhula i atlantisk laks, og tilsvarende det som observeres i vårt arbeid, kunne de påvise en forskjell i uttrykket som følge av de ulike stimuleringene. Stimulering med CpG viste en økning av IFN α 1/a2, men kun moderat økning av Mx, mens polyI:C stimulering viste mindre IFN α 1/a2 økning og større økning av Mx. Resultatene fra Strandskog *et al.* (2008) tilsier derfor ikke at økt SOCS1-uttrykk etter polyI:C stimulering vil hemme ISG sterkere enn CpG, men indikerer heller det motsatte. Det er likevel viktig å ta i betraktning at studiet av Strandskog *et al.* (2008) ble utført *in vivo* og derfor er det flere prosesser som kan påvirke utfallet enn bare SOCS1 hemming av ISG-uttrykket.

4.4.2 Rollen til SOCS ved differensiering av DC

Dendritiske celler er profesjonelle APC, som modulerer adaptive immunresponser ved å skille ut en rekke cytokiner. Disse cellene har en dirigentrolle i immunsystemet ved at de bringer det medfødte og adaptive immunsystemet sammen, og SOCSene, spesielt SOCS1, er vist å spille en viktig rolle i modning av DC (Yoshimura *et al.*, 2007). Flere studier har vist at fisk har celler med karakteristika lik DC (Bassity and Clark, 2012, Lovy *et al.*, 2009). Ved å bruke en nylig etablert modell i vårt laboratorium for differensiering av DC (Iliev, upublisert) ønsket vi å studere SOCSenes rolle i disse prosessene. Når adherente celler fra fornyre stimuleres med CpGer vil de etter 5-7 dager i kultur differensiere til celler med DC karakteristika, mens celler behandlet med polyI:C har makrofaglignende morfologi (Iliev, upublisert). I vårt arbeid ble uttrykket av de ulike SOCSene målt i adherente fornyreceller stimulert med CpG og polyI:C i 24 timer. Videre ble cellene inkubert i 7 dager og restimulert med R-848, som er syntetisk ssRNA og en TLR 7/8 ligand. Restimuleringen vil avdekke om celle fortsatt responderer på virusassosierte PAMP, eller om de har utviklet en fenotype som ikke resonderer på stimuli, en såkalt "exhausted" tilstand, som er beskrevet for visse typer DC (Abdi *et al.*, 2012). Etter 24 timer stimulering med CpG og polyI:C var uttrykket av SOCSene tilsvarende det som ble observert i forsøket beskrevet ovenfor. Mens for celler som ble stimulert på nytt ved dag 7, fant vi en 14x økning i SOCS1 uttrykket hos de CpG stimulerte, mens uttrykket i cellene som var stimulert med polyI:C var markant lavere (3x). SOCS1 er tidligere vist å være involvert i differensieringen av DC, og uttrykket av SOCS1 er vist å øke i modne DC (Jackson *et al.*, 2004). Jackson *et al.* (2004) viste at i umodne DC fra mus, er STAT6 konstitutivt uttrykt

mens det i løpet av prosessen hvor DC modnes skjer en nedregulering av STAT6 og oppregulering av STAT1. Samtidig skjer en oppregulering av SOCS1, og forfatterne foreslår at SOCS1 fungerer som en negativ feedback hemmer av STAT6, og dermed er nøkkelregulatorer i den STAT1 avhengige modningen av DC. Det høye nivået av SOCS1 som observeres spesielt for de CpG-stimulerte cellene, samtidig med at cellene morfologisk ligner på DC, kan indikere at SOCS1 bidrar til modning av DC i laks tilsvarende det som er rapportert for mus (Jackson *et al.*, 2004).

Restimulering av cellene med R-848 viste at det var forskjell mellom cellene som er prestimulert med CpG sammenlignet med polyI:C og ubehandlede kontrollceller. Førstnevnte viste en økning i SOCS1 og CISH nivået etter restimulering, men i mindre grad enn celler stimulert med polyI:C og kontrollceller. En interessant observasjon er at de CpG-behandlede cellene viser samme IFN α 1 induksjon som polyI:C stimulerte- og kontrollceller, mens Mx uttrykket er markant lavere i cellene som er restimulert med CpG. Det at de CpG stimulerte cellene ser ut til å respondere svakere på R-848-restimuleringen indikerer at cellene har endret fenotype, og ikke reagerer på samme stimuli som kontrollcellene. Cellene som er stimulert med polyI:C ser ut til å reagere likt kontrollcellene, og har ikke endret fenotype på samme måte. Et interessant spørsmål er om de CpG-behandlede cellene kan ha differensiert til DC som er i en "exhausted" tilstand. Det er også interessant å se, at selv om ISGene er nedregulerte, så er IFN-uttrykket like høyt som i kontrollcellene. (Iliev, upublisert) observerte at i DC-lignende celler som ble restimulert med TLR7 liganden Gardiquimod, ble uttrykket av ISG-transkripter nedregulert, mens uttrykket av proinflammatoriske cytokiner økte i de samme cellene. Den økningen i SOCS1 uttrykket som vi ser her, kan spille en rolle i denne sammenhengen, ved å hemme induksjon av ISGer. Dette stemmer også med at vi observerte en økning i IFN α 1 mRNA i restimulerte DC, mens uttrykket av Mx-transkripter ikke økte. Det at de CpG stimulerte cellene og kontrollcellene viste likt uttrykk av IFN α 1, gjør det mer sannsynlig at våre DC ikke har en "exhausted" fenotype. De er heller omprogrammerte til å kunne respondere på andre stimuli, slik at de som APC kan mest mulig effektivt bidra i cellemedierte immunresponser (Abdi *et al.*, 2012). Økningen i CISH uttrykket (45x) som observeres i vårt forsøk er faktisk større enn økningen i SOCS1 (40x), og indikerer at CISH også har en rolle i DC ved virusinfeksjoner. CISH er nylig rapportert å øke i uttrykk ved differensiering av type 1 DC, som er viktige i CD8+ immunresponser (Miah *et al.*, 2012). En økning av CISH etter stimulering med ssRNA, kan derfor indikere at DC responderer målrettet mot en CD8+ immunrespons. Det ville derfor vært interessant å undersøke uttrykket

av MHC II og kostimulatoriske molekylar i cellene, og vidare undersøke hvilke typer stimuli som kan aktivere APC, slik at de aktiverer T-celle medierte immunesponser.

Resultatene som er diskutert over baserer seg på prøver fra kun to fisk, og disse viste stor individuell variasjon i nivået på de responsene som ble målt. Dette gjør at resultatene må tolkes med forsiktighet, og forsøkene må gjentas før man kan komme med sikre konklusjoner. Variasjonen i datasettet er ikke uventet, siden primærceller generelt vil gi stor variasjon mellom individer, siden de i stor grad vil reflektere variasjonen man også ser på individnivå ved forsøk *in vivo*. Likevel kunne det observeres samme mønster i økning i uttrykk av de undersøkte genene hos de to fiskene, og selv om grunnlaget for konklusjoner basert på dette arbeidet er noe sparsomt, har forsøk med større datagrunnlag vist lignende resultater (Iliev, upublisert).

Alt i alt viser resultatene fra dette forsøket, at stimulering av leukocytter fra hodenyre hos atlantisk laks, både som ny-isolerte primærceller og etter differensiering til DC, responderer på stimulering med PAMPer ved å oppregulere SOCSene. Mye oppmerksomhet har vært rettet mot CpG og polyI:C, siden nevnte ligander er vist å ha potensiale som adjuvans i virusvaksiner til fisk (Thim *et al.*, 2012, Carrington and Secombes, 2006, Strandskog *et al.*, 2011). En forutsetning for å lykkes med å lage vaksiner mot virus er at både humoral og cellulær immunitet utløses, og spesielt det å aktivere cellulære responser har vist seg å være en stor utfordring. Å aktivere APC spesifikt rettet mot en CD8+ immunrespons har derfor stort potensiale til å kunne forbedre de vaksinene som finnes mot virus i dag. Resultatene fra våre eksperimenter kan indikere at CpG har størst potensiale i denne sammenheng, siden CpG ser ut til å differensiere APC hos atlantisk laks. Våre resultater viser også, at etter restimulering med R-848 øker IFN1a uttrykket i de DC-lignende cellene, samtidig som Mx-uttrykket ikke øker. Kontrollcellene derimot viser økning i både IFN1a og Mx nivåene. Type I IFN er vist å være essensielt for utvikling av en CD8+ T-celle respons (Kolumam *et al.*, 2005), og det kan dermed tenkes at endringen i fenotypen i DC inkluderer en nedregulering av antivirale proteiner, hvor IFN heller rettes mot utvikling av en CD8+ T-celle respons. Dette er så langt ikke beskrevet i litteraturen, og vidare undersøkelser må til for å avdekke om dette kan være tilfellet. Siden det samtidig observeres en økning i SOCS1 uttrykket er det mulig at SOCS1 har en rolle i nedreguleringen av Jak/STAT signalveien, som vidare fører til å dempe Mx uttrykket. I motsetning til den "positive" rollen beskrevet for SOCS1 knyttet til modning av DC, er det også foreslått at SOCS1 kan hemme denne typen celler, og enkelte studier har

vist at blokkering av SOCS1 øker antigen presentasjon i DC (Shen *et al.*, 2004, Zhang *et al.*, 2012). Siden SOCSene, spesielt SOCS1, har en nøkkelrolle både i utviklingen av DC og i IFN-signalveien, kan SOCSene tenkes å påvirke effekten av vaksiner med CpG eller polyI:C som adjuvans. Det er derfor viktig å avdekke hvilken rolle, stimulerende eller hemmende, SOCSene i denne sammenheng har hos fisk. Våre resultater kan indikere at økt SOCS1 uttrykk vil bidra til at vaksiner mot virus med CpG som adjuvans blir mer effektive. Både ved at CpGene stimulerer til differensiering av DC (Jackson *et al.*, 2004) og til endring av fenotype som favoriserer en utvikling av CD8+ T-celler ved å omdirigere type I IFN signalering fra produksjon av antivirale proteiner (Kolumam *et al.*, 2005). Å anvende SOCSer i terapeutisk sammenheng har vært foreslått, enten for å utnytte deres stimulerende eller hemmende egenskaper (Yoshimura *et al.*, 2007). Vaksinerings av laks med CpG som adjuvans, vil medføre at SOCS1 nivået i cellene påvirkes og kan være en metode for å gjøre virusvaksiner enda mer effektive. Før man går i gang med å teste ut slike tiltak er det viktig at rollene til SOCS1 blir grundig kartlagt *in vivo*. Dette er nøye regulerte prosesser, som uten tvil vil bli adskillig mer komplisert å avdekke enn de cellestudiene som er gjort i denne masteroppgaven, og vil kreve studier over lengre tid i flere organer i levende fisk. Den omdiskuterte rollen til SOCS1 i modningen av DC viser også betydningen av å studere ulike aspekter av immunresponser, både molekyler som stimulerer og hemmer disse, slik at man oppnår en bredere forståelse av hva som skjer for eksempel ved vaksinerings.

