



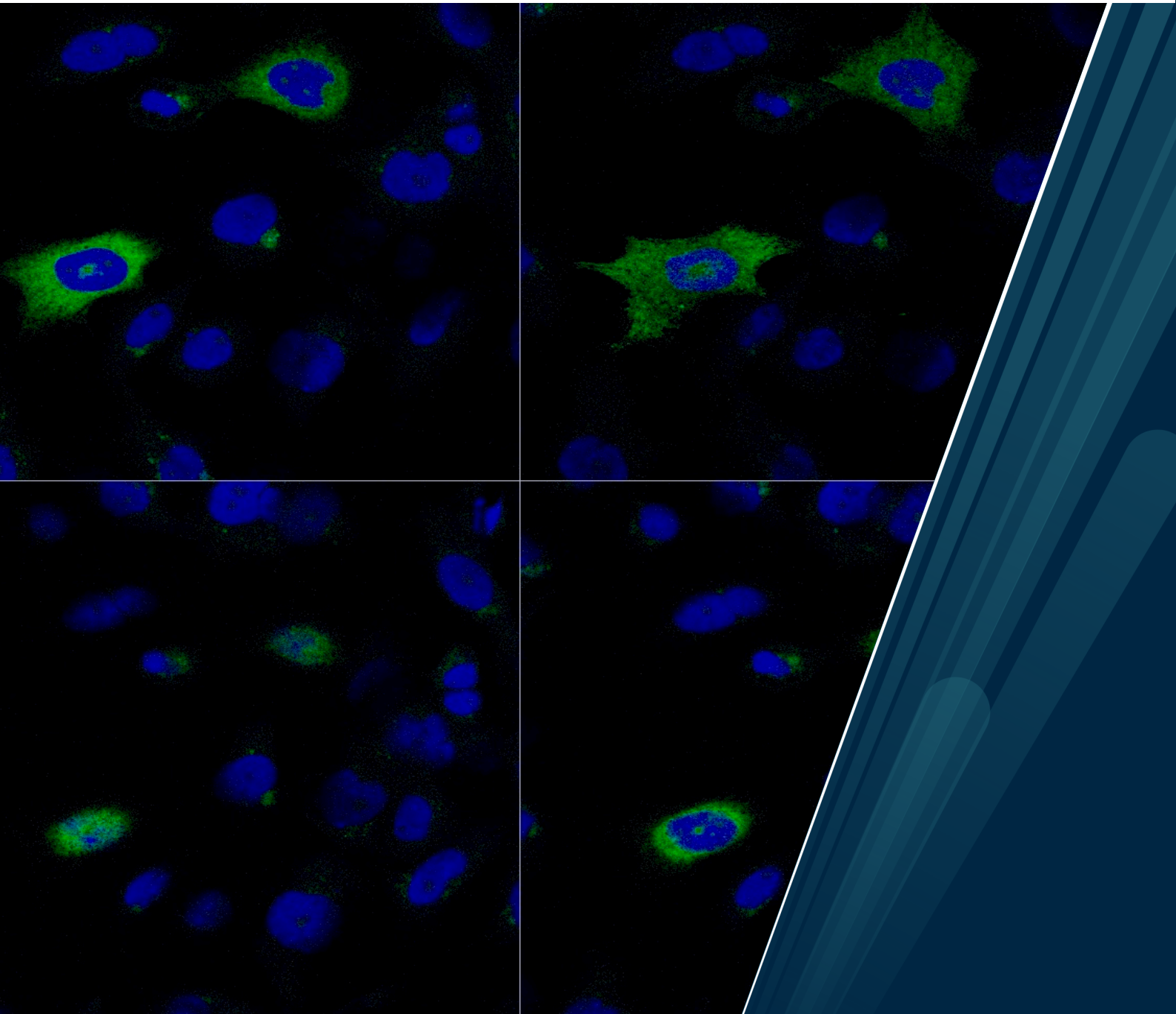
Fakultet for biovitenskap, fiskeri og økonomi (BFE), Norges Fiskerihøgskole (NFH)

Ikke-klassiske MHC klasse I L-linjegener i atlantisk laks (*Salmo salar*)

- Potensiell funksjonell rolle som tidlige antivirale varslings signaler

Ella Mortensen

Masteroppgave i akvamedisin BIO-3955, mai 2022



Forord

Denne oppgaven ble utført i forskningsgruppen «Fish Immunology and Vaccinology» ved Norges Fiskerihøgskole, fakultet for biovitenskap, fiskeri og økonomi ved UiT Norges arktiske universitet. Oppgaven ble påbegynt i mars 2021 og avsluttet i mai 2022.

I løpet av masteråret har jeg lært mye om både, immunologi, laboratorieteknikker, men også om meg selv. Det har vært en tid fylt av mange lange dager, nedturer, men også store oppturer, lærdom og mestringsfølelse.

Høsten 2019 hadde jeg Eva-Stina Edholm som foreleser i immunologifaget. Jeg beundret din evne til å lære bort, og du vekket en genuin interesse for immunologi hos meg, samtidig som jeg så opp til deg som person. Allerede da bestemte jeg meg for at jeg ville ha deg som veileder til min masteroppgave, og slik ble det heldigvis også. Det har vært en ære å ha deg som veileder og ditt gode humør, tilstedeværelse og faglige tyngde har gjort masteråret fantastisk lærerikt!

A huge thank you to my co-supervisor Maryam Imam, who has stood by my side in the lab and always guided me with a steady hand and seemingly never-ending knowledge. You have taught me so much, both in the lab and in life. I am forever grateful for all your advice, help, time, patience, and faith in me (especially when I didn't have it). You are simply the best, «Punkt slut»!

Takk til Mehrdad og Henriette for at dere alltid tok dere tid til å hjelpe meg når jeg så ut som et spørsmåltegn på labben, og alle andre ved immunologilabben som har gitt meg gode råd gjennom masteråret. Takk til Miroslav Bobrik for god hjelp med konfokalmikroskopi!

Denne masteroppgaven markerer slutten på fem år med studier. I den sammenheng ønsker jeg å takke alle som har vært med på å gjøre studieårene helt uforglemmelige; klassen min, studievenner, håndballvenner, og mine venner hjemmefra. Takk mamma, pappa, Olav og Knut, bestemora og bestefaren for alt fint dere gir meg i livet. Og takk til min kjære Gøran for at du alltid heier på meg.

Tromsø, mai 2022

Ella Mortensen

Ella Mortensen

Abstract

The Atlantic salmon farming industry is constantly growing in Norway and if managed properly can present a viable solution to the constantly increasing food demand resulting from staggering human population growth. However, one of the main challenges the industry is facing are recurring fish viral disease outbreaks. Fish vaccination strategies, especially with multicomponent vaccines, is used routinely as a prophylactic measure, but present-day fish vaccines do not prevent viral disease outbreaks. To better understand why the effect of today's virus vaccines is sub-optimal and how the vaccines can be improved, the fish's cellular immune response must be studied in more detail. As virus are obligate intracellular organisms residing inside the host cells, the key to combating them lies within the T cell mediated arm of the immune response. For activation of T cells, antigens are displayed on special complexes encoded by *Major Histocompatibility Complex* (MHC) genes. MHC genes are sub-divided into classical and non-classical genes. Salmonids have a large repertoire of non-classical MHC class I genes, divided into 6 lineages. Among these the L-lineage genes have emerged as potential early warning molecules that are rapidly induced in response to both viral infections and type I interferon signaling. This work focuses on two MHC class I L lineage genes, LIA and LGA. Here, using Chinook Salmon Embryo-214 (CHSE)-cells that are derived from Chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) it was shown that LIA, similarly to what has been observed in Atlantic salmon is upregulated in response to interferon stimulation and following SAV3 infection *in vivo*. This reinforces a putative role of LIA in salmonid anti-viral immunity and hints at an important, evolutionary conserved biological role. Further, Chinook Salmon Embryo-214 (CHSE)-cells overexpressing Sasa-LGA were established. Protein isolation of membrane and cytosol proteins from the cells, respectively, was performed, and subsequent western blots with tag specific antibodies, showed that Sasa-LGA was predominantly found in the membrane fraction, reinforcing the hypothesis that these complexes have an antigen-presenting role. These cell lines will be invaluable tools to further elucidate the functional roles of LGA and aid in the identification of potential LGA-ligands.

Ordliste

AMP	ampicilin
cDNA	complementary DNA
CHSE-celler	Chinook Salmon Embryo-214-celler
CPL	cytosol-proteinlysate
DNA	deoksyribonukleinsyre
dpi	Days post infection
eGFP	Enhanced Green Fluorescent Protein
FBS	Fetal Bovine Serum
FCA/FIA	Freund's complete/incomplete adjuvant
H+L	Heavy + Light chain
hpi	Hours post infection
IFN	interferon
IgG	immunoglobulinG
kDa	kilodalton
KLH	keyhole limpet hemocyanin
L15	Leibovitz's L-15 medium
L15 ⁺	Leibovitz's L-15 medium+ P/S+ FBS
LB	Lysogeny Broth
MCS	multiple cloning site
MHC	Major Histocompatibility Complex
MOI	multiplicity of infection
MPL	membran-proteinlysate
ODN	CpG oligodeoxynucleotides
OntsLGA	<i>Oncorhynchus tshawytscha</i> -LGA
P/S	Penicillin/Streptomycin
PAMP	patogen-assosierte molekulære mønster
PBS	Dulbecco's Phosphate Buffered Saline
Poly (I:C)	polycytidylysyre
PRR	mønster-gjenkjennelsesreseptorer
qPCR	quantitative polymerase chain reaction
RAG	rekombinasjon-aktiverende gener
RNA	ribonukleinsyre
RSAM	Rabbit-Sam (Individet som er immunisert)
RT	romtemperatur
SasaLGA	<i>Salmo salar</i> -LGA
SAV3	<i>salmonid alfavirus subtype 3</i>
SDS-PAGE	sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis

Strep
TCR
TLR
TR

streptactin
T-cellereseptor
Toll-lignende reseptor
T-cellereseptorgener

1 Innhold

1. Innledning.....	8
1.1 Prosjektbakgrunn.....	8
1.2 Vaksiner i oppdrettsnæringen i dag.....	9
1.3 Immunforsvar hos teleost fisk.....	10
1.4 Immunovervåkning.....	12
1.5 Rollen til MHC i T-celle utviklingen.....	13
1.6 Klassisk MHC klasse I.....	14
1.7 Ikke-klassisk MHC og ukonvensjonelle T-celler.....	15
1.8 MHC klasse I i fisk.....	16
1.9 Ikke-klassiske MHC klasse I L-linjegener.....	16
1.10 Regulering av L-linjegener hos atlantisk laks (<i>salmo salar</i>) ved SAV3-infeksjon.....	17
2 Problemstilling.....	19
3 Material og metoder.....	20
3.1 Reagenser og utstyr.....	20
3.2 Vedlikehold av CHSE-214 cellelinjen.....	20
3.3 CHSE stimulering med rekombinant interferon.....	21
3.4 In vitro SAV3 infeksjon av CHSE.....	21
3.5 RNA-isolering.....	22
3.6 DNase Treatment og cDNA syntese.....	22
3.7 Kvantitativ RT-qPCR.....	23
3.8 Statistisk analyse.....	23
3.9 Antibiotikaresistenstest- CHSE.....	24
3.10 Plasmid design.....	24
3.11 Plasmid transformasjon og isolering.....	25
3.12 Plasmid fordøyelse.....	26
3.13 Transfeksjon.....	27
3.14 Konfokalmikroskopi.....	27
3.15 Protein-isolering.....	28
3.16 SDS-polyakrylamid gelelektroseforese (SDS- PAGE).....	28
3.17 Western blot.....	29
3.18 Etablere stabile cellelinjer som overuttrykker Sasa-LGA.....	30
3.18.1 Forsøk 1.....	30
3.18.2 Forsøk 2.....	30
3.19 Produksjon av polyklonale Sasa-LGA antistoffer.....	30
3.20 IgG-Antistoffrensing.....	32
3.21 Databasesøk og sekvenssammenstilling.....	33
4 Resultat.....	34

4.1	<i>Ikke-klassisk MHC klasse I uttrykk i CHSE er ulikt induert av type I and type II interferoner</i>	34
4.2	<i>Ikke-klassiske MHC klasse I L-linje genuttrykk i CHSE-cellelinjer (avledet fra kongelaks) er induerte av SAV3 infeksjon.....</i>	35
4.3	<i>Overuttrykk av atlantisk laks (Salmo salar) LGA-eGFP-fusjonsprotein (SasaLGA-eGFP) i CHSE-celler.....</i>	37
4.4	<i>Optimalisere plasmid-design for å etablere stabile CHSE celler som overuttrykker Sasa-LGA</i>	41
4.5	<i>Overuttrykk av Atlantisk laks LGA-Streptactin protein (Sasa-LGA-Streptactin) i CHSE-celler</i>	44
4.6	<i>Utvikling og karakterisering av anti-SasaLGA polyklonale antistoffer.....</i>	47
4.7	<i>Immunoglobulin rensing fra kaninserum.....</i>	50
4.8	<i>Karakterisering av RSAM immunoglobulin rensede polyklonale antistoffer.....</i>	52
5	Diskusjon.....	54
5.1	<i>CHSE-stimulering</i>	54
5.2	<i>Plasmid design.....</i>	56
5.3	<i>Western blot- LGA i membranen.....</i>	57
5.4	<i>Utvikling og karakterisering av anti-SasaLGA polyklonale antistoffer.....</i>	59
6	Fremtidsaspekter for prosjektet.....	61
7	Konklusjoner	62
8	Referanser.....	63
9	Appendix.....	70
9.1	<i>Primerliste</i>	70
9.2	<i>Maskiner.....</i>	71
9.3	<i>Kit.....</i>	71
9.4	<i>Reagenser.....</i>	72
9.5	<i>Volumer i cDNA-syntese.....</i>	74
9.6	<i>Antistoffer.....</i>	74
9.6.1	<i>Primære antistoffer</i>	74
9.6.2	<i>Sekundære antistoffer</i>	74
9.7	<i>Gjennomførte transfeksjoner</i>	75
9.7.1	<i>Transfeksjoner med pcDNA3.1+C-LGA-eGFP</i>	75
9.7.2	<i>Transfeksjoner med pcDNA3.1+C-LGA-Streptactin-Blasticidin</i>	75
9.8	<i>Immuniseringstimeplan RSAM.....</i>	76
9.9	<i>ELISA av RSAM.....</i>	76

1. Innledning

1.1 Prosjektbakgrunn

Ved starten av 1800-tallet var det 1 milliard mennesker på jorden, mens i dag, 200 år senere, nærmere 7.9 milliarder. Denne befolkningsveksten øker presset på verdens matproduksjon og introduserer nye utfordringer med hensyn på bærekraftighet. For å kunne fø den raskt økende verdensbefolkningen må vi utnytte havet som ressurs for matproduksjon i større grad i fremtiden. Norge, med sin langstrakte kystlinje som geografisk fordel, har allerede vert verdensledende på produksjon av oppdrettsfisk i flere år, da spesielt på arten atlantisk laks (*Salmo salar*). Oppdrettslaks er et bærekraftig bidrag for å imøtekomme det økende proteinbehovet, da den har en god ernæringsmessig sammensetning, lav fôrfaktor, samt at produksjonen krever lite arealforbruk og innebærer et lite karbonavtrykk.

I 1971 ble Norges første oppdrettslaks slaktet (Misund, 2022), og i 2021 meldte Norges Sjømatråd følgende: «2021 ble tidenes beste år for norsk sjømateksport. Totalt eksporterte Norge 3,1 millioner tonn sjømat til en verdi av 120,8 milliarder kroner i fjor. Det er rekord i både volum og verdi og tilsvarer 42 millioner måltider hver eneste dag – året rundt» (Sjømatrådet, 2021). Den eventyrlige veksten i laksenæringen har derimot ikke vert problemfri, og dagens næring står ovenfor flere utfordringer. Blant disse utpeker virussykdommer seg som en av de største (Sommerset I & Haukaas A, 2021), som går kraftig utover fiskevelferden, samt fører til store økonomiske tap (Rodger, 2016).

Som profylaktisk tiltak blir all oppdrettslaks vaksinert, på lik linje med mennesker (Gudding & Goodrich, 2014). Den hyppige forekomsten av virussykdommer kan imidlertid indikere at virusvaksinene ikke gir tilstrekkelig beskyttelse. For å forbedre dagens virusvaksiner er det derfor aktuelt å sette søkelys på fiskens immunforsvar, og da særlig den delen som skal bekjempe virus, siden det fremdeles er mye som er uklart om dets mekanismer. En viktig komponent i bekjempelsen av virus er T-celler, og for å bli aktiverte er disse kritisk avhengige av molekyler som blir kodet av *Major Histocompatibility Complex*-gener, derav kalt MHC-molekyler. Disse T-celleaktiverende MHC-molekylene er fremdeles lite utforsket i fisk, og ved å studere deres funksjon nærmere kan det tilegnes kunnskap som kan føre til forbedrede vaksiner i fremtiden, slik at næringen kan fortsette å vokse, med bedre fiskevelferd.

1.2 Vaksiner i oppdrettsnæringen i dag

For å bedre forstå hvorfor dagens virusvaksiner ikke fungerer optimalt, må man få et bedre innblikk i hvordan det adaptive immunforsvaret hos fisk fungerer. Adaptivt immunforsvar er spesifikt tilpasset det aktuelle antigenet og det gir immunologisk hukommelse. Adaptiv immunitet er igjen delt i to; humoralt immunforsvar, som hovedsakelig er tilpasset bekjempelse av extracellulære mikrober, og cellulært, som er nøkkelen til å kontrollere intracellulære mikrober (Abbas, Lichtman & Pillai, 2019). De fleste bakterier befinner seg extracellulært, og kan dermed bli direkte gjenkjent av blant annet B-celler, som er hovedkomponenten i det humorale immunforsvaret, og bli naturaliserte av deres antistoffer. Virus derimot, befinner seg hovedsakelig intracellulært, og gjemmer seg dermed fra antistoffer fra humorale responsen. T-celler, som er viktig i det cellulære forsvaret, kan gjenkjenne virusinfiserte vertsceller og eliminere disse, noe som gjør T-celler blant de viktigste bekjempelsesmekanisme mot virus (Abbas et al., 2019).

Vaksinasjon baserer seg i all hovedsak på å aktivere det adaptive immunforsvaret, både den humorale og den cellemedierte responsen, ved å utsette organismen for et kjent, men ikke-virulent antigen og la organismens immunforsvar selv starte en immunrespons. Målet er å oppnå den immunologiske hukommelsen, slik at responstiden er kort neste gang organismen eventuelt utsettes for antigenet. Hvordan vaksinen er oppbygd vil ha mye å si for den påfølgende immunresponsen (Mondal & Thomas, 2022). Vanligste hovedkomponenter i vaksinerne brukt i oppdrettsnæringen i dag er inaktivert hel bakterie/virus eller subenhet av mikrobielt antigen (A. Adams, 2019; Ma, Bruce, Jones & Cain, 2019). Felles for inaktiverte vaksiner og subenhetsvaksiner er at de resulterer i ekstracellulære antigener ved injeksjonsstedet og dermed aktiverer B-cellene til å produsere antistoffer. Det cellulære immunforsvaret blir derimot aktivert i mindre grad.

I juni 2017 ble første DNA-vaksine for atlantisk laks, og dyr forøvrig, godkjent til bruk i EU, og fikk dermed også norsk markedsføringstillatelse (Legemiddelverk, 2017). Denne vaksinen skal gi beskyttelse mot pankreas sykdom (PD), forårsaket av salmonid alfavirus (SAV). Virale DNA-vaksiner består av plasmider som koder for virale antigener. Vertens egne celler tar opp disse plasmidene, uttrykker antigener og presenterer disse proteinene på spesielle molekyler som T-celler kan gjenkjenne (Ballesteros, Saint-Jean, Perez-Prieto & Coll, 2012; Liu, 2011; Raz et al., 1996). Antigenpresentasjonen blir utført ved overflateeksposisjon av immune overvåkingsmolekyler kalt MHC-molekyler. På denne måten gjør DNA-vaksiner det mulig å aktivere både det cellulære og humorale immunforsvaret.

Dokumentasjonen av effekten til DNA-vaksinen mot PD er foreløpig mangelfull (Dalmo, 2018; Hølvold, Myhr & Dalmo, 2014), men en DNA-vaksine mot infeksiøs hematopoetisk nekrose virus (IHNV), som er godkjent for bruk i Canada og USA har i en studie vist seg å gi beskyttelse (Corbeil, Kurath & LaPatra, 2000). Noe som er verdt å merke seg fra denne studien er at det i vaksinert fisk, før påfølgende infeksjon med IFNV, ikke ble detektert neutraliserende antistoffer i dens serum, men at samme fisk viste seg å ha oppnådd beskyttelse mot sykdommen (Corbeil et al., 2000). Dette indikerer at cellemediert immunitet, i alle fall delvis, står for den oppnådde beskyttelsen min sykdommen (Corbeil et al., 2000). Dette gir håp for fremtidens DNA-vaksiner, men konseptet er fremdeles relativt nytt og for å forbedre vaksinene må man derfor gjøre et dypdykk i laksens immunforsvar og da hovedsakelig det cellulære, og definere hvilke celler, mekanismer og komplekser, som er involvert i aktiveringen av dette.

1.3 Immunforsvar hos teleost fisk

Som alle andre organismer har fisk medfødt immunitet og i tillegg har ekte beinfisk (teleost fisk) en unik immunologisk evolusjonær posisjon, siden de var de første dyrene som utviklet RAG (*rekombinasjon-aktiverende gener*)-basert adaptiv immunitet, som innebærer MHC-molekyler og rekombinasjon av genene somkoder for T- og B-cellereseptorer (Bernstein, Schluter, Bernstein & Marchalonis, 1996; M. F. Flajnik & Kasahara, 2010). Denne utviklingen regnes å ha skjedd over en kort evolusjonær periode referert til som det immunologiske «Big Bang» (Martin F Flajnik, 2018; Kasahara, 1997). Fisk har altså de samme grunnleggende byggesteinene for sitt adaptive immunforsvar som pattedyr (i.e svært variable B- og T-cellereseptorer og MHC-molekyler), men det kan imidlertid ikke antas at deres immunsystem og immunologiske prosesser fungerer på samme måte. Fisk har en unik anatomi, endret genetisk struktur, samt at evolusjonen av teleost fisk er svært divergent (Glasauer & Neuhauss, 2014). Store forskjeller mellom pattedyr gjenspeiler seg også i teleost fisks kaldblodige natur, samt det faktum at de har frittlevende larvestadier.

En viktig forskjell mellom menneskers og beinfisks immunsystem er dets organer. Menneskets primære immunorganer, hvor forløpere til lymfocytter modnes, er beinmarg og thymus, som gir opphav til henholdsvis B-celler og T-celler. Det er hovedsakelig lymfesystemet og milten som utgjør menneskets sekundære immunorgan, hvor antigenpresentasjon og resulterende aktivering av adaptiv immunitet foregår. Fisk derimot, har verken lymfesystem eller en hematopoetisk beinmarg. Det er imidlertid funnet at thymus trolig fungerer som primært immunorgan

for T-celle modning (Bowden, Cook & Rombout, 2005; Teruyuki Nakanishi, Shibasaki & Matsuura, 2015), samt at hodenyre trolig fungerer som primært immunorgan for B-celler (Chilmonczyk, 1992). Det er også registrert antigenpresentasjon i hodenyren (Press & Evensen, 1999), noe som gjør at den foreløpig også er karakterisert som sekundært immunorgan i fisk.

Medfødt immunforsvar responderer raskt, men tilpasses ikke spesifikt til det sykdomsfremkallende antigenet. Reseptorene i denne delen av immunforsvaret er kodet i genomet, derav medfødt immunforsvar, og forblir uendret gjennom organismens levetid. Det er flere fellestrekk mellom beinfisks og pattedyrs medfødte immunitet, eksempelvis fysiske barrierer, antimikrobielle enzymer, spesialiserte celler, eksempelvis makrofag-lignende celler (Grayfer, Hodgkinson & Belosevic, 2014; Kordon, Karsi & Pinchuk, 2019; Rieger & Barreda, 2011) og dendrittisk-lignende-celler (Bassity & Clark, 2012; Haugland, Jordal & Wergeland, 2012; Shao et al., 2015). Beinfisk har imidlertid et større utvalg av *mønster-gjenkjennelsesreseptorer* (PRR)(Jault, Pichon & Chluba, 2004; Roach et al., 2005), som er små molekulære elementer felles for ulike typer mikrober, eksempelvis peptidoglykan fra bakterier eller dsRNA fra virus.

På lik linje med pattedyr har fisk B-celler, som utgjør viktigste komponent i humoralt forsvar. B-celler produserer immunoglobuliner, også kjent som antistoffer, som nøytraliserer ekstracellulære mikrober. Sammenlignet med pattedyr har de imidlertid færre typer immunoglobuliner (Ig)(Bilal, Etayo & Hordvik, 2021), ingen isotypebytte (Patel, Banerjee, Samanta & Das, 2018), og B-celler utvikles og modens trolig i fiskens hodenyre, i kontrast til mennesker hvor de utvikles i beinmargen og germinale sentre i lymfeknuter. Hovedkomponenten i cellulært immunforsvar er T-celler. På like linje med pattedyr har beinfisk både konvensjonelle T-hjelpeceller, cytotoksiske T-celler, samt ukonvensjonelle $\gamma\delta$ T-celler (T. Nakanishi, Toda, Shibasaki & Somamoto, 2011; Tang et al., 2021; Wan et al., 2017). I tillegg har de MHC-molekyler, men disse kompleksene er en del av fiskens immunitet man fremdeles vet lite om. En stor forskjell mellom mennesker og fisk er at i pattedyr ligger alle ulike MHC gener samlet på en plass i genomet og MHC klasse I og MHC klasse II gener er genetisk linket i MHC lokuset (Ohta et al., 2000). Hos fisk derimot, finner vi MHC klasse I og klasse II gener på ulike kromosomer (Stet, Kruiswijk & Dixon, 2003), derav blir de i enkelte tilfeller referert til som MH-gener (*Major Histocompatibility*).

En annen forskjell mellom pattedyr og beinfisks immunforsvar er deres repertoar av interferoner (IFN), som er en av immunsystemets regulerende signalmolekyler. Det finnes hovedsakelig to hovedtyper av interferoner, type I og II. Type I produseres av virusinfiserte vertsceller for å

varsle celler i nærheten og indusere antiviralt forsvar, som er en av de første reaksjonene til en virusinfeksjon ((Abbas et al., 2019) Type II (IFN- γ) har en viktig funksjon i det cellulære immunforsvaret, og aktiverer T-celler og NK-celler (Abbas et al., 2019). Særlig type I IFN er en svært viktig komponent i de tidlige faser av en viral infeksjon. Type I interferoner hos mennesker er IFN-a og IFN-b mens atlantisk laks har seks ulike type I interferoner (IFN-a, IFN-b, IFN-c, IFN-d, IFN-e, IFN-f) (B. Robertsen, 2018), og dette brede utvalget av interferoner hos atlantisk laks kan tyde på at de spiller en svært viktig rolle i immunresponsen. IFN-a har flere ganger vist oppregulering ved virale infeksjoner (Kileng, Brundtland & Robertsen, 2007; Lauksund, Greiner-Tollersrud, Chang & Robertsen, 2015; McBeath, Snow, Secombes, Ellis & Collet, 2007) så vell som IFN-c og IFN-d (Svingerud et al., 2012) (Chang, Jenssen & Robertsen, 2016). Hos pattedyr vet man at type I interferoner er med på å oppregulere uttrykket av klassiske MHC klasse I- molekyler og studier indikerer at situasjonen i fisk er lignende (C. Xu, Evensen & Munang'andu, 2019).

