



UiT Noregs arktiske universitet

Noregs fiskerihøgskule – Fakultetet for biovitenskap, fiskeri og økonomi

## **Studiar av B-celler hos laks (*Salmo salar*) – blir dei aktiverte av TLR-ligandar?**

Hanna Fylling Ellingseter

Masteroppgåve i akvamedisin (60 stp)

Mai 2022



# Forord

*Denne oppgåva vart gjennomført i samarbeid med forskingsgruppa «Fish Immunology and Vaccinology» ved Noregs fiskerihøgskule ved fakultetet for biovitskap, fiskeri og økonomi ved UiT – Noregs arktiske universitet. Arbeidet med oppgåva starta i februar 2021 og vart avslutta i juni 2022.*

Dette masterløpet har vore både lærerikt og utfordrande. Eg har vore på turar ned i djupe dalar, men også opplevd kjensler som må kunne bli samanlikna med å stå på verdas høgaste fjell. Det er jo fordi ein ikkje gir seg, at ein når toppen.

Eg vil rette ein stor takk til alle i forskingsgruppa som har hjelpt meg å kome i mål. Sjølv om denne oppgåva på mange måtar er mitt eige produkt, er den samstundes eit resultat av godt samarbeid mellom mange kloke hovud. Eg vil gi ein spesielt stor takk til rettleiarane mine, Jorunn B. Jørgensen og Ingvill Jensen. De har eit engasjement som er inspirerende og smittande. Takk for at de begge har kontordører som alltid står på gløtt.

Takk til Henriette for opplæring på laboratoriet og for at du svarar på mail til alle tider av døgnet. And for Shiferaw: Not all heroes wear capes. Some of them wear lab coats! Thank you for all the help and your everlasting patience during ELISpot assay procedures and sorting of cells.

Tusen takk til alle medstudentar, Fokale nekroser og styrer eg har vore så heldig å få vere ein del av ved BFE. Det har verkeleg vore fem fantastiske år her i Tromsø! Uendeleg mange takk til familien min for all vilkårslaus støtte og kjærleik. Det finst ikkje fine nok ord i denne verda som kan beskrive kva de betyr for meg.

Sist, men ikkje minst, vil eg takke Marie for godt samarbeid på laben og for venskapet vårt. Du er god å ha i livet.

Uansett kvar vinden fører meg, skal eg hugse at: «Da bi da da bi».

Tromsø, mai 2022

Hanna Fylling Ellingseter

## Samandrag

Pankreassjukdom, infeksjøs lakseanemi, hjarte- og skjelettmuskelbetennelse og kardiomyopatisyndrom er dei mest utbreidde virussjukdommane i oppdrettsnæringa i Noreg i dag. Sjukdommane har skulda for sterkt nedsett velferd for laksefisk, og store økonomiske tap for oppdretterar langs heile kysten. Vaksine som blir nytta mot virus i dag har ikkje tilfredsstillande effekt, då vaksinert fisk framleis blir smitta av virus. For å få større kontroll over virussjukdommane, må det bli utvikla meir effektive vaksinar. Vaksinologi er dermed eit fagfelt som er og blir viktig for den framtidige akvakulturnæringa.

Immunmodulatorar er stoff som verkar inn på immunsystemet sitt funksjon og kan bli lagt til i vaksinar som adjuvansar for å auke immunresponsen ved infeksjon. Ein viktig del av immunforsvaret er nøytraliserande antistoff som blir skilde ut i blodet av antistoff-sekrerande B-celler. Det er vist at nokre typar immunmodulatorar som mellom anna CpG, LPS, imiquimod og poly I:C kan verke inn på antalet B-celler som har evne til å skilje ut antistoff. Dette gjer dei ved å binde TLR-reseptorar som finst på laksen sine immunceller, inkludert B-cellene. Formålet med dette studiet var å undersøke om frekvens av IgM<sup>+</sup> antistoffsekrerande celler (ASC) i leukocyttopulasjonar frå hovudnyre, milt, blod og bukhole frå laks endra seg etter stimulering med TLR-ligandane CpG, LPS, imiquimod og poly I:C, målt med ELISpot. RT-qPCR vart nytta for å undersøke uttrykket av ulike immungen og immunoglobulinar etter stimulering med same TLR-ligandar. I tillegg vart naive leukocytter frå laks stimulerte med ulike type I-IFN for å studere korleis IFN verkar inn på antal IgM<sup>+</sup> ASC i cellekultur. For å etablere ein metode for å studere IgM<sup>+</sup> B-celler i ELISpot, vart IgM<sup>+</sup> B-celler sorterte ut frå leukocytter frå milt hos laks og sådd ut i ulike konsentrasjonar. Dei sorterte cellene vart også stimulerte med LPS, for å undersøke om LPS har direkte verknad på B-celler hos laks.

Stimulering med CpG, LPS og imiquimod auka frekvensen av IgM<sup>+</sup> ASC i leukocyttopulasjonane, medan behandling med IFN og poly I:C ikkje gav nokon signifikant effekt. Dei sorterte B-cellene viste ikkje respons på behandlinga med LPS. I RT-qPCR-analysen vart det stadfesta at stimuleringa med TLR-ligandane gav immunreaksjonar i cellene. Funna i denne oppgåva har bidratt til å belyse korleis leukocyttopulasjonar frå naiv laks responderer til stimulering med TLR-ligandar og type I-IFN. Den gir også eit forslag på kva for mengd av sorterte IgM<sup>+</sup> B-celler som er utgjorde av ASC.

# Innholdsliste

Innleiing .....	1
1 Bakgrunn .....	1
2 Virussjukdom og vaksinerings av oppdrettslaks i Noreg .....	2
2.1 Virussjukdom hos norsk oppdrettslaks .....	2
2.2 Vaksinerings av norsk oppdrettslaks .....	4
2.3 Administrering av vaksinar .....	5
2.4 Adjuvansar .....	5
3 Immunsystemet hos beinfisk .....	7
3.1 Immunologiske organ .....	7
3.1.1 Bukhola – ein arena for immunresponsar? .....	10
3.2 Medfødd immunitet .....	11
3.2.1 Patogen blir oppdaga av PRR-reseptorar .....	11
3.2.2 Immunmodulatorar nytta i denne oppgåva .....	14
3.2.3 Interferonar .....	17
3.3 Adaptiv immunitet .....	20
3.3.1 Cellemediert og humoral adaptiv immunitet .....	21
3.4 B-celler hos beinfisk .....	23
3.4.1 Immunoglobulinar hos beinfisk .....	23
3.4.2 B-celler hos fisk har eigenskapar som liknar B-1-celler hos pattedyr .....	26
3.4.3 Utvikling og distribusjon av B-celler .....	26
3.4.4 B-celler og medfødd immunitet .....	28
Problemstilling .....	29
4 Material og metode .....	30
4.1 Forsøksfisk og organuttak .....	30
4.1.1 Oversikt over organuttak .....	30
4.1.2 Forsøksfisk .....	31

4.1.3	Organuttak .....	31
4.2	Isolering og teljing av leukocytter frå atlantisk laks .....	32
4.2.1	Isolering av leukocytter frå milt, hovudnyre, blod og bukhole .....	33
4.2.2	Teljing av isolerte celler .....	34
4.3	Måling av IgM-sekrerande B-celler .....	34
4.3.1	Kvantitering av ASCs ved ELISpot-analyse .....	34
4.3.2	Gjennomføring av ELISpot .....	36
4.4	Antal IgM <sup>+</sup> ASC frå laks etter stimulering med ulike TLR-ligandar og interferon .	37
4.4.1	Stimulering av leukocytter med TLR-ligandar og interferonar .....	37
4.5	RT-qPCR .....	38
4.5.1	Ekstraksjon og isolering av totalt RNA .....	38
4.5.2	cDNA-syntese .....	39
4.5.3	Kvantitativ RT-qPCR .....	40
4.6	Sorterte B-celler .....	44
4.6.1	Fluorescent activated cell sorting (FACS) .....	44
4.6.2	Gjennomføring av FACS .....	44
4.7	Databehandling .....	46
5	Resultat .....	47
5.1	Verknad av immunmodulatorar på B-celler frå laks .....	47
5.1.1	Basalt nivå av IgM <sup>+</sup> ASC .....	47
5.1.2	Innleiande ELISpot-assay for måling av sekret IgM i leukocytter stimulerte med TLR-ligandar .....	49
5.1.3	Optimal konsentrasjon for CpG, poly I:C og imiquimod .....	54
5.1.4	CpG, LPS og imiquimod stimulerer differensiering til IgM <sup>+</sup> ASC .....	56
5.2	Stimulering av leukocytter frå laks med type 1 IFN .....	59
5.3	Transkripsjon av immunoglobulinane IgM, IgD og IgT hos leukocytter stimulert med TLR-ligandar og type I IFN .....	61
5.4	Sorterte IgM <sup>+</sup> B-celler i ELISpot-analyse .....	65

6	Diskusjon.....	67
6.1	Verknad av immunmodulatorar på B-celler frå laks .....	67
6.1.1	Frekvens av ASC i hovudnyre og milt hos ikkje-stimulerte leukocyttar .....	67
6.1.2	CpG, LPS og imiquimod stimulerer B-celler til å differensiere til ASC .....	68
6.2	Undersøking av genuttrykk av IgM, IgD og IgT i leukocyttopulasjon frå laks etter stimulering med TLR-ligandar og IFN .....	73
6.3	IgM <sup>+</sup> ASC i leukocyttar frå milt stimulerte med type I-IFN .....	74
6.4	Sorterte B-celler i ELISpot-analyse .....	75
6.5	Eksperimentelle føresetnader og metode .....	77
6.5.1	Føresetnader for forsøk .....	77
6.5.2	ELISpot for total IgM ASC populasjonar .....	77
6.5.3	Optimale konsentrasjonar av TLR-ligandar .....	78
6.5.4	RT-qPCR av stimulerte leukocyttar .....	79
6.6	Vidare forskning.....	79
7	Konklusjon .....	81
8	Referanseliste .....	82
	Vedlegg .....	92

# Innleiing

## 1 Bakgrunn

Havbruksnæringa er den nest største eksportnæringa i Noreg og ein viktig del av landet sin kultur og økonomi. På 1970-talet gjekk startskotet for dei blå åkrane, då det vart sett i gang med kommersielt oppdrett av laks og aure i primitive merdar i sjø. Produksjonsforma har vakse og utvikla seg enormt dei siste tiåra, og Noreg er i dag godt etablert som ein verdsléiande produsent av atlantisk laks (*Salmo salar*). Det blir også drive med kommersielt oppdrett av regnbogaure (*Oncorhynchus mykiss*) og nokre marine artar. Fisk oppdretta i norske fjordar blir eksportert til store deler av verda. Dei største marknadene finst i land i Asia, Europa og Nord-Amerika. I 2021 vart det eksportert laks for over 80 milliardar norske kroner (Noregs sjømatråd, 2022).

Når inntektene frå oppdrettsindustrien er så store, er det fort gjort at negative konsekvensar ikkje blir tekne nok på alvor. Dei siste åra har søkelyset i større grad blitt retta mot fiskevelferd og fiskehelse, både i næringa og blant forbrukarane. I 2021 døydde 15,5% av all laks som vart sett ut i merdar på sjø (Sommerset et al., 2022), eit tal som har lege relativt stabilt dei siste åra. Fisk går også tapt ved utkast på slakteri, og ein liten del av fisken blir tapt i rømmingshendingar.

Fiskehelsesrapporten frå Veterinærinstituttet slår fast at den største delen av dødelegheita er eit resultat av handtering; i hovudsak i samband med avlusingsoperasjonar (Sommerset et al., 2022). Ein annan viktig faktor for at så mykje fisk døyr, er virussjukdommar. Dei tre virussjukdommane som dominerer i talet på diagnosar i norsk oppdrett er kardiomyopatisyndrom (CMS), hjarte- og skjelettmuskelbetennelse (HSMB) og pankreassjukdom (PD). Dei to siste åra har talet på tilfelle av infeksiøs lakseanemi (ILA) auka merkbar samanlikna med dei 15 siste åra, då det i 2021 var 25 lokalitetar som fekk påvist smitte (Sommerset et al., 2022). Dette har hausta stor merksemd både i næringa og i media.

For at oppdrettsnæringa skal kunne vekse vidare, må det kome forbetringar når det kjem til fiskevelferd og sjukdomsførebygging. Meir effektive vaksinar mot virussjukdommar kjem til å vere ein nøkkelbrikke i denne samanhengen. Forsking på vaksinekomponentar og adjuvansar vil vere heilt sentralt for å få bukt med virusproblematikken som rår i norsk oppdrettsnæring i dag. Dette vil vere nødvendig å få til dersom oppdrettsnæringa skal kunne vere ei berekraftig næring ein kan hauste store mengder mat frå, også i framtida.



## 2 Virussjukdom og vaksining av oppdrettslaks i Noreg

### 2.1 Virussjukdom hos norsk oppdrettslaks

Den årlege fiskehelse rapporten frå Veterinærinstituttet presenterer ei oversikt over helsestatusen til oppdrettsfisk og korleis sjukdomsbiletet i Noreg ser ut frå år til år.

Datamaterialet kjem frå rapportering av listeførte sjukdommar. Veterinærinstituttet har dei to siste åra hatt avtalar med fleire oppdrettsselskap og private laboratorium om deling av data for dei ikkje-listeførte virussjukdommane CMS, HSMB, IPN (infeksiøs pankreas nekrose) og laksepox. Dette for å kunne presentere sjukdomsbiletet i Noreg meir heilskapleg. Tabell 1 viser antal påvisingar av sjukdommane ILA, PD, CMS, HSMB og IPN dei ti siste åra.

**Tabell 1: Antal oppdrettslokalitetar med påvist virussjukdom i perioden 2010-2021.** Datamaterialet er utarbeidd av Veterinærinstituttet og omfattar lokalitetar med laks. For ILA og PD blir det vist nye lokalitetar med diagnose, for dei andre blir det vist påviste sjukdomstilfelle i det aktuelle kalenderåret. \* For perioden 2010-2019 er datamaterialet basert på prøver sendt til Veterinærinstituttet, medan det for 2020 og 2021 er tilgjengelege datamateriale frå private laboratorium inkludert i opteljinga (Sommerset et al., 2022).

