

Effekt av interferon-plasmider på ekspresjon av antiviralt Mx-protein i pankreas og beskyttelse mot SAV3-infeksjon hos atlantisk laks (*Salmo salar* L.)

Iris Jenssen

Masteroppgave i Akvamedisin [60 stp]

November 2015

Forord

Denne oppgaven ble utført ved fakultetet for biologi, fiskeri og økonomi, ved Norges Fiskerihøgskole, Universitetet i Tromsø. Oppgaven ble påbegynt i januar 2015 og avsluttet i november 2015.

Først og fremst ønsker jeg å takke min dyktige hovedveileder Børre Robertsen for å ha gitt meg muligheten til å lære så mye nytt i et spennende og utfordrende fagfelt. Takk for at du alltid har hatt døren åpen når jeg har trengt hjelp. Videre vil jeg gi en stor takk til min dyktige biveileder Chia-Jung Chang for særdeles god hjelp på laben. 感謝您的幫助

Det er flere som har hjulpet meg underveis. Takk til Linn Greiner-Tollersrud for utmerket opplæring i qPCR. Ditt gode humør smitter. Jinni Gu ved Veterinærinstituttet i Trondheim fortjener også noen ord. Takk for et lærerikt opphold i Trondheim, uten din gode hjelp hadde scoring av PD-forandringer blitt særdeles utfordrende. Ellers vil jeg takke alle på labben for å alltid være behjelpelig med store og små problemer.

Tusen takk til alle mine medstudenter for å ha gitt meg en utrolig artig studietid. Det har vært en fryd å være omgitt av så mange flotte folk! Takk til Mathias for teknisk support og gode tips i skriveprosessen. Takk til Renate for flotte stunder på og utenom skolen, jeg ser frem til å ha deg som kollega! Til slutt vil jeg takke mamma og pappa for all hjelp og støtte underveis i studietiden.

Tromsø 15. november 2015

Iris Jenssen

Sammendrag

Pankreassykdom (PD) forårsakes av salmonid alfavirus (SAV) og er den mest alvorlige virussykdommen for norsk lakseoppdrett. Sykdommen har de siste årene ført til store økonomiske tap i næringen, samt fiskevelferdsmessige problemer. Den viktigste faktoren for å bekjempe fisesykdommer er forebyggende tiltak, der vaksiner av fisken er et av de viktigste tiltakene. I Norge finnes det godkjente virusvaksiner, også mot PD, men disse gir kun begrenset beskyttelse. Robertsen's forskningsgruppe undersøker om interferoner (IFN) kan benyttes til å forebygge virusinfeksjoner hos atlantisk laks (*Salmo salar* L). IFN blir produsert og skilt ut fra virusinfiserte celler der de binder seg til reseptorer på andre celler, som initierer produksjon av antivirale proteiner. IFN hos laks har lav sekvenslikhet og binder seg til ulike reseptorer, dette tyder på at de har forskjellige funksjoner i fisken. Denne oppgaven hadde to hovedmål. Først ble det undersøkt om intramuskulær (i.m) injeksjon av IFN-plasmider (pIFN) kodet med gen for IFNa, IFNb eller IFNc førte til produksjon av antiviralt Mx-protein i eksokrin pankreas. Pankreas ble undersøkt da dette er et av målorganene for SAV. Videre ble det undersøkt om IFN-plasmidene ga beskyttelse mot SAV3-infeksjon hos laks.

Det ble med kvantitativ RT-PCR (qPCR) vist at IFNb og særlig IFNc ga et økt uttrykk av Mx-mRNA i pankreas en og to uker etter i.m. injeksjon av p-IFN. Immunohistokjemi ble benyttet til å detektere Mx-protein i pankreas to og ti uker etter i.m. injeksjon av p-IFN. Kun IFNc induiserte uttrykk av Mx-protein i eksokrine celler i pankreas to uker etter i.m. injeksjon. Ti uker etter injeksjon ble det detektert uttrykk av Mx-protein i eksokrine celler både fra fisk injisert i.m. med IFNb- eller IFNc-plasmid. IFNc ga et sterkere uttrykk av Mx-protein sammenlignet med IFNb. For å undersøke om p-IFN ga laks beskyttelse mot SAV-3 infeksjon ble kvantitativ virusmengde i blod målt med qPCR en uke etter infeksjon. I tillegg ble histopatologiske forandringer i virusets målorganer undersøkt tre uker etter infeksjon. IFNb og IFNc ga henholdsvis signifikant og meget signifikant lavere virusmengde i blod sammenlignet med kontrollgrupper. Alle fisker injisert med IFNa-plasmid eller IFNb-plasmid hadde uttalte forandringer i pankreas og hjerte etter SAV-infeksjon. I motsetning hadde majoriteten av fisk injisert med IFNc-plasmid bare moderate forandringer i hjerte og pankreas. Resultatene indikere at IFNc kan benyttes til å gi økt beskyttelse mot SAV-3 virus.

Innholdsfortegnelse

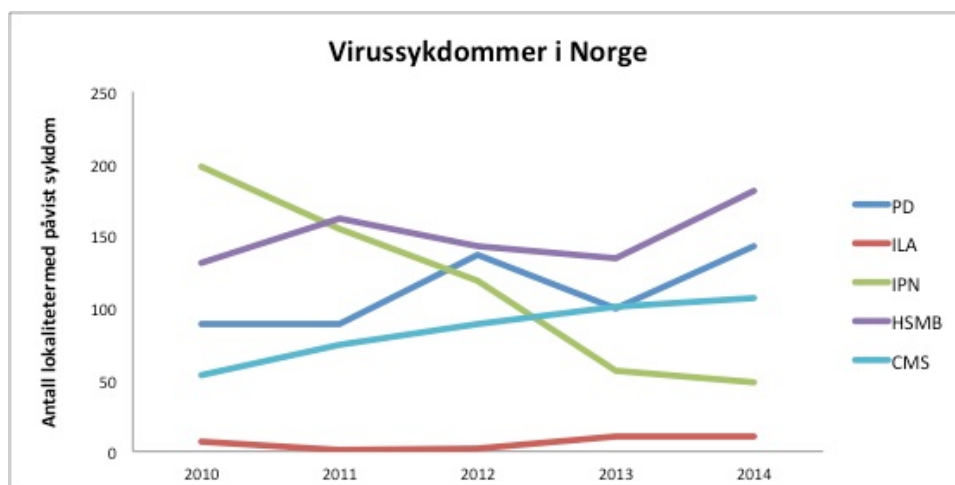
1	Innledning	1
1.1	Bakgrunn	1
1.2	Pankreassykdom (PD)	3
1.2.1	Sykdomsforløp	3
1.2.2	patologiske endringer i vev	4
1.2.3	Pankreas	4
1.2.4	Hjerte	5
1.2.5	Skjelettmuskel	5
1.3	Virusvaksiner	6
1.4	Rollen til interferon i det medfødte immunsystemet	7
1.4.1	Reseptorer som gjenkjenner virus	7
1.4.2	Interferoner	9
1.4.3	Interferon reseptorer	10
1.4.4	Antivirale proteiner induert av interferoner	11
1.4.5	Antiviralt Mx-protein	12
1.5	Interaksjon mellom SAV og IFN-systemet hos laks	12
1.5.1	induksjon av IFN og antivirale proteiner ved SAV-infeksjon	12
1.5.2	Effekt av IFN på replikasjon av SAV i cellekultur	13
1.6	Effekt av IFN-I på virusinfeksjon hos laks <i>in vivo</i>	13
1.7	Problemstilling	15
2	Materialer og metoder	16
2.1	Forsøksfisk	16
2.2	Oppformering av plasmider og virus	16
2.3	Forsøksoppsett og prøveuttak del 1	17
2.4	Forsøksoppsett og prøveuttak del 2	18
2.5	Kvantitativ RT-PCR	19
2.6	Måling Mx	20
2.6.1	RNA-isolering	20
2.6.2	cDNA-syntese	21
2.6.3	Kvantitativ RT-PCR	21
2.6.4	Databehandling	23
2.7	Måling SAV-3	24
2.7.1	RNA-isolering	24
2.7.2	cDNA-syntese	24
2.7.3	Kvantitativ RT-PCR	24
2.7.4	Analysering	24
2.8	Immunohistokjemi	26
2.8.1	Dehydrering	26
2.8.2	Snitting av vev	27
2.8.3	Deparafinisering og rehydrering	27
2.8.4	Antigengjenvinning	28
2.8.5	Blokkering og immunohistokjemisk farging	28
2.8.6	Mikroskopering	29
2.9	Histopatologi	30
2.9.1	Dehydrering, innstøpning og snitting av vev	30
2.9.2	Farging av vev	30
2.9.3	Mikroskopering	31
2.9.4	Analyse av resultater	31
3	Resultater	34
3.1	Effekt av IFN-plasmider på uttrykk av antiviralt Mx-protein i pankreas	34
3.1.1	Effekt av IFN-plasmider på uttrykk av Mx-mRNA i pankreas	34

3.1.2	Effekt av IFN-plasmider på proteinuttrykk av Mx i pankreas	36
3.2	Effekt av IFN-plasmider på beskyttelse mot infeksjon av SAV3	38
3.2.1	Måling av SAV3-mengde i blod ved qPCR.....	39
3.2.2	Histopatologisk undersøkelse	40
3.2.3	Pankreas.....	40
3.2.4	Hjerte.....	44
3.2.5	Muskel.....	48
4	Diskusjon	49
4.1	Effekt av IFN-plasmider på uttrykk av antiviralt MX-protein i pankreas	49
4.2	Effekt av IFN-plasmider på beskyttelse mot SAV3	53
4.3	Kan interferoner-plasmider benyttes til å beskytte laks mot SAV?	56
4.4	Konklusjon.....	58
	Referanser	59
	Appendix I - Reagenser	69
	Appendix II- Løsninger til PCR	71
	Mx-uttrykk.....	71
	SAV3.....	72
	Appendix III- Løsninger til immunhistokjemi og histologi	73
	Appendiks IV- Score resultater	75

1 Innledning

1.1 Bakgrunn

Virussykdommer utgjør en av de største utfordringene for oppdrett av atlantisk laks (*Salmo salar* L.). I Norge er kontroll av virussykdommer nedfelt i forskrifter som omfatter forebygging, begrensning og bekjempelse av smittsomme sykdommer. Smitteforebyggende tiltak som soneinndeling, generasjonsskille, utslakting og brakklegging, og regelmessig renhold av utstyr benyttes for å hindre smittespredning av infeksjøs mikrober, som virus. Ved økt dødelighet eller mistanke om listesykdom skal helsekontroll gjennomføres slik at sykdom raskt kan påvises og bekjempes (FKD, 2008a, FKD, 2008b). Det er også innført avl av laks med økt motstandsdyktighet mot virus for å få bukt på sykdommen infeksjøs pankreas nekrosevirus (IPNV) (Storset et al., 2007). En av de viktigste faktorene for suksess og vekst innen lakseoppdrettsnæringen er effektive vaksiner (Brudeseth et al., 2013). Et godt eksempel på dette er bakterievaksiner. På grunn av effektive vaksiner anses ikke bakteriesykdommer, med unntak av vintersår, som et problem i næringen (Hastein et al., 2005, Bornø og Lineaker, 2015). Det eksisterer derimot få effektive vaksiner mot virussykdommer, noe som skaper store utfordringer for oppdrettsnæringen (Kibenge et al., 2012). Dette er illustrert i Figur 1, som viser de viktigste virussykdommene i norsk oppdrett av laksefisk. Her observeres en økende trend av antall lokaliteter med påvist sykdom forårsaket av infeksjøs lakseanemi (ILA), hjerte- og skjelettmuskelbetennelse (HSMB), kardiomyopatisyndrom (CMS) og PD (Bornø og Lineaker, 2015). Den mest tapsbringende virussykdommen i norsk fiskeoppdrett forårsakes av salmonid alfavirus (SAV) og fører til pankreassykdom (PD) hos laksefisk i sjø (Bornø og Lineaker, 2015). Gjennom soneforskrifter benytter Norge en tredelt bekjempelsesstrategi mot to ulike varianter av viruset, SAV2 og SAV3. Forskriftene omfatter en rekke smittehygieniske tiltak, i tillegg til rask utslakting og brakklegging av anlegg ved påvisning av sykdommen i visse områder (FKD, 2007, FKD, 2012, FKD, 2015). Kommersiell vaksine er også tilgjengelig som forebyggende tiltak, men denne gir kun en begrenset beskyttelse mot PD (Jensen et al., 2012). Til tross for strenge tiltak og vaksiner er forekomsten av PD-tilfeller høy, noe som skaper store utfordringer for oppdrettsnæring og forvaltning (Bornø og Lineaker, 2015).



Figur 1. Viktige virussykdommer hos laksefisk i Norge. Figuren viser antall nye lokaliteter med påvist sykdom registrert ved Veterinærinstituttet fra 2010 t.o.m 2014. Pankreassykdom(PD), infeksiøs lakseanemi (ILA), infeksiøs pankreas nekrose (IPNV), hjerte- og skjelettmuskelbetennelse (HSMB) og kardiomyopati syndrom (CMS). Tabellen er basert på tall fra (Bornø og Lineaker, 2015).

Atlantisk laks har i utgangspunktet et velutviklet medfødt immunforsvar og er relativt motstandsdyktig mot virussykdommer. Interferonsystemet utgjør den viktigste komponenten i førstelinjeforsvaret til laksen. Ved infeksjon vil vertsceller gjenkjenne virus-RNA, dette setter i gang syntese og sekresjon av interferoner (IFN). Interferoner er alarmproteiner som initierer produksjon av antivirale proteiner i friske vertsceller, som hemmer videre virusreplikasjon. I oppdrett kan uheldige forhold som stress og infeksjon svekke fiskens førstelinjeforsvar, og dermed gjøre den mer mottakelig for infeksjoner (Robertsen, 2006, Robertsen, 2011). Robertsens forskningsgruppe undersøker om IFN kan benyttes til å beskytte laks mot virusinfeksjoner. Gruppen har vist at intramuskulær (i.m.) injeksjon IFN-plasmid (pIFN) gir høy beskyttelse mot infeksjon av infeksiøs lakseanemi virus (ILAV) i minst 8 uker (Chang et al., 2014). I denne oppgaven ble det undersøkt om i.m injeksjon av ulike pIFN hadde evne til å beskytte laks mot infeksjon av SAV3.

1.2 Pankreassykdom (PD)

Pankreassykdom ble først beskrevet i Skottland i 1976 og forårsaker sykdom hos laksefisk i en rekke land i Europa (Munro et al., 1984, McLoughlin og Graham, 2007). Viruset er medlem av slekten alfavirus i familien *Togaviridae*. Til nå er seks undergrupper beskrevet, SAV1-SAV6 (Nelson et al., 1995, Fringuelli et al., 2008). I Norge eksisterer to varianter, SAV2 og SAV3. Begge variantene er listeført på liste 3- nasjonale sykdommer og mistanke om sykdom er dermed meldepliktig (FKD, 2008a). Alvorlige utbrudd av SAV3 er blitt diagnostisert hos atlantisk laks og regnbueørret (*Oncorhynchus mykiss*) på Vestlandet de siste 20 årene, mens SAV2 ble først detektert hos oppdrettslaks i 2011 (Hodneland et al., 2005, Weston et al., 2005, Karlsen et al., 2006, Jansen et al., 2010, Hjortaas et al., 2013). Variantene er geografisk distribuert i to separate, endemiske soner; SAV3 forårsaker sykdom på Vestlandet opp til Sunnmøre, mens SAV2 forårsaker sykdom hos laks i Romsdalen, Nordmøre og Sør-Trøndelag (Hjortaas et al., 2015). Smitteforsøk tyder på at transmisjon av virus skjer gjennom fiskens avføring og slim. Viruset spres horisontalt via vannmassene og kan dermed bli transportert over store avstander. Modellering har vist at nærhet til anlegg med PD-utbrudd øker sjansen for å få utbrudd i eget anlegg (McLoughlin et al., 1996, Kristoffersen et al., 2009, Graham et al., 2011). Virussykdommen fører til store økonomiske tap. Aunsmo og medarbeidere beregnet direkte kostander assosiert med PD-utbrudd til 14,4 millioner kroner. Beregning var basert på en lokalitet med 500 000 smolt, der produksjon ble redusert til 70% av salgbar biomasse (Aunsmo et al., 2010).

1.2.1 Sykdomsforløp

Smolt som tilbringer første år i sjøfase er mest utsatt for PD. Dødeligheten varierer betydelig, fra akutt høy dødelighet til lav dødelighet som sprer seg over flere måneder. En til to uker før sykdommen oppdages er det ofte et brått fall i appetitt hos smittet fisk. Dødeligheten øker og fisker med klinisk sykdom oppholder seg ved kanten av merden, ved overflaten eller hviler på bunnen av nota (Crockford et al., 1999, McLoughlin et al., 2002, Taksdal et al., 2007). Fiskene som har overlevd utbrudd vil etter en tid gå inn i restitusjonsfase med økt appetitt og aktivitetsnivå. Restitusjonsfasen kan starte fra to uker til tre måneder etter utbrudd, avhengig av miljøforhold og alvorlighetsgrad på

utbruddet. Fisken som ikke restitueres vil raskt miste vekt, bli mørkfarget og pinneformet (McVicar, 1987, McLoughlin et al., 2002). Marine SAV2-utbrudd resulterer generelt i lavere dødelighet der kliniske tegn er mildere sammenlignet med SAV3-utbrudd (Taksdal et al., 2014, Bornø og Lineaker, 2015, Jansen et al., 2015).

1.2.2 *patologiske endringer i vev*

patologiske endringer i klinisk syk fisk karakteriseres med alvorlig tap av eksokrin pankreas, samt nekrose og varierende grad av inflammasjon i hjerte- og skjelettmuskel. Alvorlighetsgrad og distribusjon av patologiske skader vil variere avhengig av hvor i sykdomsforløpet prøvetakingen skjer (McLoughlin et al., 2002, Taksdal et al., 2007, Christie et al., 2007). I sykdomsforløpet vil ikke endringer i affiserte vev utvikles synkront. Lesjoner i målorganene pankreas, hjerte og skjelettmuskel er delt opp i følgende faser: akutt, sub-akutt, kronisk og restitusjonsfase etter Tabell 1 (McLoughlin et al., 2002, Taksdal et al., 2007).

Tabell 1. Forhold mellom organlesjon og utviklingsfase av PD. Tabell er hentet fra (Taksdal et al., 2007) og tillat for bruk av Torunn Taksdal.

Stadium	Pankreas	Hjerte	Muskulatur
Akutt	+	+/-	-
Sub-akutt	+	+	-
Kronisk	+	+	+
Restitusjon	-/+	-(+)	+

1.2.3 *Pankreas*

Patologiske undersøkelser viser at det første organet som blir akutt skadet av SAV er eksokrin pankreas, der det observeres akutt nekrose av eksokrine celler. Tidligere forsøk har vist at det er vanskelig å detektere akutt stadium i utviklingsfasen da fasen er relativt kortvarig. Overgangen til sub-akutt og kronisk fase observeres med alvorlig tap av eksokrin pankreas. Infiltrasjon av leukocytter kan variere fra ingen inflammasjon til

massiv inflammasjon av mononukleære celler (McLoughlin et al., 2002, Desvignes et al., 2002, Taksdal et al., 2007, McLoughlin og Graham, 2007, Xu et al., 2012a). I restitusjonsfase observeres intakte eksokrine celler (Munro et al., 1984, Desvignes et al., 2002, McLoughlin et al., 2002).

1.2.4 Hjerte

Akutt fase i hjerte observeres samtidig som eller rett i etterkant av nekrose i eksokrin pankreas. Endringer i hjerte omfatter fokal eller multifokal myocyttnekrose, der begge lag i ventrikkel og atrium kan være affisert. Patologiske endringer kan variere fra fokale nekroser til omfattende diffus nekrose i hele hjertemuskulaturen. Affiserte celler har pyknotisk (stadium i nekrose der cellekjerne kondenserer) cellekjerne. Cytoplasma i affiserte celler er eosinofile (sterkt farget av det røde fargestoffet eosin) og innskrunpet. Grad av inflammasjon i form av leukocytter kan variere (Desvignes et al., 2002, McLoughlin et al., 2002, Taksdal et al., 2007). I restitusjonsfase observeres hypertrofi (forstørrelse) av myocyttkjerner, særlig i overgangen mellom kompakt og spongiøst lag i ventrikkelen (McLoughlin et al., 2002).

1.2.5 Skjelettmuskel

Det er vanlig å finne patologiske endringer i skjelettmuskel tre til fire uker etter at skader i pankreas og hjerte er observert. Både rød og hvit muskulatur affiseres, oftest er en høyere andel av røde muskelfibre skadet sammenlignet med hvite muskelfibre. Skadene består av degenerering i form av nekrotiske muskelfibre med sentral migrasjon av muskelkjerne og inflammasjon i form av fagosyterende makrofager (McLoughlin og Graham, 2007, Taksdal et al., 2007). I restitusjonsfasen observeres hypertrofi av gjenværende muskelkjerne assosiert med basofilt cytoplasma (Taksdal et al., 2007). Sammenlignet med infeksjoner som forekommer naturlig er det ikke alltid at patologiske forandringer observeres i skjelettmuskel ved eksperimentelle forsøk (Murphy et al., 1995, Desvignes et al., 2002).

1.3 Virusvaksiner

For å utvikle virusvaksiner eksistere det fire ulike vaksinekonsepter: levende attenuerte vaksiner, rensede subenhet-vaksiner (proteiner eller glykoproteiner fra mikrober), helvirusvaksiner og DNA-vaksiner (Sommerset et al., 2005a, Evensen og Leong, 2013, Brudeseth et al., 2013). De fleste kommersielt tilgjengelige virusvaksiner består av inaktiverte virus eller rekombinante subenheter fra virus. Bakdelen med disse er at det er vanskelig å lage subenhet-vaksine med korrekt konformasjon mens det krever svært høye doser av inaktiverte virus for å oppnå tilstrekkelig beskyttelse (Sommerset et al., 2005a).

DNA-vaksiner mot virus består av nakent plasmid-DNA (pDNA). DNA-vaksine injiseres vanligvis i.m. hos fisk, der muskelceller tar opp pDNA som transkriberes til mRNA og translateres til protein (Gillund et al., 2008). Etter injeksjon vil immunresponser i hovedsak initieres av antigen-presenterende celler (APC), der profesjonelle APC som makrofager og dendrittiske celler er svært viktige for aktivering av adaptive responser (Corr et al., 1996, Doe et al., 1996). APC aktiverer T-celler, som videre aktiverer B-celler. Dette fører til antistoffproduksjon mot virusantigenet. I tillegg vil APC aktivere produksjon av cytotoksiske T-celler som dreper virusinfiserte celler (Gillund et al., 2008). Hos fisk er det vist at DNA-vaksiner raskt induserer en uspesifikk antiviral aktivitet forårsaket av IFN type I-produksjon (IFN α og IFN β), etterfulgt av spesifikke immunresponser (Kim et al., 2000).

DNA-vaksiner er svært lovende for å forebygge virussykdommer da de gir høyere beskyttelse enn inaktiverte vaksiner, subenhetvaksiner og helvirusvaksiner (Evensen og Leong, 2013). DNA-vaksiner mot flere virussykdommer i fiskeoppdrett er prøvd ut, med varierende resultater (Lorenzen et al., 1999, Tonheim et al., 2008). Den eneste kommersielle DNA-vaksinen til fisk ble godkjent for salg i 2005 av Canadisk Byrå for Matsikkerhet (CFIA) og beskytter laks mot infeksiøs hematopoetisk nekrose virus (IHNV). Selv om vaksinen er hyppig brukt i Canada er det enda ikke rapportert utbrudd av IHNV i vaksinerte populasjoner (Salonius et al., 2007, Kutzler og Weiner, 2008, Evensen og Leong, 2013, Brudeseth et al., 2013). I Europa er det enda ikke godkjent å bruke DNA-vaksiner i akvakultur da det er behov for mer kunnskap om risikoaspekter

som stabiliteten til pDNA, integrering av pDNA i kromosom og uønskede immunologiske reaksjoner (Gillund et al., 2008, Hølvold et al., 2014).

