



UiT Norges arktiske universitet

Fakultet for biovitenskap, fiskeri og økonomi, Norges fiskerihøgskole

**Medfødte antivirale immungener hos atlantisk laks (*Salmo salar L.*) rett etter klekking og ved startfôring: Ekspresjon, ontogeni og effekt av lys- og temperatur**

Elisabeth Mækelæ Eliassen

Masteroppgave i Akvamedisin BIO-3955 Mai 2020



# Forord

*Denne oppgaven ble utført ved fakultet for biologi, fiskeri og økonomi ved Norges Fiskerihøgskole, Universitetet i Tromsø og havbruksstasjonen i Tromsø.*

Dette masterforløpet har vært en opplevelse med mange oppturer og nedturer. Jeg kan se tilbake til en periode med mye hardt arbeid, faglige utfordringer og frustrasjon, men også mye glede og ny kunnskap. Jeg ønsker å takke min hovedveileder Roy Dalmo, som har stilt opp med faglig veiledning, god tilrettelegging og rask handling ved behov. Alt dette har ført til at jeg har kommet i mål med oppgaven. Takk til Marie Bue for hjelp og veiledning på lab og for tilgang til fisk brukt i forsøket. Takk til Divya Thiyagarajan for hjelp på lab og til RT-qPCR.

Tusen takk til mamma og min søster/matematiker Siri som alltid stiller opp. Jeg er også takknemlig for alle mine gode klassekamerater og medstudenter. Det er så mange navn, men jeg vil spesielt nevne Fredrik, Harald, Sunniva og Elise som alltid har vært der for meg og gitt meg mot når jeg har trengt det mest. Dette er mennesker jeg ikke ville vært foruten! Til slutt vil jeg nevne min kjære alltid så optimistiske og tålmodige Erlend, som dukket opp i livet mitt midt opp i det hele. Takk for at du sørget for rikelig tilgang på Cola Zero i stressende tider.

Elisabeth Mækælæ Eliassen



## Sammendrag

Utbrudd av virussykdommer medfører store økonomiske tap for norsk oppdrettsnæring i dag og er en utfordring for fiskehelsen. Virussykdom kan ramme fisk ved alle livsstadier og forårsakes av en kombinasjon mellom miljø, vert og virulens. Fisk er vekselvarme dyr, som vil si at kroppstemperaturen og hele fiskens fysiologi endres med temperaturen i miljøet. Lys- og temperatur er diskuterte og studerte miljøfaktorer hos bl.a. sebrafisk og ansees fiskehelsemessig, som noen av de viktigste miljøfaktorene tidlig i ontogenien. Lys- og temperatur kan forstyrre fiskens homeostase og knyttes til dårlig vekst, økt dødelighet og redusert immunforsvar hos fiskelarver av flere arter. Fiskelarvens helse tidlig i ontogenien er viktig og burde prioriteres, da det kan forme grunnlaget for fiskens helsestatus og sykdomsresistens resten av livsforløpet. Atlantisk laks (*Salmo salar L*) har et sterkt medfødt immunforsvar. Det er et førstelinjeforsvar og den eneste barrieren mot patogener hos nyklekt yngel fram til spesifikk immunitet utvikles. Viktige medfødte immunkomponenter for viral beskyttelse inkluderer reseptorer (rekognisjon), interferoner (signaloverføring) og interferoninduserbare gener (interaksjon). Diverse transkripsjonsfaktorer har også viktige roller i bekjempelsen av virus. Genekspresjon av medfødte antivirale immunkomponenter tidlig i ontogenesen hos atlantisk laks er ukjent. Om miljøfaktorer som lys- og temperatur har effekt på genekspresjonen er heller ikke mye studert. I dagens næring holdes egg og yngel av atlantisk laks i hovedsak ved kontinuerlig mørke, men det finnes også en del som lar egg gå i simulert naturlig fotoperiode og i kontinuerlig lys. Effekter av lys- og temperatur er viktig informasjon, som gir innspill i om dagens norske standard for bruk av lys- og temperatur er optimalt eller ikke.

I denne oppgaven ble genuttrykket av *MDA5*, *TLR3*, *TLR7*, *IFNa*, *IFNc*, *Mx*, *viperin*, *ISG15*, *STAT-1* og *PKR* studert hos atlantisk laks ved 488 døgngader (rett etter klekking) og ca 848 døgngader (omkring startfôring). Det ble undersøkt hvilke gener som uttrykkes mer eller mindre i forhold til hverandre, tidlig utvikling av genuttrykk (ontogeni) og effekt av lys- og temperatur på ekspresjon. Resultatene indikerte at ekspresjon av medfødte antivirale gener hos yngel av atlantisk laks kan ha en sammenheng med ontogeni, lys- og temperatur. De indikerte også at hold av atlantisk laks i kontinuerlig mørke ved 8°C (norsk standard), med hensyn til antiviral medfødt immunitet er fornuftig ved 488 døgngader og rundt 848 døgngader (dg).



# Innhold

1.1	Bakgrunn .....	1
1.2	Lys og temperatur .....	2
1.2.1	Den indre klokken ("The circadian clock") .....	2
1.2.2	Fysiologiske innvirkninger av lys på laks og teleoster .....	3
1.2.3	Fysiologiske innvirkninger av temperatur på laks og teleoster .....	4
1.3	Immunforsvaret til beinfisk .....	5
1.3.1	Ontogeni av immunologiske organer .....	5
1.3.2	Ontogeni av det medfødte immunforsvaret .....	6
1.3.3	Ontogeni av det spesifikke immunforsvaret .....	6
1.3.4	Tidlig utvikling av immunforsvaret til egg og larver (salmonider) .....	7
1.4	Antiviral immunitet .....	7
1.4.1	«Pattern recognition receptors»: Generell oversikt .....	7
1.4.2	Toll-like reseptorer: TLR3 og TLR7 .....	8
1.4.3	Interferoner .....	8
1.4.4	Andre antivirale reseptorer og komponenter: Mx, MDA-5, ISG15 og viperin....	9
1.4.5	Sentrale transkripsjonsfaktorer som induserer antivirale gener, STAT-1 og PKR	10
1.5	Effekt av lys- og temperatur på det medfødte immunforsvaret .....	11
1.5.1	Effekt av lys på det medfødte immunforsvaret .....	11
1.5.2	Effekt av temperatur på det medfødte immunforsvaret .....	12
1.6	Problemstilling .....	13
2	Materialer og metoder .....	14
2.1	In vivo studier av genetisk uttrykk .....	14
2.1.1	Forsøksoppsett .....	14
2.1.2	Prøveuttak og vevsprøve på RNA-later .....	15

2.1.3	RNA isolering med «Trizol metoden» .....	16
2.1.4	DNasebehandling med Turbo DNA-free kit (Ambion) .....	17
2.1.5	Fortynning av RNA og cDNA syntese.....	18
2.1.6	Positiv kontroll (POS) & kontroll av genomisk kontaminering (NRT) .....	19
2.1.7	Primer stam- og arbeidsløsning og beregning av amplifikasjonseffektivitet.....	20
2.1.8	QPCR .....	23
2.2	Analyse av qPCR data .....	26
2.2.1	Manuell treshold verdi .....	26
2.2.2	Korrigerings av Ct-verdier mot effektivitet .....	26
2.2.3	Normalisering av <b>CtE</b> verdier til $\Delta$ Ct .....	27
2.2.4	Beregning av relativt uttrykk R og <b>R</b> (Livak metoden) .....	27
2.2.5	Fold change .....	28
2.2.6	Statistisk analyse .....	30
3	Resultater.....	32
3.1	Ekspresjon av antivirale gener og ontogenetisk utvikling.....	32
3.1.1	Relativt genuttrykk ( <b>R</b> ) av antivirale gener ved 488 døgngader .....	33
3.1.2	Relativt genuttrykk ( <b>R</b> ) av antivirale gener ved 848 døgngader .....	34
3.1.3	Ontogenetisk endring av ekspresjon (488 – 848 døgngader).....	36
3.2	Effekt av lys- og temperatur på antiviralt genuttrykk.....	37
3.2.1	Effekt av ulike lys- og temperatureregimer mot kontroll gruppe DD8°C ved 488 døgngader.....	38
3.2.2	Effekt av lavere temperatur på genuttrykk ved 488 døgngader .....	40
3.2.3	Effekt av ulike lys- og temperatureregimer mot kontroll gruppe DD8°C ved 848 døgngader.....	41
3.2.4	Effekt av lavere temperatur på genuttrykk ved 848 døgngader .....	42
4	Diskusjon.....	43



4.1	Mangler og feil ved metode.....	43
4.2	Relativt genuttrykk ved 488 døgngrader (rett etter klekking).....	44
4.2.1	Antivirale reseptorer: <i>TLR3</i> , <i>TLR7</i> og <i>MDA5</i> (488 døgngrader).....	44
4.2.2	Interferoner: <i>IFNa</i> og <i>IFNc</i> (488 døgngrader).....	44
4.2.3	Interferon induserbare gener: <i>Mx</i> , <i>Viperin</i> og <i>ISG15</i> og transkripsjonsfaktorene <i>STAT-1</i> og <i>PKR</i> (488 døgngrader).....	45
4.3	Relativt genuttrykk ved 848 døgngrader (rundt startfôring).....	46
4.3.1	Antivirale reseptorer: <i>TLR3</i> , <i>TLR7</i> og <i>MDA5</i> (848 døgngrader).....	46
4.3.2	Interferoner: <i>IFNa</i> og <i>IFNc</i> (848 døgngrader).....	46
4.3.3	Interferon induserbare gener: <i>Mx</i> , <i>Viperin</i> og <i>ISG15</i> og transkripsjonsfaktorene <i>STAT-1</i> og <i>PKR</i> (848 døgngrader).....	47
4.4	Ontogenetisk utvikling av genuttrykk hos laks fra 488 - 848 døgngrader.....	47
4.4.1	Antivirale reseptorer: <i>TLR3</i> , <i>TLR7</i> og <i>MDA5</i> (488 - 848 døgngrader).....	47
4.4.2	Interferoner: <i>IFNa</i> og <i>IFNc</i> (488 - 848 døgngrader).....	48
4.4.3	Interferon induserbare gener: <i>Mx</i> , <i>Viperin</i> og <i>ISG15</i> og transkripsjonsfaktorene <i>STAT-1</i> og <i>PKR</i> (488 - 848 døgngrader).....	48
4.5	Effekt av ulike lys- og temperaturregimer på genuttrykk ved 488 døgngrader (rett etter klekking).....	49
4.5.1	Effekt av lys- og temperatur på ekspresjon ved 488 døgngrader.....	49
4.5.2	Hypotermisk effekt på ekspresjon ved 488 døgngrader.....	50
4.6	Effekt av ulike lys- og temperaturregimer på genuttrykk ved 848 døgngrader (rundt startfôring).....	51
4.6.1	Effekt av lys- og temperatur på ekspresjon ved 848 døgngrader.....	51
4.6.2	Hypotermisk effekt på ekspresjon ved 848 døgngrader.....	52
4.7	Oppsummering.....	53
5	Konklusjoner.....	55
6	Referanser.....	56

Appendix I.....	60
Appendix II .....	65
Appendix III .....	67
Appendix IV .....	69

### 1.1 Bakgrunn

Atlantisk laks i norsk oppdrett blir kontinuerlig eksponert for virus da de ut-nummerer andre mikrober i det akvatiske miljøet. Virus er tilpasningsdyktige og kan også etablere seg i lukkede fasiliteter, som RAS systemer (Dahle, 2019). Med tanke på dette er det ikke rart at virussykdommer til stadighet preger sykdomsbildet hos oppdrettslaks i Norge (Sommerset I., 2019; Hjeltnes, 2018). I produksjonen av fiskelarver antar man at 10% av mortaliteten skyldes infeksjose sykdommer (Dalmo, 2005). Utslag av virussykdom på fisk ansees å skyldes en kombinasjon av miljø, vert, og virulens. Det betyr at patogenet alene nødvendigvis ikke er hovedårsaken til et sykdomsutbrudd (Magnadóttir B., 2006). At andre faktorer innvirker kan man se på sesongbaserte sykdommer, som gjerne oppstår i kaldere og mørkere perioder. Miljøet til fisken (verten) vil på alle livsstadier innvirke på fiskens fysiologi inkludert immunforsvaret. Til tross for dette er det gjort begrensede mengder forskning på ontogenetisk utvikling av det medfødte immunsystemet og antiviral immunitet hos fiskelarver (Zhang Q., 2018). En god målsetning for norsk oppdrettsnæring ville være å tilegne seg kunnskap om antiviral immunitet hos lakselarver, og i hvilken grad miljøet kan påvirke tidlig utvikling av antiviral immunitet hos atlantisk laks. Kunnskapen er viktig for å oppnå en avklaring på hvorvidt norsk standard lys- og temperaturregimer er fornuftige. Det akvatiske miljøet kan bidra til å opprettholde eller forstyrre fiskens homeostase og immunforsvar allerede tidlig i utviklingen av fiskelarver, der temperatur og lys antas å være blant de viktigste miljøfaktorene (Esteban, 2016).

## 1.2 Lys og temperatur

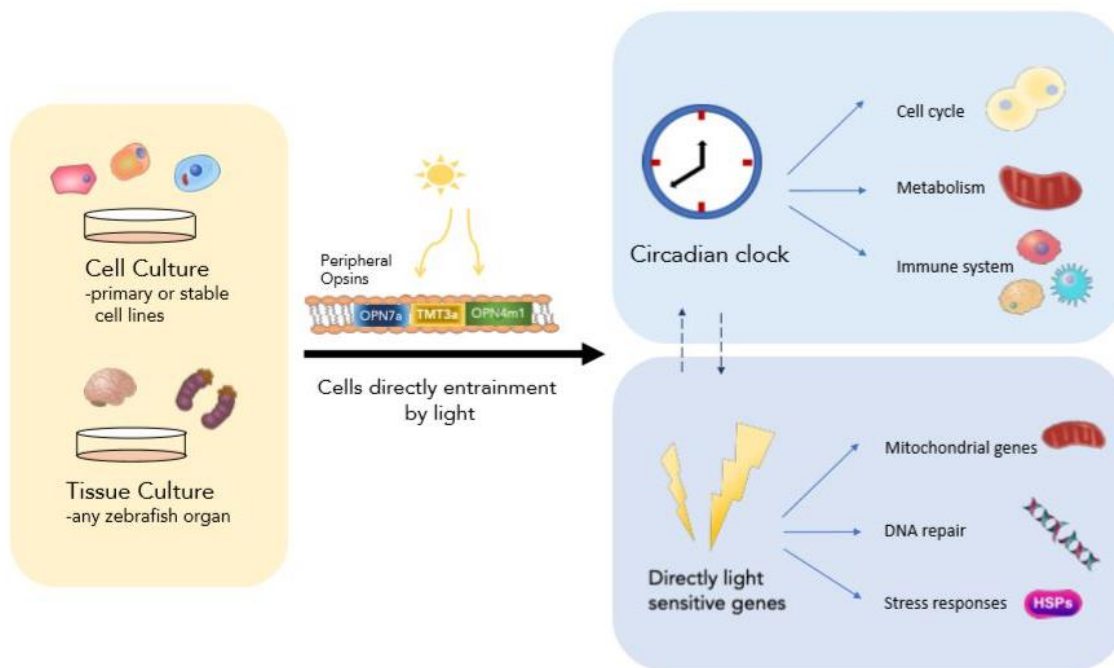
### 1.2.1 Den indre klokken ("The circadian clock")

Lys er en nøkkelfaktor som synkroniserer alle livsstadier til fisk fra utviklingen av embryo, til kjønnsmodning. Det er anerkjent at fisk har en indre fysiologisk klokke mekanisme «den indre klokken» (Villamizar, 2011). De bakenforliggende mekanismene, som innstiller den indre biologiske klokkerytmen og medierer lys-signalene i fisk, er enda ikke fullt forstått. Tidligere forskning har avdekket, at lys fanges opp av fisken via lys-sensitive fotoreseptorer i epifysen, som er en del av fiskehjernen. Signalene fra fotoreseptorene i epifysen regulerer bl.a. biosyntesen av hormonet melatonin, som er en viktig regulator av døgnrytmen og hvile (Downing, 2001). Epifysen produserer rytmisk melatonin avhengig av lyset i miljøet. Nivået av hormonet øker når det er mørkt, og avtar ved lyseksponering. Melatonin-produksjonen avhenger også av lengden på døgnrytmen. Melatonin-rytmen oppnår maksimale nivåer på kort tid ved lang lyseksponering, ved kortere lyseksponeringer er nivåene reduserte med lengere varighet (Falcòn, 2010). Melatonin er påvist i sebrafisk (*Danio rerio*) to dager etter fertilisering (Gothilf, 1999; Villamizar, 2011).

Ny forskning viser at fisk i tillegg til fotoreseptorer i epifysen har lys sensitive gener i kromosomet kalt «klokkegener». Genene uttrykkes av alle celletyper og organer i fisken, som betyr at fiskevevet er responsivt til lys uavhengig av epifysen. Signalet fra lys styrer transkripsjon og aktivering av klokkegenene. Aktive klokkegener kan bl.a. regulere «den indre klokken», påvirke stress responser, immunforsvaret, celle-deling og reparasjon (Steindal, 2019)(Figur 1). I dag er det akseptert at fisk utvikler fotoreseptorer og klokkegener allerede i de tidligste stadiene av embryogenesen (Dekens, 2008; Kaneko, 2005). Studier på sebrafisk har vist at den cellulære klokken er aktiv og lys-sensitiv første dag etter fertilisering av egget (Dekens, 2008) (Kaneko, 2005). Synkroniseringen av ulike cellulære klokkesvinginger i embryoet til sebrafisk, avhenger midlertidig av lysregimet. For at noen cellulære klokkeprosesser skal initieres, er det nødvendig at sebrafisken eksponeres for lys første dagen av embryogenesen (Frøland, 2019). Andre cellulære klokker avhenger av eksponering til en variasjon mellom lys og mørke (naturlig lys), eller eksponering til mørke (Kaneko, 2005). Selv om klokkegenene og epifysen ikke avhenger av hverandre, er det ikke redegjort for hvorvidt de

## Innledning

kan påvirke hverandre direkte eller indirekte. I tillegg til lys antas det at den embryoniske cellulære klokken påvirkes av temperatur (Frøland, 2019; Kaneko, 2005).



Figur 1: Ved å kultivere vev fra sebrafisk, har man påvist at lyset påvirker cellene direkte, ved å regulere transkripsjonen av lyssensitive klokkegener. Lysgenene påvirker fysiologiske prosesser i fiskekroppen som cellereparasjon, metabolisme, immun- og stressresponser (Frøland, 2019).

### 1.2.2 Fysiologiske innvirkninger av lys på laks og teleoster

Det er lite informasjon rundt egg, fiskelarver og den fysiologiske effekten av skiftende lysintensiteter. Mange studier har beskrevet lys intensitet og fotoperiode i sammenheng med abnormiteter i skjelettet, stress, redusert immunforsvar og økt dødelighet hos fiskelarver av ulike arter (Villamizar, 2011; Zhang Q., 2018; Cerquiera, 1991). I en studie der det ble brukt flere arter av marine fiskelarver var høy dødelighet og et større antall deformiteter, tilsynelatende tilknyttet eksponering til ulike lys-regimer (Villamizar, 2011). Lys-styring brukes aktivt på oppdrettslaks i dag for å kontrollere smoltifisering, kjønnsmodning og atferd (Berge, 1995). Konstant lys kan ha negativ effekt på nevrologisk utvikling av røye-parr (*Salvelinus alpinus*) (Ebbesson, 2008), men hvorvidt lys har ytterligere negative effekter på velferden til laksefisk er ukjent (Noble, 2018). Det er observert akutte stressresponser og panikkatferd hos laksefisk i sjø i øyeblikket lyset skrur på. Lyset kan være en stressfaktor i lysregimer basert på lys og mørke intervaller (naturlig lys) (Mork, 1994).

### 1.2.3 Fysiologiske innvirkninger av temperatur på laks og teleoster

Atlantisk laks heretter kalt laks, tilhører gruppen teleoster i klassen beinfisk. Laks og teleoster er poikiloterme dyr, som betyr at kroppstemperaturen er lik temperaturen i miljøet. Dagens kunnskap om temperatur og dens fysiologiske effekt, benyttes av næringen bl.a. for å kontrollere klekketidspunkt og startfôring hos flere oppdrettsarter. Temperatur er en essensiell parameter i den embryologiske utviklingen til de fleste teleoster og er en kritisk velferdsindikator i startfôringsfasen. Optimal temperaturstyring kan bidra til rask vekst god fiskehelse og velferd. Suboptimale temperaturer kan ha negative implikasjoner på fiskens vekst, immunforsvar og helsestatus. Optimaltemperaturen til en art kan variere mellom ulike livsstadier (Noble, 2018). Villaks er fra tidlig embryo fram til startfôring eksponert for lave temperaturer på 0,5-3 °C i elven (Heggberget T.G., 2011). I lakseoppdrett anbefales det at inkubasjonstemperaturen til lakse-egg ligger på mellom 4-8 °C (Noble, 2018). Villaks og oppdrettslaks virker ha lik termisk toleranse med god evne til å adaptere til lave temperaturer. Det argumenteres for at høy dødelighet hos yngel av villaks i elver, skyldes andre faktorer enn temperaturen (Solberg M.F., 2016).

En mulig konsekvens av eksponering til temperaturer over eller under den fysiologiske grensen for en vilkårlig fiskeart, er en termisk stressrespons. Stress har negativ effekt på fiskens generelle homeostase og immunforsvaret (Noble, 2018). Akutt eller kronisk eksponering til suboptimale temperaturer, kan interferere med fiskens evne til å beskytte seg mot patogener og gjøre dem sårbar for sykdom (Abram, 2017). Det menes også å kunne forårsake ryggdeformiteter hos laks i tidlige livsstadier (Ytteborg E., 2010). I 1989 ble det publisert en artikkel, som påsto at salmonider vokser dårligere etter klekking fram til startfôring, parallelt med økende temperatur (Jensen, 1989). I nyere tid er det gjort funn på at temperaturen også kan interferere med transkripsjonen av cellulære klokkegener (Kaneko, 2005). Temperatur er et effektivt og viktig virkemiddel i oppdrettsnæringen. Fortsatt er det mangel på kunnskap rundt inkubasjonstemperatur og hvilken betydning den har for immunforsvaret til embryo og fiskelarver (Zhang Q., 2018).

### 1.3 Immunforsvaret til beinfisk

I kontrast til vertebrater klekker fisk i det embryologiske stadiet. Det betyr at de er avhengige av et operativt immunsystem på et tidlig stadium i livet, for å kunne beskytte seg selv mot skadelige mikroorganismer i det akvatiske miljøet (Dalmo, 2005). Funn tyder på at immunsystemet til sebrafisk er morfologisk og funksjonelt og ferdigutviklet 4-6 uker etter fertilisering (Liam S, 2004). Regnbueørret (*Oncorhynchus mykiss*) larver regnes som immunkompetente 14 dager etter klekking. En immunkompetent fisk har ferdigutviklet populasjoner med sirkulerende lymfocytter og lymfoide organer, som er morfologisk ferdigutviklede. Den spesifikke immunresponsen utvikles rundt startfôring (Heinecke R.D., 2014).

#### 1.3.1 Ontogeni av immunologiske organer

Fisk og pattedyr har de samme lymfoide organene med unntak av lymfeknuter og beinmarg (Press, 1999). Immunforsvaret hos fisk inkluderer de sentrale organene nyre, thymus, fornyre og det mukosal-assosierte lymfoide systemet MALT, som deles inn i hud (SALT), gjeller (GALT) og tarm (GIALT). Thymus er viktig for utvikling av spesifikk immunitet og produksjonen av hematopoetiske stem-celler (HSC). Thymus er det første lymfoide organet, som utvikles i den embryoniske fasen hos salmonider (Heinecke R.D., 2014). I noen studerte marine teleoster utvikles midlertidig nyren først, som også er et hematopoetisk organ. HSC er forgjengere, som gir opphav til myeloide celler og lymfocytter. Primitive varianter av HSC er påvist hos sebrafisk 12 timer etter fertilisering. Tidlig i embryogenesen produseres primitive HSC i den «intermediate» celle-massen (ICM) som senere blir et viktig område for hematopoese. Erytrocytter og makrofager er de første blodcellene identifisert i sebrafisk embryoer i ICM. Hos regnbueørret oppstår HSC først i eggeplommen før de på et senere stadium koloniserer de primære lymfoide organene: nyre og thymus (Zapata A, 2008).

### 1.3.2 Ontogeni av det medfødte immunforsvaret

Ferdigutviklet sebrafisk (samt andre beinfisk) har et velutviklet immunsystem, som er veldig likt menneskers. Derfor forventes det at majoriteten av signalveiene og molekylene involvert i immun responsen til pattedyr, eksisterer og oppfører seg likt hos fisk (Varela, 2017). Det medfødte immunforsvaret er den første forsvarslinjen mot skadelige mikroorganismer, og tilbyr en uspesifikk og øyeblikkelig respons mot et bredt spekter av patogener (Jørgensen, 2014). Det medfødte immunsystemet inkluderer fysiske barrierer, som hud og slimlag, cellulær fagocytose og humorale komponenter (Magnadóttir B., 2006). Medfødt immunitet har to typiske reaksjonsmønstre, en antiviral respons, og en inflammatorisk. Den inflammatoriske responsen oppstår gjerne i sammenheng med bakterielle infeksjoner (Abbas K. A., 2014). Viktige komponenter i den antivirale responsen er sensorene som registrerer virale inntrengere (Toll liknende reseptorer, NOD-liknende reseptorer, RIG-1). I tillegg er komplementsystemet, fagocytter, naturlige drapsceller, cytokiner, og radikale oksygen og nitrogenoksider viktige bestanddeler (Jørgensen, 2014), som også kan delta i antiviral respons. Aktivitet i det medfødte immunsystemet hos sebrafisk kan oppdages allerede første dag i embryogenesen (Dios, 2010). Det gjenstår fortsatt mye forskning på ontogenetisk utvikling av det medfødt immunitet hos de fleste fiskearter (Zhang Q., 2018). Av medfødte komponenter hos fiskelarver i tidlige livsstadier er inflammatoriske komponenter, som leukocytter, komplementproteiner og enzymer som cathepsiner og lysozymer beskrevet (Magnadóttir B., 2005). Hos laks er C3 funnet 14 dager etter fertilisering, og hos regnbueørret 7 dager etter fertilisering (Heinecke R.D., 2014). Mange av faktorene er maternalt overført (Magnadóttir B., 2005).

### 1.3.3 Ontogeni av det spesifikke immunforsvaret

Adaptiv immunitet, også kalt «spesifikk immunitet» er basert på somatisk rekombinasjon, der reseptor-gener settes sammen på ulike måter for å lage T- og B celler med unike spesifikke reseptorer. Hver lymfocytt får en særegen reseptor, som gjenkjenner et spesifikt patogen eller epitop. Signalisering til reseptorene initierer effektor funksjoner hos lymfocytten. Effektorfunksjoner innebærer produksjon av immunoglobuliner/antistoffer hos B-celler og plasmaceller. Eller T-celle produksjon av interleukiner (IL) og medfølgende celledierte responser (Abbas K. A., 2014). Sammenliknet med medfødt immunitet er spesifikk immunitet



## Innledning

ferdig utviklet på et senere stadium i ontogenien. I tillegg bruker det lengere tid på å respondere på infeksjoner. Fisken er i et sårbart livsstadium før det spesifikke immunsystemet er ferdig utviklet, og er i denne perioden avhengig av en sterk medfødt immunrespons (Dios, 2010). Hos regnbueørret er innholdet av IgM vist å øke frem mot klekking, og avtar deretter et par måneder, før det spesifikke forsvaret er utviklet og i stand til å respondere for eksempel ved immunisering eller infeksjon (Castillo A., 1993; Tatner, 1983).

### **1.3.4 Tidlig utvikling av immunforsvaret til egg og larver (salmonider)**

Hos salmonider er det vist at transkripsjonen av immun-molekyler starter tidlig etter fertilisering. Thymus, for- og baknyre begynner og utvikles før larven klekker. I thymus, som fortsatt er under utvikling kan lymfocytter observeres etter klekking. Udifferensierte HSC celler og lymfocytter er ikke blitt observert i nyren før rett etter klekking (Heinecke R.D., 2014). Genuttrykket for ulike medfødte og spesifikke immun-komponenter har blitt undersøkt under ontogenesen til larver av regnbueørret. Trenden var at ekspresjon av spesifikke immungener var lave tidlig i embryogenesen, men økte til moderate nivåer rett etter klekking, og økte i større grad fra larven var 670 døgngader (startføring). Man så også medfødte immun-molekyler før klekking (ca 368 døgngader), men ikke de spesifikke (Heinecke R.D., 2014).