	2011	2012	2013	2014	2015	2016	2017	2018	2019	2020	2021
ILA	1	2	10	10	15	12	14	13	10	23	25
PD	89	137	99	142	137	138	176	163	152	158	100
CMS	74	89	100	107	105	90	100	101	82	154*	155*
HSMB	162	142	134	181	135	101	93	104	79	161*	188*
IPN	154	119	56	48	30	27	23	19	23	22*	20*

Både HSMB, CMS og PD er virussjukdommar som verkar på ulike delar av hjartet hos atlantisk laks. Virussjukdommen med høgast førekomst i 2021 var HSMB med 188 tilfelle. Årsaka til HSMB hos oppdrettslaks er Piscint orthoreovirus subtype 1 (PRV-1), eit virus som finst hos opp til 90% av oppdrettsfisk i sjøfasen i Noreg (Veterinærinstituttet, 2021). HSMB gir betennelse og nekrosar i hjartet og i den raude skjelettmuskulaturen. Den kvite skjelettmuskulaturen er ofte upåverka, medan det i nokre tilfelle kan bli observert mild patologi.

PD er ein liste 3-sjukdom og førekomst eller mistanke om sjukdommen skal difor bli rapportert til Mattilsynet. Sjukdommen er forårsaka av Salmonid alfavirus (SAV). Blant dei seks subtypane som finst av viruset, er berre to påviste i Noreg. SAV3 finn ein på Vestlandet, medan SAV2 finst nord for Hustadvika i Møre og Romsdal. Det er oppretta ein PD-sone der sjukdommen er utbreidd, frå Jæren til Nord-Trøndelag, der det blir arbeidd førebyggjande for å redusere konsekvensane av sjukdommen (PD-forskriften, 2017). I område i Noreg der PD ikkje er påvist (overvakingssoner), blir det arbeidd for at sjukdommen ikkje skal etablere seg.

Typiske skadar av PD er nekrosar i hjartet som forstyrrar sirkulasjonssystemet. Eksokrin pankreas blir ofte broten ned og nekrosar i raud og kvit skjelettmuskulatur verkar inn på symjeåtferda til fisken. PD-fisk blir ofte avmagra grunna tap av appetitt og blir kalla «pinnar».

Av oppdretterane sjølve blir CMS rangert som den viktigaste årsaka til dødelegheit (Sommerset et al., 2022). Sjukdommen er forårsaka av Piscine myocarditis virus (PMCV) og blir på folkemunne kalla for «hjartesprikk», fordi nekrosar og degenerering i hjartemuskulaturen i nokre tilfelle fører til at forkammeret i hjartet sprekk og blod flyt ut i hjartehola og koagulerer (Veterinærinstituttet, 2022c). Det er mest stor fisk som blir ramma, noko som kan gi store økonomiske tap. Histopatologi av hjartet kan vere utfordrande i tilfelle der det er koinfeksjonar av PD, CMS og HSMB i same individ, fordi PD kan maskere HSMB og CMS, og HSMB kan maskere CMS. For å skilje mellom dei ulike typane virus kan ein nytte real time kvantitativ polymerase kjedereaksjon (RT-qPCR) som analysemetode.

ILA er ein liste 2-sjukdom, og påvising eller mistanke skal rapporterast til Mattilsynet. Sjukdommen blir forårsaka av infeksiøst lakseanemivirus (ILAV), som ein finn som to subtypar: ILAV HPR0 og ILA HPR deletert. ILAV HPR0 er den ikkje-virulente varianten av viruset og blir ikkje knytt til klinisk sjukdom. ILAV HPR deletert blir alltid isolert i samband med sjukdom og er den patogene forma av viruset, der den hypervariable regionen i segment 6 av virusgenomet har mista ei eller fleire aminosyrer (Brun et al., 2018). Viruset går til åtak på blodkar hos laksen og gir alvorleg anemi (Veterinærinstituttet, 2022a). I dei aller fleste tilfella vil Mattilsynet krevje at ILA-sjuk fisk blir slakta ut så fort det let seg gjere, for å hindre smittespreiing.

IPN er ein virussjukdom forårsaka av infeksiøs pankreas nekrose virus (IPNV) som først og fremst er knytt til produksjon av laksefisk. Dei fleste påvisingar av IPN skjer i ferskvatnsfasen, men dei største økonomiske tap kjem i sjøfasen der fisken er større. Sjukdommen infiserer eksokrin pankreas og gir hemorragisk enteritt (Veterinærinstituttet, 2022b). IPN har i mange år blitt godt handtert ved å bruke QTL-rogn (quantitative trait loci) kombinert med systematisk utrydding av husstammar (Sommerset et al., 2022). QTL-rogn er rogn som inneheld eit lokus i genomet som gir motstand mot IPN. I tillegg til dette blir størstedelen av norsk settefisk vaksinert med kombinasjonsvaksine som også inneheld ein IPNV-komponent, men effekten av vaksinen er usikker. I fiskehelsesrapport i 2022 kjem det fram at påvising av ein ny IPNV-variant gjer IPN til eit aukande problem med litt auka dødelegheit, redusert tilvekst og redusert velferd (Sommerset et al., 2022).

## 2.2 Vaksinerings av norsk oppdrettslaks

Vaksinar er eitt av dei viktigaste verktøya for å motverke spreiding og påvising av sjukdom hos oppdrettsfisk. Vaksinar som blir nytta på fisk i Noreg er i all hovudsak basert på inaktiverte patogen i ein emulsjon av mineralolje og stabilisatorar. Vaksineantigena blir frigitt frå emulsjonen over tid og bidreg på denne måten til ein kontinuerleg produksjon av antistoff (Bøgwald et al., 2020). Det er vanleg å nytte fleirkomponentsvaksinar som gir vern mot opp til sju ulike sjukdomsframkallande agens. Ved å vaksinere fisken gjer ein han meir robust for livet i sjøen. Immunsystemet får bu seg på sjukdom ved at immunceller produserer antistoff mot ulike patogen og at T-celler drep virusinfiserte celler. Dersom det blir eit møte med det same patogenet seinare i livsløpet, kan immunsystemet setje i gang raskare og sterkare immunreaksjon for å utrydde infeksjonen. Dette fordi systemet «hugsar» patogenet.

På 1980-talet hadde den norske oppdrettsnæringa eit store utfordringar knytt til bakteriesjukdommar. Det var høgare forbruk av antibakterielle middel enn nokon gang, utan at det tok knekken på sjukdommane. Då effektive, oljebaserte vaksinar mot dei bakterielle sjukdommane kom på marknaden, fekk ein bukt med mange sjukdomsproblem i næringa. I dag er vaksinerings det viktigaste førebyggjande tiltaket for å hindre bakterielle sjukdommar hos oppdrettsfisk. Det er svært få påvisingar av bakterielle sjukdommar hos norsk oppdrettsfisk kvart år (Sommerset et al., 2022).

Virusvaksinar har vist seg å gi eit noko avgrensa immunologisk vern dersom ein samanliknar dei med vaksinar som blir nytta mot bakterielle sjukdommar. Det manglar framleis effektive vaksinar mot dei fleste virussjukdommar hos laks. Det gjer at norsk oppdrettslaks ikkje har tilstrekkeleg forsvar mot desse sjukdommane. Fleirkomponentsvaksinane som blir nytta i dag, som til dømes ALPHA JECT micro 7 ILA frå Pharmaq, inneheld mellom anna inaktiverte former av ILAV og IPNV (Veterinærkatalogen, 2020a). Nyleg vart ein DNA-vaksine mot PD tatt i bruk i Noreg. Vaksinen inneheld DNA-plasmid som kodar for proteinar frå salmonid alfavirus, og blir injisert i ryggmuskulaturen på fisken (Veterinærkatalogen, 2020b). I 2021 vart det registrert ein nedgang i antal påvisingar av PD, noko som moglegvis kan bli sett i samband med denne DNA-vaksinen som er utvikla og blir nytta mot sjukdomen (Sommerset et al., 2022).

Sjølv om fisken blir vaksinert, ser ein framleis utbrot i felt etter vaksinerings, noko som viser kor viktig det er å arbeidet med utvikling av meir effektive vaksinar. I tillegg er det mange virussjukdommar det ikkje finst vaksinar mot i det heile, som til dømes HSMB og CMS.

Næringa er heilt avhengig av at forskning vil føre fram ny-utvikling av vaksinar, for å få kontroll på situasjonen. Metodane i vaksineutviklinga må samstundes bli balanserte med kravet om at vaksinane skal vere kostnadseffektive, slik at dei faktisk blir nytta i næringa.

### **2.3 Administrering av vaksinar**

Administreringa av vaksinen har mykje å seie for kor effektiv den er. Hos fisk kan vaksinar bli administrerte ved badebehandling, oralt, peritonalt eller muskulært. Bad- eller dyppbehandling, kalla immersjonsvaksinering, er enkelt å bruke på liten fisk og gir god beskyttelse for visse smittestoff (Berg et al., 2006). Det er likevel vist at beskyttelsen blir dårlegare enn ved injeksjon, og at det er vanskeleg å kontrollere administreringa til kvar enkelt fisk. Ved oral administrering får fisken vaksinen gjennom fôret. Dette er den ideelle metoden for administrasjon av vaksine for fisk (Sommerset et al., 2005), men det er i likskap med immersjonsbehandling vanskeleg å stadfeste kor mykje vaksinefôr som blir administrert til kvart individ. Slice vet. er eit eksempel på ei slik fôrbehandling, som blir nytta i oppdrettsnæringa som antiparasittært middel mot lakselus. Ved ei peritonal administrering av vaksine, blir vaksinen sprøyta inn i bukhola og ved muskulær administrering blir han sett i muskulaturen dorsalt på fisken. Administrering av vaksinar blir gjort både automatisk med maskiner og for hand. Dette er arbeidskrevjande operasjonar som er stressande for fisken. Det blir observert fleire biverknader ved vaksinasjon av fisk, mellom anna melaninflekkar i fileten, tap av appetitt og samanvakse feittvev i bukhinna (Sommerset et al., 2022).

### **2.4 Adjuvansar**

Hovudmålet med vaksinering er å gi ein spesifikk og langvarig beskyttelse mot ein bestemt sjukdom. For å få til dette, må det ofte bli nytta tilleggsstoff for å auke immunresponsen mot vaksinen. Ein adjuvans omfattar alle produkt som bidreg til å auke eller endre den humorale eller cellulære immunresponsen mot eit antigen (Lima et al., 2004).

Dei fleste kommersielle vaksinar som er tilgjengelege i dag til bruk i akvakultur inneheld antigen i ein oljeemulsjon. Når ein vaksine blir injisert i fisken, er responsen i stor grad avhengig av korleis vaksinen blir frigitt i kroppen. Dersom vaksinen nyttar oljeadjuvansar, kan antigen bli frigitt sakte i til dømes bukhola, fordi olja lagar eit depot med antigen. Ut frå dette «lageret» med vaksine kan antigen bli frigitt langsamt. Dette er ein av måtane adjuvansar verkar på. I tillegg kan olja i seg sjølv gi stimulerande effektar på immunsystemet (Berg et al., 2006). Det er på den andre sida knytt store velferdsotter til bruken av oljeadjuvansar i multivalente vaksinar for fisk, då fleire biverknader kan førekomme, som

betennelsar, danning av granulomar og melanin-pigmentering (Mutoloki et al., 2014; Poppe et al., 2014). Oljeadjuvansar kan også gi bieffektar som redusert vekst og samanveksing av indre organ (Midtlyng et al., 1998). Dette gjer at det er av stor interesse å utvikle adjuvansar som anten vedlikeheld eller forbetrar effekten av vaksinen, samstundes som risikoen for biverknader blir redusert.

Mangelen på effektive virusvaksinar i dag viser kor viktig det er å identifisere effektive adjuvansar til bruk i vaksineutvikling. Dersom ein får meir kunnskap om adjuvansar i vaksinar til fisk, kan vaksinen etter kvart bli «skreddarsydd» mot spesifikke sjukdommar.

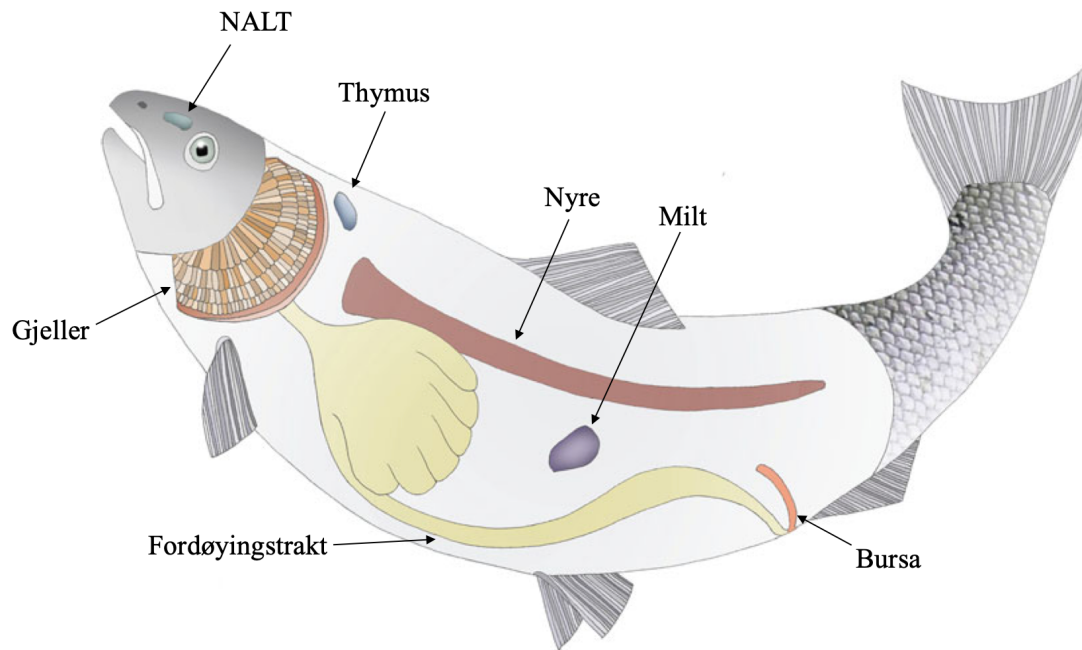
### 3 Immunsystemet hos beinfisk

Immunsystemet er bygd opp av ei samling av celler, vev og molekyl som arbeider saman for å nedkjempe infeksjonar (Abbas et al., 2019). Immunsystemet si hovudoppgåve er å verne verten mot invaderande patogene mikroorganismar som virus, bakteriar og parasittar (Magnadottir, 2010). Viktige cellepopulasjonar som deltek i forsvaret er mellom anna granulocytter, lymfocytter, makrofagar, monocytter og trombocytter (Ellis, 1977).