1.4 Rollen til interferon i det medfødte immunsystemet

Det medfødte immunsystemet fungerer som et førstelinjeforsvar mot potensielle patogener. Systemet består av hudbarriere, fagocytter, dendrittiske celler, naturlige drapsceller (NK-celler), cytokiner og plasmaproteiner, inkludert proteiner i komplementærsystemet (Abbas et al., 2012). I forsvaret mot intracellulære virus vil det medfødte immunsystemet reagere med å aktivere NK-celler, som dreper virusinfisert celler, og via interferon type I (IFN-I) som blokkerer virusreplikasjon i vertscelle (Abbas et al., 2012). Ved tilstedeværelse av virus aktiveres reseptorer som uttrykkes på celleoverflater, i intracellulære organeller, eller sekreteres ut i blodstrøm. Aktivering av reseptorer fører til flere typer medfødte immunresponser som bidrar til å bekjempe virusinfeksjon (Medzhitov og Janeway, 1997, Janeway og Medzhitov, 2002).

1.4.1 Reseptorer som gjenkjenner virus

Fisk har en rekke reseptorer som gjenkjenner potensielle patogener: Toll-lignende reseptorer (TLR), RIG1- lignende reseptorer (RLR), NOD-lignende reseptorer (NLR) og C-type lektin reseptorer (CLR) (Zhu et al., 2013). Her vil TLR og RLR beskrives næremer da de er viktige komponenter i virusforvaret.

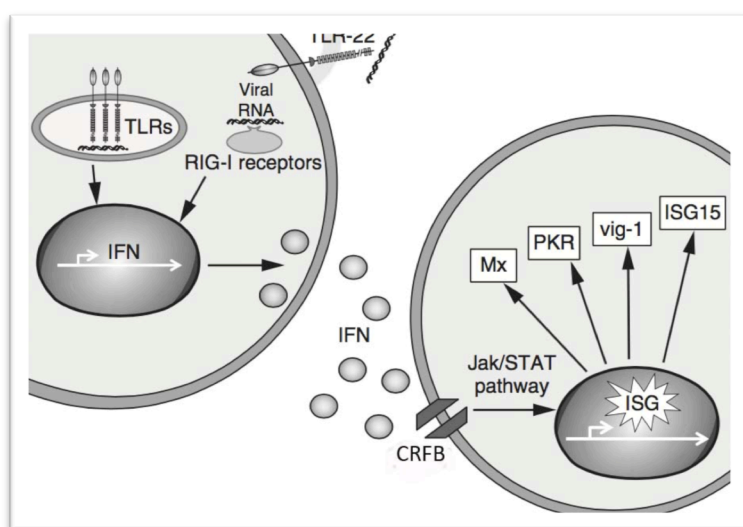
TLRs er transmembranreseptorer som primært aktiveres av nukleinsyrer. Hos mennesker blir dobbeltrådig-RNA (ds-RNA), enkeltrådig-RNA (ss-RNA) og DNA fra virus og bakterier gjenkjent av TLR3, TLR7, TLR8 og TLR9 (Jørgensen, 2014). I tillegg til TLR-varianter som finnes hos mennesker er seks fiskespesifikke TLR identifisert: TLR14, TLR19, TLR20, TLR21, TLR22 og TLR23 (Oshiumi et al., 2003, Meijer et al., 2004, Jørgensen, 2014). I forsvaret mot virus er TLR3, TLR7, TLR8, TLR9 og TLR22 sentrale. TLR3 gjenkjenner ds-RNA, TLR7 og TLR8 gjenkjenner ss-RNA, TLR9 gjenkjenner viralt DNA og TLR22 gjenkjenner lengre segmenter ds-RNA. Alle TLR-reseptorene befinner seg i endosomer i cellene, med unntak av TLR22 som befinner seg på celleoverflaten (Matsuo et al., 2008, Palti, 2011).

RLR befinner seg i cytoplasma i de fleste celler hos pattedyr og består av tre medlemmer: RIG-I, MDA5 og LGP2. RIG-I og MDA5 gjenkjenner RNA fra virus og begge har lik oppbygning med tre ulike domener, inkludert kaspaseaktivering og rekruteringsdomener (CARDs) (Yoneyama et al., 2005, Saito et al., 2007, Loo og Gale, 2011). LGP2 mangler N-terminal med CARDs, men har ellers samme oppbygning som de andre medlemmene. Rollen til LGP2 er trolig å regulere RIG-I og MDA5 signalisering (Yoneyama et al., 2005). Alle medlemmene av RLR er funnet i fisk, men i motsetning til pattedyr er ikke hele signalveien kartlagt. De ulike RLR-medlemmene i fisk ser ut til å ha samme funksjoner som hos pattedyr (Yang et al., 2011, Chang et al., 2011, Rajendran et al., 2012, Zhu et al., 2013).

Aktivering av virusreseptorer trigger flere signalveier som igjen regulerer aktivering av ulike transkripsjonsfaktorer. Interferonregulatoriske faktorer (IRFs), som IRF3 og IRF7 er viktige transkripsjonsfaktorer for IFN-signalering, da de initierer IFN-produksjon (Kumar et al., 2011, Zhang og Gui, 2012).

1.4.2 Interferoner

Etter syntese blir IFN-I skilt ut av virusinfiserte celler og fraktet med blodbanen til andre celler der interferoner binder til CRFB-reseptorer. Dette trigger signaltransduksjon gjennom JAK-STAT-signalveien som igjen fører til produksjon av antivirale proteiner (Samuel, 2001, Robertsen, 2006, Svingerud et al., 2012). Figur 2 illustrerer mekanismene for induksjon av IFN-I og effekten av IFN-I.



Figur 2. Skjematisk oversikt av type I IFN-signalvei. Virusinfisert celle har virusreseptorer på celleoverflaten (TLR22), i transmembranen til endosomer (TLR 3/7/8/9) og i cytoplasma (RIG-I og MDA5). Virusreseptorene gjenkjenner viralt RNA/DNA, aktivering av reseptorer trigger signalveier som resulterer i produksjon av IFN via interferon regulatoriske faktorer. IFN fraktes med blodbane og binder til CRFB -reseptor som aktiverer Jak/STAT-signalvei. Dette vil videre initiere uttrykk av flere hundre interferonstimulerte responselementer, deriblant antiviralt Mx-protein. Figur er hentet fra Jørgensen, 2014, og tiltatt for bruk av Jorunn Jørgensen.

Basert på ulik struktur og funksjon er interferoner delt inn i tre grupper hos vertebrater: IFN type I (IFN-I), IFN type II (IFN-II) og IFN type III (IFN-III). Hos mennesker er det funnet mange gener for IFN-I, disse inkluderer tretten IFN α -gener, et IFN β -gen og et IFN ω -gen, mens det bare er funnet et gen for IFN-II og IFN-III: henholdsvis IFN γ -gen og IFN λ -gen (Platanias, 2005, Iversen og Paludan, 2010). IFN-I og IFN-III er viktigst i det medfødte immunforsvaret, mens IFN-II er viktigst i det adaptive immunsystemet (Robertsen, 2006). Hos laks er det identifisert 13 IFN-gener av IFN-I, der genene koder for fire ulike IFN undergrupper; IFNa (tre gener), IFNb (fire gener), IFNc (fem gener) og

IFN δ (et gen). IFN α og IFN δ har en disulfidbinding, mens IFN β og IFN γ har to disulfidbindinger. De ulike undergruppene har kun 22-37% sekvenslikhet og viser store forskjeller i cellulært uttrykk og antiviral aktivitet. (Sun et al., 2009, Svingerud et al., 2012). *In vitro*-forsøk har vist at IFN α 1 og IFN γ har sterk antiviral aktivitet mot IPNV, der begge IFN induserte like transkripsjonsnivåer av antivirale gener som Mx og ISG15. IFN β hadde også antiviral aktivitet mot IPNV, men ga lavere beskyttelse og lavere uttrykk av antivirale gener. IFN δ induserte ikke antiviral aktivitet mot IPNV i cellelinjer (Svingerud et al., 2012). Det er også vist at IFN α , IFN β og IFN γ har sterk, men kortvarig antiviral aktivitet mot ILAV i cellekultur (Svingerud et al., 2013). *In-vivo* studier har vist at IFN α kun har lokal virkning i laks, mens IFN β og IFN γ gir systemisk oppregulering av antivirale gener (Chang et al., 2014).

I tillegg til å initiere produksjon av antivirale proteiner er det vist hos pattedyr at IFN-I har en viktig rolle i å igangsette apoptose av virusinfiserte celler ved å stimulere til cytotoxisk aktivitet hos NK-celler (Biron et al., 1999). IFN-I har også vist seg å være et viktig ledd mellom det medfødte og adaptive immunsystemet ved å stimulere modning av dendrittske celler, samt å øke B- og T-celleresponser (Tough, 2004, Le Bon et al., 2006).

1.4.3 Interferon reseptorer

Hos pattedyr består IFN-I-reseptorer (IFNAR) av to subenheter: IFNAR1 og IFNAR2, som begge tilhører cytokin klasse II reseptor familien (CRFB). Aktivering av reseptorer fører til transfosforylering og aktivering av TYK2- og JAK1-kinase, disse aktiverer videre transkripsjonsproteinene STAT1 og STAT2. Ved aktivering vil disse vandre til nukleus der de assosieres med IRF-9 og danner transkripsjonsfaktorkomplekset ISGF3. Komplekset aktiverer transkripsjoner av antivirale gener ved å binde til interferonstimulerte responselementer (ISRE) på promotorer til interferonstimulerte gener (Samuel, 2001, Robertsen, 2006, Zou og Secombes, 2011). Til forskjell fra pattedyr, der alle IFN-I binder til IFNAR1 og IFNAR2, viser studier utført på zebrafisk at IFN-I hos beinfisk binder til ulike reseptorer basert på antall disulfidbindinger. IFN med en disulfidbinding binder seg til reseptor bestående av CRFB1 og CRFB5, mens IFN med

to disulfidbindinger, binder seg til reseptor som består av CRFB2 og CRFB5 (Aggad et al., 2009). Det er nylig vist at atlantisk laks har et større antall av CRBF-reseptorer enn både mennesker og zebrafisk (Sun et al., 2014). Alle nøkkelkomponentene i Jak-STAT-signalvei er identifisert i genomet til beinfisk, blant annet er tre gentranskripter av STAT1 funnet i laks. Det er dermed sannsynlig at uttrykk av ISG induseres via Jak/STAT-signalvei på samme måte som hos pattedyr (Stein et al., 2007, Skjesol et al., 2010, Zhang og Gui, 2012).

IFN-I signalering via JAK/STAT-signalveien fører til uttrykk av flere hundre IFN-stimulerte gener (ISGs), som skaper en antiviral tilstand i celler. Mange ISGs har en direkte antiviral funksjon hos pattedyr, men funksjonen til de fleste ISGs hos fisk er enda ikke kartlagt (Jørgensen, 2014).

1.4.4 Antivirale proteiner indusert av interferoner

Det er funnet effektorfunksjoner til flere antivirale proteiner hos pattedyr, disse hemmer virus på ulike replikasjonsstadier. PKR er et antiviralt protein som ved aktivering av ds-RNA fra virus, hemmer elongeringsfaktoren eIF-2 α . Denne elongeringsfaktoren kreves for initiering av translasjon, dermed vil PKR hemme translasjon av viralt-mRNA (Garcia et al., 2006). Oppregulering av et PKR-lignende gen (PKZ) er funnet i laks ved behandling med IFN. PKZ er kapabel til å fosforylisere med eIF-2 α , dette er en indikasjon på at PKZ hos laks har samme rolle i antiviralt forsvar som PKR har hos pattedyr (Bergan et al., 2008). ISG15 kan danne kovalente bindinger med virus- og vertsproteiner og dermed modulere funksjonen til disse. Proteinet finnes også i fri form hvor den fungerer som cytokin, blant annet ved å stimulere til proliferering av NK-celler (D'Cunha et al., 1996, Ritchie og Zhang, 2004). ISG15-protein er funnet i laks, der det er vist en sterk induksjon av proteinet ved virusinfeksjon og behandling av IFN og ds-RNA. Dette kan tyde på at ISG15 i laks har samme funksjon som hos pattedyr (Røkenes et al., 2007). Viperin hemmer influensavirus i siste steg av replikasjonsyklus ved å forstyrre transportsystemet i endoplasmatisk retikulum som transporterer virus over til plasmamembran (Wang et al., 2007). Det er vist kraftig økning av viperin ved å infisere makrofaglignende lakseceller med ILAV, noe som indikerer antiviral aktivitet hos laks (Workenhe et al., 2009).

1.4.5 Antiviralt Mx-protein

Mx-proteiner er dynaminlignende proteiner med GTPase-aktivitet som hovedsakelig induseres av IFN-I og IFN-III hos mange typer vertebrater, inkludert fisk (Nygaard et al., 2000, Haller og Kochs, 2002, Haller et al., 2007). Menneskeceller uttrykker MxA og MxB, begge er lokalisert i cytoplasma, hvor kun MxA har antiviral aktivitet mot et bredt spekter av virustyper (Kochs og Haller, 1999, Gordien et al., 2001, Haller et al., 2007). Mx-protein er klonet fra flere fiskearter, og i likhet med pattedyr uttrykkes Mx-proteiner enten i nukleus eller pankreas (Trobridge et al., 1997, Nygaard et al., 2000, Robertsen, 2006). Det er identifisert tre ulike Mx-proteiner hos atlantisk laks: ASMx1, ASMx2 og ASMx3, som alle uttrykkes i cytoplasma (Robertsen et al., 1997, Larsen et al., 2004). Den antivirale effektormekanismen til Mx-protein er enda ikke fullstendig klarlagt (Workenhe et al., 2010, Lester et al., 2012), men dett er vist at cellebeskyttelse mot IPNV og ILAV korrelerer med interferonindusert uttrykk av Mx-protein. Dette viser at proteinet har sterk antiviral aktivitet hos laks (Nygaard et al., 2000, Jensen et al., 2002b, Larsen et al., 2004).

1.5 Interaksjon mellom SAV og IFN-systemet hos laks

1.5.1 induksjon av IFN og antivirale proteiner ved SAV-infeksjon

I høyere vertebrater er det vist at IFN α/β - signalveien har en nøkkelrolle i beskyttelse mot alfavirus (Aguilar et al., 2005, Zhang et al., 2007). *In vitro*- og *in vivo*-forsøk har demonstrert rask transkripsjon av IFN α etter SAV-infeksjon i lakseceller/laks (Gahlawat et al., 2009, Xu et al., 2010, Xu et al., 2015, Herath et al., 2013). SAV-infeksjon i cellekultur viser i tillegg sterk induksjon av mange antivirale gener, blant annet TRIM, PKR, viperin, ISG15 og Mx. Proteinnivå av Mx er også høyt etter SAV-infeksjon (Gahlawat et al., 2009, Xu et al., 2010, Herath et al., 2012, Xu et al., 2015). *In vivo*-forsøk viser at SAV3-infeksjon i atlantisk laks gir høy oppregulering av mRNA for IFN α og IFN-stimulerte gener som ISG-15 og Mx i målorganer til SAV to uker etter smitte (Xu et al., 2012a).

1.5.2 Effekt av IFN på replikasjon av SAV i cellekultur

IFN har en sterk hemmende effekt på SAV-replikasjon i celler. Dette er vist ved å tilføre antistoff mot IFNa1 i cellekultur smittet med SAV, der replikasjon av virus ble fremmet (Sun et al., 2011). For å oppnå en inhiberende effekt mot virusinfeksjon av SAV er behandlingstidspunktet av stor betydning. Behandling med rekombinant IFNa 4 til 24 timer før SAV3-infeksjon induserte antiviral respons i cellekultur. Responsen førte til en markert inhibering av virusreplikasjon og beskyttet cellene mot cytopatisk effekt. Derimot ble det ikke vist beskyttelse mot SAV3 dersom cellekultur ble behandlet med IFNa på samme tidspunkt som smitte skjedde (Xu et al., 2010).

Mange virus har utviklet mekanismer for å motvirke vertens bekjempelsesapparat. IFN-systemet blir blokkert ved å hemme induksjon av IFN, blokkere proteiner i Jak/STAT-signalvei eller hemme antivirale effektorproteiner (Weber og Haller, 2007). Ulike studier har vist at alfavirus også kan blokkere IFN-signalering (Simmons et al., 2009, Simmons et al., 2010). Tidligere undersøkelser viser at SAV-3 kan replikere *in vitro*, selv med sterk IFN-respons, men grunnen til dette er ukjent. En årsak kan være at SAV3 infeksjon fører til nedregulering av flere gener i vertscelle, noe som kanskje kan bidra til å øke virusreplikasjon (Xu et al., 2015).

1.6 Effekt av IFN-I på virusinfeksjon hos laks *in vivo*.

IFN sin beskyttende effekt for laks mot ILAV er testet alene og som adjuvant i DNA-vaksine (Chang et al., 2014, Chang et al., 2015). I.m. injeksjon med IFNa-plasmid, IFNb-plasmid eller IFNc-plasmid viste store forskjeller i grad av beskyttelse mot ILAV, der grad av beskyttelse ble målt i dødelighet. IFNa-plasmid og IFNb-plasmid ga ingen beskyttelse mot viruset, mens IFNc-plasmid alene ga høy grad av beskyttelse mot ILAV.

Siden IFN induserer antiviral aktivitet mot mange virustyper er det undersøkt om IFN kan fungere som adjuvant i DNA-vaksiner hos laks. Adjuvant betyr "å hjelpe" og er en substans som øker immunresponsen til vaksiner (Anderson, 1992). Dette er en svært viktig komponent i de fleste fiskevaksiner da det øker både humorale og cytotoxiske immunmekanismer (Singh og T O'Hagan, 2003). Hos pattedyr fungerer type I IFN som et

ledd mellom medfødte og adaptive immunresponser ved virusinfeksjoner, der type I IFN-adjuvant er direkte koblet til stimulering av dendrittiske-, B- og T-celler (Tough, 2004, Le Bon et al., 2006). Det er med vaksinemodell bevist at IFN-I hos laks er en viktig igangsetter av adaptivt immunforsvar ved virusinfeksjoner (Chang et al., 2015) I vaksinemodellen ble atlantisk laks injisert i.m. med plasmid som kodet for ILAV-antigenet hemagglutinin esterase (HE) alene eller sammen med IFN-plasmid, etterfulgt av smitte med ILAV. Resultatet viste økt beskyttelse mot ILA og økt mengde Immunglobulin M-antistoff mot virus i DNA-vaksine der IFN ble benyttet som adjuvant. I tillegg ble det observert økt tilførsel av B- og cytotoksiske T-celler på injeksjonssted i muskel. Derimot ga HE-plasmid alene mindre beskyttelse mot ILAV og lav antistoffkonsentrasjon (Chang et al., 2015). IFN-I kan dermed være med å forsterke effekten av mindre effektive DNA-vaksiner, for eksempel mot sykdommer som IPNV og ILAV, der DNA-vaksine med antigen alene gir dårlig beskyttelse (Evensen og Leong, 2013, Chang et al., 2015).

1.7 Problemstilling

PD er et stort problem for norsk lakseoppdrett. En rekke tiltak blir i dag benyttet for å forebygge og bekjempe sykdommen, men til tross for tiltakene har antall utbrudd av sykdommen økt. Dette indikerer et behov for nye og bedre forebyggende tiltak. Som tidligere nevnt har atlantisk laks i utgangspunktet et velutviklet medfødt immunforsvar og er relativt motstandsdyktig mot virussykdommer. I oppdrett kan uheldige forhold som stress og infeksjon svekke fiskens førstelinjeforsvar, og dermed gjøre den mer mottakelig for infeksjon. Det forskes nå på om IFN kan anvendes for å forebygge virusinfeksjoner hos laks da det setter i gang viktige medfødte og adaptive responsmekanismer mot virus. Det er allerede vist at IFNc-plasmid gir beskyttende effekt mot ILAV. Med bakgrunn i dette var det interessant å undersøke om IFN-plasmider har beskyttende effekt mot SAV3-infeksjon hos atlantisk laks.

Delmål 1

Undersøke om i.m. injeksjon med IFNa-, IFNb- eller IFNc-plasmid induserer uttrykk av Mx-mRNA i pankreas hos laks en og to uker etter injeksjon av plasmid.

Delmål 2

Undersøke om i.m. injeksjon med IFNa-, IFNb- eller IFNc-plasmid induserer økt uttrykk av Mx-protein i pankreas hos laks to og ti uker etter injeksjon av plasmid.

Delmål 3

Undersøke om i.m. injeksjon av IFNa-, IFNb- eller IFNc-plasmid gir beskyttende effekt i viremisk fase av SAV3- infeksjon.

Delmål 4

Undersøke om i.m. injeksjon av IFNa-, IFNb- eller IFNc-plasmid gir beskyttende effekt mot patologiske forandringer forårsaket av SAV3-infeksjon.

2 Materialer og metoder

Denne masteroppgaven ble delt i to deler. Formålet i del en var å undersøke om i.m. injeksjon av IFNa-, IFNb- eller IFNc-plasmid førte til induksjon av antiviralt Mx-protein i pankreas hos laks. Pankreas ble undersøkt da dette er et av målorganene for SAV. Både relativt genuttrykk og proteinuttrykk av Mx ble målt. I del to ble det undersøkt om i.m. injeksjon av IFNa-, IFNb- eller IFNc-plasmid har evnen til å beskytte laks mot SAV3-infeksjon. Grad av beskyttelse ble vurdert ved å måle relativ virusmengde i blod, samt ved undersøkelse av patologiske forandringer i virusaffisert vev.

2.1 Forsøksfisk

Forsøkene ble gjennomført på landanlegg i Kårvika, som driftes av Havbruksstasjonen i Tromsø. Forsøkene foregikk i tidsrommene 09.02.2015- 23.09.2015 (del en) og 10.04.2015- 10.07.2015 (del to). Forsøkene var på forhånd godkjent av Forsøksdyrutvalget (ID 7324 og 7380) og ble utført i henhold til bestemmelser i Dyrevelferdsloven og Forskrift om forsøk med dyr. Presmolt av atlantisk laks (*Salmo salar*) fra stamme Standard QTL-innova IPNV generasjon 2014 ble benyttet i forsøkene. Fisken ble holdt i ferskvann ved 10°C og de ble fôret med 1,5 mm Nutra Olympic fra Skretting. Før injisering av plasmider ble fisken sultet i to dager. Fisken ble bedøvd med benzoak (ACD Pharmaceuticals) før håndtering. Fisken ble avlivet før prøveuttak ved, overdose benzoak, og påfølgende slag mot hodet.

2.2 Oppformering av plasmider og virus

Interferoner som ble benyttet var fra atlantisk laks som Svingerud og medarbeidere hadde klonet inn i plasmidvektoren pcDNA3.3 TOPO-vektor (Invitrogen) i tidligere forsøk (Svingerud et al., 2012). Gen for IFNa, IFNb eller IFNc var satt inn i åpen leseramme nedstrøms for CMV-promotor. Disse plasmidene ble henholdsvis kalt pIFNa, pIFNb, og pIFNC, i tillegg til pcDNA3.3 (kontrollplasmid). Plasmidene ble oppformert av one shot TOP 10 *Escherichia coli* (Invitrogen) og rensset ut med EndoFree Plasmid purification Mega kit (Qiagen) i henhold til protokoll fra produsent.

SAV 3 ble oppformert i CHH1 (Public Health England), som er hjertevevsceller isolert fra ketalaks (*Onchorhynchus keta*). Oppformering ble utført av Chia Jung Chang (PhD. kandidat ved Norges Fiskerihøgskole).

2.3 Forsøksoppsett og prøveuttak del 1.

Gruppe av presmolt med en snittvekt på 17 g ble injisert i.m. med 15 µg plasmid oppløst i 50 µl fosfatbufret saltvann (PBS) etter Tabell 2. Fisken ble mekret med alkaline blue tatovering og overført til 150 liters sirkulære kar. Prøveuttak ble foretatt en og to uker etter injisering, der det ble tatt ut fem fisk fra hver gruppe ved begge tidspunkt. Til kvantitativ RT-PCR ble det tatt ut prøver av pankreas og lever, som ble oppbevart på RNAlater (Ambion) ved -20°C til videre bruk. For immunohistokjemi ble det tatt ut prøver av pankreas og lever som ble fiksert i 4% paraformalaldehyd i PBS i ett døgn før de ble overført til 70% etanol (Sigma-Aldrich).

Tabell 2. Forsøksoppsett del 1, med ulike forsøksgrupper, og antall fisk benyttet i hver analyseringsmetode.