## **1.4 Antiviral immunitet**

### **1.4.1 «Pattern recognition receptors»: Generell oversikt**

Virus og andre mikrober kan aktivere det medfødte immunforsvaret ved å bli gjenkjent av reseptorer kalt «pattern recognition receptors» (PRRs). På norsk kan disse kalles mønstergjenkjennende reseptorer. PRRs er reseptorer som gjenkjenner spesifikke molekulære mønstre hos patogener (PAMPS). PAMPS er molekulære strukturer, som finnes på ulike grupper av mikrober og virus, men som normalt ikke finnes på vertsceller. Reseptorene har utviklet seg til å oppdage strukturer, som gjerne er essensielle for overlevelsen eller virulensen

til patogenet. Mønster-gjenkjennende reseptorer deltar i antiviralt forsvar ved å oppdage virus og videreføre signaler, som aktiverer antivirale forsvarsmekanismer (Abbas K. A., 2014).

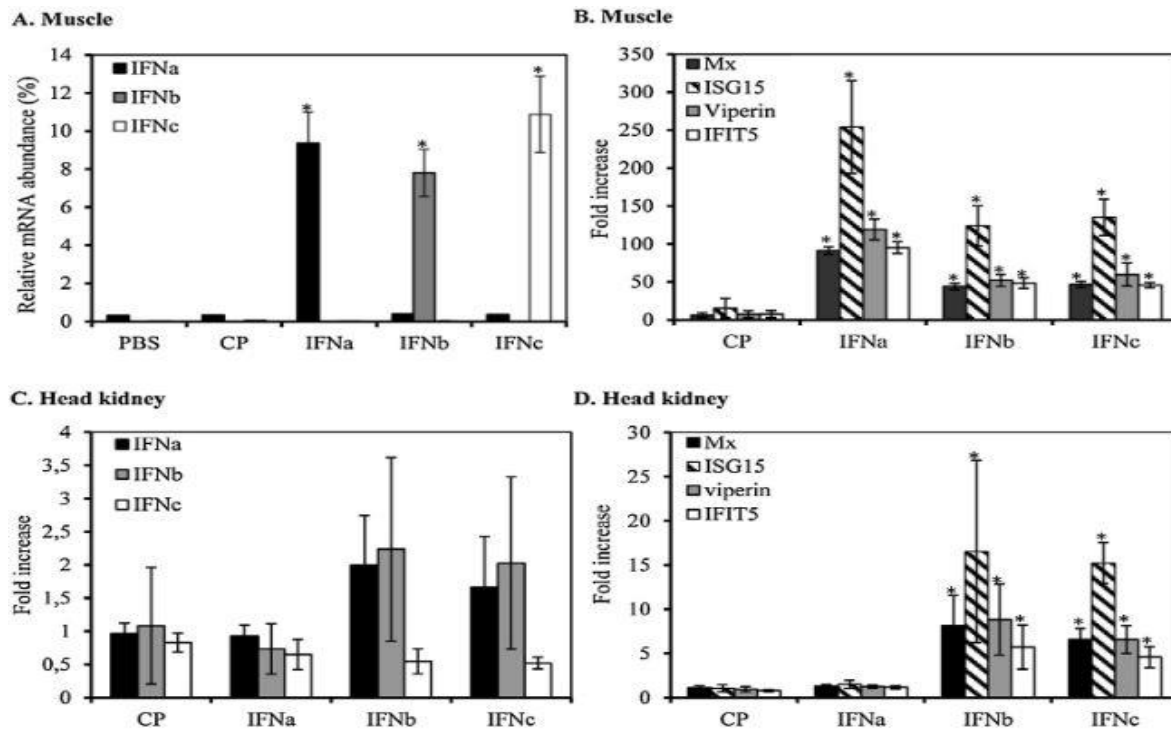
### 1.4.2 Toll-like reseptorer: TLR3 og TLR7

Noen av de mest studerte mønster-gjenkjennende reseptorene er toll-lignende reseptorer (TLR). Så langt er det blitt beskrevet 17 ulike TLR hos ulike fiskearter. Reseptorene deles inn i to grupper: Type 1 og Type 2. TLR type I befinner seg på celleoverflaten, mens type II fins inne i cellen (Palti, 2011). TLR7 og TLR3 er cytoplasmiske reseptorer (Varela, 2017), og er påvist hos salmonider (Svingerud T., 2017). De cytoplasmiske reseptorene befinner seg på cellemembraner inne i cellen og gjenkjenner virale nukleinsyrer i cellens cytoplasma. TLR3 gjenkjenner dobbelt-trådig RNA (dsRNA) og TLR7 gjenkjenner enkeltrådig RNA (ssRNA) (Palti, 2011). Signalkaskadene i fisk, som aktiveres når TLR gjenkjenner RNA/DNA, later til å være lik den hos pattedyr (Varela, 2017) Når toll-reseptorene gjenkjenner RNA eller DNA videreføres det signaler mellom flere ledd i en signalkaskade, som til slutt setter vertscellene i en «virus alarm» (Jørgensen, 2014).

### 1.4.3 Interferoner

Interferoner (IFN) er en type cytokin celler bruker for å signalisere til hverandre om en pågående viral infeksjon. Interferonene kan mobilisere nærliggende friske celler og leukocytter for å motvirke virusinfeksjoner (Jørgensen, 2014). Type I interferoner spiller en avgjørende rolle i antiviral immunitet hos fisk og vertebrater (Svingerud T., 2017), og er sentrale for antiviralt forsvar (Dahle, 2019). Hos fisk ble induksjonen av interferon-liknende molekyler beskrevet for 40 år siden (Jørgensen, 2014) og type 1 IFN er påvist hos atlantisk laks (Robertsen, 2003). Interferon-a (IFN-a) og interferon-c (IFN-c) er potente type 1 IFN hos laks med. IFN-a induksjon skjer hovedsakelig gjennom RIG-1/MDA5 veien, som opererer i de fleste laksecellene. Produksjon av IFN-c induseres via TLR7, som opererer primært i lymfoide celler. Interferonene initierer signalveier som stimulerer interferon induserbare gener (ISG). Forsøk har vist at IFNa stimulerer ISG lokalt i cellen mens IFNc induksjon kan skje systemisk (figur 2) (Robertsen, 2003; Chang J-C. R. C., 2014; Sun, 2009). Flere hundre ISG er identifiserte i fisk, men forskningen er mangelfull på dette området (Poynter S & Dixon B., 2017).

## Innledning



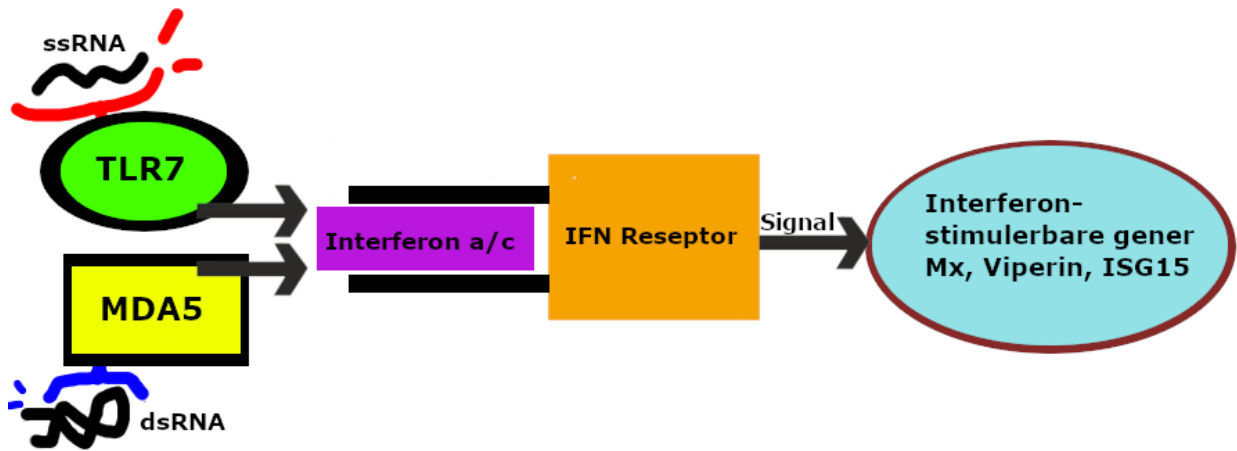
Figur 2: Laksemuskel injisert med interferon-produserende plasmid viser lokal IFNa, IFNc og IFNb stimulering av ulike ISG i laksemuskel (A/B). ISG ble systemisk stimulert i andre lymfoide organer av IFNb og IFNc (C/D) (Chang J-C. R. C., 2014).

### 1.4.4 Andre antivirale reseptorer og komponenter: Mx, MDA-5, ISG15 og viperin

Når ISG stimuleres, initieres transkripsjon av proteiner involvert i antivirale mekanismer. Eksempler på ISG er *Mx*, *viperin* og IFN-induserbart gen 15 (*ISG15*) (Svingerud T., 2017). Det er påvist at *Mx* og *ISG15* utøver direkte antivirale handlinger mot patogene virus i atlantisk laks (Jørgensen, 2014). *ISG15* finnes i cellene i fri form eller som kovalent bundet til substratproteiner (ISGylering). «*ISG15*-substrat protein konjugasjon» øker bl.a. stabilitet, aktivitet, og interaksjon hos ulike antivirale immunkomponenter (Chang J-C., 2016). Uttrykket av *Mx* økte 500 ganger hos sebrafisk-larver, etter injeksjon med poly I:C (dobbeltrådig (ds) RNA analog, som binder TLR3). Dette indikerte at *Mx* er en viktig komponent for å bekjempe virale infeksjoner (Dios, 2010). «Melanoma differentiation associated protein 5» (*MDA5*) er en reseptor i familien RIG-I-liknende reseptorer (RLR). RLR er cytosoliske reseptorer, som kan detektere intracellulært viralt RNA (Varela, 2017). *MDA5* gjenkjenner lange dsRNA tråder og aktiverer produksjon av interferoner (hovedsakelig IFNa) (Figur 3). TLR3 og TLR7 kan også

## Innledning

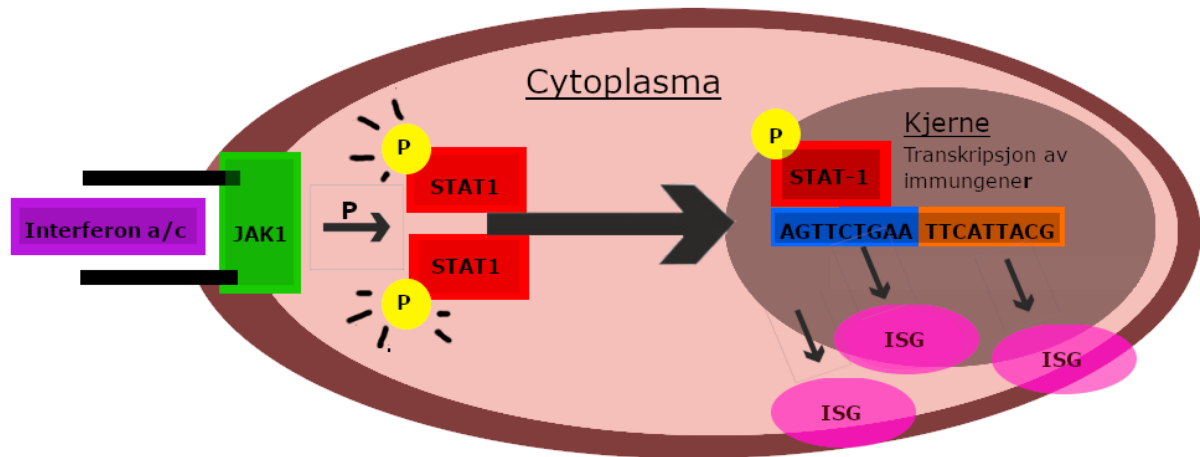
gjenkjenne enkeltrådig RNA og er knyttet til endosomer, mens MDA5 befinner seg andre steder inne i cytoplasma. MDA5 er påvist og karakterisert hos regnbueørret (Chang, 2011).



Figur 3: MDA5 og TLR7 gjenkjenner viralt dsRNA eller ssRNA og stimulerer produksjonen av IFN $\alpha$  og IFN $\gamma$ . Interferonene binder til reseptorer på cellemembraner og initierer signalkaskader inne i cellen. Resultatet er at interferon induserbare gener i cellekjernen transkriberes til protein (Eliassen, 2020).

### 1.4.5 Sentrale transkripsjonsfaktorer som inducerer antivirale gener, STAT-1 og PKR

Interferoner interfererer ikke direkte med virus, men viderefører signaler gjennom signalveier (Langevin C., 2013). En av signalveiene er JAK(Janus kinase) /STAT («signal transducer and activator of transcription proteins») signalveien. STAT familien er best beskrevet hos pattedyr og består av cytoplasmiske transkripsjonsfaktorer. STAT1 kan mediere signaler fra membranen til cellekjernen raskt når de fosforyleres (Figur 4). STAT1 homologer er påvist hos atlantisk laks (Skjesol, 2010).



*Figur 4: Interferoner aktiverer janus kinase 1 (JAK1) på cellemembranen, som fosforylerer (P) intracellulære STAT1. Aktiv STAT1(P) regulerer bl.a. genetisk transkripsjon av ISG proteiner i cellekjernen. ISG har direkte antivirale effekter på virus hos pattedyr og laks (Eliassen 2020).*

Når nivået av interferoner øker ved virus infeksjon, øker også uttrykket av «(dsRNA)-avhengig protein kinase» (PKR). PKR binder viralt-dsRNA, som tilgjengeliggjøres når viruset replikerer. Når PKR binder seg til viruset, inhiberes virusets protein syntese av at PKR fosforylerer eukaryot translasjonsfaktor 2a (eIF2 $\alpha$ ) (Liu, 2011).

## 1.5 Effekt av lys- og temperatur på det medfødte immunforsvaret

### 1.5.1 Effekt av lys på det medfødte immunforsvaret

Sesongbaserte rytmer kan gi endringer i immunsystemet, som promoterer helse og overlevelse hos mange organismer. Flere studier på pattedyr støtter opp om denne teorien, men den er lite utforsket på fisk. Det er demonstrert flere sterke sammenhenger mellom lyset i miljøet og immunsystemet til vertebrater. Man har sett at både humorale (løselige komponenter) og cellulære immun-komponenter hos dyr, påvirkes positivt ved kortere fotoperioder, og negativt ved lange kontinuerlige fotoperioder. Bl.a. er det funnet direkte hormonelle korrelasjoner mellom fagocytose aktivitet hos makrofager og melatoninnivået, da hos duer (Esteban, 2016).

## Innledning

Immunkomponenter hos *regnbueørret* (*Onchorynkus Mykiss*) har også vist seg å fluktuere i samsvar med daglige lysrytmer. Naturlige døgnrytmer med lys og mørke påvirket myeloide cellers antall og posisjon. Antall myeloide celler i blodet var høyest på morgenen, minsket i blodet når det ble mørkt, og økte samtidig i hodenyren (Montero R., 2019). Rytmske daglige fluktuasjoner er også observert å påvirke komplement og lysozymaktivitet hos havkaruss (*Sparus aurata*).

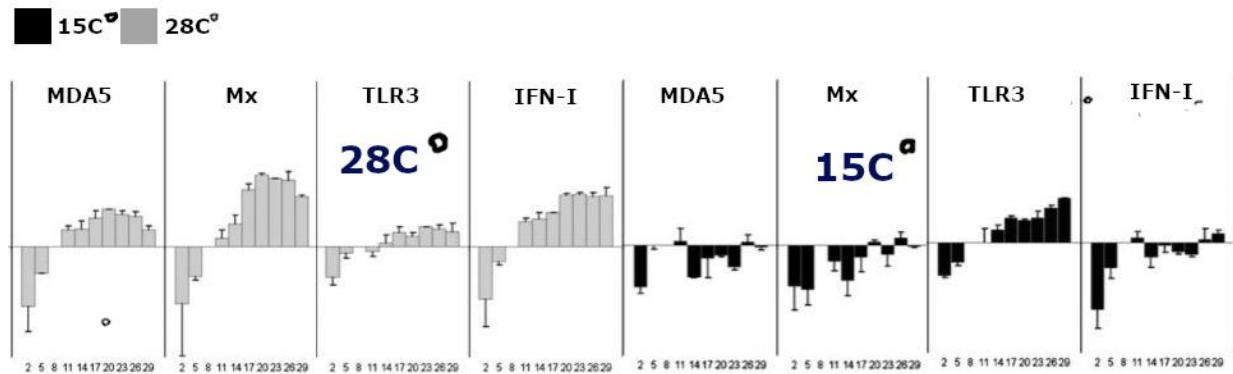
### 1.5.2 Effekt av temperatur på det medfødte immunforsvaret

Få studier er gjort på kronisk (langvarig) eksponering til suboptimale temperaturer og effekten på medfødt immunitet (Abram, 2017). Det første initiativet til å utforske effekten av lave temperaturer på spesifikk immunitet hos fisk ble utført i 1977 (Morvan, 1998). Studien i 1977 konkluderte med at antistoff-produksjon er en temperaturavhengig prosess, som reduseres ved lavere temperaturer. Medfødt immunitet har generelt blitt ansett som konstant og temperatur uavhengig i motsetning til de spesifikke responsene. Det ble bl.a vist at NK-celler fra karpe kan tilpasse seg nye temperaturer og slik opprettholde sin funksjon (Abram, 2017). Dette har vist seg å ikke være helt korrekt for andre medfødte immunkomponenter. Det er gjort studier på aktiviteten til komplementsystemet, fagocytter og enzymer (lysozymer og cathepsiner) i laksefisk. Regnbueørret akklimatisert til lavere temperatur på 4°C hadde lavere komplement-aktivitet, og dermed lytisk aktivitet i blodserum. Fagocytoseaktivitet hos leukocytter var også signifikant redusert. I motsetning til regnbueørret viste rødlaks (*Oncorhynchus nerka* W) mer komplement aktivitet i blodserum ved lavere temperatur. Funnene antyder at lavere temperatur kan ha ulik effekt på komplement-aktiviteten til to ulike arter i samme familie (Nikoskelainen, Bylund, & Lilius, 2004).

Hypotermisk effekt på ontogenetisk utvikling av ulike immun-gener i det medfødte immun-systemet, er blitt studert i sebrafisk (Abram, 2017). Lav inkubasjons-temperatur resulterte i dårligere medfødt immunrespons hos sebrafisk, injisert med lipopolysakkarid og poly I:C. Samme studie konkluderte med at lav temperatur tidlig i larveutviklingen reduserte ekspresjonen av enkelte medfødte immungener (Zhang Q., 2018). Ekspresjon av antivirale medfødte immungener er også studert hos sebrafisk i tidlige stadier. Studien viste at lav temperatur hadde negativ effekt på uttrykket av IFN type 1, IFN $\gamma$ , *MDA5* og *Mx* (Figur 5).

## Innledning

Utrykket av *TLR3* var i denne studien uforandret (Dios, 2010). Det er foreslått at proinflammatoriske cytokiner og proteiner involvert i viral gjenkjenning, kan nedreguleres eller forsinkes under hypotermiske temperaturer under ontogenesen (Abram, 2017).



Figur 3: Figuren viser genuttrykket av medfødte antivirale immun-komponenter under utviklingen av sebrafiskelarver. Stolpene representerer graden av uttrykket, X-aksene er antall døgn etter fertilisering. 28°C regnes som optimal temperatur for sebrafisk, og larvene klekker ved dag 2-3 (Dios, 2010).

## 1.6 Problemstilling

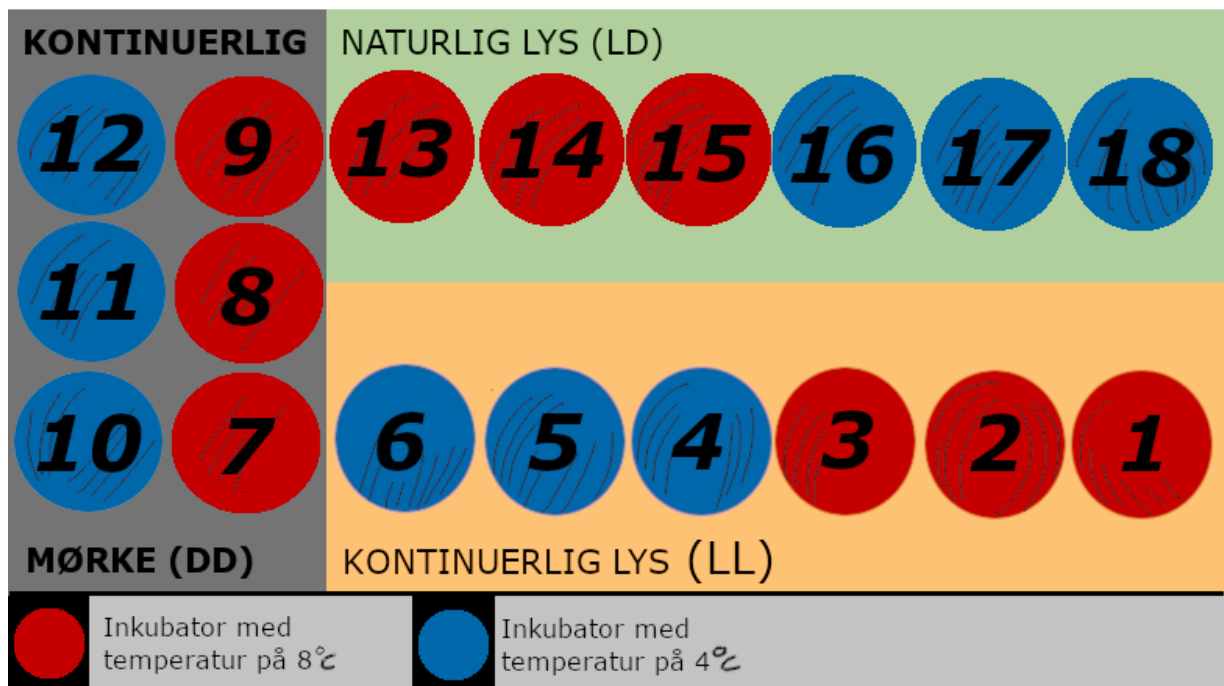
I oppdrettsnæringen i dag inkuberes lakserogn vanligvis på kontinuerlig mørke ved 8°C. Hvorvidt dette er det beste lys- og temperaturregimet for utviklingen av antiviral medfødt immunitet hos lakseyngel, er ikke avklart enda. Oppgavens mål var å finne ut i hvilken grad ulike antivirale medfødte gener uttrykkes, og om ekspresjon av ulike antivirale medfødte gener påvirkes av lys- og temperatur på ulike utviklingsstadier hos laks.

## 2 Materialer og metoder

### 2.1 In vivo studier av genetisk uttrykk

#### 2.1.1 Forsøksoppsett

Lakseegg ble kjøpt fra Salmobreed Salten AS (Salten) og inkubert på havbruksstasjonen i Tromsø. Eggene ble fordelt på 18 inkubatorer og delt inn i 6 grupper med ulik fotoperiode og temperatur. Gruppene hadde tre ulike lysregimer hvorav en stod på kontinuerlig mørke ((DD)benyttes i industrien), en på kontinuerlig lys (LL), og en på naturlig lys (LD). Naturlig lys simulerer «Mosjøen», dvs. at hver dag ble kortere mot vinteren i en periode, før den ble lengere hver dag mot sommeren. Hver lysgruppe var delt inn to temperatur grupper (8°C og 4°C) med tre inkubatorer per gruppe (Figur 6).

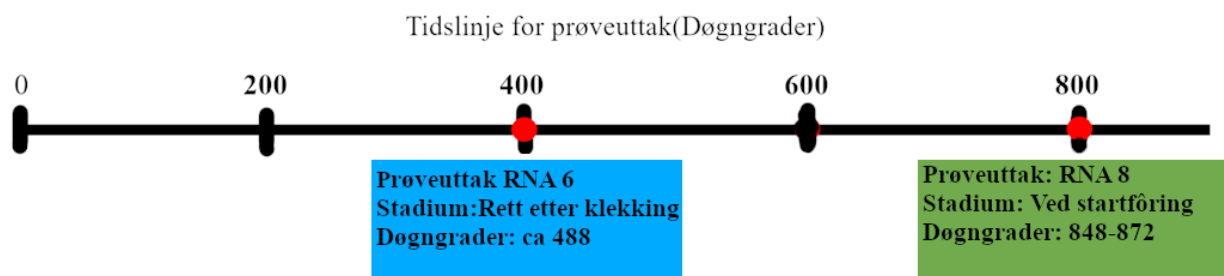


Figur 4: Figuren viser forsøksoppsettet på havbruksstasjonen. 18 inkubatorer ble fordelt på seks grupper. Gruppene hadde tre lysregimer: Naturlig lys (gul), Kontinuerlig mørke (grå) og naturlig lys (grønn). Hvert lysregime besto av seks inkubatorer fordelt på to ulike temperaturer (8°C og 4°C) (Eliassen 2020).



### 2.1.2 Prøveuttak og vevsprøve på RNA-later

Til analyse av antiviralt genuttrykk ved kvantitativ real time RT-PCR (qPCR), ble det tatt prøver av plommeseekkyngler rett etter klekking (ca 488 døgngader etter fertilisering) og yngel omkring startfôring (848-872 døgngader etter fertilisering) (Figur 7). Nyklekkede plommeseekkyngler og yngel ble avlivet med en overdose av benzokain (bedøvelsesmiddel) og bevart i egnet fikserings- og lagringsmedium (RNA-later). RNA-later inaktiverer DNA- og RNAaser og forhindrer dermed degradering av hhv. DNA og RNA. Prøvene ble fiksert i RNA-later ved romtemperatur minimum 24 timer før det ble fryst ved -20°C.



*Figur 5: Figuren viser tidslinjen over tidspunkt for prøveuttak av plommeseekkyngel og yngel brukt til analyse av antiviral genekspressjon. Tidslinjen starter ved fertilisering av egg (0 døgngader). Første prøveuttak ble gjennomført rett etter klekking da fisken var ca. 488 døgngader (RNA 6). Andre prøveuttak ble gjennomført ved startfôring etter ca 848 – 872 døgngader (RNA 8) (Eliassen 2020).*

Totalt 108 fisk ble tatt på RNA-later rett etter klekking (RNA uttak 6) og 108 ved startfôring (RNA uttak 8). Totalt ble 216 fisk fra 6 grupper brukt til genetisk analyse som vist i tabell 1.

## Metode

Tabell 1: Tabellen viser antall fisk tatt på RNA-later i et prøveuttak (RNA6 eller RNA8). Det ble totalt tatt 108 fisk fra hvert livsstadium (rett etter klekking og ved startfôring). Seks fisk ble tatt fra hver inkubator, som tilsvarte totalt 18 fisk per lys og temperaturgruppe (f.eks. LL 4 °C).

Temperatur på inkubator	Daglengde på inkubator	Antall fisk per inkubator(ink)	Totalt antall fisk per uttakk
4°C	Kontinuerlig lys (LL)	6 x 3ink	18
8°C	Kontinuerlig lys (LL)	6 x 3ink	18
4°C	Naturlig lys (LD)	6 x 3ink	18
8°C	Naturlig lys (LD)	6 x 3ink	18
4°C	Kontinuerlig mørke (DD)	6 x 3ink	18
8°C	Kontinuerlig mørke (DD)	6 x 3ink	18
<b>Sum: RNA8 + RNA6</b>			<b>106+106 = <u>216 Fisk</u></b>

### 2.1.3 RNA isolering med «Trizol metoden»

Før tillaging av cDNA til kvantitativ real-time PCR (qPCR), ble RNA fra fiskelarvene isolert og rensset etter protokoll fra Nofima. Metoden baseres på bruk av «Trizol» (guanidinthiocyanat, kloroform og fenol), som skal gi rent RNA og DNA med høy-kvalitet. Trizolmetoden var en særlig godt egnet metode til vevsprøver fra plommesekklarver, som har mye proteiner og lipider i plommesekken. All bruk av kjemikalier ble utført i et avtrekksskap med sikkerhetsutstyr. Fisken ble homogenisert i eppendorfrør tilsatt priscyllis kuler i en Precellys 24 maskin (Bertin technologies) på følgende program: 6800-3x15-030. En yngel ble tilsatt til hvert rør. All sentrifugering ble utført i en Centrifuge 5418 R, TX4 Digital IR Vortex Mixer ved 12000 rpm/10min/4°C og 12000 rpm/15min/4°C.