1.4 Immunovervåkning

T-celler kan, i motsetning til B-celler, bare gjenkjenne peptide antigen ved at vertsceller selv fremviser antigen på spesielle membrankomplekser. T-celler har MHC-restriksjon, som betyr at de er kritiske avhengig av MHC-molekyler for å bli aktiverte (Zinkernagel & Doherty, 1974), dermed spiller disse molekylene en uunnværlig rolle i aktivering av cellulær immunitet og kampen mot virusinfeksjoner.

Det finnes hovedsakelig to typer klassiske MHC: klasse I og klasse II. MHC klasse II finnes bare på APC-er (B-celler, makrofager og dendritiske celler). I motsetning til MHC klasse II, blir klassisk MHC klasse I uttrykt på membranen til alle nukleære celler til enhver tid. En annen forskjell er at MHC klasse II presenterer peptider av ekstracellulært opphav, mens MHC klasse I presenterer peptider avledet fra intracellulære proteiner. Vanligvis presenterer disse cellenes egne peptider, men ved en virusinfeksjon vil vertsceller presentere virale antigener på sine MHC-molekyler til naive T-celler som har en T-cellereseptor (TCR) med høy affinitet til antigenet, og disse T-cellene vil da gjennomgå klonal ekspansjon (Abbas et al., 2019)

De viktigste typene T-celler er T-hjelpeceller og cytotoksiske T-celler. T-hjelpeceller aktiverer makrofager, samt frigjør cytokiner, som fungerer som varselsignaler til andre celler, noe

som øker inflammatoriske responser i organismen. T-hjelpecellene uttrykker også et CD4 glykoprotein på overflaten som fungerer som en koreseptor, og blir derfor også kalt CD4⁺ T-celler. Cytotoksiske T-celler gjenkjenner infiserte vertsceller og dreper disse ved hjelp av cytotoxicke enzymer. De uttrykker koreseptoren CD8 og blir dermed også kalt CD8⁺ T-celler. T-celle reseptoren som blir uttrykt på de ulike typene T-celler gjenkjenner spesifikke MHC-molekyler, CD8⁺ T-celler gjenkjenner antigener på MHC klasse I og CD4⁺ T-celler gjenkjenner antigener på MHC klasse II. Ved interaksjon mellom en MHC og TCR, vil TCR-en binde til MHC-ens membrandistale domene, samt antigenet, mens CD4/CD8 koreseptoren binder til MHC-ens $\alpha 3$ -kjede. Modne, men ikke-aktiverede T-celler kalles naive T-celler, og disse sirkulerer rundt lymfesystemet i påvente av å bli presentert et antigen på et MHC-molekyl i lymfeknutene. Dette er kjent som immunovervåkning.

1.5 Rollen til MHC i T-celle utviklingen

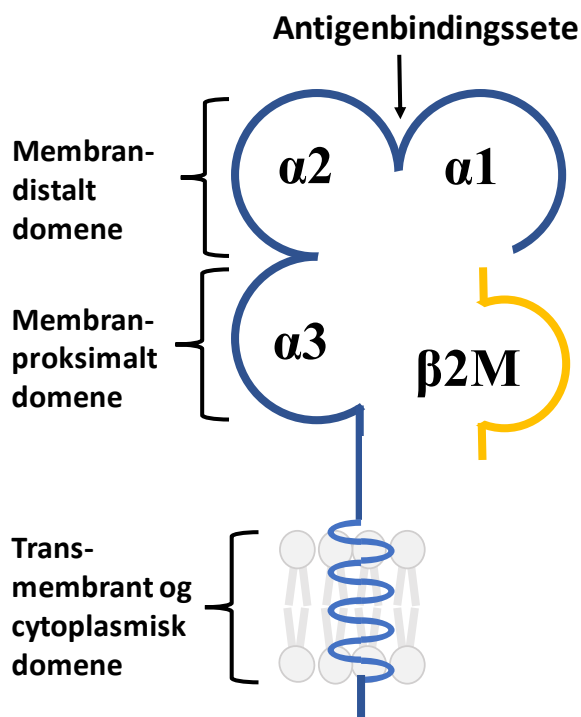
MHC er nøkkelen til aktivering av T-celler, men disse kompleksene spiller også en viktig rolle i utviklings- og selekteringsfasen av T-celler. Rekombinasjonen av T-celle-reseptor genene (TR) ved hjelp av RAG, kan gi opphav til tilnærmet uendelig mange, unike TCR. Dette gjør at organismen til enhver tid har T-celler med TCR med spesifisitet for omtrent hvilket som helst antigen. Den omfattende produksjonen av tilfeldige TCR gjør at det også kan oppstå TCR-er som ikke har affinitet til vertens MHC-molekyler, eller som binder organismens egne peptider, noe som vil føre til autoimmunitet. Det foregår derfor en grundig seleksjonsprosess i tidlige stadier i T-celle utviklingen. Hos pattedyr foregår denne seleksjonsprosessen i thymusens cortex og medulla. Hvorvidt fiskens thymus har samme anatomiske struktur er fortsatt diskutabelt (Barraza et al., 2020).

I forkant av denne seleksjonsprosessen uttrykker T-cellen både CD4 og CD8 koreseptoren. I thymusens cortex blir TCR-en presentert for vertens MHC klasse I og II, der er målet at TCR-en skal binde. Dette blir kalt positiv seleksjon. Affinitet for vertens MHC er høyst nødvendig for at TCR-en senere skal kunne gjenkjenne antigener på disse senere. Merk at det i denne sammenhengen også er TCR-ens binding til MHC-en som bestemmer hvilken type T-celle denne vil bli. Dersom TCR-en og CD4-koreseptoren binder sterkest til en MHC-klasse II blir dette en CD4⁺-celle, som videre vil utvikle seg til en hjelpecelle dersom den kommer gjennom neste selektering. Dersom sterkest binding til MHC klasse I er dette en CD8⁺-celle, og denne vil dermed bli en cytotoxic T-celle. Ingen binding, eller for sterk binding til vertens MHC fører til apoptose. Videre migrer T-cellen til thymusens medulla, hvor den blir presentert for

vertens egne peptider på MHC-molekyler, der målet er at TCR-en ikke skal binde, altså negativ seleksjon. Dersom TCR-er binder her vil dette føre til at T-cellen gjenkjenner vertens egne peptider som antigener og starte en immunrespons mot disse.

1.6 Klassisk MHC klasse I

Hvert klassisk MHC klasse I-molekyl består av en α -kjede som er ikke-kovalent assosiert med et protein kalt β_2 -mikroglobulin(B2M). α -kjeden består av tre ekstracellulære domener, α_1 , α_2 og α_3 , i tillegg til et kort transmembrant og cytoplasmisk domene. α_1 - og α_2 -domenene på alfa-kjeden utgjør peptid-bindingssete, som kan bære peptider på 8-9 aminosyrer(Abbas et al., 2019). α_1 - og α_2 -domenene utgjør sammen det membrandistale domenet, mens α_3 utgjør det



Figur 1: Illustrasjon av et klassisk MHC klasse I molekul med alfa-kjeden, med sine α_1 -, α_2 -, og α_3 -domener, samt et transmembrant og cytoplasmisk domene. B2M er assosiert med α_3 -kjeden.

membranproksimale domenet. Gulvet i peptidbindingssetet, som primært består av ulike β -strands, er regionen som primært binder peptider for å fremvise til T lymfocytter. Veggene i kløften, som består av to α -helikser, er regionen som binder T-celle reseptoren. De mest polymorfe områdene i MHC klasse I molekyler er lokaliserte i α_1 - og α_2 -domenene i alfa-kjeden. I klassisk MHC klasse I antigenbindingssete finnes det kjennetegnende MHC klasse I peptidforankringsrester samlet i to grunne lommer, A og F, plassert i hver ende av det antigenbindingssetet som er svært evolusjonært bevart (Bjorkman et al., 1987). Noen av disse polymorfe egenskapene bidrar til variasjoner i gulvet til peptid-binding. Andre polymorfe egenskaper bidrar til variasjon i veggene på MHC-en og dermed variasjon i dens evne til å binde T-celler. α_3 -domene er invariant, altså det forblir uendret, og innehar et bindingssete for CD8 T celle koreseptoren, men ikke CD4 (Abbas et al., 2019).

1.7 Ikke-klassisk MHC og ukonvensjonelle T-celler

Det er generelt mange likheter mellom strukturen til klassiske MHC klasse I og ikke-klassisk MHC klasse I, derav α -kjeden med bindingssete og et transmembrant- og cytoplasmisk domene. Det er derimot ikke alltid at de innehar β_2 -mikroglobulin eksempelvis MHC klasse I kjede relatert protein A og B (MIC-A og MIC-B) (Halenius, Gerke & Hengel, 2014). I motsetning til klassisk MHC er ikke-klassiske MHC gener som regel ikke-polymorfe. Hos pattedyr har disse ikke-polymorfe genene blitt betegnet som ikke-klassiske MHC dersom de ligger i MHC-lokuset, mens de som ligger utenfor MHC-lokuset blir kalt «MHC-klasse I-lignende». Eksempler på ikke-klassiske klasse I-molekyler hos mennesker er HLA-E, mens CD1 og MR1 er «MHC-klasse I-lignende» (D'Souza et al., 2019). Selv om de strukturelt ligner klassisk MHC klasse I, har mange ikke-klassiske molekyler andre funksjoner enn peptidpresentasjon (D'Souza et al., 2019). Videre i oppgaven blir både ikke-klassiske MHC og «MHC-klasse I-lignende» referert til som ikke-klassisk MHC.

I tillegg til CD4+ og CD8+ T-celler, finnes det også andre, mindre utforskede, subpopulasjoner av T-celler, ofte kalt ukonvensjonelle T-celler. Hos mennesker finnes det tre hovedgrupper av ukonvensjonelle T-celler; naturlige dreper T-celler (NKT-celler)(Taniguchi, Harada, Kojo, Nakayama & Wakao, 2003), mukosa-assosierte invariante T-celler (MAIT-celler)(Treiner et al., 2003), og $\gamma\delta$ T-celler (Treiner et al., 2003). I motsetning til klassiske MHC-spesifikke T-celler, viser ukonvensjonelle T-celler generelt begrensede TCR-repertoarer. Hos mennesker har man sett at ikke-klassiske MHC klasse presenterer ikke-peptider til ukonvensjonelle T-celler. Eksempelvis presenter HLA-E deler av MHC klasse I- molekyler til NK-celler (Lee, Goodlett, Ishitani, Marquardt & Geraghty, 1998; Lee, Llano, et al., 1998). MR1 presenter riboflavin intermedierer til mukosale assosiert invariante T celler (MAIT-celler) og CD1e presenterer (glyko)lipid-antigener til like ukonvensjonelle $\alpha\beta$ T-celler og $\gamma\delta$ -TCR (E. J. Adams & Luoma, 2013; De Libero & Mori, 2010) (Facciotti et al., 2011).

Menneskers lipid-presenterende CD1-familie har gener for 5 ulike ikke-klassiske MHC klasse I molekyler, CD1a, CD1b, CD1c, CD1d og CD1e (Moody, Zajonc & Wilson, 2005). CD1a-d er uttrykt på overflaten membranen og presenterer lipider. CD1 blir trafikkerte intracellulært via endosomale prosesseringsveier, og blir videre spaltet til et løselig protein(Ly & Moody, 2014).

1.8 MHC klasse I i fisk

Både MHC klasse I og klasse II gener er til stede i beinfisk (teleoster). Ved bruk av fylogenetisk komparativ metode har MHC klasse I sekvenser blitt klassifisert i forskjellige avstamminger, eller linjer. Man har hittil funnet seks slike linjer hos fisk; U, Z, S (Shum et al., 1999), L (Dijkstra et al., 2007), P og nylig H (Grimholt, Tsukamoto, Hashimoto & Dijkstra, 2019). I U-linjen finnes ett gen som koder for klassisk MHC I (UBA), samt flere ikke-klassiske gener. Man vet svært lite om reguleringen av klassisk MHC klasse I hos fisk, men det er imidlertid gjort en studie med regnbueørret som viste oppregulering UBA, samt andre type I IFN gener som respons på infeksjøs hematopoetisk nekrosevirus (IHNV) (Hansen & La Patra, 2002). Det er påvist at klassiske MHC klasse I transkripsjoner hos fisk blir oppregulert i alt vev som respons på SAV3 infeksjon (C. Xu et al., 2019; Cheng Xu, Guo, Mutoloki, Haugland & Evensen, 2012).

Z, S, L, P og H-linjene koder utelukkende for ikke-klassisk MHC. U- og Z-linjen har i de fleste tilfeller beholdt det karakteristiske peptidforankringslommer i $\alpha 1$ og $\alpha 2$ -domenene til MHC klasse I, mens S-, L- og P-linjen mangler disse lommene, noe som tyder på at disse molekylene binder ikke-peptid ligander, eller ingen ligand (Grimholt et al., 2015). Atlantisk laks (*Salmo salar* L.) har gener fra alle 5 linjene (P-linjen hos laks er bare identifisert som ett partiell gen), og har over 20 full-lengde, svært divergerende, ikke klassiske MHC klasse I gener, noe som gjør dem numerisk overlegne klassiske MHC klasse I (Grimholt & Lukacs, 2021). Deres funksjon er i stor grad ukjent, men basert på deres klare flertall sammenlignet med gener for klassisk MHC kan tenkes at disse har en langt mer betydelig rolle i beinfiskens immunforsvar enn tidligere antatt.

1.9 Ikke-klassiske MHC klasse I L-linjegener

Blant linjene for ikke-klassiske MHC klasse I har L-linjen flest full-lengde gener hos laksefisk (Grimholt & Lukacs, 2021). Felles for alle L-linjegener er mangel på typiske peptidforankrings seter og en relativt høy hydrofobisitet i ellers peptidbindende $\alpha 1$ og $\alpha 2$ -domener (Grimholt et al., 2015). Dette kan tyde på at disse molekylene presenterer hydrofobe ligander, eksempelvis lipider, på en måte som ligner pattedyrs MHC klasse I-lignende CD1-familie (Grimholt et al., 2015). I tillegg til at L-linjen som har flest gener for ikke-klassiske MHC hos laksefisk, er det også store variasjoner i antall L-linjegener mellom ulike arter av laksefisk (Grimholt & Lukacs, 2021). Eksempelvis har atlantisk laks 16-linjegener, mens brunørret har 25 (Grimholt &

Lukacs, 2021). Denne store antallsvariasjonen mellom artene kan ha sammenheng med L-linjegenes funksjon.

For å få bedre innsikt i laksefisks ikke-klassiske MHC klasse I, samt deres immunologiske betydning, må man se på genutvalget, og i denne sammenhengen er det viktig å forstå forskjell på funksjonelle, partielle og pseudogener. Funksjonelle gener i full-lengde uten stoppkodon eller mutasjoner, pseudogener har enten stoppkodon på én eller flere plasser i genet, eller har mistet/fått innsatt spesifikke nukleotider som gjør at genet ikke kan bli omgjort til mRNA. For partielle gener, finnes bare deler av genet i genomet, ofte som følge av flere mutasjoner. Atlantisk laks (*Salmo salar*) har minst 16 ulike L-linjegener, hvorav 6 er funksjonelle (LDA, LCA, LIA, LGA1, LHA, LFA), 4 er pseudogener, og 8 er enten for korte til å identifiseres (Grimholt & Lukacs, 2021; Svenning et al., 2019).

1.10 Regulering av L-linjegener hos atlantisk laks (*salmo salar*) ved SAV3-infeksjon

I en av de få studiene gjort på reguleringen av L-linjegener i atlantisk laks har de vist seg å respondere noe ulikt på patogenstimulering, noe som indikerer at de har ulike roller i forsvaret mot patogene mikrober (Svenning et al., 2019). I denne studien ble L-linjereguleringen i ulike organer fra atlantisk laks, infisert med SAV3 og *P. salmonis* kartlagt, resultatene ble sammenlignet med IFN type I-uttrykk i samme organer, samt at det ble gjort in vitro forsøk med ulike patogen-assosierte molekylære mønster (PAMP).

Ved infeksjon med SAV3 ble det registrert en kraftig, og systemisk oppregulering av LIA tidlig i infeksjonsløpet. Videre ble det funnet at LGA og LHA også ble oppregulert ved SAV3-infeksjon, men på en mer vevsspesifikk måte, der begge var oppregulerte i hodenyre, med ulik kinetikk, samt at LHA ble signifikant oppregulert i leveren. Til sammenligning var oppreguleringen av L-linjegene beskjedne ved *P. salmonis* infeksjon. Utskillelsen av IFN-a, b og c ble målt i samme organer. Det var tydelig at ingen av interferonene ble bemerkelsesverdig oppregulert ved *P. Salmonis*-infeksjon, men for SAV3 derimot, var interferonoppregulering et faktum i alle organer (bortsett fra gjeller), noe som korresponderte med L-linjeuttrykket i samme organ. I tillegg ble lakseceller in vitro stimulerte med polycytidylsyre [poly (I:C)] og R848, som er virale PAMPs, samt CpG ODN, som er assosiert med bakterielle PAMP. Det ble observert oppregulering av L-linjegene for alle stimulanter, men mest for poly (I:C), som er en dsRNA-

mimikk som binder atlantisk laks sin TLR 3 (Alexopoulou, Holt, Medzhitov & Flavell, 2001), samt TLR 22 (Matsuo et al., 2008).

Resultatene fra denne studien gir oss et innblikk i hvordan L-linje-genene reguleres. Noe som underbygger L-linje-genenes rolle som antigenpresenterende MHC-komplekser i cellulært forsvar er den beskjedne oppreguleringen ved systemisk bakteriell infeksjon ved P-salmonis. Deres raske respons på SAV3-viruset, samt korresponderende deteksjon av høye type I IFN-nivåer, gir en indikasjon på L-linje-geners rolle i første del av et infeksjonsløp og styrker hypotesen om at disse fungerer som **tidligere varslingsignal**. Det er fremdeles svært mye man ikke vet om disse L-linjekompleksene, og da spesielt hva de eventuelt presenterer til andre celler, og hvorvidt de har en aktiverende effekt på immunceller. Det er nærliggende å tro at de, med sine in silico predikert hydrofobe bindingssteder, har en rolle i potensiell lipidpresentasjon til ukonvensjonelle T-celler.

2 Problemstilling

Virusvaksinene til atlantisk laks fungerer ikke tilstrekkelig mot virussykdommene som norsk oppdrettsnæring står ovenfor. Noe av grunnen til dette kan være at vaksinene er bygget slik at de i all hovedsak aktiverer det humorale immunforsvaret. Nøkkelen for best mulig beskyttelse mot virussykdommer er å aktivere det cellulære immunforsvaret, altså T-cellene, som er strengt avhengig av MHC-molekyler for å bli aktiverte. Det er derfor høyaktuelt å utforske laksens repertoar av MHC-komplekser, hvor ikke-klassiske MHC klasse I molekyler er i klart flertall. Blant disse ikke klassiske klasse I, har L-linjen nylig vist å ha en potensiell viktig rolle i antiviral respons. Unikt for denne linjen er at kompleksenes bindings seter er, *in silico*, karakterisert som relativt hydrofobe, noe som indikerer at de presenterer ikke-peptider, potensielt lipide antigener. Et langsiktig mål er å finne funksjonen til alle L-linje genene, men i dette prosjektet skal vi i all hovedsak fokusere på LGA og LIA, da dette er de to L-linje genene som har vist mest respons på viral infeksjon i atlantisk laks

For å studere proteiner og celler i immunforsvaret er spesifikke antistoffer viktig verktøy. Det finnes imidlertid få velkarakteriserte spesifikke antistoffer for fisk, så i dette prosjektet gjøres det et forsøk på å generere slike spesifikke antistoffer for LGA.

Hypotese: L-linje genene har en viktig immunologisk funksjon tidlig i den antivirale immunresponsen, som et ikke-klassisk MHC klasse I antigen presenterende molekyl.

Delmål

- Kartlegge reguleringen av L-linje gener i embryoniske celler avledet fra kongelaks (CHSE-celler), ved interferon- og SAV3-stimulering.
- Designe et plasmid som koder for Sasa-LGA (samt et tag-en og et antibiotikaresistensgen), som translateres effektivt av cellene.
- Optimalisere transfeksjonsprotokoll for transfeksjon med CHSE-celler.
- Gjennomføre konfokalmikroskopi for å visualisere transfekterte celler.
- Identifisere om Sasa-LGA blir uttrykt på cellemembranen eller i cytosol ved å gjennomføre proteinisolering av celler fra disse kompartmentene og videre western blot med spesifikke tag-antistoffer.
- Etablere stabile Sasa-LGA-uttrykkende cellelinjer.
- Undersøke om anti-LGA antistoffer produsert i kanin faktisk er spesifikke mot LGA.

3 Material og metoder

3.1 Reagenser og utstyr

Listet i appendix (seksjon 9).

3.2 Vedlikehold av CHSE-214 cellelinjen

Til alle forsøk i dette prosjektet ble Chinook Salmon Embryo-214 celler (CHSE-214) benyttet. CHSE-celler er embryoniske celler avledet fra kongelaks (*Oncorhynchus tshawytscha*), også kjent som Chinook-laks, og ble kjøpt av American Type Culture Collection (ATCC). Cellene er adherente, og enkle å dyrke i laboratoriet. De ble kultivert i monolag (enkle cellelag på bunnen av flasken, ikke oppå hverandre) med Leibovitz's L-15 medium (L15)(Gibco™) med 1 % Penicillin/Streptomycin (P/S)(Gibco™), og 8 % Fetal bovine serum (FBS)(BioWest)(L-15⁺). P/S hindret fremvekst av bakterier i cellekulturen, og FBS er svært næringsrikt og blir lagt til for å øke celleveksten. Cellene ble oppbevart ved 20°C og mediet ble byttet hver 3-4 dag. I perioder før større transfeksjoner, hvor det var behov for mye celler ble de kultivert med 10-12 % FBS, for å øke veksthastigheten til cellene.

Når cellene vokste seg konfluente, ble det benyttet Trypsin-EDTA Solution (Sigma-Aldrich®), og celler ble splittet etter behov. I forkant av trypsinering ble cellene vasket med Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (PBS)(Biowest), for å fjerne FBS og døde celler. Trypsin er et enzym som hemmer overflateproteinene som gjør cellene adherente. Cellene vil dermed løsne fra flasken med enzymet til stede. I dette prosjektet ble det brukt 5x trypsin fra Trypsin-EDTA solution (Sigma-Aldrich®). Trypsinet fikk virke i 3-5 minutter, til alle cellene har løsnet. For å hemme trypsinet blir det lagt til L-15⁺. FBS inneholder en protease inhibitor, α 1 antitrypsin, som hemmer trypsinaktiviteten. Cellene ble regelmessig splittet med nytt media i et 1:3 forhold.

I forkant av forsøk ble antall celler bestemt ved hjelp av Countess™ II (Invitrogen™). Celler ble spunnet, og resuspendert i 1-5 ml L-15⁺. 10 μ l fra celleløsningen og 10 μ l med Trypan Blue Stain (0.4 %)(Invitrogen™) ble overført til en 1,5-ml-tube og forsiktig mikset ved pipettering. 10 μ l fra denne løsningen ble overført til cellcount-kammeret. Kammeret ble plassert i Countess™ II-maskinen med et resulterende antallsanslag på celler/ml. Dette ble gjort to ganger og snittet av disse to tallene ble brukt som utgangspunkt videre.

3.3 CHSE stimulering med rekombinant interferon

Rekombinant interferon var tilgjengelig på laboratoriet fra tidligere arbeid. Rekombinant IFN- α (rIFN- α) og IFN- γ (rIFN- γ) ble produsert i HEK293-celler som tidligere beskrevet i (Svingerud et al., 2012), og IFN γ ble produsert i E.coli som beskrevet i (Børre Robertsen, Greiner-Tollersrud & Jørgensen, 2019). CHSE-celler ble sådd med 150 000 celler per brønn i 24-brønnersbrett, og de vokste i L-15+ over natten til rundt 70 % konfluens. Celler ble stimulert i duplikat med 200 U rIFN α , 200 U rIFN β , 200 U rIFN γ , 1 ng/ml rIFN- γ eller kombinasjoner med 200 U rIFN α +1ng/ml rIFN- γ , 200 U rIFN γ +1 ng/ml rIFN- γ og kultivert ved 20°C i 6, 12, 24 og 48 timer før høsting. Celler vokste i media alene ble høstet på korresponderende tidspunkt som kontroll. Ved høsting ble media først fjernet fra cellene, som videre ble vasket med 1 ml PBS før de ble samlet med 350 μ l med RPL Buffer (RNeasy® Mini Kit, Qiagen) og oppbevart ved -20°C frem til RNA-isolering.

3.4 In vitro SAV3 infeksjon av CHSE

Salmonid alfavirus subtype 3 (SAV3) (PDV-H10-PA3, fra Professor Øystein Evensen, Norwegian University of Life Sciences) ble oppformert i CHH-1-celler i L-15+ med 5 % FBS ved 15°C av overingeniør Guro Strandskog v/Norges Fiskerihøgskole. Virus ble titrert i de samme cellene ved hjelp av protokollen som blir beskrevet i (Strandskog et al., 2011). Det ble sådd ut 150 000 CHSE celler per brønn i 24-brønnersbrett, og cellene fikk vokse natten over til cirka 70 % konfluens i L15+ media (P/S, 8 % FBS). L-15+ kulturmedia ble fjernet og erstattet med serum og antibiotikafritt L-15 med 1 *multiplicity of infection* (MOI) av SAV3, som betyr at forholdet mellom virioner per celler er 1:1. I kontrollbrønner ble samme medie uten virus brukt. Dette ble inkubert i 3-4 timer, før virusmedia ble fjernet og erstattet med L-15+ 2 % FBS. Det ble gjort uttak på fem tidspunktet: 1 *days past infection* (dpi), 3 dpi, 7 dpi, 9 dpi, 12 dpi. Ved høsting ble mediet første fjernet fra cellene før de ble samlet med 350 μ l med Quiagen cellelyseringsbuffer (RLT buffer), som inneholder 20 μ l DDT, og videre lagret ved -20 °C frem til RNA-isolering.