Forsøksgruppe	Behandling	q-PCR	Imm.histokjemi	Western blot
		Uke 1 og 2	Uke 1 og 2	Uke 1 og 2
PBS	50 µl PBS	5	5	5
Kontrollplasmid	50 µl PBS+ 15 µg kontrollplasmid	5	5	5
IFNa-plasmid	50 µl PBS+ 15 µg IFNa plasmid	5	5	5
IFNb-plasmid	50 µl PBS+ 15 µg IFNb plasmid	5	5	5
IFNc-plasmid	50 µl PBS+ 15 µg IFNc plasmid	5	5	5

2.4 Forsøksoppsett og prøveuttak del 2

Gruppe av presmolt med en snittvekt på 27 g ble injisert i.m. med 15 µg plasmid oppløst i 50 µl (PBS) etter Tabell 3. Fiskene ble merket med alkaline blue tatovering og overført til 300 liters sirkulære kar. Etter ti uker ble fem fisk fra hver gruppe avlivet og det ble tatt tilsvarende prøver som i del en av forsøket (se avsnitt 2.3). Resterende fisk ble smittet intraperitonalt (i.p.) med 5×10^3 TCID₅₀ SAV3 i 0,1 ml L-15 medium uten serum. En uke etter smitte ble femten fisk fra hver gruppe avlivet. Det ble tatt blodprøver for å måle virusmengde i blodet til fiskene. Blodprøvene ble først overført på is, og videre sentrifugert ved 2000x g i 20 min. Serum ble overført fra prøvene i PCR-strips som ble fryst ned på -80°C inntil bruk. Tre uker etter smitte ble femten fisk fra hver gruppe avlivet. Det ble tatt blodprøver fra fiskene, som ble videre behandlet etter metode nevnt tidligere. Vevsprøver fra hjerte, pankreas og muskel ble overført til formalin.

Tabell 3. Forsøksoppsett i del 2, med ulike forsøksgrupper, og antall fisk benyttet i hver analyseringsmetode.

Forsøksgruppe	Behandling	Imm.histokjemi	qPCR Mx	qPCR SAV	Histopatologi
		før smitte	før smitte	7 dpc	21 dpc
PBS	50 µl PBS	5	5	15	15
kontrollplasmid	50 µl PBS+ 15 µg kontrollplasmid	5	5	15	15
IFNa-plasmid	50 µl PBS+ 15 µg IFNa plasmid	5	5	15	15
IFNb-plasmid	50 µl PBS+ 15 µg IFNb plasmid	5	5	15	15
IFNc-plasmid	50 µl PBS+ 15 µg IFNc plasmid	5	5	15	15

2.5 Kvantitativ RT-PCR

Kvantitativ RT-PCR (qPCR) ble brukt for å undersøke om det var ulikheter i genuttrykk av Mx-mRNA i pankreas mellom de ulike IFN-gruppene før infeksjon av SAV. Metoden ble også benyttet til å måle relativ SAV3-mengde i serum en uke etter infeksjon av viruset. I qPCR oppformes DNA-sekvenser fra vev, celler eller blod, og kvantifiseres ved hjelp av det fluoriserende fargestoffet SYBR®Green. Metoden kan raskt og svært sensitiv detektere lave mengder mRNA (Heid et al., 1996). Under en ordinær PCR-sekvensering detekteres og kvantifiseres amplifisert produkt etter siste PCR-syklus. Ved qPCR måles derimot amplifisert DNA-sekvens i hver PCR-syklus. Målingene som blir gjort i eksponentiell fase av amplifiseringen gjør at en svært nøyaktig kan beregne startmengden av genkopiene (Technologies, 2014). For å kunne måle antall genkopier i vev og blod ble to-steps qPCR benyttet. Først ble mRNA transkribert til komplementært DNA (cDNA) med revers transkriptase. I neste steg ble cDNA overført til nye rør for PCR. Hver syklus av en PCR-reaksjon består av tre hovedsteg: denaturering, amplifisering og ekstensjon. Ved denaturering anvendes høy temperatur til å bryte ds-DNA ned til ss-DNA. I amplifiseringsfasen senkes temperaturen og spesifikke primere binder til DNA-tråden. I ekstensjonsfasen syntetiserer DNA-polymerase ny DNA-tråd ut fra primersted. Syklusene gjentas en rekke ganger slik at en får oppformert den ønskede DNA-sekvensen (Technologies, 2014). Figur 3 viser hovedstegene i metoden.



Figur 3. Flytskjema over hovedstegene i kvantitativ RT-PCR.

SYBR®Green ble benyttet for å detektere økning i genuttrykk. Når dette stoffet binder seg til "minor groove" i ds-DNA fluoriserer det og fluorescensen brukes til å måle mengde oppformert DNA. Fargestoffet er dermed svært anvendelig da det kan benyttes til å kvantifisere ulike målsekvenser uten å benytte sekvensspesifikke prober (Technologies, 2014).

Elongeringsfaktor 1 α B (EF1 α B) ble benyttet som referansegene ved måling av Mx-mRNA, da dette er et stabilt gen som blir uttrykt i relativt konstante mengder i alle vev hos atlantisk laks (Olsvik et al., 2005).

2.6 Måling Mx

2.6.1 RNA-isolering

RNeasy Mini Kit (Qiagen) ble benyttet til å isolere mRNA fra pankreas. Isoleringen foregikk i avtrekkskap. All sentrifugering foregikk ved romtemperatur, der Eppendorf Centrifuge 5417R (USA Scientific) ble benyttet. Keramiske kuler var på forhånd vasket med RNase AWAY (Molecular BioProducts) og det ble benyttet RNasefritt utstyr under hele prosessen. Tilsatte keramiske kuler og 600 μ l RLT lysisbuffer (Qiagen) tilsatt 1 % 2-mercaptoetanol (Sigma-Aldrich) i 2 ml sentrifugerør. Ca. 50 mg vev ble overført i sentrifugerør. Vevet ble homogenisert i 2 x 15 sek ved 5900x g i Precellys lysis og homogenizer (Bertin Technologies). For å fjerne skum ble prøvene sentrifugert ved 5000x g i 5 min. Supernatanten ble videre overført i rene 2 ml sentrifugerør, tilsatte 1,2 ml ultra pure H₂O (Biochrom) og 20 μ l proteinase K (New England Biolabs). Prøvene ble inkubert ved 55°C i 10 min og sentrifugert i 5 min ved 15 000x g. Supernatanten ble pipettert over i 15 ml sentrifugerør og tilsatte 0,5 volum 99 % etanol (Sigma-Aldrich) i hver prøve. Supernatanten, ble overført i spinnkolonner (Qiagen) som ble sentrifugert ved 8000x g i 1 min. Kolonnene ble vasket med 1 x 700 μ l RW1 buffer (Qiagen), etterfulgt av 2 x 500 μ l RPE buffer (Qiagen). Spinnkolonnene ble så tørrsentrifugert 19000x g. Spinnkolonnene ble overført i rene samlerør og tilsatte 30 μ l ultra pure H₂O (Biochrom). Konsentrasjonen av mRNA ble avlest i Nanodrop. A_{260/280} ratio viser forholdet mellom mRNA og proteinkonsentrasjon, der verdier over 1,8 blir ansett som

rene. Ved svært høye mRNA-konsentrasjoner ble det tilsatt ytterligere 30µl ultra pure H₂O (Biochrom).

2.6.2 *cDNA-syntese*

For å syntetisere cDNA ble QuantiTect® reverse transcription kit (Qiagen) benyttet. Protokoll til produsent ble fulgt under utførelse av cDNA-syntesen. Alle inkuberinger ble utført i GeneAmp® PCRsystem 2700 (Applied Biosystems), der prøvene ble oppbevart på is før og etter inkuberinger. For å syntetisere cDNA ble 1000 ng mRNA benyttet. For å fjerne genomisk DNA ble 5 µl RNA overført i PCR-strips med 9 µl gDNA Wipeout buffer, reagenser ble inkubert ved 42 °C i 2 min. cDNA ble syntetisert ved å tilsette 6 µl reverstranskriptase-miks etterfulgt av inkubasjon ved 42 °C i 15 min og 95 °C i 3 min. For å undersøke kontaminering av genomisk DNA ble tilfeldige RNA-prøver cDNA-syntetisert, der revers transkriptase og primere ble erstattet med vann.

2.6.3 *Kvantitativ RT-PCR*

Protokoll ble fulgt i henhold til produsent (Quantitect® SYBR Green RT-PCR) og prøvene ble analysert i 7500 Fast Real-Time PCR systems (Life technologies). De ulike stegene er beskrevet i Tabell 4. Det ble tillaget cDNA-fortynning 1:10 med RNase-fritt vann. Mastermiks med primere og Fast SYBR®Green Master Mix (Applied Biosystems), totalt 9 µl, ble fordelt ut i hver av brønnene i 96- brønners Micro Amp Fast Optikal brett (Life technologies). Det ble tilsatt 6 µl fortynnet cDNA, med duplikat av hver enkeltprøve, i brønnene. Oversikt over primere som ble benyttet er beskrevet i Tabell 5. For å ekskludere kontaminering av genomisk DNA ble det tatt prøver fra cDNA-syntese der revers transkriptase ikke var tilsatt. Hver plate inneholdt også negativ kontroll (Non template control) der cDNA ble erstattet med vann for å avdekke uspesifikk binding. En grenseverdi (Threshold) ble satt til 0,2 for å sammenligne kontroll og målgen.

Tabell 4. Steg, temperatur, varighet og antall sykluser i hver PCR-reaksjon samt smeltekurveanalyse.

Steg	Temperatur (°C)	Varighet (sek)	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	

Tabell 5. Primersekvenser for gen som ble undersøkt i qPCR, genbank nr., primer konsentrasjon og effektivitet. Stockløsninger til EF1A_B og MX ble fortynnet til en bruksløsning på 5 µM. Stockløsning til qSAV ble fortynnet til en brukerløsning på 4 µM/µl.

Gen	primer	Genbank nr	Primer kons (stock).	effektivitet
EF1A _B FW	TGCCCCTCCAGGATGTCTAC	BG933897	100 µM	2,08
EF1A _B RW	CACGGCCCACAGGTACTG			
MxFW	TGCAACCACAGAGGCTTTGAA	U66475.1	100 µM	2
MxRW	GGCTTGGTCAGGATGCCTAAT			
Q-SAVFW	CAGTGAAATTCGATAAGAAGTGCAA	AY604235	100 µM	
Q-SAVRW	TGGGAGTCGCTGGTAAAGGT			

2.6.4 Databehandling

Data ble analysert i Microsoft Excel og grafer ble utarbeidet i GraphPad Prism 6c. For å måle økning i genuttrykk av Mx ble Pfaffl-metoden (Pfaffl, 2001) anvendt etter følgende likning:

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

Dette er en matematisk modell som måler relativ endring av målgenet sammenlignet med referansegenet i den stimulerede gruppen sammenlignet med kontrollgruppen. Pfaffl-metoden tar hensyn til primereffektiviteten, hvor $E_{\text{mål}}$ er effektivitet til primere for målgenet og E_{ref} er effektiviteten til primere for referansegenet. Terskelnivå (Ct-verdi) defineres i antall PCR-sykluser som kreves for at fluoriserende signal skal overstige terskelverdien. ΔCt forteller hvor mye Ct-verdien av hver enkeltprøve i stimulert gruppe avviker fra gjennomsnittlig Ct-verdi i kontrollgruppen (Pfaffl, 2001). For å finne primereffektiviteten til referansegenet og målgenet ble det laget en 2-folds fortyningsserie av cDNA, med syv fortyninger der utgangskonsentrasjonen var 0,2 μg . Stigningstall i kurve ble benyttet til å bestemme effektivitet med følgende formel:

$$E = 10^{(-1/\text{slope})} \quad (\text{Pfaffl, 2001})$$

Det ble benyttet uparet t-test for å påvise forskjeller mellom kontrollgruppe (pcDNA3.3) og behandlede grupper. Uparet t-test ble også benyttet til å undersøke om det var signifikante forskjeller mellom behandlede grupper. P-verdier under 0,05 ble betegnet som signifikant og p-verdier under 0,001 ble betegnet som meget signifikant.

2.7 Måling SAV-3

2.7.1 RNA-isolering

Det ble benyttet QIAamp Viral RNA Mini Kit (Qiagen) til å isolere viralt-RNA fra serum. Prøvene ble oppbevart i romtemperatur og all sentrifugering foregikk ved romtemperatur i Eppendorf Centrifuge 5417R (USA Scientific). RNasefritt utstyr og pipettespisser med filter ble benyttet under hele prosessen. Protokoll fra produsent ble fulgt med følgende unntak: 100 µl serum fra fisk ble benyttet (ikke 140 µl). Etter RNA-isolering ble prøvene satt på is og videre alikvotert i strips som ble oppbevart ved -80°C til videre bruk. Nanodrop ble ikke benyttet til måling av RNA-konsentrasjon. Dette siden Carrier RNA fra kit inneholdt mye RNA, og vil derfor ha stått for majoriteten av RNA i prøvene.

2.7.2 cDNA-syntese

QuantiTect® reverse transcription kit (Qiagen) ble brukt for å syntetisere cDNA. Det ble benyttet samme metode som i avsnitt 2.6.2 med følgende unntak: det ble tilført 10 µl RNA til cDNA-syntesen. RNAet ble overført i PCR-Strips med 2 µl dH₂O og 2 µl gDNA wipeout. I tilfeldige RNA-prøver ble revers transkriptase og primere erstattet med vann for å undersøke kontaminering.

2.7.3 Kvantitativ RT-PCR

Prøvene med cDNA ble fortynnet 1:40 med RNase-fritt vann. Mastermikts bestående av 2 µl av hver primer og 4 µl RNasefritt vann ble fordelt ut i hver brønn av 96- brønners Micro Amp Fast Optikal brett (Life technologies). Det ble pipettert 10 µl Fast SYBR®Green Master Mix (Applied Biosystems) og 2 µl cDNA i hver brønn. Duplikat av hver prøve ble laget. 7500 Fast Real-Time PCR systems (Life technologies) ble benyttet etter Tabell 4 for analysing av SAV3-konsentrasjon i serum. I negativ kontroll ble cDNA erstattet med vann. Se Tabell 5 for oversikt over primere som ble benyttet.

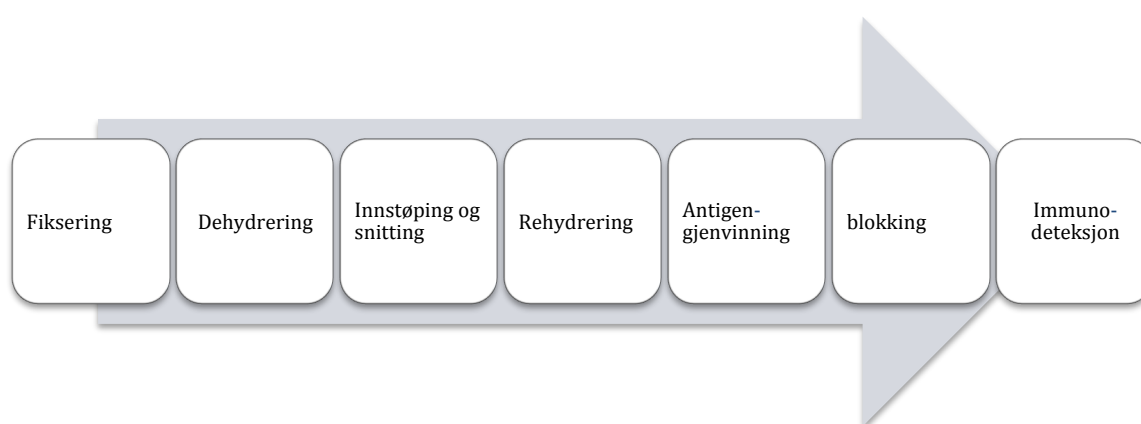
2.7.4 Analysering

For å analysere kvantitativ mengde SAV3-RNA ble Ct-verdier mellom kontrollgruppe (pcDNA3.3) og IFN-grupper sammenlignet. En C_t-verdi er omvendt proporsjonal til

mengde DNA i prøver, jo lavere C_t -verdi, jo høyere startmengde mRNA. Benyttet Kruskal-Wallis test av C_t -verdier for å påvise forskjeller mellom kontrollgruppe (pcDNA3.3) og behandlede grupper. For å undersøke om det var signifikante forskjeller mellom behandlede grupper ble uparet Mann-Whitney -test benyttet. P-verdier under 0,05 ble betegnet som signifikant og verdier under 0,001 ble betegnet som meget signifikant.

2.8 Immunohistokjemi

Denne metoden er et godt verktøy for å lokalisere proteinantigener i vevssnitt samtidig som morfologien opprettholdes i vevet (Farr og Nakane, 1981, Taylor CR, 2002). Et spesifikt protein kan lokaliseres ved å inkubere vevssnitt med primært antistoff, etterfulgt av sekundært antistoff som er merket med et reportertermolekyl. Spesifisiteten i teknikk er svært avhengig av kvaliteten til det primære antistoffet samt antigenets bindingsevne til antistoffet (Ramos-Vara og Miller, 2014). Figur 4 viser hovedstegene i metoden.



Figur 4. Flytskjema over hovedstegene i immunohistokjemi.

Protokoll som ble benyttet er basert på abcam IHC- paraffin protokoll (abcam). HRP-konjugert antistoff ble benyttet som sekundært antistoff og tilstedeværelse av antigen resulterer i rødbrun farge ved mikroskopering.

2.8.1 Dehydrering

Vevskassetter med pankreasbiter ble dehydrert i Citadel 1000 (Shon) etter Tabell 6. Disse ble videre satt inn i forvarmet Leica EG 1150H (Leica Biosystems), som ble brukt til å støpe inn vevsbiter i paraplant (HistoLab). Vevskassetene ble kjølt ned på kjøleelement og oppbevart i kjøleskap til videre bruk.

Tabell 6. Dehydreringstrinn for vev etter program 1.

Kar nr.	Innhold	Tid
1.	96 % etanol	2 timer
2.	96 % etanol	2 timer
3.	100 % etanol	2 timer
4.	100 % etanol	2 timer
5.	1:1 100 % etanol og histoclear	1 time
6.	histoclear	1 time
7.	histoclear	1 time
8.	histoclear	1 time
9.	1:1 histoclear og pararfinvoks	1 time
10.	Paraplast	3 timer

2.8.2 Snitting av vev

Vevskassetene ble kjølt ned på is før de ble snittet. Leica RM2235 (Leica Biosystems) ble benyttet til å snitte vevet i 4 μm tykke snitt, snittene ble overført til 40 °C vannbad og videre på objektglass. Snittene ble satt til tørking ved 60 °C i 30 min.

2.8.3 Deparafinisering og rehydrering

Histoclear (National diagnostics) ble benyttet til å fjerne parafin fra snittene, da ufullstendig fjerning av parafin resulterer i dårlig farging av vevet. Deparafinisering og rehydrering av snittene ble utført i avtrekksskap etter Tabell 7.

Tabell 7. Inkuberinger for deparafinisering og rehydrering av vevssnitt.

Kar nr.	Innhold	Tid
1	histoclear	3 x 5 min
2	1:1 histoclear og 100 % etanol	3 min
3	100 % etanol	2 x 3min
4	95 % etanol	3 min
5	70 % etanol	3 min
6	50 % etanol	3 min
7	rennende kaldt vann	inntil antigengjenvinning

2.8.4 Antigengjenvinning

For å unngå dannelsen av metylenbroer, som fører til kryssbindinger og maskerer antigenområder, ble vevssnittene inkubert i natrium-sitratbuffer pH 6.0 (Dako) i 30 min ved 95-100°C i en riskoker. Snittene ble avkjølt 20 min i romtemperatur og vasket under rennende vann.

2.8.5 Blokking og immunohistokjemisk farging

Snittene ble vasket 2 x 5 min i TBST. Snittene ble blokkert i 5% fettfri tørrmelk (AppliChem) og 10% serum fra geit (Sigma Aldrich) i TBS i 2 timer ved romtemperatur. Vevet ble isolert med Dakopenn (DakoCytomation). Det ble tilført 100-200µl primærantistoff mot Mx fortynnet 1:500 i TBS med 5% fettfri tørrmelk (AppliChem) og 1% BSA (Sigma Aldrich) på snittene som ble inkubert i over natt ved 4 °C.

Snittene ble rensset 2 x 5 min i TBST. Snittene ble videre behandlet med 3 % hydrogenperoxid (Sigma Aldrich) i TBS i 15 min, dette steget ble utført i mørket. Hydrogenperoxid demper endogen peroxidaseaktivitet og vil dermed redusere bakgrunnsstøy. Snittene ble vasket 2 x 5 min i TBST. Snittene ble videre behandlet med 200µl HRP-konjugert geit anti-kanin sekundærantistoff fortynnet 1:3000 i TBS med 1% BSA i 2 timer. I dette steget ble snittene oppbevart i en fuktig boks. Snittene ble deretter vasket 3 x 15 min i TBST. For å få et farget produkt ble snittene behandlet med 100 µl 3-Amino-9-ethylcarbazol (Dako) i 2,5 til 3 min, som gir en rød farge. Snittene ble vasket 5 min i dH₂O og videre kontrastfarget med Mayer's haematoxylin (Life Technologies) i 10

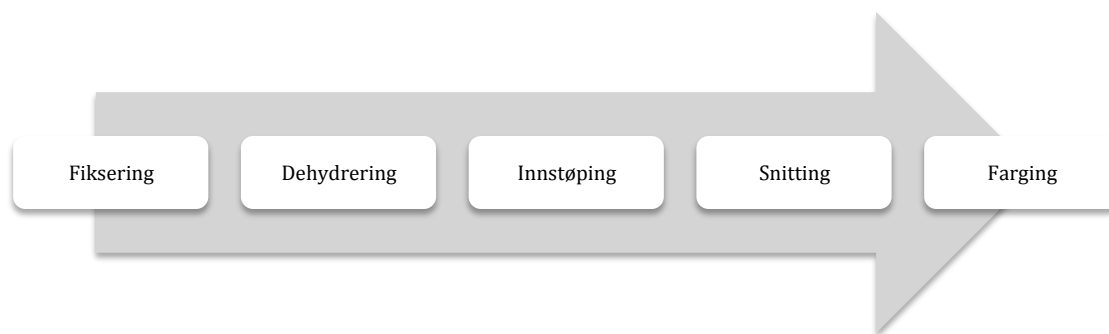
min. Snittene ble vasket under 30-40 °C rennende vann i 4 min og dekkglass ble limt på snittene med ImmunoHistoMount (Sigma Aldrich).

2.8.6 Mikroskopering

For å analysere snittene ble lysmikroskopet DM6000 B (Leica Microsystems) anvendt. Bilder ble tatt med Leica DFC 320 (Leica Microsystems), og integrert med Leica Application Suite V3 (software).

2.9 Histopatologi

For å kunne påvise patologiske endringer i vev forårsaket av skader, infeksjoner og sykdommer, er det essensielt å inneha kunnskap om normalstruktur til vevet. Histologiske undersøkelser utføres med mikroskopisk eksaminering av fargede, tynne utsnitt av vev. Dette gjøres for å koble vevstruktur til vevsfunksjon (Bruno DW., 2013). Innen fiskehelse er histopatologi et viktig felt da en ofte kan detektere mikroskopiske endringer forårsaket av sykdom, som er vanskelig å oppdage med makroskopiske undersøkelser av fisken (Mumford, 2009). Figur 5 viser flytskjema over hovedstegene i histopatologi.



Figur 5. flytskjema over hovedstegene i histopatologi.

2.9.1 Dehydrering, innstøping og snitting av vev

Det ble benyttet samme protokoll som ved immunohistokjemi for å dehydrere og snitte vev fra pankreas, hjerte og skjelettmuskel (se avsnitt 2.5a og 2.5b).

2.9.2 Farging av vev

Shandon Instant Hematoxylin (Thermo Scientific) og Shandon instant Eosin, alcoholic (Thermo Scientific) ble benyttet til farging av snittene. Reagenser ble preparert i henhold til protokoll fra produsenten.

Leica ST4020 ble benyttet for deparafinisering og farging av snittene etter Tabell 8. Snitten ble på forhånd inkubert i histoclear 5 min før de ble satt i maskinen. Etter farging ble dekkglass limt på snittene med Eukitt® quick-hardening mounting medium (Fluka Analytical).