### 2.1.4 DNasebehandling med Turbo DNA-free kit (Ambion)

Til DNasebehandlingen ble det brukt «TURBO DNA-free Kit» fra Ambion. Målet med DNase-behandlingen var å degradere genomisk DNA fra RNA'et i prøvene. I forkant ble det laget en mastermix med en blanding av DNase-buffer og Turbo DNase enzym (Tabell 2). Blandingsforholdet mellom buffer og DNase i mastermiksen ble beregnet ut fra volum og mengde isolert RNA og antall prøver som behandles.

Tabell 2: Komponentene tilsatt i mastermiksen, som brukes til DNase behandling

Komponent i mastermix (MM)	Volum
Buffer	<p><b>Et rør:</b></p> <p><math>0.1 \mu\text{l DNase buffer} \times 30 \mu\text{l Isolert RNA} = \underline{3 \mu\text{l}}</math></p> <p><b>Totalt i MM:</b></p> <p><math>3 \mu\text{l DNase buffer} \times (\text{antall prøver} + 2)</math></p>
Turbo DNase enzym	<p><b>Totalt i MM:</b> <math>0.5 \mu\text{l Turbo DNase} \times (\text{antall prøver} + 2)</math></p>

Forholdet i konsentrasjon mellom protein og RNA i vaskede prøver ble målt i et spektrofotometer (ND-1000, Thermo Fischer Scientific). Spektrofotometeret bruker absorpsjon av stråling til å determinere konsentrasjonen av kjemiske forbindelser. Metoden brukes til å avklare om RNA'et er tilstrekkelig rent. Ved bølgelengde A260nm/A280nm og 230nm er det ønskelig med verdier på minimum 1,8 og tilnærmet 2 så mye som mulig. Resultater under minimumsverdi (OD 260/280 <1,8) indikerer at prøvene har forurensende mengder protein.

### 2.1.5 Fortynning av RNA og cDNA syntese

Primere som brukes i qPCR binder seg til komplementære nukleotidsekvenser i DNA. Ved å gjøre om RNA fra prøven til cDNA, kan RNA amplifiseres i qPCR i form av cDNA. Revers transkripsjon (cDNA syntese) er en enzymatisk prosess der enkeltrådig mRNA brukes som templat til å lage komplementær DNA (cDNA) (Griffiths A. J. F., 2015). I løsningen til cDNA syntesen ble det tilsatt løsning med 200ng fortynnet RNA (Tabell 3), nukleasefritt vann ( $dH_2O$ ), revers transkriptase og buffer til et eppendorfrør (tabell 4). Mengden konsentrert RNA i hver reaksjon tilsvarte 200ng i et volum på 2-9  $\mu$ l. For å få lik RNA konsentrasjon i hver prøve, ble riktig fortynningsforhold og mengde RNA(ng) per 1  $\mu$ l beregnet (Tabell 3). Utgangspunktet for RNA konsentrasjonene ble hentet ifra resultatene fra nanodrop analysene av original løsning med isolert totalt RNA. Hvis volumet av RNA var mindre enn 9  $\mu$ l ble resterende volum erstattet med  $dH_2O$ .

Tabell 3: Tabellen viser hvordan løsningen med RNA ble laget. Mengde  $\mu$ l  $dH_2O$  og konsentrert RNA ble beregnet slik at konsentrasjonen som brukes i cDNA syntese tilsvarer 200ng.

<b>Løsning med 200ng RNA og <math>dH_2O</math> (totalvolum 9 <math>\mu</math>l)</b>			
<b>Komponenter</b>	<b>Forhold</b>	<b>RNA (ng per 1 <math>\mu</math>l)</b>	<b>Beregnet volum tilsatt i rør</b>
Konsentrert RNA (ng)	1:40	<b>Formel (ng RNA per 1 <math>\mu</math>l):</b> $[RNA](ng) / 40$ <i>Eksempel:</i> $12663ng / 40 = \underline{66,6 \text{ ng}/\mu\text{l}}$	<b>Totalt volum (<math>\mu</math>l) med RNA i rør:</b> $= \frac{RNA(ng)/1 \mu\text{l}}{200 \text{ ng}}$ <i>Eksempel:</i> $\frac{66,6ng/\mu\text{l}}{200 \text{ ng}} = 3\mu\text{l}$
$dH_2O$			<b>Totalt volum <math>dH_2O</math> i rør:</b> $= 9 \mu\text{l} - \text{mengde } (\mu\text{l}) \text{ RNA}$ <i>Eksempel:</i> $9 \mu\text{l} - 3 \mu\text{l} = \underline{6 \mu\text{l}}$

## Metode

Komponentene vist i tabell 4 ble pipetert og mikset i brønner på en PCR-plate. cDNA syntese er en varmebasert prosess og PCR-platene ble kjørt på et program i en thermosyklus (2720 Thermal cycler, Applied biosystems) på tre temperaturer: 60 minutter ved 37°C, 5 min ved 95°C og nedkjøling ved 4°C. cDNA er relativt stabilt og kan stå på 4°C før det fryses ned til -20°C. Før prøvene med ferdig syntetisert cDNA ble kjørt i qPCR ble de fortynnet 1:40 med  $dH_2O$ .

Tabell 4: Komponentene tilsatt i hver brønn på PCR-platen til cDNA syntese

Komponent	Volum
Løsning med 200ng RNA og $dH_2O$	9 $\mu$ l
20X RT Buffer mix	10 $\mu$ l
2X RT Enzyme mix	1 $\mu$ l
<b>Totalt</b>	<b><u>20 <math>\mu</math>l</u></b>

### 2.1.6 Positiv kontroll (POS) & kontroll av genomisk kontaminering (NRT)

For å kontrollere og sikre kvaliteten på prøvene og mellom qPCR brettene, ble det i forkant laget en standardløsning med positiv kontroll (POS), og no reverse transcription (NRT). Standardmiksen for positiv kontroll ble laget av 6 utvalgte RNA prøver, med god gruppevis spredning og RNA-kvalitet basert på verdier fra NanoDrop. Positiv kontroll er en metode å forsikre seg om at det ikke er store forskjeller mellom qPCR brettene. En tilnærmet lik Ct-verdi/signal fra POS på de ulike platene, indikerer at det ikke er differanser mellom komponentene i f.eks. mastermiksen på de ulike brettene. I tillagingen av POS fra utvalgte RNA-prøver, ble protokollen for cDNA syntese fulgt. Syntetisert cDNA fra alle de utvalgte prøvene til POS ble mikset sammen i en vortexer og fortynnet 1:40. Prøvene ble deretter fordelt i 2mL eppendorfrør med et volum tilsvarende to brønner på PCR brettet (2 x 7  $\mu$ l).

Prinsippet for NRT er å kjøre vanlig qPCR, bare at man ikke bruker cDNA, men isolert RNA fra prøvene. Hvis Ct-verdien i NRT er mindre enn 6 sykluser fra prøvene når man kjører qPCR, kan det være DNA kontaminering i originalprøvene. For hver 44. prøve med cDNA per gen

## Metode

kjørt i qPCR, ble det også kjørt 2 NRT. NRT miksen ble laget med komponentene som i løsningen med 200ng RNA og  $dH_2O$  (Tabell 3), og av de samme originalprøvene med isolert RNA. Det ble tilsatt et volum på 9  $\mu$ l med 200 ng RNA, men buffer og enzym (Tabell 2) ble erstattet med  $dH_2O$ . Prøvene ble så fortynnet 1:40.

### 2.1.7 Primer stam- og arbeidsløsning og beregning av amplifikasjonseffektivitet

QPCR er et verktøy, som kan benyttes til å påvise og kvantifisere genetisk materiale (DNA eller RNA) i en prøve. Kvantifiseringen av DNA avhenger av at en primer binder seg til hver ende av området på cDNA'et, som skal amplifiseres. Primeren starter (initierer) replikasjonen på et spesifikt område av DNA tråden. Primeren muliggjør seleksjon av hvilke gensekvenser på cDNA'et som transkriberes og amplifiseres i qPCR. Totalt ble det kjørt qPCR på 10 medfødte antivirale immungener, som koder for ulike proteiner (Tabell 5). I forkant av qPCR ble primere på 0.2  $\mu$ mol av forward og revers bestilt fra SigmaAldrich. Primerene (frysetørret) ble løst opp til en stamløsning (100  $\mu$ M). Fra stamløsning ble primeren fortynnet til en 5  $\mu$ l arbeidsløsning før qPCR.

Tabell 5: Tabellen viser primerene brukt i forsøket. Kolonnene viser type primer, gensekvens, tidligere publikasjoner og beregnet amplifikasjonseffektivitet. (F= Forward, R = Reverse)

Primer	Gensekvens (5-3')	Genbank nr / Publikasjon	Amplifikasjonseffektivitet (%)
<b>Mx FW</b>	TGC-AAC-CAC-AGA-GGC-TTT-GAA	U66475.1	<b>100%</b>
<b>Mx RW</b>	GGC-TTG-GTC-AGG-ATG-CCT-AAT	(Svingerud T., 2017)	
<b>ISG15 FW</b>	CTG-AAA-ACG-AAA-AGG-GCCA	AY926456.1	<b>80,65%</b>

Metode

<b><i>ISG15</i> RW</b>	GCA-GGG-ACT-CCC-TCC-TTG-TT	(Svingerud T., 2017)	
<b><i>PKR</i> FW</b>	TGG-CAT-GAT-GGA-GAC-GAC-AG	EF523422.1	<b>107%</b>
<b><i>PKR</i> RW</b>	GCT-GGG-AGA-TAA-CTG-CTC-GG	(Svingerud T., 2017)	
<b><i>Viperin</i> FW</b>	TCC-TTG-ATG-TTG-GCG-TGG-AA	BT047610	<b>84,7%</b>
<b><i>Viperin</i> RW</b>	GCA-TGT-CAG-CTT-TGC-TCC-ACA	(Svingerud T., 2017)	
<b><i>IFNa</i> FW</b>	TGC-AGT-ATG-CAG-AGC-GTG-TG	DQ354152.1	<b>81,1%</b>
<b><i>IFNa</i> RW</b>	TCT-CCT-CCC-ATC-TGG-TCC-AG	(Svingerud T. 2017)	
<b><i>IFNc</i> FW</b>	ATG-TAT-GAT-GGG-GAG-GTG-G	EU768890	<b>84,4%</b>
<b><i>IFNc</i> RW</b>	CCA-GGC-GCA-GTA-ACT-GAA-AT	(Svingerud T., 2017)	
<b><i>TLR3</i> FW</b>	TTT-GAT-GAG-TCT-CCG-CCA-ACT-CCA	BK008646	<b>92%</b>
<b><i>TLR3</i> RW</b>	AAT-CTG-CGA-GGG-ACA-CAA-AGG-TCT	(Svingerud T., 2017)	
<b><i>TLR7</i> FW</b>	TAC-AGC-TTG-GTA-ACA-TGA-CTC-TCC	AGKD01152847	<b>83%</b>
<b><i>TLR7</i> RW</b>	CAA-CTC-TCT-GAG-ACT-THT-CGG-TAA	(Svingerud T., 2017)	
<b><i>STAT-1</i> FW</b>	GGT-CCA-CAC-AAA-TCA-ACG-TG	XM 014173039.1	<b>86%</b>
<b><i>STAT-1</i> RW</b>	CTT-TGC-AGG-GCC-TTC-TTC-TT	Not published	

## Metode

<b><i>MDA5 FW</i></b>	CTC-GTG-AAC-TAC-TCA-AGA-GAA-TCG	KU376486.1  (Moore L. J., 2018)	<b>91,7%</b>
<b><i>MDA5 RW</i></b>	CCT-GGC-TCA-TCT-ATC-AAG-TTA-T		
<b><i>S18 FW</i></b>	TGT-GCC-GCT-AGA-GGT-GAA-ATT	AJ427629	<b>96,7%</b>
<b><i>S18 RW</i></b>	CGA-ACC-TCC-GAC-TTT-CGT-TCT		
<b><i>Efl-<math>\alpha</math> FW</i></b>	CGC-CAA-CAT-GGG-CTG-G	AN321836	<b>100%</b>
<b><i>Efl-<math>\alpha</math> RW</i></b>	TCA-CAC-CAT-TGG-CGT-TAC-CA		
<b><i><math>\beta</math>-actin FW</i></b>	CAG-CCC-TCC-TTC-CTC-GGT-AT	BT059604	<b>89%</b>
<b><i><math>\beta</math>-actin RW</i></b>	CGT-CAC-ACT-TCA-TGA-TGG-AGT-TG		

Effektiviteten til primeren sier noe om hvor effektivt den binder cDNA. Etter teorien skal en 100% effektiv primer fordoble mengden cDNA i prøven hver oppformeringssyklus i qPCR. Effektivitet <100% betyr at den amplifiserer mindre cDNA per syklus, høyere effektivitet >100% kan bety at det foregår en viss inhibering av prosessen ved høye konsentrasjoner av cDNA. For test av primereffektivitet ble det laget en fortynningsrekke med cDNA. På qPCR-brettet ble hver primer testet i triplikate på cDNA-rekker med fortynningene 1:10, 1:20, 1:40, 1:80, 1:160, 1:320 og 1:640 (Tabell 6).



## Metode

Tabell 6: Tabellen viser hvordan hver fortynningsrekke ble pipettert horisontalt på qPCR brettet. Primeren ble tilsatt i en mastermix (se tabell 7) og fordelt kolonnevis på qPCR brettet i triplikater.

Fortyning (cDNA)	Kolonne 1 (Brett)	Kolonne 2 (Brett)	Kolonne 3 (Brett)
<b>1:10</b>	Primer 1	Primer 1	Primer 1
<b>1:20</b>	Primer 1	Primer 1	Primer 1
<b>1:40</b>	Primer 1	Primer 1	Primer 1
<b>1:80</b>	Primer 1	Primer 1	Primer 1
<b>1:160</b>	Primer 1	Primer 1	Primer 1
<b>1:320</b>	Primer 1	Primer 1	Primer 1
<b>1:640</b>	Primer 1	Primer 1	Primer 1

Av Ct-verdiene fra fortynningsrekke ble det laget en standardkurve til primerne. Korrelasjonen ( $R^2$ ) bør ikke være mindre enn 0.98. Stigningstallet på kurven til en 100% effektiv primer tilsvarer -3,3. Et høyere stigningstall (for eksempel -2,500) betyr at effektiviteten er over 100%. Amplifikasjonseffektiviteten ble brukt til analyse av qPCR resultatene.

### 2.1.8 QPCR

Funn av en spesifikk RNA sekvens betyr at tilsvarende genomisk DNA sekvens, aktivt transkriberes til mRNA. Mengden RNA (kvantiteten) sier noe om i hvilken grad genet uttrykkes i organismen. Det er midlertidig ikke bestandig at det er en direkte proporsjonalitet mellom mengde RNA og protein. Når cDNA varmes opp til 95°C denaturerer cDNA-trådene til to enkelttråder. Temperaturen senkes deretter til lavere temperatur (72°C), som er egnet for DNA-syntese. En runde med oppvarming og nedkjøling tilsvarer en oppformeringsyklus i qPCR (Griffiths A. J. F., 2015). cDNA fra yngelprøvene ble fordelt på 96-brønners qPCR-brett og

## Metode

kjørt i en 7500 Fast-Real-Time PCR system fra ThermoFisher. Ved å tilsette fluoriserende fargestoff kalt «FastSYBR®Green I» ble mengden PCR produkt (syntetisert DNA) målt i hver oppformeringssyklus. En større mengde kopiert DNA som har «interkalerende» SYBR green avgir sterkere lyssignal. Mengden cDNA i en prøve determinerer antall oppformeringssykluser som brukes på nå en «terskel verdi». Oppformeringssyklusen der lyssignalet stiger over terskelen kalles for tilsvarer Ct-verdien. Lav Ct-verdi indikerer mye opprinnelig cDNA i prøven. Høy Ct-verdi tilsier at det er lite cDNA i prøven og dermed et lavt uttrykk av det undersøkte genet.

For å beregne relativ kvantifisering ble genene normalisert mot tre referansegene. Referansegene er et gen uttrykt i omtrent lik mengde av alle typer celler til enhver tid, som er nødvendig for en organisme. Referansegene er stabile og i stor grad uavhengig av eksterne faktorer. Ct-verdiene fra referansegene i qPCR ble brukt til å identifisere forskjeller i Ct-verdiene fra målgenene. Referansegene kan bl.a. kontrollere ulike mengder RNA i prøvene, som følger av ekstrahering eller mRNA-kvalitet. I dette forsøket ble «elongationfactor alfa 1a» (EF1-a), ribosomalt protein (18S) og beta-aktin brukt som referansegene.

Til qPCR ble det brukt 96-brønners brett der 88 brønner var tilegnet cDNA (i prøver fra fisk) og 8 brønner var tilegnet NTC (2) POS (2) og NRT (4). I alle brønnene ble det tilsatt mastermix med komponentene presentert i tabell 7, endelig primerkonsentrasjon tilsvarte 300nM. Til brønner med cDNA ble det tilsatt cDNA, for brønner med NTC ble det tilsatt  $dH_2O$  istedenfor cDNA (Tabell 8).

Tabell 7: Tabellen viser mengden av hver komponent tilsatt i mastermixen per brønn, og mengden beregnet for å fylle et qPCR brett med 96 brønner + 4 ekstrabrønner.

Komponent (mastermix)	Per brønn	Master mix (96 brønner +4)
Fast SYBR® Green I	10 µl	1000 µl
F primer (5 µl)	1.2 µl	120 µl
R primer (5 µl)	1.2 µl	120 µl
Nuklease fritt vann	0.6 µl	60 µl

## Metode

Tabell 8: Mengden ( $\mu\text{l}$ ) av hver komponent tilsatt i en vilkårlig brønn på qPCR platen.

<b>Komponent (Brett)</b>	<b>Per brønn</b>
<b>Mastermix</b>	13 $\mu\text{l}$
<b>cDNA, NTC (<i>dH<sub>2</sub>O</i>), POS, NRT</b>	7 $\mu\text{l}$
<b><u>Totalt volum:</u></b>	<u>20 <math>\mu\text{l}</math></u>

## 2.2 Analyse av qPCR data

### 2.2.1 Manuell treshold verdi

Analyse av qPCR data ble utført etter beskrivelsene av Livak og Schmittgen (Schmittgen T.C., 2008; Livak K.J., 2001). Dersom terskelverdiene til genene mellom plater ikke er like, blir resultatet en usann verdi. På grunn av dette ble det satt en manuell terskelverdi på hver plate, med det kriterium at verdien skulle være over støy nivået. Terskelverdien ble manuelt innstilt til 0.15 på alle platene i 7500 Software v2.3 fra Applied Biosystems.

### 2.2.2 Korrigering av Ct-verdier mot effektivitet

Til analyse brukes gjennomsnittet av duplikatverdiene  $Ct_1$  og  $Ct_2$  til målgenet ( $\overline{CT_{prøve}}$ ) og til referansegenene ( $\overline{CT_{ref}}$ ). Duplikatverdier med en differensase over ca 0.5 slettes. Når amplifikasjonseffektiviteten til referansegenene er lik den til genet som undersøkes, kan man direkte beregne det relative uttrykket fra gjennomsnittet ( $\overline{CT_{prøve}}$ ) (Kubista, 2007). Referansegenene hadde ulik effektivitet og gjennomsnittsverdiene ( $\overline{CT_{prøve}}$ ,  $\overline{CT_{ref}}$ ) ble korrigert mot amplifikasjonseffektiviteten til primerne (se avsnitt om amplifikasjonseffektivitet 2.1.7) før videre analyse. Ct-verdien for hver prøve ble justert med formelen:

$$Ct_{E=100\%} = \log_2(E) \times \overline{CT_{prøve}}$$

$$Excel = LOG^{(E;2)} \times \overline{CT_{prøve}} \text{ eller } \overline{CT_{ref}}$$

Der E = amplifikasjonseffektiviteten. En 100% effektiv primer har en amplifikasjonseffektivitet (E) tilsvarende 2. En mindre effektiv primer f. eks *TLR7* med 83% effektivitet (Tabell 5) har en lavere verdi (E) = 1,83, en mer effektiv primer som *PKR* (107%, tabell 5) har en verdi (E) over 2 (2,07).

### 2.2.3 Normalisering av $Ct_E$ verdier til $\Delta Ct$

Alle  $Ct_E$  verdiene ble normalisert mot det geometriske gjennomsnittet til referansegene: *S18*, *EF1-a* og  *$\beta$ -actin* ( $\overline{Ct_{EREF}}$ ). Geometrisk gjennomsnittsverdi ble regnet i excel med formelen =GJENNOMSNIITT.GEOMETRISK. Dette tilsvarer:

$$\text{Geometrisk gjennomsnitt } \overline{Ct_{EREF}} = \sqrt[n]{Ct_{ERef_1} \times Ct_{ERef_2} \times Ct_{ERef_3}}$$

$Ct_E$  ble normalisert mot  $\overline{Ct_{EREF}}$  for å finne  $\Delta Ct$  med formelen:

$$\Delta Ct = \overline{Ct_{prøve}} - \overline{Ct_{REF}}$$

$\Delta Ct$  ble brukt til statistisk analyse, beregning av relativt uttrykk og fold change.

### 2.2.4 Beregning av relativt uttrykk R og $\bar{R}$ (Livak metoden)

Før framstilling av resultatene transformeres  $\Delta Ct$  verdiene fra eksponentiell til linær form. Relativt genuttrykk (R) ble kalkulert etter Livak (Livak K.J., 2001) metoden for hver individuelle prøve med formelen nevnt under:

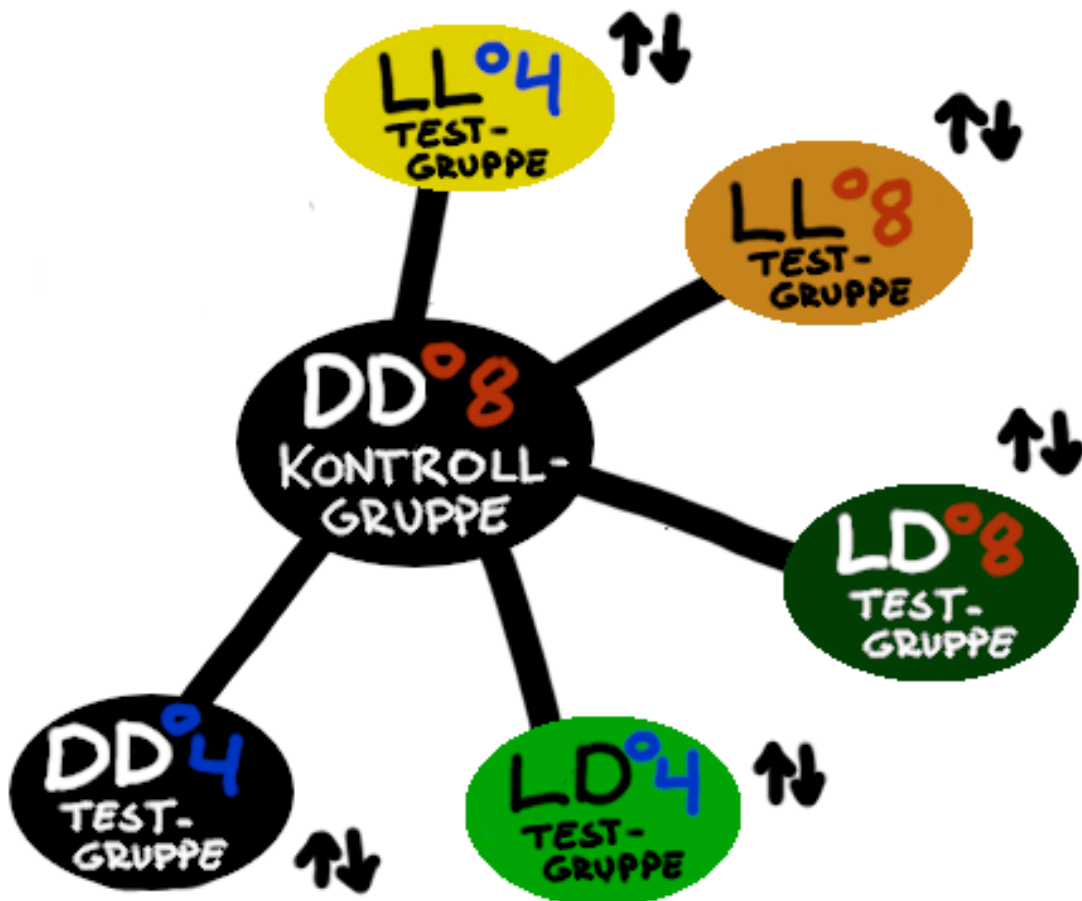
$$R = 2^{-\Delta Ct}$$

For å få et gjennomsnittlig genuttrykk per gruppe ble geometrisk gjennomsnitt per gruppe ( $\bar{R}$ ) beregnet i excel. Dette tilsvarer formelen:

$$\bar{R} = \text{GEOMETRISK. GJENNOMSNIITT (Excel)} = \sqrt[n]{R_1 \times R_2 \times R_3 \times \dots \times R_x}$$

### 2.2.5 Fold change

«Fold change» er en metode som kan brukes til å sammenlikne genuttrykket til en gruppe mot en kontrollgruppe. Fold change ble beregnet for å framstille endringer genuttrykk mellom temperaturer, lysregimer og livsstadier (Figur 8).



*Figur 6:* Figuren illustrerer fold change og hvordan testgrupper kan sammenliknes mot en kontrollgruppe. Alle lys- og temperaturgruppene ble sammenlignet med kontrollgruppen «kontinuelig mørke, 8°C» (DD8°C), som er vanlig i dagens oppdrettsnæring. Verdien til testgruppene tilsvarer hvor mye mer eller mindre et gen uttrykkes i forhold til kontrollen. LL: Kontinuerlig lys; DD:Kontinuerlig mørke; LD: Naturlig lys (Eliassen 2020).

Fold change ble regnet individuelt for hver prøve etter delta-delta Ct metoden beskrevet av Livak og schmittgen (Schmittgen T.C., 2008). Test og kontroll grupper som ble brukt til beregning av fold change er presentert i tabell 9.

## Metode

Tabell 9: Tabellen viser grupper og kontrollgrupper brukt i beregningen av fold change.

Mål	Testgruppe	Kontrollgruppe
Effekt av lys og temperatur sammenlignet med kontroll <i>DD8°C</i> ved 488 døgngader.	<i>RNA6 LD8°C</i>	<i>RNA6 DD8°C</i>
	<i>RNA6 LL8°C</i>	<i>RNA6 DD8°C</i>
	<i>RNA6 DD4°C</i>	<i>RNA6 DD8°C</i>
	<i>RNA6 LD4°C</i>	<i>RNA6 DD8°C</i>
	<i>RNA6 LL4°C</i>	<i>RNA6 DD8°C</i>
Effekt av lavere temperatur på genuttrykk ved 488 døgngader	<i>RNA6 DD4°C</i>	<i>RNA6 DD8°C</i>
	<i>RNA6 LD4°C</i>	<i>RNA6 LD8°C</i>
	<i>RNA6 LL4°C</i>	<i>RNA6 LL8°C</i>
Effekt av lys og temperatur sammenlignet med <i>DD8°C</i> ved 848 døgngader	<i>RNA8 LD8°C</i>	<i>RNA8 DD8°C</i>
	<i>RNA8 LL8°C</i>	<i>RNA8 DD8°C</i>
	<i>RNA8 DD4°C</i>	<i>RNA8 DD8°C</i>
	<i>RNA8 LD4°C</i>	<i>RNA8 DD8°C</i>
	<i>RNA8 LL4°C</i>	<i>RNA8 DD8°C</i>
Effekt av lavere temperatur på genuttrykk ved 848 døgngader	<i>RNA8 DD4°C</i>	<i>RNA8 DD8°C</i>
	<i>RNA8 LD4°C</i>	<i>RNA8 LD8°C</i>
	<i>RNA8 LL4°C</i>	<i>RNA8 LL8°C</i>
Ontogenetisk endring i genuttrykk fra 488 – 848 døgngader.	<i>RNA8 DD8°C</i>	<i>RNA6 DD8°C</i>
	<i>RNA8 LD8°C</i>	<i>RNA6 LD8°C</i>
	<i>RNA8 LL8°C</i>	<i>RNA6 LL8°C</i>
	<i>RNA8 DD4°C</i>	<i>RNA6 DD4°C</i>
	<i>RNA8 LD4°C</i>	<i>RNA6 LD4°C</i>

## Metode

	RNA8 LL4°C	RNA6 LL4°C
--	------------	------------

$\Delta\Delta Ct$  er forskjellen mellom hver individuelle  $\Delta Ct$  prøve i en testgruppe (se formel for  $\Delta Ct$  i avsnitt 2.2.3) og gjennomsnittsverdien til kontrollgruppen.