3.5 RNA-isolering

Total RNA ble isolert fra stimulerte og viralt infiserte CHSE-celler. For RNA-isolering ble RNeasy® Mini Kit (Qiagen: katalognr.74104) benyttet, og Quick-Start Protocol RNeasy® Mini Kit, Part 1 ble fulgt. Prøver som inneholdt CHSE celler i cellelyseringsbuffer ble tint og mikset med et 1:1 volum med 70 % etanol og overført til RNeasy mini spinn kolonner. I tillegg ble vask med vaskebuffer (Buffer RW1) gjennomført. Opsjonell sentrifugering i 1 min med nytt 2 ml oppsamlingsrør for å sikre tørr membran ble gjennomført, og avslutningsvis ble det brukt 30 µl elueringsbuffer (RPE). Etter RNA-isolering ble RNA-konsentrasjonen (oppgett i µg/µl) for hver prøve målt med maskinen NanoDrop 1000 Specrophotometer (Thermo Scientific™), og ble videre oppbevart ved -80°C. RNA-konsentrasjonen rangerte mellom 65-190 ng/µl og alle prøver hadde en OD260/280 mellom 2,05-2,19.

3.6 DNase Treatment og cDNA syntese

Hver prøve ble tilsatt 1 µl DNase (stock-konsentrasjon på 1 unit/ µl, 1 µl), 1 µl Reaction Buffer with MgCl₂ for DNase I (10X) (Thermo Scientific™). Videre ble det lagt til RNA. Merk at antall µg RNA som ble benyttet var avhengig av prøven med laveste RNA-konsentrasjon, slik at alle prøver fra samme eksperiment hadde samme RNA-konsentrasjon. RNA prøvenes konsentrasjon varierte mellom 500 og 900 ng avhengig av det enkelte eksperimentet. Avslutningsvis ble det lag til Water, RNase-Free (Thermo Scientific™) opp til 10 µl.

Prøvene inkuberte i en PCR-maskin ved at 37 °C i 30 minutter. Videre ble det lagt til 1 µL med EDTA (0.5 M), pH 8.0 (Thermo Scientific™) og prøvene ble inkuberte ved at 65 °C i 10 minutter. EDTA binder metallioner og hemmer dermed DNase-aktiviteten. Prøver ble lagt på is og cDNA-syntese blir foretatt. For å omgjøre RNA-prøvene til cDNA ble kitet TaqMan™ Reverse Transcription Reagents (Invitrogen™) brukt. Det ble laget en mastermix av komponentene i kitet (se appendix) og 10,4 µl mastermix og 9,6 µl RNA-prøve inkuberte i Thermal Cycler 2720 (Applied Biosystems) på følgende måte; 10 min ved 25 °C, 30 min ved 37 °C, 5 min på 95 °C, og deretter 4 °C. Syntetisert cDNA ble fortynnet 1:1 med molecular grade vann og brukt umiddelbart til qPCR eller oppbevart ved -20°C frem til videre bruk.

3.7 Kvantitativ RT-qPCR

For å kvantifisere gennuttrykk av forskjellige ikke-klassiske MHC klasse I L-linjegener, ble det benyttet SYBR-Green basert kvantitativ PCR (qPCR) ved hjelp av Fast SYBR™ Green Master Mix (Applied Biosystems™). Alle primere som ble brukt er listet i appendix. Elongeringsfaktor 1 α (EF1 α) ble brukt som referansegen (Ingerslev, Pettersen, Jakobsen, Petersen & Wergeland, 2006) og primere spesifiske for det norske salmonid alfavirus isolatet *Hav1 non-structural polyprotein gene* (nsP1) ble brukt til kontroll for vellykket virusinfeksjon (for SAV3-infeksjonsforsøket). Konsentrasjonen til alle primere var 10 μ M. Duplikate prøver ble satt opp i Micro Amp Fast 96-well Reaction Plate (0.1 mL) (Life Technologies, katalognr: 4346907). I vår reaksjon ble det brukt 5 μ l SYBRGreen 2,5 μ l primermix (som består av lik mengde forward og revers primer), samt 2,5 μ l cDNA. Det ble lagt plastfilm over brettet før det ble vortexet og spunnet ned i 1 min. Prøvene ble kjørt i 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems) med innstillingene Quatitative Comparative (CT) og SYBRGreen Fast.

3.8 Statistisk analyse

Ct-verdier fram qPCR analysene ble brukt til å kalkulere forandringer i uttrykket av utvalgte gener etter IFN-stimulering og virusinfeksjon. Først ble alle Ct-verdier for hvert individuelle gen normalisert mot referansegenet EF1 α Δ Ct og det relative uttrykket ble kalkulert på følgende måte:

X= Ct verdi for spesifikt primerpar

Δ Ct= Ct x \div Ct EF1 α

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

Fold forandring ble regnet ut ved å ta relativt uttrykk av prøven ($2^{-\Delta$ Ct}) delt på gjennomsnittlig relativt uttrykk i kontroll ($2^{-\Delta$ Ct}).

Alle kvantitative data var basert på dupliserte prøver, og ble analysert i GraphPad Prism 9. Statistisk evaluering ble utført ved bruk av Tukeys multiple sammenligningstest etter en signifikant enveis ANOVA. For all analyse ble en p-verdi $> 0,05$ ansett som signifikant.

3.9 Antibiotikaresistenstest- CHSE

For å komme frem til det mest effektive antibiotikumet for CHSE seleksjon ble det gjort en antibiotikaresistenstest, og følgende antibiotikum ble benyttet; blasticidin, puromycin og G-418. Hvert antibiotikum ble testet ved to ulike konsentrasjoner; 10 µg/ml og 100 µg/ml. L-15⁺ media uten antibiotika ble brukt som kontroll. Hvert antibiotikum ble testet i kvadruplikat. CHSE-celler ble sådd med 0.25×10^6 celler, og 2 ml L-15⁺ media i 6-brønnersbrett og fikk vokse natten over. Dagen etter ble L-15⁺ mediet fjernet, og brønnene ble tilsatt L-15⁺ media supplert med ulike antibiotika. Cellene ble trypsinerte, telt og farget på fire ulike tidspunkter gjennom forsøket. Dette ble gjort med 3-4 dagers mellomrom i en tidsperiode på 14 dager. For hvert tidspunkt ble det tatt ut en kontroll, en 10 µl/ml, og en 100 µl/ml-antibiotikabehandlet brønn fra hvert antibiotikum. Brønnene ble skylt med 2 ml PBS og celler ble trypsinerte med 0,5 ml 5x Trypsin. Celler ble telt med Countess™ 3 Automated Cell Counter ved hjelp av Trypan Blue (Invitrogen™) farging, samt studert under mikroskop med samme fargestoff. Trypan Blue farger celler som er døde mørkeblå, mens celler som lever er lysere i farge og dermed kan man visuelt skille mellom døde og levende celler. Cellenes morfologi ble studert under mikroskop og bilder ble tatt. Det ble også kontinuerlig tatt bilder av cellene rett fra okularet, uten fargestoff.

3.10 Plasmid design

For at uttrykket og påfølgende deteksjon av *SasaLGA1* (LGA) skal bli optimalt er det viktig at plasmidet har et gunstig design. Det ble benyttet to ulike plasmid design i dette prosjektet; pcDNA3.1+C-LGA-eGFP og pcDNA3.1+C-LGA-Streptactin-Blasticidin. Hovedforskjellen mellom disse var ulike epitop-tagger og ulike antibiotikaresistensgener.

Ryggraden i begge plasmiddesign var pcDNA3.1+C-eGFP vektoren som ble kjøpt av GenScript®. pcDNA3.1+C-eGFP inneholder en *Cytomegalovirus* (CMV) promotor. Dette er en sterk promotor og blir derfor mye brukt i transfeksjon (Barrow, Perez-Campo & Ward, 2006). Promotoren skal drive uttrykket av *Sasa-LGA*. Etter promotoren ligger *multiple cloning site* (MCS). MCS består hovedsakelig av sekvensene som restriksjonsgener gjenkjenner, og det er også her man setter inn genet man ønsker å få uttrykt, mellom ønskede restriksjonsgengjenkjenningområder. *Sasa-LGA* er plassert mellom restriksjonsgengjenkjenningområder for re-

striksjonsenzymene *Hind III* og *BAMHI*. pcDNA3.1+C-eGFP har også et ampicillin resistensgen. Dette er nødvendig i prosessen med å oppformere plasmidet gjennom plasmid-transformasjon (Se seksjon 3.11). pcDNA3.1+C-eGFP har også en annen promotor fra Simian Virus 40 (SV40) som driver uttrykket av et resistensgen mot antibiotikumet neomycin.

pcDNA3.1+C-LGA-eGFP-plasmidet ble designet med et full-lengde *Sasa-LGA* (som inneholder ledersekvensen til alfakjeden, det transmembrane og cytoplasmiske domenet) klonet i samme leseramme som *Enhanced Green Fluorescent Protein* (eGFP)-taggen. Fordelen med eGFP er at man kan bruke dette som et hjelpemiddel til å bestemme om proteinet blir uttrykt, og også hvor i cellen proteinene befinner seg. Det finnes kommersielle monoklonale antistoffer til eGFP, noe som gjør det lettere å detektere *Sasa-LGA-eGFP*-komplekset ved en western blot. *Sasa-LGA* er 42,8 kDa og eGFP er 26,9 kDa noe som resulterer i ett *Sasa-LGA-eGFP* fusjonsprotein på 70,85 kDa. pcDNA3.1+C-LGA-Streptactin-Blasticidin skiller seg fra pcDNA3.1+C-LGA-eGFP ved at det inneholder full-lengde LGA i leseramme med en kort glycin-linker og *Twin Strep-Tactin II tag* (strep-tag), etterfulgt av to stoppkodon. Strep-taggen er 3,23 kDa, noe som resulterer i et kompleks på 45,53 kDa. Dette genet inneholder også et resistensgen for blasticidin, i stedet for neomycin. Merk at eGFP-taggen er en del av ryggraden til pcDNA3.1+C-eGFP, men i pcDNA3.1+C-LGA-Streptactin-Blasticidin plasmidet har vi satt to stoppkodon fremfor eGFP.

3.11 Plasmid transformasjon og isolering

For å oppformere plasmidet ble Stellar™ Component Cells (Takara) brukt i henhold til produsentens protokoll. Stellar celler er en *Escherichia coli* (*E. Coli*) HST08 stamme som gir høy transformasjonseffektivitet. Kort forklart ble 5 ng plasmid DNA inkubert med 50 µl med Stellar Competent Cells i 30 minutter på is, etterfulgt av 45 sekunder varmesjokk ved 42 °C. Dette varmesjokket gjør membranen mer løs og dermed blir det mulig for plasmidet å trenge inn i bakterien. Umiddelbart etter varmesjokket ble 500 µl SOC media lagt til plasmid/bakteriemixen etterfulgt av en 30 minutters inkubering ved 37°C før miksen ble platet ut på agarplater bestående av *Lysogeny Broth* (LB) og ampicillin (AMP) og inkubert ved 37 °C over natten. Ampicilinkonsentrasjonen i agarplatene ble laget med 100 µg/ml.

Påfølgende dag ble bakterier fra én enkelt koloni på platen overført til kolbe med 25 ml LB AMP og dette fikk stå på risting ved 37 °C natten over, etterfulgt av gjennomføring av plasmid

isolering med *GenElute™ Endotoxin-free Plasmid Midiprep Kit* (Sigma-Aldrich®). Her ble selve plasmidet isolert fra cellekomponenter, samt eventuelle endotoksiner og kontaminanter. Kort forklart ble LB media først spunnet ned i sentrifuge og den resulterende cellepelleten ble resuspendert og cellene lyserte, slik at plasmidet ble fritt, løsningen ble behandlet med endotoxin-removal solution og videre ble vårt DNA-plasmid isolert i en kolonne.

Det ble gjort enkelte unntak fra fra *GenElute™ Endotoxin-free Plasmid Midiprep Kit*-protokollen. Det første som ble gjort var å legge til 3 ml med Column Preparation Solution ti kolonnen, og den ble ikke spunnet før den skulle bli brukt videre. Dette var for å gi kolonnen tilstrekkelig tid til å bindes. For å få maksimal plasmid-konsentrasjon ble det anvendt to ulike tilnærminger. Ved plasmid-isolering med pcDNA3.1+C-LGA-eGFP ble det brukt en to-trinns eluering, først ble det lagt til 300 µl med endotoksinfritt vann, prøven ble spunnet og flow-throughen ble oppsamlet. Videre ble det lagt til ytterligere 200 µl med endotoksinfritt vann og den resulterende flow-throughen ble oppsamlet. Ved plasmid-isolering med pcDNA3.1+C-LGA-Streptactin-Blasticidin ble det lagt til 500 µl med endotoksinfritt vann som var oppvarmet til 65 °C. Plasmid-isolatene ble oppbevart ved -20 °C.

3.12 Plasmid fordøyelse

For å verifisere at Sasa-LGA er til stede i plasmidet benyttet vi oss av plasmid-fordøyelse, som baserer seg på utnyttelsen av restriksjonsenzymmer som spalter DNA ved spesifikke basesekvenser. Dermed vil Sasa-LGA-genet bli fritt fra resten av plasmidet, og plasmidet er ikke lenger sirkulært formet, men lineært. Videre kjører man prøven i en agarosegel. DNA er negativt ladet og vil dermed bevege seg mot positivt ladet side av gelen. Mindre molekyler vil bevege seg raskere og DNA blir dermed sortert etter ulik lengde i en slik gel.

1 µg pcDNA3.1+C-LGA-Streptactin-Blasticidin, 1U med Hind III og BAMH1 (Thermo Scientific™), samt 10x Fast Digest Buffer (10X)(Thermo Scientific™) med et totalt volum på 20 µl ble inkubert i 37 °C i 30 minutter. Det ble lagt til 4 µl med størrelsesmarkøren *GeneRuler Express DNA Ladder* (Thermo Scientific™), og prøvene ble kjørt på 1 % agarosegel. Agarosekorn (*TopVision Agarose*) (Thermo Scientific™) ble oppløst i mikrobølgeovn og avkjølt i 10 minutter. Det ble tilsatt 5 ul med ethidiumbromid, som farger nukleinsyrer, og dermed muliggjør visualisering av disse. Prøvene ble kjørt på 125 volt i 20-25 minutter og visualiserte i maskinen VWR® Smart3 (VWR™ Collection).

3.13 Transfeksjon

Under en transfeksjon blir fremmed DNA, ofte i form av et sirkulært plasmid, ført inn i en celle. Formålet er å få cellen til å uttrykke genene i plasmidet. I dette prosjektet var hovedmålet med transfeksjonen å få CHSE-celler til å uttrykke Sasa-LGA. Cell Line Nucleofector™ Kit T (Lonza), samt maskinen Amaxa™ Nucleofector™ II (Lonza) ble benyttet til transfeksjon i dette prosjektet.

CHSE-celler vokste i L-15+ til 80-100 % konfluens, og ble trypsinerte og pelletert ved sentrifugering i 5 min ved 200 g. Antall celler i prøven ble bestemt ved hjelp av Countess™ II (Invitrogen™), og celler per transfeksjon varierte mellom 2-4 millioner (se appendix). Ønsket antall celler ble fordelt i rør, spunnet på 200 g i 5 minutter og supernatanten ble fjernet. For hver transfeksjon ble det forberedt en mix med 100 µl Nucleofector™ Solution T og 1100 ng plasmid. Dette ble lagt til cellene, resuspendert og celler, plasmid og Nucleofector™ Solution T ble overført til kyvette. For selve transfeksjonen ble program 20 tatt i bruk. Transfeksjon er hardt for cellene og de ble behandlet ekstra forsiktig i dagene etter en transfeksjon. Kulturmediet ble byttet etter 24 timer.

3.14 Konfokalmikroskopi

Gjennomføringen av konfokalmikroskopi ble assistert av PhD-kandidat Miroslav Bobrik. Ved konfokalmikroskopi ble CHSE-celler transfekterte med pcDNA3.1+C-LGA-eGFP-plasmidet og cellene ble sådd i 6-brønnersbrett med dekkglass i bunnen. Etter 48 timer ble mediet i brønnen forsiktig fjernet. Dekkglasset med celler festet på seg ble deretter fiksert ved hjelp av for å stoppe nedbryting av cellene og fryse cellulære proteiner og subcellulære strukturer. For å fikse cellene ble de inkubert med 4 % paraformaldehydløsning fortynnet i PBS i 20 minutter etterfulgt av 0,2 % (v/v) Triton X-100 i 10 minutter. Videre ble cellene forsiktig skylt med PBS for å fjerne fikseringsmiddelet. De fikserte adherente cellene ble deretter montert omvendt på glass-sliden ved å bruke Antifade-monteringsmiddel inkludert DAPI for å farge cellekjernene (ProLong Diamond Antifade Mountant with DAPI, Thermofisher Scientific™) og sliden ble videre forseglet.

For visualisering via konfokal laserskanningsmikroskopi, ble glassplaten plassert på objektivbordet i invertert posisjon og skannet ved bruk av passende kombinasjon av lasere, barrierefiltre

og dikroisk speil (For GFP/TRITC, laserkombinasjonen: Ar488 nm+HeNe543 nm; barriere filtre: BA510IF+BA530RIF for kanal 1, BA565IF+BA590 for kanal 2; dikroisk speil: DM488/543). Bildene av de transfekterte cellene inkluderer grønn farge fra eGFP og blå for kjernefarging.

3.15 Protein-isolering

For protein-isolering ble Mem-PER™ Plus Membrane Protein Extraction Kit (Thermo Scientific™) benyttet. 3 dager post transfeksjon ble celler ble overførte til 15-ml-tuber, og ble pelletert ved sentrifugering i 5 min på 300 g. Det ble lagt til 3 ml Wash Solution, og cellene ble resuspendert ved forsiktig pipettering. Celler ble spunnet på 300 g i 10 minutter. Det ble igjen lagt til Wash Solution og cellene ble resuspendert i dette. Løsningen ble overført til et 2-ml-rør og ble igjen spunnet på 300 g i 10 minutter. Supernatant ble kastet.

Det ble lagt til 100 µl permeabiliseringsbuffer per 1 million celler og prøven ble vortexet, etterfulgt av 10 minutter inkubering på 4°C. Videre ble prøven sentrifugert på 16, 000 g ved 4°C, og supernatanten overført til egen tube (merket cytosolisk protein-lysat), mens pelleten foreløpig ble lagt på is. Det ble lagt til Halt™ Protease Inhibitor Cocktail (100x) (Thermo Scientific™) til det cytosoliske protein lysatet. Merk at dette er en 100x inhibitor og den ble fortynnet slik at den passet volumet i proteinprøven (1x). Dette ble vortexet og alikvotert. 40 µl med solubiliseringsbuffer per 1 million celler ble lagt til cellepelleten (membran fraksjon) og videre inkubert på is i 30 minutter, med vortexing hvert femte minutt. Videre ble den igjen spunnet på 16, 000 g ved 4 °C. Supernatanten ("membranøst protein-lysat") ble pipettert over i ny 1.5 ml sentrifugerør. Det ble lagt til protease inhibitor. Alle proteinlysat ble alikvoterte, for å hindre protein degradering ved gjentakende tining, før de ble fryst til -20 °C inntil videre bruk.

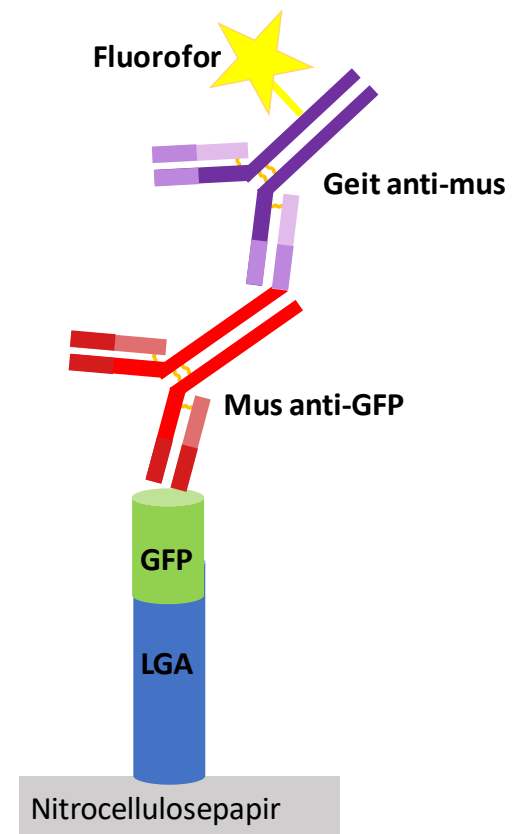
3.16 SDS-polyakrylamid gelelektroseforese (SDS- PAGE)

Protein-isolatene ble kjørt i SDS-PAGE for å separer proteinene etter størrelse. Protein isolater ble tint på is og det ble mikset med 4x sodium dodecyl-sulphate (SDS). SDS bryter opp proteinene, gir dem negativ ladning til aminosyrene, og proteinene blir denaturerte. Proteinprøven ble varmet på 70 °C i 10 min. Prøven ble spunnet i 2 min på 200 X g. NuPAGE 10 % Bis-Tris Gel ble brukt til separering i en Mini Gel Tank. Fortynnet Novex™ Tris-Glycine SDS Running Buffer (10X) (Invitrogen™) ble helt i geltanken til det dekket gelen fullstendig. 40 ul proteinlysat med SDS ble overført til gelbrønner, samt 3-5 ul markør til en eller flere brønner. Det ble

brukt 3 ulike markører i dette prosjektet SeeBlue™ Plus2 Pre-stained Protein Standard (Invitrogen™), Chameleon® Duo Pre-stained Protein Ladder (LI-COR®) og MagicMark™ XP Western Protein Standard (Invitrogen™). Prøvene ble kjørt på 120 volt i 80-100 minutter.

3.17 Western blot

Separering av proteiner ved SDS-Page ble etterfulgt av deteksjon av protein av interesse ved western blotting. I forkant av western blotten må proteiner overføres til et nitrocellulosepapir. Følgende komponenter ble lagt i bløt i NuPAGE™ Transfer Buffer (20X)(Invitrogen™) i forkant av blotting; 4 filterpapir, 4 filterpad, 1 nitrocellulosemembran og gelen. Proteinene ble overførte fra gelen til nitrocellulosemembranen ved å benytte maskinen PowerPac 200 Electrophoresis Power Supply (Bio-Rad) på 25 volt i 120 minutter i kjølerom (4°C). Membranen ble deretter skylt med TBST, etterfulgt av inkubering i 10 ml *Super-Block™ (TBS) Blocking Buffer* (Thermo Scientific™), i 2 timer i romtemperatur. Direkte etterfulgt av inkubering i blokkeringsbuffer og primært antistoff i 1 time romtemperatur før det ble satt over på risting i kjølerom (4°C) over natten. Liste over antistoffer i appendix. Etter inkubasjon ble vask gjennomført. Selve vasken innebar at nitrocellulosepapiret ble skylt tre ganger med TBST (Bestående av TBS tilsatt 1 % Tween20® (Sigma-Aldrich ®)) og videre satt på risting i 5 minutter, 15 minutter i TBST og avslutningsvis 5 minutter i TBS. Videre ble membranen ble inkubert med sekundære antistoffer i 2 timer. Vask ble gjennomført som beskrevet over. Nitrocellulosepapiret ble løftet over på tørkepapir. Deteksjon ble gjort ved at nitrocellulosemembranen ble scannet i en fluorescensmaskin der det sekundære antistoffet ble detektert.



Figur 2: Illustrasjon av prinsippet bak visualisering av målprotein ved hjelp av antistoffer i Western Blot. Målprotein, her; SasaLGA-GFP, er festet til nitrocellulosepapir, hvorpå primært antistoff, mus anti-GFP, binder og følgelig geit anti-mus assosiert med en fluorofor som muliggjør visualisering av målprotein.

3.18 Etablere stabile cellelinjer som overuttrykker Sasa-LGA

Det ble gjort flere forsøk på å finne optimal konsentrasjon av blasticidin til å vedlikeholde stabile-cellelinjer transfekterte med pcDNA3.1+C-LGA-Streptactin-Blasticidin.

3.18.1 Forsøk 1

Det ble gjort 3 transfeksjoner med pcDNA3.1+C-LGA-eGFP med 4 millioner celler per transfeksjon der hver transfeksjon ble fordelt i 6-brønnersbrett. Det ble også gjort mock-transfeksjon med tilsvarende antall celler, altså vanlig transfeksjon bare at det ikke ble lagt til plasmider. Samme antall ikke-transfekte celler ble sådd (for kontroll). 3 dager etter transfeksjonen ble celler tilsatt media med henholdsvis 5 µg/ml og 10 µg/ml blasticidin, samt L15+ (for negativ kontroll). Cellene fikk vokse ved disse konsentrasjonene i 2 uker, og ble visuelt observert i mikroskop hver tredje dag.

3.18.2 Forsøk 2

4 transfeksjoner med 2 millioner celler ble fordelt i 2 brønner (6-brønnersbrett). Etter 3 dager ble celler fra hver transfeksjon tilsatt media med 0.01, 0.5, 0.7 og 1 µg/ml blasticidin og ble inkuberte med disse konsentrasjonene i 14 dager, hvor mediet ble byttet hver tredje-fjerde dag. Videre ble antibiotikakonsentrasjonen i disse forhøyet fra 0.01, 0.5, 0.7 og 1 µg/ml blasticidin til henholdsvis 1, 2.5, 5 og 7 µg/ml. Celler ble visuelt observert i mikroskop hver tredje-fjerde dag i 14 dager.

3.19 Produksjon av polyklonale Sasa-LGA antistoffer

For å lettere kunne studere Sasa-LGA i dette prosjektet og i fremtidige prosjekt, ble det bestilt polyklonale antistoffer for Sasa-LGA. Polyklonale antistoffer blir produsert av dyr, typisk mus, kanin eller geit, ved at disse blir immunisert med epitop fra protein av interesse. Merk at polyklonale antistoffer er antistoffer mot samme antigen, men produsert av ulike B-celler, og kan dermed være av ulike epitopspesifisitet, mens monoklonale antistoffer kommer fra en enkelt isolert B-celle, og er dermed helt identiske.

LGA-antistoffene benyttet i dette prosjektet ble leverte fra Agrisera®, som immuniserte en kanin med et 13 aminosyrer langt peptid: YRGOHITKTKDDE. Dette peptidet er spesifikt til Sasa-LGA og er lokalisert i antigenbindingssetet ved starten på alfa 2 helixen. For å unngå

potensiell kryssreaktivitet ble den utvalgte peptidsekvensen sammenlignet med atlantisk laks sitt genom (Saalv3: GCA_905237065.2) ved hjelp av tBLASTx, med det formål å unngå å immunisere med et peptid som det finnes svært like sekvenser til i andre ikke-klassiske MHC klasse I gener. For å fasilitere konjugasjon med *keyhole limpet hemocyanin* (KLH), som blir brukt som bærerprotein i produksjon av antistoffer, og som skal være med på å øke vertens immunrespons mot antigenet er det lagt til et cystein på slutten av SasaLGA-peptiden, noe som resulterer i en 14 aminosyrer langt peptid, som immuniseringsprosessen.