Tabell 8. Antall kar og innhold i karene som ble benyttet under farging av vevet. Tid i hver beholder var 90 sekunder.

Kar nr:	Innhold:
1.	Histoclear
2.	100 % etanol
3.	96 % etanol
4.	96 % etanol
5.	Vann
6.	Hematoxylin
7.	Hematoxylin
8.	Vann
9.	Vann
10.	Eosin
11.	96 % etanol
12.	96 % etanol
13.	100 % etanol
14.	100 % etanol
15.	Histocelar

2.9.3 Mikroskopering

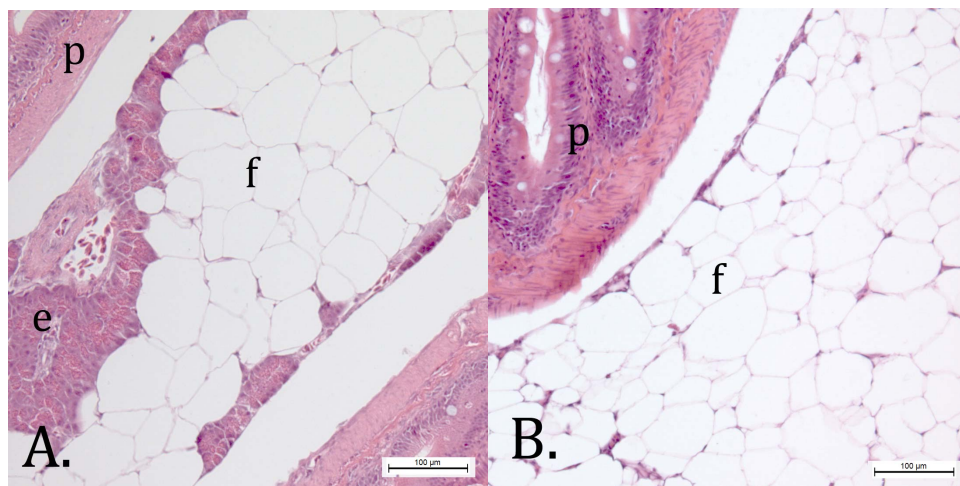
Lysmikroskopet (DM6000 B, Leica Microsystems) ble anvendt for å analysere snittene. Bilder ble tatt med Leica DFC 320 (Leica Microsystems), og integrert med Leica Application Suite V3 (software).

2.9.4 Analyse av resultater.

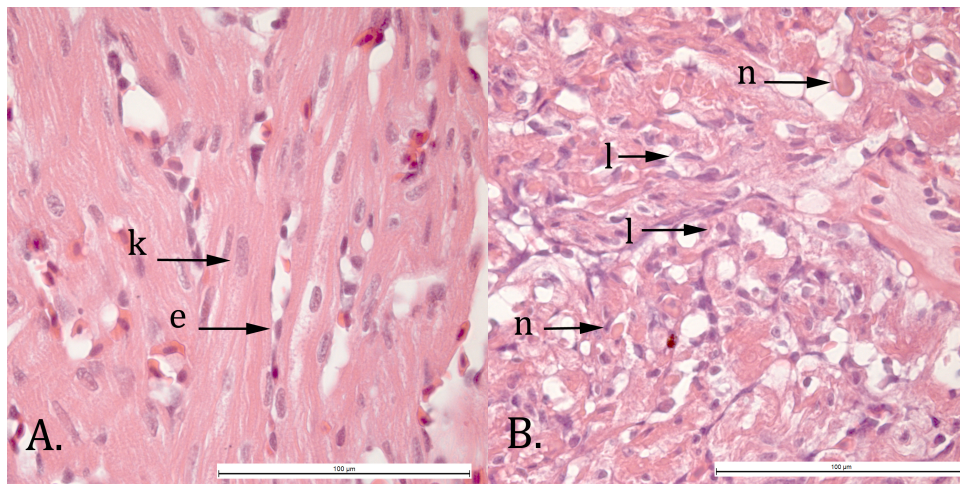
Det ble gitt opplæring i PD-scoring på Veterinærinstituttet i Trondheim av forsker Jinni Gu. Tabell 9 ble benyttet til å gradere forandringer i pankreas, hjerte og skjelettmuskulatur. Tabellen er basert på (McLoughlin et al., 2006) med noen modifikasjoner. Forskjeller mellom score 0 og 3 er illustrert i Figur 6 av pankreas, Figur 7 av hjerte og Figur 8 av skjelettmuskel. Snittene ble scoret i merket tilstand, men det ble også foretatt en blindtest på 30% av utvalget for å eliminere subjektiv innflytelse.

Tabell 9. Semikvantitativ gradering for PD-forandring i pankreas, hjerte og muskulatur.

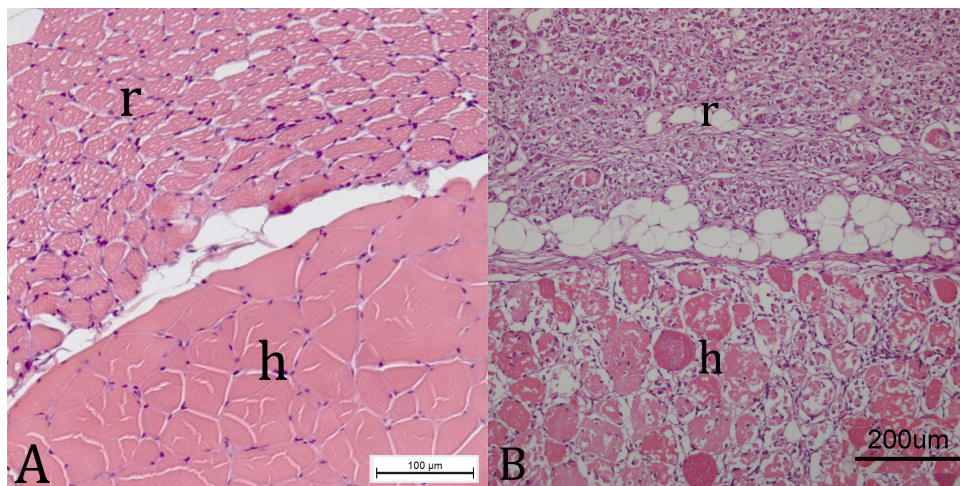
Grad	Pankreas	Hjerte	Skjelettmuskulatur
0	Normal	Normal	Normal
1 (Sparsom forandring)	Fokal nekrose og/eller noe tap av eksokrin pankreas (<30%)	Fokal/multifokal myocyttnekrose og/eller betennelse (<15% av myofibrene er affisert)	Fokal myofibre degenerasjon og/eller betennelse
2 (Moderat forandring)	Multifokal nekrose og/eller delvis tap av eksokrin pankreas (30-80%)	Multifokal myocyttnekrose og/eller betennelse (15-50% av myofibrene er affisert)	Multifokal myofibre degenerasjon, betennelse, og/eller myofibrose
3 (Uttalt forandring)	Omfattende diffus nekrose eller stort tap av eksokrin pankreas (>80%)	Omfattende diffus myocyttnekrose og/eller betennelse (>50% av myofibrene er affisert)	Omfattende diffus myofibre degenerasjon, betennelse og/eller myofibrose



Figur 6. A: normalhistologi i pankreas, score 0. B: Pankreas, score 3. Bilde A viser normal pankreas med eksokrine celler (e), og fettvev (f), lokalisert ved pylorusblindsekk. Bilde B viser total tap av eksokrin pankreas, kun fettvev (f) igjen i pankreas, lokalisert ved pylorusblindsekk (p). Målestokk tilsvare 100 µm.



Figur 7. A: normalhistologi Stratum spongiosum, ventrikkel, score 0. B: Stratum spongiosum, ventrikkel, score 3. Bilde A viser tverrstripet muskelcelle med normal plassering av kjerne (k) og endokardcelle (e). Bilde B viser omfattende diffus myocyttnekrose (n) og leukocytter (l) i vevet. Målestokk tilsvarer 100 µm.



Figur 8. A: normalhistologi skjelettmuskel, score 0 B: skjelettmuskel, score 3. Bilde A viser rød (r) og hvit (h) muskel med normale, perifert lokaliserte kjerner. Målestokk tilsvarer 100 µl. Bilde B viser nekrotiske muskelfibre med sentral migrasjon av muskelkjerner og innvasjon av leukocytter. Målestokk tilsvarer 200 µl. Bilde er godkjent for bruk av Trygve Poppe.

3 Resultater

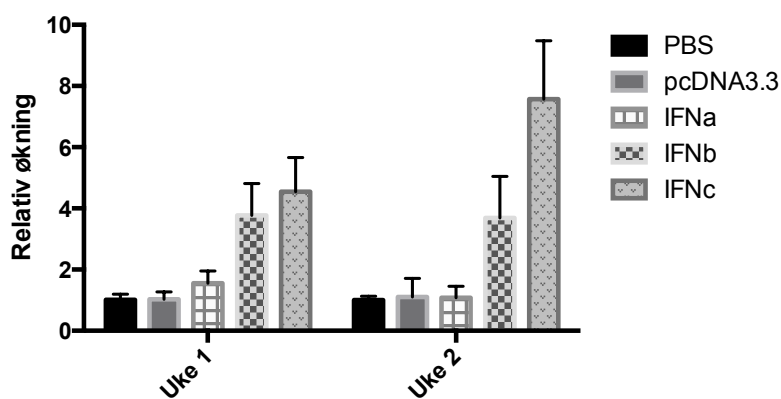
3.1 Effekt av IFN-plasmider på uttrykk av antiviralt Mx-protein i pankreas

Antiviralt Mx-protein ble valgt som markør for antivirale proteiner fordi det blir induisert raskt og spesifikt i celler etter behandling med IFN-I. I tillegg blir Mx-protein uttrykt i høye konsentrasjoner og har lang halveringstid (Ronni et al., 1993, Jensen et al., 2002a).

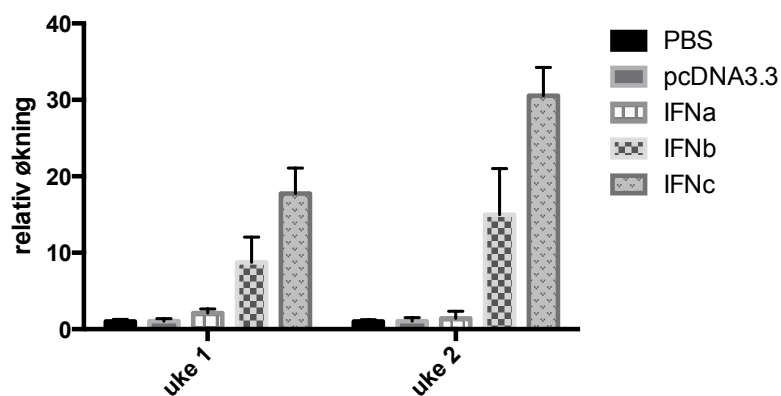
3.1.1 Effekt av IFN-plasmider på uttrykk av Mx-mRNA i pankreas

Tidligere studier utført av Robertsen sin forskningsgruppe har vist økning av Mx-mRNA i lever, hjerte, hodenyre og en rekke andre organer en uke etter i.m. injeksjon av pIFNb og pIFNc-plasmid (Chang et al., 2014). Da pankreas er et av målorganene for SAV ble det nå undersøkt om i.m. injeksjon av IFNa, IFNb eller IFNc har ulik evne til å inducere Mx-mRNA i pankreas etter i.m. injeksjon av plasmider.

Figur 9 viser relativt genuttrykk av Mx målt med qPCR en og to uker etter injeksjon av plasmider. Injeksjon med pcDNA3.3 ga ikke signifikant økning av Mx-mRNA i pankreas sammenlignet med injisering av PBS. Det ble heller ikke funnet signifikante forskjeller i relativ mengde Mx-mRNA i pankreas mellom fisk som var injisert med pcDNA3.3 og pIFNa i noen av ukene ($p > 0,05$). Derimot ga både injeksjon med pIFNb og pIFNc en signifikant økning av Mx-mRNA i pankreas ved begge tidspunkter ($p < 0,05$). Uttrykket av Mx-mRNA fra fisk injisert med pIFNb var relativt likt ved begge tidspunkter (4x). Ved behandling av pIFNc ble det observert en høyere økning av Mx-mRNA i pankreas ved uke to (8x) enn ved uke en (5x). Uttrykk av Mx-mRNA ved behandling med pIFNb eller pIFNc var ikke signifikant forskjellig i uke en ($p > 0,05$). To uker etter injeksjon ga pIFNc signifikant større økning av Mx-mRNA i pankreas sammenlignet med pIFNb ($p < 0,05$). Lever ble brukt som positiv kontroll (Figur 10), der trenden er den samme som i pankreas. Behandling med pIFNc resulterte i meget signifikant økning av Mx-mRNA i leveren både en (18x) og to uker (31x) etter injeksjon ($p < 0,0001$). Ved begge tidspunkt ga pIFNc en større økning av Mx-mRNA enn pIFNb.



Figur 9. Relativt uttrykk av Mx-gen i pankreas fra laks injisert i.m. med 15 µg plasmider oppløst i 50 µl PBS. En og to uker etter injeksjon ble det tatt ut fem fisk fra hver av følgende grupper PBS, pcDNA3.3, pIFNA, pIFNb og pIFNc. Ct-verdier for kontroll var 23,58 (PBS) og 24,99 (pcDNA3.3).

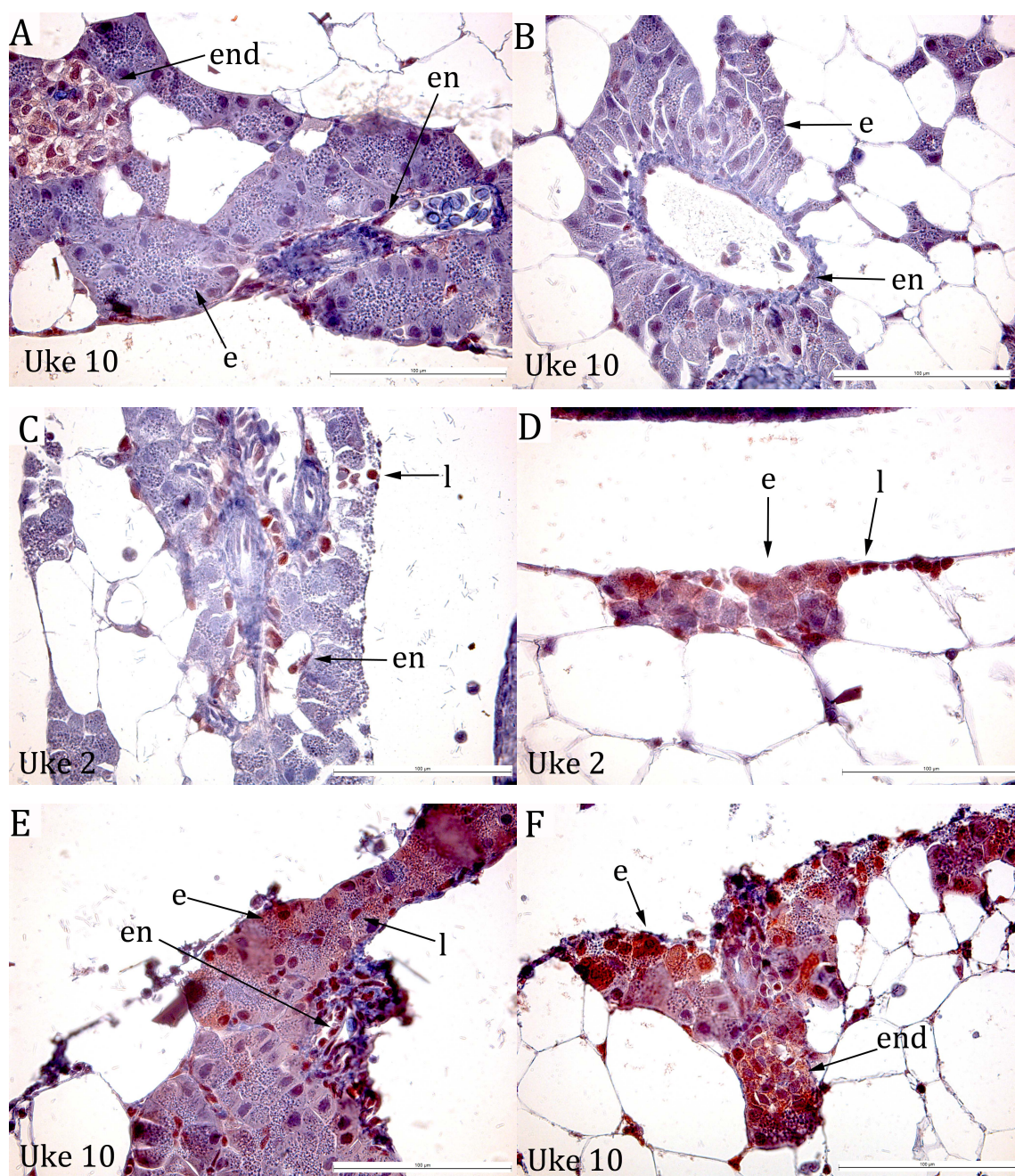


Figur 10. Relativt uttrykk av Mx-gen i lever fra laks injisert i.m. med 15 µg plasmid oppløst i 50 µl PBS. En og to uker etter injeksjon ble det tatt ut fem fisk fra hver av følgende grupper PBS, pcDNA3.3, pIFNA, pIFNb og pIFNc. Ct-verdier for kontroll var 26,29 (PBS) og 26,84 (pcDNA3.3).

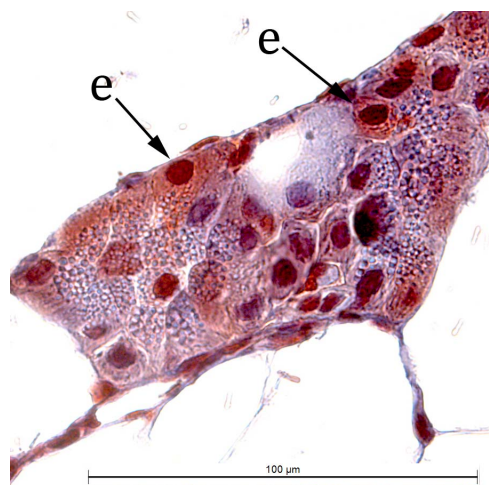
3.1.2 Effekt av IFN-plasmider på proteinuttrykk av Mx i pankreas

Et vedvarende proteinuttrykk av Mx er observert i lever en til 22 uker etter i.m. injeksjon av pIFNc, der uttrykk av protein ble undersøkt med Western blotting (Lisa Bratland, masteroppgave). Det var imidlertid ikke mulig å benytte samme metode i dette forsøket, da Mx-protein ikke ble påvist i noen av prøvene fra pankreas med Western blotting. Dette kan skyldes at Mx-protein blir raskt degradert av fordøyelsesenzymer før proteinase-inhibitor får tid til å virke. Immunohistokjemi er tidligere brukt til å påvise økning av Mx-protein i andre organer etter i.m. injeksjon av pIFNb og pIFNc (Chang et al., 2014). Denne metoden ble dermed benyttet til å måle proteinuttrykk av Mx i pankreas to og ti uker etter i.m. injeksjon av PBS, pcDNA3.3, pIFNa, pIFNb eller pIFNc.

Figur 11 (A-F) viser at kun pIFNc (D) induserte et sterk uttrykk av Mx-protein i eksokrine celler to uker etter injeksjon av plasmider. Ti uker etter injeksjon ga både behandling med pIFNb (E) og pIFNc (F) uttrykk av Mx-protein i eksokrine celler. Det ble ikke observert uttrykk av Mx-protein i pankreas hos fisk injisert med PBS (A), pcDNA3.3 (ikke vist i figur) eller pIFNa (B). Det ble derimot observert et svakt uttrykk av Mx-protein i endotelceller, leukocyt-lignede celler og enkelte endokrine celler i disse gruppene. Hos fisk injisert med pIFNb og pIFNc ble det observert et sterkt uttrykk av Mx-protein i leukocyt-lignende celler, eksokrine celler og endotelceller i pankreas. Uttrykket var sterkest ti uker etter injeksjon, der fisk injisert med pIFNc hadde et sterkere uttrykk av Mx-protein enn fisk injisert med pIFNb. Uttrykk av Mx-protein i eksokrine celler var også sterkere ved injeksjon med pIFNc sammenlignet med pIFNb i uke ti. Det ble observert uttrykk av Mx-protein i flere eksokrine cellekjerner (Figur 12). Cellekjernene hadde sterkest uttrykk av Mx-protein ti uker etter injeksjon av plasmider, der fisk injisert med pIFNb eller pIFNc hadde sterkest farging av Mx-protein i cellekjernene.



Figur 11. Uttrykk av Mx-protein i pankreas hos laks etter i.m. injeksjon av 15 µg plasmid oppløst i 50 µl PBS. To og ti uker etter injeksjon ble det tatt ut fem fisk fra hver av følgende grupper: PBS(A), pIFNA(B), pIFNb(C+E) og pIFNc (D+ F). Immunohistokjemi ble benyttet for å detektere Mx-protein i pankreas. Bilder viser pankreas med eksokrine celler(e), endotelceller (en), endokrin pankreas (end) og leukocyt-lignende celle (l). Rød farge viser farging av Mx-protein. Målestokk tilsvarer 100 µm.



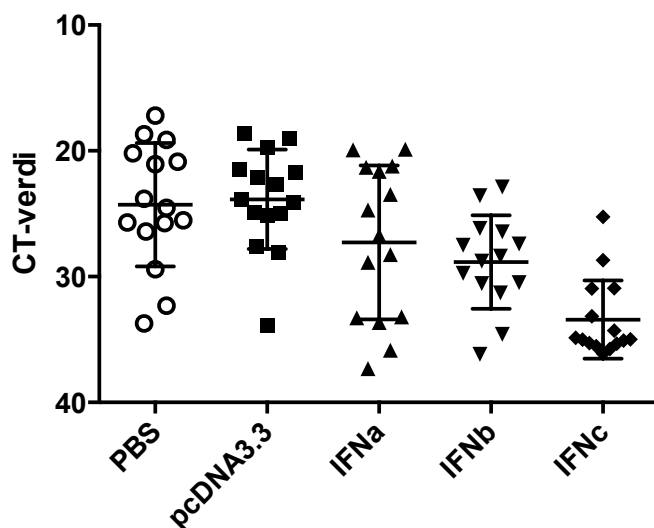
Figur 12. Uttrykk av Mx-protein i eksokrine celler i pankreas hos laks etter i.m. injeksjon av 15 µg pIFNB oppløst i 50 µl PBS. Pankreas fra fisk er tatt ut ti uker etter injeksjon og immunohistokjemi ble benyttet for å detektere Mx-protein i pankreas. Flere eksokrine celler (e) hadde sterkt uttrykk av Mx-protein i kjernen. Målestokk tilsvarer 100 µm.

3.2 Effekt av IFN-plasmider på beskyttelse mot infeksjon av SAV3

Tidligere studier har vist at i.m. injeksjon med pIFNc gir høy beskyttelse mot ILA-virus hos laks i minst åtte uker (Chang et al., 2014). Med bakgrunn i dette var det interessant å se om i.m. injeksjon med pIFN ga beskyttelse mot SAV3 hos laks. I eksperimentelle smitteforsøk er det vanskelig å oppnå dødelighet hos laksefisk etter smitte med SAV (Desvignes et al., 2002, McLoughlin et al., 2002, Graham et al., 2011). Grad av beskyttelse ble dermed bestemt ved å måle virusmengde i blod og ved å undersøke patologiske forandringer i pankreas, hjerte og muskel. Metoden som ble benyttet var basert på metode beskrevet av Thim og medarbeidere, men i dette forsøket ble gradering av patologiske forandringer i pankreas og muskel inkludert (Thim et al., 2012). Prøvetakingen av virusmengde i blod, samt prøvetaking av vev til undersøkelse av patologiske forandringer foregikk på ulike tidspunkter, grunnet infeksjonsdynamikken til SAV. Ved SAV-infeksjoner blir viremi registrert tidlig i sykdomsforløpet mens de patologiske endringene i virusaffisert vev skjer senere i forløpet (Christie et al., 2007, Taksdal et al., 2014). Det var ingen dødelighet i forsøksperioden og det ble ikke observert makroskopiske forandringer i indre organer ved prøveuttak.