4.5 Stabil transfektering av celler med SOCS1 og SOCS2

I pattedyr har overuttrykk av SOCSene enten *in vitro* eller *in vivo*, sammen med "knock out" studier, bidratt til å øke kunnskapen om deres biologiske rolle (Alexander and Hilton, 2004). Å etablere denne type verktøy for å få frem mer detaljert kunnskap om disse proteinene i fisk har vært et viktig delmål i denne masteroppgaven. Vi valgte å anvende CHSE-celler, siden erfaringer fra forskningsgruppen tilsier at disse er best egnet til transfeksjon. Ved å bruke stabilt transfekterte celler fremfor transient transfekterte celler har man et mer stabilt verktøy for å produsere reproducerbare resultater. Dessuten kan cellelinjen i seg selv være nyttig til for eksempel dyrkning av virus.

4.5.1 Etablering av cellelinjer stabilt transfektert med SOCS1 og SOCS2

Resultatene viser, at vår metode for å etablere cellelinjer med stabilt uttrykk av SOCS1 og SOCS2 har lyktes, basert på at gitte celler har høyere uttrykk av henholdsvis SOCS1 og SOCS2 sammenlignet med ubehandlede CHSE-celler. Western blott og RT-qPCR viste at dette var tilfellet både på transkript- og proteinnivå. SOCS1 viste noe lavere uttrykk enn SOCS2, noe som kan indikere at SOCS1 er under strengere regulering enn SOCS2. Dette er ikke uventet, med tanke på nøkkelrollen til SOCS1 i regulering av immunresponser.

Forsøkene i denne masteroppgaven er gjennomført med ubehandlede CHSE-celler som kontroll mot de transfekterte cellene. Plasmider i seg selv vil kunne inducere en immunologisk respons, siden de er av bakterielt opphav og kan inneholde CpG sekvenser (Carrington and Secombes, 2006) slik at en mer korrekt kontroll ville være å bruke cellelinjer som uttrykker tom-vektor. En cellelinje stabilt transfektert med GFP-tom vektor ble etablert etter at forsøkene i denne masteroppgaven var avsluttet, og forsøk med infeksjon av virus viste små forskjeller i virusmengde, sammenlignet med ubehandlede CHSE-celler etter 96 timer (appendix VII). Dette indikerer at det er liten forskjell i antiviral respons i de to kontrollcellelinjene innenfor det tidsintervallet som ble brukt i denne masteroppgaven, og resultatene kan derfor regnes som pålitelige.

4.5.2 Hva skjer med IFN-signalveien i celler som overuttrykker SOCS1 og SOCS2?

Siden SOCS1 har vist seg å være et ISG hos laks, og hemmer Jak/STAT signalveien ved å blokkere forflytning av STAT1 til cellekjernen (Skjesol *et al.*, 2014), kan det tenkes at en cellelinje som overuttrykker SOCS1 vil hemme IFN-signaleringen. Dette er tidligere vist i fibroblaster fra pattedyr, hvor overuttrykk av SOCS1 hemmet infeksjon med herpes simplex virus ved å hemme IFN γ induksjon (Frey *et al.*, 2009). Resultatene fra vårt forsøk viser, at etter stimulering med IFN1 α øker SOCS1 uttrykket i CHSE-cellene og de SOCS2-transfektete, mens SOCS1 uttrykket i de SOCS1-transfektete er uendret. Nivået av SOCS2 i alle cellelinjene er i stor grad uendret etter stimuleringen. Dette viser at cellene responderer på stimuleringen som forventet ved å inducere ISG. Årsaken til at det ikke observeres noen endring i SOCS1 uttrykket i de SOCS1-transfektete cellene er sannsynligvis at IFN-signaleringen vil hemmes av SOCS1, og at SOCS1 som er et ISG, dermed ikke blir like effektivt induisert ved IFN-behandlingen. I samsvar med disse resultatene observeres en større økning av Mx-nivået i IFN-stimulerte CHSE-celler og SOCS2-transfektete cellene,

sammenlignet med det man måler i cellene som er transfektert med. Igjen blir IFN-signaleringen hemmet av SOCS1, og dermed induseres ikke Mx. Resultatene indikerer dermed, at SOCS1 hemmer IFN-signaleringen som tidligere også er vist hos pattedyr (Crocker *et al.*, 2008). Disse dataene støtter nylige studier av SOCS hos fisk, som foreslår en konservert funksjonell rolle mellom SOCS1 hos pattedyr og fisk (Skjesol *et al.*, 2014, Nie *et al.*, 2014).

En cellelinje som i så stor grad hemmer induksjon av antivirale proteiner kan være et effektivt redskap for dyrkning av virus, både i forbindelse med forsøk og produksjon av vaksiner. Ett av problemene med produksjon av virusvaksiner i dag er at det kreves store mengder antigen, noe som er både dyrt og tidskrevende å få til (Robertsen, 2011). Forsøk gjennomført etter at forsøkene i denne masteroppgaven var avsluttet, har vist høyere replikasjon av SAV3 i de SOCS1-transfektete cellene sammenlignet med CHSE-celler transfektert med tom vektor (appendix VII). Disse resultatene stemmer med tidligere observasjoner av Frey *et al.* (2009), og indikerer at den SOCS1-transfektete cellelinjen kan være et godt redskap til dyrkning av større mengder av virusantigen.

4.6 Konklusjoner

- SOCS1, SOCS2 og CISH ble påvist i alle organer i frisk uvaksinert laks, og viser at dette er proteiner som har brede regulerende roller hos atlantisk laks. Ulike nivåer i enkeltorganer kan indikere ulike roller for SOCSene tilsvarende det som er rapportert for pattedyr.
- Infeksjon med SAV3 *in vivo* inducerer SOCS1 som sammenfaller med prevalens av virus og patologiske endringer og tilsier at SOCS1 har en viktig rolle i vertens respons ved SAV3 infeksjoner. Resultatene tyder også på at SOCS2 og CISH kan ha immunologiske roller hos atlantisk laks.
- Infeksjon med SAV3 og IPNV *in vitro* inducerer ISGer (SOCS1 og Mx), og SOCS1 viser etter infeksjon med disse virusene en respons som forventet for et ISG. Disse to virusene ser derfor ikke ut til å utnytte SOCS1 for å unngå laksens immunforsvar, og SOCS1 har mer sannsynlig en rolle under infeksjonen som negativ feedback hemmer av IFN-signaleringsen.
- SOCS1 og CISH induseres etter stimulering med CpG og polyI:C . Ulik styrke og kinetikk av induksjon viser at disse induseres gjennom ulike signalveier hos atlantisk laks. Videre studier bør avdekke om SOCS1 kan være involvert i hemming av ISG etter stimulering med CpG og polyI:C *in vivo*.
- Resultatene indikerer at SOCS1 og muligvis også CISH er involvert i differensiering av DC hos atlantisk laks. Rollen til disse SOCSene bør undersøkes videre med tanke på aktiviteten DC har i laksens immunforsvar.
- Metoden som ble brukt for etablering av stabilt transfekterte cellelinjer som overuttrykker SOCS1 og SOCS2 er vel egnet. Disse cellelinjene vil være et godt verktøy for videre karakterisering av funksjonene til SOCSene hos atlantisk laks.
- Stimulering av celler som overuttrykker SOCS1 med IFN1a viste at SOCS1 hemmer ISG-induksjon. Resultatene fra denne masteroppgaven støtter derfor studier som tilsier at funksjonen til SOCS1 er konserverv mellom pattedyr og fisk.

5. Referanser

- Abdi, K., Singh, N. J. & Matzinger, P. (2012). Lipopolysaccharide-Activated Dendritic Cells: "Exhausted" or Alert and Waiting? *Journal of Immunology*, **188**, 5981-5989.
- Aggad, D., Mazel, M., Boudinot, P., Mogensen, K. E., Hamming, O. J., Hartmann, R., Kotenko, S., Herbomel, P., Lutfalla, G. & Levraud, J. P. (2009). The Two Groups of Zebrafish Virus-Induced Interferons Signal via Distinct Receptors with Specific and Shared Chains. *Journal of Immunology*, **183**, 3924-3931.
- Akhtar, L. N. & Benveniste, E. N. (2011). Viral Exploitation of Host SOCS Protein Functions. *Journal of Virology*, **85**, 1912-1921.
- Alexander, W. S. (2002). Suppressors of cytokine signalling (SOCS) in the immune system. *Nature Reviews Immunology*, **2**, 410-416.
- Alexander, W. S. & Hilton, D. J. (2004). The role of suppressors of cytokine signaling (SOCS) proteins in regulation of the immune response. *Annu. Rev. Immunol.*, **22**, 503-529.
- Amershambioscience (2014). Percoll Methodology and Application. Tilgjengelig fra <http://202.38.193.234/spfx1/admin/picture/200752919841517.pdf>.
- Asche, F., Hansen, H., Tveteras, R. & Tveterås, S. (2009). The salmon disease crisis in Chile. *Marine Resource Economics*, **24**, 405-411.
- Athanasopoulou, S., Marioli, D., Mikrou, A., Papanastasiou, A. D. & Zarkadis, I. K. (2009). Cloning and characterization of the trout perforin. *Fish & Shellfish Immunology*, **26**, 908-912.
- Aunsmo, A., Valle, P. S., Sandberg, M., Midtlyng, P. J. & Bruheim, T. (2010). Stochastic modelling of direct costs of pancreas disease (PD) in Norwegian farmed Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Preventive Veterinary Medicine*, **93**, 233-241.
- Babon, J. J., Kershaw, N. J., Murphy, J. M., Varghese, L. N., Laktyushin, A., Young, S. N., Lucet, I. S., Norton, R. S. & Nicola, N. A. (2012). Suppression of Cytokine Signaling by SOCS3: Characterization of the Mode of Inhibition and the Basis of Its Specificity. *Immunity*, **36**, 239-250.
- Babon, J. J., Mcmanus, E. J., Yao, S. G., Desouza, D. P., Mielke, L. A., Sprigg, N. S., Willson, T. A., Hilton, D. J., Nicola, N. A., Baca, M., Nicholson, S. E. & Norton, R. S. (2006). The structure of SOCS3 reveals the basis of the extended SH2 domain function and identifies an unstructured insertion that regulates stability. *Molecular Cell*, **22**, 205-216.
- Bassity, E. & Clark, T. G. (2012). Functional Identification of Dendritic Cells in the Teleost Model, Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Plos One*, **7**, 14.
- Bootland, L. M., Dobos, P. & Stevenson, R. M. W. (1991). The IPNV Carrier State and Demonstration of Vertical Transmission in Experimentally Infected Brook Trout. *Diseases of Aquatic Organisms*, **10**, 13-21.
- Bruno, D. W., Poppe, T. & Noguera, P. A. (2013). *A colour atlas of salmonid diseases*, Dordrecht, Springer.
- Carrington, A. C. & Secombes, C. J. (2006). A review of CpGs and their relevance to aquaculture. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, **112**, 87-101.
- Chang, M. X., Collet, B., Nie, P., Lester, K., Campbell, S., Secombes, C. J. & Zou, J. (2011). Expression and Functional Characterization of the RIG-I-Like Receptors MDA5 and LGP2 in Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Journal of Virology*, **85**, 8403-8412.