Fisken sitt immunforsvar liknar på mange måtar på pattedyr sitt, og er på same måte svært omfattande. Alle fleircella dyr har eit medfødd immunforsvar, medan beinfisk (*Teleostei*) er den første rekka av dyr som har både medfødt og adaptiv immunitet (Bassity et al., 2012). Beinfisk har MHC (major histocompatibility complex), immunoglobulinar, T- og B-celle reseptorar. Desse delane av det adaptive immunsystemet gjer det mogleg for fisk å ha immunreseptorar som kan kjenne att og skilje mellom svært mange ulike kjemiske strukturar, og dermed gi reseptorane eit stort repertoar. Dette er ein mekanisme ein finn hos alle virveldyr med kjeve (Eason et al., 2004).

#### 3.1 Immunologiske organ

Immunsystemet si oppbygning er ulik mellom beinfisk og pattedyr (*Mammalia*) (Press et al., 1999). Dei viktigaste lymfoide organa og strukturane hos beinfisk er vist i figur 1. Beinfisk manglar beinmerg og lymfeknutar, som blir rekna som høvesvis primære og sekundære lymfoide organ hos pattedyr (Abbas et al., 2019). I primære lymfoide organ skjer modning, differensiering og proliferering av stamceller til B- og T-lymfocytter, medan det er i dei sekundære lymfoide organa lymfocyttane møter på antigen og aktiverast. Hos beinfisk er det hovudnyre og thymus som blir rekna som dei primære lymfoide organa. Hovudnyra produserer B-lymfocytter, medan thymus produserer T-lymfocytter (omtalt vidare som B- og T-celler). Desse cellene gjennomgår ein modningsprosess i sitt primære lymfoide organ. Deretter blir cellene transportert via blodet til sekundære lymfeorgan, som fungerer som kontrollpostar. Der startar immunresponsen ved opptak av antigen og samhandling mellom medfødde og adaptive immunceller. Dei sekundære lymfoide organa hos beinfisk er milt, nyre (inkludert hovudnyre og baknyre) og dei mukosal-assosierte lymfoide veva (MALT) (Press et al., 1999).



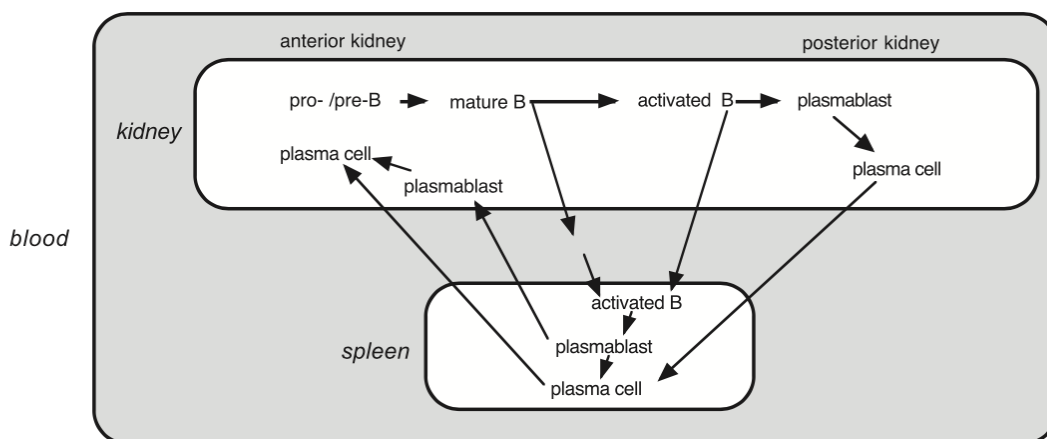
**Figur 1: Illustrasjon av plassering av viktige lymfoide organ og strukturar i fisk.** Figur henta frå (Bjørngen et al., 2022). Namn på ulike organ er ført på. NALT=nasopharynx-associated lymphoid tissue.

Nyra hos beinfisk er eit viktig organ for produksjon av blod (hematopoiese), ekskresjon av avfallsstoff (eksokrin del) og regulering av hormon (endokrin del) (Kryvi et al., 2016). Nyra blir ofte delt i tre delar: hovudnyre, midtnyre og baknyre. Beinfisk har ikkje beinmerg og det er hovudnyra som utgjer hovudsetet for produksjon av blod. Modning og aktivering av dei naive B-cellene skjer her, noko som gjer hovudnyra til eit primært lymfoid organ hos fisk (Koppang et al., 2010; Press et al., 1999; Zwollo et al., 2005). Hovudnyra inneheld store mengder B- og T-celler, forløparar til lymfocytar, raude blodceller og plasmaceller.

Plasmaceller er antistoffsekrerande celler (ASC) som blir utvikla som respons til stimulering med antigen (Abbas et al., 2019). Etter modning i hovudnyra er det vist at B-celler kan migrere til midt- eller baknyra kor dei blir aktivert til plasmablastar, forløparen til plasmaceller. Desse plasmablastane kan skilje ut store mengder antistoff, og har samstundes moglegheit til å dele seg. Plasmablastane kan så bevege seg til hovudnyra igjen som fullt utvikla plasmaceller (Zwollo et al., 2005). Dermed er det foreslått at baknyra fungerer som eit sekundært lymfoid organ, men det trengs meir forskning for å avdekke detaljane for korleis dette skjer.

Milten ligg intraperitonealt ved midttarmen i bukholra hos laks og er eit viktig hematopoetisk og immunologisk organ. Histologisk kan ein dele milten i raud og kvit pulpa, som produserer høvesvis raude og kvite blodceller (Kryvi et al., 2016). Inndeling i raud og kvit pulpa er ikkje

så tydeleg i fisk samanlikna med pattedyr (Bjørgen et al., 2021). Den raude pulpaen utgjør størstedelen av organet, og er bygd opp av blodfylte sinusoidar og immunceller som makrofagar og lymfocytter. I den kvite pulpaen finn ein akkumuleringar av melanomakrofagar og forgreiningar av arteriolar, kalla ellipsoidar. Sentera med melanomakrofagar har blitt vist å vere viktig for presentering og nedkjemping av antigen (Agius, 1980), og dei kan halde på antigen over tid (Uribe et al., 2011). Ellipsoidane filtrerer plasma og kan ta opp immunkompleks. Desse blir heldt i veggane på ellipsoidane og fagocyttert av makrofagane som ligg i melanomakrofagsentera rundt ellipsoidane (Foey et al., 2014). Milten er viktig for aktivering og differensiering av B-celler og er dermed eit sekundært immunologisk organ. Som vist i figur 2 vandrar dei modne B-cellene frå hovudnyra til milten og blir aktiverte av antigenpresenterande celler, og differensierer så til antistoffsekreterande celler (Zwollo et al., 2005).



**Figur 2: Oversikt over hypotetiske migrasjonsruter, utvikling og aktivering av B-celler og det immunologiske forholdet mellom milt og blod.** Forløparar til B-celler utviklast i hovudnyra (anterior kidney), medan modne B-celler migrerer til baknyra (posterior kidney) eller blodet. Baknyre og milt (spleen) er begge stad for aktivering av B-celler. Plasmablastar danna i baknyra eller milt differensierer til plasmaceller som migrerer til hovudnyra kor dei kan bli lengelevande plasmaceller. Figur frå (Zwollo et al., 2005).

Thymus er eit para organ som ligg øvst i gjellebuen og består av ein indre medulla og ytre korteks. Umodne T-lymfocytter kjem til thymus med blodet og gjennomgår celledeling og differensiering i dette vevet før dei gjeng ut igjen i sirkulasjonen som modne T-celler. I medulla-området i thymus skjer den negative seleksjonen, kor T-cellene med TCR (T-celle-reseptor) som kjenner att peptid frå individet sjølv med høg affinitet, vil gjennomgå apoptose (programmert celledaud) (Bowden et al., 2005). T-celler som har evne til å angripe verten sine egne celler, blir på denne måten selektert ut (Ladi et al., 2006). I korteks skjer den positive seleksjonen av T-cellene, der TCR blir testa mot kroppen sine egne antigen ved hjelp



av MHC-molekyl. T-cellene som kjenner att protein frå verten sjølv med lav affinitet, blir positivt selektert og uttrykker etter dette éin type koreseptor: CD4 eller CD8 (Abbas et al., 2019). T-cellene blir deretter spreidd ut frå thymus til dei sekundære lymfeorgana, kor dei kan kome i kontakt med antigen. Ved aktivering vil CD8<sup>+</sup> T-celler differensiere til cytotoksiske T-celler og CD4<sup>+</sup> T-celler differensierer til T-hjelpe-celler.

Dei mukosal-assosierte lymfoide veva kan delast i fem: hud-assosiert lymfoid vev (SALT), tarm-assosiert lymfoid vev (GALT), gjelle-assosiert lymfoid vev (GIALT), nasopharynx-assosiert lymfoid vev (NALT) og interbranchialt lymfoid vev (ILT) (Salinas, 2015). Dette er strukturar som fungerer som fysiske barrierar, i tillegg til at dei skil ut slim som mellom anna inneheld antibakterielle peptidar, lektinar og immunoglobulinar, og andre antimikrobielle molekul (Dash et al., 2018; Salinas, 2015). Dette bidreg i å beskytte organismen mot patogene mikroorganismar i det mukosale miljøet. Dette er spesielt viktig for fisk, då dei heile tida er i kontakt med vatn som kan huse patogene organismar. I seinare studiar har ein oppdaga eit interbranchialt lymfoid organ (ILT) i gjellene hos laks som er eit område rikt på T-celler (Koppang et al., 2010). Dette kan vere strategisk då gjellene er inngangsporten for mange patogen (Matsunaga et al., 2001).

### **3.1.1 Bukhola – ein arena for immunresponsar?**

Bukhola er den største kroppshola hos beinfisk. Den strekk seg ventralt over store delar av fisken. Ved studiar på inflammasjonsresponsar i dyr har bukhola ofte blitt brukt som modellområde (Korytář et al., 2013). Størstedelen av vaksinar til fisk blir framleis administrert intraperitonealt, då dette gir sterke og varige immunresponsar. På tross av dette, manglar det enno kunnskap om korleis leukocyttar i bukhola på fisk blir regulert når dei møter på antigen. Ved intraperitoneal infeksjon med bakterien *Aeromonas salmonicida* i regnbogeare har det blitt sett ei auke i myeloide celler (monocyttar, makrofagar etc.) i dei første timane etter infeksjon. 48 timar etter infeksjonen utgjorde plasmaceller over halvparten av cellene i bukhola (Korytář et al., 2013). I nyare studiar har ein sett at B-celler som uttrykker IgM på overflata (IgM<sup>+</sup> B-celler) er den største gruppa av celler som strøymer til bukhola etter bakterielle eller virale infeksjonar (Castro et al., 2017). Intraperitoneal infeksjon med SAV3 induserte B-celle-responsar i bukhola i form av økt frekvens av IgM<sup>+</sup> B-celler og antal IgM-sekrerande celler (ASC) (Jenberie et al., 2020). Det same er blitt vist ved intraperitoneal infeksjon med *Piscirickettsia salmonis* (van der Wal et al., 2021).

## 3.2 Medfødd immunitet

Det medfødde immunsystemet utgjør frontlinja i forsvaret mot infeksjonar i alle organismar. Systemet består av mange ulike forsvarsmekanismer som kan angripe og uskadeleggjere patogen. Hos vertebratar er det medfødde immunsystemet også viktig for å aktivere det adaptive immunsystemet og gjere det meir effektivt. Presentering av antigen til lymfocytar, stimulering av fagocytar, produksjon av cytokinar og kjemokinar og aktivering av komplementsystemet er alle viktige faktorar for at celler i det adaptive immunsystemet skal utføre sine oppgåver. Det medfødde immunsystemet reagerer umiddelbart og er ikkje avhengig av temperaturen (Magnadóttir, 2006).

Det medfødde immunsystemet blir ofte delt i tre delar: fysiske, humorale og cellulære faktorar. Unikt for teleostar er at dei har humorale og cellulære deler av immunsystemet inkorporert i den fysiske delen, i form av MALT (Salinas, 2015). Dei humorale faktorane er mellom anna ulike cytokinar, antimikrobielle peptidar og komplementproteinar. Det cellulære forsvaret består i stor grad av leukocytar kalla myeloide celler, som kan fagocytare og øydelegge patogen. Hos fisk inkluderer dette nøytrofilar, dendrittiske celle-liknande celler og monocytar/makrofagar (Jørgensen, 2014).