3.2.1 Måling av SAV3-mengde i blod ved qPCR

Kvantitering av SAV3-mengde i serum ble gjort med qPCR en uke etter smitte for å undersøke interferonene sin evne til å beskytte laks mot SAV3 i viremisk fase. Figur 13 viser Ct-verdier til femten fisk fra hver av følgende grupper: PBS, pcDNA3.3, pIFNa, pIFNb og pIFNc, der gjennomsnitt og standardavvik er inkludert. Signifikans ble undersøkt mellom kontrollgruppe (pcDNA3.3) og stimulerte grupper. Det var ikke signifikant forskjell i Ct-verdier mellom kontrollgruppe og pIFNa-gruppe ($p > 0,05$). Fisk injisert med pIFNb hadde derimot signifikant lavere virusmengde i blodet sammenlignet med kontrollgruppen ($p < 0,05$). Fisk injisert med pIFNc hadde lavest virusmengde i blod, da Ct-verdiene fra denne gruppen var høyest. Det ble beregnet en meget signifikant forskjell mellom fisk injisert med pIFNc sammenlignet med fisk injisert med pcDNA3.3 ($P < 0,001$). Det var også en signifikant forskjell mellom grupper injisert med pIFNb og pIFNc ($p < 0,05$).



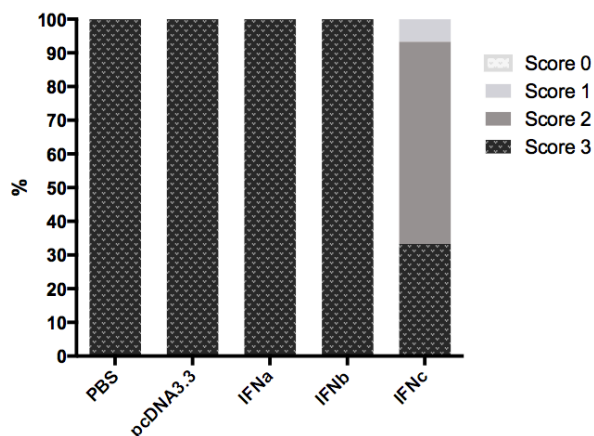
Figur 13 CT-verdier av SAV-3 fra serumprøver av laks injisert i.m. med 15 µg plasmid oppløst i 50 µl PBS. ti uker etter injeksjon av plasmider ble laks smittet i.p med 5×10^3 TCID₅₀ SAV3 i 0,1 ml L-15 medium uten serum Etter en uke ble det tatt blodprøver fra femten fisk fra følgende grupper: PBS, pcDNA3.3, pIFNa, pIFNb og pIFNc. Gjennomsnittlig CT-verdi for de ulike gruppene var: PBS:24,28, pcDNA3.3: 23,85, IFNa: 27,28, IFNb; 28,85 og IFNc: 33,41.

3.2.2 Histopatologisk undersøkelse

Patologiske forandringer i pankreas, hjerte og muskel ble sammenlignet mellom kontrollfisk (injisert med PBS eller pcDNA3.3) og fisk injisert med IFN-plasmider. Alvorlighetsgrad og distribusjon av patologiske forandringer ble gradert semikvantitativt etter Tabell 9.

3.2.3 Pankreas

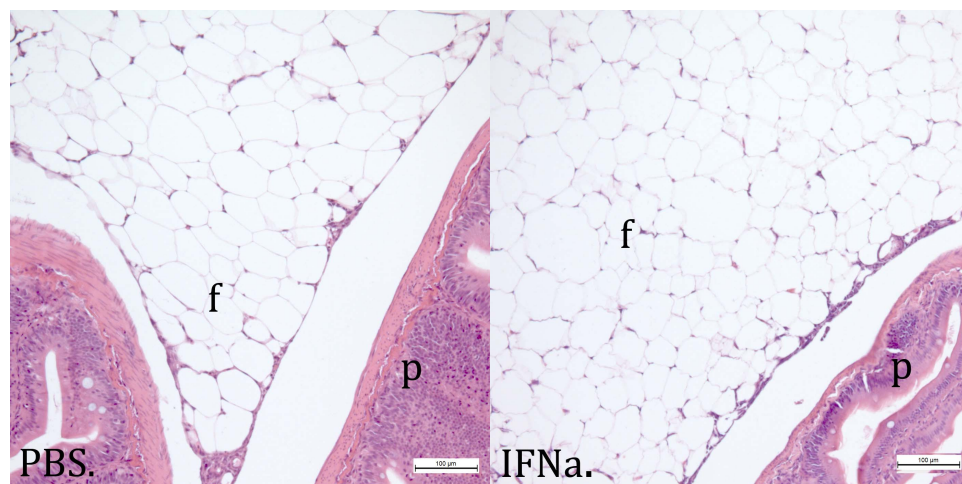
Figur 14 viser prosentvis score av patologiske forandringer i pankreas tre uker etter SAV3-infeksjon. Pankreas hos fiskegrupper som var injisert med PBS, pcDNA3.3, pIFNa eller pIFNb ble gradert til score 3. Majoriteten (60%) av fiskegruppen injisert med pIFNc hadde moderate forandringer i pankreas, og ble gradert til score 2. I denne gruppen ble også observert pankreas som ble gradert til score 3 (33%) og score 1 (7%). Akutt nekrose ble ikke observert i noen snitt.



Figur 14. Patologiske forandringer i pankreas for laks injisert i.m. med 15 µg plasmid oppløst i 50 µl PBS. Ti uker etter injeksjon av plasmid ble laks smittet i.p med 5×10^3 TCID₅₀ SAV3 i 0,1 ml L-15 medium uten serum. tre uker etter infeksjon ble det tatt ut femten fisk fra følgende grupper: PBS, pcDNA3.3, pIFNa, pIFNb og pIFNc. Prosentvis andel av fisker gradert som normal (0), sparsom forandring (1), moderat forandring (2) og uttalt forandring (3) i pankreas.

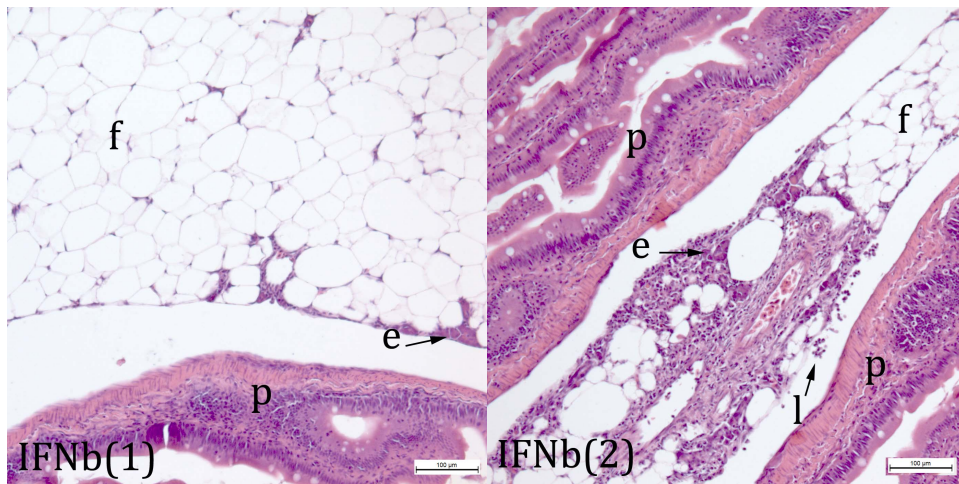
Total tap av eksokrin pankreas ble observert hos alle fisker injisert med PBS, pcDNA3.3 og pIFNa tre uker etter smitte av SAV3 (Figur 15). Minoriteten av fiskene i disse

gruppene, to til fire fisker i hver gruppe, hadde tilstedeværelse av leukocytter i pankreas.

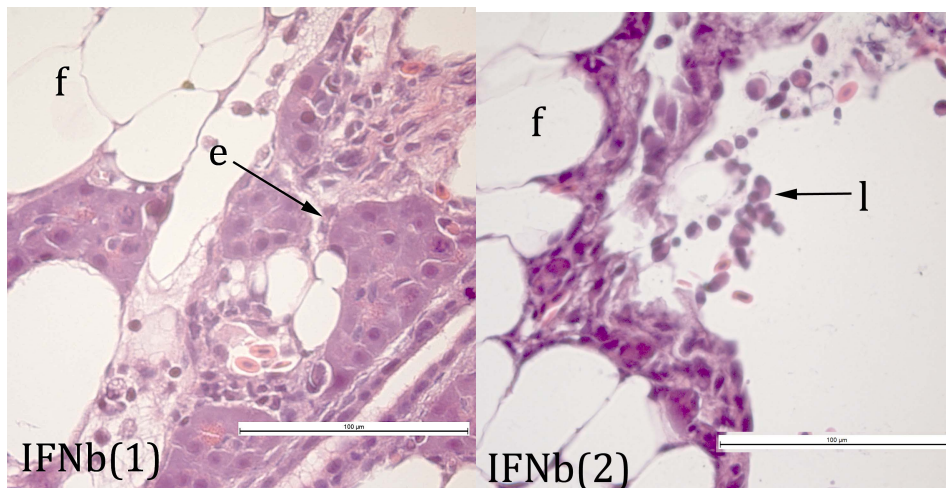


Figur 15. Pankreas tre uker etter SAV3-infeksjon fra laks injisert i.m. med 15 µl PBS (kontrollgruppe) eller 50 µg pIFNa oppløst i 50 µl PBS. Total tap av eksokrine celler, kun fettvev (f) i pankreas lokalisert ved pylorusblindsekk (p). Målestokk tilsvarende 100 µm.

Det ble observert uttalt tap av eksokrin pankreas hos fisk injisert med pIFNb (Figur 16). Fisk i denne gruppen skilte seg ut fra kontrollgrupper og pIFNa -gruppe ved å inneha små områder med intakt eksokrin pankreas i tillegg til fettvev. Det ble observert tilstedeværelse av leukocytter i pankreas hos 87% av fiskene (Figur 17).



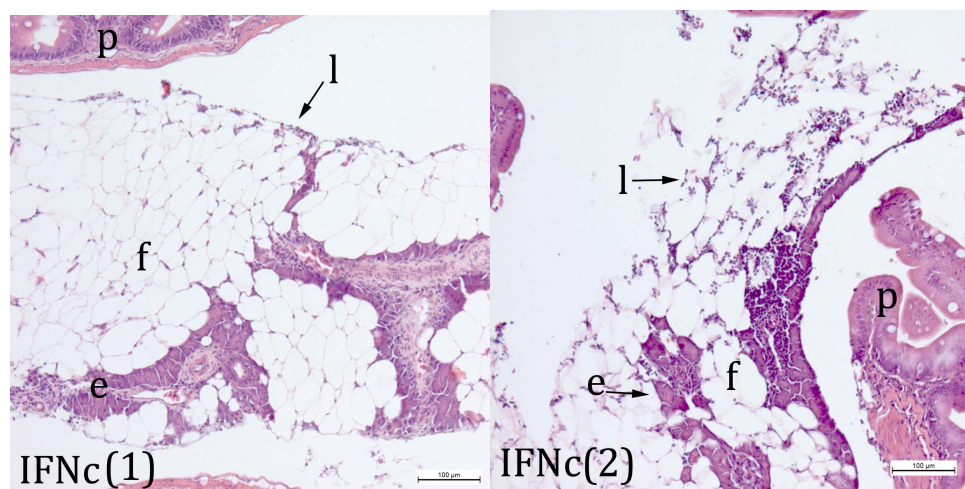
Figur 16. Pankreas tre uker etter SAV3-infeksjon fra laks injisert i.m. med 15 µg pIFNb oppløst i 50 µl PBS. Pankreas fra to fisker: IFNb(1) og IFNb(2). Begge med stort tap av eksokrin pankreas, tilstedeværelse av enkelte eksokrine celler (e) i fettvev (f), lokalisert ved pylorusblindsekk (p). Mange leukocytter (l) tilstede i IFNb(2). Målestokk tilsvare 100 µm.



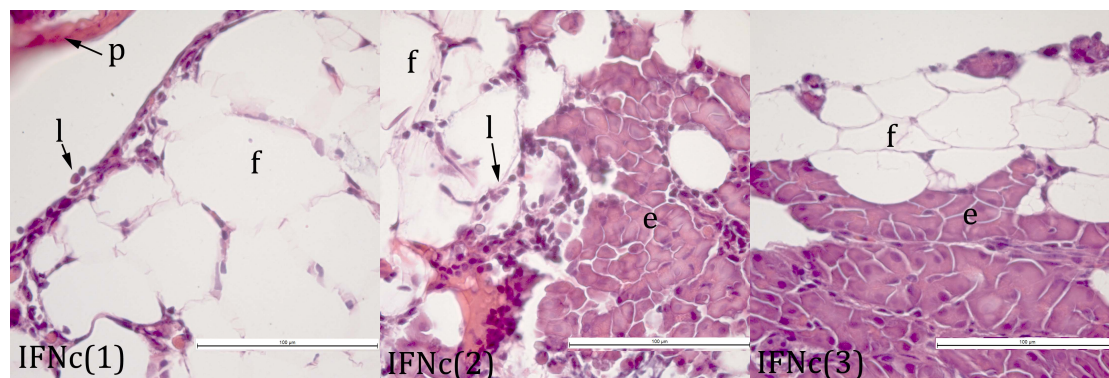
Figur 17. Pankreas tre uker etter SAV3-infeksjon fra laks injisert i.m. med 15 µg pIFNb oppløst i 50 µl PBS. Pankreas fra to fisker: IFNb(1) og IFNb(2). IFNb(1) med intakte eksokrine celler og fettvev (f). Tilstedeværelse av mange leukocytter i IFNb(2). Målestokk tilsvare 100 µm.

Majoriteten av fisk injisert med pIFNc hadde moderate forandringer i pankreas med delvis tap av eksokrine celle. I disse fiskene ble det observert områder uten eksokrine celler, men også store seksjoner med intakte celler (Figur 18). Sparsom forandring ble observert i enkelte fisker, der mindre enn 30% av pankreas var borte. Figur 19 illustrerer pankreas fra tre ulike fisker som ble gradert fra score 3 til score 1. Det ble observert tilstedeværelse av leukocytter i pankreas i 93% av fiskene. Det ble undersøkt

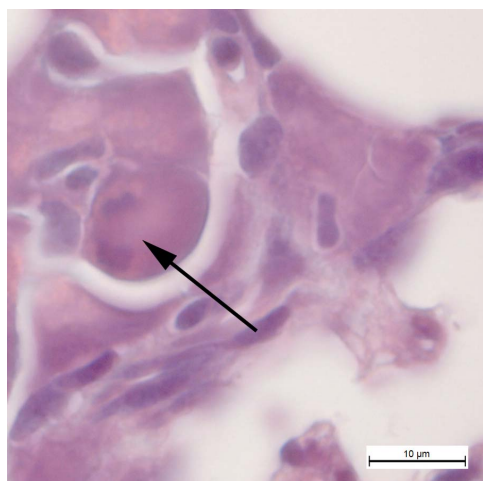
om eksokrine celler var under mitose, som er et tegn på regenerering. Figur 20 viser eksokrin celle som trolig er under mitose.



Figur 18. Pankreas tre uker etter SAV3-infeksjon fra laks injisert i.m. med 15 µg pIFNc oppløst i 50 µl PBS. Pankreas fra to fisker: IFNc(1) og IFNc(2). Begge med delvis tap av eksokrin pankreas. Eksokrin pankreas(e) i fettvev (f), lokalisert ved pylorusblindsekk (p). Mange leukocytter (l) tilstede i begge fiskene (2). Målestokk tilsvarer 100 µm.



Figur 19. Pankreas tre uker etter SAV3-infeksjon fra laks injisert i.m. med 15 µg pIFNc oppløst i 50 µl PBS. Pankreas fra tre fisker: IFNc(1), IFNc(2) og IFNc(3). IFNc(1) gradert til score 3, med total tap av eksokrin pankreas, men tilstedeværelse av leukocytter (l) rundt fettvev (f). IFNc(2) gradert til score 2, med moderat tap av eksokrin pankreas, tilstedeværelse av leukocytter (l), i tillegg til eksokrine celler (e) i fettvev (f). IFNc(3) gradert til score 1, med sparsom tap av eksokrin pankreas, majoriteten av eksokrine celler (e) intakte. Målestokk tilsvarer 100 µm.

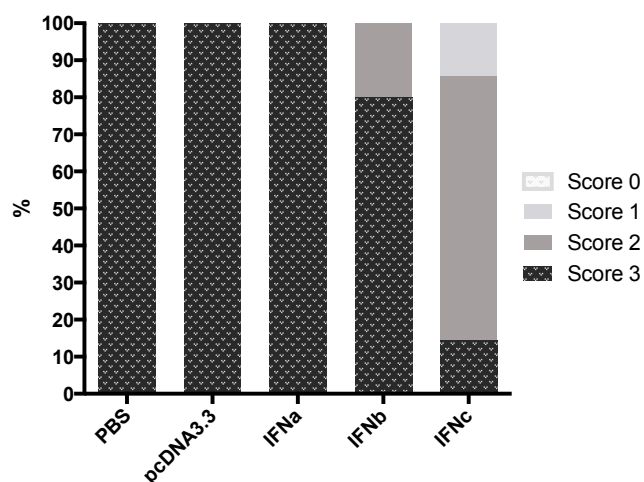


Figur 20. Eksokrine celler i pankreas tre uker etter SAV3-infeksjon fra laks injisert i.m. med 15 μ l pIFNc oppløst i 50 μ g PBS. Pil indikerer celle som trolig er under mitose. Målestokk tilsvare 10 μ m.

3.2.4 Hjerte

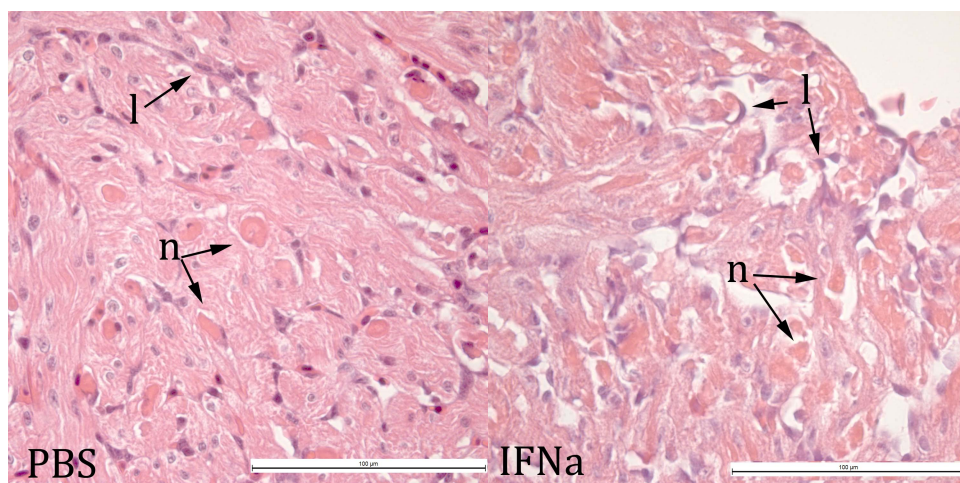
Under opplæring ble det hovedsakelig lagt vekt på forandringer i ventrikkel ved gradering av patologiske forandringer i hjerte. Grad av perikarditt ble ikke vurdert da dette kan variere mellom fisker uavhengig av sykdomsforløpet.

Figur 21 viser prosentvis score av patologiske forandringer i hjerte tre uker etter SAV3-infeksjon. Hjerte hos fisk som var injisert med PBS, pcDNA3.3 og pIFNa ble gradert til score 3. Majoriteten (80%) av fisk injisert med pIFNb ble også gradert til score 3, mens resterende (20%) fisk ble gradert til score 2. I fiskegruppe injisert med pIFNc ble 72% av fiskene gradert til score til 2 , 14% av fiskene ble scoret 1 og resterende 14% ble gradert til score 3.



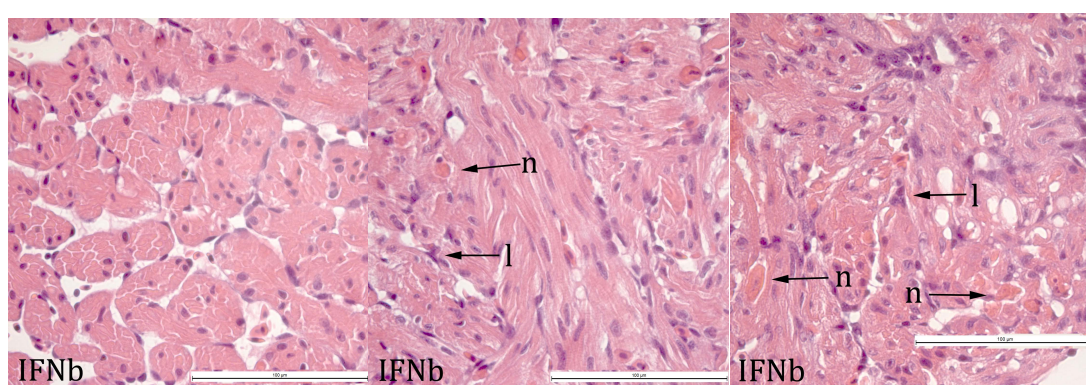
Figur 21. Patologiske forandringer i hjerte for laks injisert i.m. med 15 µg plasmid oppløst i 50 µl PBS. Ti uker etter injeksjon av plasmid ble laks smittet i.p med 5×10^3 TCID₅₀ SAV3 i 0,1 ml L-15 medium uten serum. Tre uker etter infeksjon ble det tatt ut femten fisk fra følgende grupper: PBS, pcDNA3.3, pIFNA, pIFNb og pIFNc (unntak gr . pIFNc: n=14 fisk). Prosentvis andel av fisker gradert som normal (0), sparsom forandring (1), moderat forandring (2) og uttalt forandring (3) i hjerte.

De patologiske forandringene i hjerte var like i fisk injisert med PBS, pcDNA3.3 og pIFNa. Det ble observert at ventrikkel hadde omfattende difus myocyttnekrose, med pyknotiske cellekjerner og innskrumpet, eosinofilt cytoplasma (Figur 22). Det spongiøse laget var betydelig mer affisert enn det kompakte laget, der vevet i den spongiøse delen hadde mistet den normale svampeaktige strukturen. Infiltrasjon av leukocytter ble observert i begge lag av ventrikkel, der grad av inflammasjon varierte mye mellom fiskene. Det ble ikke observert hypertrofi av myocyttkjerner i overgangen mellom kompakt og spongiøst lag.



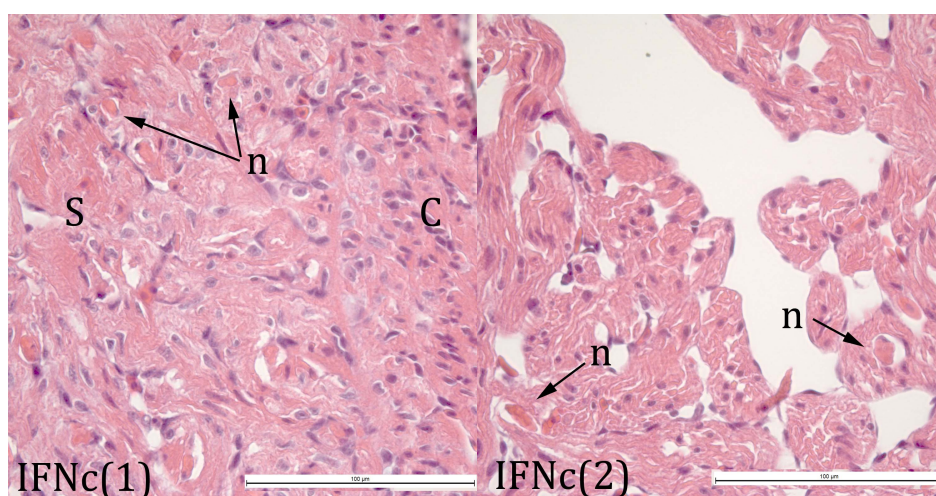
Figur 22. ventrikkel tre uker etter SAV3-infeksjon fra laks injisert i.m. med 50 µl PBS (kontrollgruppe) eller 15 µg pIFNa oppløst i 50 µl PBS. Spongiøst lag i fisker med omfattende diffus myocyttnekrose (n) og invasjon av leukocytter (l). I begge fisker er over 50% av myofibrene affisert, patologiske endringer er mer utpreget i fisk injisert med pIFNa. Målestokk tilsvare 100 µm.