- Chomczynski, P. & Sacchi, N. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical Biochemistry*, **162**, 156-159.
- Christie, K. E., Håvarstein, L. S., Djupvik, H. O., Ness, S. & Endresen, C. (1988). Characterization of a new serotype of infectious pancreatic necrosis virus isolated from Atlantic salmon. *Archives of Virology*, **103**, 167-177.
- Collet, B. (2014). Innate immune responses of salmonid fish to viral infections. *Developmental and Comparative Immunology*, **43**, 160-173.
- Collet, B. & Secombes, C. J. (2001). The rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) Mx1 promoter - Structural and functional characterization. *European Journal of Biochemistry*, **268**, 1577-1584.
- Costa, M. M., Maehr, T., Diaz-Rosales, P., Secombes, C. J. & Wang, T. H. (2011). Bioactivity studies of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) interleukin-6: Effects on macrophage growth and antimicrobial peptide gene expression. *Molecular Immunology*, **48**, 1903-1916.
- Crocker, B. A., Kiu, H. & Nicholson, S. E. (2008). SOCS regulation of the JAK/STAT signalling pathway. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, **19**, 414-422.
- Dai, X. J., Sayama, K., Yamasaki, K., Tohyama, M., Shirakata, Y., Hanakawa, Y., Tokumaru, S., Yahata, Y., Yang, L. J., Yoshimura, A., Yoshimura, A. & Hashimoto, K. (2006). SOCS1-negative feedback of STAT1 activation is a key pathway in the dsRNA-induced innate immune response of human keratinocytes. *Journal of Investigative Dermatology*, **126**, 1574-1581.
- Dalpke, A. H., Opper, S., Zimmermann, S. & Heeg, K. (2001). Suppressors of cytokine signaling (SOCS)-1 and SOCS-3 are induced by CpG-DNA and modulate cytokine responses in APCs. *Journal of Immunology*, **166**, 7082-7089.
- Delgado-Ortega, M., Marc, D., Dupont, J., Trapp, S., Berri, M. & Meurens, F. (2013). SOCS proteins in infectious diseases of mammals. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, **151**, 1-19.
- Dimitriou, I. D., Clemenza, L., Scotter, A. J., Chen, G., Guerra, F. M. & Rottapel, R. (2008). Putting out the fire: coordinated suppression of the innate and adaptive immune systems by SOCS1 and SOCS3 proteins. *Immunological Reviews*, **224**, 265-283.
- Dobos, P., Hill, B. J., Hallett, R., Kells, D. T. C., Becht, H. & Teninges, D. (1979). Biophysical and biochemical characterization of 5 animal viruses with bisegmented double-stranded-RNA genomes. *Journal of Virology*, **32**, 593-605.
- FAO (2012). The state of the world fisheries and aquaculture 2012. Rome: FAO, Tilgjengelig fra <http://www.fao.org/docrep/016/i2727e/i2727e.pdf> (13.05.14).
- Fast, M. D., Sims, D. E., Burka, J. F., Mustafa, A. & Ross, N. W. (2002). Skin morphology and humoral non-specific defence parameters of mucus and plasma in rainbow trout, coho and Atlantic salmon. *Comparative Biochemistry and Physiology a-Molecular and Integrative Physiology*, **132**, 645-657.
- Fillatreau, S., Six, A., Magadan, S., Castro, R., Sunyer, J. O. & Boudinot, P. (2013). The astonishing diversity of Ig classes and B cell repertoires in teleost fish. *Frontiers in Immunology*, **4**, 28.
- Fischer, U., Koppang, E. O. & Nakanishi, T. (2013). Teleost T and NK cell immunity. *Fish & Shellfish Immunology*, **35**, 197-206.
- Fremmerlid, K. K. (2012). Patogenese og antivirale mekanismer i atlantisk laks (*salmo salar*) ved eksperimentell SAV3-smitte. *Mastergradsavhandling*.
- Frey, K. G., Ahmed, C. M. I., Dabelic, R., Jager, L. D., Noon-Song, E. N., Haider, S. M., Johnson, H. M. & Bigley, N. J. (2009). HSV-1-induced SOCS-1 expression in

- keratinocytes: use of a SOCS-1 antagonist to block a novel mechanism of viral immune evasion. *The Journal of Immunology*, **183**, 1253-1262.
- Fryer, J. L., Yusha, A. & Pilcher, K. S. (1965). In Vitro Cultivation of Tissue and Cells of Pacific Salmon and Steelhead Trout. *Annals of the New York Academy of Sciences*, **126**, 566-&.
- Graham, D. A., Frost, P., Mclaughlin, K., Rowley, H. M., Gabestad, I., Gordon, A. & Mcloughlin, M. F. (2011). A comparative study of marine salmonid alphavirus subtypes 1-6 using an experimental cohabitation challenge model. *Journal of Fish Diseases*, **34**, 273-286.
- Gregorieff, A., Pyronnet, S., Sonenberg, N. & Veillette, A. (2000). Regulation of SOCS-1 expression by translational repression. *Journal of Biological Chemistry*, **275**, 21596-21604.
- Guo, C. J., Yang, L. S., Zhang, Y. F., Wu, Y. Y., Weng, S. P., Yu, X. Q. & He, J. G. (2012). A Novel Viral SOCS from Infectious Spleen and Kidney Necrosis Virus: Interacts with Jak1 and Inhibits IFN-alpha Induced Stat1/3 Activation. *Plos One*, **7**, 11.
- Hansen, J. D., Landis, E. D. & Phillips, R. B. (2005). Discovery of a unique Ig heavy-chain isotype (IgT) in rainbow trout: Implications for a distinctive B cell developmental pathway in teleost fish. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **102**, 6919-6924.
- Hartmann, G. & Krieg, A. M. (1999). CpG DNA and LPS induce distinct patterns of activation in human monocytes. *Gene Therapy*, **6**, 893-903.
- Haugarvoll, E., Bjerkas, I., Nowak, B. F., Hordvik, I. & Koppang, E. O. (2008). Identification and characterization of a novel intraepithelial lymphoid tissue in the gills of Atlantic salmon. *Journal of Anatomy*, **213**, 202-209.
- Heid, C. A., Stevens, J., Livak, K. J. & Williams, P. M. (1996). Real time quantitative PCR. *Genome Research*, **6**, 986-994.
- Higuchi, R., Fockler, C., Dollinger, G. & Watson, R. (1993). Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology*, **11**, 1026-1030.
- Hikima, J.-I., Jung, T.-S. & Aoki, T. (2011). Immunoglobulin genes and their transcriptional control in teleosts. *Developmental & Comparative Immunology*, **35**, 924-936.
- Hill, B. J. & Way, K. (1995). Serological classification of infectious pancreatic necrosis (IPN) virus and other aquatic birnaviruses. *Annual Review of Fish Diseases*, **5**, 55-77.
- Hjeltnes, B. 2014. Fiskehelse rapporten 2013. In: HJELTNES, B. (ed.).
- Hjortaas, M. J., Skjelstad, H. R., Taksdal, T., Olsen, A. B., Johansen, R., Bang-Jensen, B., Orpetveit, I. & Sindre, H. (2013). The first detections of subtype 2-related salmonid alphavirus (SAV2) in Atlantic salmon, *Salmo salar* L., in Norway. *Journal of Fish Diseases*, **36**, 71-74.
- Hodneland, K., Bratland, A., Christie, K. E., Endresen, C. & Nylund, A. (2005). New subtype of salmonid alphavirus (SAV), Togaviridae, from Atlantic salmon *Salmo salar* and rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* in Norway. *Diseases of Aquatic Organisms*, **66**, 113-120.
- Hu, J., Lou, D. H., Carow, B., Winerdal, M. E., Rottenberg, M., Wikstrom, A. C., Norstedt, G. & Winqvist, O. (2012). LPS Regulates SOCS2 Transcription in a Type I Interferon Dependent Autocrine-Paracrine Loop. *Plos One*, **7**, 10.
- Haan, S., Ferguson, P., Sommer, U., Hiremath, M., Mcvicar, D. W., Heinrich, P. C., Johnston, J. A. & Cacalano, N. A. (2003). Tyrosine phosphorylation disrupts elongin interaction and accelerates SOCS3 degradation. *Journal of Biological Chemistry*, **278**, 31972-31979.
- Ihle, J. N. (2001). The Stat family in cytokine signaling. *Current Opinion in Cell Biology*, **13**, 211-217.

- Iliev, D. B., Skjaeveland, I. & Jørgensen, J. B. (2013). CpG oligonucleotides bind TLR9 and RRM-Containing proteins in Atlantic Salmon (*Salmo salar*). *Bmc Immunology*, **14**, 12.
- Iliev, D. B., Sobhkhez, M., Fremmerlid, K. & Jørgensen, J. B. (2011). MyD88 Interacts with Interferon Regulatory Factor (IRF) 3 and IRF7 in Atlantic Salmon (*Salmo salar*): Transgenic SsMyD88 Modulates the IRF-Induced Type I Interferon Response and Accumulates in Aggresomes. *Journal of Biological Chemistry*, **286**, 42715-42724.
- Iliev, D. B. L., L.; Thim, H. L.; Jørgensen, S.M.; Krasnov, A.; Jørgensen, J.B. upublisert. CpG induced differentiation of Atlantic salmon (*Salmo salar*) DC-like APCs.
- Jackson, S. H., Yu, C. R., Mahdi, R. M., Ebong, S. & Egwuagu, C. E. (2004). Dendritic cell maturation requires STAT1 and is under feedback regulation by suppressors of cytokine signaling. *Journal of Immunology*, **172**, 2307-2315.
- Jansen, M. D., Jensen, B. B. & Brun, E. (2014). Clinical manifestations of pancreas disease outbreaks in Norwegian marine salmon farming – variations due to salmonid alphavirus subtype. *Journal of Fish Diseases*, n/a-n/a.
- Jin, H.-J., Shao, J.-Z., Xiang, L.-X., Wang, H. & Sun, L.-L. (2008). Global identification and comparative analysis of SOCS genes in fish: insights into the molecular evolution of SOCS family. *Molecular Immunology*, **45**, 1258-1268.
- Jørgensen, J. B., Johansen, A., Stenersen, B. & Sommer, A. I. (2001). CpG oligodeoxynucleotides and plasmid DNA stimulate Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) leucocytes to produce supernatants with antiviral activity. *Developmental and Comparative Immunology*, **25**, 313-321.
- Jørgensen, J. B., Johansen, L. H., Steiro, K. & Johansen, A. (2003). CpG DNA induces protective antiviral immune responses in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Journal of Virology*, **77**, 11471-11479.
- Kawai, T. & Akira, S. (2008). Toll-like Receptor and RIG-1-like Receptor Signaling. *Annals of the New York Academy of Sciences*, **1143**, 1-20.
- Kimura, A., Naka, T., Muta, T., Takeuchi, O., Akira, S., Kawase, I. & Kishimoto, T. (2005). Suppressor of cytokine signaling-1 selectively inhibits LPS-induced IL-6 production by regulating JAK-STAT. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **102**, 17089-17094.
- Kolumam, G. A., Thomas, S., Thompson, L. J., Sprent, J. & Murali-Krishna, K. (2005). Type I interferons act directly on CD8 T cells to allow clonal expansion and memory formation in response to viral infection. *Journal of Experimental Medicine*, **202**, 637-650.
- Koppang, E. O., Fischer, U., Moore, L., Tranulis, M. A., Dijkstra, J. M., Kollner, B., Aune, L., Jirillo, E. & Hordvik, I. (2010). Salmonid T cells assemble in the thymus, spleen and in novel interbranchial lymphoid tissue. *Journal of Anatomy*, **217**, 728-739.
- Krieg, A. M. (2000). Immune effects and mechanisms of action of CpG motifs. *Vaccine*, **19**, 618-622.
- Kvistad, A. 2014. *laks.no* [Online]. [Accessed 31.03 2013].
- Lauksund, R. S. 2014. Induction of Atlantic salmon type I interferon and antagonism by infectious pancreatic necrosis virus. Tromsø: UiT The Arctic University of Norway. *Doktorgradsavhandling*.
- Lauksund, S., Svingerud, T., Bergan, V. & Robertsen, B. (2009). Atlantic salmon IPS-1 mediates induction of IFN α 1 and activation of NF-kappa B and localizes to mitochondria. *Developmental and Comparative Immunology*, **33**, 1196-1204.
- Lavens, D., Montoye, T., Piessevaux, J., Zabeau, L., Vandekerckhove, J., Gevaert, K., Becker, W., Eyckerman, S. & Tavernier, J. (2006). A complex interaction pattern of CIS and SOCS2 with the leptin receptor. *Journal of Cell Science*, **119**, 2214-2224.