Individet (kaninen) som gjennomgår immuniseringen blir referert til som RSAM (rabbit-SAM). Før immuniseringen startet ble det samlet serum fra RSAM (28.06.21), som blir referert til som RSAM0 videre i oppgaven. Dette er nyttig ved fremtidige undersøkelser med antiserumet for å kontrollere at organismens serum ikke inneholdt antistoffer som binder uspesifikt til målproteiner før immuniseringen var begynt. 27.08.21 ble individet immunisert med 200 µg +FCA, 23.09.21 med 200 µg +FIA, og videre ny dose 21.10.21 med 100 µg +FIA. Etter disse tre immuniseringene ble det igjen tappet serum 01.11.21. Dette serum blir referert til som RSAM1 videre i oppgaven. Til slutt ble kaninen igjen immunisert med 100 µg +FIA den 18.11.2021, og avslutningsvis tappet serum, som blir referert til som RSAM2 (se immuntimeplan i appendix)

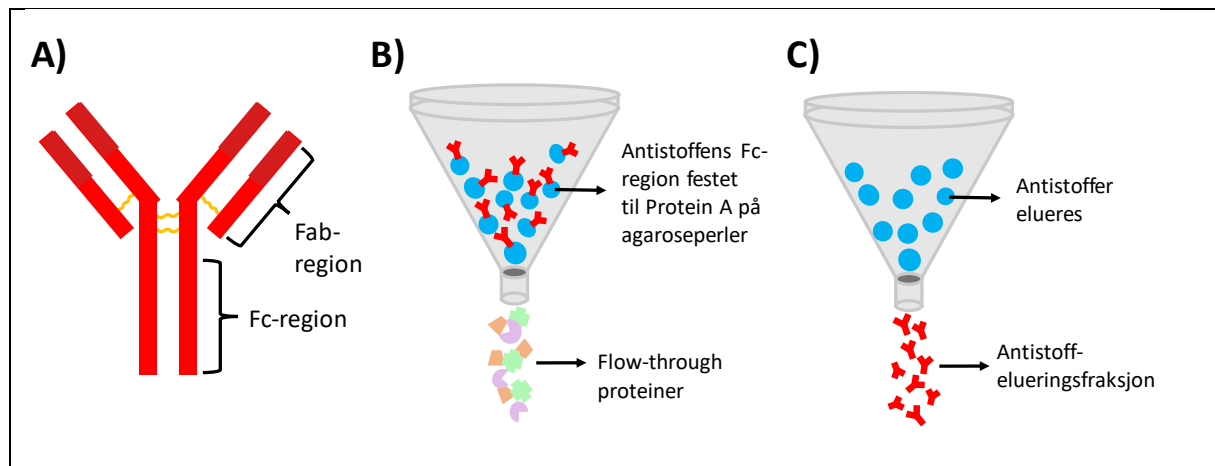
Ved produksjon av polyklonale antistoffer blir organismen vaksinert med en dose med antigen (i denne sammenheng SasaLGA-epiotpen), samt *Freund's adjuvant*, som i sin komplette form inneholder en olje og inaktiverte mykobakterier (FCA), for å øke immunresponsen i organismen (Lindblad, 2000). Adjutanten i sin ukomplette form mangler mykobakterielle komponenter (FIA), og består dermed bare en oljeløsning. Merk at første dose inneholdt FCA, mens resten var FIA.

3.20 IgG-Antistoffrensing

Som beskrevet i seksjon 3.19 ble RSAM-antistoffene levert i helt serum. Serum inneholder utallige proteiner i tillegg til antistoffer, som kan gi bakgrunn og feilkilder i en western blot. Derfor er antistoffrensing nødvendig å gjennomføre for å få best mulig resultat. En slikrensing gjøres ved å benytte seg av agaroseperler dekket med protein A, som er bakterielle proteiner som binder sterkt til Fc-regionen til antistoffer (Hober, Nord & Linhult, 2007), dermed kan man bruke disse til å hente antistoffer fra en serumløsning.

Til antistoffrensingen ble *PierceTM Protein A IgG Purification Kit* (Thermo ScientificTM) benyttet. Antistoffrensing for total kanin-IgG fra serum RSAM2. Det ble brukt 1 ml med protein A til agaroseperlene, samt 3 ml med serum som ble tint over natten. Protein A kolonnen ble ekvilibrert ved hjelp av gravitasjonsflow. Det ble lagt til 10 ml med bindingsbuffer fra kitet (Protein A IgG Binding Buffer), som fikk drenere gjennom kolonnen. Merk at membranen i kolonnen aldri må være tørr, og lokket må derfor tas på når det er rundt 0.5 ml igjen.

Serum ble fortynnet i 20 ml fortynningsbuffer (som følger med kitet). Fortynningsbuffer ble filtrert før bruk. Fortynnet serum og agaroseperler fra kolonne ble overført til samme 50 ml tube, og inkubert på risting i 2 timer ved romtemperatur. Etter inkubering ble agaroseperler og serum overført tilbake i kolonnen, som videre ble vasket med 15 ml buffer (Protein A IgG Binding Buffer).



Figur 3: Enkel illustrasjon av antistoffers struktur og hvordan disse blir isolerte fra andre proteiner ved antistoffrensing. **A)** Strukturen til IgG-antistoff med en Fab-region og en Fc-region, der sistnevnte binder Protein A på agaroseperlene. **B)** Etter at serum og agaroseperler har vært på risting i 2 timer vil antistoffenes Fc-region være festet til Protein A på agaroseperlene. Når dette overføres til en kolonne med et filter, som agaroseperler ikke kommer gjennom, vil serumproteiner sive gjennom filteret, mens antistoffene blir holdt igjen av agaroseperlene. **C)** Det tilsettes elueringsbuffer og antistoffene elueres og samles i elueringsfraksjoner.

I forkant av eluering ble 10 stk 1,5-ml sentrifugeringstuber, med 50 µl med 1M tris pH 9.5 eller 100 µl med bindingsbuffer, klargjort og lagt på is. Flere elueringsisolater ble samlet ved å legge til 10 ml elueringsbuffer (IgG Elution Buffer) til kolonnen og samle 1 ml i 1,5 ml sentrifugeringstubene som ble klargjorte på forhånd. Umiddelbart etter eluering ble tubene vendt forsiktig rundt for å stabilisere pH. Totalt proteininnhold i prøvene ble estimert ved NanoDrop, og for å verifisere selve antistoffrensingen, samt elueringen av kanin IgG, ble en liten mengde fra hver elueringsprøver analysert i SDS-PAGE (beskrevet i seksjon 3.16) og videre westernblot (som beskrevet i seksjon 3.17) med det sekundære antistoffet IRDye® 680RD Goat anti-Rabbit IgG Secondary Antibody (H+L).

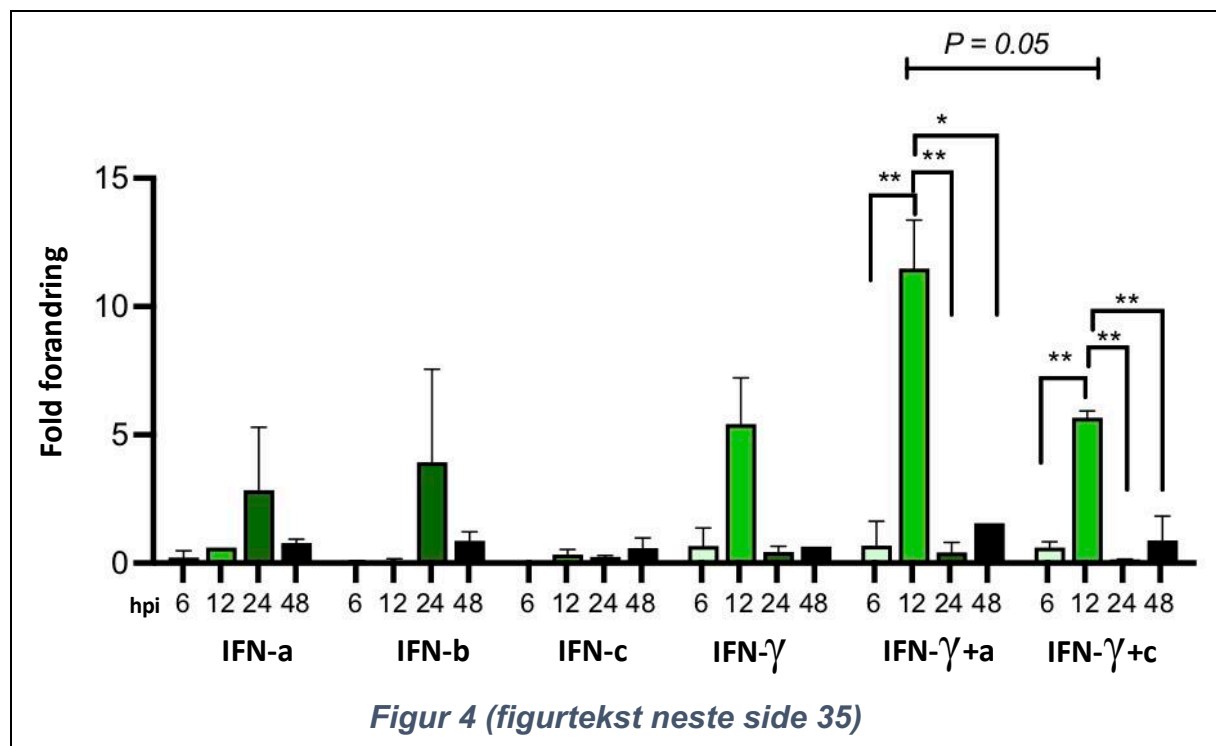
3.21 Databasesøk og sekvenssammenstilling

Nukleotidsekvensen som tilsvarende Sasa-LGA-immuniseringspeptidet (YRGOHITKTKDDE), pluss 150 flankerende nukleotider, ble brukt til å søke i chinook-laksegenomet (Oths_v2.0 GenBank assembly accession: GCA_018296145.1) for å matche sekvenser ved hjelp av BLASTn-verktøyet og innstillingene. BLASTn er en algoritme som brukes i bioinformatikk for å søke nukleotiddatabaser som ved å bruke kjente nukleotidsekvenser identifiserer lignende sekvenser. Ved bruk av de diskontinuerlige megablast-innstillingene for å identifisere mer ulike sekvenser, ble det funnet fem matcher. Når disse nukleotidsekvensene ble funnet ved bruk av BLASTn-algoritmen, ble de oversatt til aminosyrer ved hjelp av oversettelsesverktøyet ExPasy (<https://web.expasy.org/translate/>). Nukleotidsekvensene og aminosyresekvensene ble deretter sammenlignet ved å bruke programmet Clustal Omega (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>).

4 Resultat

4.1 Ikke-klassisk MHC klasse I uttrykk i CHSE er ulikt induisert av type I and type II interferoner

Tidligere analyser av *Oncorhynchus tshawytscha* har identifisert 16 L-linjegener i kongelaks, blant disse ble 8 klassifisert som enten full-lengde funksjonelle eller full-lengde pseudo-gener, og de gjenstående ble klassifisert som partielle gener (Grimholt & Lukacs, 2021). For å kartlegge L-linjeuttrykket i CHSE-celler (avledet fra Chinook Salmon embryoniske stamceller) ved interferonstimulering ble disse cellene stimulerte i duplikat med IFN-a, IFN-b, IFN-c, IFN- γ +a, IFN- γ +c og media (negative kontroller). Det ble gjort uttak 6, 12, 24 og 48 timer etter stimulering (hpi). Videre ble det foretatt RNA-isolering og cDNA-syntese med påfølgende qPCR. Det ble brukt primere for de fire av de potensielt funksjonelle L-linjegene i CHSE; LIA, LDA, LCA og LNA. Det ble også designet og brukt primere spesifikke for LGA1, selv om dette er klassifisert som et pseudogen. I *Onts-LGA1* er det bare en nukleotid substitusjon som resulterer i ett stoppkodon og som karakteriserer det som et pseudogen i in silico analyser, men det er mulig at dette er resultatet av en sekvenseringsfeil og at LGA1 kan bli uttrykt. Resultater sees i figur 4.

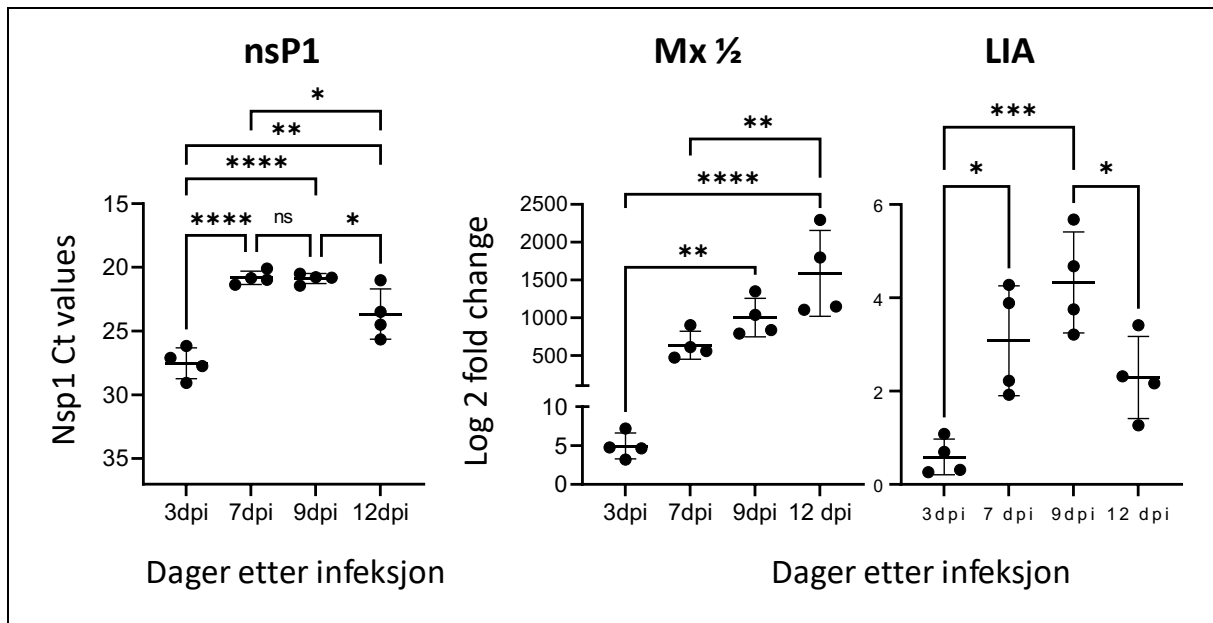


Figur 4: Fold forandring av LIA i CHSE-celler stimulert med 200 U rekombinant (r) IFN-a, rIFN-b, rIFN-c, 10 ng/ul IFN-g eller i kombinasjon med rIFN-g+ rIFN-a, IFN-g+c ved 6, 12, 24, og 48 timer etter stimulering (hpi). Data for genuttrykk ble normalisert mot referansegenet EF1a og fold forandringer ble kalkulerte ved hjelp av kontroll-CHSE-celler stimulert med media alene og høstet ved samme tidspunkter. Dataene vist her representerer resultater fra duplikate prøver og standardavvikene er vist. Merk at for prøver stimulerte med enten rIFN-g eller rIFN-g+rIFN-a som ble høstet etter 48 timer er dataene i figuren fra en enkelt prøve. Asterisks indikerer graden av signifikans mellom de indikerte tidspunkter. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

I ustimulerte CHSE-celler ble ikke uttrykk av verken LCA, LDA, LNA eller LGA1 detektert, mens LIA ble uttrykt ved lave nivåer (Ct verdier 35,4-35,5). Utenom LIA ble ingen av de andre L-linje-genene oppregulerte ved interferonstimulering. LIA blir oppregulert, om enn ikke med statistisk signifikans og med stor variasjon mellom prøvene, etter 24 timer ved IFN-a og IFN-b, men ikke av IFN-c stimulering. I kontrast til dette blir LIA uttrykket oppregulert tidligere, ved 12 timer post-stimulering i respons på rIFN- γ . Denne induksjonen sees også ved kombinasjonene rIFN- γ /rIFN-a og rIFN- γ /rIFN-c. Mest oppregulert med kombinasjonen rIFN- γ +rIFN-a, som etter 12 timer resulterer i en 11 ganger fold forandring, sammenlignet med ustimulerte celler, men også IFN-kombinasjonen IFN- γ +c gir en signifikant oppregulering, med en fold forandring på rundt 5 etter 12 timer.

4.2 Ikke-klassiske MHC klasse I L-linje genuttrykk i CHSE-celler (avledet fra kongelaks) er induserte av SAV3 infeksjon

For å kartlegge hvorvidt L-linjegener blir oppregulert ved SAV3-infeksjon ble CHSE-celler infiserte med SAV3-virus ved 1 MOI. 150 000 celler ble sådd i kvadruplikat på 24-brønnersbrett og det ble gjort uttak etter 3, 7, 9, 12 dager etter infeksjon (dpi). Videre ble det foretatt RNA-isolering og cDNA-syntese med påfølgende qPCR. Her ble primere for LIA, samt viralt *non structural protein* (nsP1) og Mx $\frac{1}{2}$, brukt. nsP1 er primer for et gen kodet i SAV3-viruset (Hodneland & Endresen, 2006) og ble brukt for å bekrefte virusinfeksjon. Mx $\frac{1}{2}$ er primere for et Myxovirus-resistensgen (Mx) 1 og 2, som er en antiviral GTPase, som blir induert av type I IFN og virusinfeksjon, og er bevist oppregulert ved rIFN-a til stede (Robertsen, Greiner-Tollersrud & Jørgensen, 2019), og som dermed verifiserer at celler har reagert på viruset ved å initiert en anti-viral respons.



Figur 5: CHSE-celler infiserte med 1 MOI SAV3-virus, som er høstet etter 3, 7, 9 og 12 dager. Data for genuttrykk av Mx1/2 og LIA ble normalisert mot referansegenet EF1a og fold forandringer ble kalkulerte ved hjelp av kontroll-CHSE-celler stimulert med media alene og høstet ved samme tidspunkter. Asterisks indikerer graden av signifikans mellom de indikerte tidspunkter. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$

Det er tydelig at det har skjedd en vellykket SAV3-infeksjon. Siden nsP1 et SAV3-gen og dermed ikke er til stede i uinfiserte kontroller, kan det ikke bergenes fold forandring mot kontroller, og dermed er tallene for nsP1 oppgitt i Ct-verdier. Videre fremkommer det også at SAV3-infeksjonen har induisert en anti-viral respons i CHSE-cellene siden Mx $\frac{1}{2}$ -genet er oppregulert. Korresponderende med Mx $\frac{1}{2}$ har også LIA blitt gradvis oppregulert, med en topp 9 dager etter infeksjon med en fold forandring på over 4. Nsp1 detekteres 3 dager etter infeksjon, og øker gradvis på dag 7 og 9, og synker litt ved dag 12.

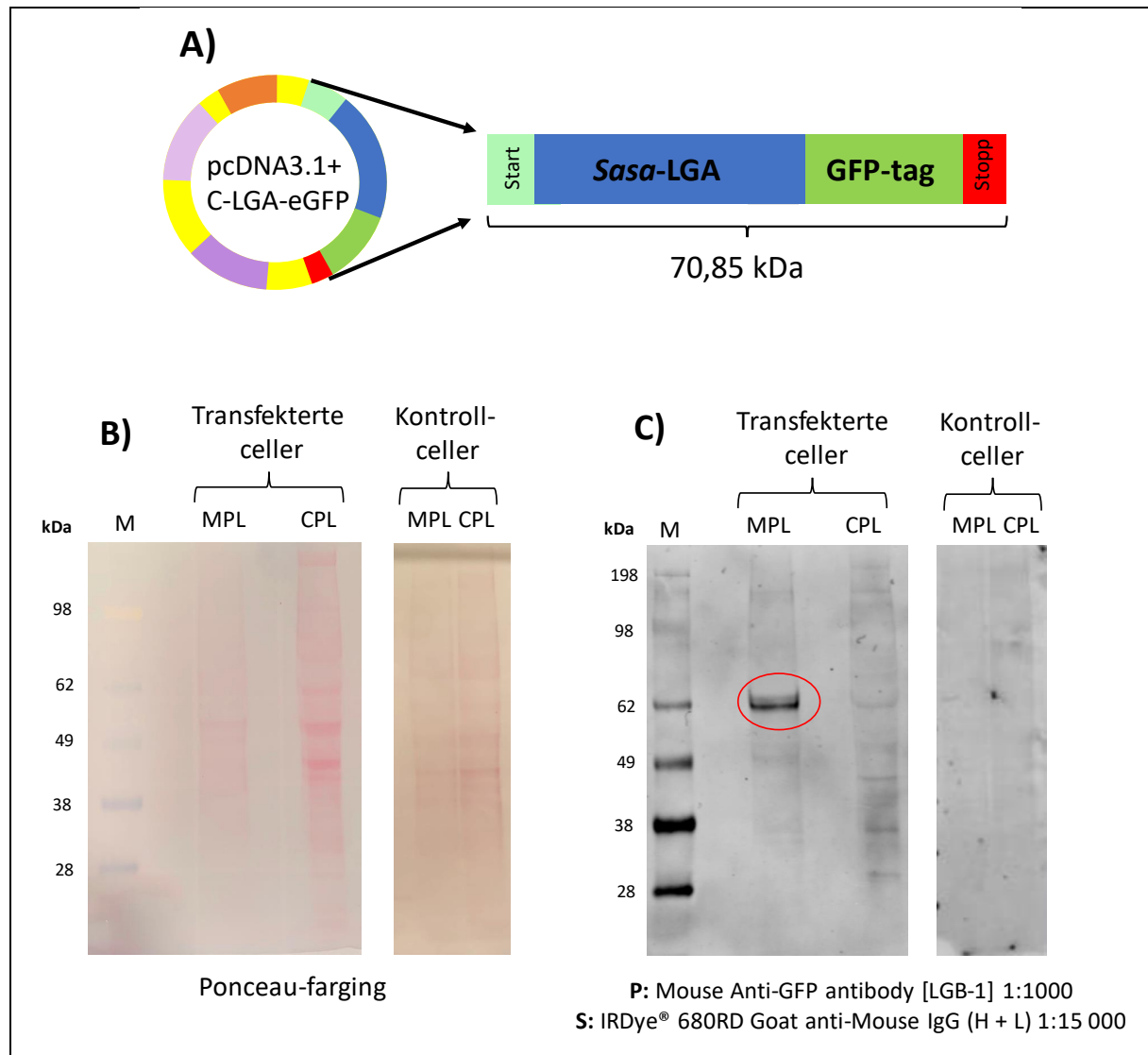
4.3 Overuttrykk av atlantisk laks (*Salmo salar*) LGA-eGFP-fusjonsprotein (SasaLGA-eGFP) i CHSE-celler

For å etablere CHSE-cellelinjer med overuttrykk av Sasa-LGA og videre bruke disse cellene som verktøy til å undersøke funksjonen til LGA, ble et Sasa-LGA-plasmid (pcDNA3.1+C-LGA-eGFP) med eGFP-tag, transfekterte inn i CHSE-celler ved nukleofeksjon. Transfekterte celler ble undersøkte ved fluorescensmikroskopi og western blot. For å fastslå hvor i cellen LGA-proteinet er lokalisert ble cellens proteiner fraksjonert til cytosol-og membranisolater, som videre ble brukt i western blot sammen med anti-GFP monoklonalt antistoff. pcDNA3.1+C-LGA-eGFP- plasmidet inneholder en full-lengde Sasa-LGA, som også omfatter ledersekvensen til det cytoplasmiske domenet (42,8 kDa) og er klonet i samme leseramme som eGFP (26,9 kDa), som resulterer i et fusjonsprotein med en anslått størrelse på 70,85 kDa.

Plasmid transformasjon og isolering av pcDNA3.1+C-LGA-eGFP-plasmidet ble gjennomført. I et forsøk på å oppnå høy plasmid-konsentrasjon ble det gjort to elueringer av plasmidet. Plasmid-isolatene fra første og andre eluering hadde en DNA-konsentrasjon på henholdsvis 398,1 ng/ μ l og 213,3 ng/ μ l. Første plasmid-isolat (398,1 ng/ μ l) ble benyttet i alle transfeksjoner med pcDNA3.1+C-LGA-eGFP-plasmidet. For å optimalisere uttrykket av Sasa-LGA ble det foretatt flere transfeksjoner med ulikt antall CHSE-celler og flere protein-isoleringer med varierende konsentrasjoner av permeabiliseringsbuffer og/eller solubiliseringsbuffer ble gjennomførte i forkant av deteksjonen av Sasa-LGA, samt antistoff-konsentrasjoner. Oversikt over transfeksjoner og antall celler benyttet vises i appendix. Alle transfeksjoner ble gjort med Amaxa™ Nucleofector™ II (program 20), og celler ble høstet tre dager etter transfeksjon.

Ved hjelp av Mem-PER™ Plus Membrane Protein Extraction ble det ble gjennomført protein-isolering av membranproteiner og cytosolproteiner fra celler transfekterte med pcDNA3.1+C-LGA-eGFP-plasmidet. Det er hovedsakelig permeabiliseringsbuffer og solubiliseringsbuffer som muliggjør isolering av proteiner fra ulike cellekompartenter. Permeabiliseringsbufferet gjør membranen permeabel, noe som gjør av proteiner fra cytosol siver ut, og solubiliseringsbuffer løser opp selve membranen og dens proteiner. Membran-og cytosol-proteinisolater fra celler transfekterte med pcDNA3.1+C-LGA-eGFP-plasmidet, samt villtype celler ble benyttet i SDS-Page og videre western blot. Fig 6 viser et representativt western blot resultat med Anti-

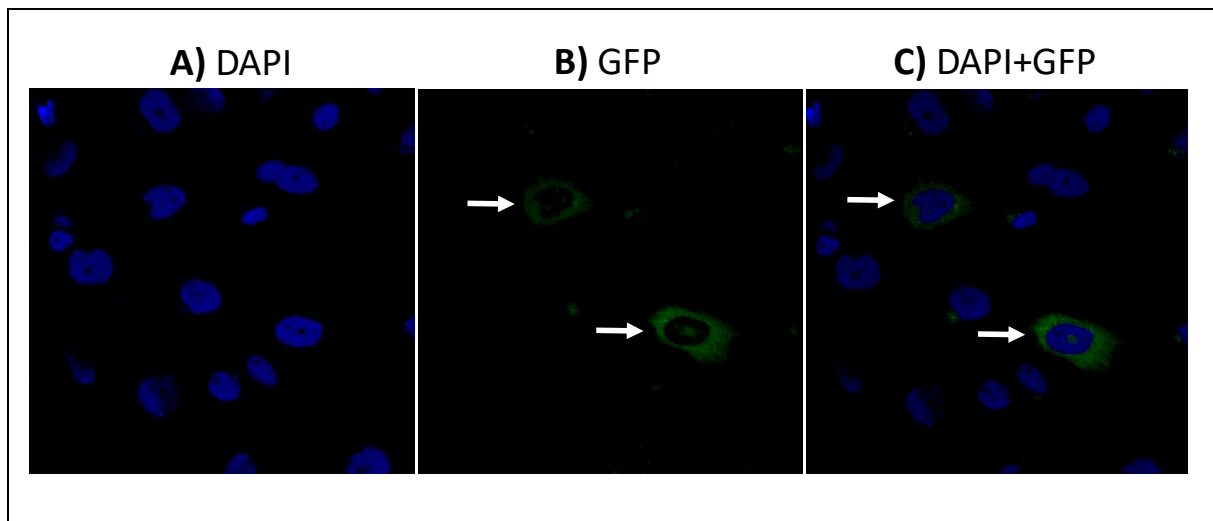
GFP antibody [LGB-1](mouse monoclonal) som primært antistoff med 1 μ l per 1000 μ l anti-stoffløsning (1:1000) og IRDye® 680RD Goat anti-Mouse IgG (H + L) (1:15 000) som sekundært.