Majoriteten av fisk injisert med pIFNb hadde uttalte forandringer i ventrikkel med tilsvarende endringer som nevnt tidligere. Noen av fisken (20%) i denne gruppen skilte seg fra resterende fisk ved å inneha områder med normalstruktur i ventrikkel, men også områder med uttalte forandringer (Figur 23). Denne fisken ble dermed gradert til score 2. Det ble heller ikke observert hypertrofi av myocyttkjerner i ventrikkel hos fisk injisert med pIFNb.

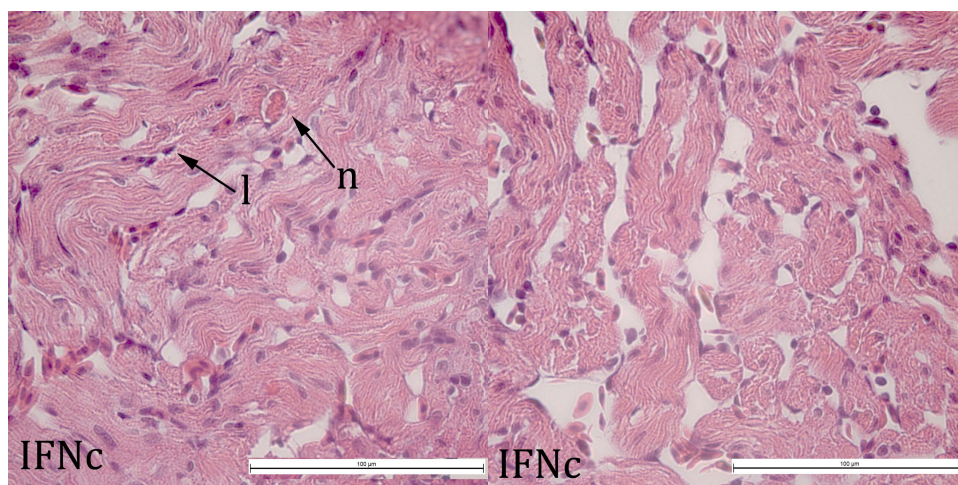


Figur 23. ventrikkel tre uker etter SAV3-infeksjon fra laks injisert i.m. med 15 µg pIFNb oppløst i 50 µl PBS. Spongiøst lag i ventrikkel fra samme fisk med ulike grader av patologiske endringer. Nekrose (n) og leukocytter (l) i flere områder, totalt er 40-50% av myofibrene affisert. Målestokk tilsvare 100 µm.

Minoriteten (14%) av fisk injisert med pIFNc hadde uttalte forandringer i ventrikkel tre uker etter SAV3-infeksjon, med tilsvarende forandringer som nevnt tidligere. Majoriteten (72%) av fisk ble scoret til 2, da over 15% av myofibrene var affiserte. Ventrikkel hadde områder med normal struktur, men også områder med multifokal myocyttnekrose (Figur 24). Det ble observert færre leukocytter i ventrikkel hos denne fisken. Enkelte fisk (14,3%) i denne gruppen hadde sparsomme forandringer i ventrikkel der enkelte fokale nekroser ble observert (Figur 25).



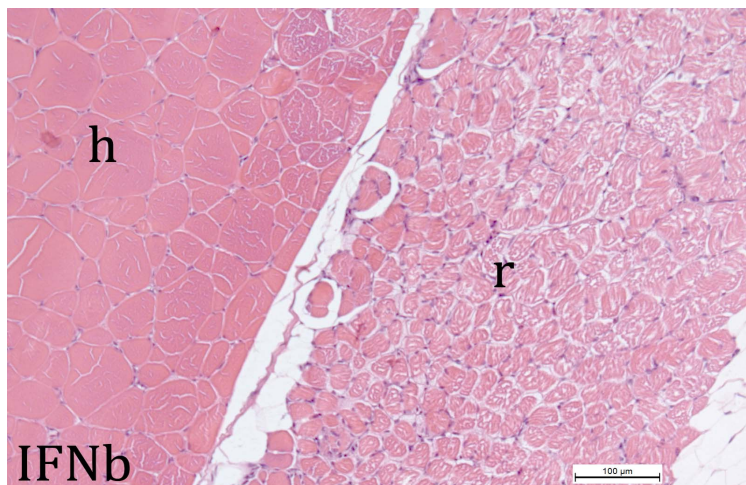
Figur 24. Ventrikkel tre uker etter SAV3-infeksjon fra laks injisert i.m. med 15 µg pIFNc oppløst i 50 µl PBS. Hjerte fra to fisker: IFNc(1) og IFNc(2). Spongiøst (S) og kompakt (C) lag i ventrikkel fra IFNc(1) og spongiøst lag i ventrikkel fra IFNc(2), begge med fokale nekroser(n). Målestokk tilsvarer 100 µm.



Figur 25. Ventrikkel tre uker etter SAV3-infeksjon fra laks injisert i.m. med 15 µg pIFNc oppløst i 50 µl PBS. Begge bildene er fra samme fisk, fokal nekrose (n) og noen leukocytter (l) tilstede. Andre områder er normale. Målestokk tilsvarer 100 µm.

3.2.5 Muskel

Det ble ikke observert patologiske forandringer i muskelvev fra noen fisk i kontrollgruppene (PBS og pcDNA3.3) eller fisk injisert med pIFN tre uker etter SAV3-infeksjon. All fisk ble gradert til score 0 - normal skjelettmuskulatur. Det ble observert at både røde og hvite muskelfibre var intakte, med flere perifert lokaliserte kjerner (Figur 26). Det ble ikke observert inflammasjon i form av fagosyterende makrofager.



Figur 26. Hvit (h) og rød (r) muskulatur tre uker etter SAV3- infeksjon fra laks injisert i.m. med 15 μg pIFNb oppøst i 50 μl PBS. Normale muskelfibre med perifert lokaliserte kjerner. Målestokk tilsvarer 100 μm.

4 Diskusjon

Pankreassykdom har utviklet seg til å bli Norges mest tapsbringende virussykdom i oppdrettsnæringen. Hovedproblemene relatert til sykdommen er dårlig tilvekst, som fører til redusert slaktekvalitet, samt dårlig fiskevelferd. I dag blir sykdommen kontrollert gjennom soneforskrifter for å hindre smittespredning. Kommersiell vaksine mot PD blir benyttet, men effekten til vaksinen er begrenset. Robertsens forskningsgruppe undersøker om IFN kan benyttes til å forebygge virussykdommer hos laksefisk. IFN induserer en rask aktivering av medfødte immunresponser som kan bekjempe virus på et tidlig stadium. I tillegg er det vist at IFN har en viktig rolle i igangsetting av adaptive immunresponser (Robertsen, 2006, Chang et al., 2015). Det er allerede vist at behandling med pIFNc gir laks god beskyttelse mot ILAV i minst åtte uker (Chang et al., 2014) Med bakgrunn i dette var det interessant å undersøke om IFN-plasmider gir beskyttende effekt mot SAV3. Det ble først undersøkt om injeksjon av IFN-plasmider førte til syntese av antiviralt Mx-protein i eksokrin pankreas, da dette er et av målorganene for SAV. Videre ble det undersøkt om IFN-plasmidene beskyttet laks mot SAV3-infeksjon.

4.1 Effekt av IFN-plasmider på uttrykk av antiviralt MX-protein i pankreas

Resultatene fra qPCR og immunohistokjemi samsvarte godt. Begge metodene viste at injeksjon med pIFNa ikke ga oppregulering av Mx-mRNA og Mx-protein i pankreas. Derimot ga både pIFNb og pIFNc oppregulering av Mx-mRNA og Mx-protein. Disse resultatene bekrefter tidligere studier som har vist at pIFNb og pIFNc induserer antivirale gener systemisk mens pIFNa ikke virker systemisk, kun lokalt (Chang et al., 2014). Fisk behandlet med pIFNc hadde et høyere gen- og proteinuttrykk av Mx sammenlignet med fisk behandlet med pIFNb. Dette tyder på at antivirale proteiner i pankreasvev blir indusert i større grad ved stimulering med IFNc enn IFNb, dette kan ha en betydning for det antivirale forsvaret. Pankreas er et av målorganene for sykdomsfremkallende virus som SAV og IPNV, der både SAV og IPNV ser ut til å foretrekke eksokrine celler i pankreas for virusreplikasjon (Swanson og Gillespie, 1979, Swanson et al., 1982, Xu et al., 2012a). Økt uttrykk av Mx-mRNA og Mx-protein etter i.m.

injeksjon av pIFNb og pIFNc hos laks viser at disse interferonene har en viktig rolle i å aktivere immunforsvaret i pankreas. Dette kan kanskje bidra til å forebygge virusinfeksjon i vevet.

Ti uker etter behandling med pIFNb og pIFNc hadde fiskene sterkere ekspresjon av Mx-protein i pankreas, sammenlignet med to uker etter behandling. Dette tyder på at uttrykk av Mx-protein øker over tid eller at proteinet akkumulerer i cellene. Mx-protein danner oligomerer i cytoplasma eller nukleus, avhengig av art. Oligomer-aggregater fører til en stabil lagringsform av Mx-protein med lang halveringstid (Melen et al., 1992, Jensen et al., 2002a).

Hos atlantisk laks er det tidligere vist at injeksjon av poly I:C (syntetisk analog av dobbeltrådig RNA som induserer IFN) gir økende oppregulering av Mx-protein frem til fire uker etter injeksjon. Deretter observeres en rask nedgang i proteinuttrykk (Das et al., 2009). I vårt forsøk ble Mx-protein uttrykt i pankreas ti uker etter injeksjon av pIFNb og pIFNc, noe som tyder på at plasmidene ikke er blitt degradert av immunsystemet. Produksjonssyklus for laks tar rundt to år fra klekking til slakting, det kreves derfor en langvarig effekt for å utvikle vaksiner til fisken som kan benyttes kommersielt (Tonheim et al., 2007). Det er i flere studier vist at injeksjon av plasmid-DNA i fisk gir vedvarende uttrykk av plasmidkodet protein på injeksjonssted. Hos atlantisk laks er transkripsjon av luciferase registrert i muskelceller 535 dager etter injeksjon av ekspresjonsplasmidet (Garver et al., 2005, Tonheim et al., 2007). Andre studier ha derimot vist at muskelceller som uttrykker eksogene proteiner blir degradert av immunsystemet slik at uttrykk av protein forsvinner (Wells et al., 1997, Lorenzen et al., 2005). Interferoner som ble brukt i dette forsøket var isolert fra laks, og vil derfor ikke oppfattes som fremmedlegeme av immunsystemet. Trolig vil ikke muskelceller som uttrykker interferoner degraderes. Dette resultatet i kombinasjon med tidligere resultater fra forskningsgruppen gir lovende indikasjoner på at pIFN har den langvarige effekten som kreves for å benyttes i vaksiner til oppdrettslaks (Lisa Bratland, masteroppgave, Chang et al., 2014).

Forskjeller i Mx-uttrykk i pankreas mellom fisker injisert med pIFNb og pIFNc kan forklares med at ulike IFN-I undergrupper har lav sekvenslikhet og binder til ulike reseptorer (Sun et al., 2009, Sun et al., 2014). Både IFNc og IFNb blir induisert via TLR7, men IFNb har trolig en mer spesialisert funksjon enn IFNc. IFNb blir hovedsakelig produsert ved gjenkjenning av ss-RNA i spesialiserte leukocytter. Derimot blir IFNc produsert av mange celletyper både ved gjenkjenning av ds-RNA og ss-RNA (Svingerud et al., 2012). Tidligere undersøkelser utført med immunohistokjemi har vist at pIFNb gir lignende nivå av Mx-protein i hepatocytter som IFNc åtte uker etter i.m. injeksjon. Derimot ble Mx i hjertevev sterkere uttrykt ved behandling med pIFNc sammenlignet med pIFNb (Chang et al., 2014). Mx i pankreasvev blir, i likhet med hjerte, sterkere uttrykt i fisk injisert med pIFNc. I vårt forsøk ble det observert sterk ekspresjon av Mx-protein i endotelceller, endokrine celler og leukocyt-lignende celler etter behandling med pIFNb og pIFNc. Sterk ekspresjon av Mx-protein i endotelceller og leukocytter er observert hos laks og menneske etter behandling med IFN eller injeksjon av poly I:C (Al-Masri et al., 1997, Das et al., 2009, Chang et al., 2014). Dette tyder på at endotelceller og leukocytter er godt rustet mot virusinfeksjoner, noe som virker sannsynlig da de begge er viktige komponenter i det medfødte immunforsvaret (Magnadottir, 2010). Hovedfunksjonen til endokrine celler er å produsere hormoner, blant annet insulin og glukagon (Bruno DW., 2013). Hvorfor endokrine celler hadde sterkt uttrykk av Mx-protein kan ikke forklares i dette forsøket.

Kontrollfisk og fisk injisert med pIFNa hadde et svakt uttrykk av Mx-protein i endotelceller, eksokrine celler og leukocytter i pankreas. Dette er tidligere observert i andre organer hos laks (Jensen et al., 2002a, Das et al., 2007, Das et al., 2009). Observasjonene støttes av resultater fra qPCR, da Ct-verdier var mellom 24-26 for Mx-mRNA i pankreas hos kontrollgrupper og pIFNa-gruppe, noe som bekrefter uttrykk av Mx-mRNA. Ct-verdi er normalt omkring 35-40 dersom Mx-mRNA ikke uttrykkes i vev. Hos mennesker er IFN- α uttrykt konstitutiv i flere typer lymfoide celler, og det er også vist at monocytter uttrykker et lavt basalnivå av Mx-protein (Ronni et al., 1993, Lallemand et al., 1996). Uttrykk av Mx-protein i noen celletyper hos laks kan være en indikasjon på at også laks produserer IFN-I eller Mx-protein konstitutiv i lave mengder.

De fleste vertebrater uttrykker Mx-protein i kjerne eller cytoplasma, og så langt er kun cytoplasmisk Mx-protein identifisert hos mennesker og atlantisk laks (Haller og Kochs, 2002, Larsen et al., 2004, Robertsen, 2006, Das et al., 2007, Chang et al., 2014). Cytoplasmiske og nukleære former av Mx er funnet i flere vertebrater, blant annet rotter og ender (Meier et al., 1988, Bazzigher et al., 1993). I ørret er det funnet tre ulike Mx-proteiner, hvor RBTMx1 og RBTMx3 er lokalisert i cytoplasma, mens RBTMx2 er lokalisert i cellekjernen (Trobridge et al., 1997). Å inneha ulike former for Mx-proteiner basert på sub-cellulær lokalisasjon kan være en fordel, da det kan bidra til å bekjempe virus som replikerer i nukleus og virus som replikerer i cytoplasma (Haller og Kochs, 2002). I dette forsøket ble uttrykk av Mx-protein observert i kjerne til flere eksokrine celler. Det kan ikke utelukkes at tilsynelatende farging av Mx-protein i kjernen kan være forårsaket av uspesifikk bakgrunnsfarging, til tross for flere forsøk for å redusere dette. Dog kan det være mulig at laks har både cytoplasmisk og nukleær form av Mx-protein siden dette tidligere er funnet hos andre arter. For å avkrefte eller bekrefte funnet kan en benytte seg av qPCR der en anvender primer som binder til templat som består av nukleær form av Mx-mRNA. Det er funnet nukleær form av Mx-mRNA hos laks (B. Robertsen, personlig meddelelse).

4.2 Effekt av IFN-plasmider på beskyttelse mot SAV3

Fiskegrupper som var behandlet med IFN-plasmider ble smittet med SAV3 ti uker etter IFN-injeksjon. Etter en uke ble fisken analysert for virusmengde i blod, og etter tre uker ble patologiske forandringer undersøkt. Resultater fra qPCR og histopatologi viste at kontrollgruppene (injisert med PBS eller kontrollplasmid) hadde høye nivåer av SAV-partikler i blodet og uttalte forandringer i pankreas og hjerte som var forenelig med PD. Virusinfeksjon var dermed vellykket. I.m. injisering av pIFNa ga ingen beskyttelse mot SAV3-infeksjon, da verken resultater fra qPCR eller histopatologi var forskjellige fra kontrollgrupper. Fisk injisert med pIFNb hadde signifikant lavere virusmengde i blod sammenlignet med kontrollgruppe ($p < 0,05$). Til forskjell fra kontrollgrupper ble det observert noen intakte eksokrine celler i pankreas og færre nekroser i hjerte hos fisk stimulert med pIFNb. Til tross for dette var skader i vev så uttalte at majoriteten av fisk ble gradert til score 3 i affisert vev. Fisk injisert med pIFNc hadde meget signifikant lavere mengde viruspartikler i blodet sammenlignet med kontrollgrupper ($P < 0,0001$), og signifikant lavere enn IFNb ($p < 0,05$). Majoriteten av fisk i pIFNc-gruppe hadde moderate forandringer i affisert vev. Resultatene tyder på at pIFNb kan ha dempet virusreplikasjonen noe i viremisk fase, men siden patologiske endringer var uttalte har ikke beskyttelse vært sterk nok til å til å hemme virusreplikasjonen i målvev. Fisk injisert med pIFNc har vært bedre beskyttet mot SAV3-virus sammenlignet med de andre fiskegruppene. Behandling med pIFNc har imidlertid ikke etablert et antiviralt forsvar som har gitt full beskyttelse mot infeksjonen, da både pankreas og hjerte hadde patologiske forandringer forårsaket av SAV.

Mildere forandringer i pankreas hos fisk behandlet med pIFNc samsvarte godt med resultater i del en av forsøket, da det ble observert høyest oppregulering av Mx-mRNA og Mx-protein i denne gruppen. Dette indikerer at mengde Mx-protein (og andre antivirale proteiner) har betydning for utfall av SAV3-infeksjon. Det at en ikke oppnår full beskyttelse mot SAV3 etter injeksjon med pIFNc kan skyldes at viruset infiserer celler som ikke blir stimulert av IFNc eller at SAV3 evner å motvirke viktige antivirale proteiner. Dette bør undersøkes nærmere.

Pankreas var det vevet som var hardest rammet av SAV3-infeksjon tre uker etter smitte. Det var kun var fisker i pIFNc-gruppe som fikk lavere patologisk score enn 3. Dette samsvarer godt med tidligere undersøkelser som viser at pankreas trolig er foretrekkende vev for SAV3-replikasjon, og det er det første vevet der skade detekteres (McLoughlin et al., 2002, Xu et al., 2012a). Siden det ikke ble observert akutt nekrose i pankreas, tyder dette på at akutt stadium var passert i alle gruppene. Da det ikke ble funnet patologiske endringer i muskel tyder det på at fisk var i sub-akutt stadium av sykdom etter tabell 1.

Både fisk fra pIFNb-gruppe og særlig pIFNc-gruppe hadde intakte eksokrine celler igjen i pankreas. Disse cellene kan ha klart seg gjennom hele infeksjonen på grunn av et forsterket antiviralt forsvar forårsaket av pIFN. Intakte eksokrine celler kan også ha vært regenererte celler. Hvor raskt vev regenereres etter PD-utbrudd er varierende og kan korrelere med alvorlighetsgrad på utbrudd samt miljømessige faktorer. Regenerering av eksokrine celler kan skje i løpet av to uker, men det kan også ta opp til tre måneder før regenerering observeres (Mcvicar, 1987). Under opplæring med Jinni Gu ble det lagt vekt på å se etter eksokrine celler i mitose som et tegn på regenerering. I enkelte celler ble det funnet deling av cellekjerne (Figur 20). Disse cellene var trolig under mitose, men majoriteten av cellene viste ikke tegn til dette. Det er derfor vanskelig å fastslå om eksokrine celler som ble observert var regenererte eller ikke. Dette ville vært lettere å avgjøre om patologiske forandringer hadde blitt undersøkt ved flere tidspunkter i sykdomsforløpet. Hjertemuskel hadde ikke tegn til regenerering da det ikke ble observert observeres hypertrofi av myocyttkjerner i overgangen mellom kompakt og spongiøst lag i ventrikkel. Dette kan tyde på at hjerter med moderate eller sparsomme forandringer i muskulatur har hatt områder der muskelceller har vært intakte gjennom hele virusinfeksjonen. Det er vanlig å ikke observere patologiske endringer i skjelettmuskel før etter tre til fire uker etter at skader i hjerte og pankreas er detektert (McLoughlin og Graham, 2007). Det var derfor ikke forventet å finne endringer i dette vevet. Virusmengde har kanskje ikke vært høy nok til å kunne påvirke muskelvev i stor nok grad til å forårsake forandringer. Det er tidligere vist at virusmengde må over en viss terskelverdi for å forårsake patologiske endringer i vev (Xu et al., 2012a). Det ville vært interessant å måle virusmengde i vev med qPCR for å undersøke om virusmengde i vev korresponderte patologiske endringer.

Det var stor variasjon i antall leukocytter tilstede i pankreas mellom ulike pIFN-grupper etter infeksjon med SAV3. Kontrollgrupper og pIFNa-gruppe hadde ingen eller få leukocytter i pankreas, mens det ble observert massiv infiltrasjon av leukocytter i pankreasvev i pIFNb- og pIFNc-gruppe. Det er tidligere vist stor variasjon i tilstedeværelse av leukocytter i pankreas ved SAV-infeksjon (McLoughlin et al., 2002, Desvignes et al., 2002, Taksdal et al., 2007, Xu et al., 2012a). Hvilke betydning leukocytter har i pankreasvev etter SAV-infeksjon er uviss. Ved histopatologi observeres normalt leukocytter etter akutt stadium og de er trolig viktig for å fjerne døde celler samt å bygge opp nye celler. Men regenerasjon kan i enkelte tilfeller forekomme helt uten tilstedeværelse av leukocytter (Jinni Gu, personlig meddelelse).

Ingen av interferonene i dette forsøket ga full beskyttelse mot SAV3-virus. *In-vitro* forsøk har vist at IFN har en sterk inhiberende effekt på SAV3-replikasjon, men behandlingstidspunkt er viktig. Jo senere behandling med IFN jo mindre beskyttelse mot SAV (Xu et al., 2010, Sun et al., 2011). I vårt forsøk ble fisk smittet med SAV3-virus ti uker etter i.m. injeksjon av pIFN, og rett før smitte ble det bekreftet et økt uttrykk av Mx-protein i eksokrine celler i pankreas. Økt uttrykk av Mx-protein tyder på et økt antiviralt forsvar. Effekten av et økt antiviralt forsvar har i vårt forsøk ikke vært sterk nok til å stoppe virusinfeksjonen. Det er tidligere vist at flere virus har evne til å hemme ulike deler av interferonsystemet (Weber og Haller, 2007). Mekanismene som fører til hemming av medfødt immunforsvar kan influere utfallet av infeksjonen, ved at virus er i stand til å replikere i celler selv om vertens immunforsvar er intakt (Workenhe et al., 2010). Alfavirus som infiserer andre vertebrater har vist seg å kunne hemme IFN-signalerings *in vitro*, blant annet ved å forstyrre STAT1-signalerings (Simmons et al., 2009, Simmons et al., 2010). Det er ikke undersøkt om SAV har lignende egenskaper. Selv om det er vist at IFNa har sterk inhiberende effekt mot SAV i cellekultur (Sun et al., 2011), kan en ikke utelukke at SAV kan interferere og hemme ulike mekanismer i interferonsystemet.

4.3 Kan interferoner-plasmider benyttes til å beskytte laks mot SAV?

Det er velkjent at IFN-I etablerer et antiviralt stadium i uinfiserte celler ved virusinfeksjon. Interferoner og deres virkningsmekanismer er viktigst i tidlig del av virusinfeksjon, før det adaptive immunresponsene har reagert, men kan også bidra til å sette i gang adaptive immunresponser (Samuel, 2001, Robertsen, 2006, Chang et al., 2015). Hos mennesker benyttes IFN-I (IFN- α) hovedsakelig til behandling av pasienter med kronisk hepatitt C virus (George et al., 2012). Rekombinant IFN- α har også vist beskyttende effekt mot influensavirus hos flere vertebrater, blant annet kylling og marsvin (Van Hoeven et al., 2009, Meng et al., 2011). Dessverre er det svært kostbart å produsere rekombinante IFN i tillegg til at de degraderes raskt. Dette gjør at de er lite egnet i oppdrett av fisk der det kreves langvarig beskyttelse og kosteffektive vaksiner. Som nevnt tidligere er det vist at pIFNc gir beskyttelse mot ILAV i minst åtte uker og det er observert et vedvarende Mx-uttrykk i lever i minst 22 uker. Begge resultatene indikerer at pIFNc har den langvarige effekten som kreves for å gi langvarig beskyttelse mot sykdom gjennom en hel produksjonssyklus.