- Lehtonen, A., Matikainen, S., Miettinen, M. & Julkunen, I. (2002). Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) - induced STAT5 activation and target-gene expression during human monocyte/macrophage differentiation. *Journal of Leukocyte Biology*, **71**, 511-519.
- Li, J., Barreda, D. R., Zhang, Y. A., Boshra, H., Gelman, A. E., Lapatra, S., Tort, L. & Sunyer, J. O. (2006). B lymphocytes from early vertebrates have potent phagocytic and microbicidal abilities. *Nature Immunology*, **7**, 1116-1124.
- Li, S. L., Chen, S. W., Xu, X. F., Sundstedt, A., Paulsson, K. M., Anderson, P., Karlsson, S., Sjogren, H. O. & Wang, P. (2000). Cytokine-induced Src homology 2 protein (CIS) promotes T cell receptor-mediated proliferation and prolongs survival of activated T cells. *Journal of Experimental Medicine*, **191**, 985-994.
- Lifetechnologies (2012). Real-time PCR handbook. Tilgjengelig fra http://find.lifetechnologies.com/Global/FileLib/qPCR/RealTimePCR_Handbook_Update_FLR.pdf.
- Linossi, E. M., Babon, J. J., Hilton, D. J. & Nicholson, S. E. (2013). Suppression of cytokine signaling: The SOCS perspective. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, **24**, 241-248.
- Lovy, J., Savidant, G. P., Speare, D. J. & Wright, G. M. (2009). Langerin/CD207 positive dendritic-like cells in the haemopoietic tissues of salmonids. *Fish & Shellfish Immunology*, **27**, 365-368.
- Magnadottir, B. (2006). Innate immunity of fish (overview). *Fish & Shellfish Immunology*, **20**, 137-151.
- Magnadottir, B. (2010). Immunological Control of Fish Diseases. *Marine Biotechnology*, **12**, 361-379.
- Malsberger, R. G. & Cerini, C. P. (1965). MULTIPLICATION OF INFECTIOUS PANCREATIC NECROSIS VIRUS. *Annals of the New York Academy of Sciences*, **126**, 320-&.
- Matsumoto, A., Masuhara, M., Mitsui, K., Yokouchi, M., Ohtsubo, M., Misawa, H., Miyajima, A. & Yoshimura, A. (1997). CIS, a cytokine inducible SH2 protein, is a target of the JAK-STAT5 pathway and modulates STAT5 activation. *Blood*, **89**, 3148-3154.
- Matsuo, A., Oshiumi, H., Tsujita, T., Mitani, H., Kasai, H., Yoshimizu, M., Matsumoto, M. & Seya, T. (2008). Teleost TLR22 recognizes RNA duplex to induce IFN and protect cells from birnaviruses. *Journal of Immunology*, **181**, 3474-3485.
- McLoughlin, M. F. & Graham, D. A. (2007). Alphavirus infections in salmonids - a review. *Journal of Fish Diseases*, **30**, 511-531.
- Mevicar, A. H. (1987). Pancreas disease of farmed Atlantic salmon, *Salmo salar*, in Scotland: Epidemiology and early pathology. *Aquaculture*, **67**, 71-78.
- Miah, M. A., Yoon, C.-H., Kim, J., Jang, J., Seong, Y.-R. & Bae, Y.-S. (2012). CISH is induced during DC development and regulates DC-mediated CTL activation. *European Journal of Immunology*, **42**, 58-68.
- Morrison, R. N. & Nowak, B. F. (2002). The antibody response of teleost fish. *Seminars in Avian and Exotic Pet Medicine*, **11**, 46-54.
- Nie, L., Xiong, R., Zhang, Y.-S., Zhu, L.-Y., Shao, J.-Z. & Xiang, L.-X. (2014). Conserved inhibitory role of teleost SOCS-1s in IFN signaling pathways. *Developmental & Comparative Immunology*, **43**, 23-29.
- Nishi, M., Ryo, A., Tsurutani, N., Ohba, K., Sawasaki, T., Morishita, R., Perrem, K., Aoki, I., Morikawa, Y. & Yamamoto, N. (2009). Requirement for microtubule integrity in the SOCS1-mediated intracellular dynamics of HIV-1 Gag. *Febs Letters*, **583**, 1243-1250.

- Olsvik, P. A., Lie, K. K., Jordal, A. E. O., Nilsen, T. O. & Hordvik, I. (2005). Evaluation of potential reference genes in real-time RT-PCR studies of Atlantic salmon. *Bmc Molecular Biology*, **6**, 9.
- Palmer, D. C. & Restifo, N. P. (2009). Suppressors of cytokine signaling (SOCS) in T cell differentiation, maturation, and function. *Trends in Immunology*, **30**, 592-602.
- Pfaffl, M. W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research*, **29**, 6.
- Pickering, A. D. & Pottinger, T. G. (1989). Stress responses and disease resistance in salmonid fish: effects of chronic elevation of plasma cortisol. *Fish Physiology and Biochemistry*, **7**, 253-258.
- Piessevaux, J., Lavens, D., Montoye, T., Wauman, J., Catteeuw, D., Vandekerckhove, J., Belsham, D., Peelman, F. & Tavernier, J. (2006). Functional cross-modulation between SOCS proteins can stimulate cytokine signaling. *Journal of Biological Chemistry*, **281**, 32953-32966.
- Pietretti, D. & Wiegertjes, G. F. (2014). Ligand specificities of Toll-like receptors in fish: Indications from infection studies. *Developmental & Comparative Immunology*, **43**, 205-222.
- Press, C. M. & Evensen, O. (1999). The morphology of the immune system in teleost fishes. *Fish & Shellfish Immunology*, **9**, 309-318.
- Purcell, M. K., Smith, K. D., Aderem, A., Hood, L., Winton, J. R. & Roach, J. C. (2006). Conservation of Toll-like receptor signaling pathways in teleost fish. *Comparative Biochemistry and Physiology D-Genomics & Proteomics*, **1**, 77-88.
- Randelli, E., Buonocore, F. & Scapigliati, G. (2008). Cell markers and determinants in fish immunology. *Fish & Shellfish Immunology*, **25**, 326-340.
- Rebl, A., Goldammer, T. & Seyfert, H.-M. (2010). Toll-like receptor signaling in bony fish. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, **134**, 139-150.
- Rico-Bautista, E., Flores-Morales, A. & Fernandez-Perez, L. (2006). Suppressor of cytokine signaling (SOCS) 2, a protein with multiple functions. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, **17**, 431-439.
- Roberts, R. J. & Pearson, M. D. (2005). Infectious pancreatic necrosis in Atlantic salmon, *Salmo salar* L. *Journal of Fish Diseases*, **28**, 383-390.
- Robertsen, B. (2006). The interferon system of teleost fish. *Fish & Shellfish Immunology*, **20**, 172-191.
- Robertsen, B. (2008). Expression of interferon and interferon-induced genes in salmonids in response to virus infection, interferon-inducing compounds and vaccination. *Fish & Shellfish Immunology*, **25**, 351-357.
- Robertsen, B. (2011). Can we get the upper hand on viral diseases in aquaculture of Atlantic salmon? *Aquaculture Research*, **42**, 125-131.
- Robertsen, B., Bergan, V., Rokenes, T., Larsen, R. & Albuquerque, A. (2003). Atlantic salmon interferon genes: Cloning, sequence analysis, expression, and biological activity. *Journal of Interferon and Cytokine Research*, **23**, 601-612.
- Rombout, J., Huttenhuis, H. B. T., Picchiatti, S. & Scapigliati, G. (2005). Phylogeny and ontogeny of fish leucocytes. *Fish & Shellfish Immunology*, **19**, 441-455.
- Sasaki, A., Inagaki-Ohara, K., Yoshida, T., Yamanaka, A., Sasaki, M., Yasukawa, H., Koromilas, A. E. & Yoshimura, A. (2003). The N-terminal truncated isoform of SOCS3 translated from an alternative initiation AUG codon under stress conditions is stable due to the lack of a major ubiquitination site, Lys-6. *Journal of Biological Chemistry*, **278**, 2432-2436.
- Savan, R. & Sakai, M. (2006). Genomics of fish cytokines. *Comparative Biochemistry and Physiology Part D: Genomics and Proteomics*, **1**, 89-101.