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{prøve} - \overline{\Delta Ct}_{kontroll}$$

$\Delta\Delta Ct$  ble brukt til å regne fold change med formelen:

$$\text{Fold change (FD)} = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

For og få gjennomsnittlig FD per gruppe ble det regnet geometrisk gjennomsnitt:

$$\overline{FD} = \text{GEOMETRISK.GJENNOMSNIITT} = \sqrt[n]{FD_1 \times FD_2 \times FD_3 \times \dots \times FD_x}$$

### 2.2.6 Statistisk analyse

Til all statistisk analyse ble  $\Delta Ct$  brukt som variabel. Standardavvik (STD) beregnes fra alle  $\Delta Ct$  verdier i en gruppe med formelen =STDEV.S i excel. For å finne standardavviket (+/-) til det relative uttrykket ble formlene nevnt under brukt:

$$\bar{R} + STD = 2^{-(\overline{\Delta Ct} + STD)}$$

$$\bar{R} - STD = 2^{-(\overline{\Delta Ct} - STD)}$$

Analyse av normalfordeling og statistiske tester ble utført i programmet GraphPad Prism 8.4.1. Normalfordelte data som ble testet mot en kontrollgruppe ble testet med en Welch t-test, egnet



## Metode

for to grupper. Welch korrigerings test ble benyttet når standardavviket mellom gruppene ikke var identiske. To ikke-normalfordelte grupper ble testet med Mann-Whitney test. Tester der  $p < 0.05$  ble determinert statistisk signifikante.

Flergruppetest ble brukt til å determinere signifikante forskjeller mellom inkubatorene i en gruppe. ANOVA test ble benyttet mellom normalfordelte inkubatorer. Ikke-normalfordelte inkubatorer ble testet med Kruskal-Wallis test.

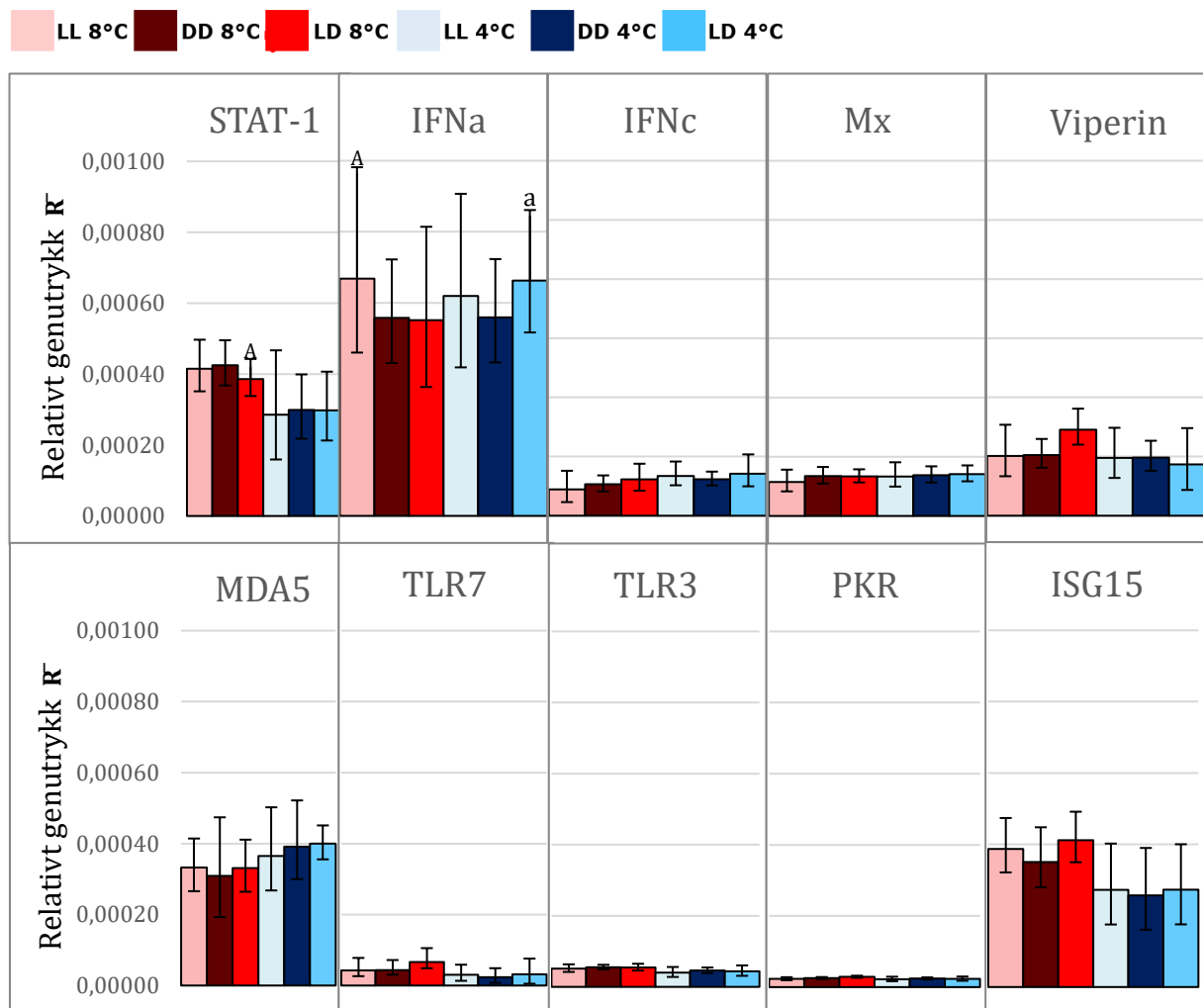
### 3 Resultater

Det ble ikke detektert Ct-verdier av betydelig størrelse (<6 Ct-sykluser fra prøve) i NRT- og NTC prøvene. Dette var en sterk indikasjon på at prøvene ikke inneholdt kontaminering av genomisk DNA. Ct-verdiene i positiv-kontroll på plater med samme gen hadde liten differanse, noe som tilsa at ulike plater med samme gen ikke viste store variasjoner seg imellom. Resultatene fra test av amplifikasjonseffektivitet til de brukte primerene er presentert i tabell 5 (se avsnitt 2.1.7: Primer stam-og arbeidsløsning og beregning av amplifikasjonseffektivitet).

#### 3.1 Ekspresjon av antivirale gener og ontogenetisk utvikling

Relativt genuttrykk er Ct-verdier normalisert mot referansegener, primereffektivitet og transformert fra eksponentielle verdier. Ved å beregne  $\overline{R}$  kunne ulike Ct-verdier sammenliknes, for å se om noen antivirale gener ble uttrykt mer eller mindre enn andre gener, hos nyklekkede plommeseekkyngel (Figur 9) og startfôringsyngel (Figur 10). Det ble også undersøkt om det var ontogenetiske endringer i det antivirale genuttrykket fra 488 døgngader til 848 døgngader (heretter kalt dg). For å synliggjøre ontogenetisk opp- eller nedregulering av genuttrykk hos yngelen fra 488dg til rundt 848 dg, ble plommeseekkyngelen ved 488 dg brukt som kontrollgrupper til å beregne fold change. Ontogenetiske endringer i det antivirale genuttrykket fra 488 dg til 848 dg er presentert i figur 11.

### 3.1.1 Relativt genuttrykk ( $\bar{R}$ ) av antivirale gener ved 488 døgngader



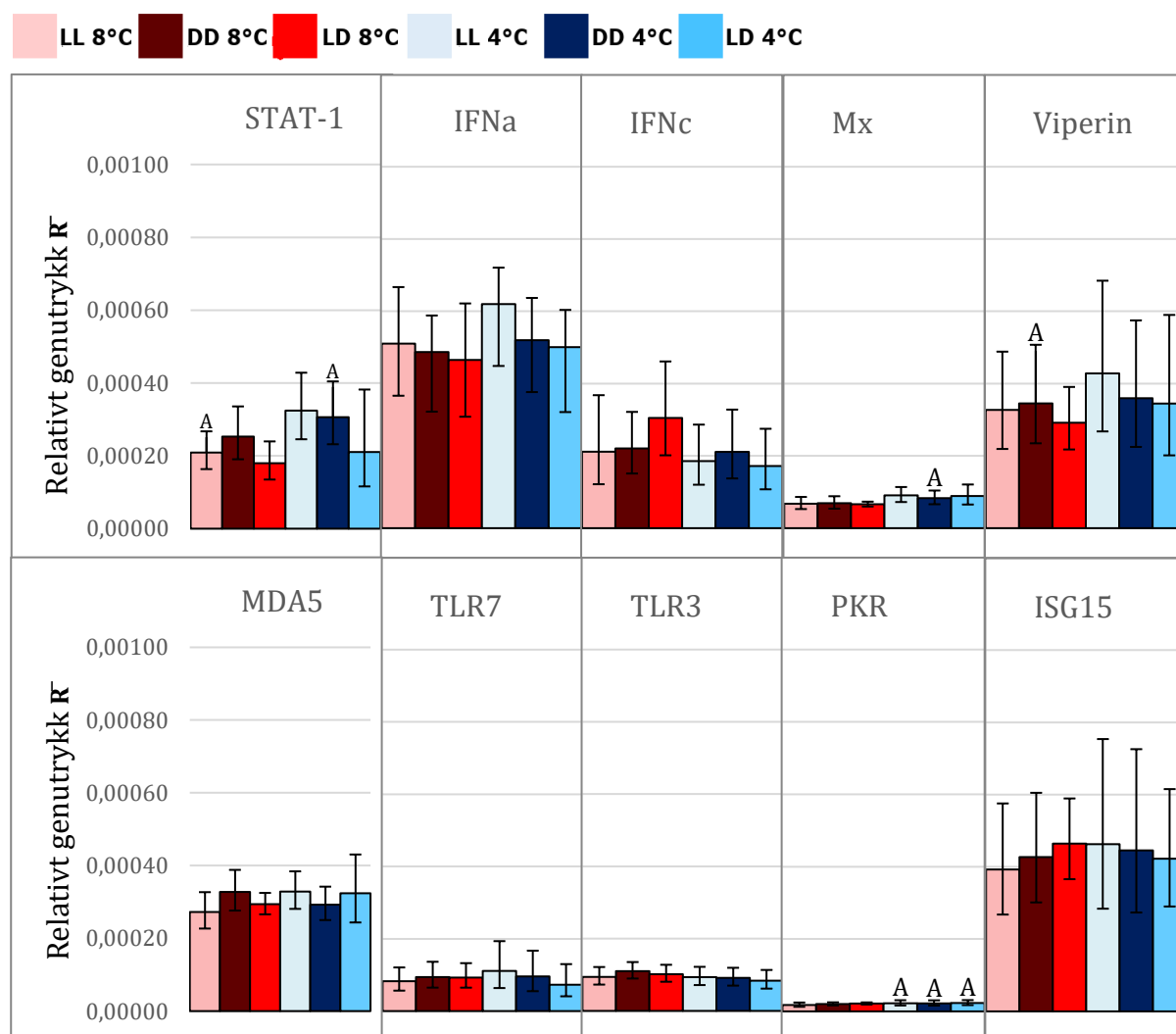
**Figur 7: Relativt genuttrykk av STAT-1, IFNa, IFNc, Mx, viperin, MDA5, TLR7, TLR3, PKR og ISG15 etter 488 døgngader (rett etter klekking).** Figuren viser det gjennomsnittlige relative genuttrykket til plommeseckyngel rett etter klekking (488 døgngader) + standardavvik ( $\bar{R} - STD$ ,  $\bar{R} + STD$ ). Hver søyle representerer en lys og temperaturgruppe, Y-aksen representerer ( $\bar{R}$ ) verdien. ( $\bar{R}$ ) for alle lys og temperaturgruppene er beregnet etter  $2^{-\Delta Ct}$  metoden og er normalisert mot referansegenene. Grupper med statistisk signifikant forskjell mellom inkubatorer er merket med stor bokstav (A). LL: Kontinuerlig lys; DD: Kontinuerlig mørke; LD: Naturlig lys.

Resultatene i figur 9 viser at *IFNa* var mest uttrykt av de antivirale genene hos plommeseckyngelen ved 488 dg i alle lys- og temperaturgruppene. For *IFNa* var det relative uttrykket jevnt (0,0005-0,0006) i alle gruppene. Fisk i to av gruppene (LL8°C og LD4°C) uttrykte *IFNa* med verdier over 0,0006, men det var statistisk signifikant forskjell mellom inkubatorene (A) og større standardavvik. Genene *MDA5*, *STAT-1* og *ISG15* var nest mest

## Resultater

utrykt (0,0003-0,0004), etterfulgt av *IFNc* og *Mx*, der uttrykket var to til tre ganger lavere sammenliknet med førstnevnte. *TLR7*, *TLR3* og *PKR* var minst utrykt ved 488 dg med verdier på  $<0,0001$ .

### 3.1.2 Relativt genuttrykk ( $\bar{R}$ ) av antivirale gener ved 848 døgngader

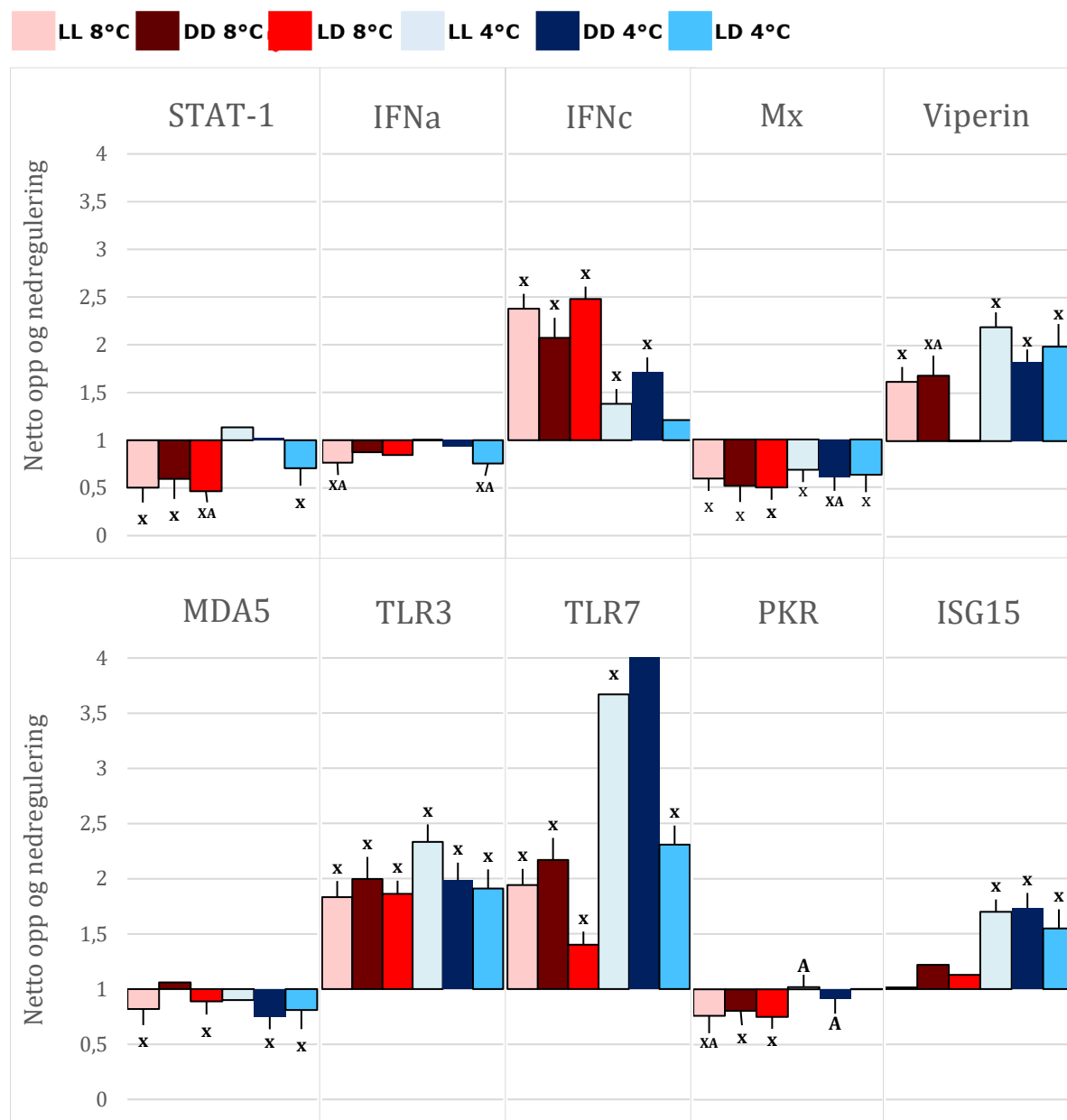


**Figur 8: Relativt genuttrykk av STAT-1, IFNa, IFNc, Mx, viperin, MDA5, TLR7, TLR3, PKR og ISG15 etter 848 døgngader (omkring startfôring).** Figuren viser det gjennomsnittlige relative uttrykket til yngelen ved startfôring + standardavvik ( $\bar{R} - STD, \bar{R} + STD$ ). Hver søyle representerer en lys og temperaturgruppe, Y-aksen representerer ( $\bar{R}$ ) verdien. ( $\bar{R}$ ) for alle lys og temperaturgruppene er beregnet etter  $2^{-\Delta Ct}$  metoden og er normalisert mot referansegenene. Grupper med statistisk signifikant forskjell mellom inkubatorer er merket med stor bokstav «A». LL: Kontinuerlig lys; DD: Kontinuerlig mørke; LD: Naturlig lys.

## Resultater

Det relative genuttrykket ved 848 dg (Figur 10) viste at *IFNa* var relativt høyt uttrykt hos lakseyngel i alle lys- og temperaturgruppene ved startfôring. *IFNa* hadde størst uttrykk av alle genene, med verdier på mellom 0,0004-0,0006. ISG15 var nest mest uttrykt blant yngelen med verdier på ca 0,0004 i alle gruppene. Videre kom det relative uttrykket av viperin (0,0003-0,0004), etterfulgt av *STAT-1* *MDA5* og *IFNc* (0,0002-0,0003). *TLR7*, *TLR3*, *Mx* og *PKR* var minst uttrykt hos yngelen ved 848 dg, som sett hos plommeseekkyngelen ved 488dg (<0,0001).

## 3.1.3 Ontogenetisk endring av ekspresjon (488 – 848 døgngrader)



**Figur 9: Ontogenetisk opp- og nedregulering av STAT-1, IFNa, IFNc, Mx, viperin, MDA5, TLR7, TLR3, PKR og ISG15.** Figuren viser opp- og nedregulering (fold change) av det antivirale genuttrykket hos fisk ved startfôring i forhold til fisk rett etter klekking. Hver søyle på x-aksen representerer en lys- og temperaturgruppe ved startfôring, sammenlignet med tilsvarende gruppe rett etter klekking (akseverdi 1). Y-aksen representerer gjennomsnittlig «fold change» verdi (Netto opp- og nedregulering). Statistisk signifikante opp- eller nedreguleringer ( $p < 0,05$ ) er markert med «x». Utrekninger som inkluderer grupper med statistisk signifikant variasjon mellom inkubatorer, er merket med stor bokstav «A». LL: Kontinuerlig lys; DD: Kontinuerlig mørke; LD: Naturlig lys.

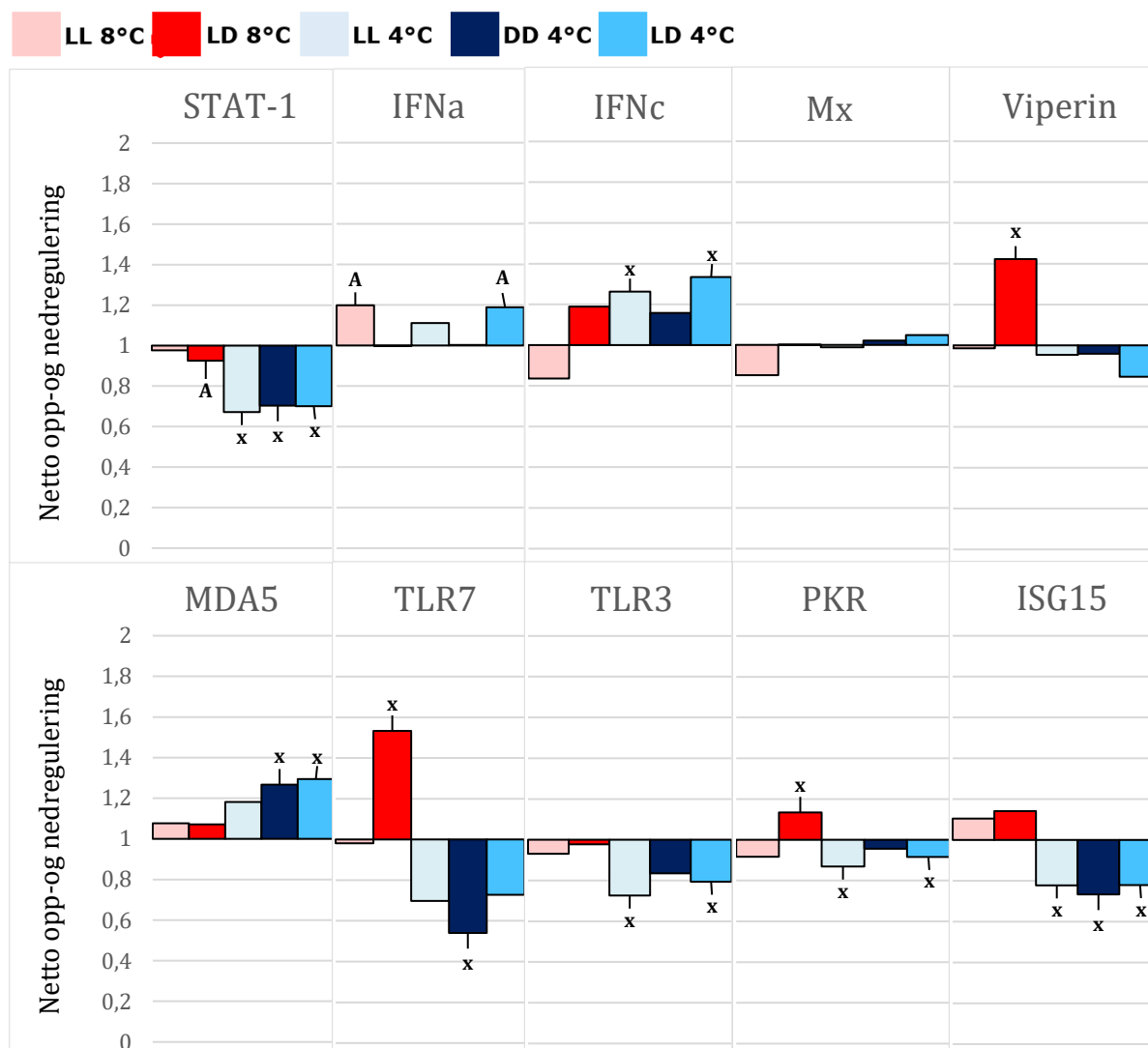
## Resultater

Ekspressjonen av *IFNa* forble uendret hos yngelen fra 488 dg – 848 dg i flertallet av lys- og temperaturgruppene (Figur 11). *IFNa* var signifikant nedregulert ca 24% hos yngelen i gruppene LL8°C og LD4°C. Gruppene med yngel viste nedregulert *IFNa* ekspresjon, men hadde signifikante forskjeller mellom inkubatorene. I 4°C-gruppene hadde uttrykket av *ISG15* signifikant økt ved 848 dg. *IFNc*, *TLR7*, *TLR3* og *viperin*. var mest oppregulert i lakseyngelen fra 488 dg - 848 dg. Lakseyngel holdt i ulike lysregimer ved 8°C (LL8°C, DD8°C, LD8°C), utrykte ved 848 dg mer *IFNc* mRNA (+100-140%) enn ved 488 dg i tilsvarende lys- og temperaturgrupper (LL8°C, DD8°C, LD8°C). Utrykket av *TLR7* hos lakseyngel i gruppene LL4°C og DD4°C hadde om lag tredoblet seg (+250-360%) ved 848 dg fra 488 dg. Utrykket av *TLR3* var ved 848 dg fordoblet hos lakseyngel i alle lys- og temperaturgruppene, som tilsvarte en økning på +100%. *Viperin*, *STAT-1*, *Mx*, *MDA5* og *PKR* var ved 848 dg signifikant nedregulert hos lakseyngel i de fleste lys- og temperaturgruppene. *STAT-1* var nedregulert i stor grad (-50%) hos lakseyngel holdt ved 8°C, mens uttrykket av *Mx* var omtrent halvert (-50%) i alle lys- og temperaturgruppene.

### 3.2 Effekt av lys- og temperatur på antiviralt genuttrykk

For å undersøke effekten av ulike lys- og temperaturregimer på antiviral genekspressjon hos lakseyngel ved 488 og 848 dg, ble lakseyngelen i gruppene LL8°C, LD8°C, LL4°C, DD4°C, LD4°C sammenliknet mot yngel i gruppen holdt på kontinuerlig mørke ved 8°C (DD8°C). Det ble også undersøkt om det var signifikante forskjeller i det antivirale genuttrykket hos lakseyngel som stod ved lavere temperatur (4°C) sammenliknet med 8°C (hypotermisk effekt). Effekten av lys og temperatur er presentert som opp- eller nedregulering av et gen i forhold til en respektiv kontrollgruppe («fold change») (Tabell 9). Resultatene fra plommeseckkyngel ved 488 dg er presentert i figur 12 og figur 13. Resultatene fra lakseyngel prøvetatt etter 848 dg er presentert i figur 14 og figur 15.

### 3.2.1 Effekt av ulike lys- og temperatureregimer mot kontroll gruppe DD8°C ved 488 døgngader



**Figur 10: Effekt av ulike lys og temperatureregimer på genuttrykket av STAT-1, IFNa, IFNc, Mx, viperin, MDA5, TLR7, TLR3, PKR og ISG15 ved 488 døgngader (rett etter klekking).** Figuren viser opp- og nedregulering (Fold change) av genuttrykket hos plommeseekyngel i de ulike lys- og temperaturgruppene, mot kontrollgruppen kontinuerlig mørke 8°C (DD8°C) (akseverdi 1). Hver søyle på x-aksen representerer en lys- og temperaturgruppe. Y-aksen representerer gjennomsnittlig «fold change» verdi (Netto opp- og nedregulering). Statistisk signifikante opp- eller nedreguleringer ( $p < 0,05$ ) er markert med «x». Utrekninger som inkluderer grupper med statistisk signifikant variasjon mellom inkubatorer, er merket med stor bokstav «A». LL: Kontinuerlig lys; DD: Kontinuerlig mørke; LD: Naturlig lys.

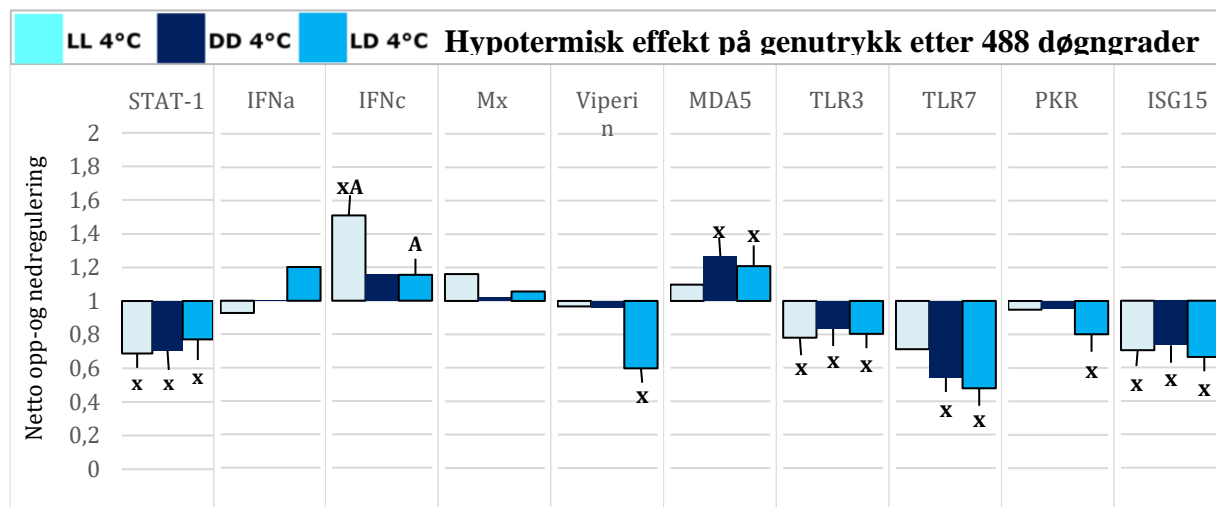
Resultatene i figur 12 viser at plommeseekyngel i gruppene LD8°C og LL8°C hadde få signifikante opp- eller nedregulerte genuttrykk sammenliknet mot kontrollgruppen (DD8°C). Plommeseekyngelen i gruppen LD8°C oppregulerte uttrykket av 3/10 gener: *TLR7* (+53%)



## Resultater

*Viperin* (+42%), og *PKR* (+13%). Gruppen hadde ingen statistisk signifikante nedregulerte uttrykk. *IFNc* var signifikant oppregulert i gruppene LL4°C (+18%) og LD4°C (+33%), *MDA5* hos laks i gruppene DD4°C (+26%) og LD4°C (29%). Utrykket av *Mx* og *IFNa* hadde ingen endringer i uttrykk av signifikans. Signifikante nedreguleringer ble observert av følgende gener i gruppene: *TLR3* (ca -20%) (LL4°C, LD4°C), *TLR7* (-53%) (DD4°C), *ISG15* (ca -20%) (LL4°C, DD°C, LD4°C), *STAT-1* (ca -30%) (LL4°C, DD°C, LD4°C) og *PKR* (10-15%) (LL4°C, LD4°).