Pankreassykdom er den mest tapsbringende virussykdommen i norsk fiskeoppdrett. Tross iherdig arbeid utført av næring og forvaltning som inkluderer en rekke smitteforebyggende tiltak samt bekjempelsesstrategier har antall utbrudd av PD har økt. Nye løsninger – som å benytte IFN som immunostimulant kan muligens bidra til å forebygge sykdommen.

Å utvikle effektive DNA-vaksiner mot flere fiskepatogener, for eks. PD, IPNV, ILA og nodavirus har vist seg å være utfordrende (Mikalsen et al., 2005, Sommerset et al., 2005b, Munang'andu et al., 2012, Xu et al., 2012b). Ved ILA-infeksjon ble det vist at pIFN har immunostimulerende-effekt. DNA-vaksine med antigenet hemaggluininesterase (HE) gir alene liten beskyttelse mot ILA, men om HE injiseres i.m. sammen med pIFN-I økes beskyttelse mot sykdommen betraktelig (Chang et al., 2015). Vårt resultat kan tyde på pIFNc kanskje kan være en viktig komponent i en DNA-vaksine mot PD. IFNc som immunostimulant kan bidra å sette i gang medfødte og adaptive immunresponser i vaksiner der antigenet alene ikke gir tilstrekkelig beskyttelse.

Responsmekanismer involvert hos vert i forsvar mot virus er bestemt av komplekse interaksjoner mellom vert og virus. I oppdrett kan uheldige forhold som stress og infeksjon svekke fiskens førstelinjeforsvar, og dermed gjøre den mer mottakelig for infeksjon (Robertsen, 2008). Det er mange faktorer som bestemmer utfallet ved PD-utbrudd, det er blant annet blitt rapportert at anlegg med IPN-utbrudd har større risiko for å få PD-utbrudd. Under enkelte omstendigheter kan sykdommer som HSMB, CMS og gjelleinflammasjon også influere utfall på PD-utbrudd (Mcvicar, 1987, Jensen et al., 2012). Dette tyder på at fisk som allerede har et svekket immunforsvar kan være mer mottakelig for PD. En positiv egenskap med å bruke IFN som immunostimulant i PD-vaksine er induksjon av et bredt spekter av antivirale gener som også etablerer et antiviralt forsvar mot andre virussykdommer. Dette kan kanskje føre til at fisk blir mindre mottakelig for PD som sekundærinfeksjon.

I eksperimentelle forsøk har fisk vesentlig bedre forhold enn fisk i kommersielt oppdrett, da oppdrettsfisk er mer eksponert for flere stressfaktorer som naturlig eksponering av patogener, plassmangel og vannstrømmer (Herath et al., 2013). Det er kan være en av grunnene til at flere forsøk har gitt gode resultater eksperimentelt, men ikke i felt (Gomez-Casado et al., 2011). Det er derfor viktig å undersøke om pIFNc har like beskyttende effekt når fisk eksponeres for stressfaktorer som forekommer i kommersielt oppdrett. I tillegg må det undersøkes om bruk av IFN som DNA-vaksine eller som adjuvant i DNA-vaksine kan gi uønskede effekter. Deriblant må eventuelle bivirkninger, redusert tilvekstvekt og redusert fiskehelse og fiskevelferd undersøkes nærmere ved bruk av p-IFN.

4.4 Konklusjon

- pIFNb og pIFNc virker systemisk og fører til signifikant oppregulering av Mx-mRNA og ekspresjon av Mx-protein i pankreas. pIFNa virker ikke systemisk da det ikke ga signifikant oppregulering av Mx-mRNA eller ekspresjon av Mx-protein i pankreas.
- Fisk som var injisert med pIFNb og pIFNc hadde signifikant lavere virusmengde i blod sammenlignet med kontrollgrupper etter SAV3-infeksjon. Det var lavere virusmengde i blod hos fisk injisert med pIFNc enn hos fisk injisert med pIFNb. Det var ingen signifikante forskjeller i virusmengde mellom pIFNa-gruppe og kontrollgruppe. Dette tyder på at pIFNb og pIFNc kan ha induisert et forsterket antiviralt forsvar i viremisk fase.
- All fisk i pIFNa -gruppe og majoriteten av fisk i pIFNb-gruppe, hadde uttalte patologiske forandringer i pankreas og hjerte tre uker etter SAV3-infeksjon. Majoriteten av fisk i pIFNc-gruppe hadde bare moderate forandringer i pankreas og hjerte. Dette tyder på at pIFNc har gitt delvis beskyttelse mot SAV3-virus.
- Ingen av IFN-plasmidene ga full beskyttelse mot SAV3-infeksjon alene. Resultatene indikerer at pIFNc kan bidra til å øke beskyttelse mot SAV3-infeksjon hos laks.

Referanser

- Abbas, A. K., Lichtman, A. H. & Pillai, S. (2012) Basic Immunology- Functions and Disorders of the immune system. (Fourth Edition) Elsevier Saunders, Philadelphia.
- abcam. *IHC- PARAFFIN PROTOCOL (IHC-P)*.
http://www.abcam.com/ps/pdf/protocols/ihc_p.pdf. (Nedlastet 03.05 2015).
- 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. *The Journal of Immunology*, **183** (6), 3924-3931.
- Aguilar, P. V., Paessler, S., Carrara, A.-S., Baron, S., Poast, J., Wang, E., Moncayo, A. C., Anishchenko, M., Watts, D. & Tesh, R. B. (2005) Variation in interferon sensitivity and induction among strains of eastern equine encephalitis virus. *Journal of Virology*, **79** (17), 11300-11310.
- Al-Masri, A., Werfel, T., Jakschies, D. & Von Wussow, P. (1997) Intracellular staining of Mx proteins in cells from peripheral blood, bone marrow and skin. *Molecular Pathology*, **50** (1), 9.
- Anderson, D. P. (1992) Immunostimulants, adjuvants, and vaccine carriers in fish: applications to aquaculture. *Annual Review of Fish Diseases*, **2**, 281-307.
- 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** (2-3), 233-241.
- Bazzigher, L., Schwarz, A. & Staeheli, P. (1993) No enhanced influenza virus resistance of murine and avian cells expressing cloned duck Mx protein. *Virology*, **195** (1), 100-112.
- Bergan, V., Jagus, R., Lauksund, S., Kileng, Ø. & Robertsen, B. (2008) The Atlantic salmon Z - DNA binding protein kinase phosphorylates translation initiation factor 2 alpha and constitutes a unique orthologue to the mammalian dsRNA - activated protein kinase R. *Febs Journal*, **275** (1), 184-197.
- Biron, C. A., Nguyen, K. B., Pien, G. C., Cousens, L. P. & Salazar-Mather, T. P. (1999) Natural killer cells in antiviral defense: function and regulation by innate cytokines. *Annual review of immunology*, **17** (1), 189-220.
- Bornø, G. & Lineaker Lie, M. (2015) Fiskehelse rapporten 2014. Harstad, Veterinærinstituttet.
- Brudeseth, B. E., Wiulsrød, R., Fredriksen, B. N., Lindmo, K., Løkling, K.-E., Bordevik, M., Steine, N., Klevan, A. & Gravningen, K. (2013) Status and future perspectives of vaccines for industrialised fin-fish farming. *Fish & shellfish immunology*, **35** (6), 1759-1768.
- Bruno DW., Noguera AP., Poppe TP. (2013) Functional Anatomy. *A Colour Atlas of Salmonid Diseases*. (second Edition) Springer Science & Business Media B.V.
- Chang, C.-J., Sun, B. & Robertsen, B. (2015) Adjuvant activity of fish type I interferon shown in a virus DNA vaccination model. *Vaccine*, **33** (21), 2442-2448.
- Chang, C. J., Robertsen, C., Sun, B. & Robertsen, B. (2014) Protection of Atlantic salmon against virus infection by intramuscular injection of IFNc expression plasmid. *Vaccine*, **32** (36), 4695-4702.

- Chang, M., 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** (16), 8403-8412.
- Christie, K. E., Graham, D. A., McLoughlin, M. F., Villoing, S., Todd, D. & Knappskog, D. (2007) Experimental infection of Atlantic salmon *Salmo salar* pre-smolts by i.p. injection with new Irish and Norwegian salmonid alphavirus (SAV) isolates: a comparative study. *Diseases of Aquatic Organisms*, **75** (1), 13-22.
- Corr, M., Lee, D. J., Carson, D. A. & Tighe, H. (1996) Gene vaccination with naked plasmid DNA: mechanism of CTL priming. *The Journal of experimental medicine*, **184** (4), 1555-1560.
- Crockford, T., Menzies, F. D., McLoughlin, M. F., Wheatley, S. B. & Goodall, E. A. (1999) Aspects of the epizootiology of pancreas disease in farmed Atlantic salmon *Salmo salar* in Ireland. *Diseases of Aquatic Organisms*, **36** (2), 113-119.
- D'Cunha, J., Knight, E., Haas, A. L., Truitt, R. L. & Borden, E. C. (1996) Immunoregulatory properties of ISG15, an interferon-induced cytokine. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **93** (1), 211-215.
- Das, B., Nayak, K., Fourrier, M., Collet, B., Snow, M. & Ellis, A. (2007) Expression of Mx protein in tissues of Atlantic salmon post-smolts—an immunohistochemical study. *Fish & shellfish immunology*, **23** (6), 1209-1217.
- Das, B. K., Ellis, A. E. & Collet, B. (2009) Induction and persistence of Mx protein in tissues, blood and plasma of Atlantic salmon parr, *Salmo salar*, injected with poly I: C. *Fish & shellfish immunology*, **26** (1), 40-48.
- Desvignes, L., Quentel, C., Lamour, F. & Le Ven, A. (2002) Pathogenesis and immune response in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) parr experimentally infected with salmon pancreas disease virus (SPDV). *Fish & shellfish immunology*, **12** (1), 77-95.
- Doe, B., Selby, M., Barnett, S., Baenziger, J. & Walker, C. M. (1996) Induction of cytotoxic T lymphocytes by intramuscular immunization with plasmid DNA is facilitated by bone marrow-derived cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **93** (16), 8578-8583.
- Evensen, O. & Leong, J. A. (2013) DNA vaccines against viral diseases of farmed fish. *Fish Shellfish Immunology*, **35** (6), 1751-1758.
- Farr, A. G. & Nakane, P. K. (1981) Immunohistochemistry with enzyme labeled antibodies: a brief review. *Journal of Immunological Methods*, **47** (2), 129-144.
- Fiskeri- og kystdepartementet (2007) FOR: 2007-11-20 nr 1315: Forskrift om sone for å hindre smitte og bekjempe pankreassjukdom hos akvakulturdyr. <https://lovdata.no/dokument/FV/forskrift/2007-11-20-1315>. (Nedlastet 25.10 2015).
- Fiskeri- og kystdepartementet (2008a) FOR-2008-06-17-819: Forskrift om omsetning av akvakulturdyr og produkter av akvakulturdyr, forebygging og bekjempelse av smittsomme sykdommer hos akvatiske dyr. <https://lovdata.no/dokument/SF/forskrift/2008-06-17-819>. (Nedlastet 03.11 2015).
- Fiskeri- og kystdepartementet (2008b) FOR:2008-06-17-822: Forskrift om drift av akvakulturanlegg (akvakulturdriftsforskriften) <https://lovdata.no/dokument/SF/forskrift/2008-06-17-822>. (nedlastet 03.11 2015).

- Fiskeri- og kystdepartementet (2012) FOR: 2012-11-06-1056: Forskrift om sone for å begrense spredning og utbrudd av pankreassjukdom forårsaket av SAV2 hos akvakulturdyr. <https://lovdata.no/dokument/FV/forskrift/2012-11-06-1056>. (Nedlastet 25.10 2015).
- Fiskeri- og kystdepartementet (2015) FOR: 2015-05-05-438: Forskrift om bekjempelse av SAV2 i Nordfjord, Sogn og Fjordane. <https://lovdata.no/dokument/FV/forskrift/2015-05-05-438>. (Nedlastet 25.10 2015).
- Fringuelli, E., Rowley, H. M., Wilson, J. C., Hunter, R., Rodger, H. & Graham, D. A. (2008) Phylogenetic analyses and molecular epidemiology of European salmonid alphaviruses (SAV) based on partial E2 and nsP3 gene nucleotide sequences. *Journal of Fish Diseases*, **31** (11), 811-823.
- Gahlawat, S. K., Ellis, A. E. & Collet, B. (2009) Expression of interferon and interferon-Induced genes in Atlantic salmon *Salmo salar* cell lines SHK-1 and TO following infection with Salmon AlphaVirus SAV. *Fish & shellfish immunology*, **26** (4), 672-675.
- Garcia, M., Gil, J., Ventoso, I., Guerra, S., Domingo, E., Rivas, C. & Esteban, M. (2006) Impact of protein kinase PKR in cell biology: from antiviral to antiproliferative action. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, **70** (4), 1032-1060.
- Garver, K. A., Conway, C. M., Elliott, D. G. & Kurath, G. (2005) Analysis of DNA-vaccinated fish reveals viral antigen in muscle, kidney and thymus, and transient histopathologic changes. *Marine Biotechnology (NY)*, **7** (5), 540-553.
- George, P. M., Badiger, R., Alazawi, W., Foster, G. R. & Mitchell, J. A. (2012) Pharmacology and therapeutic potential of interferons. *Pharmacology & therapeutics*, **135** (1), 44-53.
- Gillund, F., Dalmo, R., Tonheim, T. C., Seternes, T. & Myhr, A. I. (2008) DNA vaccination in aquaculture—expert judgments of impacts on environment and fish health. *Aquaculture*, **284** (1), 25-34.
- Gomez-Casado, E., Estepa, A. & Coll, J. (2011) A comparative review on European-farmed finfish RNA viruses and their vaccines. *Vaccine*, **29** (15), 2657-2671.
- Gordien, E., Rosmorduc, O., Peltekian, C., Garreau, F., Bréchet, C. & Kremsdorf, D. (2001) Inhibition of hepatitis B virus replication by the interferon-inducible MxA protein. *Journal of Virology*, **75** (6), 2684-2691.
- 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** (4), 273-286.
- Haller, O. & Kochs, G. (2002) Interferon - induced Mx proteins: dynamin - like GTPases with antiviral activity. *Traffic*, **3** (10), 710-717.
- Haller, O., Staeheli, P. & Kochs, G. (2007) Interferon-induced Mx proteins in antiviral host defense. *Biochimie*, **89** (6), 812-818.
- Hastein, T., Gudding, R. & Evensen, O. (2005) Bacterial vaccines for fish--an update of the current situation worldwide. *Progress in Fish Vaccinology, Developments in Biologicals*, **121**, 55-74.
- Heid, C. A., Stevens, J., Livak, K. J. & Williams, P. M. (1996) Real time quantitative PCR. *Genome Research*, **6** (10), 986-994.

- Herath, T. K., Bron, J. E., Thompson, K. D., Taggart, J. B., Adams, A., Ireland, J. H. & Richards, R. H. (2012) Transcriptomic analysis of the host response to early stage salmonid alphavirus (SAV-1) infection in Atlantic salmon *Salmo salar* L. *Fish & shellfish immunology*, **32** (5), 796-807.
- Herath, T. K., Thompson, K. D., Adams, A. & Richards, R. H. (2013) Interferon-mediated host response in experimentally induced salmonid alphavirus 1 infection in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Vet Immunol Immunopathol*, **155** (1), 9-20.
- Hjortaa, M. J., Bang Jensen, B., Taksdal, T., Olsen, A. B., Lillehaug, A., Trettenes, E. & Sindre, H. (2015) Genetic characterization of salmonid alphavirus in Norway. *Journal of Fish Diseases*, early view.
- Hjortaa, 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** (1), 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** (2), 113-120.
- Hølvold, L. B., Myhr, A. I. & Dalmo, R. A. (2014) Strategies and hurdles using DNA vaccines to fish. *Veterinary Research*, **45**, 21.
- Iversen, M. B. & Paludan, S. R. (2010) Mechanisms of type III interferon expression. *Journal of Interferon & Cytokine Research*, **30** (8), 573-578.
- Janeway, C. A., Jr. & Medzhitov, R. (2002) Innate immune recognition. *Annual Review of Immunology*, **20**, 197-216.
- Jansen, M. D., Gjerset, B., Modahl, I. & Bohlin, J. (2010) Molecular epidemiology of salmonid alphavirus (SAV) subtype 3 in Norway. *Virology Journal*, **7**(1)188.
- Jansen, M. D., Jensen, B. B. & Brun, E. (2015) Clinical manifestations of pancreas disease outbreaks in Norwegian marine salmon farming - variations due to salmonid alphavirus subtype. *Journal of Fish Diseases*, **38** (4), 343-353.
- Jensen, B. B., Kristoffersen, A. B., Myr, C. & Brun, E. (2012) Cohort study of effect of vaccination on pancreas disease in Norwegian salmon aquaculture. *Diseases of Aquatic Organisms*, **102**, 23-31.
- Jensen, I., Albuquerque, A., Sommer, A.-I. & Robertsen, B. (2002a) Effect of poly I: C on the expression of Mx proteins and resistance against infection by infectious salmon anaemia virus in Atlantic salmon. *Fish & shellfish immunology*, **13** (4), 311-326.
- Jensen, I., Larsen, R. & Robertsen, B. (2002b) An antiviral state induced in Chinook salmon embryo cells (CHSE-214) by transfection with the double-stranded RNA poly I: C. *Fish & shellfish immunology*, **13** (5), 367-378.
- Jørgensen, J. B. (2014) The Innate Immune Response in Fish. *Fish Vaccination*, **1**, 84-102.
- Karlsen, M., Hodneland, K., Endresen, C. & Nylund, A. (2006) Genetic stability within the Norwegian subtype of salmonid alphavirus (family Togaviridae). *Archives of Virology*, **151** (5), 861-874.
- Kibenge, F. S., Godoy, M. G., Fast, M., Workenhe, S. & Kibenge, M. J. (2012) Countermeasures against viral diseases of farmed fish. *Antiviral research*, **95** (3), 257-281.

- Kim, C. H., Johnson, M. C., Drennan, J. D., Simon, B. E., Thomann, E. & Leong, J.-A. C. (2000) DNA vaccines encoding viral glycoproteins induce nonspecific immunity and Mx protein synthesis in fish. *Journal of Virology*, **74** (15), 7048-7054.
- Kochs, G. & Haller, O. (1999) GTP-bound human MxA protein interacts with the nucleocapsids of Thogoto virus (*Orthomyxoviridae*). *Journal of Biological Chemistry*, **274** (7), 4370-4376.
- Kristoffersen, A. B., Viljugrein, H., Kongtorp, R. T., Brun, E. & Jansen, P. A. (2009) Risk factors for pancreas disease (PD) outbreaks in farmed Atlantic salmon and rainbow trout in Norway during 2003-2007. *Preventive Veterinary Medicine*, **90** (1-2), 127-136.
- Kumar, H., Kawai, T. & Akira, S. (2011) Pathogen recognition by the innate immune system. *International reviews of immunology*, **30** (1), 16-34.
- Kutzler, M. A. & Weiner, D. B. (2008) DNA vaccines: ready for prime time? *Nature Reviews Genetics*, **9** (10), 776-788.
- Lallemant, C., Lebon, P., Rizza, P., Blanchard, B. & Tovey, M. (1996) Constitutive expression of specific interferon isotypes in peripheral blood leukocytes from normal individuals and in promonocytic U937 cells. *Journal of leukocyte biology*, **60** (1), 137-146.
- Larsen, R., Røkenes, T. P. & Robertsen, B. (2004) Inhibition of infectious pancreatic necrosis virus replication by Atlantic salmon Mx1 protein. *Journal of Virology*, **78** (15), 7938-7944.
- Le Bon, A., Thompson, C., Kamphuis, E., Durand, V., Rossmann, C., Kalinke, U. & Tough, D. F. (2006) Cutting edge: enhancement of antibody responses through direct stimulation of B and T cells by type I IFN. *The Journal of Immunology*, **176** (4), 2074-2078.
- Lester, K., Hall, M., Urquhart, K., Gahlawat, S. & Collet, B. (2012) Development of an in vitro system to measure the sensitivity to the antiviral Mx protein of fish viruses. *Journal of virological methods*, **182** (1), 1-8.
- Loo, Y.-M. & Gale, M. (2011) Immune signaling by RIG-I-like receptors. *Immunity*, **34** (5), 680-692.
- Lorenzen, E., Lorenzen, N., Einer-Jensen, K., Brudeseth, B. & Evensen, Ø. (2005) Time course study of in situ expression of antigens following DNA-vaccination against VHS in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum) fry. *Fish & shellfish immunology*, **19** (1), 27-41.
- Lorenzen, N., Lorenzen, E., Einer-Jensen, K., Heppell, J. & Davis, H. (1999) Genetic vaccination of rainbow trout against viral haemorrhagic septicaemia virus: small amounts of plasmid DNA protect against a heterologous serotype. *Virus Research*, **63** (1), 19-25.
- Magnadottir, B. (2010) Immunological control of fish diseases. *Marine Biotechnology*, **12** (4), 361-379.
- 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. *The Journal of Immunology*, **181** (5), 3474-3485.
- McLoughlin, M., Graham, D., Norris, A., Matthews, D., Foyle, L., Rowley, H., Jewhurst, H., MacPhee, J. & Todd, D. (2006) Virological, serological and histopathological evaluation of fish strain susceptibility to experimental infection with salmonid alphavirus. *Diseases of Aquatic Organisms*, **72**, 125-133.

- McLoughlin, M., Nelson, R., McCormick, J., Rowley, H. & Bryson, D. (2002) Clinical and histopathological features of naturally occurring pancreas disease in farmed Atlantic salmon, *Salmo salar* L. *J Fish Dis*, **25** (1), 33-43.
- McLoughlin, M. F. & Graham, D. A. (2007) Alphavirus infections in salmonids--a review. *Journal of Fish Diseases*, **30** (9), 511-531.
- McLoughlin, M. F., Nelson, R. T., Rowley, H. M., Cox, D. I. & Grant, A. N. (1996) Experimental pancreas disease in Atlantic salmon *Salmo salar* post-smolts induced by salmon pancreas disease virus (SPDV). *Diseases of Aquatic Organisms*, **26** (2), 117-124.
- Mcvicar, A. H. (1987) Pancreas Disease of Farmed Atlantic Salmon, *Salmo-Salar*, in Scotland - Epidemiology and Early Pathology. *Aquaculture*, **67** (1-2), 71-78.
- Medzhitov, R. & Janeway, C. A. (1997) Innate immunity: impact on the adaptive immune response. *Current opinion in immunology*, **9** (1), 4-9.
- Meier, E., Fäh, J., Grob, M. S., End, R., Staeheli, P. & Haller, O. (1988) A family of interferon-induced Mx-related mRNAs encodes cytoplasmic and nuclear proteins in rat cells. *Journal of Virology*, **62** (7), 2386-2393.
- Meijer, A. H., Krens, S. G., Rodriguez, I. A. M., He, S., Bitter, W., Snaar-Jagalska, B. E. & Spaik, H. P. (2004) Expression analysis of the Toll-like receptor and TIR domain adaptor families of zebrafish. *Molecular Immunology*, **40** (11), 773-783.
- Melen, K., Ronni, T., Broni, B., Krug, R. M., Von Bonsdorff, C. & Julkunen, I. (1992) Interferon-induced Mx proteins form oligomers and contain a putative leucine zipper. *Journal of Biological Chemistry*, **267** (36), 25898-25907.
- Meng, S., Yang, L., Xu, C., Qin, Z., Xu, H., Wang, Y., Sun, L. & Liu, W. (2011) Recombinant chicken interferon- α inhibits H9N2 avian influenza virus replication in vivo by oral administration. *Journal of Interferon & Cytokine Research*, **31** (7), 533-538.
- Mikalsen, A. B., Sindre, H., Torgersen, J. & Rimstad, E. (2005) Protective effects of a DNA vaccine expressing the infectious salmon anemia virus hemagglutinin-esterase in Atlantic salmon. *Vaccine*, **23** (41), 4895-4905.
- Mumford, S. (2009) Histology of Finfish. NWFHS Laboratory Procedures Manual, http://www.fws.gov/policy/aquatichandbook/Volume_2/Chapter13Histology.pdf. (Nedlastet 21.09. 2015).
- Munang'andu, H. M., Fredriksen, B. N., Mutoloki, S., Brudeseth, B., Kuo, T.-Y., Marjara, I. S., Dalmo, R. A. & Evensen, Ø. (2012) Comparison of vaccine efficacy for different antigen delivery systems for infectious pancreatic necrosis virus vaccines in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) in a cohabitation challenge model. *Vaccine*, **30** (27), 4007-4016.
- Munro, A. L. S., Ellis, A. E., Mcvicar, A. H., Mclay, H. A. & Needham, E. A. (1984) An Exocrine Pancreas Disease of Farmed Atlantic Salmon in Scotland. *Helgolander Meeresuntersuchungen*, **37** (1-4), 571-586.
- Murphy, T. M., Drinan, E. M. & Gannon, F. (1995) Studies with an experimental model for pancreas disease of Atlantic salmon *Salmo Salar* L. . *Aquaculture Research*, **26** (12), 861-874.
- Nelson, R. T., Mcloughlin, M. F., Rowley, H. M., Platten, M. A. & McCormick, J. I. (1995) Isolation of a Toga-Like Virus from Farmed Atlantic Salmon *Salmo-Salar* with Pancreas Disease. *Diseases of Aquatic Organisms*, **22** (1), 25-32.
- Nygaard, R., Husgard, S., Sommer, A.-I., Leong, J.-A. C. & Robertsen, B. (2000) Induction of Mx protein by interferon and double-stranded RNA in salmonid cells. *Fish & shellfish immunology*, **10** (5), 435-450.