- Schiotz, B. L., Rosado, E. G., Bækkevold, E. S., Lukacs, M., Mjaaland, S., Sindre, H., Grimholt, U. & Gjoen, T. (2011). Enhanced transfection of cell lines from Atlantic salmon through nucleofection and antibiotic selection. *BMC Research Notes*, **4**, 136.
- Schorpp, M., Bialecki, M., Diekhoff, D., Walderich, B., Odenthal, J., Maischein, H. M., Zapata, A. G., Boehm, T., Tübingen Screen, C. & Freiburg Screening, G. (2006). Conserved functions of Ikaros in vertebrate lymphocyte development: Genetic evidence for distinct larval and adult phases of T cell development and two lineages of B cells in zebrafish. *Journal of Immunology*, **177**, 2463-2476.
- Sebastián, R.-C., Kevin, M., Felipe, R.-L., Daniela, T.-A., Ana María, S. & Mónica, I. (2012). *Fish Cytokines and Immune Response*.
- Shen, L., Evel-Kabler, K., Strube, R. & Chen, S. Y. (2004). Silencing of SOCS1 enhances antigen presentation by dendritic cells and antigen-specific anti-tumor immunity. *Nature Biotechnology*, **22**, 1546-1553.
- Shepherd, B. S., Rees, C. B., Binkowski, F. P. & Goetz, F. W. (2012). Characterization and evaluation of sex-specific expression of suppressors of cytokine signaling (SOCS)-1 and -3 in juvenile yellow perch (*Perca flavescens*) treated with lipopolysaccharide. *Fish & Shellfish Immunology*, **33**, 468-481.
- Skjesol, A., Hansen, T., Shi, C. Y., Thim, H. L. & Jørgensen, J. B. (2010). Structural and functional studies of STAT1 from Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Bmc Immunology*, **11**, 17.
- Skjesol, A., Liebe, T., Iliev, D. B., Thomassen, E. I. S., Tollersrud, L. G., Sobhkezh, M., Lindenskov Joensen, L., Secombes, C. J. & Jørgensen, J. B. (2014). Functional conservation of suppressors of cytokine signaling proteins between teleosts and mammals: Atlantic salmon SOCS1 binds to JAK/STAT family members and suppresses type I and II IFN signaling. *Developmental & Comparative Immunology*, **45**, 177-189.
- Skjesol, A., Aamo, T., Hegseth, M. N., Robertsen, B. & Jørgensen, J. B. (2009). The interplay between infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) and the IFN system: IFN signaling is inhibited by IPNV infection. *Virus Research*, **143**, 53-60.
- Sobhkezh, M., Hansen, T., Iliev, D. B., Skjesol, A. & Jørgensen, J. B. (2013). The Atlantic salmon protein tyrosine kinase Tyk2: Molecular cloning, modulation of expression and function. *Developmental and Comparative Immunology*, **41**, 553-563.
- Song, M. M. & Shuai, K. (1998). The suppressor of cytokine signaling (SOCS) 1 and SOCS3 but not SOCS2 proteins inhibit interferon-mediated antiviral and antiproliferative activities. *Journal of Biological Chemistry*, **273**, 35056-35062.
- Starr, R., Metcalf, D., Elefanty, A. G., Brysha, M., Willson, T. A., Nicola, N. A., Hilton, D. J. & Alexander, W. S. (1998). Liver degeneration and lymphoid deficiencies in mice lacking suppressor of cytokine signaling-1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **95**, 14395-14399.
- Starr, R., Willson, T. A., Viney, E. M., Murray, L. J. L., Rayner, J. R., Jenkins, B. J., Gonda, T. J., Alexander, W. S., Metcalf, D., Nicola, N. A. & Hilton, D. J. (1997). A family of cytokine-inducible inhibitors of signalling. *Nature*, **387**, 917-921.
- Strandskog, G., Skjaeveland, I., Ellingsen, T. & Jørgensen, J. B. (2008). Double-stranded RNA- and CpG DNA-induced immune responses in Atlantic salmon: Comparison and synergies. *Vaccine*, **26**, 4704-4715.
- Strandskog, G., Villoing, S., Iliev, D. B., Thim, H. L., Christie, K. E. & Jørgensen, J. B. (2011). Formulations combining CpG containing oligonucleotides and poly I:C enhance the magnitude of immune responses and protection against pancreas disease in Atlantic salmon. *Developmental & Comparative Immunology*, **35**, 1116-1127.

- Sun, B. J., Skjæveland, I., Svingerud, T., Zou, J., Jorgensen, J. & Robertsen, B. (2011). Antiviral Activity of Salmonid Gamma Interferon against Infectious Pancreatic Necrosis Virus and Salmonid Alphavirus and Its Dependency on Type I Interferon. *Journal of Virology*, **85**, 9188-9198.
- Sun, F., Zhang, Y. B., Liu, T. K., Gan, L., Yu, F. F., Liu, Y. & Gui, J. F. (2010). Characterization of Fish IRF3 as an IFN-Inducible Protein Reveals Evolving Regulation of IFN Response in Vertebrates. *Journal of Immunology*, **185**, 7573-7582.
- Svingerud, T., Solstad, T., Sun, B. J., Nyrud, M. L. J., Kileng, O., Greiner-Tollersrud, L. & Robertsen, B. (2012). Atlantic Salmon Type I IFN Subtypes Show Differences in Antiviral Activity and Cell-Dependent Expression: Evidence for High IFN β /IFN γ -Producing Cells in Fish Lymphoid Tissues. *Journal of Immunology*, **189**, 5912-5923.
- Thim, H. L., Iliev, D. B., Christie, K. E., Villoing, S., Mcloughlin, M. F., Strandskog, G. & Jorgensen, J. B. (2012). Immunoprotective activity of a Salmonid Alphavirus Vaccine: Comparison of the immune responses induced by inactivated whole virus antigen formulations based on CpG class B oligonucleotides and poly I:C alone or combined with an oil adjuvant. *Vaccine*, **30**, 4828-4834.
- Towbin, H., Staehelin, T. & Gordon, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **76**, 4350-4354.
- Unitednations 2013. World Population Prospects: The 2012 Revision, Key Findings and Advance Tables. *Working Paper No. ESA/P/WP.227*. Department of Economic and social affairs, Population Division.
- Uribe, C., Folch, H., Enriquez, R. & Moran, G. (2011). Innate and adaptive immunity in teleost fish: a review. *Veterinarni Medicina*, **56**, 486-503.
- Verdier, F., Rabionet, R., Gouilleux, F., Beisenherz-Huss, C., Varlet, P., Muller, O., Mayeux, P., Lacombe, C., Gisselbrecht, S. & Chretien, S. (1998). A sequence of the CIS gene promoter interacts preferentially with two associated STAT5A dimers: a distinct biochemical difference between STAT5A and STAT5B. *Molecular and Cellular Biology*, **18**, 5852-5860.
- Vidal, O. M., Merino, R., Rico-Bautista, E., Fernandez-Perez, L., Chia, D. J., Woelfle, J., Ono, M., Lenhard, B., Norstedt, G., Rotwein, P. & Flores-Morales, A. (2007). In vivo transcript profiling and phylogenetic analysis identifies suppressor of cytokine signaling 2 as a direct signal transducer and activator of transcription 5b target in liver. *Molecular Endocrinology*, **21**, 293-311.
- Villanueva, R. A., Galaz, J. L., Valdes, J. A., Jashes, M. M. & Sandino, A. M. (2004). Genome assembly and particle maturation of the birnavirus infectious pancreatic necrosis virus. *Journal of Virology*, **78**, 13829-13838.
- Wang, T., Gorgoglione, B., Maehr, T., Holland, J. W., Vecino, J. L. G., Wadsworth, S. & Secombes, C. J. (2011). Fish Suppressors of Cytokine Signaling (SOCS): Gene Discovery, Modulation of Expression and Function. *Journal of Signal Transduction*, **2011**, 905813.
- Wang, T. & Secombes, C. J. (2008). Rainbow trout suppressor of cytokine signalling (SOCS)-1, 2 and 3: molecular identification, expression and modulation. *Molecular Immunology*, **45**, 1449-1457.
- Wang, T. H., Gao, Q. A., Nie, P. & Secombes, C. J. (2010). Identification of suppressor of cytokine signalling (SOCS) 6, 7, 9 and CISH in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* and analysis of their expression in relation to other known trout SOCS. *Fish & Shellfish Immunology*, **29**, 656-667.
- Weber, F. & Haller, O. (2007). Viral suppression of the interferon system. *Biochimie*, **89**, 836-842.

- Wergeland, H. I. & Jakobsen, R. A. (2001). A salmonid cell line (TO) for production of infectious salmon anaemia virus (ISAV). *Diseases of Aquatic Organisms*, **44**, 183-190.
- Whyte, S. K. (2007). The innate immune response of finfish – A review of current knowledge. *Fish & Shellfish Immunology*, **23**, 1127-1151.
- Wilson, M., Bengten, E., Miller, N. W., Clem, L. W., Dupasquier, L. & Warr, G. W. (1997). A novel chimeric Ig heavy chain from a teleost fish shares similarities to IgD. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **94**, 4593-4597.
- Workenhe, S. T., Rise, M. L., Kibenge, M. J. T. & Kibenge, F. S. B. (2010). The fight between the teleost fish immune response and aquatic viruses. *Molecular Immunology*, **47**, 2525-2536.
- Xiao, Z. G., Liu, H., Fu, J. P., Hu, W., Wang, Y. P. & Guo, Q. L. (2010). Cloning of common carp SOCS-3 gene and its expression during embryogenesis, GH-transgene and viral infection. *Fish & Shellfish Immunology*, **28**, 362-371.
- Xu, C., Guo, T. C., Mutoloki, S., Haugland, O. & Evensen, O. (2012). Gene expression studies of host response to Salmonid alphavirus subtype 3 experimental infections in Atlantic salmon. *Veterinary Research*, **43**, 10.
- Yasukawa, H., Misawa, H., Sakamoto, H., Masuhara, M., Sasaki, A., Wakioka, T., Ohtsuka, S., Imaizumi, T., Matsuda, T., Ihle, J. N. & Yoshimura, A. (1999). The JAK-binding protein JAB inhibits Janus tyrosine kinase activity through binding in the activation loop. *Embo Journal*, **18**, 1309-1320.
- Yoshimura, A., Naka, T. & Kubo, M. (2007). SOCS proteins, cytokine signalling and immune regulation. *Nature Reviews Immunology*, **7**, 454-465.
- Yoshimura, A. & Yasukawa, H. (2012). JAK's SOCS: A Mechanism of Inhibition. *Immunity*, **36**, 157-159.
- Zhang, J., Yu, J. P., Yang, L. L., Li, H., Wei, F., Zhao, H., Yu, W. W. & Ren, X. B. (2012). Enhanced activation of human dendritic cells by silencing SOCS1 and activating TLRs simultaneously. *Cancer Immunology Immunotherapy*, **61**, 1653-1661.
- Zhang, M., Xiao, Z. Z. & Sun, L. (2011). Suppressor of cytokine signaling 3 inhibits head kidney macrophage activation and cytokine expression in *Scophthalmus maximus*. *Developmental and Comparative Immunology*, **35**, 174-181.
- Zhang, Y. B. & Gui, J. F. (2012). Molecular regulation of interferon antiviral response in fish. *Developmental and Comparative Immunology*, **38**, 193-202.
- Zhu, L. Y., Nie, L., Zhu, G., Xiang, L. X. & Shao, J. Z. (2013). Advances in research of fish immune-relevant genes: A comparative overview of innate and adaptive immunity in teleosts. *Developmental and Comparative Immunology*, **39**, 39-62.
- Zou, J., Chang, M. X., Nie, P. & Secombes, C. J. (2009). Origin and evolution of the RIG-I like RNA helicase gene family. *Bmc Evolutionary Biology*, **9**, 14.
- Zou, J. & Secombes, C. J. (2011). Teleost fish interferons and their role in immunity. *Developmental and Comparative Immunology*, **35**, 1376-1387.
- Zwollo, P., Cole, S., Bromage, E. & Kaattari, S. (2005). B cell heterogeneity in the teleost kidney: Evidence for a maturation gradient from anterior to posterior kidney. *Journal of Immunology*, **174**, 6608-6616.