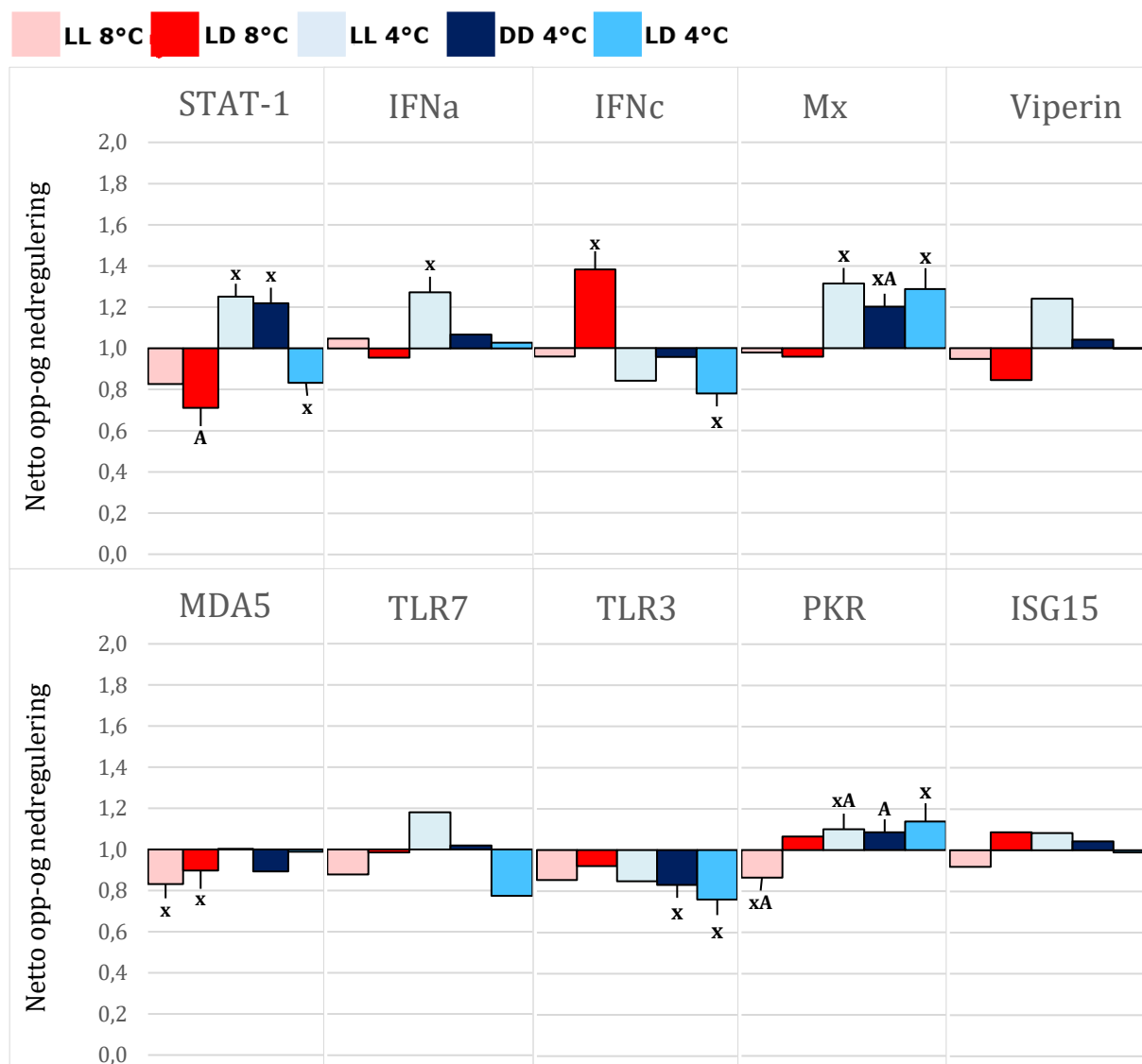
### 3.2.2 Effekt av lavere temperatur på genuttrykk ved 488 døgngader



**Figur 11: Hypotermisk effekt på STAT-1, IFNa, IFNc, Mx, viperin, MDA5, TLR7, TLR3, PKR og ISG15 ved 488 døgngader.** Søylediagrammet viser opp- og nedregulering (fold change) av genuttrykket hos yngel i gruppene LL4°C, LD4°C og DD4°C, sammenliknet med gruppene LL8°C, LD8°C og DD8°C. Hver søyle på x-aksen representerer en lysgruppe på 4°C. Y-aksen representerer gjennomsnittlig «fold change» verdi (Netto opp- og nedregulering). Statistisk signifikante opp eller nedreguleringer ( $p < 0,05$ ) er markert med «x». Utrekninger som inkluderer grupper med statistisk signifikant variasjon mellom inkubatorer, er merket med stor bokstav «A». LL: Kontinuerlig lys; DD: Kontinuerlig mørke; LD: Naturlig lys.

Figur 13 viser forskjellen i det antivirale genuttrykket mellom plommeseekkyngel (488 dg) holdt ved 4°C og plommeseekkyngel holdt ved 8°C. Negativ hypotermisk effekt kan sees på uttrykket av *ISG15* og *STAT-1*, som var signifikant nedregulert hos plommeseekkyngel i alle lysgruppene (-30-35%). Utrykket av de toll-liknende reseptorene *TLR3* og *TLR7* var også nedregulert hos plommeseekkyngelen i alle lysgruppene. *TLR3* var nedregulert med ca -20%, og *TLR7* rundt -50%. Positiv hypotermisk effekt ble observert hos få lysgrupper ved 488 dg. *MDA5* var signifikant oppregulert i lysgruppene DD4°C (26%) og LD4°C (20%). *IFNc* var signifikant oppregulert +51% i lysgruppen LL ved 4°C. Utrykket av *PKR*, *Mx*, *IFNa* hadde ingen endringer i genuttrykk av signifikans..

### 3.2.3 Effekt av ulike lys- og temperaturregimer mot kontroll gruppe DD8°C ved 848 døgngader

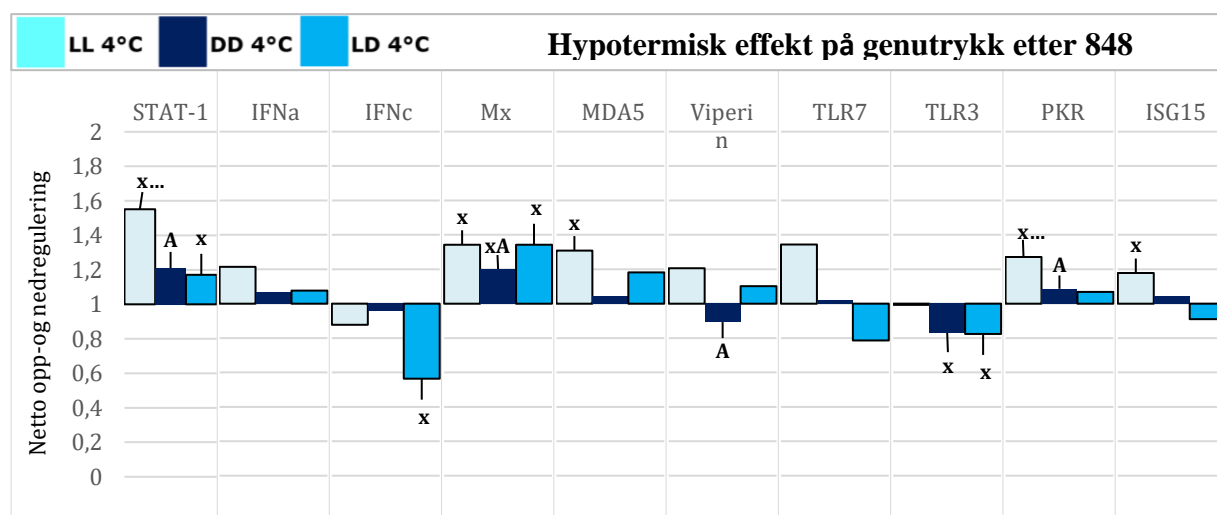


**Figur 12: Effekt av ulike lys og temperaturregimer på genuttrykket av STAT-1, IFNa, IFNc, Mx, viperin, MDA5, TLR7, TLR3, PKR og ISG15 ved 848 døgngader (ved startfôring).** Figuren viser opp- og nedregulering (fold change) av genuttrykket hos yngel i de ulike lys og temperaturgruppene mot kontrollgruppen kontinuerlig mørke 8°C (DD°C). Hver søyle på x-aksen representerer en lys- og temperaturgruppe. Y-aksen representerer gjennomsnittlig «fold change» verdi (Netto opp- og nedregulering). Statistisk signifikante opp eller nedreguleringer ( $p < 0,05$ ) er markert med «x». Utrekninger som inkluderer grupper med statistisk signifikant variasjon mellom inkubatorer, er merket med stor bokstav «A». LL: Kontinuerlig lys; DD: Kontinuerlig mørke; LD: Naturlig lys.

## Resultater

Sammenliknet mot lakseyngel i gruppen DD8°C, var et stort antall gener hos lakseyngel i gruppen LL4°C oppregulert (Figur 14): *IFNa* (+27%), *STAT-1* (+25%), *Mx* (+31%) og *PKR* (+10%). Gruppen hadde ingen statistisk signifikante nedregulerte uttrykk. *Mx* var også signifikant oppregulert hos lakseyngel i gruppene LD4°C (+29%) og DD4°C (+20%), *PKR* i gruppe LD4°C (+14%) og *IFNc* i LD8°C (+38%). Genuttrykket av *TLR7*, *viperin* og *ISG15* hadde ingen endringer i uttrykk av signifikans. Nedreguleringer ble observert av følgende gener i gruppene: *TLR3* (DD4°C, LD4°C), *MDA5* (LL8°C, LD8°C), *IFNc* (LD8°C).

### 3.2.4 Effekt av lavere temperatur på genuttrykk ved 848 døgngader



**Figur 13: Hypotermisk effekt på *STAT-1*, *IFNa*, *IFNc*, *Mx*, *viperin*, *MDA5*, *TLR7*, *TLR3*, *PKR* og *ISG15* ved 488 døgngader (ved startfôring).** Søylediagrammet viser opp- og nedregulering (fold change) av genuttrykket hos yngel i gruppene LL4°C, LD4°C og DD4°C, sammenliknet med gruppene LL8°C, LD8°C og DD8°C. Hver søyle på x-aksen representerer en lysgruppe på 4 °C. Y-aksen representerer gjennomsnittlig «fold change» verdi (Netto opp- og nedregulering). Statistisk signifikante opp eller nedreguleringer ( $p < 0,05$ ) er markert med «x». Utrekninger som inkluderer grupper med statistisk signifikant variasjon mellom inkubatorer, er merket med stor bokstav «A». LL: Kontinuerlig lys; DD: Kontinuerlig mørke; LD: Naturlig lys.

Resultatene i figur 15 viser at lakseyngelen som ble holdt på lavere temperatur (4°C) ved 848 dg viste liten reduksjon i antiviralt genuttrykk, sammenliknet med yngel holdt ved 8°C. Utrykket av *IFNc* var redusert med -40% lysgruppen LD4°C i forhold til LD8°C. Ekspresjonen av *TLR3* var hos yngelen redusert med ca -20% i lysgruppene LD°C, og DD4°C. Hos

lakseyngel i flere lysgrupper var genuttrykket av *STAT-1* (20-80%) og *Mx* (+20-40%) oppregulert. Hos lakseyngel som sto på kontinuerlig lys (LL) ved 4°C, var halvparten av genene (5/10) signifikant oppregulerte. Genuttrykket av *STAT-1* hadde økt med +55%, *Mx* (+34%), *PKR* (+27%), *MDA5* (+20%) og *ISG15* (+17%). Ingen av genuttrykkene i lysgruppen LL4°C var nedregulert i forhold til LL8°C.

## 4 Diskusjon

Plommeseekkyngel av laks (488 dg) og lakseyngel (848 dg) ble brukt til qPCR for å undersøke genekspressjon og tidlig utvikling (ontogeni) av *MDA5*, *TLR3*, *TLR7*, *IFN $\alpha$* , *IFN $\gamma$* , *Mx*, *viperin*, *ISG15*, *STAT-1* og *PKR*. Det ble også undersøkt hvilke gener som var induserte/aktive (og nedregulerte) ved endret lys-styring og redusert temperatur. Dette kan gi et innspill på om dagens mest vanlige behandling av atlantisk laks («norsk standard») er fornuftig eller ikke. I tillegg kan det belyse om lys- og temperatur kan ha signifikant effekt på ekspresjonen antivirale immungener.

### 4.1 Mangler og feil ved metode

QPCR er en veldig sensitiv metode og det er usikkerheter rundt metoden må man ta til orde for. Vasking og isolering av RNA må gjøres grundig og nøye. Tillaging av cDNA kan påvirkes av flere faktorer som innvirker på mengden cDNA i prøven. Det kan være degradering av RNA og cDNA som en konsekvens av tid tilbrakt ikke på is/ved romtemperatur og opptining/nedfrysing. Pipetterings-teknikk og nøyaktighet er en determinerende faktor i alle ledd ved metoden. Man må også være obs på at det ikke bestandig er en direkte proporsjonalitet mellom mengde RNA og protein. Normalisering av Ct-verdiene mot referansegener er en god metode, for å korrigere prøver med ulik mengde cDNA. I analysen ble duplikatverdier med differanse >0,05 fjernet, dvs. at noen gjennomsnittlige genuttrykk ved analyse inkluderte grupper med mindre enn 18 fisk (- en eller fler). 18 Fisk per gruppe er et solid antall, og frafall av en fisk eller to vil sannsynligvis ikke ha vært av stor signifikant betydning. Videre

introduserer korrigerende av Ct-verdier mot primereffektivitet usikkerhet rundt verdiene dersom amplifikasjonsverdien ikke bestemmes presist. *TLR7* var primerparet, som ga store duplikatforskjeller og flere plater med samme prøver måtte kjøres med *TLR7* primere opptil 3 ganger. Ved test av amplifikasjonseffektivitet hadde *TLR7* kurven lavest korrelasjonskoeffisient (0,971). Det er da høyest usikkerhet rundt Ct-verdiene til prøvene kjørt på *TLR7* primere. Sannsynligheten for å finne signifikans øker noe ved bruk av T-test på flere grupper per test. Det er midlertid tydelige mønstre i resultatene og ikke enkeltobservasjoner som blir ilagt hovedfokus i diskusjon og konklusjon.

## 4.2 Relativt genuttrykk ved 488 døgngader (rett etter klekking)

### 4.2.1 Antivirale reseptorer: *TLR3*, *TLR7* og *MDA5* (488 døgngader)

Av normaliserte Ct-verdier fra qPCR ble det beregnet relativt genuttrykk, med den hensikt å undersøke ekspresjonen av ulike antivirale gener hos laks på tidlige livsstadier (488 dg og 848 dg). *TLR3*, *TLR7* og *MDA5* er reseptorer, som kan gjenkjenne viralt ssRNA og dsRNA (Chang, 2011; Palti, 2011). Det relative genuttrykket av *TLR 3*, *TLR7* og *MDA5* hos plommeseekkyngel av laks (488 dg), viste at *MDA5* utryktes 8-10 ganger enn *TLR3* og *TLR7* (Figur 9). Dette indikerer at *MDA5* er en primær antiviral reseptor hos laks rett etter klekking. Forskjellen i verdi mellom *MDA5*, *TLR3* og *TLR7* var stor og verdiene utrykt av *TLR3* og *TLR7* minimale ( $<0,0001$ ). Observasjonen kan bety at viral rekognisjon hos laks ved 488 dg hovedsakelig foregår via reseptorfamilien RLR. *MDA5* utryktes også mer enn *TLR3* i sebrafisk-larver holdt ved optimaltemperatur (Figur 4) (Dios, 2010). RIG-I er i tillegg påvist hos sebrafisk 24–36 timer etter fertilisering (Chen N.S., 2017) noe som gjør tilstedeværelse av RLR i tidlige livsstadier hos laksen mer troverdig.

### 4.2.2 Interferoner: *IFNa* og *IFNc* (488 døgngader)

Teorien om at *MDA5* er en mer aktiv antiviral reseptor enn *TLR3* og *TLR7* hos plommeseekkyngel ved 488 dg, ble styrket ved at *IFNa* var mer utrykt enn *IFNc* (Figur 9).

Ekspresjonen av *IFNa* var omtrent 5-5,5 ganger høyere enn *IFNc*. *IFNa* induseres hovedsakelig via RIG-I/MDA5 og i moderate mengder av TLR3. *IFNc* induseres via TLR7/TLR22 (Svingerud T., 2017). Resultatene gjør det plausibelt å påstå *IFNa* er det primære og mest aktivt transkriberte interferonet hos plommeseekkyngel av laks rett etter klekking.

### **4.2.3 Interferon induserbare gener: *Mx*, *Viperin* og *ISG15* og transkripsjonsfaktorene *STAT-1* og *PKR* (488 døgngader)**

Plommeseekkyngelen uttrykte *ISG15* mest av de interferoninduserbare genene (ISG) ved 488 dg (Figur 9). *ISG15* var i enkelte lys- og temperaturgrupper uttrykt dobbelt så mye som *viperin* og to til tre ganger mer enn *Mx*. Resultatet kan bety at *ISG15* er det mest aktive ISG hos laks rett etter klekking. *ISG15* er kjent for å være et av de mest utrykte ISG bl.a. hos voksen sebrafisk (Langevin C., 2013). En annen teori kan være at *IFNa* favoriserer induksjon av *ISG15* sammenliknet med *Mx* og *viperin*. *ISG15* ble indusert i større grad enn *viperin* og *Mx* ved injeksjon av *IFNa* plasmid i laksemuskel (Figur 2 A/B) (Chang J-C. R. C., 2014). *ISG15* induksjon hos mennesker skjer hovedsakelig via *IFNa/b* (Jeon Joo-Y., 2010). *ISG15* induksjon via *IFNa/b* er også påvist hos atlantisk laks og sebrafisk (Røkenes P. T., 2007; Langevin C., 2013).

Høyt uttrykk av *ISG15* trigger «ISGylering» av cellulære proteiner i sebrafisk. Det som er interessant er at ISGylerte proteiner beskytter celler mot RNA og DNA virus. I tillegg har ISGylerte faktorer nøkkelroller i reguleringen av antiviral respons hos sebrafisk. ISGylerte faktorer ga positiv induksjon av IFN type I, *Viperin* og reseptoren RIG-I på mRNA nivå hos sebrafisk (Langevin C., 2013). Hos mennesker og mus er MDA5, RIG-1, *Mx*, *PKR* og *STAT-1/JAK1* aktive mål for ISGylering (Jeon Joo-Y., 2010). At uttrykket av *ISG15* var høyt hos laks ved 488 dg kan være av stor betydning for regulering av antiviral immunitet i fisken. Det er mulig at *ISG15* er nødvendig for å opprettholde et basalt nivå av *IFN*-gener og *viperin* transkripter, på samme måte som hos sebrafisken (Langevin C., 2013).

Utrykket av *STAT-1* var markant (21x) høyere enn *PKR* hos plommeseekkyngelen ved 488 dg (Figur 9). Resultatet gir mening da *STAT-1* viderefører signaler fra interferoner og regulerer

transkripsjon av ISG (Skjesol, 2010). PKR er et interferon-induserbart antiviralt «våpen» og øker i uttrykk når interferonnivået øker ved en virusinfeksjon (Liu, 2011).

### 4.3 Relativt genuttrykk ved 848 døgngader (rundt startfôring)

#### 4.3.1 Antivirale reseptorer: *TLR3*, *TLR7* og *MDA5* (848 døgngader)

Ved 848 dg var *MDA5* reseptoren med høyest relativt genuttrykk hos lakseyngelen (Figur 10). At *MDA5* utryktes mest av reseptorene også hos laks ved startfôring (som rett etter klekking), styrker teorien om at *MDA5* kan være en primær antiviral reseptor. *MDA5* kan ha viktigere funksjoner og gi en kraftigere respons mot virus enn *TLR3* og *TLR7*. *MDA5* har vist seg å indukere sterkere interferonresponser hos voksen gresskarpe (*Ctenopharyngodon idella*) enn f.eks Rig-I (Wan Q., 2017). Det må midlertidig tas til konsiderasjon at *TLR3* og *TLR7* transkripsjon induseres av IFN $\alpha$  og IFN $\beta$  (*TLR3*). Dvs. uttrykket av reseptorene øker ved virale infeksjoner (Robertsen, 2003; Chang, 2011). Et kontinuerlig høyt uttrykk av *MDA5* gir kanskje vedvarende beskyttelse mot virale infeksjoner hos laks, mens viral TLR-respons er mer induksjons-avhengig. *MDA5* finnes også i alle celler, mens *TLR7* opererer i lymfoide celler (Robertsen, 2003). Det virker derfor logisk at *MDA5* uttrykkes i større mengder. *MDA5* induksjon av IFN $\alpha$ , har kanskje flere viktige formål enn bekjempelse av virus ved en viral infeksjon (Chang J-C. R. C., 2014). IFN $\alpha$  induserer (som nevnt tidligere) ISG15 i laks, mens ISGylerte proteiner er viktige for reguleringen av antivirale medfødte transkripter hos sebrafisk (Langevin C., 2013).

#### 4.3.2 Interferoner: *IFN $\alpha$* og *IFN $\beta$* (848 døgngader)

*IFN $\alpha$*  var hos laks ved uttrykt av interferonene (Figur 10). Utrykket av *IFN $\alpha$*  var to til tre ganger høyere enn *IFN $\beta$* , som gir mening da *MDA5* var mer uttrykt hos laks ved startfôring enn *TLR3* og *TLR7*. Det kan virke som at *IFN $\alpha$*  er det primært utrykte interferonet både hos laks rett etter klekking og ved startfôring



### 4.3.3 Interferon induserbare gener: *Mx*, *Viperin* og *ISG15* og transkripsjonsfaktorene *STAT-1* og *PKR* (848 døgngader)

Lakseyngelen utrykte ved 848 dg primært de interferoninduserbare genene *viperin* og *ISG15* (Figur 10). Forskjellen i ekspresjon mellom *viperin* og *ISG15* var marginale (tilnærmet like). Ettersom at *MDA5* og *viperin* utryktes mer enn *Mx*, oppstår spørsmålet hvorvidt *ISG15* og *viperin* kan ha viktigere funksjoner enn *Mx*. *Viperin* er lite studert i fisk, men har hos mennesker og mus i tillegg til å bekjempe virus, demonstrert flere viktige funksjoner. *Viperin* kan bl.a. ha en rolle i og mediere TLR7 og TLR9 induksjon av IFN $\alpha$  i dendritiske celler, samt regulere utvikling og aktivering av T-celler (Seo, 2011). Det kan være at *Mx* er viktigere i perioden mellom 488- og 848 dg hos lakseyngel, men dette er ukjent. Hos sebrafisk var ekspresjonen av *Mx* lav tidlig i ontogenesen (rundt klekking), før uttrykket økte i stor grad frem til 20 dager etter fertilisering, der uttrykket ble nedregulert igjen (Villamizar, 2011). Det kan også være at *Mx* er induksjonsavhengig, dvs. at uttrykket øker ved virale infeksjoner (Dios, 2010). Genuttrykket av transkripsjonsfaktoren *STAT-1* var som forventet uttrykt i større grad enn *PKR* ved 848 dg. Det samme ble observert hos plommeseekkyngel ved 488 dg.

## 4.4 Ontogenetisk utvikling av genuttrykk hos laks fra 488 - 848 døgngader

### 4.4.1 Antivirale reseptorer: *TLR3*, *TLR7* og *MDA5* (488 - 848 døgngader)

Ontogenetisk utvikling (Figur 11) forteller noe om endringen i genuttrykket fra laksen var 488 dg til den var 848 dg (rett etter klekking - rundt startfôring). Laks ved 848 dg hadde i liten, men signifikant grad nedregulert ekspresjonen av *MDA5* (-10-25%). *MDA5* var mest uttrykt av reseptorene i begge livsstadiene og er trolig en viktig antiviral reseptor. Utrykket av *TLR3* og *TLR7* var ved 848 dg signifikant oppregulert. Ekspresjonen av *TLR3* økte med gjennomsnittlig +100%. Genuttrykket av *TLR7* hadde signifikant økte verdier tilsvarende +100-300%. Oppreguleringen indikerer at *TLR3* og *TLR7* ikke utryktes maksimalt ved 488 dg hos laksen. Det betyr at plommeseekkyngel av laks kan ha svekket antiviral TLR-induksjon av interferoner. Hvorvidt oppreguleringen av *TLR3* og *TLR7* ved startfôring hadde sammenheng med

utviklingen av lymfoide immunologiske organer kan det spekuleres i. TLR7 hos atlantisk laks opererer i lymfoide celler, som hodenyre og milt (Robertsen, 2003). Regnbueørret er ikke immunokompetent før 14 dager etter klekking (Heinecke R.D., 2014). Det er mulig at plommeseckkyngelen ved 488 dg manglet funksjonelle lymfoide celler i signifikant grad. Det må tas til konsiderasjon at den voldsomme økningen på 300% av *TLR7* skiller seg ut, og kan skyldes feil med *TLR7* primer i metode.

### **4.4.2 Interferoner: *IFNa* og *IFNc* (488 - 848 døgngader)**

Ekspresjonen av *IFNa* var uendret ved 848 dg hos yngelen i 4/6 lys- og temperaturgrupper (Figur 11). Det betyr at *IFNa* var uttrykt i tilnærmet lik grad hos laks rundt 848 dg, som hos laks ved 488 dg. Resultatet samsvarer godt med at nedreguleringen i ekspresjon av *MDA5* også var liten. Nedreguleringen av *MDA5* var midlertidig til stede, som kan bety at *MDA5* induksjon av *IFNa* ble kompensert for med moderat induksjon av *IFNa* via TLR3 (Robertsen, 2003). *IFNc* var oppregulert signifikant i stor grad hos laks ved 848 dg. *IFNc* er som TLR7 blitt observert i stor grad i lymfoide organer som hodenyre og milt hos laks (Robertsen, 2003; Chang J-C. R. C., 2014). Man kan forestille seg at ekspresjon av *TLR7* og induksjon av *IFNc* hos lakseyngel, kan ha en sammenheng med utvikling av lymfoide organer. Oppregulering i ekspresjon av *IFNc* og *TLR7* hos laks ved 848 dg samsvarer teoretisk bra, da *TLR7* hovedsakelig induserer *IFNc* og lymfoide iorganer kan regnes som ferdig utviklet på dette stadiet (Robertsen, 2003; Heinecke R.D., 2014).