### 3.2.1 Patogen blir oppdaga av PRR-reseptorar

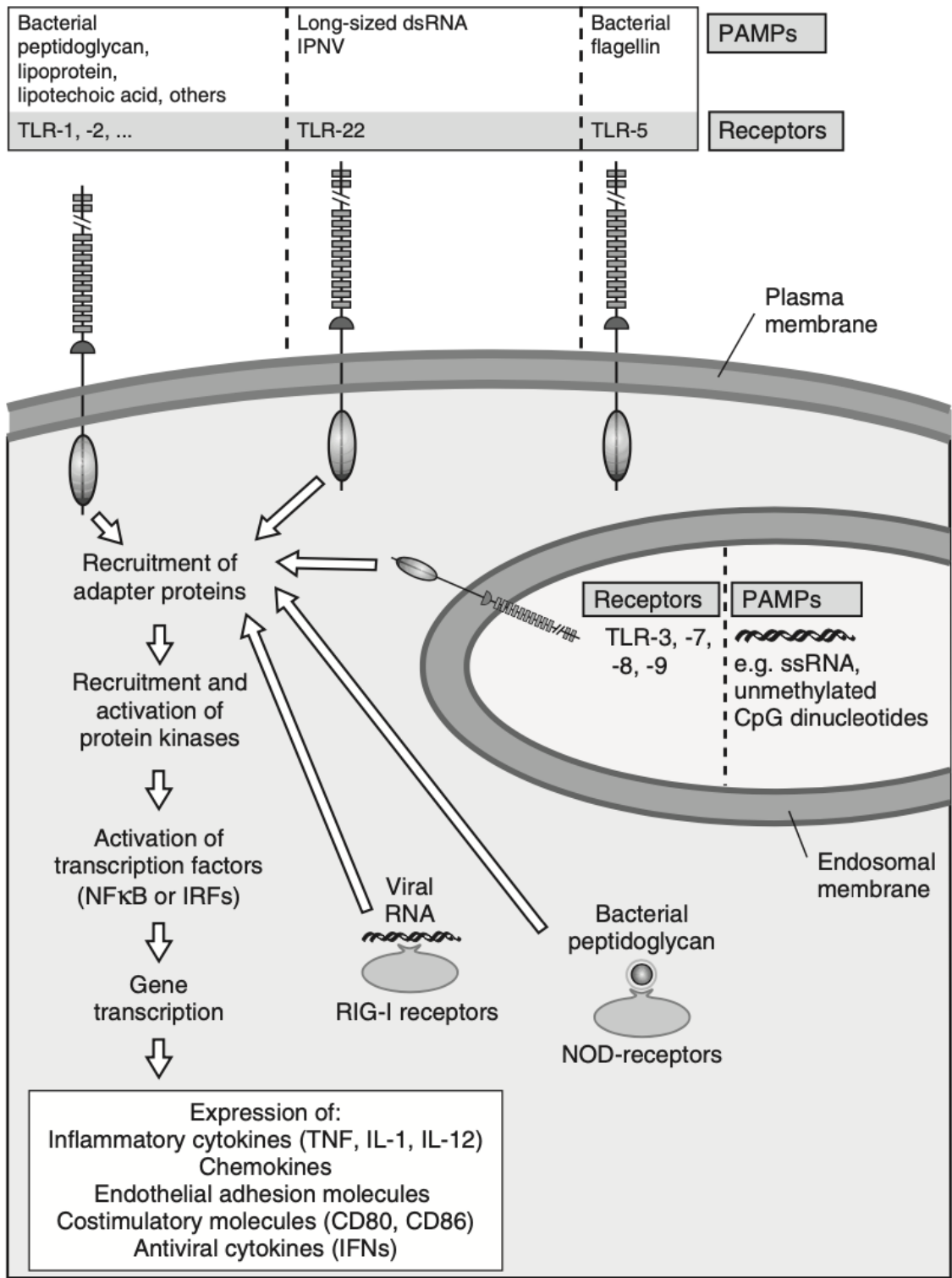
Ein føresetnad for alle cellulære immunresponsar er at cellene har spesifikke reseptorar som kan kjenne att komponentar eller molekylære strukturar hos patogen som er ulik verten sine egne celler. Dette blir gjort gjennom ei gruppe reseptorar kalla «Pattern Recognition Receptors» (PRR), som kjenner att og reagerer på konserverte molekylære mønster på mikrobar. Desse mønstera er heilt nødvendige for mikrobane si overleving og infektivitet, og er molekylære strukturar som ikkje finst i eukaryote celler i multicellulære organismar (Magnadóttir, 2006; Uribe et al., 2011). Dei molekylære mønstera blir kalla «Pathogen Associated Molecular Pattern» (PAMP). Dette kan for eksempel vere lipopolysakkarid (LPS), som ein finn i bakterieveggar, eller mikrobielle nukleinsyrer (RNA og bakterielt DNA), polysakkaridar og peptidoglykanar på bakterielt DNA. Til forskjell frå BCR (B-celle-reseptor) og TCR (T-celle-reseptor) er ikkje PRR klonalt distribuerte.

Innanfor PRR-familien finst det ulike typar reseptorar, som Toll-liknande reseptorar (TLR), Nod-liknande reseptorar (NLR) og retinoic acid-inducible gene 1-liknande reseptorar (RLR). NLR og RLR er begge intracellulære cytoplasmatiske reseptorar som bidreg i forsvar mot høvesvis bakteriar og virus (Jørgensen, 2014). NLR er ein stor familie av reseptorar som

kjenner att PAMP og DAMP (damage associated molecular patterns) som celler uttrykker ved stress eller skade (Abbas et al., 2019). RLR består av RIG-1, MDA-5 og LGP2, og desse kjenner att virus-RNA i cytoplasma (Kumar et al., 2011). Dei best studerte PRR i fisk er TLR og det er i alt beskrive 20 ulike TLR hos ulike fiskeartar (Zhang et al., 2014), mellom anna 6 typar som ein ikkje finn hos pattedyr (Jørgensen, 2014). TLR er membranbundne reseptorar som finst anten i den ytre cellemembranen eller i membranen på endosom inne i cella, som vist i figur 3. Endosomale TLR kjenner att nukleinsyrer, medan TLR på overflata av celler ofte er spesifikke for komponentar i celleveggen av bakteriar. TLR er bygd opp av eit ligand-bindande domene rikt på leucin, eit transmembran-domene og eit cytoplasmatisk signalerande TIR-domene (toll-liknande interleukin-1-reseptor) (Abbas et al., 2019).

Hos fisk finst TLR-reseptorane med stor diversitet og dei kan binde til mange ulike PAMPar (Palti, 2011). Hos pattedyr blir TLR uttrykt på celler i det medfødde immunforsvaret som til dømes makrofagar og dendrittiske celler, men dei utgjør også ei viktig kopling mellom det medfødde og adaptive immunsystemet då dei også blir uttrykt på B-celler. Seinare studiar har vist at TLR blir uttrykt på B-celler også hos beinfisk (Abós et al., 2013; Jenberie et al., 2018). Sjølv om nokre av TLR viser likskap med pattedyr sine TLR og deira nøkkeleigenskapar i signaloverføring, veit vi framleis lite om ligandspesifisiteten hos fisk sine TLRar. I forskingssamanheng blir det ofte tatt utgangspunkt i at homologe TLR hos fisk har same verknadsmekanisme og ligandspesifisitet som dei ein finn hos pattedyr. Sidan det finst fleire TLR som er spesifikke for fisk, er det nødvendig å finne ut meir om deira særegne ligandspesifisitet, då det ikkje finst noko samanlikningsgrunnlag å bygge på frå pattedyr (Zhang et al., 2014). Ein oversikt over kva for TLR dei ulike immunmodulatorane som er brukt i denne oppgåva moglegvis binder til i fisk, er vist i tabell 2.

Binding av ligandar til PRR startar signalvegar som aktiverer transkripsjonsfaktorane NF $\kappa$ B og interferon-regulerande faktorar (IRF). NF $\kappa$ B aukar genuttrykket av inflammatoriske cytokinar som til dømes TNF, kjemokinar, endotele adhesjonsmolekyl og kostimulatoriske molekyl, medan IRF stimulerer produksjon av type 1 interferonar (figur 3) (Kanwal et al., 2014; Palti, 2011; Sahoo, 2020). Alle desse faktorane bidreg i nedkjempinga av, samt beskyttelsen mot, patogenet som i utgangspunktet batt til PRR.



**Figur 3: Ulike PRRs responderar på ulike mikrobielle molekyl (PAMP).** Dei fleste PRR aktiverer signalmekanismer, som resulterer i cellulære responsar som er sentrale i medfødde immunresponsar (Jørgensen, 2014).

### 3.2.2 Immunmodulatorar nytta i denne oppgåva

Ein immunmodulator er ein kvar forbindelse som verkar inn på immunsystemet sin funksjon. Immunmodulatorar kan bli nytta som adjuvansar i vaksiner, då dei kan bidra til å auke eller endre den humorale eller cellulære immunresponsen mot eit antigen (Lima et al., 2004). Ved introduksjon av ein immunmodulator, vil makrofagar og dendrittiske celler migrere til desse områda for å starte inflammasjonsprosessar. Ved binding til reseptorar, som for eksempel TLR, vil immunmodulatorar stimulere til produksjon av cytokinar og kostimulatoriske molekyl for å nedkjempe infeksjonen (Abbas et al., 2019). Dendrittiske celler er profesjonelle antigenpresenterande celler (APC) som kan ta opp og prosessere antigen for presentering til T-celler. Dette startar den adaptive immunresponsen (Tafalla et al., 2014). Aktivering av T-celler krev at proteinkomplekset CD3 er assosiert med TCR, samt kostimulatoriske signal. Dette blir gitt av T-celle-reseptoren CD28, når den binder til sine ligandar CD80 og CD86 uttrykt på APC (Abós et al., 2022). Både CD28 og ortologar av CD80 og CD86 er funne i beinfisk (Bernard et al., 2006; Hansen et al., 2009; Sugamata et al., 2009). Antigen-spesifikke B-celler blir aktiverte når det spesifikke antigenet blir oppdaga av T-hjelpe-celler. Aktiverte B-celler uttrykker ein høgare andel av det kostimulatoriske molekylet CD83 på overflata (Zhu et al., 2014). Antigenet blir oppdaga av T-hjelpe-celler ved at CD40-reseptoren på B-celler kjenner att CD40-ligand (CD40L) uttrykt på overflata av T-hjelpeceller. I tillegg vil cytokinane som blir skilt ut av T-hjelpe-cellene også kunne bidra i aktiveringa av B-cellene (Abós et al., 2022). Det er vist at cytokinar frå T-celler i kombinasjon med CD40L betrar overleving og aukar celledeling av IgM<sup>+</sup> B-celler, samt sekresjon av IgM hos regnbogeure (Abos et al., 2020).

#### 3.2.2.1 LPS

LPS (lipopolysakkarid) er eit glykolipid i den ytre membranen på Gram-negative bakteriar, og er ein potent immunstimulant (Tanekhy et al., 2019). LPS består av eit lipid-domene (kalla lipid A), eit hydrofilt polysakkarid-domene og ein glykan-polymer kalla O-antigen. Det er lipid-A-delen som induserer dei biologiske effektane som LPS har hos pattedyr. Hos pattedyr blir lipid-A-delen av LPS kjent att av TLR4 (Rawlings et al., 2012), i samband med MD2 og CD14 (Jørgensen, 2014). Dette systemet for gjenkjenning av LPS er ulikt frå fisk (Iliev et al., 2005). Av desse molekyla er det berre homologar av TLR4 som er oppdaga i nokre genom frå fisk (Jault et al., 2004). TLR4 finst til dømes ikkje hos laksefisk, medan i andre fiskeartar, kor TLR4 finst, ser det ut til at reseptoren ikkje er involvert i LPS-sansing (Sepulcre et al., 2009). I fleire forsøk med LPS-behandling på celler frå milt hos beinfisk, er LPS vist å oppregulere

uttrykk av TLR1 og TLR2 mRNA i milten (Wang et al., 2013; Wei et al., 2011). Ved forsøk med kulefiskar (*Tetraodon nigroviridis*) injisert med LPS vart TLR1 i milten merkbart oppregulert (Wu et al., 2008). Desse ulike forsøka foreslår at TLR1 og TLR2 truleg deltek i gjenkjenning av LPS hos fisk (Zhang et al., 2014). Sjølv om reseptorane for sansing av LPS ikkje er fullstendig studert, er det vist i fleire forsøk at polysakkaridet gir responsar hos laksefisk. Stimulering med LPS på sorterte IgM<sup>+</sup> B-celler har blitt vist å stimulere til auka overleving og evne til å skilje ut IgM (Abós et al., 2016). Tidlegare ELISpot-forsøk i vår forskingsgruppe har vist at stimulering med LPS med konsentrasjon på 100 µg/ml på leukocyttkultur frå hovudnyre hos laks gav 1.9 gongar så mange ASC som ikkje-stimulerte celler (Wold, 2018).

### 3.2.2.2 CpG

DNA-sekvensar for bakteriar og enkelte typar virus har ein høgare mengd av ikkje-metylerede cytosine-fosfat-guanine (CpG)-motiv, samanlikna med eukaryote celler (Abbas et al., 2019). Det er identifisert tre ulike klassar av CpG: klasse A, B og C. Det er klasse B CpG som aktiverer B-celler (Strandskog et al., 2007) og som blir nytta i denne oppgåva. Det finst to TLR hos fisk som kjenner att CpG-motiva som faresignal: TLR9 og TLR21. TLR9 kjenner att CpG-motiv i pattedyr (Keestra et al., 2010; Owen et al., 2013) og i beinfisk (Skjæveland et al., 2008), medan TLR21 kjenner att CpG-motiv i beinfisk og fugl (Alcaide et al., 2011; Takano et al., 2010; Yeh et al., 2013). Ved testing i forsøk blir det nytta syntetiske, korte, enkelttråda DNA-molekyl med CpG-motiv i (CpG oligodeoxynukleotidar (ODN)). Som adjuvans i vaksine mot SAV vart det vist at CpG bidrog til auka beskyttelse mot viruset (Thim et al., 2012). I eit tidlegare forsøk i vår forskingsgruppe vart IgM<sup>+</sup> celler sortert ut frå leukocyttopulasjonar frå hovudnyre og milt hos laks. Ved stimulering med CpG auka utskiljinga av IgM (Jenberie et al., 2018). I forsøk med leukocyttrar frå milt og blod frå regnbogeaure viste stimulering med CpG liknande effektar (Simón et al., 2019). Dette foreslår at CpG verkar direkte på B-celler frå laksefisk til å differensiere til ASC. Non-CpG ODN blir nytta som negativ kontroll for CpG i våre forsøk. I kontrollen er CG-sekvensar inverterte til GC, og inneheld dermed GpC-oligodeoksynukleotidar.

### 3.2.2.3 Imiquimod

Imiquimod (R837) er eit imidazoquinolin analog til guanosine som har antivirale eigenskapar og er ein ligand for TLR7 i pattedyr (Akira et al., 2003). Ved binding til TLR7 vil imiquimod bidra til produksjon av type I-interferon og cytokinar som TNF- $\alpha$ , IL-6 og IL-12 (Jault et al., 2004). Desse cytokinane aukar evna APC har til å presentere virale antigen til T-lymfocyttrar,

og dermed fremmer dei den antigenspesifikke Th1-cellemedierte immunresponsen (Stanley, 2002). TLR7 er påvist hos laks (Lee et al., 2013). Imiquimod har vist å inducere uttrykk av type 1-IFN, Mx, ISG15 og IFN- $\gamma$  ved intraperitoneal injeksjon i laks (Kileng et al., 2008). I forsøk med karpe (*Cyprinus carpio*) vart imiquimod brukt for å undersøke genuttrykk av fleire cytokin-gen i leukocyttar frå hovudnyre, til dømes TNF- $\alpha$ , type 1 IFN og Mx1. Behandling med imiquimod oppregulerte dei fleste gena som vart undersøkt, spesielt IFN-gena (Tanekhy et al., 2019). Dette underbygger at imiquimod startar signalvegar for produksjon av cytokinar og dermed er med å initiere medfødde immunresponsar i karpe. Eksakt kva for reseptor som binder imiquimod i fisk, er ikkje kartlagt.