Appendix I

Reagenser

Reagenser	Produsent
Anti-Aktin antistoff, produsert i kanin, A2066	Sigma Aldrich
Bovine Serum albumin 5 %	Sigma Aldrich
Cell counting lysis buffer	Chemometec
Cell counting stabilizing buffer	Chemometec
CpG/non-CpG ODN	Thermo Scientific
Ethanol (>99,8 %)	Sigma-Aldrich
Fast SYBR®green mastermix	Applied biosystems, Life Technologies
Fetal bovine serum, FBS	Biochrom AG
Goat Anti Rabbit IgG-HRP, Sc 2004	St. Cruz Biotechnologies
Glycine	Sigma Aldrich
Heparin	LEO Pharma AS
Ikke essensielle aminosyrer	Gibco®, Life Technologies
Leibovitz´s L-15 medium, L-15	Gibco®, Life Technologies
Lipofectamine® 2000 Reagent	Invitrogen, Life Technologies
MagicMark® XP Western Protein Standard	Novex®, life Technoloies
Methanol 99,8 %	Sigma Aldrich
Minimum Essential Media, MEM	Gibco®, Life Technologies
NucleoSpin® RNA II	Macherey Nagel
NuPAGE® Antioxidant	Novex®, Life Technologies
NuPAGE® LDS sample buffer (2x)	Novex®, Life Technologies
NuPAGE® MOPS SDS Running Buffer	Novex®, Life Technologies
NuPAGE® reducing agent	Novex®, Life Technologies
RNA-later®	Ambion®, Life Technologies
RNeasy® Mini Kit	Qiagen
Rnase-Free Dnase set	Qiagen
SDS	Sigma Aldrich
Streptomycin/Penicillin	Gibco®, Life Technologies

Appendix

SuperSignal West Pico Chemoluminiscent	Thermo scientific
Tris(hydroxymethyl)aminomethane	Sigma Aldrich
Tween® 20	Sigma Aldrich
pBABE-puro, Plasmid 1764	Weinberg Lab, Addgene
Phosphate-buffered Saline, PBS	Sigma-Aldrich
Percoll	GE Healthcare
PolyI:C	Amersham Bioscience
Primere/Prober	Sigma-Aldrich
R-848	InvivoGen
SeeBlue Plus2 Pre-stained Protein Standard	Novex®, Life Technologies
SYBR®Green PCR Master Mix	Applied biosystems, Life Technologies
TaqMan® fast universal PCR Master Mix	Applied biosystems, Life Technologies
TaqMan®reverse transkription reagents	Invitrogen™, Life Technologies
TRIzol® reagent	Ambion®, Life Technologies
Trypsin/EDTA	Sigma-Aldrich
Ultra Pure Water	Biochrom AG
2-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich

Appendix II**Løsninger til Western Blotting**

Tween Tris-Buffered Saline, TTBS	
Tris-Buffered Saline, TBS 10x	100 ml
dH ₂ O	900 ml
Tween	1 ml

NuPAGE® SDS running buffer	
NuPAGE® SDS running buffer (MOPS)	40 ml
dH ₂ O	760 ml
NuPAGE® Antioxidant	0,5 ml

Blottebuffer (1L)	
Tris	3,03 g
Glycine	14,4 g
SDS	0,02 %
Methanol	20 %
dH ₂ O	ad. 1 L

Blokkebuffer	
TTBS	50 ml
BSA	2,5 g

Appendix III

RT-qPCR spesifikasjoner for de ulike forsøk

Totalt input av RNA i hver cDNA reaksjon på 20 µl* og fortynning av cDNA for videre qPCR.

Delforsøk	Totalt input RNA	Fortynnet cDNA
Normalekspressjon SOCS	500 ng	1:10
Smitteforsøk med SAV3 <i>in vivo</i>	400 ng	1:10
Primærceller stimulert med CpG, non-CpG og polyI:C i 8, 24 og 48 timer * 48 timer - 30 µl reaksjon	250 ng	1:10
Primærceller stimulert med CpG og polyI:C i 24 t og 7 dager samt restimulering med R-848 i 24 timer	250 ng	1:10
<i>In vitro</i> infeksjon av TO celler - SAV3 *30 µl reaksjon - IPNV	300 ng	1:10
CHSE-celler stabilt transfektert med SOCS1 eller SOCS2	150 ng	1:5

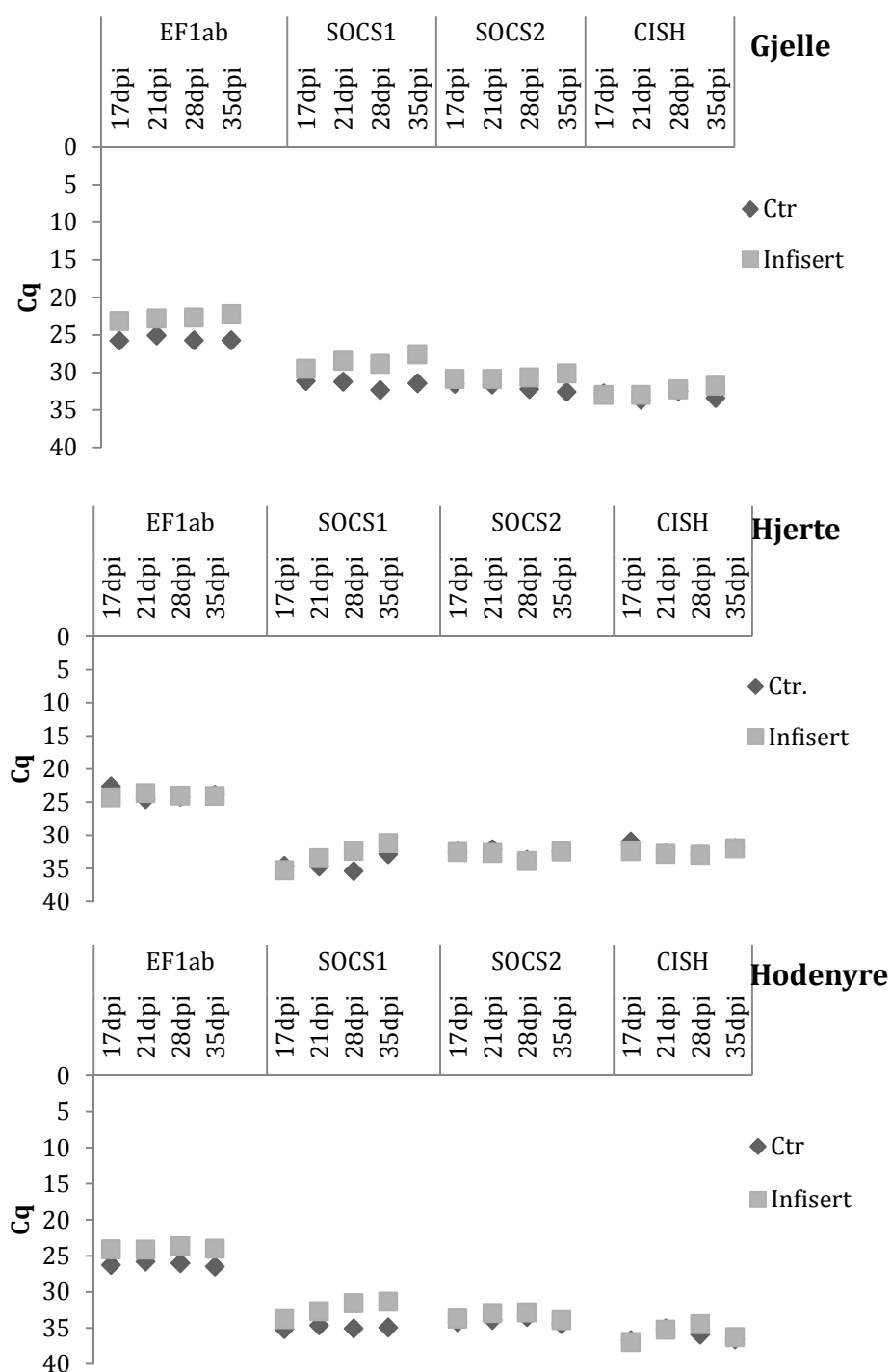
qPCR assay som ble benyttet for de enkelte forsøk.

Delforsøk	qPCR assay
Normalekspressjon SOCS	Fast SYBR®Green
Smitteforsøk med SAV3 <i>in vivo</i>	Fast SYBR®Green
Primærceller stimulert med CpG, non-CpG og polyI:C i 8, 24 og 48 timer	Standard SYBR®Green
Primærceller stimulert med CpG og polyI:C i 24 t og 7 dager samt restimulering med R-848 i 24 timer	Fast SYBR®Green
<i>In vitro</i> infeksjon av TO celler med SAV3 og IPNV - SOCS1, SOCS2, CISH, IFN1a - Mx - Absolutt kvantifisering, nsP1, VP2	Standard SYBR®Green TaqMan® fast TaqMan® fast
CHSE-celler stabilt transfektert med SOCS1 eller SOCS2	Standard SYBR®Green

Appendix IV

Gjennomsnittlige Cq-verdier

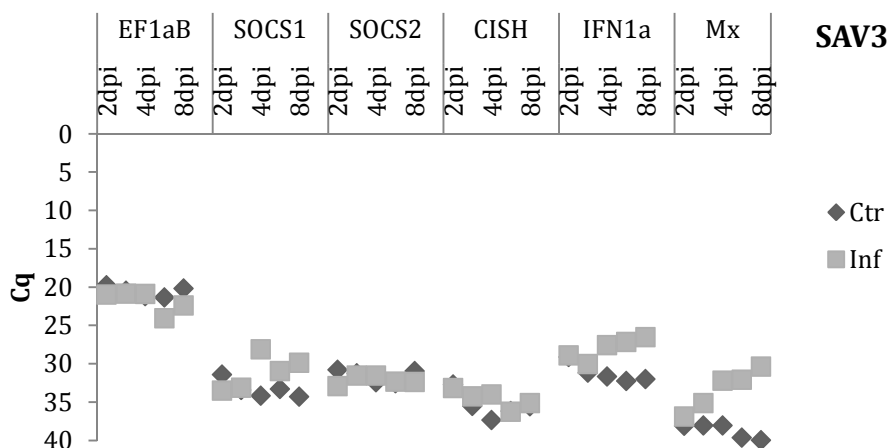
Uttrykk av SOCS-mRNA i Atlantisk laks infisert med SAV3



Gjennomsnittlige Cq-grenseverdier (threshold cycle) ved SYBR Green Real-Time PCR etter in-vivo infeksjon av laks med SAV3. Søylen viser gjennomsnittlige Cq-verdier for EF1ab som referanseggen samt SOCS 1, SOCS2 og CISH ved 17, 21, 28 og 35 dager etter infeksjon for kontroll- og infisert gruppe.