### **4.4.3 Interferon induserbare gener: *Mx*, *Viperin* og *ISG15* og transkripsjonsfaktorene *STAT-1* og *PKR* (488 - 848 døgngader)**

*ISG15* og *viperin* var oppregulerte ISG i lakseyngel ved 848 dg. Utrykket av *ISG15* hadde økt utelukkende hos laks i lysgruppene holdt ved 4°C (Figur 11). En mulig forklaring kan være at *ISG15* ekspresjon hos laks nedreguleres, som følge av lavere temperatur (4°C) i plommeseckstadiet (488 dg). Ekspresjonen av genet når kanskje ikke et tilstrekkelig nivå før senere i ontogenesen ved 4°C (f.eks. ved startfôring). *Viperin* var mest oppregulert av de ulike ISG. Det er grunn til å tro at ekspresjonen av *viperin* øker mellom livsstadiene hos laksen i 5/6

lys- og temperaturgrupper (foruten LD8°C) fordi den er en viktig medfødt antiviral komponent. Det er mulig at viperin har flere viktige funksjoner i immunforsvaret til laks, f.eks. i spesifikk immunitet som hos mus (Seo, 2011). Ved startfôring (848 dg) kan det regnes med at laksen har et ferdigutviklet spesifikt immunforsvar. Hos regnbueørret er ekspresjon av spesifikke immungener moderate rett etter klekking, men øker i større grad fra larven er 670 døgngader (Heinecke R.D., 2014). Dersom *viperin* er viktig i regulering av T-celler, gir det mening at uttrykket økte rundt startfôring. Nedregulert genekspresjon av *Mx*, *STAT-1*, *PKR* og *MDA5* kan også skyldes at det spesifikke immunforsvaret hos laks er ferdigutviklet ved 848 dg (Heinecke R.D., 2014). Behovet for medfødte antivirale komponenter kan tenkes å være noe redusert når spesifikke immunitet har nådd full aktivitet.

### **4.5 Effekt av ulike lys- og temperaturregimer på genuttrykk ved 488 døgngader (rett etter klekking)**

#### **4.5.1 Effekt av lys- og temperatur på ekspresjon ved 488 døgngader.**

Det ble undersøkt om plommeseekkyngel av laks (488 dg) holdt på ulike lys- og temperaturregimer uttrykte antivirale gener i mer eller mindre grad, enn plommeseekkyngel holdt på kontinuerlig mørke ved 8°C (DD8°C) (figur 12). Plommeseekkyngel holdt ved 8°C på naturlig lys (LD8°C) uttrykte *TLR7*, *Viperin* og *PKR* i signifikant høyere grad enn DD8°C. Det ble ikke observert nedregulerte gener hos yngel i gruppen LD8°C, eller signifikante endringer i genuttrykket hos plommeseekkyngel på kontinuerlig lys ved 8°C (LL8°C). Signifikante endringer av genuttrykk ble hovedsakelig observert hos plommeseekkyngel holdt på ulike lysregimer ved 4°C (LL4°C, DD°C, LD4°C). Dette funnet diskuteres ytterligere i avsnittet om hypotermisk effekt på genekspresjon ved 488 dg.

Basert på observerte opp- og nedreguleringer av genuttrykk i forhold til DD8°C ved 488 dg, kan det være at lys- og temperatur hadde en effekt. Hvorvidt det var lys eller temperatur som var den avgjørende faktoren kan diskuteres. Endringen i genuttrykk var minimal hos plommeseekkyngel holdt ved lik temperatur (8°C), men på andre lysregimer enn kontrollen (LD8°C, LL8°C). Lysregimet virket ikke å ha stor effekt på genuttrykket uten

temperaturforandring. Det kan belyses at yngelen holdt på simulert naturlig lys uttrykte mer *TLR7*, *viperin* og *PKR* ved 8°C. Om resultatet har en sammenheng med effekt av lys tidlig i embryogenesen kan spekuleres i. Noen klokkegener avhenger av at fisken eksponeres for lys eller en variasjon av lys og mørke, som hos sebrafisk (Frøland, 2019). Standardavvikene mellom laks i gruppen LD8°C var midlertidig større, og *TLR7* hadde mest usikre Ct-verdier. Det kan ha bidratt til de signifikante økningene sett i LD8°C. På bakgrunn av resultatene virker det fornuftig å holde plommeseckkyngel av laks på kontinuerlig mørke ved 8°C, men simulert naturlig lys og 8°C ga et noe høyere genuttrykk.

### 4.5.2 Hypotermisk effekt på ekspresjon ved 488 døgngader.

Hypotermisk effekt vil si endring av genuttrykk, som følger av lavere temperatur. Endring i genuttrykk ble undersøkt mellom laks på holdt på samme lysregimer, men ved to ulike temperaturer (hhv. 4°C og 8°C) (Figur 13). Hoved observasjonen var at *TLR3*, *TLR7*, *ISG15*, *viperin*, *PKR* og *STAT-1* var signifikant nedregulert i minst en lysgruppe. Resultatet indikerer at medfødt antiviral immunitet var svekket hos plommeseckkyngel holdt ved 4°C. De nedregulerte antivirale mekanismene inkluderte evne til rekognisjon (TLR3 og TLR7), mediering av signaler (STAT-1) og interaksjon (ISG15, Viperin, PKR). Laks, som fra fertilisering fram til klekking ble holdt ved 4°C, var kanskje mer sårbare for viral infeksjon.

Funnene er ikke overraskende da negativ hypotermisk effekt på ontogenetisk utvikling er observert hos andre fiskearter. Sebrafisk-larver eksponert for lav temperatur viste også redusert genuttrykk av antivirale gener rett etter klekking (Figur 4) (Zhang Q., 2018; Dios, 2010). Komplement-aktivitet og fagocytose var dessuten redusert hos regnbueørret ved lav temperatur (Nikoskelainen, Bylund, & Lilius, 2004). En annen interessant observasjon er at 6/10 gener var signifikant nedregulert hos plommeseckkyngel som sto på naturlig lys (LD4°C). Studerer man midlertidig ontogenetisk utvikling (figur 12) ser man at nedreguleringen av *TLR7*, *Viperin* og *PKR* i gruppen LD4°C skyldes økt differanse, som følger av at *viperin* og *TLR7* var oppregulert hos yngel i gruppen LD8°C. 3/10 nedregulerte gener hos yngel i gruppen LD4°C kan derfor være temperatur-induserte, 4/10 ved kontinuerlig mørke (DD4°C) og 3/10 ved kontinuerlig lys (LL4°C).

I teorien er det antatt at den embryoniske cellulære klokken kan påvirkes av temperatur (Frøland, 2019; Kaneko, 2005). Økt dødelighet er hos flere marine arter blitt knyttet ulike lysregimer (Villamizar, 2011; Zhang Q., 2018; Cerquiera, 1991) og stressresponser er registrert hos laksefisk ved lysskifter (Noble, 2018). Forskjellen mellom LL og lysregimene LD og DD er i all hovedsak eksponering til mørke og bl.a. vil nivået av melatonin variere (Downing, 2001). Forskjellen i genuttrykk hos yngelen holdt ved 4°C var minimal mellom ulike lysregimer (+-1 gen). Det virker som at endringen av genuttrykket i all hovedsak skyldes lavere temperatur.

Videre er det med bakgrunn i dødelighet og evne til å tilegne seg fôr påstått at villaks og oppdrettslaks, er like temperatur-tolerante i larvestadiet (Solberg M.F., 2016). Resultatene motstrider at antiviral immunrespons hos plommeseekkyngel i oppdrett, er adaptert til kaldere temperaturer ved 488 dg. Om nedreguleringen av genuttrykket er av signifikant betydning for plommeseekkyngel av laks ved viruseksponering i praksis er ukjent. Nedreguleringen av genuttrykket ved 4°C gir god indikasjon, på at dagens temperatur-standard (8°C) er et mer fornuftig valg for laks i plommeseekkestadiet (rett etter klekking).

## **4.6 Effekt av ulike lys- og temperaturregimer på genuttrykk ved 848 døgngader (rundt startfôring)**

### **4.6.1 Effekt av lys- og temperatur på ekspresjon ved 848 døgngader.**

Det ble undersøkt om det var fornuftig å holde lakseyngel ved 848 dg på kontinuerlig mørke ved 8°C (DD8°C) (Figur 14). Genuttrykket hos lakseyngel i gruppene: LD8°C, LL8°C LD4°C, LL4°C LD4°C ble sammenliknet mot DD8°C. Få signifikant opp- eller nedregulerte gener ble observert i lysgruppene LD8°C, LL8°C, som stod på lik temperatur som DD8°C (8°C) (Figur 14). Signifikante endringer i genuttrykket ble observert hos lakseyngel i lysgruppene holdt ved ulik temperatur (LL4°C, LD4°C, DD4°C). Tilsvarende mønster ble observert hos laks rett etter klekking (Figur 11), men hos laks ved startfôring var genuttrykkene i 4°C-gruppene nedregulerte og ikke oppregulerte. Ved 848 dg virket det ikke som at ulike lysregimer forårsaket signifikante endringer i genuttrykk hos lakseyngel holdt ved lik temperatur (8°C), men at ulik temperatur forårsaket endring i større grad. Noe interessant med observasjonen er at tilsvarende

observasjon ble gjort hos plommeseekkyngel ved 488 dg. Lakseyngelen i gruppe LL4°C hadde ved 848 dg oppregulert flest antivirale immungener sammenliknet mot DD8°C. I tillegg hadde LL4°C ingen signifikante nedreguleringer. Kontinuerlig lys og 4°C kan ha bidratt til noe økt antiviral immunitet hos laks ved 848 dg sammenliknet med dagens standard. Hvorvidt oppreguleringen er positiv eller er en kompensasjon for nedregulert spesifikk immunitet kan diskuteres. Observasjonen av temperatur-induserte endringer diskuteres ytterligere i neste avsnitt om hypotermisk effekt på genekspressjon ved 848 døgngader.

### 4.6.2 Hypotermisk effekt på ekspressjon ved 848 døgngader.

I undersøkelsen av hypotermisk effekt på antiviral genekspressjon hos lakseyngel ved 848 dg, ble laks holdt på samme lysregimer, men ved to ulike temperaturer (4°C og 8°C) sammenliknet (Figur 15, Tabell 9). Halvparten av genene: *STAT-1*, *Mx*, *MDA5*, *PKR* og *ISG15* var oppregulert i minst en lysgruppe ved 4°C sammenliknet med 8°C. *TLR3* var hos laks ved startfôring nedregulert ved 4°C, *TLR3* var også nedregulert rett etter klekking. Genuttrykket av *TLR3* hos laks virker påvirket negativt av lavere temperatur. Utrykket av *IFNA*, *IFNc*, *TLR7* og *viperin* var uendret i to eller ingen lysgrupper. Lakseyngelen som stod på kontinuerlig lys (LL4°C) skilte seg ut, da halvparten av genene var oppregulert sammenliknet mot lakseyngel i gruppen LL8°C. Hos lakseyngel i gruppen LL4°C var *MDA5*, *Mx*, *ISG15*, *PKR* og *STAT-1* oppregulerte.

Trenden var at flere antivirale gener var oppregulert hos lakseyngel holdt ved 4°C. Plommeseekkyngel ved 488 dg hadde nedregulerte genuttrykk ved 4°C. En mulig teori er at noen antivirale gener nedreguleres hos plommeseekkyngel ved 4°C, men har adaptert til lavere temperatur rundt startfôring. Teorien samsvarer godt med uttrykket av *ISG15*, som var nedregulert hos lakseyngel ved 4°C og 488 dg. Ved 848 dg ble ontogenetisk oppregulering av *ISG15* observert hos laks holdt på lysregimer ved 4°C (Figur 11). Studerer man den ontogenetiske utviklingen av genuttrykket fra 488 dg – 848 dg litt nærmere (Figur 11), ser man at *MDA5*, *Mx*, *STAT-1* og *PKR*, var signifikant nedregulerte gener hos laks ved 848 dg og at de var nedregulert i størst grad hos 8°C gruppene. *STAT-1* og *PKR* var kun nedregulert hos lakseyngel holdt ved 8°C (Figur 11). Det betyr at det totale relative genuttrykket til lakseyngelen var redusert ved 8°C. Differanseverdien mellom de relative genuttrykkene til lakseyngel holdt på like lysregimer, men ved 4°C og 8°C, økte bl.a. fordi 8°C -lysgruppene var

nedregulert (Figur 11). Tidligere ble det nevnt at den ontogenetiske nedreguleringen kan skyldes ferdigutvikling av det spesifikke immunforsvaret rundt startfôring (Heinecke R.D., 2014) og at medfødt immunitet nedprioriteres. Hypotermisk oppregulering hos lakseyngelen (Figur 15) kan skyldes nedregulert genuttrykk ved 8°C, kombinert med temperatur-indusert økning av genuttrykk ved 4°C. Et nytt spørsmål som oppstår er hvorfor det relative genuttrykket av *MDA5*, *Mx*, *STAT-1* og *PKR* hos lakseyngel holdt ved 8°C var mer nedregulert enn ved 4°C.

En mulig teori er at lavere temperatur forsinket utvikling eller begrenset funksjon av det spesifikke immunforsvaret hos lakseyngelen. Det kan tenkes at fisken responderer ved å opprettholde eller øke medfødt antiviral genekspressjon ved 4°C for å kompensere. Flere studier viser at spesifikk immunitet svekkes ved lave temperaturer og det er et anerkjent fenomen (Morvan, 1998; Abram, 2017; Lorenzen N., 2010). I sebrafisk mutanter som manglet spesifikk immunitet, observerte man at mutantene kompenserte ved å tilegne seg en medfødt antiviral «alert state». Fisken hadde bl.a. økt ekspresjonen av interferon-relaterte gener (Garcia-Valtanen P., 2017). Det er også interessant at lakseyngel i lysgruppen LL4°C signifikant hadde oppregulert flere antivirale gener (5/10) enn LD4°C (2/10) og DD°C (1/10). Det er et tilfelle hvor lys virker å ha hatt effekt på genuttrykket. En mulighet er at kontinuerlig lys svekker/forsinker utvikling av spesifikk immunitet mer enn andre lysregimer. Lange kontinuerlige fotoperioder er vist å innvirke negativt på cellulære immunkomponenter hos dyr (Esteban, 2016).

## 4.7 Oppsummering

Samlet sett viste det relative genuttrykket hos laks ved 488- og 848 dg at *MDA5* er en primært uttrykt antiviral reseptor hos laks tidlig i ontogenesen. *MDA5* induserer *IFNa* syntese, som var det mest utrykte interferonet ved begge livsstadiene (Figur 9, Figur 10). *ISG15*, som induseres av *IFNa* var mer utrykt enn *viperin* og *Mx* ved 488 dg (Figur 9) og det er mulig at *IFNa* favoriserer *ISG15* induksjon. *ISG15* «ISGylerer» proteiner som spiller flere viktige roller i immunforsvaret hos bl.a. sebrafisk. *ISG15* og *viperin* var ved 848 dg uttrykt i tilnærmet lik grad (Figur 10). *Viperin* kan ha viktige funksjoner innen spesifikk immunitet hos laks, som regnes å

## Diskusjon

være ferdigutviklet rundt startfôring. *STAT-1* ble uttrykt i stor grad både hos lakseyngel ved 488- og 848 dg. Ontogenetisk endring i relativt genuttrykk fra 488 – 848 dg viste at *TLR3*, *TLR7*, *IFNc* og *viperin* hadde økt i stor grad hos lakseyngelen ved 848 dg (Figur 11). Hovedteorien bak ontogenetisk oppregulering av *TLR3*, *TLR7*, *IFNc* og *viperin* var at lymfoide celler ferdigutvikles til å bli funksjonelle på et tidspunkt etter 488 dg i ontogenesen.

Felles mønstre hos plommeseekkyngel ved 488 dg og lakseyngel rundt 848 dg ble observert i undersøkelsen på effekter av lys- og temperatur, der yngel holdt ved DD8°C ble brukt som kontrollgruppe. Yngel i naturlig- og kontinuerlig lys hadde endret genuttrykket i liten grad ved 8°C. Signifikante endringer av genuttrykket ble observert hos yngel i lysgrupper som stod ved ulik temperatur (4°C) (Figur 12, Figur 14). Lavere temperatur kan ha hatt effekt på ekspresjonen av antivirale gener hos laks ved 488- og 848 dg.

I undersøkelsen av hypotermisk effekt på ekspresjon hos plommeseekkyngel (488 dg), ble det observert signifikante nedreguleringer av følgende genuttrykk i lysgruppene: *TLR7* (DD), *TLR3* (LL, DD, LD), *ISG15* (LL, DD, LD) og *STAT-1* (LL, DD, LD) (Figur 13). Observasjonen indikerer at antiviral immunitet var svekket hos plommeseekkyngelen holdt ved 4°C sammenliknet med 8°C. Differansen i antall nedregulerte gener mellom de ulike lysregimene var liten (+1). Det virket ikke som at lysregimet hadde effekt på resultatet. Resultatene underbygger at 8°C er den mest fornuftige temperaturen for laks rett etter klekking.

I undersøkelsen av hypotermisk effekt på genuttrykk hos lakseyngel (rundt 848 dg) ble det observert signifikante oppreguleringer av følgende genuttrykk i lysgruppene: *MDA5* (LL), *ISG15* (LL), *PKR* (LL), *STAT-1* (LL, LD) og *Mx* (LL, DD, LD) (Figur 15). Lakseyngel i gruppen LL4°C skilte seg ut, og hadde økt ekspresjon av (5/10) gener sammenliknet med LL8°C. Observasjonen skyldes trolig nedregulering av relativt genuttrykk hos lakseyngel holdt ved 8°C, kombinert med lys- og/eller temperatur-indusert oppregulering ved 4°C. Oppreguleringen kan ha vært på bekostning av at spesifikk immunitet var svekket eller ufullstendig utviklet, som følger av lys- og/eller temperatur. På bakgrunn av dette kan man ikke med sikkerhet si at det var mer fornuftig å holde lakseyngel rundt startfôring på kontinuerlig lys ved 4°C, til tross for oppreguleringen.



## 5 Konklusjoner

- Hos atlantisk laks rett etter klekking (484 dg) og ved startfôring (848 dg) var *MDA5* uttrykt mest av de undersøkte antivirale reseptorene. *IFNa* var det mest utrykte interferonet. Mest utrykt av ISG var *ISG15* ved 488 dg og *ISG15* og *viperin* ved 848 dg. *STAT-1* var mest utrykt av transkripsjonsfaktorene.
- Ekspresjon av *TLR3*, *TLR7*, *IFNc* og *viperin* var oppregulert hos laksen fra 488dg – 848 dg. Det virker som at transkripsjonen av *TLR3*, *TLR7*, *IFNc* og *viperin* begynte å øke ved et tidspunkt etter 488 dg i ontogenesen.
- Felles for laks ved 488- og 848 dg var at tre eller færre gener var signifikant opp- eller nedregulert i gruppene LL8°C og LD8°C, sammenliknet mot gruppen DD8°C. Signifikante endringer ble hovedsakelig observert hos plommeseekkyngel og lakseyngel i grupper holdt ved ulike temperaturer: LD4°C, LL4°C, DD4°C.
- Plommeseekkyngel (rett etter klekking) holdt ved 4°C hadde signifikant nedregulert ekspresjon av *TLR3*, *TLR7*, *ISG15*, *viperin*, *STAT-1* og *PKR* i minst en lysgruppe, sammenliknet med plommeseekkyngel holdt ved 8°C. Plommeseekkyngel i gruppen LD4°C hadde nedregulert 6/10 gener, DD4°C 4/10 gener og LL4°C 3/10 gener. Forandringene virker å være temperatur induserte.
- Lakseyngel (rundt startfôring) hadde signifikant oppregulert ekspresjon av *MDA5*, *Mx*, *ISG15*, *PKR* og *STAT-1* i lysgrupper holdt ved 4°C sammenliknet med lakseyngel holdt ved 8°C. Lakseyngel i gruppen LL4°C hadde oppregulert 5/10 genuttrykk, LD4°C (2/10) og DD4°C (1/10). Oppreguleringen skyldes delvis at lakseyngel holdt på lysregimer ved 8°C nedregulerte totalt relativt genuttrykk. De kan også skyldes lys- og temperatur induserte faktorer.
- Det virker som at lavere temperatur (4°C) og lys kan ha hatt effekt på medfødt antiviral genekspressjon ved 488- og 848 dg. Dagens norske standard er fornuftig for hold av oppdrettslaks ved 488 dg og rundt 848 dg, men naturlig lys ved 8°C kan ha gitt noe økt ekspresjon hos laks ved 488 dg

## 6 Referanser

- Abbas K. A., L. A. (2014). *Basic immunology: Functions and Disorders of the immune system 4th ed.* Elsevier Inc.
- Abram, H. Q. (2017). Impacts of Low Temperature on the Teleost Immune System.
- Berge, Å. I. (1995). Development of salinity tolerance in underyearling smolts of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) reared under different photoperiods. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 52, pp. 243-251.
- Castillo A., S. C. (1993). Ontogeny of IgM and IgM-bearing cells in rainbow trout. *Dev comp immunology* (5), pp. 419-424.
- Cerquiera, V. C. (1991). Photoperiodic effects on the growth and feeding rhythm of European sea bass, *Dicentrarchus labrax*, larvae in intensive rearing. *LARVI'91*, pp. 304-306.
- Chang J-C. (2016). *Atlantic salmon type I interferons: Protection against virus infection in vivo and function as adjuvants in a virus DNA vaccine.* Universitetet i Tromsø (UiT).
- Chang J-C., R. C. (2014). Protection of Atlantic salmon against virus infection by intramuscular injection of IFN $\alpha$  expression plasmid. *Vaccine: Vol 32 (36)*, pp. 4695-4702.
- Chang, M. C. (2011, Aug). Expression and Functional Characterization of the RIG-I-Like Receptors MDA5 and LGP2 in Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Journal of Virology; 85(16)*, pp. 8403-8412.
- Chen N.S., Z. F. (2017). Retinoic acid-inducible gene I (RIG-I)-like receptors (RLRs) in fish: current knowledge and future perspectives. *Immunology* 151(1), pp. 16-25.
- Dahle, K. M. (2019). Antiviral defense in salmonids - Mission made possible? *Fish and shellfish immunology: 87*, pp. 421-437.
- Dalmo, A. R. (2005). Ontogeny of the fish immune system. *Fish & Shellfish Immunology: 19*, p. 2.
- Dekens, M. W. (2008). Autonomous onset of the circadian clock in the zebrafish embryo. *EMBO J. 27*, pp. 2757-2765.
- Dios, S. R. (2010). Effect of the temperature during antiviral immune response ontogeny in teleosts. *Fish & Shellfish Immunology*, pp. 1019 -1027.
- Downing, G. L. (2001). The effect of light intensity on growth of larval haddock. *N.Am.J. Aquat. 61*, pp. 135-140.
- Ebbesson, L. O. (2008). Daily endocrine profiles in parr and smolt Atlantic salmon. *Comparative Biochemistry and Physiology a-Molecular & Integrative Physiology* 151,, pp. 698-704.
- Esteban, A. Â. (2016). Effect of photoperiod on the fish innate immune system: A link between fish pineal gland and the immune system. *Journal of pineal reasearch ; 41*, pp. 261-266.

## Referanser

- Falcòn, J. B. (2010). Pineal Photoreception and Temporal Physiology in Fish. In E. P. Kulczykowska, *BIOLOGICAL CLOCK IN FISH* (pp. 9-35). Science Publishers: CRC Press, Taylor & Francis Group.
- Frøland, I. W. (2019). Circadian clocks in fish, what have we learned so far? *Biology (Basel)*.
- García-Valtanen P., M.-L. A.-M.-B.-G.-V.-M. (2017). Zebra Fish Lacking Adaptive Immunity Acquire an Antiviral Alert State Characterized by Upregulated Gene Expression of Apoptosis, Multigene families, and Interferon-Related Genes. *Front. Immunol.*8:121.
- Gothilf, Y. C. (1999). Zebrafish serotonin N-acetyltransferase-2: Marker for development of pineal photoreceptors and circadian clock function. . *Endocrinology* 140,, pp. 4895-4903.
- Griffiths A. J. F., W. S. (2015). *INTRODUCTION TO GENETIC ANALYSIS 11TH EDITION*. W.H. Freeman & Company.
- Heggberget T.G. (2011, April). Timing of Spawning in Norwegian Atlantic Salmon (*Salmo salar*). *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*.
- Heinecke R.D., C. J. (2014). Adaptive and innate immune molecules in developing rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* eggs and larvae: Expression of genes and occurrence of effector molecules. *Fish & Shellfish Immunology* 38 (1).
- Hjeltnes, B. (2018). Fiskehelse rapporten 2018. pp. 4-5.
- Jensen, A. J. (1989). Temperature Requirements in Atlantic Salmon (*Salmo salar*), Brown Trout (*Salmo trutta*), and Arctic Char (*Salvelinus alpinus*) from Hatching to Initial Feeding Compared with Geographic Distribution.
- Jeon Joo-Y., Y. M.-H.-C. (2010). ISG15 and immune diseases. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis.*1802:(5), pp. 485-496.
- Jørgensen, B. J. (2014). The Innate Immune Response in Fish. 1-11.
- Kaneko, M. C. (2005). Light-Dependent Development of Circadian Gene Expression in Transgenic Zebrafish. *PLoS Biol* 3(2): e34, pp. 1-2.
- Kubista, M. S. (2007). The prime technique. *GIT Lab J* 9-10, pp. 33-35.
- Langevin C., V. d.-P. (2013). Zebrafish ISG15 Exerts a Strong Antiviral Activity against RNA and DNA Viruses and Regulates the Interferon Response. *Journal of Virology*: 87 (18), pp. 10025-10036.
- Liam S, H. C. (2004). Development and maturation of the immune system in zebrafish, *Danio rerio*: a gene expression profiling, in situ hybridization and immunological study. *Developmental & Comparative immunology*: Vol 28, pp. 9-28.
- Liu, T.-K. Z.-B.-F. (2011, Dec). Cooperative Roles of Fish Protein Kinase Containing Z-DNA Binding Domains and Double-Stranded RNA-Dependent Protein Kinase in Interferon-Mediated Antiviral Response. *Journal of Virology*; 85(23), pp. 12769-12780.
- Livak K.J., S. T. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>(-DeltaDelta C(T))</sup> method. *Methods*:25, pp. 402-408.

## Referanser

- Lorenzen N., L. E.-J.-. (2010). Temperature effects on vaccine induced immunity to viruses in fish. *8th International Symposium on Virus of Lower Vertebrates*. DTU Orbit.
- Magnadóttir B. (2006). Innate immunity of fish (overview). *Fish & Shellfish Immunology: Vol 20, 1* 2, pp. 137-151.
- Magnadóttir B., G. S. (2005). Ontogeny og humoral immune parameters in fish . *Fish & Shellfish immunology* .
- Montero R., H. C. (2019). Dawn to Dusk: Diurnal Rythm of the Immune Response in Rainbow Trout (*Onchorynkus Mykiss*). *Biology 9 (1)*.
- Moore L. J., J. J. (2018). Atlantic salmon adapted to seawater for 9 weeks develop a robust immune response to salmonid alphavirus upon bath challenge. *Fish & Shellfish Immunology* , pp. Vol: 74, 573-583.
- Mork, O. I. (1994). Vertical activity of four salmonid species in response to changes between darkness and two intensities of light. *Aquaculture 127(4)*., pp. 317-328.
- Morvan, L. C. (1998). DIFFERENTIAL EFFECTS OF TEMPERATURE ON SPECIFIC AND NONSPECIFIC IMMUNE DEFENCES IN FISH. *The Journal of Experimental Biology 201*, pp. 165-168.
- Nikoskelainen, S., Bylund, G., & Lilius, E. (2004). Effect of enviromental temperature on rainbow trout (*Onchorynkus mykiss* innate immunity. *Dev. Comp. Immunol.*, pp. 581-592.
- Noble, C. N. (2018). *Velferdsindikatorer for oppdrettslaks: Hvordan vurdere og dokumentere fiskevelferd*. Nofima.
- Palti, Y. (2011). Toll-like receptors in bony fish: from genomics to function. *Developmental, and Comparative Immunolgy 35*, pp. 1263-1272.
- Poynter S & Dixon B. (2017). Bony Fish Immunology. *Reference Module in Life Sciences, Elsevier*, pp. 2-4.
- Press, C. E. (1999). The morphology of the immune system in teleost fishes. *Fish & shellfish immunology, 9(4)*, pp. 309-318.
- Robertsen, B. B. (2003). Atlantic salmon interferon genes: cloning, sequence analysis, expression and biological activity. . *J Interferon Cytokine Res 23:*, pp. 601-12.
- Røkenes P. T., L. R. (2007). Atlantic salmon ISG15: Expression and conjugation to cellular proteins in response to interferon, double stranded RNA virus and infections. *Molecular Immunology : Vol 44 (5)*, pp. 950-959.
- Schmittgen T.C., L. K. (2008). Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. . *Nat Protoc*, pp. 1101-1108.
- Seo, J.-Y. Y. (2011). Viperin: A Multifunctional, Interferon-Inducible Protein that Regulates Virus Replication. *Cell Host & Microbe: Vol 10 (6)*, pp. 534-539.
- Skjesol, A. H.-Y. (2010). Structural and functional studies of STAT1 from Atlantic salmon (*Salmo Salar*). *BMC Immunology 11:17*.