### 3.2.2.4 Poly I:C

Polyinosinic polycytidylic acid (poly I:C) er eit syntetisk dobbeltråda polyribonukleotid som etterliknar virale infeksjonar. Poly I:C er strukturelt likt dobbeltrådig RNA og er ein naturleg ligand for MDA5 og TLR3 (Kato et al., 2006; Tanekhy et al., 2019). Binding av poly I:C til reseptorane MDA5 og TLR3 bidreg til produksjon av type 1 IFN og induksjon av ulike IFN-induserte gen, inkludert Mx. Dette er blitt vist både i japansk flyndre (*Paralichthys olivaceus*) og atlantisk laks (Kileng et al., 2007; Zhou et al., 2014). I tillegg har fisk TLR22, som er foreslått å vere ein funksjonell analog til TLR3 hos menneske. TLR22 deltek i nedkjemping av dsRNA-virus ved produksjon av IFN (Matsuo et al., 2008), og binder dermed truleg poly I:C.

**Tabell 2: Oversikt over kva for TLR-reseptorar hos fisk dei ulike immunmodulatorane brukt i forsøka våre moglegvis binder til.**

Ligand	Reseptor	Referanse
LPS	TLR1, TLR2	(Quiniou et al., 2013; Wei et al., 2011)
CpG	TLR 9, TLR21	(Lee et al., 2014; Skjæveland et al., 2008; Yeh et al., 2013)
Imiquimod	TLR7	(Akira et al., 2003; Jault et al., 2004)
Poly I:C	TLR3, TLR22, (MDA5)	(Kato et al., 2006; Lv et al., 2012; Matsuo et al., 2008; Tanekhy et al., 2019)

### 3.2.3 Interferonar

Immunologiske celler kan produsere ulike typar signalmolekyl kalla cytokinar. Dette er ekstracellulære polypeptid og glykoprotein som regulerer immunresponsen, og omfattar interferonar, interleukinar og kjemokinar. Interferonar er dei viktigaste forsvarsmolekyla som blir produsert under virusinfeksjonar (Abbas et al., 2019). I tillegg til antivirale eigenskapar har dei viktige regulatoriske funksjonar både i det medfødde og adaptive immunforsvaret (Sun et al., 2011).

Hos pattedyr blir IFN klassifisert i tre typar etter biologiske og strukturelle eigenskapar: type I-IFN (IFN-I), type-II IFN (IFN-II) og type-III IFN (IFN-III) (Jørgensen, 2014). Ein har enno ikkje funne IFN-III hos teleostar, men både IFN-I og IFN-II er beskrivne (Sun et al., 2011). Binding av virus-RNA i infiserte celler vil indusere produksjon av type I og type III IFN, medan type II IFN berre blir produsert av immunceller. Dei fleste virus lagar dsRNA eller ssRNA som fungerer som PAMPs, blir kjend att av PRR og fører til aktivering av spesifikke transkripsjonsfaktorar, følgd av uttrykking av type 1 IFN (Jørgensen, 2014). Type 1 IFN vil alarmere celler i nærleiken ved å binde spesifikke IFN-reseptorar som finst på alle celler med kjerne. Aktivering av desse vil i sin tur indusere transkripsjon av interferon-stimulerte gen (ISG) gjennom JAK-STAT signalvegen. Dette vil føre til produksjon av antivirale protein, som til dømes Mx, som hindrar viruset i å replikere (Abbas et al., 2019).

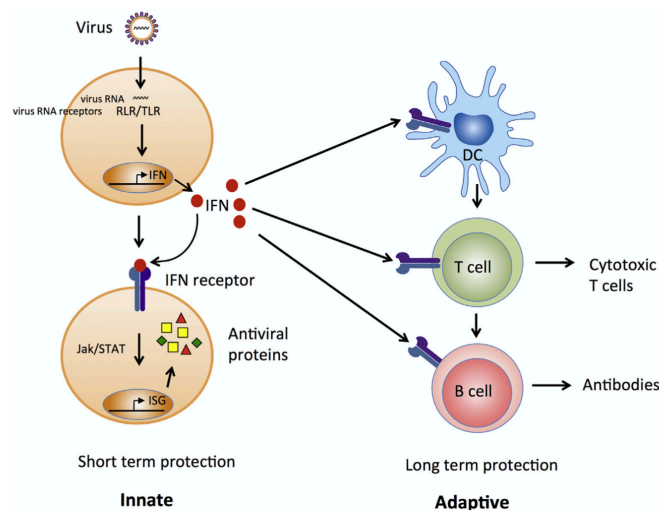
I det adaptive immunsystemet hos pattedyr fungerer type I-IFN ved å stimulere antigenpresenterande celler (dendritiske celler) og B- og T-celler, noko som resulterer i økt produksjon av antigen-spesifikke antistoff og cytotoksiske T-celler (Robertsen, 2018). Det er blitt undersøkt korleis type I-interferonar regulerer B-celle-responsar i regnbogeaure. Det vart vist at IFN $\alpha$  både auka overlevinga av IgM<sup>+</sup> B-celler og B-celler sin evne til å fagocytare, og type I og type II interferon auka sekresjon av IgM i blod. Det vart også observert ei auke i transkripsjonen av Mx-protein i B-cellene (Benedicenti et al., 2020). IFN-II blir produsert av T-celler og blir ofte kalla IFN- $\gamma$ . IFN- $\gamma$  verker i den adaptive immuniteten mot intracellulære patogen (Abbas et al., 2019).



### 3.2.3.1 Type 1 IFN hos beinfisk

Store delar av IFN-I systemet til atlantisk laks har blitt karakterisert dei siste 20 åra, kor IFN $\alpha$  var den første undertypen som vart oppdaga (Robertsen, 2018; Robertsen et al., 2003). IFN- $\alpha$  og IFN- $\beta$  er dei dominante type-I interferonane hos pattedyr, men fisk og pattedyr sine gen for IFN-I har utvikla seg ganske ulikt og er dermed ikkje ortologar (Robertsen, 2018). I celleprøver frå menneske er det vist at forbehandling av makrofagar (APC) med IFN- $\alpha$  gir ein oppregulering av TLR3, TLR4 og TLR7, samt signalmolekyl som er viktig i TLR sin funksjon, som mellom anna MyD88 og ulike kinasar (Sirén et al., 2005).

Seinare forskning har vist at laks, i tillegg til IFN $\alpha$ , også har undertypane IFN $\beta$ , IFN $\gamma$  og IFN $\delta$  (Chang et al., 2009), der ein har funne 11 IFN-gen i same genomiske område. Det inneheldt to IFN $\alpha$ -gen (IFN $\alpha$ 1 og IFN $\alpha$ 3), fire IFN $\beta$  (IFN $\beta$ 1-4) og fem IFN $\gamma$  (IFN $\gamma$ 1-5). Etter publisering av genomet til atlantisk laks vart det klart at laks også har to andre klassar, IFN $\epsilon$  og IFN $\zeta$ , som liknar dei som er karakterisert i regnbogeaure (Zou et al., 2014). For atlantisk laks er IFN $\alpha$ 1 og IFN $\alpha$ 2 foreslått å primært bli induisert gjennom RIG-I/MDA5 reseptorane, medan IFN $\beta$  og IFN $\gamma$  blir induisert gjennom TLR7-reseptoren (Robertsen, 2018; Svingerud et al., 2012). Dei ulike interferonane hos laks er svært ulike i sekvens, noko som tydar på at dei har ulike funksjonar i fisk. Hos laks er det vist at interferonane har antiviral aktivitet. IFN $\alpha$  og IFN $\gamma$  er mellom anna blitt vist å induisere fullstendig beskyttelse for lakseceller mot cytopatogen effekt forårsaka av IPNV (Svingerud et al., 2012).



**Figur 4: Oversikt over rollen til type I-IFN i medfødde og adaptive immunresponser.** Under ein virusinfeksjon vil vertsceller kjenne att viralt RNA ved binding til cytoplasmiske (RLR) eller endosomale reseptorar (TLR) og frigjere IFN-I. Frigjort IFN-I fører til transkripsjon av IFN-induserte gen (ISG), f.eks. antivirale protein, ved binding til vertscelle-assosierte IFN-I reseptorar og stimulering av det adaptive immunforsvaret gjennom B-, T- og dendrittiske celler. RLR omfattar både RIG-I og MDA5, medan TLR omfattar TLR3, TLR7 og TLR22 (Robertsen, 2018).

Koplinga mellom IFN og det adaptive immunforsvaret er skissert i figur 4. Denne koplinga gjer det mogleg å nytte IFN-I-plasmid som adjuvans i vaksinar. DNA-vaksinar som har hemagglutinin esterase (HE) frå ILAV som antigen, har liten beskyttande effekt *in vivo* åleine, men når gen som kodar for IFNa, IFNb og IFNC blir nytta som adjuvans, gir DNA-vaksinen god beskyttelse (Chang et al., 2015). Alle tre IFN-plasmid som vart testa saman med vaksinen, auka beskyttelsen mot infeksjon med ILAV, og stimulerte til ei auke i IgM-antistoff mot viruset. Ved injeksjon av plasmid som kodar for IFNa, IFNb og IFNc i muskel vil IgM<sup>+</sup> og IgT<sup>+</sup> B-celler og cytotoxiciske T-celler strøyme til området for injeksjon, noko som truleg skjer fordi interferonane induserer produksjon av kjemokinar som tiltrekkjer seg denne typen celler (Chang et al., 2015; Sobhkhez et al., 2017). Dette er ikkje tilfelle i kontrollprøvene, kor det vart injisert tom vektor i staden for IFN-plasmida. Det krevst vidare forskning for å kartlegge den heilskaplege effekten av å nytte interferonar som adjuvans i vaksinar og ein veit spesielt lite om effektane interferonar har på B- og T-celler. Dei ulike funksjonane til type I-interferonar i laks er vist i tabell 3.

**Tabell 3: Funksjonelle eigenskapar til IFNa, IFNb, IFNc og IFNd.** Grad av funksjon er vist med (+). ISG=interferon-induserte gener, poly I:C=polyinosin:polycytidylisk syre, R848=TLR-7/8-agonist. Tabell henta frå (Robertsen, 2018).

	IFNa	IFNb	IFNc	IFNd
<b>Antiviral aktivitet i cellelinjer</b>	+++	+	+++	-
<b>Antiviral aktivitet <i>in vivo</i></b>	+	++	+++	-
<b>Systemisk induksjon av ISGs</b>	-	++	+++	-
<b>Induksjon av poly I:c i cellelinjer</b>	+++	-	-	-
<b>Induksjon av poly I:C <i>in vivo</i></b>	+++	-	+++	-
<b>Induksjon av R848 i cellelinjer</b>	-	-	-	-
<b>Induksjon av R848 <i>in vivo</i></b>	-	++	++	-

### 3.2.3.2 Tumor nekrose faktor (TNF)

TNF- $\alpha$  er eit viktige pro-inflammatoriske cytokin og ein del av TNF-superfamilien. Det er ei gruppe cytokinar og reseptorar, løyselege og membranbundne, som blir karakterisert ved homologe cyteinrike domener (CRDs). Proteina i familien spelar ei viktig rolle i immunsystemet der dei koordinerer celledeling og beskyttande funksjon av patogen-reaktive celler (Locksley et al., 2001). TNF- $\alpha$  er eit proinflammatorisk cytokin som hovudsakeleg blir produsert av ulike fagocytiske celler og som regulerer inflammasjon og rekruttering av leukocyttar (Wiens et al., 2011). Det er høgt uttrykk av TNF- $\alpha$  i hovudnyre og gjeller, og stimulering med LPS har vist å indusere uttrykk av TNF- $\alpha$  i leukocyttar frå hovudnyre frå regnbogeare (Laing et al., 2001).

### 3.3 Adaptiv immunitet

Mikroorganismar evnar på ulike måtar å nedkjempe eller unngå verten sitt medfødde immunforsvar og etablere infeksjon. Ved slik infeksjon vil verten sette i gang ein spesifikk immunrespons, som er skreddarsydd for ulike antigen. Dette forsvaret involverer ulike celler, protein, gen og biokjemiske signal som gjer systemet i stand til å aktivere ulike effektorceller og produsere antistoff med høg spesifisitet og affinitet (Uribe et al., 2011). Ein adaptiv immunrespons tek generelt lengre tid å etablere enn den medfødde, den blir påverka av temperatur og kan danne minneceller som gir hurtigare respons dersom det same patogenet blir introdusert på ny i organismen (Foey et al., 2014). Den adaptive immunresponsen har også lengre varigheit enn den medfødde (Abbas et al., 2019).

Fisk har celler som uttrykker MHC, TCR (T-celle-reseptor) og immunoglobulinar. Dei har også hjelpe-T-celler og cytotoxiske T-celler, og ulike populasjonar av B-celler (Foey et al., 2014). Dette stadfestar at fisk innehar ein adaptiv immunrespons. T-cellene har T-celle-reseptor (TCR) og B-cellene har B-celle-reseptor (BCR), som begge er bygd opp av protein. BCR binder direkte til antigen, medan TCR berre kan kjenne att peptid presentert av MHC-molekyl i membranen til antigenpresenterande celler (APC). Når BCR og TCR hos pattedyr binder til antigen vil det aktivere ein signalkaskade nedstrøms for desse reseptorane, ved å aktivere ulike enzym i cytoplasma. Desse enzyma fosforylerar proteinar og det gir ein kaskade av reaksjonar som til slutt mobiliserer ulike transkripsjonsfaktorar for ulike gen, som kodar for spesifikke protein eller signalmolekyl som deltek i delinga av B-celler eller er viktige for produksjon av cytokinar eller effektormolekyl hos T-celler (Abbas et al., 2019). Det er usikkert om desse prosessane skjer på same måte hos fisk, då det er lite studert.

I motsetning til PRR, er diversiteten til BCR og TCR stor. Gensegmenta som kodar for protein som byggjer opp reseptorane, blir endra ved somatisk rekombinasjon for å danne det store repertoaret av antistoff /immunoglobulinar og TCR hos høvesvis B- og T-celler. Activation-induced cytidine deaminase-enzym (AID) er eit enzym som utfører punktmutasjonar i gensegmenta som kodar for reseptorane. I denne prosessen blir det tilført eller fjerna tilfeldige nukleotidar frå genane, noko som gir eit stort repertoar når det kjem til antigenspesifisitet (Boehm et al., 2007). Deretter skjer det ei somatisk rearrangering av VDJ-segment i loci som kodar for TCR eller BCR. Dette er ei nærmast tilfeldig rearrangering av variable (V)-, «joining» (J)- og, i nokre tilfelle, diversitet (D)-segment.