Figur 6: SasaLGA uttrykkes hovedsakelig i membranen til transfekterte CHSE-celler. **A)** Designet til pcDNA3.1+C-LGA-eGFP-plasmidet brukt i transfeksjonen av CHSE-celle. I dette plasmidet er Sasa-LGA klonet i samme leseramme som eGFP og disse vil dermed bli transkribert som ett LGA-GFP-kompleks. Merk at LGA-eGFP-komplekset har en predikert størrelse på 70,85 kDa. **B)** Ponceaufarging av nitrocellulosemembran med membran-proteinlysate og cytosol-proteinlysate fra CHSE-celler transfekterte med pcDNA3.1+C-LGA-eGFP-plasmidet, samt fra utransfekterte celler (kontroll). M(markør) er SeeBlue™. **C)** Western blot med mus anti-GFP (1:1000) som primært antistoff og geit-anti-mus IgG (H+L) (1:15 000) som sekundært antistoff. Rød ring rundt det eneste båndet som blir detektert av mus anti-GFP, ved rundt 70 kDa, og som størrelsesmessig korresponderer med det forventende LGA-eGFP-komplekset.

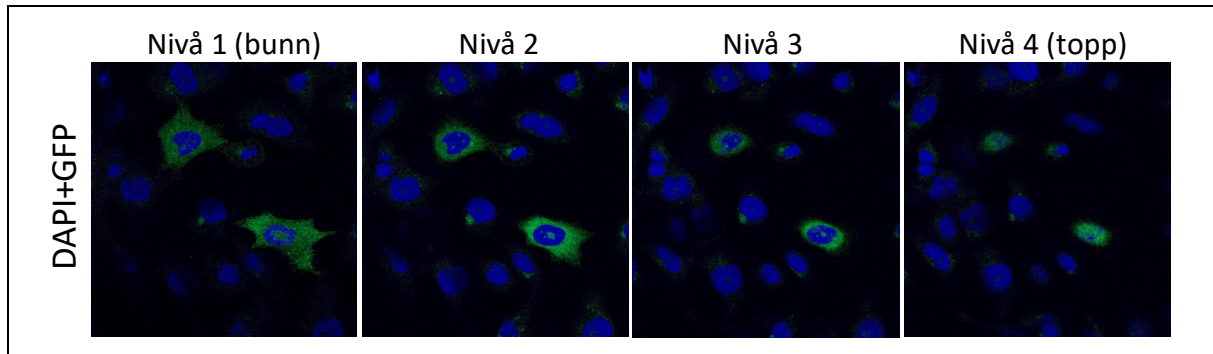
I forkant av inkubering med primære og sekundære antistoffer ble membranen farget med ponceau-farge. Ponceau-fargingen (fig. 6.B) viser at det er proteiner til stede i alle de merkede brønnene. Selve western blotten (fig. 6.C) resulterte i ett tydelig bånd ved rundt 70 kDa i brønnen med membranlysat fra transfekterte celler, noe som korresponderer med størrelsen på SasaLGA-eGFP-komplekset plasmidet koder for. Det ses også noen svake bånd i brønnen med cytosolproteinlysater, inkludert ved omtrent 70 kDa. Dette er trolig bakgrunn (siden det er svake bånd ved mange størrelser). Konklusjonen er at SasaLGA-eGFP blir uttrykt i transfekterte celler og aller mest i membran fraksjonen.

For å vurdere frekvensen av CHSE-celler som uttrykker SasaLGA-eGFP-fusjonsproteinet, ble transfekterte CHSE-celler analyserte ved hjelp av konfokalmikroskopi (fig. 7). Basert på antall GFP+ celler ble det estimert at rundt 15-20% av cellene uttrykker SasaLGA-eGFP.



Figur 7: Konfokalmikroskopi av celler transfekterte med pcDNA3.1+C-LGA-eGFP-plasmidet, der nukleus er farget blått (med DAPI) og enkelte cellemembraner lyser grønt (grønn fluorescens) som følge av GFP-uttrykk etter transfeksjonen (pilene peker på disse cellene). **A)** Viser bare DAPI farge. **B)** Viser bare grønn fluorescens. **C)** Viser både DAPI og grønn fluorescens.

Det ble også tatt bilder av cellene på et horisontalt plan, altså fra bunnen av cellene til toppen av cellene. Dette ble gjort for å nærmere studere hvor i cellene SasaLGA-eGFP-komplekset befant seg, men ut ifra disse bildene er det vanskelig å vurdere lokasjonen til SasaLGA-eGFP-komplekset i cellen (fig. 8).

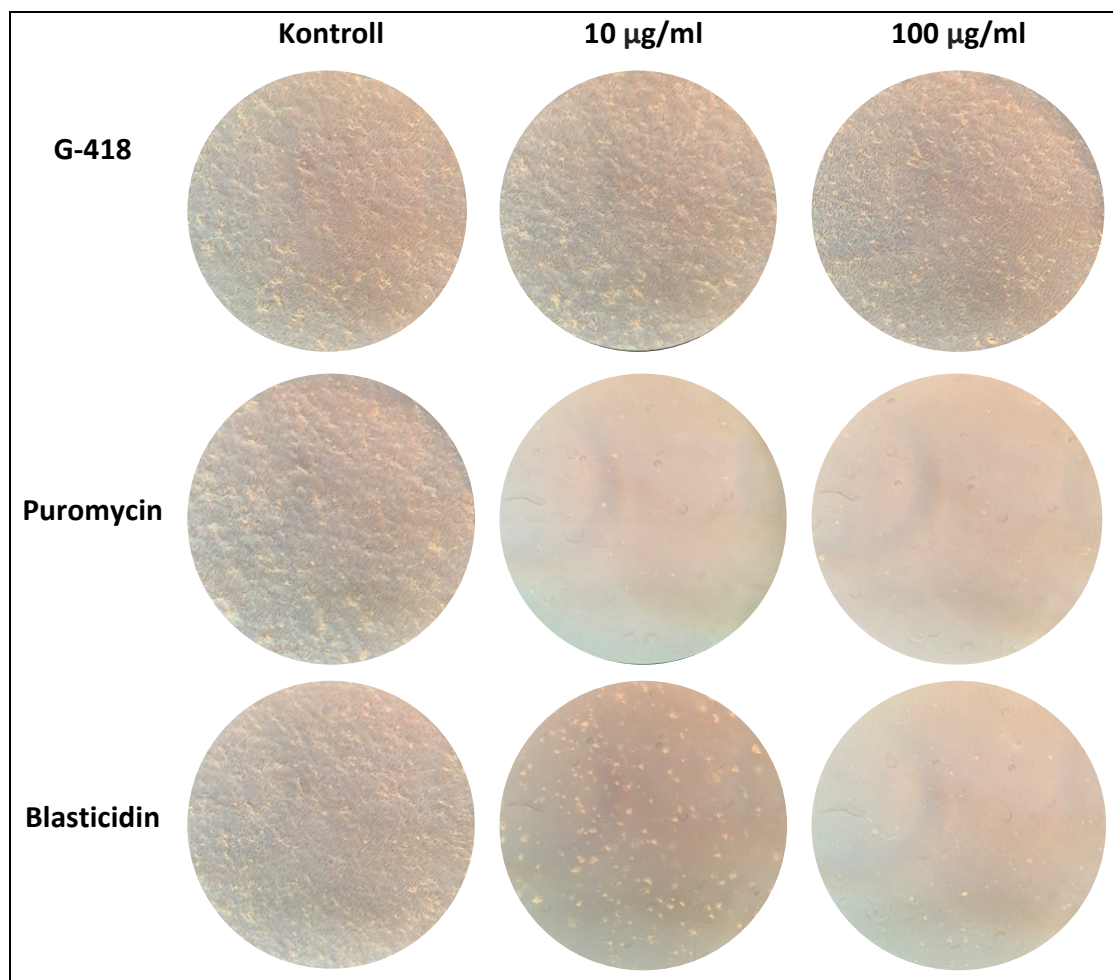


Figur 8: Konfokalmikroskopi med pcDNA3.1+C-LGA-eGFP-plasmidet med både DAPI+GFP. Bilder tatt med ulikt fokus i linsen, noe som gir bilder av cellene på et horisontalt plan, her; nederst der man tydelig ser CHSE-cellenes adhesjon til dekkglasset. Midt i cellen på nivå 2, og enda lenger opp ved nivå 3. Nivå 4 viser toppen av cellene.

For å kunne bruke disse Sasa-LGA-eGFP-overuttrykkende CHSE-cellene til å identifisere funksjonen til LGA og identifisere mulige LGA-ligander til andre celler burde en høyere andel av cellene uttrykke proteinet. I et forsøk på å selekttere CHSE-cellene som uttrykker plasmidet, og etablere stabile cellelinjer med overuttrykk av Sasa-LGA, skulle det benyttes et antibiotikum i mediet og inkludere et korresponderende resistensgen for antibiotikumet i plasmidet, og på denne måten selekttere transfekterte celler. pcDNA3.1+C-LGA-eGFP-plasmidet inneholder et neomycin-resistensgen. Dermed ble transfekterte CHSE-celler inkubert i media som inneholdt 5-10 µg/ml G-418 og observert i 14 dager. Ikke-transfektete CHSE celler ble brukt som kontroll, men det ble ikke observert celledød i verken kontroll eller transfektete celler, noe som tyder på at CHSE-celler har en ervervet resistens mot dette antibiotikumet.

4.4 Optimalisere plasmid-design for å etablere stabile CHSE celler som overuttrykker Sasa-LGA

I forbindelse med design av nytt plasmid var det aktuelt å gjøre en antibiotikaresistenstest med villtype CHSE-celler og ulike antibiotikum, for å avdekke eventuell naturlig resistens, og komme frem til det mest effektive antibiotikumet for CHSE. Det ble sådd ut 250, 000 CHSE-celler per brønn i 6-brønnersbrett, og cellene ble inkuberte ved enten 10 µg/ml eller 100 µg/ml, med enten G-418, puromycin eller blasticidin. Cellene ble kontinuerlig observert visuelt i mikroskop og på dag 12 ble forsøket avsluttet, da alle celler i 100 µg/ml puromycin og blasticidin var døde.



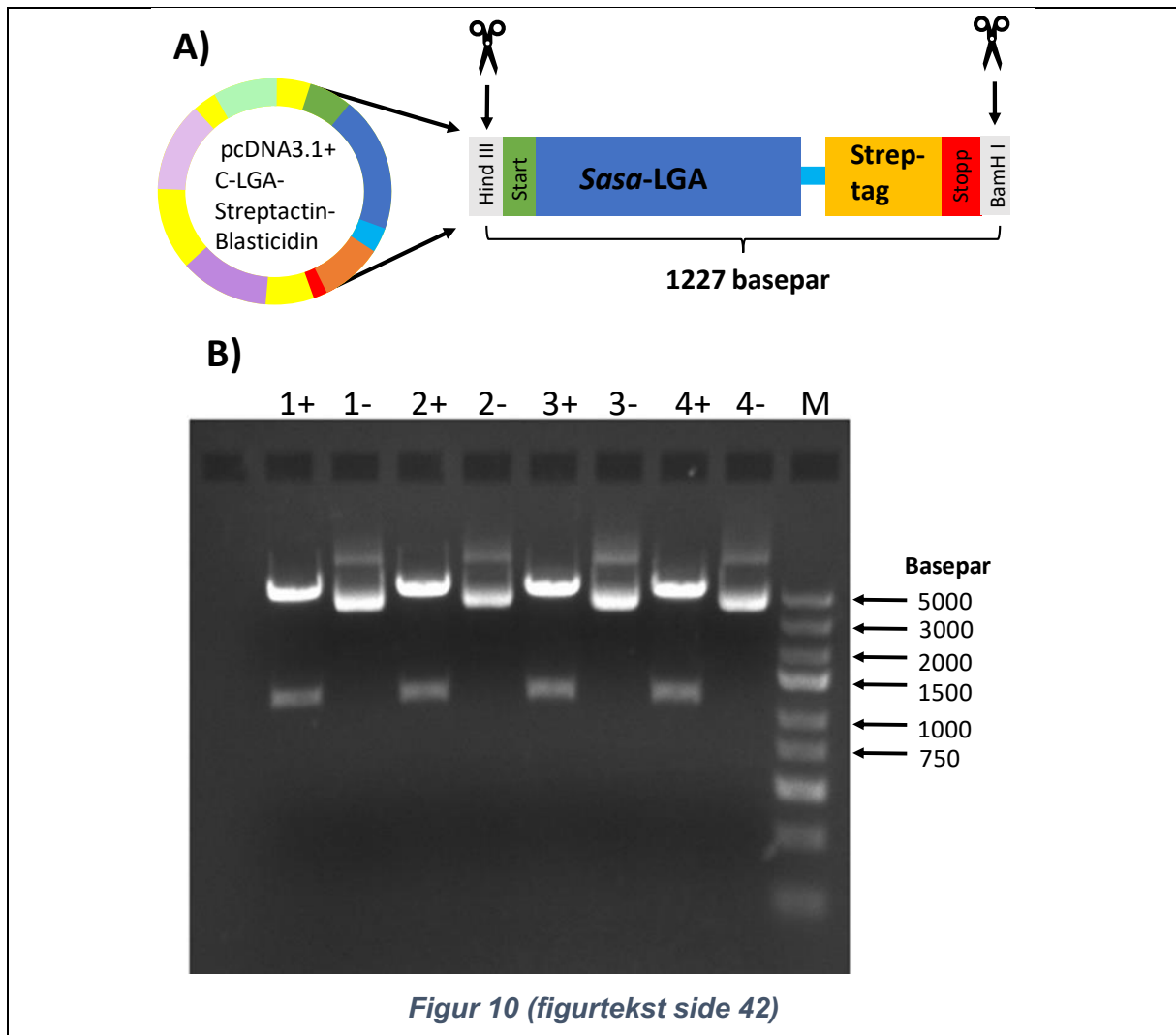
Figur 9: CHSE-celler ble sådd i brønner og inkubert med G-418, puromycin, blasticidin med konsentrasjonene 10 µg/ml, 100 µg/ml, samt kontroll (uten antibiotika). Figuren viser bilder fra alle brønner med de ulike antibiotikaene og konsentrasjonene på tolvte og siste dag av forsøket.

Det fremkommer i figur 9 at cellene ikke døde i G-418, puromycin dreper derimot cellene aggressivt. Blastocidin har også god virkning, men ikke like sterk som puromycin. Det ble derfor konkludert med at blastocidin var det mest gunstige antibiotikumet å benytte i etablering av stabile cellelinjer, og dermed ble blastocidin-resistensgenet inkorporert i pcDNA3.1+C- plasmidet som erstatning til neomycin-resistensgenet. I tillegg besto det nye designet av full lengde Sasa-LGA etterfulgt av en kort glycin-rik linker og *Twin Strep-Tactin II tag* (pcDNA3.1+C-LGA-Streptactin-Blastocidin). Det ble satt inn stoppkodon fremfor GFP. Plasmidet ble bestilt fra GenScript®.

Det ble foretatt plasmid-transformasjon og isolering av det nye pcDNA3.1+C-LGA-Streptactin-Blastocidin-plasmidet og denne gangen ble bakterier fra fire enkeltkolonier overført til fire kolber, for å videre lage fire plasmid-isoleringer. DNA-konsentrasjonen for plasmid isolering nummer 1, 2, 3 og 4 ble henholdsvis 452.4, 426.4, 374.4, 308.2 ng/μl. Merk at bare plasmid isolering nummer 1 ble benyttet for transfeksjoner i dette prosjektet.

For å verifisere at pcDNA3.1+C-LGA-Streptactin-Blastocidin-plasmidet inneholdt Sasa-LGA-genet ble det gjennomført plasmid fordøyelse av de 4 resulterende plasmid-isolatene fra plasmid transformasjon og isolering (se seksjon 4.4). Restriksjonsenzymene HindIII og BamHI ble benyttet og disse klippet Sasa-LGA-genet ut av plasmidet.

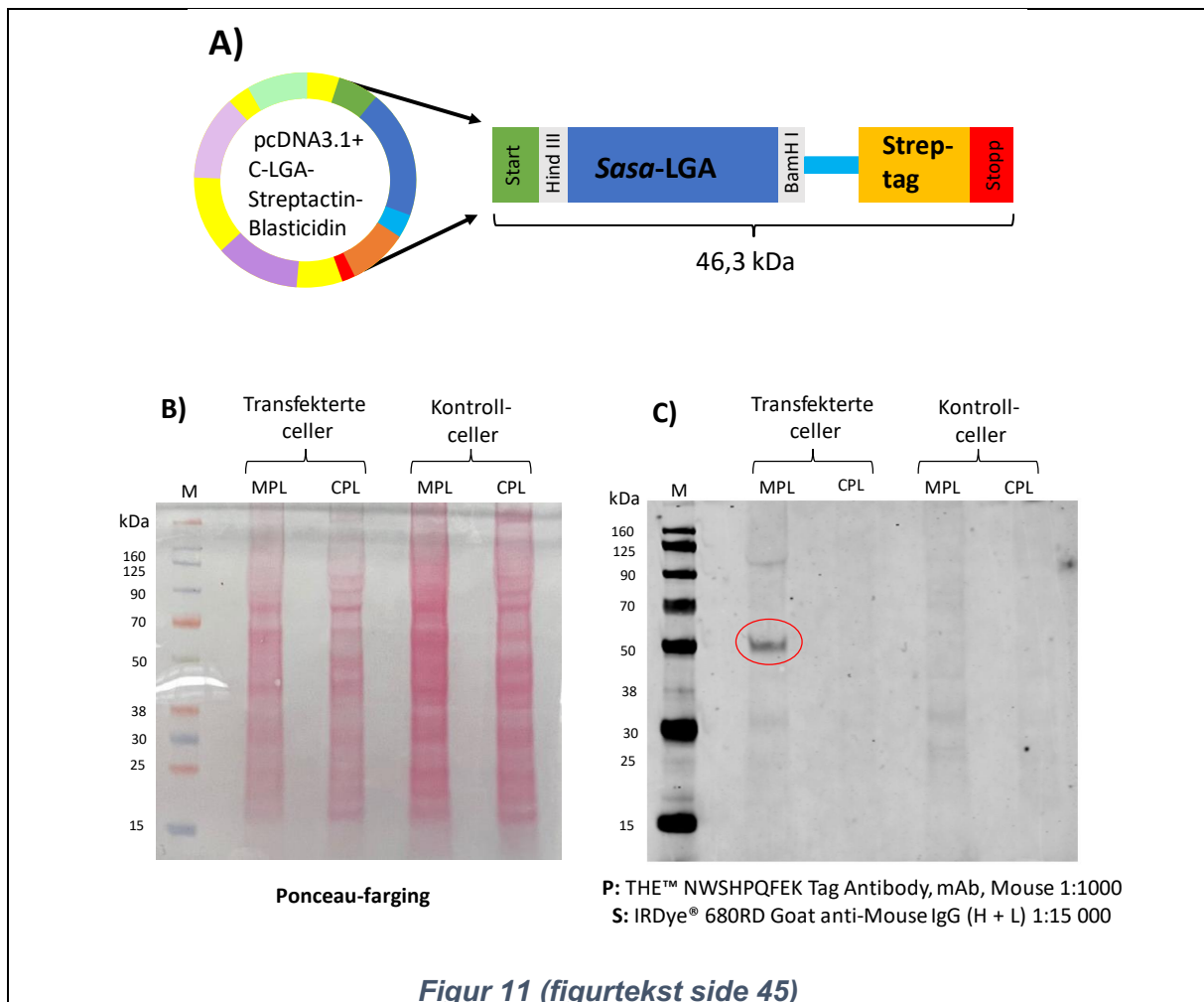
Figur 10: A) Designet til pcDNA3.1+C-LGA-Streptactin-Blastocidin-plasmidet, som inneholder restriksjonsgjenkjenningområder for restriksjonsenzymene HindIII og BamHI, fremfor og bak Sasa-LGA-genet. **B)** Det er gjort plasmid-fordøyelse av pcDNA3.1+C-LGA-Streptactin-Blastocidin og restriksjonsenzymene vil da «klippe ut» sekvensen for SasaLGA. Resultat av plasmid-fordøyelse visualisert i VWR® Smart3. Tallene over brønnene representerer hvilken plasmid-isolering som er i brønnen og +/- viser om det er restriksjonsenzymet til stede eller ikke. M (Markør): GeneRuler 50 bp DNA Ladder.



Av figur 10.B fremkommer det at brønner som kun inneholder plasmid, uten restriksjonsenzymer (merket «-»), gir ett bånd, mens brønner med plasmid og restriksjonsenzymer («+») gir to bånd. med restriksjonsenzymer ved 1500 basepar i brønner med restriksjonsenzymer korreponderer med størrelsen på sekvensen til *SasaLGA*.

4.5 Overuttrykk av Atlantisk laks LGA-Streptactin protein (Sasa-LGA-Streptactin) i CHSE-celler

CHSE-celler ble transfekterte ved bruk av nukleofeksjon (Amaya™ Nucleofector™ II (program 20)). Tre dager etter transfeksjon ble det gjennomført protein-isolering med MemPER™ Plus Membrane Protein Extraction-kit. De resulterende membran-og cytosol-protein-isolatene fra celler transfekterte med pcDNA3.1+C-LGA-Streptactin-Blasticidin-plasmdiet, samt fra ikke-transfektete CHSE- celler ble benyttet i SDS-Page og videre western blot. I western blotten ble mus anti-strep (THE™ NWSHPQFEK Tag Antibody, mAb, Mouse) benyttet som primært antistoff og geit-anti-mus (IRDye® 680RD Goat anti-Mouse IgG, H + L) som sekundært. Et representativt resultat er vist i fig 11C.



Figur 11 (figurtekst side 45)

Figur 11: A) Designet til pcDNA3.1+C-LGA-Streptactin-Blasticidin-plasmidet brukt i transfeksjonen av cellene som proteinene i western blotten er isolerte fra (B og C). I dette plasmidet er SasaLGA klonet i samme leseramme som strep-tag og disse vil dermed bli transkribert som ett LGA-strep-kompleks i celler transfekterte med pcDNA3.1+C-LGA-Streptactin-Blasticidin-plasmidet. Merk at LGA-strep-komplekset har en størrelse på 45,53 kDa. **B)** Ponceaufarging av nitrocellulosemembran med membran-proteinlysate og cytosol-proteinlysate fra celler transfekterte med pcDNA3.1+C-LGA-Streptactin-Blasticidin-plasmidet, samt fra kontrollceller (villtype). M(markør): Chameleon® Duo Marker **C)** Western blot med mus anti-strep (1:1000) som primært antistoff og geit anti-mus (1:15 000) som sekundært antistoff. Rød ring rundt det eneste båndet som har oppstått, ved rundt 50 kDa, og som størrelsesmessig korresponderer med LGA-Strep-komplekset (A).

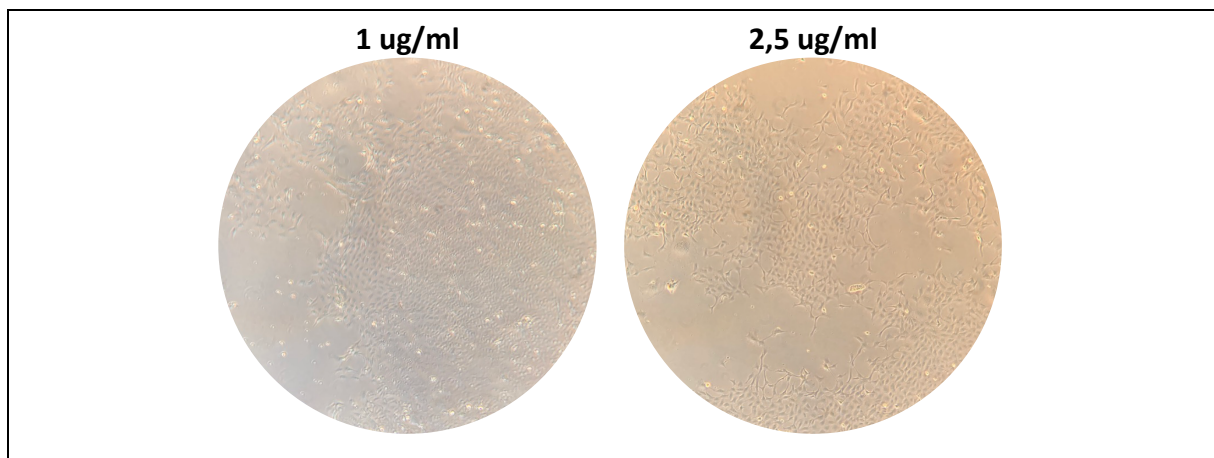
Ponceau-fargingen (fig 11.B) viser at det var proteiner til stede i alle brønnene. Western blotten (fig. 11.C) gav ett bånd ved rundt 50 kDa i brønnen med membranlysate fra celler transfekterte med pcDNA3.1+C-LGA-Streptactin-Blasticidin-plasmidet, noe som korresponderer med størrelsen til LGA-Strep-komplekset på 46,03 kDa. Det ble bare observert tag-spesifikke bånd i membranproteinlysater fra transfekterte celler, noe som korresponderer med det som ble observert for western blot med proteiner fra celler transfekterte med pcDNA3.1+C-LGA-eGFP-plasmidet.

Etter vellykket western blot og plasmid fordøyelse av nytt plasmid ble første transfeksjon ment for etablering av stabile CHSE-cellelinjer gjennomført. Det ble gjennomført 3 transfeksjoner med pcDNA3.1+C-LGA-Streptactin-Blasticidin-plasmidet, med 4 millioner celler per transfeksjon fordelt i 2 brønner i 6-brønnersbrett. Det ble også foretatt 3 transfeksjoner uten plasmid, mock transfeksjon. Det ble også sådd ut samme antall ikke-transfekte celler på samme måte. 3 dager etter transfeksjonen ble celler tilsatt henholdsvis 5 µg/ml og 10 µg/ml blasticidin, samt media uten antibiotika. Cellene fikk vokse ved disse konsentrasjonene i 2 uker, og ble observert undervegs. Det viste seg at disse konsentrasjonene var for høye og etter 14 dager var alle celler døde, både transfekte, mock transfekte og kontrollceller. Dermed ble forsøket avsluttet. I brønner med kontrollceller uten antibiotika var cellene veldig konfluente.

De ble gjennomført 4 nye transfeksjoner med 2 millioner CHSE-celler per transfeksjon pcDNA3.1+C-LGA-Streptactin-Blasticidin-plasmidet der hver transfeksjon ble fordelt i 2 brønner. Etter 3 dager ble celler fra hver transfeksjon tilsatt 0.01, 0.5, 0.7 og 1 µg/ml blasticidin og ble inkuberte med disse konsentrasjonene i 14 dager, hvor mediet ble byttet hver tredje-

fjerde dag. Siden cellene ofte er svake etter transfeksjon og det derfor brukt lave konsentrasjoner av blasticidin i starten. Cellene vokste raskt og ble konfluente i brønnene, og etter 14 dager ble blasticidinkonsentrasjonen økt til henholdsvis 1, 2.5, 5 og 7 $\mu\text{g/ml}$. Etter 14 dager i forhøyet konsentrasjon var alle transfekterte celler i brønner med 5 og 7 $\mu\text{g/ml}$, samt kontrollceller for alle konsentrasjoner, døde. Celler i 1 og 2.5 $\mu\text{g/ml}$ ble observert å ikke ha sin vanlige adherente form der de er strukket utover brønnen. De hadde en rundere form og er løsere festet til brønnen. Ytterligere 14 dager etter at antibiotikakonsentrasjonen ble forhøyet så det ut til at det hadde dannet seg små øyer med adherente celler i brønnene med 1 og 2.5 $\mu\text{g/ml}$.