## Referanser

- Solberg M.F., D. L. (2016). Thermal plasticity in farmed, wild and hybrid Atlantic salmon during early development: has domestication caused divergence in low temperature tolerance. *BMC Evolutionary Biology*.
- Sommerset I. (2019). *Fiskehelse rapporten 2019*. Veterinærinstituttet.
- Steindal, I. A. (2019). Circadian clocks in fish, what have we learned so far? *Biology (Basel)*.
- Sun, B. B. (2009, April). Identification of an Atlantic salmon IFN multigene cluster encoding three IFN subtypes with very different expression properties. *Developmental and comparative immunology* 33:, pp. 547-558.
- Svingerud T., S. T.-T. (2017, September 25). Atlantic Salmon Type 1 IFN Subtypes Show Differences in Antiviral Activity and Cell-Depe. *The Journal of Immunology*, pp. 2-12.
- Tatner, F. M. (1983). The ontogeny of cellular immunity in the rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson, in relation to the stage of development of the lymphoid organs. *Developmental & Comparative Immunology*, pp. 69-75.
- Varela, M. F. (2017). Modelling viral infections using zebrafish: Innate immune response and antiviral research . *Antiviral Research*, pp. 59-68.
- Villamizar, N. D.-V.-V. (2011, Mai). Effects of light during early larval development of some aquacultured teleosts: A review. *Aquaculture*, pp. 2-8.
- Wan Q., Y. C. (2017). MDA5 Induces a Stronger Interferon Response than RIG-I to GCRV Infection through a Mechanism Involving the Phosphorylation and Dimerization of IRF3 and IRF7 in CIK cells. *Frontiers in Immunology*.
- Ytteborg E., B. G. (2010). Molecular pathology of vertebral deformities in hyperthermic Atlantic salmon (*Salmo Salar*). *BMC Physiology*, pp. 10,12.
- Zapata A, G. C. (2008). Immunology. In N. K. Finn R, *Fish larval physiology* (pp. 573-605). Enfield, NH, USA: Science Publishers,.
- Zhang Q., K. M. (2018). Low incubation temperature during early development negatively affects survival and related innate immune processes in zebrafish larvae exposed to lipopolysaccharide. *Scientific reports* 8: 4142.

## Appendix I

Tabell 11 viser gjennomsnittlige Ct-verdier (rådata) for plommeseekyngel og lakseyngel i lys- og temperaturgruppene tatt ved 488 dg (RNA uttak 6/RNA6) og ca 848 dg (RNA uttak 8 /RNA8)

Tabell 10: Tabellen viser en forklaring på individ markering «Fisk ID». Fisken er merket etter inkubator nummeret den ble holdt (1-18), individ (A-F) og hvilket tidspunkt for prøveuttak (RNA6 eller RNA8).

Eksempel: Fisk ID	Inkubator Nr:	Individ (A-F)	Uttak (6 eller 8)
11D6	11	D	RNA 6 (488 dg)
2A8	2	A	RNA 8 (ca 848 dg)

Tabell 11: Gjennomsnittlige Ct-verdier for plommeseekyngel (488dg) og lakseyngel (rundt 848 dg).

FISK ID	Ef1-a	B-actin	S18	MDA5	IFNa	IFNc	TLR3	TLR7	Mx	Viperin	STAT-1	PKR	ISG15
11D6	19,915	18,218	7,3877	26,896	28,047	30,761	29,663	34,367	26,369	30,121	28,06	27,544	30,328
18F6	19,782	18,405	7,7828	26,38	28,488	29,97	29,829	33,571	26,405	29,744	27,822	27,574	29,921
10F6	19,963	17,744	7,8916	26,554	28,362	30,092	29,936	31,795	25,928	29,056	28,275	27,397	29,62
18E6	19,946	18,198	7,5716	26,495	28,622	30,758			26,635	29,702	28,654	27,51	30,234
10E6	20,018	18,243	7,6799	26,447	28,794	30,926	29,983		26,203	29,184	28,174	27,5	30,129
5F6	20,051	18,26	7,5119	26,513	28,511	29,617	30,086	34,092	26,52	30,152	28,064	27,589	30,636
18D8	20,761	18,478	7,7236	26,846	29,127	30,761	29,028	32,676	26,874	29,508	27,999	27,697	29,787
17D6	19,979	18,166	7,7037	26,372	28,311	29,67	30,091	33,313	26,634	30,273	28,297	27,636	30,403
6D6	20,244	18,406	7,9268	26,776	28,151	30,342	30,787	34,061	26,624	29,49	28,886	27,858	30,296
18E8	21,217	18,718	7,81	27,211	28,612	30,611	29,273	31,228	27,304	29,038	29,122	27,899	29,628
17E6	20,071	18,345	7,5262	26,525	28,614	29,708	29,991	33,192	26,523	30,066	28,694	27,823	30,287
6E6	20,611	18,521	8,3354	27,197	27,518	29,118	29,652	30,364	26,617	28,475	28,425	27,983	29,622
18F8	20,735	17,886	7,4796	26,756	29,508	30,723	28,976	32,339	26,577	28,973	28,148	27,574	29,39
17F6	19,792	17,895	7,4946	26,114	27,648	29,27	29,214	31,393	25,759	28,513	27,754	27,28	29,044
6F6	19,608	17,958	6,8337	26,45	28,247	30,568	29,769	34,359	26,175	29,581	28,216	27,362	29,901
7A6	19,846	18,023	7,5548	26,758	27,931	30,398	29,551		26,323	29,317	27,697	27,699	29,994
18D6	20,278	18,42	8,056	26,745	28,273	30,091	30,373	33,846	26,506	29,754	28,485	27,895	30,229
10D6	19,948	18,276	7,5843	26,62	28,149	30,17	29,812	34,367	26,03	29,995	28,047	27,541	30,619
6B6	19,974	18,348	8,0391	26,981	28,087	30,452	30,355		27,095	29,643	28,686	28,029	29,594
12A6	19,84	18,109	7,5711	26,504	28,047	30,172	30,22	33,441	26,996	29,978	28,418	27,701	30,111
17C6	19,586	17,969	7,3282	26,381	27,615	28,981	29,512	32,229	26,175	29,2	27,864	27,347	29,039
5E6	18,702	16,95	7,0139	25,583	27,137	28,515	29,17	31,619	25,345	28,151	26,658	26,474	28,369
16F6	20,055	18,48	7,4694	27,042	28,033	30,864	30,483	34,524	26,844	29,869	28,817	27,817	30,122
6A6	19,601	17,852	7,119	26,499	26,989	29,42	29,715	31,542	26,546	28,358	27,96	27,614	29,198
11C6	18,895	17,288	6,9534	25,873	27,707	29,583	29,131	32,98	25,526	29,246	27,374	26,955	29,027
17B6	19,568	17,887	7,5548	26,485	27,576	29,827	29,754	32,834	26,369	29,615	28,292	27,667	29,747
5D6	19,688	18,014	7,4141	26,531	28,033	29,574	30,066	31,61	26,412	29,319	28,307	27,639	29,538
16E6	19,083	17,651	6,885	26,251	27,56	29,207	29,538	31,986	25,696	29,334	27,492	27,08	29,198
5C6	19,853	18,369	7,6138	26,843	28,271	30,726	30,298	33,064	26,895	30,249	28,589	27,856	30,231

## Appendix

FISK ID	<i>Ef1-a</i>	<i>B-actin</i>	<i>S18</i>	<i>MDA5</i>	<i>IFNa</i>	<i>IFNc</i>	<i>TLR3</i>	<i>TLR7</i>	<i>Mx</i>	<i>Viperin</i>	<i>STAT-1</i>	<i>PKR</i>	<i>ISG15</i>
11B6	19,63	17,822	7,4896	26,423	28,111	29,728	29,508	33,848	26,081	28,981	27,954	27,386	29,518
17A6	20,178	18,331	8,18	27,076	27,851	29,719	30,16	31,77	26,704	28,946	28,64	28,013	29,461
4F6	20,08	18,487	7,5658	27,159	28,577	30,72	30,615	32,98	27,11	30,414	28,8	28,06	30,215
16D6	19,712	17,902	7,7967	26,413	27,438	30,002	29,849	32,212	26,44	29,557	28,209	27,763	29,7
5B6	20,424	18,394	7,9218	26,957	28,618	30,304	30,286	34,438	26,726	29,692	28,729	27,886	30,712
11A6	20,664	18,449	7,7007	27,048	27,851	29,862	29,725	31,164	26,836	28,724	28,874	27,814	30,005
16C6	20,636	18,556	8,4615	27,062	28,341	30,54			27,173	30,002	29,007	27,977	30,495
4E6	20,073	18,182	7,9562	26,74	28,673	29,782	29,974	33,85	26,174	29,169	28,007	27,634	29,836
12F6	20,405	18,598	8,2187	27,239	28,563	31,312	30,317	34,685	27,171	30,258	29,83	27,958	31,006
5A6	20,337	18,194	8,3287	26,54	28,459	30,484	29,914	32,661	26,356	29,295	28,365	27,807	29,993
10C6	19,202	16,923	8,1514	25,113	27,524	28,557	28,68	30,88	25,438	27,86	26,829	26,71	28,952
16B6	20,375	18,102	8,284	26,582	28,884	29,922	29,587	30,872	26,758	28,839	28,569	28,034	29,724
4D6	20,934	18,538	8,6838	27,171	29,253	30,513	30,688	33,469	26,852	29,501	29,062	28,576	30,798
12E6	21,016	18,719	9,0695	27,327	30,183	30,995	31,102	33,609	27,515	30,217	29,622	28,566	31,503
4C6	20,041	18,351	7,1692	26,852	28,949	30,395	29,6	31,313	26,567	28,971	28,484	27,893	30,068
10B6	19,731	17,836	7,2095	26,543	28,929	30,249	29,559	32,836	26,52	28,866	28,255	27,776	29,682
16A6	19,803	17,932	7,6397	26,42	28,621	30,053	29,65		26,084	29,447	28,094	27,666	30,341
18C6	19,501	17,624	7,3417	26,245	28,179	30,165	29,461	34,122	26,246	29,697	27,757	27,55	29,759
12D6	20,065	18,268	7,6036	27,069	29,377	31,077	30,31	33,789	26,814	29,632	28,775	27,992	30,647
4B6	20,102	18,546	7,6933	27,181	29,555	30,166	30,152	31,524	27,045	29,242	28,878	28,168	30,05
10A6	19,797	18,069	7,5728	26,692	28,963	30,471	30,049	32,879	26,708	29,096	28,365	27,708	29,714
12C6	20,318	18,437	8,1275	26,981	29,262	29,962	29,968	32,331	26,986	29,29	28,394	28,081	29,971
18B6	19,953	18,375	7,6454	27,051	29,361	30,714	30,05	33,023	26,762	29,499	28,588	27,902	30,25
11F6	19,5	17,883	7,8008	26,707	28,886	30,707	29,839	34,621	26,597	29,231	28,419	27,431	30,438
4A6	19,625	18,161	7,2633	26,536	28,793	29,891	30,094	32,745	26,235	29,855	28,283	27,838	29,512
6C6	20,021	18,44	7,9101	27,088	29,694	30,763	30,205	32,862	27,034	29,566	29,121	28,025	30,033
12B6	20,256	18,553	7,751	27,161	28,873	29,48	29,944	30,945	26,879	28,966	28,694	28,118	29,291
18A6	19,873	18,228	7,7643	26,743	29,296	29,535	30,201	30,113	26,441	29,833	28,541	27,843	29,833
11E6	19,788	18,258	7,8441	26,681	28,902	29,95	29,968	33,684	26,435	29,602	28,317	27,607	29,56
6E8	21,192	18,683	7,3992	27,397	27,978	29,299	28,834	30,382	27,025	27,928	28,14	27,932	28,287
12D8	20,982	18,892	7,4092	27,523	28,506	29,443	29	30,182	27,653	28,075	28,963	28,24	28,394
17F8	20,566	18,283	7,3097	26,971	28,916	30,548	28,855	32,231	27,467	29,129	28,417	27,694	29,019
2A6	20,566	18,381	8,6894	27,088	28,44	30,79	30,424	33,238	26,762	29,335	27,842	27,894	29,276
6D8	20,897	18,496	7,3664	27,065	28,758	29,6	29,001	30,751	27,014	27,816	27,777	27,684	28,153
11F8	20,468	18,182	6,7391	26,52	28,702	30,347	28,97	31,25	26,672	27,848	27,64	27,365	28,266
17E8	20,957	18,44	7,696	26,912	28,86	30,478	29,105	30,614	27,134	28,955	28,076	27,68	28,825
15F6	19,891	17,929	7,6417	26,905	27,897	29,796	29,942	30,614	26,631	28,055	27,282	27,397	28,826
1F6	19,694	17,619	8,3542	26,503	28,47	32,076	30		27,632	30,769	27,698	28,186	29,547
5F8	20,992	18,802	7,524	27,486	28,804	29,758	28,909	30,548	27,049	28,183	27,939	27,792	28,867
11E8	20,928	18,74	7,4452	27,539	28,469	28,974	29,042	29,581	27,63	27,555	29,043	28,067	28,113
17D8	21,203	18,693	7,2626	27,742	29,017	30,475	29,276	30,899	27,858	28,999	29,035	28,178	29,411
15E6	19,904	17,888	7,6856	26,933	27,921	29,399	29,983	30,738	26,573	28,505	27,459	27,322	29,213
1E6	19,754	17,905	7,4891	27,134	28,274		30,39	32,578	27,591	30,461	28,394	28,034	29,72
5E8	21,829	19,395	8,0678	28,109	28,88	30,848	29,507	30,5	28,128	28,806	29,362	28,71	29,655
11D8	20,925	18,654	7,5228	27,242	27,735	29,394	28,644	29,572	27,57	27,841	28,873	27,839	28,795
16F8	20,364	17,91	7,2644	26,939	29,271	29,574	29,606	32,149	26,966	27,851	28,512	27,34	29,183
15D6	20,348	18,287	8,3007	27,409	28,052	30,536	30,767	31,324	26,954	29,287	27,961	27,907	29,925
1D6	20,964	18,687	9,45	27,964	28,734	32,943	30,971	32,399	28,3	30,5	29,33	29,485	30,369
5D8	21,281	18,875	7,9224	27,445	29,317	30,744	29,628	31,563	27,715	28,734	29,106	28,274	29,555
10F8	21,222	19,005	7,9173	28,008	29,897	31,406	29,901	32,028	28,247	29,651	29,827	28,709	30,363
16E8	20,765	18,185	7,546	27,045	28,875	30,311	28,99	32,269	27,266	29,194	29,261	27,519	29,799
15C6	19,917	17,815	8,0146	26,857	28,798	30,381	30,014	32,778	26,633	29,885	28,494	27,385	30,328
1C6	20,498	18,562	9,1384	27,464	29,122	31,453	31,083	32,729	27,399	29,75	28,731	28,343	30,299
4E8	21,499	19,222	8,0705	27,599	28,969	31,082	28,923	30,579	27,491	28,267	29,04	28,187	29,59
10D8	21,16	18,974	8,3017	27,794	29,556	31,436	29,542	30,611	27,552	29,828	28,974	28,5	29,879
12F8	21,101	19,032	7,9827	27,617	29,084	30,233	29,355	30,82	27,791	28,792	29,413	28,074	29,598

## Appendix

<b>FISK ID</b>	<b>Ef1-a</b>	<b>B-actin</b>	<b>S18</b>	<b>MDA5</b>	<b>IFNa</b>	<b>IFNc</b>	<b>TLR3</b>	<b>TLR7</b>	<b>Mx</b>	<b>Viperin</b>	<b>STAT-1</b>	<b>PKR</b>	<b>ISG15</b>
15A6	20,32	17,898	8,0334	26,938	28,326	30,495	29,89	31,018	26,447	28,945	27,843	27,155	29,781
1A6	20,778	19,111	9,9797	28,123	29,229		31,087	33,287	28,129	30,89	28,598	29,322	30,784
4F8	21,635	18,951	8,1258	27,556	29,481	30,965	29,358	32,085	27,701	29,136	29,157	28,288	29,863
10E8	21,522	18,768	7,5358	27,616	28,898	29,927	29,124	31,18	27,639	29,117	29,106	28,065	29,667
16D8	21,373	18,642	7,9976	27,447	29,192	30,092	29,308	32,649	27,096	26,878	28,778	27,824	28,896
15B6	19,92	18,253	7,8841	27,092	29	29,775	30,221	31,246	26,14	28,606	27,435	27,379	29,239
1B6	21,548	18,612	8,8821	27,629	28,7	30,746	30,293	32,917	27,201	29,727	28,27	28,268	30,137
4D8	21,471	18,996	7,9884	28,18	29,316	31,023	30,048	32,653	28,057	30,34	29,52	28,463	30,62
6F8	21,736	19,311	8,0759	27,928	29,087	30,348	29,323	30,889	27,812	28,743	29,494	28,577	29,742
12E8	20,723	18,357	7,8992	26,912	28,138	29,355	28,732	30,334	27,266	28,278	28,692	27,679	29,194
14F6	20,4	18,302	8,2709	27,568	28,864	29,671	29,901	30,795	26,48	28,608	27,886	27,37	29,527
18C8	21,132	18,614	9,9082	27,268	28,513	30,525	29,245	31,153	27,865	28,771	28,676	28,348	29,42
3c6	19,494	17,91	7,2488	26,279	28,044				25,798		27,189		
7e6	19,691	18,006	7,1259	26,459	28,18				25,954		27,088		
9a6	19,601	17,936	7,3643	26,397	28,985			30,991	26,101		27,327		
13c6	19,754	17,915	7,3304	26,491	28,653				26,626		28,072		
14E6	19,733	18,005	7,3648		28,52				26,469		28,113		
3b6	20,166	18,37	7,6923	27,126	28,674				26,933		28,499		
7d6	19,543	17,915	7,0864	26,558	28,679				26,4		27,814		
8f6	19,899	18,118	7,3046	26,685	28,35				26,475		27,927		
13b6	19,135	17,551	7,0085	26,075	27,793				25,831		27,326		
14d6	18,95	17,314	7,4914	25,851	28,97				25,73		27,212		
3a6	19,756	17,999	7,211	26,799	28,06			32,561	26,778		27,683		
7c6	19,627	17,785	7,2552	26,569	27,801				26,161		27,282		
8e6	19,977	18,261	7,482	27,08	28,701				26,915		27,906		
13a6	20,013	18,203	7,4729	26,966	28,304				26,762		27,873		
14c6	19,33	17,575	7,3223	26,292	28,432				26,139		27,676		
2f6	20,273	18,208	7,3954	27,327	29,041				26,878		28,186		
7b6	19,992	17,968	7,1983	26,923	28,011				26,677		27,401		
8d6	19,985	18,163	7,8995	26,811	28,177				26,418		27,6		
9f6	19,748	17,687	7,6448	26,573	28,492				26,42		27,67		
14b6	20,199	18,449	7,8496	27,151	29,031				26,869		28,191		
2e6	20,218	17,368	8,2015	27,043	28,379				27,102		27,51		
7a6	20,343	18,023	8,1465	26,951	28,307			31,943	26,68		27,618		
8c6	20,082	17,851	8,3084	26,826	27,977				26,603		27,623		
9e6	19,973	17,784	8,2532	26,752	28,784				26,792		27,88		
14a6	20,088	18,012	7,8716	26,874	28,468			31,727	26,872		28,132		
2d6	19,984	17,836	6,8484	27,012	27,977				26,488		27,572		
3f6	20,123	17,815	7,0161	27,71	28,271				26,826		28,07		
8b6	19,872	17,798	7,1745	26,945	28,025				26,277		27,32		
9d6	19,83	18,056	7,0523	27,089	28,293				26,437		27,762		
13f6	20,407	18,431	7,6979	27,665	29,521				27,152		28,593		
2c6	19,74	17,886	7,6749	26,657	28,011				26,13		27,159		
3e6	19,259	17,218	7,7324	26,199	28,125			33,289	26,009		27,359		
8a6	19,898	18,204	7,8721	26,911	28,68				26,479		27,881		
9c6	19,927	18,072	8,2701	26,868	28,782				26,698		28,361		
13e6	20,138	18,19	8,45	27,322	28,92				26,878		28,325		
2b6	20,147	18,427	7,6832	27,087	28,934				27,018		28,416		
3d6	20,039	18,081	7,5749	26,784	28,843				26,751		28,11		
7f6	19,119	17,691	7,6378	26,24	28,483				25,69		26,783		
9b6	19,621	17,777	7,5217	26,258	28,502				25,863		27,33		
13d6	19,796	18,036	7,7842	26,633	28,811				26,384		28,185		
3c6	19,624	17,405	7,5428			30,943	29,406	31,851		28,641		27,467	28,321



## Appendix

<b>FISK ID</b>	<b>Ef1-a</b>	<b>B-actin</b>	<b>S18</b>	<b>MDA5</b>	<b>IFNa</b>	<b>IFNc</b>	<b>TLR3</b>	<b>TLR7</b>	<b>Mx</b>	<b>Viperin</b>	<b>STAT-1</b>	<b>PKR</b>	<b>ISG15</b>
7e6	19,408	17,27	7,4217			29,686	29,373	32,212		28,825		27,238	28,606
8f6	20,13	17,788	8,4819			30,102	29,59	31,257		28,709		28,104	28,93
13c6	19,886	17,516	7,9307			30,861	29,755	31,7		29,432		27,752	29,707
14E6	20,284	18,015	9,3108			32,015	30,294	32,66		29,879		28,112	29,483
3b6	20,164	18,07	7,9899			29,971	29,403	31,22		29,121		28,127	29,222
7d6	19,624	17,576	8,0767			30,33	29,717	33,323		29,83		27,382	29,479
9a6	19,682	17,505	7,9802			30,658	29,495			29,756		27,449	29,78
13b6	18,518	16,36	6,9494			29,778	28,313	30,648		27,601		26,429	28,037
14d6	19,621	17,453	8,632			31,156	29,409	33,217		28,71		27,57	29,165
3a6	19,865	17,56	7,8561			31,195	29,433			29,586		27,451	29,685
7c6	19,425	17,293	7,5825			30,372	29,148	31,447		28,816		27,024	28,91
8e6	20,045	17,8	7,7932			30,779	29,636	31,109		28,99		27,761	29,213
13a6	19,969	17,752	7,7901			30,38	29,521	32,165		28,91		27,746	29,129
14c6	19,705	17,474	8,4811			30,749	29,671	32,344		29,249		27,325	29,045
2f6	20,602	18,325	7,958			31,639	30,111	32,803		30,047		28,099	30,19
7b6	19,222	16,941	6,8516			29,099	28,634	30,529		28,059		26,7	28,312
8d6	20,218	17,675	7,9046			30,792	29,296	32,119		29,185		27,48	29,539
9f6	19,739	17,415	7,6271			30,275	29,402	33,105		29,104		27,231	29,538
14b6	20,753	18,44	8,8743			0	30,099	32,314		29,937		28,226	30,144
2e6	20,106	17,823	7,6182			30,534	29,908	33,166		29,678		27,466	29,506
8c6	20,195	17,87	7,7283			30,167	29,62	32,051		29,02		27,483	29,153
9e6	19,991	17,726	7,8018			30,753	29,463	32,925		29,788		27,543	30,364
14a6	20,168	18,09	8,1016			30,47	29,565	31,434		28,906		27,658	30,068
2d6	19,896	18,082	7,2663			30,806	29,455	31,867		29,572		27,294	29,576
3f6	19,872	17,929	7,9549			30,638	29,197	31,083		28,674		27,393	29,213
8b6	20,081	18,052	7,7756			30,516	29,896	33,127		29,739		27,416	30,111
9d6	19,971	17,962	7,6011			30,719	29,525	31,928		29,31		27,508	29,619
13f6	20,706	18,645	8,4793			30,303	29,861	31,425		29,012		28,119	29,847
2c6	20,487	18,871	7,2483			31,681	29,864	32,878		29,341		28,479	29,722
3e6	19,527	17,522	7,708			30,166	28,979			29,151		27,13	29,322
8a6	20,28	18,382	7,6122			29,991	29,781	31,556		29,58		27,888	29,557
9c6	20,216	18,264	7,6092			30,343	29,67	32,246		29,367		27,779	30,102
13e6	20,908	18,838	8,7421			30,165	30,003	31,411		28,686		28,431	29,74
2b6	19,979	17,956	7,7119			30,226	29,925	32,295		29,399		27,858	29,439
3d6	20,113	17,931	7,8824			30,587	30,313	32,549		30,013		27,751	29,839
7f6	19,644	17,588	7,8184			30,579	29,04	32,42		28,62		27,384	28,484
9b6	19,866	17,623	8,1632			30,138	29,409	32,332		29,207		27,558	29,127
13d6	20,39	18,261	7,6707			31,411	30,056	32,767		29,881		28,121	29,641
10C8	20,604	18,263	6,8742	26,848	27,93	29,087	28,361	30,439	27,075	28,056	28,243	27,635	28,354
13B8	19,752	17,035	6,4108	26,165	27,373	27,993	27,155	29,741	26,646	27,372	28,176	26,883	27,363
14D8	19,675	16,866	6,8651	25,942	27,593	28,563	27,392	29,824	26,541	27,835	27,81	26,697	27,738
15F8	19,879	16,818	7,1521	26,173	26,868	26,489	27,203	28,886	26,742	27,093	28,069	26,8	27,204
18B8	19,213	16,965	6,1731	25,594	26,72	27,701	27,446	29,981	25,939	27,444	27,738	26,483	27,93
10B8	19,818	17,544	6,5851	25,904	27,06	28,712	27,751	30,125	26,24	27,739	27,626	26,954	28,692
13A8	20,15	17,513	6,8431	26,359	27,642	27,787	27,541	29,857	26,902	27,672	28,298	27,113	28,216
14C8	20,512	17,738	7,3266	26,628	27,73	28,151	28,34	30,138	27,603	28,12	28,763	27,674	28,487
15E8	19,713	17,159	6,8797	26,04	27,022	27,049	27,21	29,437	26,539	27,155	27,787	26,903	27,776
18A8	22,004	20,104	7,6969	28,353	28,932	29,408	29,534	30,594	28,595	28,44	30,318	29,496	29,507
10A8	20,016	16,815	6,7008	25,799	28,262	28,33	27,95	30,677	26,123	27,813	27,083	26,893	28,299
12C8	20,059	16,968	6,537	25,935	27,472	28,134	27,913	30,24	26,468	27,736	27,547	27,177	28,171
14B8	20,428	16,754	6,7127	26,175	27,852	28,26	28,028	30,474	26,968	28,33	28,295	27,025	28,031
15D8	20,833	17,465	7,0397	26,829	28,865	28,845	28,296	30,467	27,208	28,695	29,033	27,807	28,688
17C8	21,174	18,503	7,4041	27,269	29,2	30,576	29,171	31,244	27,772	29,206	30,702	28,279	29,22