På same måte som hos pattedyr, deltek Rekombinasjons-aktivering-gener 1/2 (RAG  $\frac{1}{2}$ ) og TdT i desse prosessane i fisk (Hansen, 1997; Hansen et al., 1995). Når korrekt antigen blir kjent att av BCR og TCR, vil dette saman med signal frå cytokinar bidra til å utvikle desse cellene frå naive til aktiverte B- og T-celler (Abbas et al., 2019). Dei B- og T-cellene som binder til antigen med høg spesifisitet vil gå gjennom klonal seleksjon og ekspansjon og dermed blir favorisert i produksjonen av lymfocytar (Abbas et al., 2019). Det adaptive immunsystemet delast i to greiner: det humorale og det cellulære.

### **3.3.1 Cellemediert og humoral adaptiv immunitet**

Cellemediert og humoral adaptiv immuniteten verkar gjennom ulike celler og molekyl for å beskytte verten mot høvesvis intra- og ekstracellulære mikroorganismar. Lymfocyttane, kalla T- og B-celler, er nøkkelcellene i den adaptive immuniteten og desse blir knytt høvesvis til cellemediert og humoral adaptiv immunitet (Mutoloki et al., 2014).

#### **3.3.1.1 T-celler**

T-celler blir produsert og modnar i thymus hos fisk (Foey et al., 2014). I laksefisk som ikkje er vaksinert, finn ein det største talet T-celler i thymus, MALT og ILT (Koppang et al., 2010). Ein finn dei og i nyra, milten, blodet, levra og hjartet. Aktiverte T-celler kan differensiere til lengelevande hukommelsesceller som overlever etter infeksjon (Koppang et al., 2010; Nakanishi et al., 2015). T-cellene kan lokalisere og eliminere intracellulære mikroorganismar og infiserte vertsceller. TCR består av ein  $\alpha$ -kjede og ein  $\beta$ -kjede som er ankra i membranen på T-cella. På kvar av desse kjedene er det eit V-domene. Saman dannar desse to V-domena bindingsstaden for antigen (Abbas et al., 2019).

Ein kan dele T-cellene i to typar: hjelper T-celler ( $CD4^+$ ) og cytotoxiske T-celler ( $CD8^+$ ). Assosiert til TCR hos  $CD4^+$  T-celler er koreseptor CD4, som kjenner att MHC klasse 2-proteinar på overflata av APC (Mutoloki et al., 2014). Dette aktiverer fjerning av fagocyterte mikroorganismar ved utskiljing av cytokinar. Eksempel på APC er makrofagar, dendritiske liknande celler og B-celler (Hamilos, 1989).  $CD4^+$  T-celler skil ut ulike cytokin, som aktiverer andre immunceller til å respondere til ein trussel – derav namnet hjelpe T-celler (Ashfaq et al., 2019).

Assosiert til TCR hos  $CD8^+$  cytotoxiske T-celler er koreseptor CD8. Desse cellene drep infiserte vertsceller ved å binde til MHC klasse 1 molekyl på overflata av APC. Alle celler med kjerne uttrykker MHC I (Abbas et al., 2019). T-cellene kan berre kjenne att antigen i

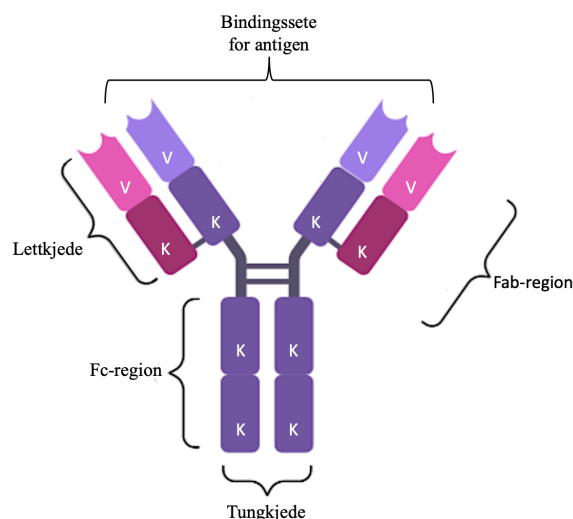
form av peptidbitar vist fram på MHC. Dei cytotoksiske T-cellene kan oppdage infiserte eller unormale celler ved at peptidfragment frå patogen eller unormale protein blir vist fram saman med MHC klasse 1-molekyl på overflata (Abbas et al., 2019). På denne måten kan verten verne seg mot intracellulære patogen som virus eller kreftceller. Denne celletypen bidreg til utskiljing av molekyl som startar apoptose (celledød) (Nakanishi et al., 2011). Det manglar framleis spesifikke leukocytmarkørar for å identifisere T-celler hos fisk, og den cellemedierte immuniteten er derfor mangelfullt studert (Dahle et al., 2019).

### 3.4 B-celler hos beinfisk

I fisk blir naive B-celler produsert i hovudnyra og har membranbundne antistoff, kalla immunoglobulinar, som fungerer som reseptorar (BCR) og binder spesifikke antigen (Ye et al., 2013). Antistoff dannar grunnlaget for den humorale immuniteten ved fleire mekanismar. Dei kan nøytralisere mikrobar ved å blokkere binding mellom ligandar og reseptorar, og dei kan setje i gang klassisk komplementaktivering (komplement-avhengig cytotoxicitet). Dei kan også aktivere celler som har Fc-reseptor og indusere fagocytose og cytotoxicitet, gjennom høvesvis opsonisering av patogen og antistoff-avhengig cellulær cytotoxicitet (Abbas et al., 2019). B-celler er også involvert i antigenpresentering, kor antigenet blir tatt inn og prosessert for å blir vist fram som fragment på MHC klasse II-molekyl i membranen og aktivere CD4<sup>+</sup> T-celler (Abós et al., 2022).

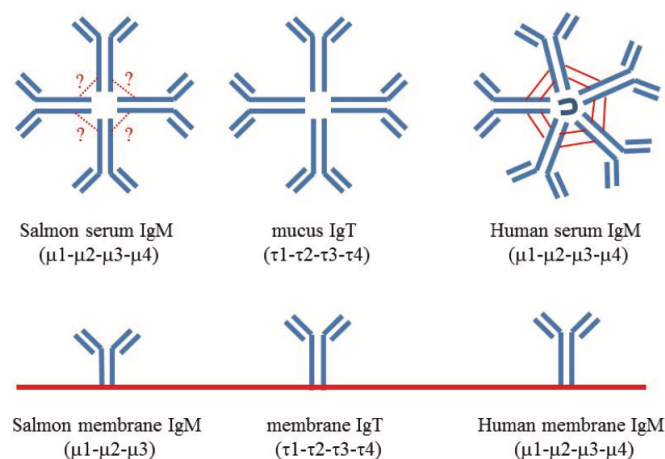
#### 3.4.1 Immunoglobulinar hos beinfisk

Immunoglobulinar (Ig) er protein som bli produsert av B-celler som respons på antigen og deira generelle struktur er vist i figur 5. Kvar Ig er bygd opp av to identiske tungkjeder og to identiske lettkjeder (Hordvik, 2015). Ig består av ein Fc-region og ein Fab-region. Det er dei variable domena av Fab-regionen som binder til antigenet, medan Fc-regionen binder til celler og ulike effektormolekyl i immunsystemet (Abbas et al., 2019). Antistoff finst enten som membranbundne til BCR eller som fritt utskilde i plasma.



**Figur 5: Illustrasjon av den generelle strukturen til antistoff.** Eit antistoff består av fire polypeptidkjeder: to identiske tungkjeder og to identiske lettkjeder, som kvar inneheld variable (V) og konstante regionar (K). Bindingssetet på eit antistoff består av V-regionane i både tung- og lettkjeden. Fab-regionen (fragment, antigen-binding) består av heile lettkjeden (med sitt ekle V og K-domene) saman med den første V og K-domene på tungkjeden. I kvart Ig-molekyl er det to identiske Fab-regionar som binder antigen. Resten av tungkjeden sine K-domene dannar Fc-regionen (fragment, crystalline) som er ansvarleg for mesteparten av den biologiske aktiviteten og effektorfunksjonen til antistoffet (Abbas et al., 2019). Figuren er i utgangspunktet henta frå (Rey, 2020), innhaldet er tilpassa og tekst er oversett til norsk.

Tre isotyper av immunoglobulin er blitt identifisert hos beinfisk, basert på kva for variantar av immunoglobulin dei uttrykker på overflata: IgM, IgD og IgT (IgZ hos zebrafisk) (figur 6). Isotypane blir skild ved den konstante regionen av tungkjedemolekylet: C $\mu$  for IgM, C $\delta$  for IgD og C $\tau$  for IgT (Hikima et al., 2011). I ei kartlegging av distribusjonen av IgM<sup>+</sup> og IgT<sup>+</sup> B-celler i systemiske immunorgan hos laks blei det vist at IgM er den mest utbreidde isotypen (Jenberie et al., 2018). IgM blir produsert hovudsakleg av plasmaceller og plasmablastar i hovudnyra (Zwollo et al., 2005) og finst som ein monomer når den er membranbunden og som ein tetramer i serum (Hordvik, 2015). Både singel positive IgM<sup>+</sup> B-celler og IgD<sup>+</sup> B-celler finst hos beinfisk, men ein finn som oftast IgD ko-uttrykt på overflata til IgM<sup>+</sup> B-celler. Desse cellene blir kalla dobbeltpositive B-celler og blir nemnt vidare som IgM<sup>+</sup> B-celler. IgT<sup>+</sup> B-celler er hovudtypen B-celler som ein finn i MALT og høyrer til ei separat B-celle-linje (Zhang et al., 2017). IgT er ein ekvivalent til det mukosale Ig ein finn hos pattedyr, IgA (Salinas, 2015). Det er >60 gongar lågare konsentrasjon av IgT i plasma hos fisk samanlikna med IgM (Zhang et al., 2010).



**Figur 6: Oversikt over sekretert og membranbunden IgM og IgT i laksefisk, samanlikna med IgM frå menneske.** Hos teleostar finn ein sekretert IgM som ein tetramer. Monomer IgM hos teleostar har svake disulfidbindingar og manglar J-kjeda samanlikna med IgM pentamer hos pattedyr. Membranbunden IgM hos teleostar er eitt domene kortare enn hos pattedyr. Dette kjem av at det fjerde konstante domenet er fjerna i spleise-mønsteret. I slimhinner finn ein IgT frå laksefisk som ikkje-kovalente bundne tetramerar. Likskapen mellom det første konstante domenet i IgM og IgT er relativt høgt (52%) i atlantisk laks, medan dei resterande domena av tungkjeden berre er 13-24% like (Tadiso et al., 2011). Figur henta frå (Hordvik, 2015).

Isotype-skifte er når ein B-celle sin produksjon av ein Ig-klasse blir endra til å produsere ein annan klasse, for eksempel IgM til IgD – i ein reaksjon som blir kalla class switch recombination (CSR). Tungkjeden på immunoglobulinet endrast, medan den variable regionen av tungkjeden ikkje endrast. Reaksjonen blir katalysert av enzymet activation-induced cytidine deaminase (AID). Teleoste fisker uttrykker AID, men det skjer ikkje CSR

hos teleostar (Barreto et al., 2005; Mutoloki et al., 2014). Det er ei hypotese om at CSR har kome til seinare i evolusjonen, kobla til framveksten av landlevande virveldyr – den einaste dyregruppa der CSR er blitt påvist fram til i dag (Ichikawa et al., 2006).

Affinitetsmodning er prosessen der ei B-celle aukar sin affinitet for eit bestemt antigen (Abbas et al., 2019). Det første steget i prosessen blir kalla somatisk hypermutasjon (SMH) og hos pattedyr blir dette gjort ved at enzymet activation induced cytidine deaminase (AID) tilfeldig muterer DNA som kodar for den variable delen av tung- eller lett kjeden. Dette kan i sin tur endre bindingssetet for antigen til antistoffet, ved at mutasjonane endrar aminosyresamansetninga i setet (Magor, 2015). Under affinitetsmodning blir antistoffa testa mot antigen, der antistoffa med høgast affinitet til antigenet som i utgangspunktet aktiverte B-cella, vil bli selektert og proliferere. Celler med lågare affinitet vil gjennomgå apoptose (Abbas et al., 2019). AID-enzym finst hos beinfisk som malle og zebrafisk (Barreto et al., 2005; Zhao et al., 2005), noko som underbygger teorien om at affinitetsmodning av immunoglobulinar også skjer hos beinfisk (Kaattari et al., 2002). Det er blitt vist at affinitetsmodning hos fisk er mindre effektiv enn hos pattedyr (Warr, 1995; Wilson et al., 1992). Prosessen føregjeng mest sannsynleg i melanomakrofag-sentera i milt og hovudnyre (Agius et al., 2003). I tidlegare forsøk er det blitt vist at regnbogeaure genererer antistoff med høgare affinitet relativt seint i immunresponsen. Etter 15 veker var affiniteten for antistoff 100 gongar høgare enn ved måling etter fem veker (Ye et al., 2011). Denne auka i affinitet for antistoff er likevel mykje lågare enn det ein observerer hos pattedyr (Abós et al., 2022).

Naturlege antistoff er ein del av det medfødde immunforsvaret og blir produsert utan nokon spesifikk stimulering med antigen (Magnadóttir, 2006). Naturlege antistoff kan bidra til normal utvikling av B-celler, motverke autoimmune sjukdommar og gi eit medfødd forsvar mot fleire infeksiøse sjukdommar. Naturlege antistoff er polyreaktive, har brei spesifisitet og er som oftast av IgM-isotypen (Bilal et al., 2021). Hos pattedyr blir naturleg IgM hovudsakeleg produsert av B1-celler medan kroppen er i homeostase (Díaz-Rosales et al., 2019). Naturleg IgM finst hos alle pattedyr, fuglar, amfibiar, bein- og bruskfisk (Savage et al., 2015), og er funne i teleoste fiskeartar som karpe og torsk (Bilal et al., 2021). Naturlege antistoff har ikkje SHM i V-regionen som gir lav affinitet for antistoff, men dette blir kompensert for ved den polyreaktive naturen til naturleg IgM (Bilal et al., 2021). Under infeksjon med PRV-1 er det blitt observert binding av ikkje-spesifikke IgM antistoff til kontrollantigen i forsøket, noko som indikerer sekresjon av naturlege polyreaktive antistoff (Teige et al., 2019).