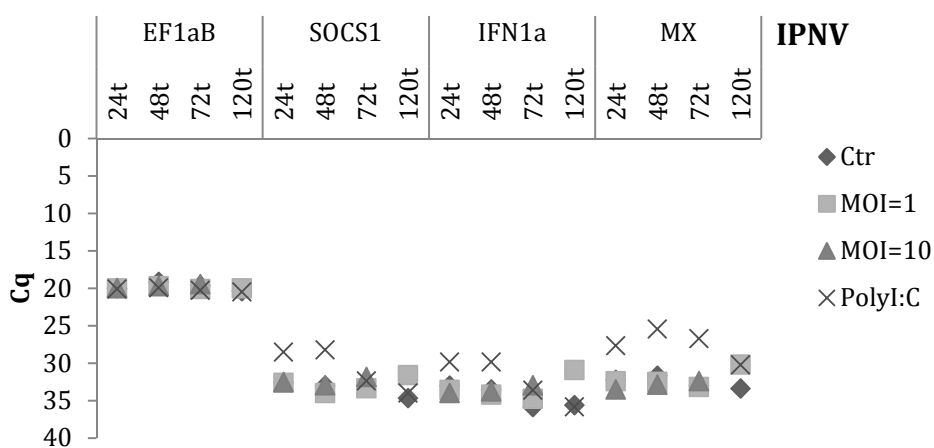
SOCS-uttrykk i TO-celler infisert med SAV3 og IPNV

Infeksjon med SAV3



Gjennomsnittlige Cq-grenseverdier (threshold cycle) ved SYBR Green Real-Time PCR etter in-vitro smitte med SAV3. Søylene viser gjennomsnittlige Cq-verdier for Ef1aB som referansegene, samt SOCS1, SOCS2, CISH, IFN1a og Mx etter smitte med SAV3 (MOI=2) i 2,3,4,7 og 8 dager.

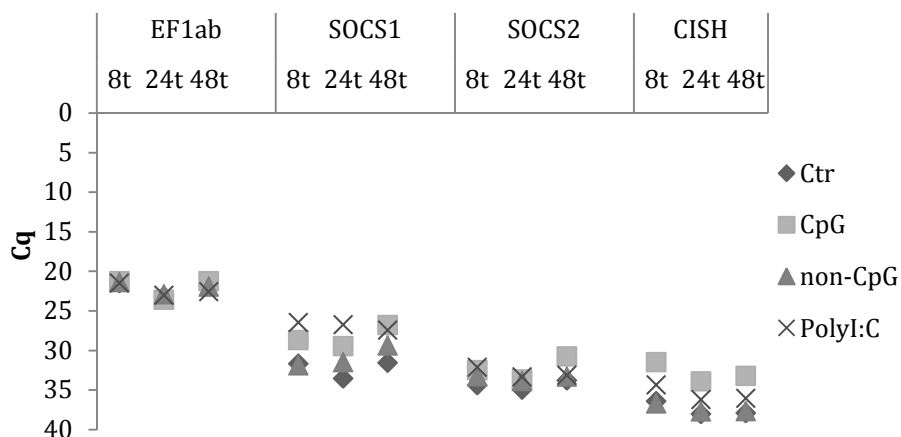
Infeksjon med IPNV



Gjennomsnittlige Cq-grenseverdier (threshold cycle) ved SYBR Green Real-Time PCR etter in-vitro smitte med IPNV. Søylene viser gjennomsnittlige Cq verdier for Ef1aB som referansegene, samt SOCS1, IFN1a og Mx etter smitte med IPNV (MOI=2) i 2,3,4,7 og 8 dager.

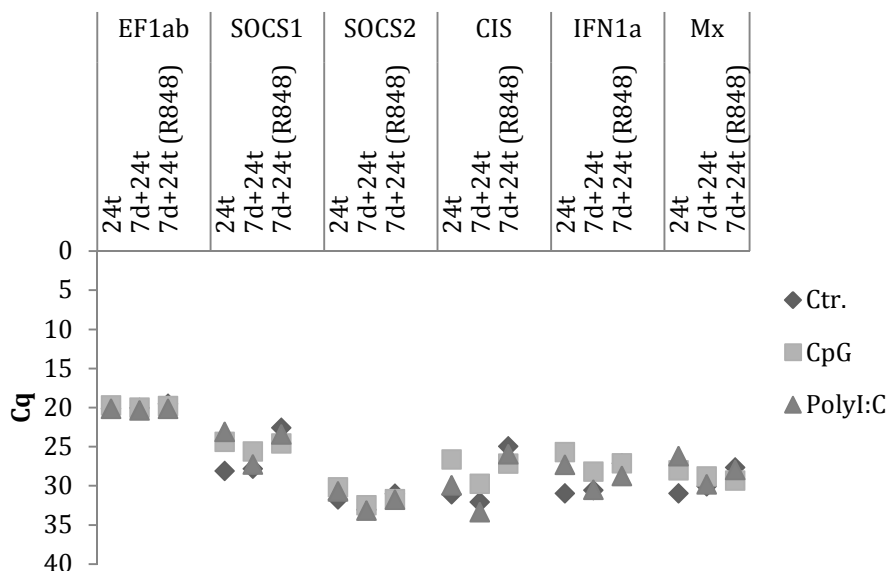
SOCS uttrykk i Leukocytter isolert fra Atlantisk laks.

Etterligning av virusinfeksjon



Gjennomsnittlige Cq-grenseverdier (threshold cycle) ved SYBR Green Real-Time PCR etter in-vitro stimulering av leukocytter med CpG, non-CpG og polyI:C. Søyene viser gjennomsnittlige Cq-verdier for EF1ab som referansen samt SOCS 1, SOCS2 og CISH etter stimulering i 8, 24 og 48 timer for kontrollceller og celler stimulert med CpG (2006T) (2 μ M), nonCpG (2007) (2 μ M) og PolyI:C (2 μ g/ml).

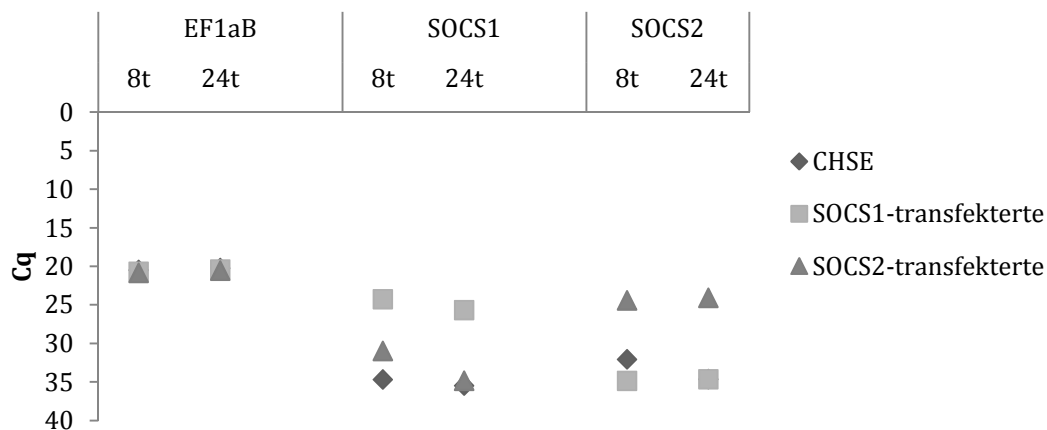
Differensiering av dendritiske celler



Gjennomsnittlige Cq-grenseverdier (threshold cycle) ved real-time PCR etter in-vitro stimulering av leukocytter med CpG, non-CpG og polyI:C samt restimulering med R 848. Søyene viser gjennomsnittlige Cq-verdier for EF1ab som referansen samt SOCS 1, SOCS2, CIS, IFN1a og Mx etter stimulering i 24 timer og 7 dager for kontrollceller og celler stimulert med CpG (2006T) (2 μ M), nonCpG (2007) (2 μ M) og PolyI:C (2 μ g/ml), samt restimulering R 848 (1 μ g/ml) i 24 timer.

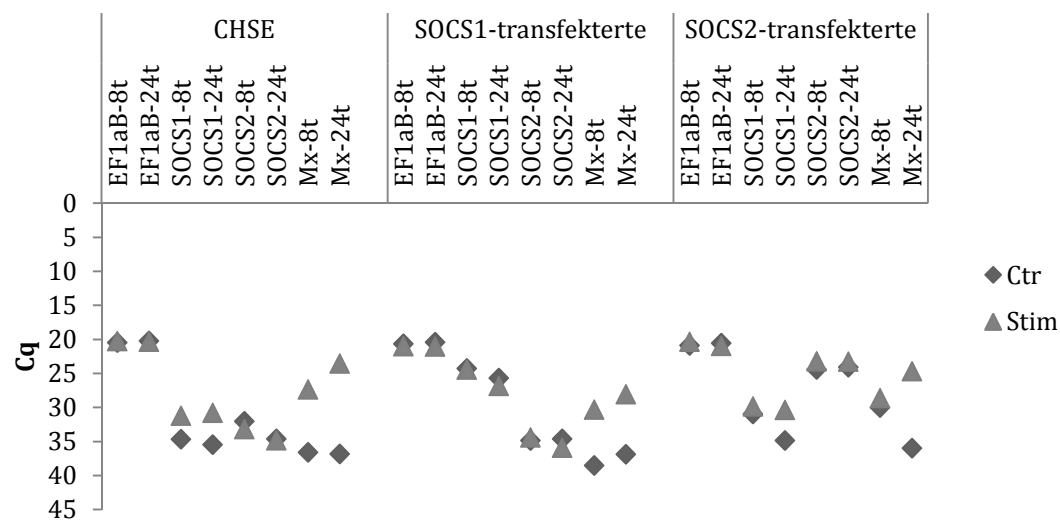
Stabil transfektering av CHSE-celler med SOCS1 og SOCS2

Etablering av cellelinjer stabilt transfektert med SOCS1 og SOCS2



Gjennomsnittlige Cq-grenseverdier (threshold cycle) ved SYBR Green Real-Time PCR i celler stabilt transfektert med SOCS1 eller SOCS2. Søyene viser gjennomsnittlige Cq-verdier for EF1ab som referanseggen samt SOCS 1, SOCS2 ved 8 og 24 timer.