Etter at transfekterte celler, samt villtype (kontroll) hadde vært inkuberte i ulike konsentrasjoner med blasticidin i omtrent to måneder satt vi igjen med adherente, transfekterte celler i både 1 og 2.5 $\mu\text{g/ml}$ blasticidin, som vokste (fig. 12). Dette indikerer i at vi lyktes i å etablere stabile SasaLGA-uttrykkende cellelinjer ved disse konsentrasjonene. For å verifisere at disse cellene fremdeles uttrykker SasaLGA må det gjøres en western blot, før disse kan bli brukt i videre forsøk.

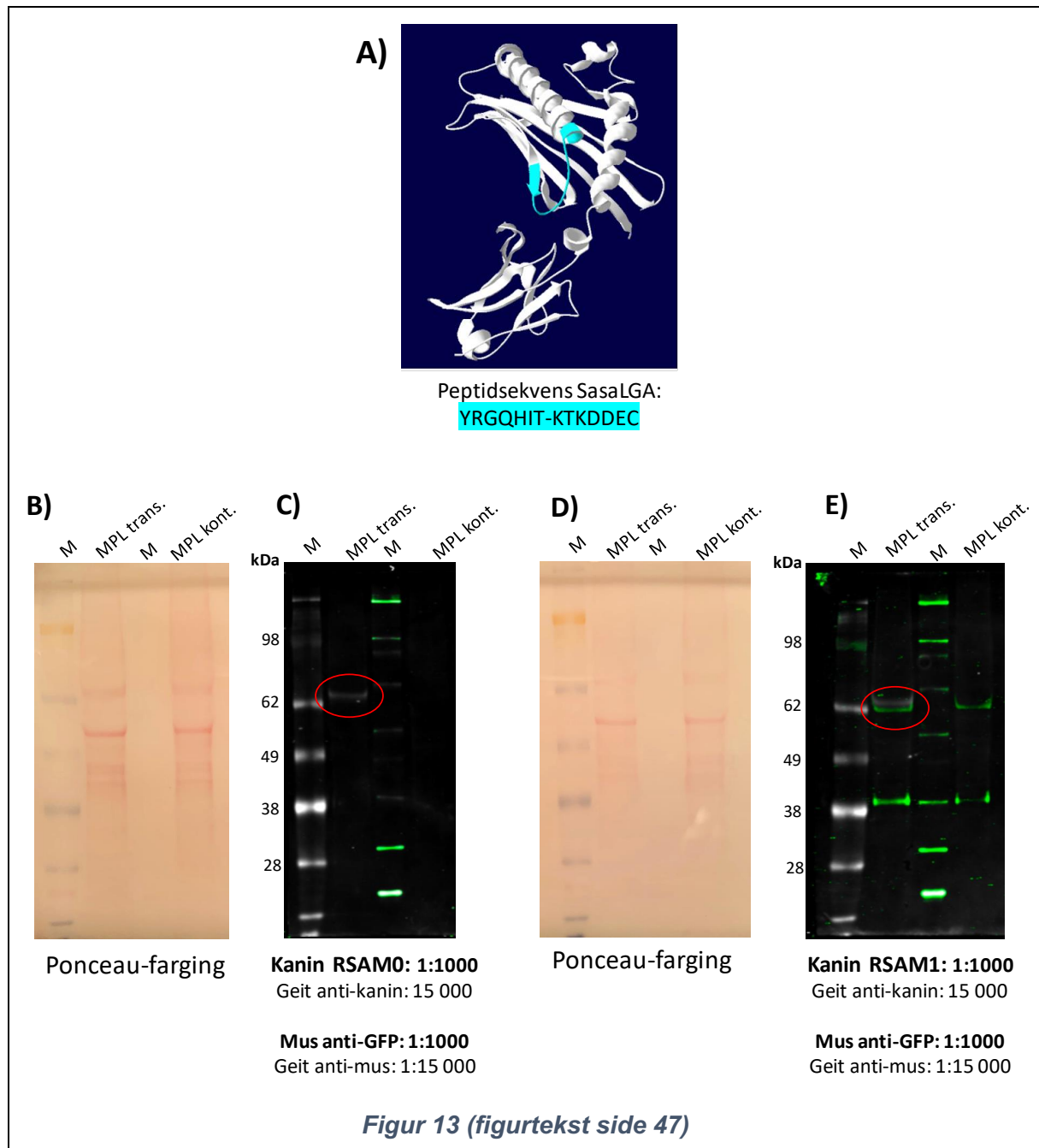


Figur 12: Stabile cellelinjer som overuttrykker pcDNA3.1+C-LGA-Streptactin-Blasticidin-plasmidet har vært inkubert med 1 $\mu\text{g/ml}$ og 2,5 $\mu\text{g/ml}$ blasticidin i 4 uker, og som dermed også uttrykket plasmidet, med Sasa-LGA.

4.6 Utvikling og karakterisering av anti-SasaLGA polyklonale antistoffer

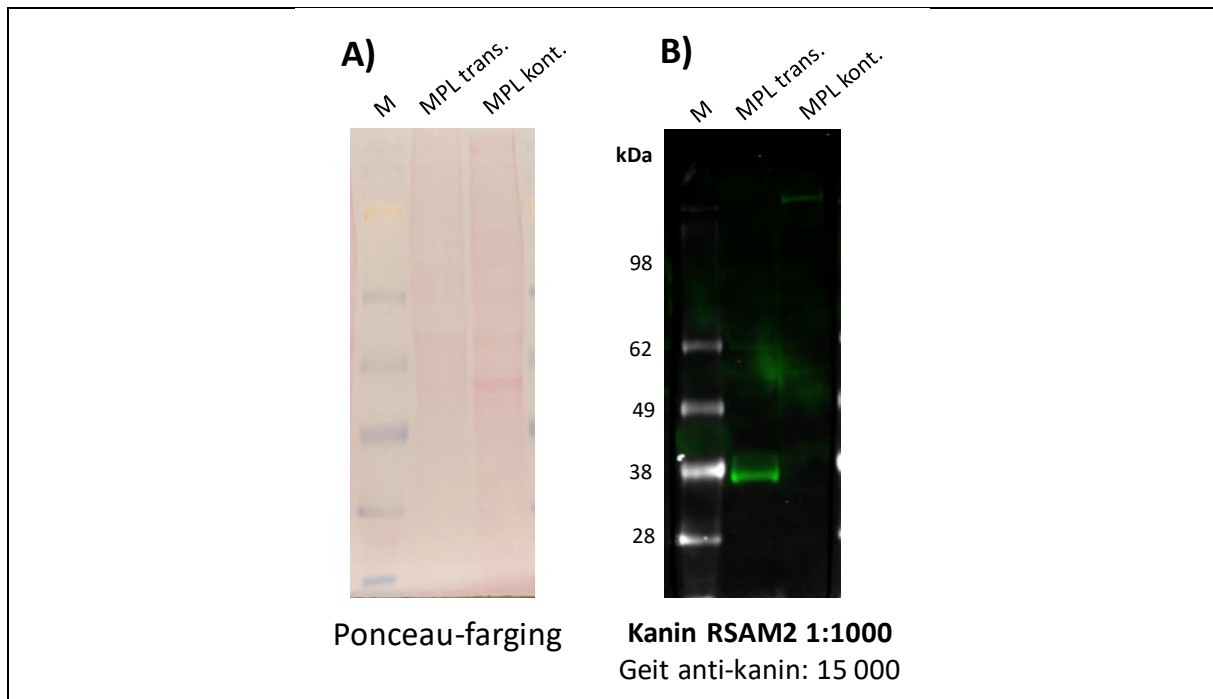
Det ble bestilt polyklonale anti-SasaLGA-antistoffer, og deres spesifisitet for SasaLGA ble undersøkt ved å bruke samme membranprotein-isolater fra CHSE-celler transfekterte med pcDNA3.1+C-LGA-eGFP-plasmidet som i Western blotten i figur 6C, siden disse beviselig inneholder SasaLGA-eGFP-komplekset. I første omgang ble det testet kaninserum fra første blødning (før immuniseringen startet), RSAM0, samt blødning etter 3 doser, RSAM1. Membran- og cytosol-proteinisolater fra celler transfekterte med pcDNA3.1+C-LGA-eGFP-plasmidet, samt villtype celler ble benyttet i SDS-Page og videre western blot. I western blotten ble det benyttet sera fra før immunisering (RSAM0), sera etter tre immuniseringer (RSAM1), samt etter alle immuniseringer (RSAM2). Sekundære antistoffer for RSAM var geit anti-kanin (IRDye® 680RD Goat anti-Rabbit IgG). Videre ble det også benyttet mus anti-GFP, med geit anti-mus som sekundært antistoff.

Figur 13 (side 46): **A)** Bånddiagram som viser SasaLGA-epitopeplassering i predikert SasaLGA-strukturmodell. **B)** Ponceaufarging av nitrocellulosepapir med membran-proteinlysat (MPL) fra CHSE-celler transfekterte med pcDNA3.1+C-LGA-eGFP-plasmidet, samt fra utransfektete CHSE-celler (kontroll). Markørene er henholdvis SeeBlue™ og MagicMark™. **C)** Western blot med serum fra **RSAM0** (1:1000), og mus anti-GFP (1:1000) som primære antistoffer og geit anti-kanin og geit anti-mus (1:15 000) som sekundære antistoffer. Båndet for mus anti-GFP med anti-mus er grått (ringet rundt). **D)** Ponceaufarging av nitrocellulosepapir med membran-proteinlysat (MPL) fra celler transfekterte med pcDNA3.1+C-LGA-eGFP-plasmidet, samt fra villtype celler (kontroll). Markørene er henholdvis SeeBlue™ og MagicMark™. **E)** Western blot med membranprotein-lysater fra celler transfekterte med pcDNA3.1+C-LGA-eGFP-plasmidet, samt fra villtype celler (kontroll), med serum fra **RSAM1** (1:1000) og mus anti-GFP (1:1000) som primære antistoffer, samt anti-kanin og anti-mus (1:15 000) som sekundære antistoffer. Grønne bånd (foruten i brønnen med MagicMark™ - markøren) er proteiner som bindes av immunoglobuliner i RSAM1-serumet og geit-anti-kanin, mens det grå båndet som er ringet rundt er proteiner som bindes av mus-anti-GFP med geit-anti-mus. Det viser at mus anti-GFP har festet seg til SasaLGA-eGFP-komplekset i de transfektete cellene.



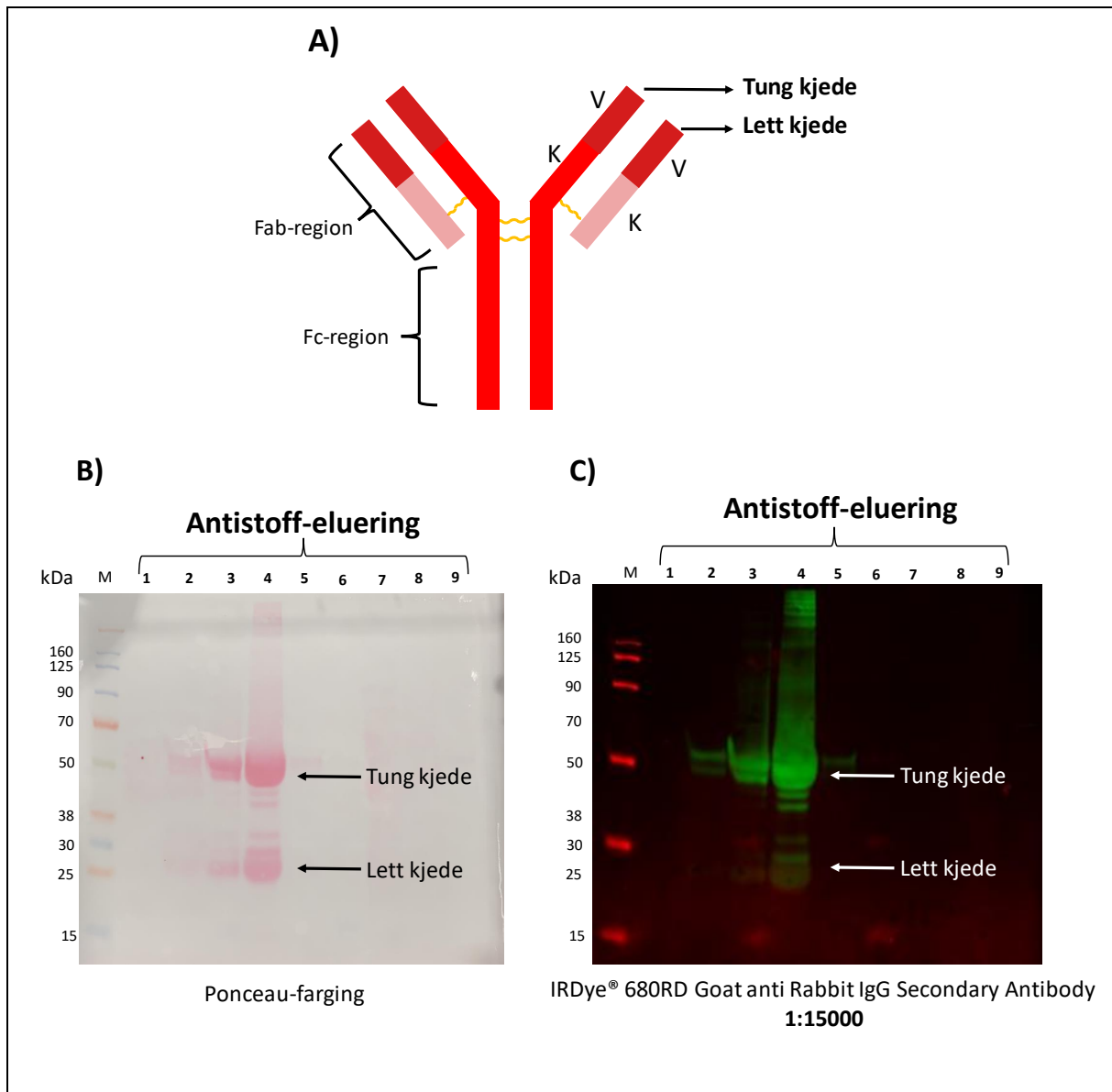
Først og fremst ser man at mus anti-eGFP binder eGFP (grå bånd med rød sirkel rundt) i brønner med transfekterte CHSE-celler, noe som verifiserer at SasaLGA-eGFP faktisk er til stede. RSAM0 binder ingen proteiner verken i transfekterte eller kontrollceller. RSAM1 binder proteiner i transfekterte og kontrollceller ved både 40 og 70 kDa. Det er usannsynlig at båndet ved 70 kDa representerer SasaLGA-eGFP, siden dette blir detektert i protein lysater fra både transfekterte og utransfektete CHSE-celler. Den samme membranen ble videre inkubert med geit anti-GFP, noe som avslørte at SasaLGA-eGFP-båndet ikke overlapper båndene for RSAM1 ved 70 kDa.

RSAM2 (serum etter fjerde og siste immunisering), ble mottatt ved et senere tidspunkt og det ble da gjennomført Western Blot med samme proteinlysate som for RSAM0 og RSAM1. Resultatet blir vist i fig 14.



Figur 14: **A)** Ponceaufarging av nitrocellulosepapir med membran-proteinlysate (MPL) fra celler transfekterte med pcDNA3.1+C-LGA-eGFP-plasmidet, samt fra villtype celler (kontroll). Markøren er SeeBlue™ **B)** Western blot med membranprotein-lysater fra celler transfekterte med pcDNA3.1+C-LGA-eGFP-plasmidet, samt fra villtype celler (kontroll), med RSAM2, som primært antistoff og geit-anti-kanin som sekundært antistoff.

Denne gangen ble det bare observert to bånd, og det var i brønnen med membran protein lysate fra transfekterte celler ved rundt 40 kDa, altså for lite til å kunne være SasaLGA-eGFP. Siden resultatene fra western med kaninsera var uklare, ble det gjort en sekvenssammenstilling av SasaLGA-epitopen og andre L-linjegener i *Oncorhynchus tshawytscha* for å undersøke om eventuelle kryssbindinger med andre L-linjegener kunne ha oppstått. Ved en sekvenssammenstilling blir aminosyresekvenser for lignende gener sammenlignet og korresponderende aminosyrer blir merket.

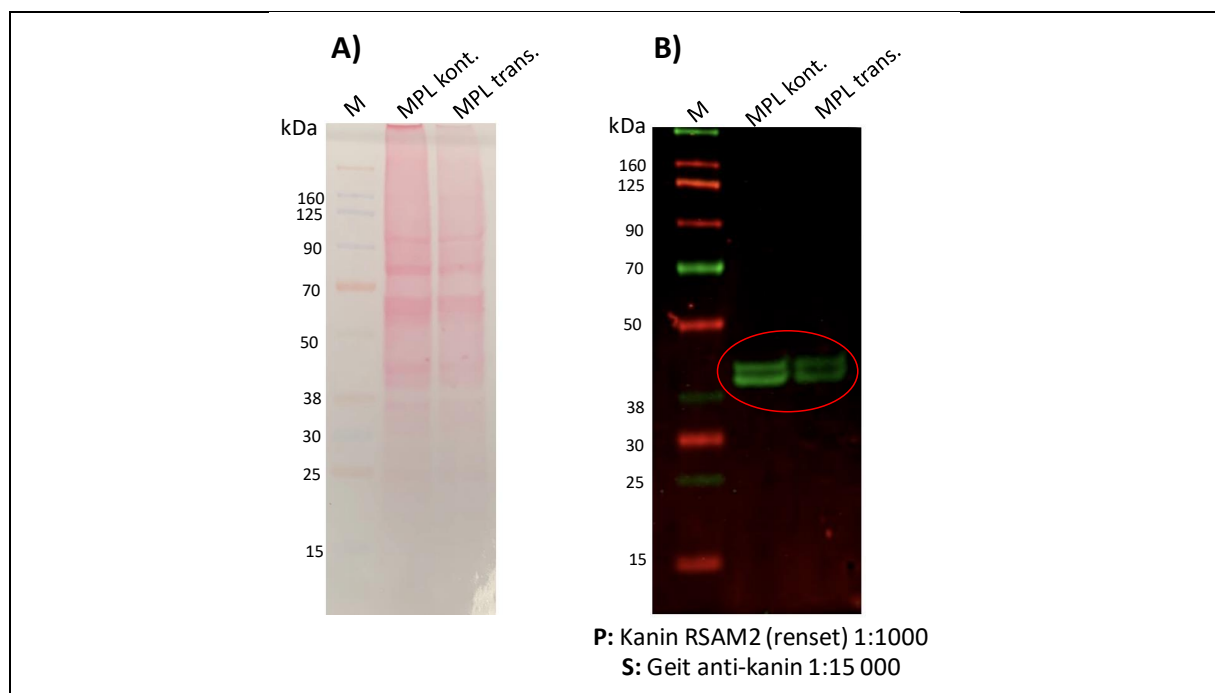


Figur 16: **A)** IgG- antistoff struktur som viser Fab-regionen og Fc-regionen, samt tung og lett kjede. Fab-region (Fragment antigen-binding-regionen) er området på antistoffet som binder antigenet. Fc-regionen (Fragment crystallizable-region) binder effektormolekyler, og ved antistoff rensing er det Fc-regionen i antistoffet som binder protein A. Tung kjede og lett kjede er bundet ved disulfidbindinger (vist i gult), men vil dissosiere ved SDS-Page. Variabel og konstant region på både tung og lett kjede er merket med henholdsvis «V» og «K». **B)** Ponceau-farging av 9 elueringsfraksjonene fra protein A-basert antistoff-rensing av RSAM2-serum, etter SDS-page og overføring av proteiner til membran Det er hovedsakelig proteiner i anti-stoff-eluering nr 3 og 4, og disse brønnene har bånd ved 50 og 25 kDa, som korresponderer med størrelsen på tung og lett kjede i antistoffer. M (Markør): Chameleon® Duo Marker **C)** Western blot av de 9 første antistoff-elueringene etter antistoffrensing av final-Sam med anti-kanin (H+L) som primært og eneste antistoff, siden det er antistoffer fra kanin i brønnene.

Det fremkommer, for både ponceau-fargingen og western blotten med geit-anti-kanin (H+L), hovedsakelig bånd ved to størrelser; 25 og 50 kDa, noe som korresponderer med størrelsen på IgG-antistoffers tunge og lette kjede. De tydeligste båndene er i brønnen med antistoff-eluering nr. 4, noe som korresponderer med protein-konsentrasjonen som ble målt ved NanoDrop, der eluering nr. 4 hadde den klart høyeste proteinkonsentrasjonen.

4.8 Karakterisering av RSAM immunoglobulin rensede polyklonale antistoffer

Det ble foretatt western blot med membran protein-lysat fra CHSE-celler transfekterte med pcDNA3.1+C-LGA-eGFP-plasmidet, samt membran protein-lysat fra utransfektete CHSE-celler. Renset RSAM2 fra elueringsfraksjon nr. 4 (4 mg/ml) ble benyttet som primært antistoff, siden denne hadde høyest protein-konsentrasjon (se tabell 1). Geit-anti-kanin ble brukt som sekundært antistoff.



Figur 17: **A)** Ponceau-farging av nitrocellulosepapir med membran-proteinlysat fra celler transfekterte med pcD-NA3.1+C-LGA-eGFP-plasmidet, samt fra villtype celler (kontroll). Markør (M): Chameleon® Duo Marker **B)** Western blot av med rensset RSAM2 som primært antistoff og geit anti-kanin som sekundært.

Det fremkommer to klare bånd ved rundt 40 kDa i brønner med lysat fra både transfekterte og villtype celler. Dersom RSAM2 hadde bundet LGA spesifikt hadde det vært et bånd ved rundt 70 kDa i brønn med membran-proteinlysat fra transfekterte celler, men det er det ikke, og det indikerer at RSAM2 ikke binder LGA spesifikt.

5 Diskusjon

Selv om ikke-klassiske MHC klasse I gener har blitt identifisert i mange ulike arter, fra fisk til pattedyr (omtalt i (M. F. Flajnik & Kasahara, 2001)), har disse gene svært heterogene sekvenser, organisering og uttrykksmønster blant de ulike artene (E. J. Adams & Luoma, 2013; E. J. Adams & Parham, 2001; Piontkivska & Nei, 2003). Denne diversiteten kompliserer forskningen på disse genene, og hos fisk er funksjonen til de ikke-klassiske MHC klasse I-molekylene fremdeles ukjent. I denne masteroppgaven har jeg fokusert på forståelsen av laksens ikke-klassiske MHC klasse I L-linjegener og bygget videre på tidligere studier av transkripsjonell regulering av L-linjegener hos atlantisk laks (Svenning et al., 2019). Det har også blitt etablert stabile cellelinjer med Sasa-LGA-overuttrykk, som vil bidra til å avdekke deres funksjon.

5.1 CHSE-stimulering

I samsvar med tidligere studier med cellelinjer avledet fra atlantisk laks og primærceller, der det ble vist at IFN- α (Svenning et al., 2019) og INF- γ stimulering (Grimholt, Fosse & Sundaram, 2020) resulterte i oppregulert LIA, førte også IFN- α , IFN- β og større grad IFN- γ i våre forsøk til oppregulering av LIA i CHSE-celler. Stimulering med IFN- α /IFN- γ så ut til å gi en kumulativ effekt med over 10 ganger fold økning av LIA-mRNA nivåer ved 12 hpi, og ved 24 hpi var LIA tilbake til basaluttrykket. Det har altså ikke bare skjedd en kraftig oppregulering, men også en kraftig påfølgende nedregulering. Denne kraftige oppreguleringen på kort tid støtter hypotesen om LIAs rolle som et tidlig antiviralt varselsignal på tvers av ulike laksefiskarter, siden oppregulering til nå har blitt sett i både atlantisk laks og kongelaks. Denne tilsynelatende kumulative effekten, kan tyde på at reguleringen av LIA har to ulike signalveier, og at det kan bli induert av både type I og type II IFN.

LIA ble også kraftig oppregulert i CHSE-celler tidlig i infeksjonsløpet med SAV3. LIAs uttrykksnivåer korresponderer med nsp1-uttrykket (viralt gen), med høyest uttrykk ved 7 og 9 dager etter infeksjon, etterfulgt av en nedregulering ved dag 12 etter infeksjon. Dette står i kontrast til mx-uttrykket, som også ble gradvis oppregulert gjennom infeksjonsløpet, med det høyeste uttrykket på dag 12 etter infeksjon, og dermed ikke ble nedregulert som LIA ble. Det er bemerkelsesverdig forskjell på CHSE-cellene (som er embryoniske og kommer fra *Onts.*), og tidligere analyserte celler isolerte fra atlantisk laks (SHK-1, ASK og primærceller), men på tross av dette viser de alle et IFN induert LIA-uttrykk. Faktisk var LIA det eneste L-linjegenet uttrykt i CHSE-celler. Ved qPCR-undersøkelse av prøver fra interferonstimuleringen av CHSE-

celler ble det brukt primere for LIA, LDA, LCA, LNA og LGA1 og det ble ikke registrert verken basaluttrykk eller induert oppregulering av noen av disse genene. Grunnen til dette kan være at primerene ikke er optimale og flere studier på transkripsjonelle studier må gjennomføres for å bekrefte mangelen på uttrykk. Videre analyser må også omfatte de gjenværende to funksjonelle L-linjegene i *Onts.*: LFA og LEA (Grimholt & Lukacs, 2021).

LIAs tilsynelatende konsekvente oppregulering ved både virus og interferoner i ulike celletyper fra ulike arter kan tyde på at dets funksjon er mer konserverv mellom arter. Det er nylig vist at mens flere L-linjegener generelt er svært variable mellom relativt nært beslektede laksearter, eksempelvis, mellom atlantisk laks og regnbueørret, ser LIA ut til å være konserverv og karakterisert som funksjonell i begge. LIA er faktisk høyst konserverv i laksefisk generelt og i tillegg til atlantisk laks og kongelaks, finnes dette genet hos rødlaks, coho-laks, regnbueørret og brunørret (Grimholt & Lukacs, 2021). Videre er det også funnet L-linjegener hos gjedde (*Esox Lucius*), og disse er sammenlignet med L-linjegene i flere laksefisk, hvor det viste seg at LIA er konserverv også hos gjedde (Grimholt & Lukacs, 2021). Det at LIA er til stede i arter med større evolusjonær avstand forsterker hypotesen om deres konservervte og potensielt svært viktige funksjon i cellulær immunitet. Denne konserveringen kan også implisere at, dersom LIA faktisk fungerer som et antigenpresenterende molekyl, er det sannsynlig at den også binder en konserverv ligand.