### 3.4.2 B-celler hos fisk har eigenskapar som liknar B-1-celler hos pattedyr

Naive B-celler hos pattedyr blir ofte delt inn i tre hovudgrupper; follikulære B-celler, B-1 B celler og marginal zone (MZ) B-celler. Dei modne follikulære B-cellene presenterer T-celle-avhengige antigen til T-celler. MZ-B celler og B-1 B celler har begge viktige roller i dei T-celle-uavhengige antistoff-responsane (Allman et al., 2008). Desse cellene har derfor ein rolle mellom den medfødde og den adaptive immuniteten. Det er beskrevet ei rekke karakteristikkar for pattedyr sine B-1 B-celler som liknar på funksjonar ein ser hos B-cellene hos teleostar (Li et al., 2006). Dette inneberer mellom anna at dei har fagocytisk aktivitet, kan presentere antigen og uttrykker fleire ulike PRR. Vidare er det blitt påvist at ein stor del IgM<sup>+</sup> B-celler i regnbogeaure uttrykker CD5, som er ein spesifikk markør for B1a celler i pattedyr (Díaz-Rosales et al., 2019).

### 3.4.3 Utvikling og distribusjon av B-celler

Studiar på mus viser at beinmerg og milt er hovudområda kor IgM-sekrerande B-celler (plasmaceller) finst (Choi et al., 2012). Hos laks finn ein i hovudnyra umodne B-celler, B-celler med rearrangerte BCR (naive, modne B-celler), plasmaceller og plasmablastar (Zwollo et al., 2005). Naive, modne B-celler migrerer til område med infeksjon, som til dømes hovudnyre, bukhole eller milt, og blir aktiverte. Det er blitt vist at IgM<sup>+</sup> og IgT<sup>+</sup> B-celler migrerer til hjartet under infeksjon med SAV (Bakke et al., 2020). Ulikskapar i IgM<sup>+</sup> cellepopulasjonane som finst i ulike vev er ikkje tilstrekkeleg utforska hos fisk. Pax5 er ein B-cellespesifikk transkripsjonsfaktor som blir nedregulert gjennom modning av B-celler, på grunn av induksjon av transkripsjons-repressoren Blimp1 (B lymphocyte-induced maturation protein-1) som skifter uttrykkelsen av Ig frå membranbunden til sekret form (Lin et al., 2002). I sorterte IgM<sup>+</sup> celler i regnbogeaure er det blitt vist at nivået av transkripsjon av Pax5 er høgare enn det ein observerer av Blimp1, noko som foreslår at dei fleste IgM<sup>+</sup> celler er i ikkje-aktiverte stadium i naiv fisk (Abós et al., 2013). Frå qPCR-analysar av leukocyttar frå regnbogeaure er det vist at blod inneheld mest ikkje-aktiverte IgM<sup>+</sup> B-celler (Zwollo et al., 2008).

I sekundære immunorgan og andre områder med infeksjon støyter naive modne B-celler på antigen, gjennomgår ein modningsprosess og differensierer til plasmaceller. Dei kan skilje ut ei stor mengd frie antistoff som er spesifikke mot antigenet BCR møtte på (Ye et al., 2013). Frie antistoff kan blir transportert i blodet, og er med på å uskadeleggjere mikroorganismar og giftstoff. Plasmaceller kan migrere tilbake til hovudnyra og bli verande der som lengelevende

immunoglobulin-sekurerande plasmaceller (Zwollo et al., 2005). Dei plasmacellene som viser høg affinitet til antigenet går gjennom affinitetsmodning og hos pattedyr er det vist at dei kan differensiere til hukommelsesceller (Abbas et al., 2019). Dette er ikkje vist hos fisk.

Det er få studiar som har undersøkt om beinfisk har immunologisk minne. I eit forsøk med regnbogeaure vart fisk immunisert med TNP-KLH saman med ein adjuvant. Det vart då observert ein meir potent antistoffrespons i den sekundære immunresponsen samanlikna med den primære (Arkoosh et al., 1991). Dei fleste forsøk viser likevel at affinitetsmodning av IgM i serum etter immunisering er svak (Kaattari et al., 2002; Ye et al., 2011). Lengelevande plasmaceller kan holde seg i hovudnyra over lengre tid, kor dei opprettheld sekresjon av antistoff (Bromage et al., 2004). I tillegg kan antigen bli lagra i melanomakrofag-sentre i milten over lang tid, noko som gir dette området viktigeheit i immunologisk minne (Uribe et al., 2011).

Beinfisk manglar nokre eigenskapar i det adaptive immunforsvaret som ein veit er viktige i immunologiske prosessar hos pattedyr. Ei oversikt over desse er vist i tabell 4. Dei eigenskapane som er felles for pattedyr og beinfisk er som regel mindre utvikla hos beinfisk samanlikna med pattedyr.

**Tabell 4: Det adaptive immunforsvaret samanlikna mellom pattedyr og beinfisk.** AID=aktiveringsindusert deaminase, MHC=major histocompatibility complex. Grad av funksjon for eigenskap er vist med (+). Tabell frå (Sunyer, 2013).

Nøkkelement	Pattedyr	Beinfisk
Affinitetsmodning	+++	+
AID	Ja	Ja
CD28, CD40, CD80, CD86, ICOS	Ja	Ja
Geminale senter og lymfeknutar	Ja	Nei
Immunoglobulinar	IgM, IgG, IgA, IgD og IgE	IgM, IgD og IgT (IgZ)
Isotypeskifte	Ja	Nei
MHC klasse I og II	Ja	Ja
Milt, thymus og beinmerg	Ja	Ja (ikkje beinmerg)
Mucosa-assosierte lymfoide vev	Ja	Ja
Somatisk hypermutasjon	+++	++
TCR, CD4, CD8	Ja	Ja
T <sub>H</sub> 1, T <sub>H</sub> 2 og T <sub>H</sub> 17 cytokinar	Ja	Ja

#### 3.4.4 B-celler og medfødd immunitet

B-celler hos pattedyr uttrykker ulike TLRar (Rawlings et al., 2012). TLR på B-cellene gjer det mogleg for signal frå det medfødde immunsystemet å regulere det adaptive (Hua et al., 2013), då B-celle-responsen kan blir finjustert alt etter ligandbinding til TLR. I forsøk med sorterte IgM<sup>+</sup> B-celler frå hovudnyre, milt og perifert blod frå laks er det vist at desse uttrykker TLR8a1, TLR3, TLR22, TLR9 og TLR21 (Jenberie et al., 2018). Alle TLR som var undersøkt vart uttrykt av populasjonen av IgM<sup>+</sup> B-celler. TLR8a1 og TLR9 hadde det høgaste relative uttrykket, og vart sett i alle veva. TLR21 var lågast uttrykt, og samanlikna med TLR9 var det uttrykt 18, 9 og 23-gongar mindre samanlikna med TLR9 i IgM<sup>+</sup> B-celler frå høvesvis hovudnyre, perifert blod og milt. Då IgM<sup>+</sup> B-celler i kultur vart stimulert med CpG, økte sekresjon av IgM i B-celler isolert frå både hovudnyre og milt. Dette tyder på at CpG binder TLR på B-celler og direkte påverkar dei til å utvikle seg til ASC (Jenberie et al., 2018). Stimulering med CpG på sorterte IgM<sup>+</sup> celler er også testa hos regnbogeare. I dette forsøket blir det også sett ein oppgang av antal IgM-sekrerande celler, noko som indikerer at cellene differensierer til plasmaceller som respons på stimulering med CpG (Simón et al., 2019).

IFN $\alpha$ 1 blir regulert opp etter CpG-stimulering av IgM<sup>+</sup> B-celler frå hovudnyre, milt og blod, i tillegg til at det blir observert ei lita auke i IFN $\beta$  (Jenberie et al., 2018). Dette viser at IgM<sup>+</sup> B-celler hos laks har ein form for type 1 IFN-respons. Ved forsøk med VHSV i regnbogeare er det IgM<sup>+</sup> B-celler som er hovudtypen av leukocytar i bukhola etter injeksjon med viruset (Castro et al., 2017). I det forsøket differensierte B-celler til ASC lokalt som respons på viruset. I forsøk med VHSV på miltceller er det vist at VHSV går inn i IgM<sup>+</sup> B-celler og startar transkripsjon av virus. Denne interaksjonen induserer transkripsjon av Mx, type I IFN (IFN1) og kjemokinet CK5B i desse cellene. Indusering av IFN1 er avhengig av ein endosomal reseptor, truleg TLR3 (Abós et al., 2015). Dette viser at B-celler innehar ei viktig rolle i attkjenning av antigen og i starten av inflammatoriske responsar (Díaz-Rosales et al., 2019) og dermed er ein viktig kopling mellom den medfødde og adaptive immunresponsen i beinfisk.

## Problemstilling

B-celler har viktige roller i immunforsvaret til laks. Dei skil ut antistoff som nedkjempar infeksjonar og vernar verten mot sjukdom. Aktivering av B-celler skjer via binding av antigen til BCR. I tillegg kan andre faktorar, som binding til TLR og cytokinar, bidra i denne aktiveringa. Laks sine B-celler uttrykker ulike TLRar som kjenner att nukleinsyrer. *In vitro* stimulering av B-celler med CpG gir auka utskiljing av IgM, noko som foreslår at CpG kan indusere modning av B-celler til plasmaceller (Jenberie et al., 2018). Formålet med dette studiet er å undersøke om ulike TLR-ligandar og type I IFN verkar inn på talet av ASC i leukocyttpopulasjonar frå ulike vev hos laks *in vitro*.

### Hovudmål

Undersøke kva for indirekte og direkte effektar TLR-ligandar og cytokinar som til dømes type I-interferonar har på B-celler frå ulike vev i laks.

### Delmål

- a) Undersøke om ulike TLR-ligandar verkar inn på andelen antistoffsekrerende celler (ASC) i leukocyttpopulasjonar frå hovudnyre, milt, blod og bukhole hos laks.
- b) Bestemme optimal konsentrasjon av utvalde TLR-ligandar for stimulering av ASC-responsen.
- c) Undersøke om ulike subtypar av type I-interferon (IFN $\alpha$ 1 og IFN $\gamma$ ) verkar inn på andelen ASC i leukocyttpopulasjonar frå milt hos laks.
- d) Undersøke om type I-IFN og ulike TLR-ligandar verkar inn på genuttrykk av ulike immunoglobulinar i leukocyttpopulasjonar frå laks.

## 4 Material og metode

### 4.1 Forsøksfisk og organuttak

#### 4.1.1 Oversikt over organuttak

**Tabell 5: Oversikt over organuttak for dei ulike forsøka, kva analysar som vart nytta, antal fisk brukt, organ tatt ut, tidspunkt for uttak, varigheit av stimulering og kva for undersøking som vart gjort. (\*)= ingen resultat, grunna feil med ELISpot eller ekskludering av resultat. HN = hovudnyre, MI = milt, BL = perifert blod, BC = bukceller.**

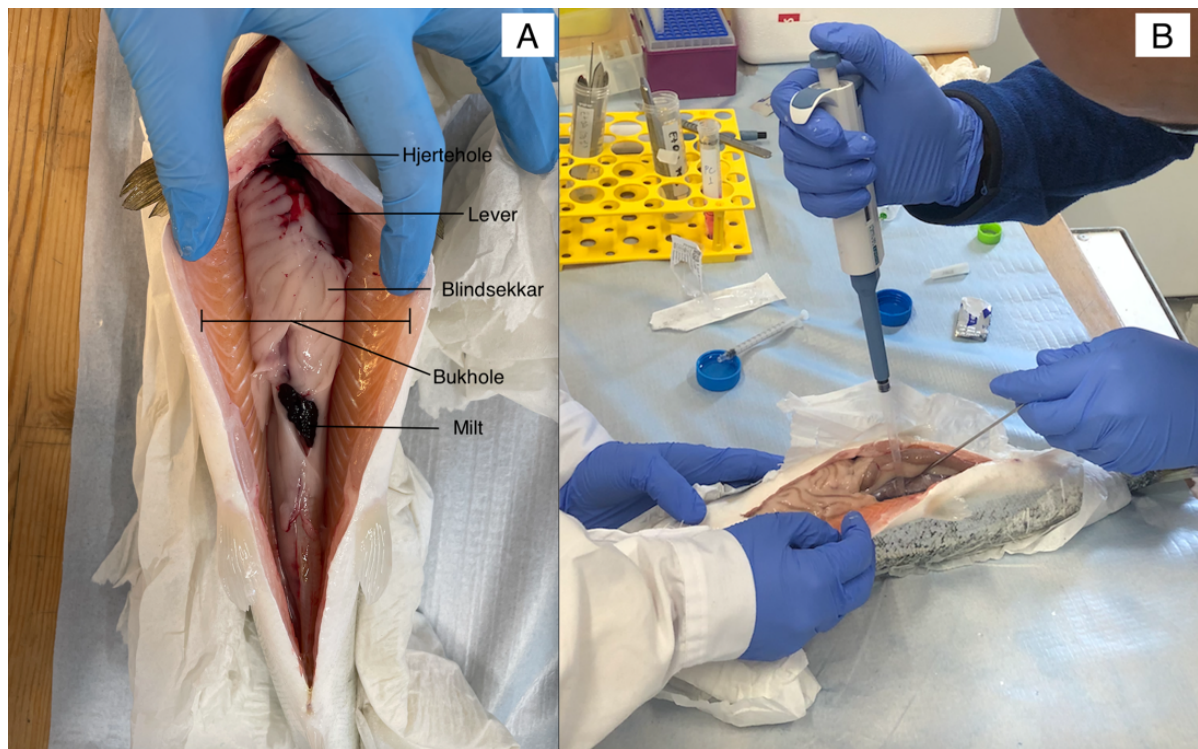
Analyse	Antal fisk per uttak	Organ	Uttakstidspunkt	Tidspunkt for hausting etter stimulering	Undersøking
Antal IgM-sekurerande celler ved stimulering med LPS, CpG, imiquimod og poly I:C	4	HN, MI, BL, BC	23. april 2021*	3d, 6d	ELISpot  For uttaka 23. april*, 28. sept.* og 2. nov. vart det køyrd qPCR-målingar på ELF, TNF, Mx og IFNa1
			7. sept. 2021*	RNA hausta etter 24t stimulering	
			28. sept. 2021		
			2. nov. 2021		
Konsentrasjonskurveforsøk med ulike konsentrasjonar av CpG, Poly I:C og Imiquimod	4	HN, MI	22. okt. 2021	3d	ELISpot
Antal IgM-sekurerande celler ved stimulering med IFNa1, IFNc, CpG og LPS	4	MI	22. nov. 2021	3d, 6d	ELISpot
		HN, MI	20. jan. 2022*	3d, 6d	
		HN, MI, BL, BC	1. mars. 2022*	3d, 6d	
Effekt av LPS på sorterte IgM <sup>+</sup> B-celler	4	MI	7. des. 2021	12t	ELISpot
Effekt av LPS og CpG på sorterte IgM <sup>+</sup> B-celler	4	MI	4. jan. 2022*	12t	RT-qPCR
Effekt av stimulering med LPS, CpG, Imiquimod, Poly I:C, nCpG, IFNa1 og IFNc på leukocyttar	4	HN, MI, BL, BC	7. feb. 2022* 22. feb. 2022*	24t, 72t	RT-qPCR, målt på: ELF, mIgM, sIgM, IgD, IgT, Mx
	3	HN, MI, BL	16. mars 2022	24t, 48t	
	3	HN, BL	04. april 2022*	24t, 48t	

### 4.1.2 Forsøksfisk

Fisk brukt i arbeidet med oppgåva vart levert av Havbruksstasjonen i Tromsø i Kårvika og er ikkje vaksinert. Arten var atlantisk laks (*Salmo salar*). Rogna vart levert av AquaGen, med stammenamn Aqua gen Atlantic QTL-innOva PRIME. Fisken har vore infisert med *Clavochlamydia salmonicola*, ein gjellebakterie, omtala i vedlegg 3. Denne bakterien forsvinn etter nokre veker i sjøvatn og har ikkje påverka fisken ved dødelegheit eller andre problem (personleg komm., Jan Erik Jensen). Fisken har hatt god tilvekst gjennom heile produksjonssyklusen. Det er blitt brukt fôr frå Skretting av typen Nutra Olympic 3,0 mm. Fôringsregimet vart sett opp etter veksttabellar og anbefalingar frå produsenten. Fisken hadde gått i kar med sjøvatn med naturleg temperatur gjennom heile perioden prøveuttaket gjekk føre seg. Gjennom forsøksperioden har fisken hatt ei vekt på mellom 500 og 1600 g.