Stimulering av stabilt transfekterte celler med IFN1a



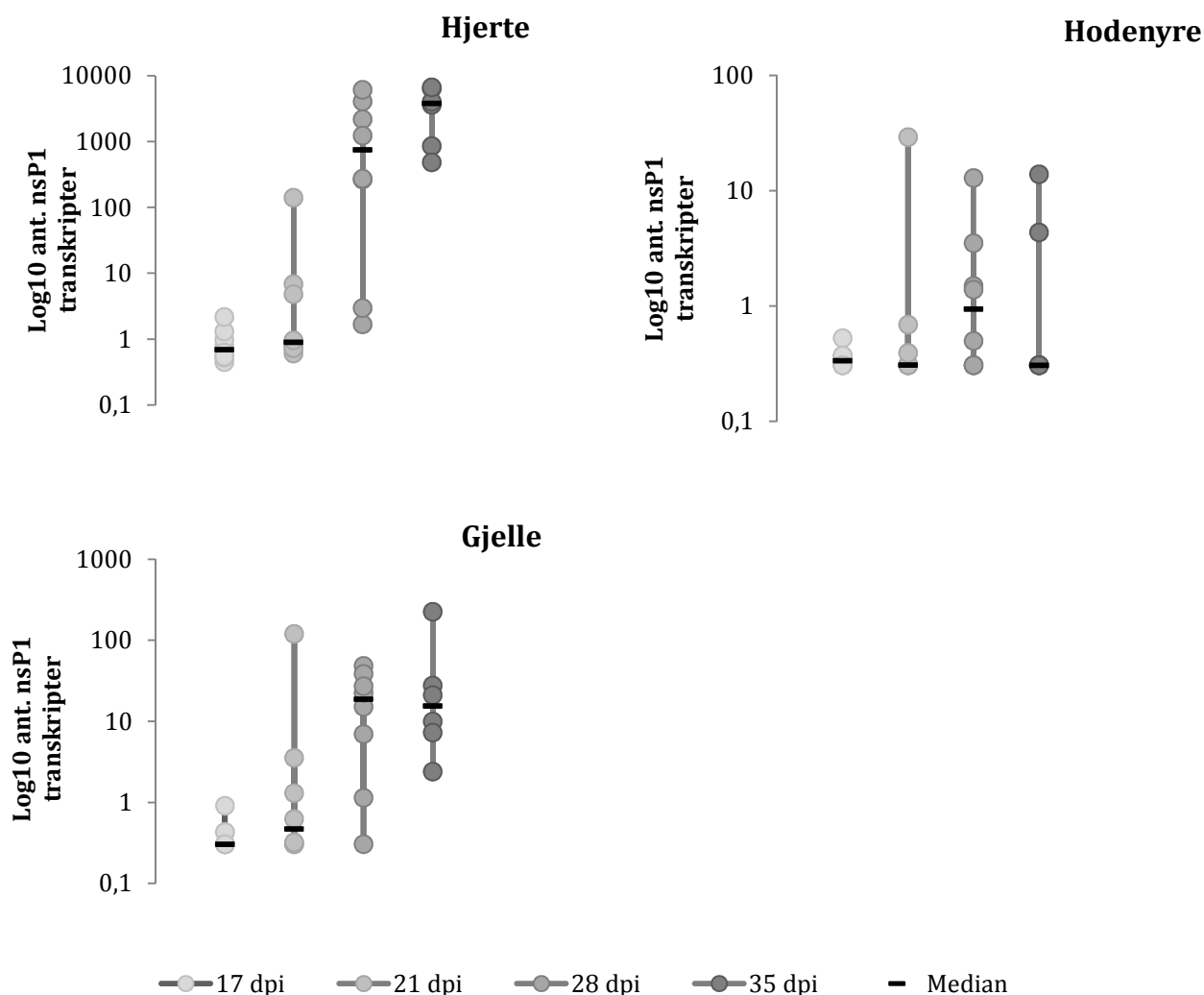
Gjennomsnittlige Cq-grenseverdier (threshold cycle) ved SYBR Green Real-Time PCR i celler stabilt transfektert med SOCS1 eller SOCS2 etter stimulering med IFN1a. Søyene viser gjennomsnittlige Cq-verdier for EF1ab som referanseggen samt SOCS 1, SOCS2 og Mx etter stimulering i 8 og 24 timer med IFN1a (500 U/ml)

Appendix V

Absolutt kvantifisering av SAV3 i hjerte, hodenyre og gjelle isolert fra atlantisk laks infisert med SAV3

Fremgangsmåte:

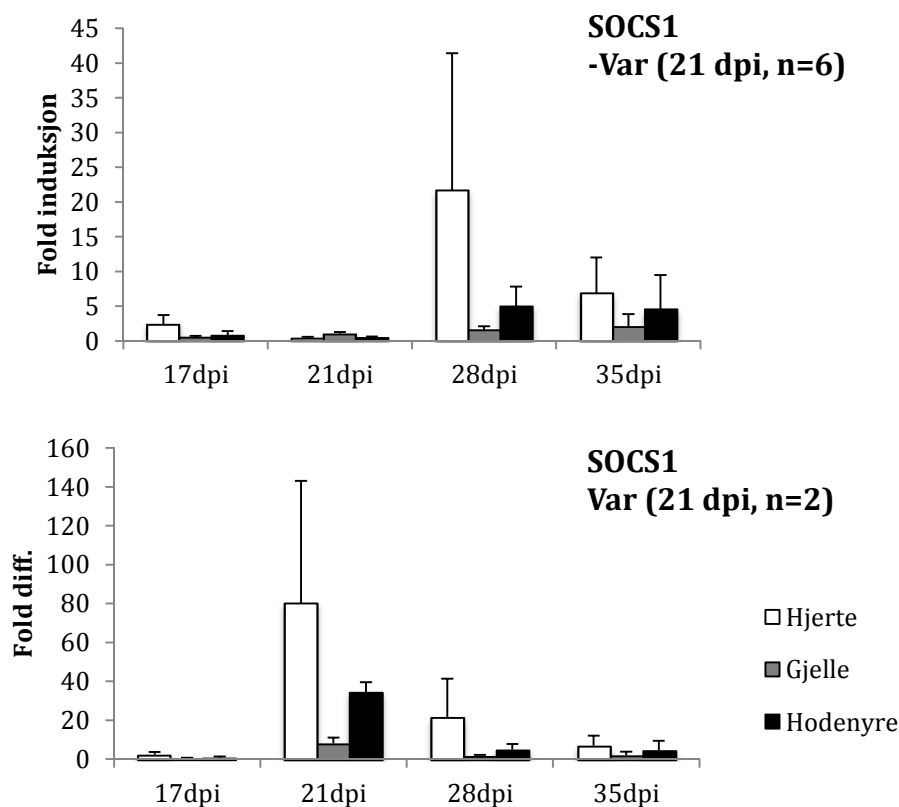
Absolutt RT-qPCR ble gjennomført av H. L. Thim med RNA som var isolert i et tidligere utført smitteforsøk ved forskningsgruppen (Fremmerlid, 2012), som beskrevet i materiale og metode. Totalt ant. nsP1 transkripter ble målt i 400 ng av totalt RNA reverst transkriptert til cDNA og fortynnet 1:10. Primer karakteristika for nsP1 er angitt i tabell 3.



Økning antall nsP1 transkripter i hjerte, hodenyre og gjelle etter *in vivo* infeksjon av laks med SAV3. Frisk, uvaksinert fisk ble utsatt for en kohabitant smittemodell med SAV3. Hjerte, gjeller og hodenyre ble tatt ut ved 17, 21, 28 og 35 dager etter smitte. Økning i nsP1 transkripter ble målt med RT-qPCR.

Appendix VI

Relativ økning i SOCS1-uttrykk i atlantisk laks infisert med SAV3.



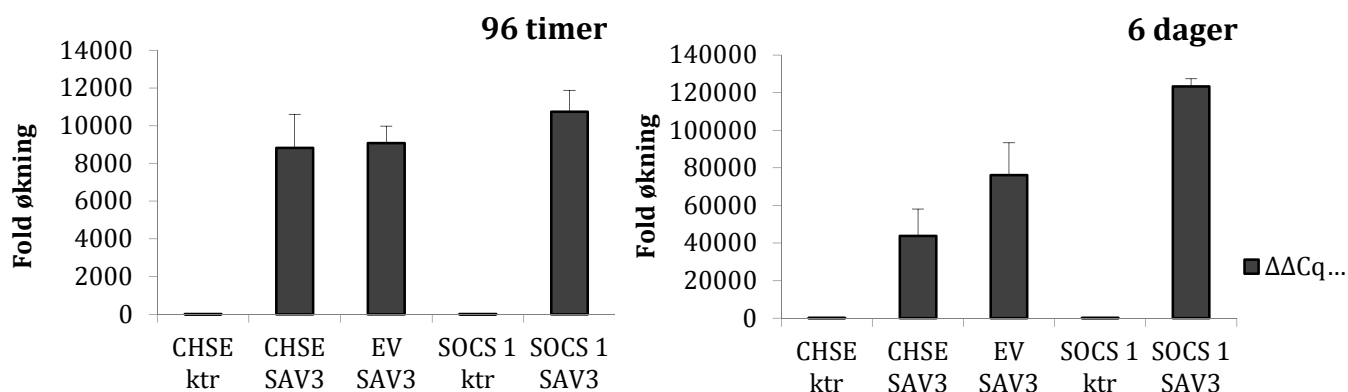
Relativ økning i genuttrykk av SOCS1 i hjerte, gjelle, hodenyre etter in-vivo infeksjon av laks med SAV3. Frisk, uvaksinert fisk ble utsatt for en kohabitant smittemodell med SAV3. Hjerte, Gjelle og hodenyre ble tatt ut ved 17, 21, 28 og 35 dager etter smitte. Forandring i genuttrykk ble målt med SYBR Green Real-Time PCR i forhold til ubehandlet kontroll som angis verdien 1. Søylene viser gjennomsnitt \pm standardavvik fra åtte fisk. For dag 21 etter smitte viser a. hovedvekten av gruppen (seks individer), b. viser to enkelt-fisk.

Appendix VII

Infisering av stabilt transfekterte celler som overuttrykker SOCS1 med SAV3.

Fremgangsmåte:

Stabilt transfekterte celler som overuttrykker SOCS1 og celler stabilt transfekterte med tom vektor (beskrevet i M&M avsnitt 2.5.1) samt CHSE celler ble infisert med SAV3 av G. Standskog. Kontrollceller ble holdt ubehandlet. Cellene ble høstet etter 96 timer og 6 dager 96. Relativ økning i nsP1 transkripter ble målt med RT-qPCR (beskrevet i M&M avsnitt 2.8). Økning i genuttrykk ble beregnet etter $\Delta\Delta Cq$ metoden.



Relativ økning i genuttrykk av nsP1 i celler stabilt transfekterte med SOCS1, tomvektor eller CHSE celler etter *in vitro* smitte med SAV3. Celler ble smittet med SAV3 i 96 timer og 6 dager. Forandring i genuttrykk ble målt med RT-qPCR i forhold til ubehandlet kontroll. Søylen viser gjennomsnitt \pm standardavvik.