I likhet med det som har blitt observert for LIA, blir Sasa-LGA også induert av SAV3, så vel som IFN-a (Svenning et al., 2019) og IFN-g (Grimholt et al., 2020). I kongelaks er LGA derimot definert som et pseudogen (Grimholt & Lukacs, 2021), noe som reiser spørsmål om dette molekylets biologiske rolle.

Den store variasjonen mellom mange av de andre L-linjegene, eksempelvis LGA, tyder på at disse er mer plastiske, noe som kan indikere at de er mer påvirket av koevolusjonært press. Dette kan videre tyde på at flere av de andre L-linjegene binder til mer diverse reseptorer som lettere forandres ved høyere evolusjonært press, potensielt en NK-lignende reseptor. Det har vist seg at fisk har NK-lignende celler, og blant disse er det i flere fiskearter også funnet polymorfe multi-genfamilier, som er forskjellige mellom arter. Blant annet er NITR (Hawke et al., 2001; Litman, Hawke & Yoder, 2001; Yoder et al., 2001) og LITR-genene (Stafford, Bengtén, Du Pasquier, Miller & Wilson, 2007), foreslått som mulige NK-cellerreseptorer. Imidlertid er

samspeilet mellom forskjellige ikke-klassiske MHC klasse I avstammingsmolekyler og NK-cellerreseptorer i fisk fortsatt ukjent.

5.2 Plasmid design

Målet med å etablere stabile cellelinjer som uttrykker SasaLGA var å videre utnytte disse til å detektere hvordan leukocytter fra hodenyren til atlantisk laks reagerte på å bli inkuberte sammen med celler som overuttrykker dette ikke-klassiske klasse I MHC-molekylet. I et slik forsøk ville Sasa-LGA uttrykkende celler blitt fikserte i forkant, slik at de er døde, men fremdeles har sin fulle form med sine intakte proteiner på utsiden. Dersom hypotesen om at LGA har en funksjon som en MHC stemmer, ville en eventuell interaksjon mellom LGA og laksens immunceller muligens ført til økt uttrykk av cytotoksiske enzymer, noe som kunne blitt detektert ved qPCR i etterkant av RNA-isolering og cDNA-syntese.

For å oppnå stabile SasaLGA-uttrykkende cellelinjer ble to ulike plasmider tatt i bruk, noe som resulterte i overuttrykk av LGA-GFP-fusjonsprotein og en strep-epitop-tagget LGA. GFP er mye brukt og det finnes kommersielle, monoklonale antistoffer for dette proteinet. En annen enorm fordel med GFP ligger i navnet, *Green Fluoresens Protein*, altså proteinet er selvlysende (Wang & Hazelrigg, 1994). Dermed var det mulig å visualisere GFP-proteinene i transfekterte celler (fig 7), noe som gav et innblikk i transfeksjonseffektiviteten. Ved konfokalmikroskopi ble det også tatt bilder av cellene på flere nivåer (fra bunnen av cellen som viste sin adherente utstrakte form mot dekkglasset, til toppen av cellen) (fig 8). Disse bildene gav oss en indikasjon på transfeksjonseffektiviteten, men det var vanskelig å se hvor i cellen Sasa-LGA befant seg. Baksiden med GFP-taggen er størrelsen. LGA alene er 42,8 kDa, mens GFP er 26,9 kDa. GFP-proteinene er altså nesten like stort som målproteinene i seg selv. Det var også klonet i samme leseramme som Sasa-LGA, så disse vil bli dannet som ett stort enkeltkompleks. Dette kan forstyrre en eventuell naturlig prosesseringsvei som LGA (og potensielt andre L-linjegener) har hos CHSE-celler (Küey, Larocque, Clarke & Royle, 2019). GFP kan også interagere med andre proteiner i cellen.

I designet av pcDNA3.1+C-LGA-Streptactin-Blasticidin, ble *Twin Strep-Tactin II tag* (Strep-tag) tatt i bruk (Schmidt et al., 2013). Strep-taggen er svært liten i størrelse (3,23 kDa), noe som gjør det mindre sannsynlig at den interfererer med prosesseringen av LGA inne i cellen. For

dette plasmidet var det også satt inn en linker, bestående av en liten sekvens med glycin, som er nøytral, hydrofob, upolar og dermed en svært lite reaktiv aminosyre.

5.3 Western blot- LGA i membranen

I dette prosjektet ble proteiner som stammet fra både membran og cytosol analysert i western blot. Permeabiliseringsbufferet gjør cellemembranen permeabel, slik at proteiner kan sive ut, mens membranen fremdeles er intakt. Ved å sentrifugere celler med permeabiliseringsbuffer vil dermed cytosoliske protein sive ut, og supernatanten vil inneholde cytosoliske proteiner. Solubiliseringbuffer løser opp hele membranen og dens proteiner, og supernatanten etter sentrifugering vil da inneholde proteiner som var til stede i selve membranen. Ved å benytte disse to typene av buffer vil man ikke bare kunne detektere målprotein, men også få en indikasjon på om det befinner seg i cytosol eller i cellenes membran.

Både SasaLGA-eGFP og SasaLGA-Strep er utelukkende detektert i membranfraksjonen, noe som indikerer at LGA er uttrykt på overflaten av cellene. Det fremkommer av figur 6 et tydelig bånd på rundt 70kDa, som er størrelsen til GFP/LGA-komplekset. Videre ser man at båndet bare vises i brønnen med membran protein-lysater fra transfekterte celler, uten noen bånd i brønnen med cytosolisk lysat. Ved western blot med mus anti-strep monoklonale antistoffer med celler transfekterte med pcDNA3.1+C-LGA-Streptactin-Blasticidin-plasmidet ble det påvist ett bånd ved 50 kDa, og dette befant seg i brønnen membran-protein-lysate. Igjen, korresponderer størrelsen med LGA-Strep-komplekset.

I sammenheng med protein-isolering er det viktig å merke seg at mengden permeabilisering og solubiliseringbuffer vil være avgjørende for protein-konsentrasjonen i endelig protein-isolat fra disse. Det ble konsekvent brukt under halvparten så lite solubiliseringbuffer (som gav membranlysate) som permeabiliseringsbuffer (som gav cytosoliske protein lysate (se seksjon 3.15). Hypotesen til prosjektet er at LGA fungerer som en MHC og dermed befinner seg i membranen. Dermed var det også ønskelig at MPL var så konsentrert som mulig, for å øke sannsynligheten for at antistoffene ville binde LGA-GFP/Strep-kompleksene, og dette var grunnen til at det ble brukt mindre solubiliseringbuffer. Det kan også tenkes at det generelt er mindre proteiner i cellemembranen enn cytosol, og at det dermed også er hensiktsmessig å

bruke mindre solubiliseringbuffer for å jevne ut protein-konsentrasjonen. For å detektere nøyaktig proteinkonsentrasjon i proteinlysaten kan man benytte Bradford Protein Assay-metoden (He, 2011).

Proteiner som blir uttrykt på cellemembranen har ofte en spesifikk funksjon her, eksempelvis transportprotein, enzym eller reseptor. Siden det viser seg at LGA og trolig andre L-linjegener blir uttrykt her, er det nærliggende å tro at de har en antigenpresenterende funksjon. Det at LGA er et pseudogen i CHSE, men SasaLGA likevel blir uttrykt på membranen i transfekterte celler kan komme av at den generelle strukturen til L-linjemolekyler er nokså lik, samt at det fleste L-linjegener har en nokså relativt høy sekvensidentitet. Dette kan være indikasjon på at andre L-linjegener også blir uttrykt på membranen i kongelaks, og muligens også at LGA og andre L-linjegener blir uttrykt på membranen hos andre laksearter, eksempelvis atlantisk laks.

Innledningsvis ble det nevnt at siden L-linjegener har bindings seter som, *in silico*, blir karakterisert som hydrofobe, kunne det tenkes at de hadde en lignende funksjon som menneskers ikke-klassiske MHC klasse I CD1-molekyler ((Godfrey, Uldrich, McCluskey, Rossjohn & Moody, 2015). Hos mennesker presenterer CD1-kompleksene lipider til ukonvensjonelle T-celler. Siden fiskens immunforsvar er forløperen til menneskets, kan det tenkes at L-linjegene hos fisk er opphavet til CD1 kompleksene hos menneskene. På lik linje med fiskens diversitet av L-linjegener, er også CD1-gruppen hos mennesker mangfoldig, og som nevnt innledningsvis har CD1-gruppen flere gener: CD1a, CD1b, CD1c, CD1d og CD1e (E. J. Adams & Luoma, 2013; Brigl & Brenner, 2004). Det er forslått at hver gruppe CD1-molekyler har ulik funksjon, og presenterer ulike antigener (Ly & Moody, 2014). Hos mennesker har CD1d-genet vist seg å være uttrykt i flere cellyper enn de andre genene, samt at den er mer polymorft (Huang & Moody, 2016). I tillegg til pattedyr har CD1 gener blitt funnet i fugler (Miller et al., 2005) og reptiler (Salomonsen et al., 2005). Det er viktig å merke seg at CD1 ikke er funnet i fisk, men det er fristende å spekulere i om L-linjegener har en lignende funksjon som CD1, selv om de ikke har evolusjonært slektskap.

Merk at selv om våre western blot indikerer at LGA er membranbundet, gir ikke dette svar på hvordan LGA er inkorporert i cellemembranen og hvorvidt det vender innover eller utover. Det er også mulig at LGA er forankret i membranen til endosomale vesikler. Et eksempel på ikke klassisk MHC klasse I molekyler som blir prosessert slik er menneskers CD1e, som i kontrast til alle andre CD1-gener, utelukkende trafikkerer mellom cellens endosomale nettverk, før det

spaltes til å bli et løselig protein (Facciotti et al., 2011; Ly & Moody, 2014). CD1e er dermed aldri uttrykt på plasmamembranen og kan dermed heller ikke fungere som et antigenpresenterende molekyl.

Dersom forsøket på å produsere LGA-spesifikke polyklonale antistoffer hadde vært vellykket kunne vi brukt disse på levende/fikserte Sasa-LGA-uttrykkende celler, og videre brukt sekundære geit anti-kanin antistoffer med påfølgende flowcytometri. Hadde det blitt detektert fluoressens da, kunne man beviselig konkludere med at LGA-komplekset sitter på cellens overflate, vender utover, og muligens har en funksjon som innebærer interaksjon med andre celler.

De polyklonale antistoffene var ikke LGA-spesifikke, men det finnes imidlertid en annen metode vi også kunne brukt for å detektere hvordan LGA ligger i membranen, nemlig en snorkel-tag. Snorkelproteiner har en bøyd form, som en snorkel, og dersom man hadde plassert taggen i den cytoplasmiske delen av proteinene, ville taggen vendt ut mot det ekstracellulære rom, hvor det kan bli detektert med kommersielt tilgjengelige antistoffer (Brown et al., 2013).

5.4 Utvikling og karakterisering av anti-SasaLGA polyklonale antistoffer

Forståelse av proteins biologiske funksjon er essensiell og i denne sammenheng er antistoffer kraftfulle verktøy, som muliggjør funksjonelle studier med mål om å identifisere og kvantifisere cellers proteiner, samt å identifisere og sortere ulike celletyper. Dessverre er studier på fiskens immunologi prege av mangelen på tilgjengelige antistoffer og mange dårlig karakteriserte antistoffer (Dixon, Barreda & Sunyer, 2018). Per i dag er det ingen tilgjengelige antistoffer for noen av de mange ikke-klassiske MHC klasse I L-linjekompleksene som fisk har. Dermed ble det gjort et forsøk på å produsere anti-LGA spesifikke polyklonale antistoffer gjennom en peptid-immuniseringsstrategi, der peptider ble konjugerte med KLH og injiserte i RSAM.

SasaLGA-peptidet som ble brukt i immuniseringen var valgt ut med hensyn på dens fysiske tilgjengelighet i en predikert strukturmodell av LGA, og den er lokalisert i starten av den andre alfaheliksen i det predikerte antigenbindingssete til LGA. I et forsøk på å bestemme spesifisiteten til vårt potensielle anti-LGA polyklonale antistoffer ble det gjennomført flere western blots med LGA-eGFP proteiner som positiv kontroll.

Ved å bruke helt kaninserum fra den immuniserte kaninen, fremkommer det at RSAM1 binder, trolig uspesifikt, til mange proteiner fra CHSE (fig 13E). Merk at dette er helt serum og ikke rensende antistoffer, noe som gjør at det er mange andre proteiner til stede i serumet. Sannsynligheten for uspesifikke bindinger er derfor høy. Det kan midlertid se ut til at noe i RSAM1 bandt seg til et protein ved 70 kDa i testbrønn med membranlysat fra LGA-eGFP-transfektete CHSE-celler. Det ble senere bekreftet ved hjelp av anti-GFP at denne bindingen var uspesifikk, siden det ble dannet to bånd nokså nært hverandre (forventet å overlape dersom anti-LGA var spesifikk). Dette tyder på at RSAM1 har bundet uspesifikt til et annet protein som tilfeldigvis har omtrent samme størrelse som LGA/GFP-komplekset.

Både helt serum og Protein A-rensede Ig fraksjoner fra samme serum (RSAM2) binder også til ett protein med størrelse på rundt 40 kDa, som ikke ble observert ved RSAM0. RSAM har altså sannsynligvis produsert disse antistoffene som respons på LGA-peptidet, noe som øker sannsynligheten for at RSAM2 binder andre L-linjegener. Det er imidlertid viktig å merke seg at pre-immune serum som ikke har blitt utsatt for andre peptider eller adjuvanter. Serum fra dyr som allerede har blitt injisert med en adjuvant alene hadde vert en mer passende kontroll. For å finne ut nøyaktig hva det er RSAM2-antistoffer har bundet til kan man gjøre en immunopresipitering etterfulgt av sekvensering av det rensende proteinene ved hjelp av massespektrometri, for å bestemme proteinets identitet. I denne sammenheng er det også viktig å merke seg, at mens *Onts*-LGA trolig er et pseudogen i CHSE, har også de andre L-linjegene en predikert størrelse på 40 kDa. Dermed er det fristende å spekulere i om RSAM2 kanskje binder endogene L-linjegener. Generelt har forskjellige L-linjegener innen en gitt art av laksefisk omkring 58-87% matchende aminosyresekvenser (Svenning et al., 2019). Det kan dermed tenkes at RSAM anti-LGA binder to ulike L-linjegener som er naturlig til stede i CHSE, eksempelvis LIA eller potensielt LFA.

6 Fremtidsaspekter for prosjektet

Fremtidige studier bør se nærmere på sammensetningen og den nøyaktige cellulære plasseringen til LGA. Ved å bruke anti-strep tac II eller alternativt anti-GFP spesifikke antistoffer kan et ko-immunopresipiteringsforsøk utføres for å bestemme hvorvidt LGA er assosiert med et B2 mikroglobulin, eller ikke. Videre kan mer detaljert mikroskopisk analyse ved bruk av strukturert illumineringsmikroskopi brukes til å undersøke potensiell korresponderende lokalisering mellom LGA og markører for tidlige og sene endosomer/lysosomer (Nepal et al., 2020).

De nå etablerte stabile cellelinjene som overuttrykker SasaLGA-komplekset vil videre bli inkubert sammen med primerceller fra atlantisk laks for å undersøke eventuelle effektorresponser. En lignende tilnærming lyktes i å belyse funksjonen til CD40L i atlantisk laks (Lagos, Iliev, Helland, Roseblatt & Jørgensen, 2012). Dersom LGA-komplekset presenterer antigener, kan det tenkes at effektorcellene fra atlantisk laks responderer med å produsere cytotoksiske enzymer, noe som kan detekteres via ekspresjonsstudier ved bruk av primere spesifikke for f.eks. granzyme A, granzyme K og perforin. Eventuelt kan man prøve å infisere de transfekterte cellene med SAV på forhånd for å være sikre på at noe blir presentert på MHC-kompleksene (dersom de har denne egenskapen).

7 Konklusjoner

- LIA hos kongelaks, i likhet med LIA i atlantisk laks, blir oppregulert ved interferonstimulering, noe som indikerer at LIA har en viktig biologisk, evolusjonært konserverert funksjon. Interferonene som oppregulerer LIA i CHSE-celler mest effektivt er IFN- α , IFN- β og IFN- γ , og oppreguleringen blir imidlertid enda høyere ved kostimulering med IFN- γ og IFN- α .
- I likhet med hva som er observert med in vitro forsøk med atlantisk laks blir *Onts*-LIA oppregulert ved in vitro SAV3 infeksjon i CHSE-celler.
- CHSE-celler uttrykker ikke predikert funksjonelle LDA, LCA, LNA, og i tillegg er LGA, som er et predikert pseudogen i kongelaks ikke uttrykt i CHSE-celler.
- SasaLGA blir prosessert til cellemembranen, noe som indikerer at det er involvert i antipresentasjon og/eller interaksjoner med ligander.
- Stabile overuttrykkende Sasa-LGA har blitt etablert og den optimale blasticidinkonsentrasjonen for å vedlikeholde disse er 2 μg /ml. Det ser også ut til at CHSE-celler er resistente mot G-418.
- Mens polyklonale antistoffer spesifikke for LGA ikke ble dannet, binder Protein A rensete immunoglobuliner fra LGA-peptid immunisert kanin til to proteiner av ukjent art i CHSE-celler.

8 Referanser

- Abbas, A. K., Lichtman, A. H. & Pillai, S. (2019). *Basic immunology e-book: functions and disorders of the immune system*: Elsevier Health Sciences.
- Adams, A. (2019). Progress, challenges and opportunities in fish vaccine development. *Fish Shellfish Immunol*, *90*, 210-214. 10.1016/j.fsi.2019.04.066
- Adams, E. J. & Luoma, A. M. (2013). The adaptable major histocompatibility complex (MHC) fold: structure and function of nonclassical and MHC class I-like molecules. *Annu Rev Immunol*, *31*, 529-561. 10.1146/annurev-immunol-032712-095912
- Adams, E. J. & Parham, P. (2001). Species-specific evolution of MHC class I genes in the higher primates. *Immunol Rev*, *183*, 41-64. 10.1034/j.1600-065x.2001.1830104.x
- Alexopoulou, L., Holt, A. C., Medzhitov, R. & Flavell, R. A. (2001). Recognition of double-stranded RNA and activation of NF- κ B by Toll-like receptor 3. *Nature*, *413*(6857), 732-738. 10.1038/35099560
- Ballesteros, N. A., Saint-Jean, S. S., Perez-Prieto, S. I. & Coll, J. M. (2012). Trout oral VP2 DNA vaccination mimics transcriptional responses occurring after infection with infectious pancreatic necrosis virus (IPNV). *Fish Shellfish Immunol*, *33*(6), 1249-1257. 10.1016/j.fsi.2012.09.004
- Barraza, F., Montero, R., Wong-Benito, V., Valenzuela, H., Godoy-Guzmán, C., Guzmán, F., . . . Imarai, M. (2020). Revisiting the Teleost Thymus: Current Knowledge and Future Perspectives. *Biology (Basel)*, *10*(1). 10.3390/biology10010008
- Barrow, K. M., Perez-Campo, F. M. & Ward, C. M. (2006). Use of the cytomegalovirus promoter for transient and stable transgene expression in mouse embryonic stem cells. *Methods Mol Biol*, *329*, 283-294. 10.1385/1-59745-037-5:283
- Bassity, E. & Clark, T. G. (2012). Functional identification of dendritic cells in the teleost model, rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *PLoS One*, *7*(3), e33196. 10.1371/journal.pone.0033196
- Bernstein, R. M., Schluter, S. F., Bernstein, H. & Marchalonis, J. J. (1996). Primordial emergence of the recombination activating gene 1 (RAG1): sequence of the complete shark gene indicates homology to microbial integrases. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *93*(18), 9454-9459. doi:10.1073/pnas.93.18.9454
- Bilal, S., Etayo, A. & Hordvik, I. (2021). Immunoglobulins in teleosts. *Immunogenetics*, *73*(1), 65-77. 10.1007/s00251-020-01195-1
- Bjorkman, P. J., Saper, M., Samraoui, B., Bennett, W. S., Strominger, J. t. & Wiley, D. (1987). Structure of the human class I histocompatibility antigen, HLA-A2. *Nature*, *329*(6139), 506-512.
- Bowden, T. J., Cook, P. & Rombout, J. H. (2005). Development and function of the thymus in teleosts. *Fish Shellfish Immunol*, *19*(5), 413-427. 10.1016/j.fsi.2005.02.003
- Brigl, M. & Brenner, M. B. (2004). CD1: Antigen Presentation and T Cell Function. *Annual Review of Immunology*, *22*(1), 817-890. 10.1146/annurev.immunol.22.012703.104608
- Brown, M., Stafford, L. J., Onisk, D., Joaquim, T., Tobbs, A., Goldman, L., . . . Chambers, R. (2013). Snorkel: an epitope tagging system for measuring the surface expression of membrane proteins. *PloS one*, *8*(9), e73255-e73255. 10.1371/journal.pone.0073255

- Chang, C. J., Jenssen, I. & Robertsen, B. (2016). Protection of Atlantic salmon against salmonid alphavirus infection by type I interferons IFN α , IFN β and IFN γ . *Fish Shellfish Immunol*, 57, 35-40. 10.1016/j.fsi.2016.08.020
- Chilmonczyk, S. (1992). The thymus in fish: Development and possible function in the immune response. *Annual Review of Fish Diseases*, 2, 181-200.
[https://doi.org/10.1016/0959-8030\(92\)90063-4](https://doi.org/10.1016/0959-8030(92)90063-4)
- Corbeil, S., Kurath, G. & LaPatra, S. E. (2000). Fish DNA vaccine against infectious hematopoietic necrosis virus: efficacy of various routes of immunisation. *Fish Shellfish Immunol*, 10(8), 711-723. 10.1006/fsim.2000.0286
- D'Souza, M. P., Adams, E., Altman, J. D., Birnbaum, M. E., Boggiano, C., Casorati, G., . . .Früh, K. (2019). Casting a wider net: Immunosurveillance by nonclassical MHC molecules. *PLoS pathogens*, 15(2), e1007567.
- Dalmo, R. A. (2018). DNA vaccines for fish: Review and perspectives on correlates of protection. *J Fish Dis*, 41(1), 1-9. 10.1111/jfd.12727
- De Libero, G. & Mori, L. (2010). How the immune system detects lipid antigens. *Prog Lipid Res*, 49(2), 120-127. 10.1016/j.plipres.2009.10.002
- Dijkstra, J. M., Katagiri, T., Hosomichi, K., Yanagiya, K., Inoko, H., Ototake, M., . . .Shiina, T. (2007). A third broad lineage of major histocompatibility complex (MHC) class I in teleost fish; MHC class II linkage and processed genes. *Immunogenetics*, 59(4), 305-321. 10.1007/s00251-007-0198-6
- Dixon, B., Barreda, D. R. & Sunyer, J. O. (2018). Perspective on the Development and Validation of Ab Reagents to Fish Immune Proteins for the Correct Assessment of Immune Function. *Frontiers in immunology*, 9, 2957-2957.
10.3389/fimmu.2018.02957
- Facciotti, F., Cavallari, M., Angénieux, C., Garcia-Alles, L. F., Signorino-Gelo, F., Angman, L., . . .Libero, G. D. (2011). Fine tuning by human CD1e of lipid-specific immune responses. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(34), 14228-14233.
doi:10.1073/pnas.1108809108
- Flajnik, M. F. (2018). A cold-blooded view of adaptive immunity. *Nature Reviews Immunology*, 18(7), 438-453.
- Flajnik, M. F. & Kasahara, M. (2001). Comparative genomics of the MHC: glimpses into the evolution of the adaptive immune system. *Immunity*, 15(3), 351-362. 10.1016/s1074-7613(01)00198-4
- Flajnik, M. F. & Kasahara, M. (2010). Origin and evolution of the adaptive immune system: genetic events and selective pressures. *Nat Rev Genet*, 11(1), 47-59.
10.1038/nrg2703
- Glasauer, S. M. K. & Neuhauss, S. C. F. (2014). Whole-genome duplication in teleost fishes and its evolutionary consequences. *Molecular Genetics and Genomics*, 289(6), 1045-1060. 10.1007/s00438-014-0889-2
- Godfrey, D. I., Uldrich, A. P., McCluskey, J., Rossjohn, J. & Moody, D. B. (2015). The burgeoning family of unconventional T cells. *Nat Immunol*, 16(11), 1114-1123.
10.1038/ni.3298
- Grayfer, L., Hodgkinson, J. W. & Belosevic, M. (2014). Antimicrobial responses of teleost phagocytes and innate immune evasion strategies of intracellular bacteria. *Developmental & Comparative Immunology*, 43(2), 223-242.
<https://doi.org/10.1016/j.dci.2013.08.003>

- Grimholt, U., Fosse, J. H. & Sundaram, A. Y. M. (2020). Selective Stimulation of Duplicated Atlantic Salmon MHC Pathway Genes by Interferon-Gamma. *Frontiers in immunology*, *11*, 571650-571650. 10.3389/fimmu.2020.571650
- Grimholt, U. & Lukacs, M. (2021). MHC class I evolution; from Northern pike to salmonids. *BMC Ecology and Evolution*, *21*(1), 3. 10.1186/s12862-020-01736-y
- Grimholt, U., Tsukamoto, K., Azuma, T., Leong, J., Koop, B. F. & Dijkstra, J. M. (2015). A comprehensive analysis of teleost MHC class I sequences. *BMC evolutionary biology*, *15*(1), 1-17.
- Grimholt, U., Tsukamoto, K., Hashimoto, K. & Dijkstra, J. M. (2019). Discovery of a Novel MHC Class I Lineage in Teleost Fish which Shows Unprecedented Levels of Ectodomain Deterioration while Possessing an Impressive Cytoplasmic Tail Motif. *Cells*, *8*(9). 10.3390/cells8091056
- Gudding, R. & Goodrich, T. (2014). The history of fish vaccination. *Fish vaccination*, 1-11.
- Halenius, A., Gerke, C. & Hengel, H. (2014). Classical and non-classical MHC i molecule manipulation by human cytomegalovirus: So many targets - But how many arrows in the quiver? *Cellular & molecular immunology*, *12*. 10.1038/cmi.2014.105
- Hansen, J. D. & La Patra, S. (2002). Induction of the rainbow trout MHC class I pathway during acute IHNV infection. *Immunogenetics*, *54*(9), 654-661. 10.1007/s00251-002-0509-x
- Haugland, G. T., Jordal, A.-E. O. & Wergeland, H. I. (2012). Characterization of small, mononuclear blood cells from salmon having high phagocytic capacity and ability to differentiate into dendritic like cells. *PloS one*, *7*(11), e49260-e49260. 10.1371/journal.pone.0049260
- Hawke, N. A., Yoder, J. A., Haire, R. N., Mueller, M. G., Litman, R. T., Miracle, A. L., . . . Litman, G. W. (2001). Extraordinary variation in a diversified family of immune-type receptor genes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *98*(24), 13832-13837. 10.1073/pnas.231418598
- He, F. (2011). Bradford Protein Assay. *Bio-protocol*, *1*(6), e45. 10.21769/BioProtoc.45
- Hober, S., Nord, K. & Linholt, M. (2007). Protein A chromatography for antibody purification. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, *848*(1), 40-47. 10.1016/j.jchromb.2006.09.030
- Hodneland, K. & Endresen, C. (2006). Sensitive and specific detection of Salmonid alphavirus using real-time PCR (TaqMan®). *Journal of Virological Methods*, *131*(2), 184-192. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2005.08.012>
- Huang, S. & Moody, D. B. (2016). Donor-unrestricted T cells in the human CD1 system. *Immunogenetics*, *68*(8), 577-596. 10.1007/s00251-016-0942-x
- Hølvold, L. B., Myhr, A. I. & Dalmo, R. A. (2014). Strategies and hurdles using DNA vaccines to fish. *Veterinary research*, *45*(1), 21-21. 10.1186/1297-9716-45-21
- Ingerslev, H.-C., Pettersen, E. F., Jakobsen, R. A., Petersen, C. B. & Wergeland, H. I. (2006). Expression profiling and validation of reference gene candidates in immune relevant tissues and cells from Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Molecular Immunology*, *43*(8), 1194-1201. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2005.07.009>
- Jault, C., Pichon, L. & Chluba, J. (2004). Toll-like receptor gene family and TIR-domain adapters in *Danio rerio*. *Mol Immunol*, *40*(11), 759-771. 10.1016/j.molimm.2003.10.001
- Kasahara, M. (1997). New Insights into the Genomic Organization and Origin of the Major Histocompatibility Complex: Role of Chromosomal (genome) Duplication in the