## Appendix

FISK ID	<i>Ef1-a</i>	<i>B-actin</i>	<i>S18</i>	<i>MDA5</i>	<i>IFNa</i>	<i>IFNc</i>	<i>TLR3</i>	<i>TLR7</i>	<i>Mx</i>	<i>Viperin</i>	<i>STAT-1</i>	<i>PKR</i>	<i>ISG15</i>
9F8	20,454	17,613	7,146	26,922	29,482	29,238	28,384	30,141	27,355	28,008	28,21	27,65	28,284
12B8	19,703	17,173	6,4402	26,409	27,815	28,511	28,116	30,09	26,293	28,174	27,263	26,986	28,524
14A8	20,128	17,203	6,721	26,166	27,91	27,856	28,074	29,606	26,902	27,768	28,482	27,185	27,921
15C8	19,854	17,304	6,6022	26,254	28,84	28,614	28,024	31,059	26,622	28,731	28,513	27,111	28,264
17B8	20,882	18,774	7,0086	26,724	29,339	28,168	29,125	31,486	27,451	28,996	29,785	28,157	29,624
9E8	20,692	17,821	7,1253	27,091	29,119	29,238	28,222	30,424	27,531	28,124	28,434	27,559	28,625
12A8	20,183	17,737	6,8453	26,811	28,603	28,511	28,309	30,659	25,826	27,234	26,682	27,3	27,711
13F8	19,898	16,946	6,5055	26,119	28,462	27,856	27,86	30,624	26,616	27,486	27,93	26,591	27,881
15B8	20,547	17,788	7,0703	26,558	29,417	28,614	28,734	30,542	27,243	28,831		27,69	28,573
17A8	19,861	17,742	6,5755	26,339	28,481	28,168	28,304	30,206	26,447	27,846	29,19	26,94	28,809
9D8	20,232	17,438	6,8797	26,405	29,166	28,264	28,102	30,387	27,069	27,751	28,122	27,54	28,312
11C8	19,861	17,352	6,3801	26,45	28,885	28,18	28,315	30,651	26,714	27,797	28,394	27,242	28,802
13E8	19,737	16,905	6,5427	26,003	28,49	27,569	27,761	29,874	26,487	27,693	27,547	26,671	28,197
15A8	20,011	17,319	6,7354	26,131	28,826	27,303	27,856	29,693	26,612	27,502	29,17	27,014	28,092
16C8	19,4	17,124	6,4102	25,981	28,399	28,303	28,158	30,558	26,153	27,984	28,173	26,699	28,448
9C8	19,555	16,615	6,5265	25,868	27,354	28,242	27,659	30,493	26,718	27,794	27,882	26,812	28,817
11B8	19,977	17,559	6,5501	25,987	27,381	27,03	27,764	29,583	25,335	26,052	26,089	26,878	27,378
13D8	20,076	17,295	6,6739	26,239	27,793	27,957	28,189	30,613	26,536	28,015	27,29	27,039	28,983
14F8	20,018	17,053	6,6098	26,226	27,383	26,745	27,46	29,438	26,698	27,175	28,661	26,823	28,217
16B8	20,085	17,789	6,717	26,416	28,119	28,505	28,54	30,367	26,801	27,184	29,421	27,197	28,86
9b8	19,365	16,317	6,2874	25,46	27,42	28,01	27,286	30,603	26,282	27,822	27,295	26,399	27,506
11A8	18,871	16,154	6,1931	24,912	27,001	27,345	27,001	29,469	24,926	25,839	26,446	25,952	27,038
13C8	19,849	16,776	6,7361	25,96	27,897	28,359	27,628	30,146	26,591	28,028	27,662	26,737	28,124
14E8	20,019	17,097	6,6843	26,29	27,413	26,959	27,712	29,585	26,621	27,617	28,633	27,147	27,763
16A8	19,953	17,524	6,7294	26,241	27,933	28,273	28,308	29,995	26,451	27,173	28,119	27,214	28,553
2b8	19,805	17,12	6,1853	26,033	27,338	29,141	27,23	29,947	25,878	26,628	27,083	26,662	27,355
3d8	19,946	16,918	6,4002	25,91	26,507	27,368	27,159	29,043	26,203	26,467	27,611	26,424	27,155
5c8	20,53	17,943	6,7875	26,628	27,972	29,85	28,61	28,61	26,788	27,828	28,074	27,207	29,02
7e8	20,122	17,128	6,6286	25,879	27,112	27,705	27,504	29,495	26,583	27,013	27,602	26,852	27,541
9a8	19,89	16,919	6,9738	25,724	26,547	27,944	27,565	29,413	26,376	26,782	27,767	26,705	27,492
2a8	19,762	16,878	5,7564	25,926	27,506	28,733	27,354	30,034	26,529	27,388	27,593	26,856	27,712
3c8	19,808	16,934	6,4876	25,865	27,803	28,318	27,392	29,966	26,243	27,019	27,456	26,628	27,631
5b8	21,632	19,03	7,3449	27,286	28,341	28,673	28,737	30,412	27,056	27,192	27,645	28,102	28,19
7d8	21,069	18,267	7,2669	26,96	28,935	29,548	28,566	31,021	27,151	28,443	28,365	28,013	28,805
8f8	20,578	17,838	7,1183	26,658	28,211	28,678	27,979	30,225	27,179	27,55	28,69	27,449	28,432
1f8	19,967	17,169	6,3932	26,234	27,488	28,169	27,668	29,682	26,632	27,627	27,906	26,971	28,057
3b8	19,618	16,718	6,9149	25,513	27,437	28,661	27,146	30,075	25,791	26,754	27,654	26,432	27,886
5a8	19,814	16,923	6,3681	25,539	26,968	28,566	27,763	29,845	25,999	26,713	26,856	26,121	27,737
7c8	20,384	17,407	7,1024	26,241	27,98	29,082	27,901	30,019	27,145	28,053	27,987	27,831	29,547
8e8	20,084	17,36	6,9082	26,19	27,177	27,218	27,266	29,05	26,464	26,681	27,556	26,942	28,06
1e8	20,797	18,163	7,034	27,243	27,758	28,813	28,198	29,534	27,607	27,486	29,125	28,313	28,428
3a8	19,642	16,769	6,4473	25,79	28,131	29,6	27,407	30,294	26,16	27,481	27,606	26,662	27,974
4c8	19,3	16,589	6,4797	25,132	26,931	28,089	27,465	29,692	25,824	26,352	26,903	26,022	27,501
7b8	19,931	17,117	6,8758	25,819	28,44	29,439	27,832	30,414	26,908	27,941	27,7	27,374	28,261
8d8	19,538	16,743	6,7376	25,756	27,994	29,25	27,303	29,993	26,395	27,714	27,726	26,849	28,435
1d8	19,729	17,312	6,4525	26,411	27,681	27,694	27,84	29,827	26,574	27,586	28,044	27,033	27,967
2f8	19,955	17,17	6,8913	26,24	27,695	27,393	27,759	29,845	26,732	27,542	28,164	27,359	27,775
7a8	20,058	17,23	6,6373	25,988	28,359	27,971	27,588	29,985	27,054	28,251	27,764	27,624	29,053
8c8	20,058	17,52	7,0775	26,368	27,695	28,45	27,796	29,646	26,843	27,587	27,747	27,321	28,315
1c8	19,493	16,862	6,5168	25,864	27,491	28,338	27,539	29,921	26,417	27,665	27,691	27,278	28,249
2e8	19,612	16,76	6,1865	25,785	27,436	27,892	27,306	30,066	25,954	27,347	26,747	27,153	28,006
4a8	20,92	18,214	7,4123	26,731	28,102	28,441	28,726	30,849	27,648	27,784	28,035	27,684	29,059
6c8	21,44	18,872	7,7903	27,432	29,204	29,503	29,299	31,356	28,202	29,553	29,032	29,508	30,427
8b8	19,938	17,048	6,7897	25,451	27,411	28,025	26,906	29,669	25,706	26,497	26,13	26,516	27,353
1b8	19,638	17,024	6,218	26,217	27,396	28	27,976	29,9	26,404	27,74	27,847	27,518	28,287
2d8	19,368	16,78	6,0386	25,529	27,473	27,744	27,982	30,196	26,399	27,697	27,351	27,252	28,435
3f8	19,7	16,868	6,6047	25,911	26,644	26,775	27,881	29,234	26,896	26,937	27,698	26,861	27,652
6b8	18,862	16,45	5,7858	25,011	27,911	28,543	27,78	30,717	25,818	27,756	27,042	26,832	28,793
8a8	19,852	17,184	7,0151	25,984	27,196	27,64	28,01	29,828	26,794	27,595	27,903	27,343	28,287
1a8	19,846	17,261	6,3311	25,977	27,677	28,759	27,998	30,591	26,689	28,002	27,906	27,152	28,964
2c8	19,501	16,734	6,2034	25,896	27,82	27,695	27,587	29,751	26,534	28,066	27,748	27,443	29,112
3e8	19,586	16,727	6,7649	0	26,566	26,287	27,364	29,087	26,203	26,581	26,758	26,667	27,567
6a8	19,915	17,424	6,6468	25,733	27,775	27,69	28,023	29,733	26,449	27,573	27,211	27,258	29,128
7f8	19,563	16,905	6,3201	25,838	27,853	27,959	27,691	30,196	26,682	27,986	27,513	26,902	28,409

## Appendix II

Gjennomsnittlig relativt genuttrykk ( $\bar{R}$ ) per gruppe og standardavvik for plommeseekyngel rett etter klekking (488 dg).

Tabell 12: Gjennomsnittlig relativt uttrykk for grupper av plommeseekyngel tatt ved 488 døggrader.

Relativt uttrykk: Geometrisk gjennomsnitt av $2^{(-\Delta Ct)}$ per gruppe. Plommeseekyngel rett etter klekking (488 døggrader)							
Uttak	Temp	Lys	MDA5	IFNa	IFNc	TLR3	TLR7
RNA 6	8°C	LL	0,00033	0,00067	0,00009	0,00005	0,00004
RNA 6	8°C	DD	0,00031	0,00056	0,00011	0,00006	0,00004
RNA 6	8°C	LD	0,00033	0,00055	0,00012	0,00005	0,00007
RNA 6	4°C	LL	0,00037	0,00062	0,00013	0,00004	0,00003
RNA 6	4°C	DD	0,00039	0,00056	0,00012	0,00005	0,00002
RNA 6	4°C	LD	0,00040	0,00066	0,00014	0,00004	0,00003
Uttak	Temp	Lys	Mx	Viperin	STAT-1	PKR	ISG15
RNA 6	8°C	LL	0,00011	0,00020	0,00042	0,00002	0,00039
RNA 6	8°C	DD	0,00013	0,00020	0,00043	0,00003	0,00035
RNA 6	8°C	LD	0,00013	0,00029	0,00039	0,00003	0,00041
RNA 6	4°C	LL	0,00013	0,00020	0,00029	0,00002	0,00027
RNA 6	4°C	DD	0,00014	0,00020	0,00030	0,00002	0,00026
RNA 6	4°C	LD	0,00014	0,00017	0,00030	0,00002	0,00027

## Appendix

Tabell 13: Standardavvik for grupper med plommeseekyngel tatt ved ca 488 døgngader: ( $\bar{R} - STD = 2^{-(\Delta Ct - STD)}$ ).

Standardavvik R-							
Uttak	Temp	Lys	MDA5	IFNa	IFNc	TLR3	TLR7
RNA 6	8°C	LL	0,000067	0,000208	0,000043	0,000009	0,000016
RNA 6	8°C	DD	0,000116	0,000127	0,000024	0,000006	0,000013
RNA 6	8°C	LD	0,000067	0,000188	0,000038	0,000008	0,000017
RNA 6	4°C	LL	0,000097	0,000201	0,000032	-0,000017	0,000017
RNA 6	4°C	DD	0,000092	0,000127	0,000021	0,000007	0,000016
RNA 6	4°C	LD	0,000044	0,000146	0,000043	0,000013	0,000027
Uttak	Temp	Lys	Mx	Viperin	STAT-1	PKR	ISG15
RNA 6	8°C	LL	0,000032	0,000069	0,000064	0,000004	0,000066
RNA 6	8°C	DD	0,000025	0,000043	0,000057	0,000003	0,000071
RNA 6	8°C	LD	0,000020	0,000050	0,000048	0,000003	0,000062
RNA 6	4°C	LL	0,000034	0,000068	0,000126	0,000006	0,000097
RNA 6	4°C	DD	0,000025	0,000045	0,000081	0,000003	0,000096
RNA 6	4°C	LD	0,000024	0,000086	0,000085	0,000005	0,000097

Tabell 14: Standardavvik for grupper med plommeseekyngel tatt ved 488 døgngader: ( $\bar{R} + STD = 2^{-(\Delta Ct + STD)}$ ).

Standardavvik R+							
Uttak	Temp	Lys	MDA5	IFNa	IFNc	TLR3	TLR7
RNA 6	8°C	LL	0,00008	0,00031	0,00006	0,00001	0,00004
RNA 6	8°C	DD	0,00017	0,00016	0,00003	0,00001	0,00003
RNA 6	8°C	LD	0,00008	0,00026	0,00005	0,00001	0,00004
RNA 6	4°C	LL	0,00014	0,00029	0,00005	0,00007	0,00003
RNA 6	4°C	DD	0,00013	0,00016	0,00003	0,00001	0,00003
RNA 6	4°C	LD	0,00005	0,00020	0,00007	0,00002	0,00004
Uttak	Temp	Lys	Mx	Viperin	STAT-1	PKR	ISG15
RNA 6	8°C	LL	0,00004	0,00011	0,00008	0,00000	0,00009
RNA 6	8°C	DD	0,00003	0,00005	0,00007	0,00000	0,00010
RNA 6	8°C	LD	0,00002	0,00007	0,00006	0,00000	0,00008
RNA 6	4°C	LL	0,00005	0,00010	0,00018	0,00001	0,00013
RNA 6	4°C	DD	0,00003	0,00006	0,00010	0,00000	0,00013
RNA 6	4°C	LD	0,00003	0,00012	0,00011	0,00001	0,00013

## Appendix III

Gjennomsnittlig relativt genuttrykk ( $\bar{R}$ ) per gruppe og standardavvik for lakseyngel rundt startfôring (ca 848 dg).

Tabell 15: Gjennomsnittlig relativt uttrykk for grupper av lakseyngel tatt ved ca 848 døgngader.

Relativt uttrykk ( $\bar{R}$ ): Geometrisk gjennomsnitt av $2^{(-\Delta Ct)}$ per gruppe. Lakseyngel rundt startfôring (848 døgngader)							
Uttak	Temp	Lys	MDA5	IFN $\alpha$	IFN $\gamma$	TLR3	TLR7
RNA 8	8°C	LL	0,00027	0,00051	0,00021	0,00009	0,00014
RNA 8	8°C	DD	0,00033	0,00049	0,00022	0,00011	0,00009
RNA 8	8°C	LD	0,00029	0,00047	0,00030	0,00010	0,00009
RNA 8	4°C	LL	0,00033	0,00062	0,00019	0,00009	0,00011
RNA 8	4°C	DD	0,00029	0,00052	0,00021	0,00009	0,00010
RNA 8	4°C	LD	0,00032	0,00050	0,00017	0,00008	0,00007
Uttak	Temp	Lys	Mx	Viperin	STAT-1	PKR	ISG15
RNA 8	8°C	LL	0,00007	0,00033	0,00021	0,00002	0,00039
RNA 8	8°C	DD	0,00007	0,00035	0,00025	0,00002	0,00043
RNA 8	8°C	LD	0,00007	0,00029	0,00018	0,00002	0,00046
RNA 8	4°C	LL	0,00009	0,00043	0,00032	0,00002	0,00046
RNA 8	4°C	DD	0,00008	0,00036	0,00031	0,00002	0,00045
RNA 8	4°C	LD	0,00009	0,00034	0,00021	0,00002	0,00042

## Appendix

Tabell 16: Standardavvik for grupper med lakseyngel tatt ved ca 848 døgngader: ( $\bar{R} - STD = 2^{-(\overline{\Delta Ct} - STD)}$ ).

Standardavvik R-							
Uttak	Temp	Lys	MDA5	IFNa	IFNc	TLR3	TLR7
RNA 8	8°C	LL	0,000045	0,000144	0,000090	0,000021	0,000125
RNA 8	8°C	DD	0,000051	0,000165	0,000069	0,000020	0,000029
RNA 8	8°C	LD	0,000028	0,000157	0,000103	0,000021	0,000028
RNA 8	4°C	LL	0,000048	0,000171	0,000065	0,000022	0,000047
RNA 8	4°C	DD	0,000042	0,000144	0,000073	0,000021	0,000041
RNA 8	4°C	LD	0,000080	0,000180	0,000064	0,000022	0,000032
Uttak	Temp	Lys	Mx	Viperin	STAT-1	PKR	ISG15
RNA 8	8°C	LL	0,000015	0,000108	0,000046	0,000005	0,000125
RNA 8	8°C	DD	0,000015	0,000110	0,000062	0,000004	0,000126
RNA 8	8°C	LD	0,000006	0,000074	0,000045	0,000003	0,000098
RNA 8	4°C	LL	0,000018	0,000160	0,000079	0,000006	0,000179
RNA 8	4°C	DD	0,000017	0,000135	0,000074	0,000006	0,000172
RNA 8	4°C	LD	0,000023	0,000143	0,000095	0,000006	0,000132

Tabell 17 Standardavvik for grupper med lakseyngel tatt ved ca 848 døgngader: ( $\bar{R} + STD = 2^{-(\overline{\Delta Ct} + STD)}$ ).

Standardavvik R+							
Uttak	Temp	Lys	MDA5	IFNa	IFNc	TLR3	TLR7
RNA 8	8°C	LL	0,00005	0,00020	0,00016	0,00003	0,00118
RNA 8	8°C	DD	0,00006	0,00025	0,00010	0,00003	0,00004
RNA 8	8°C	LD	0,00003	0,00024	0,00016	0,00003	0,00004
RNA 8	4°C	LL	0,00006	0,00024	0,00010	0,00003	0,00008
RNA 8	4°C	DD	0,00005	0,00020	0,00012	0,00003	0,00007
RNA 8	4°C	LD	0,00011	0,00028	0,00010	0,00003	0,00006
Uttak	Temp	Lys	Mx	Viperin	STAT-1	PKR	ISG15
RNA 8	8°C	LL	0,00002	0,00016	0,00006	0,00001	0,00018
RNA 8	8°C	DD	0,00002	0,00016	0,00008	0,00000	0,00018
RNA 8	8°C	LD	0,00001	0,00010	0,00006	0,00000	0,00012
RNA 8	4°C	LL	0,00002	0,00026	0,00010	0,00001	0,00029
RNA 8	4°C	DD	0,00002	0,00022	0,00010	0,00001	0,00028
RNA 8	4°C	LD	0,00003	0,00025	0,00017	0,00001	0,00019

Følgende presenterte tabeller gir oversikt over resultater av utførte statistiske tester mellom lakseyngel og plommesekkynget i ulike lys- og temperatur grupper og mellom inkubatorer.

Testgruppe	Kontroll	Statistiske parameter	MIDAS	IFNA	IFNC	TLR3	TLR7	MX	Viperin	STAT-1	PKR	ISG15
DD 4 RNA 6	DD 8 RNA 6	Type test	Mann-whitn	Welch t-test	Welch t-test	Mann-whitn	Mann-whitn	Welch t-test	Welch t-test	Welch t-test	Welch t-test	Welch t-test
		P-value	0,0006	0,4525	0,1851	0,0006	0,0083	0,7738	0,694	0,0002	0,4116	0,0043
		P<0,05 (Signifikant?)	Ja	Nei	Nei	Ja	Ja	Nei	Nei	Ja	Nei	Ja
LL 4 RNA 6	DD 8 RNA 6	Type test	Mann-whitn	Welch t-test	Welch t-test	Mann-whitn	Welch t-test	Welch t-test	Welch t-test	Mann-whitn	Welch t-test	Welch t-test
		P-value	0,2262	0,3658	0,0335	<0,0001	0,1084	0,8852	0,6864	<0,0001	0,0134	0,0168
		P<0,05 (Signifikant?)	Nei	Nei	Ja	Ja	Nei	Nei	Nei	Ja	Ja	Ja
LD 4 RNA 6	DD 8 RNA 6	Type test	Mann-whitn	Mann-whitn	Welch t-test	Mann-whitn	Welch t-test	Welch t-test	Welch t-test	Welch t-test	Welch t-test	Welch t-test
		P-value	0,0071	0,0549	0,0033	0,0002	0,1909	0,4379	0,1035	<0,0001	0,039	0,0148
		P<0,05 (Signifikant?)	Ja	Nei	Ja	Ja	Nei	Nei	Nei	Ja	Ja	Ja
LL 8 RNA 6	DD 8 RNA 6	Type test	Mann-whitn	Welch t-test	Welch t-test	Mann-whitn	Mann-whitn	Welch t-test	Welch t-test	Welch t-test	Welch t-test	Welch t-test
		P-value	0,4812	0,0922	0,152	0,3231	0,9875	0,103	0,8978	0,8138	0,2244	0,3356
		P<0,05 (Signifikant?)	Nei	Nei	Nei	Nei	Nei	Nei	Nei	Nei	Nei	Nei
LD 8 RNA 6	DD 8 RNA 6	Type test	Mann-whitn	Welch t-test	Mann-whitn	Mann-whitn	Welch t-test	Welch t-test	Welch t-test	Welch t-test	Welch t-test	Welch t-test
		P-value	0,961	0,9021	0,3865	0,9875	0,0137	0,9074	0,0015	0,2193	0,0222	0,1133
		P<0,05 (Signifikant?)	Nei	Nei	Nei	Nei	Ja	Nei	Ja	Nei	Ja	Nei
LL 4 RNA 6	LL 8 RNA 6	Type test	Mann-whitn	Welch t-test	Welch t-test	Welch t-test	Mann-whitn	Welch t-test	Welch t-test	Mann-whitn	Welch t-test	Welch t-test
		P-value	0,696	0,5582	0,0068	0,0084	0,1061	0,1634	0,8139	0,001	0,4996	0,0007
		P<0,05 (Signifikant?)	Nei	Nei	Ja	Ja	Nei	Nei	Nei	Ja	Nei	Ja
LD 4 RNA 6	LD 8 RNA 6	Type test	Mann-whitn	Welch t-test	Mann-whitn	Welch t-test	Welch t-test	Welch t-test	Welch t-test	Welch t-test	Welch t-test	Welch t-test
		P-value	0,0021	0,0946	0,2315	0,012	0,0054	0,3641	<0,0001	0,0011	0,0005	<0,0001
		P<0,05 (Signifikant?)	Ja	Nei	Nei	Ja	Ja	Nei	Ja	Ja	Ja	Ja

## Appendix IV

Appendix

Testgruppe	Kontroll	Statistiske parameter	MIDAS	IFNa	IFNc	TLR3	TLR7	Mx	Viperin	STAT-1	PKR	ISG15
DD 4 RNA 8	DD 8 RNA 8	Type test P-value	Mann-whitn 0,0847	Welch t-test 0,629	Mann-whitn 0,5841	Mann-whitn 0,0224	Mann-whitn 0,6279	Mann-whitn 0,0117	Welch t-test 0,7662	Mann-whitn 0,1038	Welch t-test 0,2165	Welch t-test 0,722
		P<0.05 (Signifikans?)	Nei	Nei	Nei	Ja	Nei	Ja	Nei	Nei	Nei	Nei
LL 4 RNA 8	DD 8 RNA 8	Type test P-value	Welch t-test 0,9561	Mann-whitn 0,0665	Welch t-test 0,2188	Welch t-test 0,0509	Welch t-test 0,3101	Welch t-test 0,0017	Welch t-test 0,1492	Mann-whitn 0,0035	Mann-whitn 0,038	Welch t-test 0,5816
		P<0.05 (Signifikant?)	Nei	Nei	Nei	Nei	Nei	Ja	Nei	Ja	Ja	Nei
LD 4 RNA 8	DD 8 RNA 8	Type test P-value	Mann-whitn 0,5212	Welch t-test 0,8491	Welch t-test 0,0887	Mann-whitn 0,0003	Welch t-test 0,1258	Welch t-test 0,0104	Mann-whitn 0,6279	Mann-whitn 0,2649	Welch t-test 0,1372	Mann-whitn 0,5628
		P<0.05 (Signifikans?)	Nei	Nei	Nei	Ja	Nei	Ja	Nei	Nei	Nei	Nei
LL 8 RNA 8	DD 8 RNA 8	Type test P-value	Welch t-test 0,0041	Welch t-test 0,711	Welch t-test 0,7919	Welch t-test 0,0502	Welch t-test 0,3076	Welch t-test 0,7952	Welch t-test 0,685	Mann-whitn 0,0132	Welch t-test 0,1261	Welch t-test 0,4956
		P<0.05 (Signifikant?)	Ja	Nei	Nei	Nei	Nei	Nei	Nei	Ja	Nei	Nei
LD 8 RNA 8	DD 8 RNA 8	Type test P-value	Welch t-test 0,0276	Welch t-test 0,7404	Welch t-test 0,0196	Welch t-test 0,272	Welch t-test 0,09049	Welch t-test 0,5092	Welch t-test 0,1494	Mann-whitn 0,0007	Welch t-test 0,2836	Welch t-test 0,4069
		P<0.05 (Signifikans?)	Ja	Nei	Ja	Nei	Nei	Nei	Nei	Ja	Nei	Nei
LL 4 RNA 8	LL 8 RNA 8	Type test P-value	Welch t-test 0,003	Mann-whitn 0,0245	Welch t-test 0,4408	Welch t-test 0,9378	Welch t-test 0,0779	Welch t-test 0,0008	Welch t-test 0,0785	Welch t-test <0,0001	Welch t-test 0,0204	Welch t-test 0,2782
		P<0.05 (Signifikant?)	Ja	Ja	Nei	Nei	Nei	Ja	Nei	Ja	Ja	Nei
LD 4 RNA8	LD 8 RNA 8	Type test P-value	Mann-whitn 0,2649	Welch t-test 0,6108	Welch t-test 0,0005	Mann-whitn 0,0096	Welch t-test 0,1441	Welch t-test 0,0009	Mann-whitn 0,696	Welch t-test 0,0285	Welch t-test 0,3975	Welch t-test 0,3758
		P<0.05 (Signifikans?)	Nei	Nei	Ja	Ja	Nei	Ja	Nei	Ja	Nei	Nei
DD 4 RNA 8	DD4 RNA6	Type test P-value	Mann-whitn 0,0004	Mann-whitn 0,4812	Welch t-test 0,0056	Mann-whitn <0,0001	Mann-whitn <0,0001	Mann-whitn <0,0001	Mann-whitn 0,0018	Mann-whitn 0,6058	Welch t-test 0,0915	Welch t-test <0,0001
		P<0.05 (Signifikant?)	Ja	Nei	Ja	Ja	Ja	Ja	Ja	Nei	Nei	Ja
DD 8 RNA 8	DD 8 RNA 6	Type test P-value	Mann-whitn 0,9626	Welch t-test 0,2503	Welch t-test <0,0001	Mann-whitn <0,0001	Welch t-test <0,0001	Welch t-test <0,0001	Welch t-test <0,0001	Welch t-test <0,0001	Welch t-test 0,0006	Welch t-test 0,852
		P<0.05 (Signifikans?)	Nei	Nei	Ja	Ja	Ja	Ja	Ja	Ja	Ja	Nei
LL 4 RNA 8	LL 4 RNA 6	Type test P-value	Welch t-test 0,0935	Mann-whitn 0,9351	Welch t-test 0,0266	Welch t-test <0,0001	Mann-whitn <0,0001	Welch t-test <0,0001	Welch t-test <0,0001	Mann-whitn 0,1528	Mann-whitn 0,3346	Welch t-test 0,0006
		P<0.05 (Signifikant?)	Nei	Nei	Ja	Ja	Ja	Ja	Ja	Nei	Nei	Ja
LL 8 RNA 8	LL 8 RNA 6	Type test P-value	Welch t-test 0,0408	Welch t-test 0,0255	Mann-whitn <0,0001	Welch t-test <0,0001	Mann-whitn 0,0006	Welch t-test <0,0001	Welch t-test 0,0011	Welch t-test <0,0001	Welch t-test 0,0099	Welch t-test 0,8985
		P<0.05 (Signifikans?)	Ja	Ja	Ja	Ja	Ja	Ja	Ja	Ja	Ja	Nei
LD 4 RNA 8	LD 4 RNA 6	Type test P-value	Mann-whitn 0,0013	Welch t-test 0,0406	Welch t-test 0,162	Mann-whitn <0,0001	Welch t-test 0,0025	Welch t-test <0,0001	Mann-whitn <0,0001	Welch t-test 0,0278	Welch t-test 0,9944	Mann-whitn 0,0002
		P<0.05 (Signifikant?)	Ja	Ja	Nei	Ja	Ja	Ja	Ja	Ja	Nei	Ja
LD 8 RNA 8	LD 8 RNA 6	Type test P-value	Mann-whitn 0,0016	Welch t-test 0,1731	Mann-whitn <0,0001	Welch t-test <0,0001	Welch t-test 0,0291	Welch t-test <0,0001	Welch t-test 0,9759	Welch t-test <0,0001	Welch t-test <0,0001	Welch t-test 0,1638
		P<0.05 (Signifikans?)	Ja	Nei	Ja	Ja	Ja	Ja	Nei	Ja	Ja	Nei





Appendix

<b>Reagens</b>	<b>Volum per prøve</b>
<b>RNA-later</b>	<b>Øyemål</b>
<b>Ethanol (&gt;99,8%)</b>	<b>Vask (ukjent)</b>
<b>Kloroform</b>	<b>700 µl</b>
<b>Trizol</b>	<b>1500 µl</b>
<b>Isopropanol (2-propanol)</b>	<b>500 µl</b>
<b>etOH 80%</b>	<b>1 ml</b>
<b>Turbo DNA-free Kit (Buffer)</b>	<b>3 µl</b>
<b>Turbo DNA-free Kit (DNase enzym)</b>	<b>0,5 µl</b>
<b>RT Buffer Mix</b>	<b>10 µl</b>
<b>RT Enzym Mix</b>	<b>1 µl</b>
<b>Nukleasefritt vann</b>	<b>Ukjent</b>
<b>Fast SYBR® Green I</b>	<b>100 µl</b>

## Appendix