- Olsvik, P. A., Lie, K. K., Jordal, A. E., Nilsen, T. O. & Hordvik, I. (2005) Evaluation of potential reference genes in real-time RT-PCR studies of Atlantic salmon. *BMC Molecular Biology*, **6**, 21.
- Oshiumi, H., Tsujita, T., Shida, K., Matsumoto, M., Ikeo, K. & Seya, T. (2003) Prediction of the prototype of the human Toll-like receptor gene family from the pufferfish, *Fugu rubripes*, genome. *Immunogenetics*, **54** (11), 791-800.
- Palti, Y. (2011) Toll-like receptors in bony fish: from genomics to function. *Developmental & Comparative Immunology*, **35** (12), 1263-1272.
- Pfaffl, M. W. (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research*, **29** (9), e45.
- Platanias, L. C. (2005) Mechanisms of type-I-and type-II-interferon-mediated signalling. *Nature Reviews Immunology*, **5** (5), 375-386.
- Rajendran, K., Zhang, J., Liu, S., Peatman, E., Kucuktas, H., Wang, X., Liu, H., Wood, T., Terhune, J. & Liu, Z. (2012) Pathogen recognition receptors in channel catfish: II. Identification, phylogeny and expression of retinoic acid-inducible gene I (RIG-I)-like receptors (RLRs). *Developmental & Comparative Immunology*, **37** (3), 381-389.
- Ramos-Vara, J. A. & Miller, M. A. (2014) When Tissue Antigens and Antibodies Get Along: Revisiting the Technical Aspects of Immunohistochemistry-The Red, Brown, and Blue Technique. *Veterinary Pathology*, **51** (1), 42-87.
- Ritchie, K. J. & Zhang, D.-E. (2004) ISG15: the immunological kin of ubiquitin. *Seminars in cell & developmental biology* **15**.(2) 237-246
- Robertsen, B. (2006) The interferon system of teleost fish. *Fish Shellfish Immunology*, **20** (2), 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** (4), 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., Trobridge, G. & Leongt, J.-A. (1997) Molecular cloning of double-stranded RNA inducible Mx genes from Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Developmental & Comparative Immunology*, **21** (5), 397-412.
- Ronni, T., Melen, K., Malygin, A. & Julkunen, I. (1993) Control of IFN-inducible MxA gene expression in human cells. *The Journal of Immunology*, **150** (5), 1715-1726.
- Røkenes, T. P., Larsen, R. & Robertsen, B. (2007) Atlantic salmon ISG15: expression and conjugation to cellular proteins in response to interferon, double-stranded RNA and virus infections. *Molecular Immunology*, **44** (5), 950-959.
- Saito, T., Hirai, R., Loo, Y.-M., Owen, D., Johnson, C. L., Sinha, S. C., Akira, S., Fujita, T. & Gale, M. (2007) Regulation of innate antiviral defenses through a shared repressor domain in RIG-I and LGP2. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **104** (2), 582-587.
- Salonius, K., Simard, N., Harland, R. & Ulmer, J. B. (2007) The road to licensure of a DNA vaccine. *Current Opinion in Investigational Drugs*, **8** (8), 635.
- Samuel, C. E. (2001) Antiviral actions of interferons. *Clinical Microbiology Reviews*, **14** (4), 778-809.

- Simmons, J. D., White, L. J., Morrison, T. E., Montgomery, S. A., Whitmore, A. C., Johnston, R. E. & Heise, M. T. (2009) Venezuelan equine encephalitis virus disrupts STAT1 signaling by distinct mechanisms independent of host shutoff. *Journal Virology*, **83** (20), 10571-10581.
- Simmons, J. D., Wollish, A. C. & Heise, M. T. (2010) A determinant of Sindbis virus neurovirulence enables efficient disruption of Jak/STAT signaling. *Journal Virology*, **84** (21), 11429-11439.
- Singh, M. & T O'Hagan, D. (2003) Recent advances in veterinary vaccine adjuvants. *International journal for parasitology*, **33** (5), 469-478.
- 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** (1), 17.
- Sommerset, I., Krossoy, B., Biering, E. & Frost, P. (2005a) Vaccines for fish in aquaculture. *Expert Review of Vaccines*, **4** (1), 89-101.
- Sommerset, I., Skern, R., Biering, E., Bleie, H., Fiksdal, I. U., Grove, S. & Nerland, A. H. (2005b) Protection against Atlantic halibut nodavirus in turbot is induced by recombinant capsid protein vaccination but not following DNA vaccination. *Fish & shellfish immunology*, **18** (1), 13-29.
- Stein, C., Caccamo, M., Laird, G. & Leptin, M. (2007) Conservation and divergence of gene families encoding components of innate immune response systems in zebrafish. *Genome Biology*, **8** (11), R251.
- Storset, A., Strand, C., Wetten, M., Kjølglum, S. & Ramstad, A. (2007) Response to selection for resistance against infectious pancreatic necrosis in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Aquaculture*, **272**, S62-S68.
- Sun, B., Greiner-Tollersrud, L., Koop, B. F. & Robertsen, B. (2014) Atlantic salmon possesses two clusters of type I interferon receptor genes on different chromosomes, which allows for a larger repertoire of interferon receptors than in zebrafish and mammals. *Developmental & Comparative Immunology*, **47** (2), 275-286.
- Sun, B., Robertsen, B., Wang, Z. & Liu, B. (2009) Identification of an Atlantic salmon IFN multigene cluster encoding three IFN subtypes with very different expression properties. *Developmental & Comparative Immunology*, **33** (4), 547-558.
- Sun, B., Skjæveland, I., Svingerud, T., Zou, J., Jørgensen, 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** (17), 9188-9198.
- Svingerud, T., Holand, J. K. & Robertsen, B. (2013) Infectious salmon anemia virus (ISAV) replication is transiently inhibited by Atlantic salmon type I interferon in cell culture. *Virus Research*, **177** (2), 163-170.
- Svingerud, T., Solstad, T., Sun, B., Nyrud, M. L., 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** (12), 5912-5923.
- Swanson, R., Carlisle, J. & Gillespie, J. (1982) Pathogenesis of infectious pancreatic necrosis virus infection in brook trout, *Salvelinus fontinalis* (Mitchill), following intraperitoneal injection. *Journal of Fish Diseases*, **5** (6), 449-460.

- Swanson, R. N. & Gillespie, J. H. (1979) Pathogenesis of infectious pancreatic necrosis in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Journal of the Fisheries Board of Canada*, **36** (5), 587-591.
- Taksdal, T., Bang Jensen, B., Böckerman, I., McLoughlin, M., Hjortaas, M., Ramstad, A. & Sindre, H. (2014) Mortality and weight loss of Atlantic salmon, *Salmo salar* L., experimentally infected with salmonid alphavirus subtype 2 and subtype 3 isolates from Norway. *Journal of Fish Diseases*, **30** (9) 545-558
- Taksdal, T., Olsen, A. B., Bjerkas, I., Hjortaas, M. J., Dannevig, B. H., Graham, D. A. & McLoughlin, M. F. (2007) Pancreas disease in farmed Atlantic salmon, *Salmo salar* L., and rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), in Norway. *Journal of Fish Diseases*, **30** (9), 545-558.
- Taylor CR, Shi. S.-R., Barr NJ, et al. (2002) Techniques of immunohistochemistry: Principles, Pitfalls, and Standardization. *Diagnostic Immunohistochemistry* (Third Edition). New York, NY: Churchill Livingstone.
- Technologies, L. (2014) *Real-time PCR handbook*. Thermo Fischer Scientific, <http://www.lifetechnologies.com/no/en/home/global/forms/real-time-pcr-handbook-lt.html>. (Nedlastet 21.04.2015).
- Thim, H. L., Iliev, D. B., Christie, K. E., Villoing, S., McLoughlin, M. F., Strandskog, G. & Jørgensen, J. B. (2012) Immunoprotective activity of a Salmonid Alphavirus Vaccine: comparison of the immune responses induced by inactivated whole virus antigen formulations based on CpG class B oligonucleotides and poly I: C alone or combined with an oil adjuvant. *Vaccine*, **30** (32), 4828-4834.
- Tonheim, T. C., Bøgwald, J. & Dalmo, R. A. (2008) What happens to the DNA vaccine in fish? A review of current knowledge. *Fish & shellfish immunology*, **25** (1), 1-18.
- Tonheim, T. C., Leirvik, J., Løvoll, M., Myhr, A. I., Bøgwald, J. & Dalmo, R. A. (2007) Detection of supercoiled plasmid DNA and luciferase expression in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) 535days after injection. *Fish & shellfish immunology*, **23** (4), 867-876.
- Tough, D. F. (2004) Type I interferon as a link between innate and adaptive immunity through dendritic cell stimulation. *Leukemia & lymphoma*, **45** (2), 257-264.
- Trobridge, G. D., Chiou, P. P. & Leong, J. (1997) Cloning of the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) Mx2 and Mx3 cDNAs and characterization of trout Mx protein expression in salmon cells. *Journal of Virology*, **71** (7), 5304-5311.
- Van Hoeven, N., Belser, J. A., Szretter, K. J., Zeng, H., Staeheli, P., Swayne, D. E., Katz, J. M. & Tumpey, T. M. (2009) Pathogenesis of 1918 pandemic and H5N1 influenza virus infections in a guinea pig model: antiviral potential of exogenous alpha interferon to reduce virus shedding. *Journal of Virology*, **83** (7), 2851-2861.
- Wang, X., Hinson, E. R. & Cresswell, P. (2007) The interferon-inducible protein viperin inhibits influenza virus release by perturbing lipid rafts. *Cell host & microbe*, **2** (2), 96-105.
- Weber, F. & Haller, O. (2007) Viral suppression of the interferon system. *Biochimie*, **89** (6), 836-842.
- Wells, K., Maule, J., Kingston, R., Foster, K., McMahon, J., Damien, E., Poole, A. & Wells, D. (1997) Immune responses, not promoter inactivation, are responsible for decreased long-term expression following plasmid gene transfer into skeletal muscle. *FEBS letters*, **407** (2), 164-168.

- Weston, J. H., Graham, D. A., Branson, E., Rowley, H. M., Walker, I. W., Jewhurst, V. A., Jewhurst, H. L. & Todd, D. (2005) Nucleotide sequence variation in salmonid alphaviruses from outbreaks of salmon pancreas disease and sleeping disease. *Diseases of Aquatic Organisms*, **66** (2), 105-111.
- Workenhe, S. T., Hori, T. S., Rise, M. L., Kibenge, M. J. & Kibenge, F. S. (2009) Infectious salmon anaemia virus (ISAV) isolates induce distinct gene expression responses in the Atlantic salmon (*Salmo salar*) macrophage/dendritic-like cell line TO, assessed using genomic techniques. *Molecular Immunology*, **46** (15), 2955-2974.
- 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** (16), 2525-2536.
- Xu, C., Evensen, Ø. & Munang'andu, H. M. (2015) De novo assembly and transcriptome analysis of Atlantic salmon macrophage/dendritic-like TO cells following type I IFN treatment and Salmonid alphavirus subtype-3 infection. *BMC genomics*, **16** (1), 96.
- Xu, C., Guo, T.-C., Mutoloki, S., Haugland, O. & Evensen, O. (2012a) Gene expression studies of host response to Salmonid alphavirus subtype 3 experimental infections in Atlantic salmon. *Veterinary Research*, **43**, 78.
- Xu, C., Guo, T.-C., Mutoloki, S., Haugland, Ø., Marjara, I. S. & Evensen, Ø. (2010) Alpha interferon and not gamma interferon inhibits salmonid alphavirus subtype 3 replication in vitro. *Journal of Virology*, **84** (17), 8903-8912.
- Xu, C., Mutoloki, S. & Evensen, Ø. (2012b) Superior protection conferred by inactivated whole virus vaccine over subunit and DNA vaccines against salmonid alphavirus infection in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Vaccine*, **30** (26), 3918-3928.
- Yang, C., Su, J., Huang, T., Zhang, R. & Peng, L. (2011) Identification of a retinoic acid-inducible gene I from grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) and expression analysis in vivo and in vitro. *Fish & shellfish immunology*, **30** (3), 936-943.
- Yoneyama, M., Kikuchi, M., Matsumoto, K., Imaizumi, T., Miyagishi, M., Taira, K., Foy, E., Loo, Y.-M., Gale, M. & Akira, S. (2005) Shared and unique functions of the DExD/H-box helicases RIG-I, MDA5, and LGP2 in antiviral innate immunity. *The Journal of Immunology*, **175** (5), 2851-2858.
- Zhang, Y., Burke, C. W., Ryman, K. D. & Klimstra, W. B. (2007) Identification and characterization of interferon-induced proteins that inhibit alphavirus replication. *Journal of Virology*, **81** (20), 11246-11255.
- Zhang, Y.-B. & Gui, J.-F. (2012) Molecular regulation of interferon antiviral response in fish. *Developmental & Comparative Immunology*, **38** (2), 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 & Comparative Immunology*, **39** (1), 39-62.
- Zou, J. & Secombes, C. J. (2011) Teleost fish interferons and their role in immunity. *Developmental & Comparative Immunology*, **35** (12), 1376-1387.

Appendix I - Reagenser

Reagenser	Produsent
Albumin fra kalverserum (BSA)	Sigma Aldrich
Benzoak	ACD Pharmaceuticals
EndoFree Plasmid purification Mega kit	Qiagen
Etanol (99,8%)	Sigma-Aldrich
Eukitt® quick-hardening mounting medium	Fluka Analytical
Fast SYBR®Green Master Mix	Applied Biosystems
Fettfri tørrmelk, 5%	AppliChem
Formalaldehyd	Sigma Aldrich
Fosfatbufret saltvann (PBS)	NFH
Geiteserum	Sigma Aldrich
Histoclear	National diagnostics
HRP-konjugert geit anti-kanin sekundærantistoff	Invitrogen
ImmunoHistoMount	Sigma Aldrich
Hydrogenperoxid	Sigma Aldrich
Mayers' haematoxylin	Life Technologies
NaOH	NFH
Natrium-sitratbuffer pH 6.0	Dako
Paraplast	Histolab
Primere	Sigma- Aldrich
Proteinase K	New England Biolabs
QIAamp Viral RNA Mini Kit	Qiagen
Rabbit anti Mx	Dr. Hilde Hansen UiT
Reverse transcription kit	Qiagen

Appendix

RLT lysisbuffer	Qiagen
RNAlater	Ambion
RNase AWAY	Molecular BioProducts
RNeasy Mini Kit	Qiagen
Shandon instant Eosin, alcoholic	Thermo Scientific
Shandon Instant Hematoxylin	Thermo Scientific
sodium dihydorgen pohsphate dihydrate	Fluka Chemicals
sodium phosphate dibasic dodecahydrate	Fluka Chemicals
Tris buffer saline (TBS)	NFH
Tween 20	Sigma-Aldrich
Ultra pure H ₂ O	Biochrom
2-mercaptoetanol	Sigma-Aldrich
3-Amino-9-ethylcarbazol	Dako

Appendix II- Løsninger til PCR

Mx-uttrykk

Reagenser i trinn 1 av cDNA syntesen av RNA fra pankreas. Genomisk DNA ble fjernet ved å inkubere miks på 42 °C i 2 min.

gDNA wipeout reagenser	
dH ₂ O	7 µl
gDNA wipeout	2 µl
0,2 µl RNA	5 µl
Totalt	14 µl

Reagenser i trinn 2, som ble overført i strips med reagenser fra trinn 1 og inkubert på 42 °C i 15 min og 95 °C i 3 min.

Revers transkripsjons reagenser	
RT primer	1 µl
RT buffer	4µl
RTrev	1 µl
RNA fra trinn 1	14 µl
Totalt	20 µl

Reagenser benyttet i kvantitativ RT-PCR for å måle relativt uttrykk av Mx i pankreas.

Kvantitativ RT-PCR reagenser	
Primer fw	0,8 µl
Primer rv	0,8 µl
Cyber green	7,5 µl
cDNA	6 µl
Totalt	15 µl

SAV3

Reagenser i trinn 1 cDNA syntese RNA i serum fra SAV3-infisert laks. Genomisk DNA ble fjernet ved å inkubere miks på 42 °C i 2 min.

gDNA wipeout reagenser	
dH ₂ O	2 µl
gDNA wipeout	2 µl
RNA	10 µl
Totalt	14 µl

Reagenser i trinn 2, som ble overført i strips med reagenser fra trinn 1 og inkubert på 42 °C i 15 min og 95 °C i 3 min.

Revers transkripsjons reagenser	
RT primer	1 µl
RT buffer	4µl
RTrev	1 µl
RNA fra trinn 1	14 µl
Totalt	20 µl

Reagenser benyttet i kvantitativ RT-PCR for å måle relativt uttrykk av SAV3 i serum fra SAV3-infiser laks.

Kvantitativ RT-PCR reagenser	
Primer fw	2 µl
Primer rv	2 µl
Cyber green	10 µl
dH ₂ O	4 µl
cDNA	2 µl
Totalt	20 µl

Appendix III- Løsninger til immunhistokjemi og histologi

Tris Buffered saline Tween (TBST)

Dest vann (dH ₂ O)	900 ml
Tris buffer saline (TBS) 10 x	100 ml
Tween 20 (detergent)	0,5 ml

Blokkingsbuffer

Tørrmelk (fettfri)	0,5 g
BSA	0,5 g
Tris buffer saline tween (TBST)	10 ml

4% paraformaldehyd i PBS

milliqvann	1 liter
0.1 M NaOH	1 ml
paraformaldehyd	40 g

Ble Blandet i flaske, som ble inkubert ved 55-60 °C til pulver var løst opp. Tilsatte så:

sodium phosphate dibasic dodecahydrate	27,5 g
sodium dihydrogen phosphate dihydrate	4,2 g

Blandet til saltene var løst opp og justert pH til 7,1-7,4.

Formalin

Formalaldehyd løsning	177 ml
milliqvann	883 ml
sodium phosphate dibasic dodecahydrate	27,5 g
sodium dihydrogen phosphate dihydrate	4,2 g

Saltene ble blandet med 1/3 av vannet, sjekket pH, som ble justert til 7,1-7,4. Tilsatte så resterende vann og formalaldehydløsning.

Appendiks IV- Score resultater

Semi-kvantitativ gradering for PD-forandringer 3 uker etter SAV3-infeksjon for laks injisert i.m. med 50 µl PBS. Gradering fra 0-3 av pankreas, hjerte og muskel. 0= normal, 1= sparsom forandring, 2= moderat forandring og 3=uttalt forandring. l= invasjon av leukocytter. Score x/x= patologiske endringer i overgang mellom to graderinger, endelig score understreket.

Fisk nr:	Pankreas	Hjerte	Muskel
1	3	3	0
2	3	3	0
3	3(L)	3	0
4	3	3	0
5	3	3	0
6	3	3	0
7	3	3	0
8	3(L)	2/ <u>3</u>	0
9	3	3	0
10	3	3	0
11	3	3	0
12	3	3	0
13	3	3	0
14	3	3	0
15	3	3	0

Semi-kvantitativ gradering for PD-forandringer 3 uker etter SAV3-infeksjon for laks injisert i.m. med 15 µg pcDNA3,3 oppløst i 50 µl PBS. Gradering fra 0-3 av pankreas, hjerte og muskel. 0= normal, 1= sparsom forandring, 2= moderat forandring og 3=uttalt forandring. l= invasjon av leukocytter. Score x/x= patologiske endringer i overgang mellom to graderinger, endelig score understreket.

Fisk nr:	Pankreas	Hjerte	Muskel
1	3	3	0
2	3	3	0
3	3	3	0
4	3	3	0
5	3(L)	3	0
6	3	3	0
7	3(L)	3	0
8	3	3	0
9	3	3	0
10	3	3	0
11	3	2/ <u>3</u>	0
12	3	3	0
13	3	3	0
14	3	3	0
15	3	3	0

Semi-kvantitativ gradering for PD-forandringer 3 uker etter SAV3-infeksjon for laks injisert i.m. med 15 µg IFNa i 50 µl PBS. Gradering fra 0-3 av pankreas, hjerte og muskel. 0= normal, 1= sparsom forandring, 2= moderat forandring og 3=uttalt forandring. L = invasjon av leukocytter. Score x/\underline{x} = patologiske endringer i overgang mellom to graderinger, endelig score understreket.

Fisk nr:	Pankreas	Hjerte	Muskel
1	3	3	0
2	3(L)	3	0
3	3	3	0
4	3	3	0
5	3	3	0
6	3	3	0
7	3 (L)	3	0
8	3	3	0
9	3	3	0
10	3	3	0
11	3	3	0
12	3	3	0
13	3(L)	3	0
14	3(L)	3	0
15	3	3	0

Tabell 10. Semi-kvantitativ gradering for PD-forandringer 3 uker etter SAV3-infeksjon for laks injisert i.m. med 15 µg IFNb oppløst i 50 µl PBS. Gradering fra 0-3 av pankreas, hjerte og muskel. 0= normal, 1= sparsom forandring, 2= moderat forandring og 3=uttalt forandring. L = invasjon av leukocytter. Score x/\underline{x} = patologiske endringer i overgang mellom to graderinger, endelig score understreket.

Fisk nr:	Pankreas	Hjerte	Muskel
1	2/ <u>3</u> (L)	2	0
2	3(L)	2	0
3	3	3	0
4	2/ <u>3</u> (L)	3	0
5	3	3	0
6	3(L)	3	0
7	3(L)	<u>2</u> /3	0
8	3(L)	3	0
9	3(L)	3	0
10	3(L)	2/ <u>3</u>	0
11	3(L)	3	0
12	3(L)	3	0
13	3(L)	3	0
14	3(L)	3	0
15	3(L)	3	0

Tabell 11. Semi-kvantitativ gradering for PD-forandringer 3 uker etter SAV3-infeksjon for laks injisert i.m. med 15 µg IFNc oppløst i 50 µl PBS. Gradering fra 0-3 av pankreas, hjerte og muskel. 0= normal, 1= sparsom forandring, 2= moderat forandring og 3=uttalt forandring. L= invasjon avleukocytter. Score x/x= patologiske endringer i overgang mellom to graderinger, endelig score understreket.

Fisk nr:	Pankreas	Hjerte	Muskel
1	2(L)	2	0
2	3	3	0
3	2(L)	2	0
4	1/ <u>2(L)</u>	Ødelagt	0
5	1(L)	2	0
6	2/ <u>3(L)</u>	2	0
7	2(L)	2	0
8	1/ <u>2(L)</u>	2	0
9	3(L)	3	0
10	3(L)	2	0
11	2(L)	1	0
12	3(L)	1/ <u>2</u>	0
13	2(L)	<u>1/2</u>	0
14	2(L)	2	0
15	<u>2/3(L)</u>	2	0