- Emergence of the Adaptive Immune System. *Hereditas*, 127(1-2), 59-65.
<https://doi.org/10.1111/j.1601-5223.1997.t01-1-00059.x>
- Kileng, Ø., Brundtland, M. I. & Robertsen, B. (2007). Infectious salmon anemia virus is a powerful inducer of key genes of the type I interferon system of Atlantic salmon, but is not inhibited by interferon. *Fish Shellfish Immunol*, 23(2), 378-389.
 10.1016/j.fsi.2006.11.011
- Kordon, A., Karsi, A. & Pinchuk, L. (2019). Innate Immune Responses in Fish: Antigen Presenting Cells and Professional Phagocytes. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 18, 1123-1139. 10.4194/1303-2712-v18_9_11
- Küey, C., Larocque, G., Clarke, N. I. & Royle, S. J. (2019). Unintended perturbation of protein function using GFP nanobodies in human cells. *Journal of cell science*, 132(21), jcs234955. 10.1242/jcs.234955
- Lagos, L. X., Iliev, D. B., Helland, R., Roseblatt, M. & Jørgensen, J. B. (2012). CD40L--a costimulatory molecule involved in the maturation of antigen presenting cells in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Dev Comp Immunol*, 38(3), 416-430.
 10.1016/j.dci.2012.07.011
- Lauksund, S., Greiner-Tollersrud, L., Chang, C. J. & Robertsen, B. (2015). Infectious pancreatic necrosis virus proteins VP2, VP3, VP4 and VP5 antagonize IFN α 1 promoter activation while VP1 induces IFN α 1. *Virus Res*, 196, 113-121. 10.1016/j.virusres.2014.11.018
- Lee, N., Goodlett, D. R., Ishitani, A., Marquardt, H. & Geraghty, D. E. (1998). HLA-E surface expression depends on binding of TAP-dependent peptides derived from certain HLA class I signal sequences. *J Immunol*, 160(10), 4951-4960.
- Lee, N., Llano, M., Carretero, M., Ishitani, A., Navarro, F., López-Botet, M. & Geraghty, D. E. (1998). HLA-E is a major ligand for the natural killer inhibitory receptor CD94/NKG2A. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95(9), 5199-5204. 10.1073/pnas.95.9.5199
- Legemiddelverk, S. (2017). Legemiddelverket anbefaler ikke alminnelig bruk av ny laksevaksine. Hentet fra <https://legemiddelverket.no/nyheter/legemiddelverket-anbefaler-ikke-alminnelig-bruk-av-ny-laksevaksine>
- Lindblad, E. B. (2000). Freund's adjuvants. I *Vaccine Adjuvants* (s. 49-63): Springer.
- Litman, G. W., Hawke, N. A. & Yoder, J. A. (2001). Novel immune-type receptor genes. *Immunol Rev*, 181, 250-259. 10.1034/j.1600-065x.2001.1810121.x
- Liu, M. A. (2011). DNA vaccines: an historical perspective and view to the future. *Immunol Rev*, 239(1), 62-84. 10.1111/j.1600-065X.2010.00980.x
- Ly, D. & Moody, D. B. (2014). The CD1 size problem: lipid antigens, ligands, and scaffolds. *Cell Mol Life Sci*, 71(16), 3069-3079. 10.1007/s00018-014-1603-6
- Ma, J., Bruce, T. J., Jones, E. M. & Cain, K. D. (2019). A Review of Fish Vaccine Development Strategies: Conventional Methods and Modern Biotechnological Approaches. *Microorganisms*, 7(11). 10.3390/microorganisms7110569
- Matsuo, A., Oshiumi, H., Tsujita, T., Mitani, H., Kasai, H., Yoshimizu, M., . . .Seya, T. (2008). Teleost TLR22 recognizes RNA duplex to induce IFN and protect cells from birnaviruses. *J Immunol*, 181(5), 3474-3485. 10.4049/jimmunol.181.5.3474
- McBeath, A. J., Snow, M., Secombes, C. J., Ellis, A. E. & Collet, B. (2007). Expression kinetics of interferon and interferon-induced genes in Atlantic salmon (*Salmo salar*) following infection with infectious pancreatic necrosis virus and infectious salmon anaemia virus. *Fish Shellfish Immunol*, 22(3), 230-241. 10.1016/j.fsi.2006.05.004
- Miller, M. M., Wang, C., Parisini, E., Coletta, R. D., Goto, R. M., Lee, S. Y., . . .Dascher, C. C. (2005). Characterization of two avian MHC-like genes reveals an ancient origin of the

- CD1 family. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(24), 8674-8679. doi:10.1073/pnas.0500105102
- Misund, B. (2022). fiskeoppdrett. Hentet fra <https://snl.no/fiskeoppdrett>
- Mondal, H. & Thomas, J. (2022). A review on the recent advances and application of vaccines against fish pathogens in aquaculture. *Aquaculture International*. 10.1007/s10499-022-00884-w
- Moody, D. B., Zajonc, D. M. & Wilson, I. A. (2005). Anatomy of CD1–lipid antigen complexes. *Nature Reviews Immunology*, 5(5), 387-399. 10.1038/nri1605
- Nakanishi, T., Shibasaki, Y. & Matsuura, Y. (2015). T Cells in Fish. *Biology*, 4(4), 640-663. 10.3390/biology4040640
- Nakanishi, T., Toda, H., Shibasaki, Y. & Somamoto, T. (2011). Cytotoxic T cells in teleost fish. *Dev Comp Immunol*, 35(12), 1317-1323. 10.1016/j.dci.2011.03.033
- Nepal, A., Wolfson, D. L., Ahluwalia, B. S., Jensen, I., Jørgensen, J. & Iliev, D. B. (2020). Intracellular distribution and transcriptional regulation of Atlantic salmon (*Salmo salar*) Rab5c, 7a and 27a homologs by immune stimuli. *Fish Shellfish Immunol*, 99, 119-129. 10.1016/j.fsi.2020.01.058
- Ohta, Y., Okamura, K., McKinney, E. C., Bartl, S., Hashimoto, K. & Flajnik, M. F. (2000). Primitive synteny of vertebrate major histocompatibility complex class I and class II genes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97(9), 4712-4717. 10.1073/pnas.97.9.4712
- Patel, B., Banerjee, R., Samanta, M. & Das, S. (2018). Diversity of Immunoglobulin (Ig) Isotypes and the Role of Activation-Induced Cytidine Deaminase (AID) in Fish. *Mol Biotechnol*, 60(6), 435-453. 10.1007/s12033-018-0081-8
- Piontkivska, H. & Nei, M. (2003). Birth-and-Death Evolution in Primate MHC Class I Genes: Divergence Time Estimates. *Molecular Biology and Evolution*, 20(4), 601-609. 10.1093/molbev/msg064
- Press, C. M. & Evensen, Ø. (1999). The morphology of the immune system in teleost fishes. *Fish & Shellfish Immunology*, 9(4), 309-318. <https://doi.org/10.1006/fsim.1998.0181>
- Raz, E., Tighe, H., Sato, Y., Corr, M., Dudler, J. A., Roman, M., . . . Carson, D. A. (1996). Preferential induction of a Th1 immune response and inhibition of specific IgE antibody formation by plasmid DNA immunization. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93(10), 5141-5145. 10.1073/pnas.93.10.5141
- Rieger, A. M. & Barreda, D. R. (2011). Antimicrobial mechanisms of fish leukocytes. *Dev Comp Immunol*, 35(12), 1238-1245. 10.1016/j.dci.2011.03.009
- Roach, J. C., Glusman, G., Rowen, L., Kaur, A., Purcell, M. K., Smith, K. D., . . . Aderem, A. (2005). The evolution of vertebrate Toll-like receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102(27), 9577-9582. 10.1073/pnas.0502272102
- Robertson, B. (2018). The role of type I interferons in innate and adaptive immunity against viruses in Atlantic salmon. *Dev Comp Immunol*, 80, 41-52. 10.1016/j.dci.2017.02.005
- Robertson, B., Greiner-Tollersrud, L. & Jørgensen, L. G. (2019). Analysis of the Atlantic salmon genome reveals a cluster of Mx genes that respond more strongly to IFN gamma than to type I IFN. *Developmental & Comparative Immunology*, 90, 80-89. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2018.09.004>
- Rodger, H. D. (2016). Fish Disease Causing Economic Impact in Global Aquaculture. I A. Adams (Red.), *Fish Vaccines* (s. 1-34). Basel: Springer Basel. Hentet fra https://doi.org/10.1007/978-3-0348-0980-1_1
- Salomonsen, J., Sørensen, M. R., Marston, D. A., Rogers, S. L., Collen, T., Hateren, A. v., . . . Kaufman, J. (2005). Two CD1 genes map to the chicken MHC, indicating that CD1

- genes are ancient and likely to have been present in the primordial MHC. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(24), 8668-8673. doi:10.1073/pnas.0409213102
- Schmidt, T. G. M., Batz, L., Bonet, L., Carl, U., Holzapfel, G., Kiem, K., . . . Stanar, K. (2013). Development of the Twin-Strep-tag® and its application for purification of recombinant proteins from cell culture supernatants. *Protein Expression and Purification*, 92(1), 54-61. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2013.08.021>
- Shao, T., Zhu, L. Y., Nie, L., Shi, W., Dong, W. R., Xiang, L. X. & Shao, J. Z. (2015). Characterization of surface phenotypic molecules of teleost dendritic cells. *Dev Comp Immunol*, 49(1), 38-43. 10.1016/j.dci.2014.11.010
- Shum, B. P., Rajalingam, R., Magor, K. E., Azumi, K., Carr, W. H., Dixon, B., . . . Parham, P. (1999). A divergent non-classical class I gene conserved in salmonids. *Immunogenetics*, 49(6), 479-490. 10.1007/s002510050524
- Sjømatrådet. (2021). *Skømateksporten passerte 120 milliarder kroner i fjor*. <https://norges-sjoematraad-as.mynewsdesk.com/>: Norges Sjømatråd Hentet fra <https://norges-sjoematraad-as.mynewsdesk.com/pressreleases/sjoemateksporten-passerte-120-milliarder-kroner-i-fjor-3153657>
- Sommerset I, W. C. S., Bang Jensen B, Wiik-Nielsen J, Bornø G, Oliveira VHS, & Haukaas A, B. E. (2021). Fiskehelserapporten 2021. *Veterinærinstituttet 2022, Veterinærinstituttets rapportserie nr. 2a/2022*.
- Stafford, J. L., Bengtén, E., Du Pasquier, L., Miller, N. W. & Wilson, M. (2007). Channel catfish leukocyte immune-type receptors contain a putative MHC class I binding site. *Immunogenetics*, 59(1), 77-91. 10.1007/s00251-006-0169-3
- Stet, R. J., Kruiswijk, C. P. & Dixon, B. (2003). Major histocompatibility lineages and immune gene function in teleost fishes: the road not taken. *Crit Rev Immunol*, 23(5-6), 441-471. 10.1615/critrevimmunol.v23.i56.50
- Strandskog, G., Villoing, S., Iliev, D. B., Thim, H. L., Christie, K. E. & Jørgensen, J. B. (2011). Formulations combining CpG containing oligonucleotides and poly I:C enhance the magnitude of immune responses and protection against pancreas disease in Atlantic salmon. *Dev Comp Immunol*, 35(11), 1116-1127. 10.1016/j.dci.2011.03.016
- Svenning, S., Gondek-Wyrozemska, A. T., van der Wal, Y. A., Robertsen, B., Jensen, I., Jørgensen, J. B. & Edholm, E.-S. (2019). Microbial danger signals control transcriptional induction of distinct MHC class II lineage genes in Atlantic Salmon. *Frontiers in immunology*, 10, 2425.
- Svingerud, T., Solstad, T., Sun, B., Nyrud, M. L. J., Kileng, Ø., Greiner-Tollersrud, L. & Robertsen, B. (2012). Atlantic Salmon Type I IFN Subtypes Show Differences in Antiviral Activity and Cell-Dependent Expression: Evidence for High IFN β /IFN γ -Producing Cells in Fish Lymphoid Tissues. *The Journal of Immunology*, 189(12), 5912-5923. 10.4049/jimmunol.1201188
- Tang, H., Jiang, X., Zhang, J., Pei, C., Zhao, X., Li, L. & Kong, X. (2021). Teleost CD4(+) helper T cells: Molecular characteristics and functions and comparison with mammalian counterparts. *Vet Immunol Immunopathol*, 240, 110316. 10.1016/j.vetimm.2021.110316
- Taniguchi, M., Harada, M., Kojo, S., Nakayama, T. & Wakao, H. (2003). The regulatory role of Valpha14 NKT cells in innate and acquired immune response. *Annu Rev Immunol*, 21, 483-513. 10.1146/annurev.immunol.21.120601.141057

- Treiner, E., Duban, L., Bahram, S., Radosavljevic, M., Wanner, V., Tilloy, F., . . .Lantz, O. (2003). Selection of evolutionarily conserved mucosal-associated invariant T cells by MR1. *Nature*, 422(6928), 164-169. 10.1038/nature01433
- Wan, F., Hu, C.-b., Ma, J.-x., Gao, K., Xiang, L.-x. & Shao, J.-z. (2017). Characterization of $\gamma\delta$ T Cells from Zebrafish Provides Insights into Their Important Role in Adaptive Humoral Immunity. *Frontiers in Immunology*, 7. 10.3389/fimmu.2016.00675
- Wang, S. & Hazelrigg, T. (1994). Implications for bcd mRNA localization from spatial distribution of exu protein in *Drosophila* oogenesis. *Nature*, 369(6479), 400-403.
- Xu, C., Evensen, Ø. & Munang'andu, H. M. (2019). Transcriptome Analysis Shows That IFN-I Treatment and Concurrent SAV3 Infection Enriches MHC-I Antigen Processing and Presentation Pathways in Atlantic Salmon-Derived Macrophage/Dendritic Cells. *Viruses*, 11(5). 10.3390/v11050464
- Xu, C., Guo, T.-C., Mutoloki, S., Haugland, Ø. & Evensen, Ø. (2012). Gene expression studies of host response to Salmonid alphavirus subtype 3 experimental infections in Atlantic salmon. *Veterinary Research*, 43(1), 78. 10.1186/1297-9716-43-78
- Yoder, J. A., Mueller, M. G., Wei, S., Corliss, B. C., Prather, D. M., Willis, T., . . .Litman, G. W. (2001). Immune-type receptor genes in zebrafish share genetic and functional properties with genes encoded by the mammalian leukocyte receptor cluster. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98(12), 6771-6776. 10.1073/pnas.121101598
- Zinkernagel, R. M. & Doherty, P. C. (1974). Restriction of in vitro T cell-mediated cytotoxicity in lymphocytic choriomeningitis within a syngeneic or semiallogeneic system. *Nature*, 248(5450), 701-702. 10.1038/248701a0

9 Appendix

9.1 Primerliste

Alle primere produsert av Sigma-Aldrich®.

Primer	Sekvens
EF1a	F: 5´-CCCCTCCAGGACGTTTACA-AA -3´
	R: 5´-CACACGGCCCACAGGTACA -3´
Q_nsP1	F: 5´-AGTTCCAGACTGCGTTTCC -3´
	R: 5´-GGTAGCCAAGTGGGAGAAAAG -3´
MX ½	F: 5´-GATGCTGCACCTCAAGTCCTATTA -3´
	R: 5´-CGGATCACCATGGGAATCTGA -3´
O.tsh LIA	F: 5´-TCAGACCTGAGGTATCGCTTTA-3´
	R: 5´-AGCATCTGTGGACAGTAATAAG -3´
O.tsh LNA	F: 5´-CAGCTCTGATCATGGAAAA -3´
	R: 5´-TAAGATATTCTCTCCTCACCCCA -3´
O.tsh LGA1	F: 5´- CACAAAAACCAAGGACGATGAA -3´
	R: 5´-TGGTGCTTCAGTTCAACTGATCTG -3´
O.tsh LDA	F: 5´GGCAAGCAACTGAAAGAACAC- 3´
	R: 5´-CTCTCCGCATCACAAAGTTCT - 3´
O.tsh LCA	F: 5´- ATTATGTACAACCACATGAAG - 3´
	R: 5´-GAAGATAAGAACGGAGATTTTG- 3´

9.2 Maskiner

Maskiner	Produsent
Countess™ II FL Automated Cell Counter	Invitrogen™ (katalognummer: 15311986)
NanoDrop 1000 Spectrophotometer	Thermo Scientific™
Odyssey® CLx Infrared Imaging System	LI-COR® Biosciences
PowerPac™ Basic Power Supply	Bio-Rad
Amaxa™ Nucleofector™ II	Lonza
Gel documentation systems, VWR® Smart3 and Smart3 EZ	VWR™ Collection
Biorad PowerPac 200 Electrophoresis Power Supply	Bio-rad
7500 Fast Real-Time PCR	Applied Biosystem

9.3 Kit

Kit	Produsent	Katalognummer
Mem-PER™ Plus Membrane Protein Extraction Kit	Thermo Scientific™	89842
RNeasy® Mini Kit	Qiagen®	74104
TaqMan™ Reverse Transcription Reagents	Invitrogen™	N8080234
Pierce™ Protein A IgG Purification Kit	Thermo Scientific™	44667
GenElute™ Endotoxin-free Plasmid Midiprep Kit	Sigma-Aldrich®	PLED35
Cell Line Nucleofector™ Kit T	Lonza	VVCA-1002

9.4 Reagenser

Reagens	Produsent	Katalognummer
Leibovitz's L-15 Medium	Gibco™	11415064
Penicillin-Streptomycin (10,000 U/mL)	Gibco™	15140122
S1810 Fetal Bovine Serum (FBS) South America	Biowest	S1810-100
Trypsin-EDTA solution	Sigma-Aldrich®	T4049-100ML
Dulbecco`s Phosphate Buffered Saline w/o Magnesium, w/o Calcium Sterile Filtered (PBS)	Biowest	L0615-500
Countess™ Cell Counting Chamber Slides	Invitrogen™	C10228
Trypan Blue Stain (0.4 %) for use with the Countess™ Automated Cell Counter	Invitrogen™	T10282
Stellar™ Competent Cells	Takara	636763
TopVision Agarose	Thermo Scientific™	R0491
GeneRuler 50 bp DNA Ladder	Thermo Scientific™	SM 1551 SM0371
FastDigest HindIII	Thermo Scientific™	FD0504
Fast Digest Buffer (10X)	Thermo Scientific™	B64
FastDigest BamHI	Thermo Scientific™	FD0054
Ethidium bromide solution E8751	Sigma-Aldrich®	E8751-25G
TAE Buffer (Tris-acetate-EDTA) (50X)	Thermo Scientific™	B49
Bolt™ 4-12 % Bis-Tris Plus 1.0mmX10 well	Invitrogen™	NW04120BOX
SeeBlue™ Plus2 Pre-stained Protein Standard	Invitrogen™	LC5925
MagicMark™ XP Western Protein Standard	Invitrogen™	LC5603
Chameleon® Duo Pre-stained Protein Ladder	Li-Cor®	
Novex™ Tris-Glycine SDS Running Buffer (10X)	Invitrogen™	LC2675
Nitrocellulose Membrane, 0.45 µm, 30 cm x 3.5 m	Thermo Scientific™	88018

Ponceau S Solution	Sigma-Aldrich®	P7170
NuPAGE™ Transfer Buffer (20X)	Invitrogen™	NP0006
SuperBlock™ (TBS) Blocking Buffer	Thermo Scientific™	37535
Pierce™ 20X TBS Buffer	Thermo Scientific™	28358
SuperSignal™ West Pico PLUS Chemiluminescent Substrate	Thermo Scientific™	34580
Tween 50		
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline w/o Magnesium, w/o Calcium Sterile Filtered (PBS)	Biowest	L0615-500
Bovine Serum Albumin heat shock fraction, pH 7, ≥98%	Sigma-Aldrich®	A9647-100G
Coomassie Brilliant Blue G-250 Dye	Thermo Scientific™	20279
Halt™ Protease Inhibitor Cocktail (100X)	Thermo Scientific™	78430
Fast SYBR™ Green Master Mix	Applied Biosystems™	4385612
Reaction Buffer with MgCl ₂ for DNase I (10X)	Thermo Scientific™	B43
DNase I, RNase-free (1 U/μL)	Thermo Scientific™	EN0521
EDTA (0.5 M), pH 8.0	Thermo Scientific™	R1021
Water, RNase-Free, DEPC Treated, Molecular Biology Grade, Ultrapure	Thermo Scientific™	J70783.AC
MicroAmp Fast 96-well Reaction Plate (0.1 mL)	Life Technologies	4346907
Tween 20®	Sigma-Aldrich®	P2287
Stellar™ Competent Cells	Takara	636766

9.5 Volumer i cDNA-syntese

Volumer av reagenser i TaqMan™ Reverse Transcription Reagents-kitet brukt til cDNA-syntese.

Reaktant	Volum i hver prøve
10xRT Buffer	2 µl
MgCl	1,4 µl
19mM dNTP	4 µl
Random Hexameres	1 µl
RNase inhibitor	1 µl
Megascript	1 µl
Dnase treated RNA	9,6 µl
Total mastermix i hver prøve	20 µl

9.6 Antistoffer

9.6.1 Primære antistoffer

Navn	Vert	Reaktivitet	Produsent	Katalognummer
THE™ NWSHPQFEK Tag Antibody, mAb, Mouse (IgG1, κ)	Mus monoklonal	<i>Twin Strep-Tactin II tag (strep-tag)</i>	GenScript®	A01732S
Anti-GFP antibody [LGB-1] (IgG1)	Mus monoklonal	<i>Green Fluorescent Protein (GFP-tag)</i>	Abcam®	ab291

9.6.2 Sekundære antistoffer

Navn	Vert	Reaktivitet	Produsent	Farge
IRDye® 680RD Goat anti-Mouse IgG (H + L)	Geit monoklonal	Mus	IRDye®	Rød (vises som grå i fig 13)
IRDye® 680RD Goat anti-Rabbit IgG Secondary Antibody (H+L)	Geit monoklonal	Kanin	IRDye®	Grønn

9.7 Gjennomførte transfeksjoner

9.7.1 Transfeksjoner med pcDNA3.1+C-LGA-eGFP

	Celler per transfeksjon oppgitt i millioner	Antall transfeksjoner	Formål
18.11.21	1,75	5	Transient til western med anti-GFP
10.01.22	4	5	Transient til western med RSAM0, RSAM1 og RSAM2
11.03.22	2,3	4	Transient western med anti-GFP

9.7.2 Transfeksjoner med pcDNA3.1+C-LGA-Streptactin-Blasticidin

	Celler per transfeksjon oppgitt i millioner	Antall transfeksjoner	Formål
15.02.22	4	3 transfeksjoner med plasmid	Forsøk på å etablere stabile cellelinjer med 2 ulike blastidinkonsentrasjoner, samt utsette mocktransfekterte celler for samme konsentrasjon.
	4	3 mock-transfeksjoner, uten plasmid	
28.02.22	4	5	Transient transfeksjon med nytt plasmid, brukt til å sjekke anti-strep.
07.03	1,5	4	Forsøk på å etablere stabile cellelinjer med 4 ulike blastidinkonsentrasjoner.

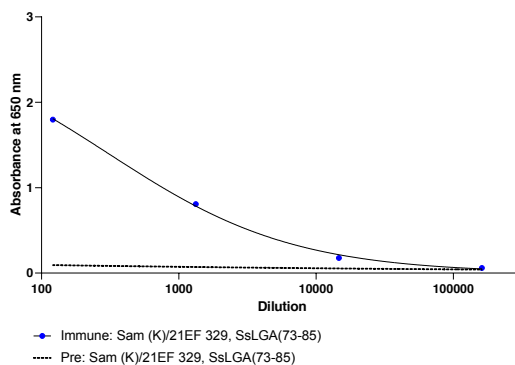
9.8 Immuniseringstimeplan RSAM

Dato	Immunisering	Mengde	Blødning	Referert til som
28.06.2021			Pre	RSAM0
27.08.2021	I	200 µg +FCA		
23.09.2021	II	200 µg +FIA		
21.10.2021	III	100 µg +FIA		
01.11.2021			III+2v	RSAM1
03.11.2021			ELISA-assay	
18.11.2021	IV	200 µg +FIA		
29.11.2021			IV+2v+final blødning	RSAM2

9.9 ELISA av RSAM

Agrisera
Part of Olink® Group

Antigen: SsLGA (73-85)



General information:

Titer expressed by ELISA test measures roughly a level of antibodies in serum/IgY.
In your test system please use initial dilution of 1: 1000 and adjust it accordingly.

If there is no signal in your test system, please contact us immediately: support@agrisera.com

Titer should not be confused with sensitivity – affinity, which cannot be measured for polyclonal antibodies.

Antibodies present in low levels in serum/IgY can still possess a valuable reactivity in different techniques against a target protein/peptide.

ELISA test has been done using:

ELISA plate: ELISA plate High Binding 82.1581, Sarstedt.

Plate coating: free peptides 0.004 mg/ml, proteins 0.002 mg/ml.

Dilution range of serum: 1:121 – 1: 161 051

Dilution range of IgY: 1:11 – 1: 14 641 (First point 0.45 mg/ml)

Secondary antibodies: Goat anti-rabbit IgG (H&L), HRP conjugated (Agrisera product number: AS09 602) 1:20 000, Rabbit anti-chicken IgY (H&L),

HRP conjugated (Agrisera product number: AS10 1489) 1:20 000, Rabbit anti-goat IgG (H&L), (Agrisera product number AS09 605) 1:20 000,

Rabbit anti-mouse IgG (H&L), HRP conjugated (Agrisera product number AS09 627) 1:20 000, Goat anti-rat IgG (H&L), HRP conjugated (Agrisera

product number: AS10 1187) 1:20 000

Reaction development: TMB-HRP (Agrisera product number AS15 TMB-HRP)

Agrisera www.agrisera.com info@agrisera.com Ph: +46 935 33000 Fax: +46 935 33044 Box 57 911 21 Vännäs, Sweden, VAT number:

SE556263276901