### 4.1.3 Organuttak

Fisken vart teken livet av med slag mot hovudet, vegd og plassert på merka underlag. Det vart tatt ut blodprøve med stikkpunkt like bak gattfinna ved hjelp av 0,8x25 mm BD Vacutainer® PrecisionGlide™ nåler, hylster og BD Vacutainer® oppsamlingsrør med litium og heparin. Blodet vart overført til nummererte 50 ml rør som inneheldt 10 ml transportmedium (tabell 6). Buken vart opna med ein steril skalpell og det vart tilsett vaskebuffer (PBS tilsett 4 µl heparin/ml med 2% FBS (Gibco®) i tre omgangar. Celler vart vaska ut ved å gni ei steril podenål forsiktig på bukveggen og rundt organa (figur 7B). Deretter vart 2,5 ml av væska med celler henta ut med pipette og overført til 50 ml rør som inneheldt 5 ml transportmedium. Milten og hovudnyra vart tatt ut med steril skalpell og pinsett (figur 7A) og overført til 50 ml rør med 10 ml transportmedium. Alle vevsprøvene vart oppbevarte kjøleg på is etter uttaket.



**Figur 7: Organuttak frå laks. (A)** Plassering av organ i bukhole. **(B)** Vasking med vaskebuffer og podenål for å hauste celler frå bukhole. Vaskebufferen vart tilsett i fleire omgangar og podenåla gnidd forsiktig på bukveggen og organa i bukhole.

## 4.2 Isolering og teljing av leukocytter frå atlantisk laks

Isoleringa av leukocytter frå milt, hovudnyre, blod og bukhole vart gjort ved bruk av perkoll-gradientar av ulik konsentrasjon (Jenberie et al., 2020). Denne metoden gjer det mogleg å for eksempel skilje celler, virus og proteinpartiklar frå kvarandre basert på deira spesifikke tettheiter. Når ein tilsett ulike konsentrasjonar av perkoll til same rør, blir det danna gradientar av tettheit på grunn av kolloidale silica-partiklar som perkollane er bygd opp av. I denne oppgåva vart det nytta 25% og 54%-gradientar til isolering av leukocytter (figur 8A). Når røra vert sentrifugert, vil leukocyttane bli samla i sjiktet mellom dei to gradientane og kan dermed lett bli observert og tatt ut. Restar frå celler og vev blir skilt frå leukocyttane og vert liggande over 25%-perkollen. For blodprøvene nyttast berre 54%-perkoll, då blodet blir overført til perkollen saman med transportmedium. Leukocyttane frå blod vil under sentrifugeringa legge seg mellom transportmediet og 54%-perkollen (figur 8B). Tabell 6 viser blandingsforhold ved tillaging av perkoll og transportmedium.

**Tabell 6: Blandingsforhold for tilaging av perkoll og transportmedium.**

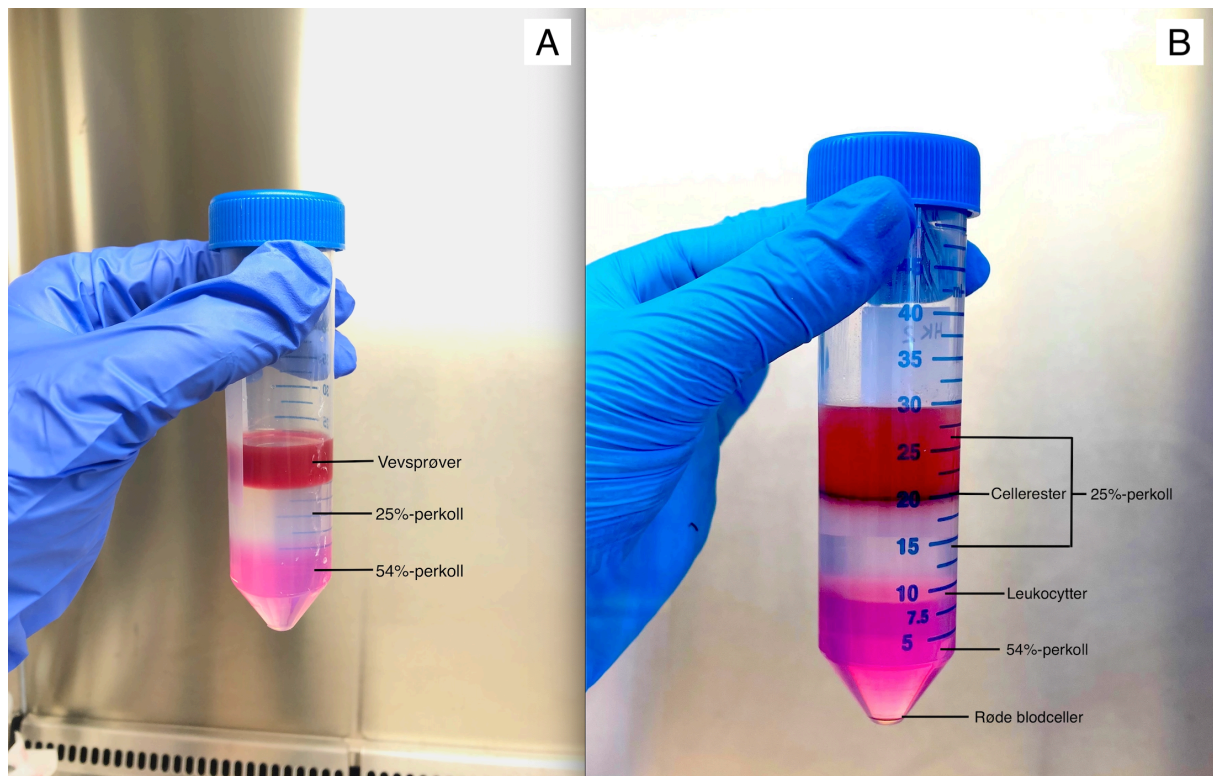
Løysing	Komponentar
L-15 med FBS og heparin (Transportmedium)	98 ml L-15 (tilsett 100 µg ml <sup>-1</sup> streptomycin og penicillin)  2 ml FBS  0,4 ml 5000 IE/a.e./ml heparin
90% Perkoll	90 ml Perkoll-utgangsløysing  10 ml (3 ml 5M NaCl + 7 ml ultra pure H <sub>2</sub> O)  0,4 ml heparin 5000 IE/a.e./ml heparin
54% Perkoll	59 ml 90% Perkoll  41 ml L-15 m/ FBS og heparin
25% Perkoll	28 ml 90% Perkoll  72 ml PBS  0,288 ml heparin

#### **4.2.1 Isolering av leukocytter frå milt, hovudnyre, blod og bukhole**

Isoleringa av leukocytter vart gjennomført i sterilbenk for å unngå kontaminering. Ein 100 µm porestørrelse cellestrainer (Falcon) vart skylt med litt transportmedium, før vevsprøva vart plassert på cellestraineren. Prøvene vart homogenisert ved å bli pressa gjennom cellestraineren ved hjelp av eit sprøytetempel og tilførsel av transportmedium, ned i eit 50 ml rør. Dei homogeniserte prøvene vart overført til perkoll-gradientane. Cellene frå bukholå og blodet vart direkte overført til gradientane, då dei ikkje krev homogenisering. Sentrifugering av røyra vart gjort ved 400 g på 4°C i 40 minutt. Etter sentrifugering låg leukocyttane som eit synleg celleband mellom 25% og 54%-sjikta (figur 8B).

Cellebandet vart overført til nye rør med plastpipetter og laust opp i ca. 2,5x volum vedlikehaldsmedium. Deretter vart cellene sentrifugert på nytt i 10 minutt ved 400 g og 4°C. Cellemediet vart så sugen av til det berre var cellepelleten igjen i røret. Celleprøvene vart fortynna med ulike volum av L-15, avhengig av mengde leukocytter det er vanleg å finne i dei ulike veva. Hovudnyre inneheld vanlegvis fleire leukocytter enn milt, blod og bukceller.





**Figur 8:** (A) Ferdig perkoll før sentrifugering. (B) Perkoll-gradient etter sentrifugering.

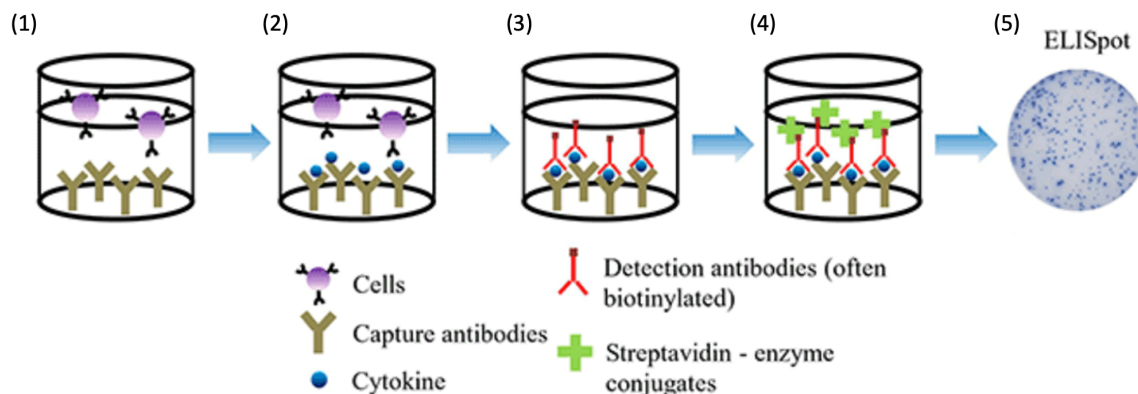
#### 4.2.2 Teljing av isolerte celler

Cellene vart talde med maskina Countess 11 FL. Ti  $\mu\text{L}$  trypanblått vart overført til ein Eppendorf-rør saman med 10  $\mu\text{L}$  av den fortynta celleprøva. Dette vart blanda godt saman og 10  $\mu\text{L}$  av dette overført til eit tellekammer, som vart sett i maskina. Maskina rekna ut talet celler per ml i prøva, og ein kan med dette talet rekne seg fram til den totale talet på leukocytter i prøva. Prøvene vart sentrifugert og tilført mengd L-15 + 5% FBS som gav ein konsentrasjon på 10 millionar celler/ml.

### 4.3 Måling av IgM-sekrerande B-celler

#### 4.3.1 Kvantitering av ASCs ved ELISpot-analyse

Enzym-linket immunosorbent spot (ELISpot) er ein kvantitativ metode som blir nytta for å undersøke immunceller hos dyr og menneske. Metoden vart i utgangspunktet utvikla for å detektere og kvantitere talet spesifikke antistoffsekrerande celler (Czerkinsky et al., 1983), som ved denne teknikken kunne binde til antigen festa til membranen på ELISpot-plata. I vidare utvikling av teknikken vart membranen dekt med antistoff, ikkje lenger antigen, og kunne dermed fange antigen (for eksempel cytokin) som blir frigitt frå celler i suspensjonen (Kalyuzhny, 2005).



**Figur 9: Metode ELISpot-assay.** (1) Membranen blir dekt med antistoff som binder IgM frå laks og leukocytter blir tilsett. (2) Stoff produsert av ASC, i dette tilfellet IgM, binder til anti-IgM på membranen. (3) Cellene blir fjerna ved vasking og eit biotinylert antistoff spesifikt for IgM binder til komplekset av IgM-antistoff på membranen. (4) Antistoff som ikkje er bunden blir vaska bort før enzymet streptavidin-HRP-konjugat tilsettast og binder til biotin. TMB-substrat blir tilsett og binder til komplekset. Enzymet startar ein reaksjon som gir fargeendring. (5) Ein synleg prikk på membranen representerer ein ASC. Figur henta frå (ThermoFisher, 2022).

Figur 9 viser eit oversiktsbilete av ELISpot-metoden. Antistoff spesifikke for IgM (monoklonale antistoff (mAb)) vert sett på membranen. Når leukocytter blir sådd ut i brønnen vil IgM produsert av celler binde til dei monoklonale antistoffa på membranen. Plata blir vaska og eit biotinylert antistoff spesifikt for IgM (anti-IgM) blir tilsett og binder til komplekset av antistoff og IgM på membranen. Det blir så tilsett eit enzym kobla til streptavidin som binder til det biotinylerte antistoffet. Til slutt blir det tilsett eit substrat som blir omdanna av enzymet til farge. Heile prosessen resulterer i synlege prikkar på membranen der kor substratet har blitt katalysert. På denne måten representerer ein prikk ei ASC (Ranieri et al., 2014). Før bruk av det monoklonale antistoffet må det bli reinsa (purification). Antistoffet som nyttast til deteksjon må også bli biotinylert før bruk. Begge desse prosessane vart utført av Shiferaw Jenberie etter protokoll frå produsent av kit for reinsing og biotinylering (Thermo-Scientific, 2010).

#### 4.3.1.1 Beskriving av *in vitro* forsøk

Ein innleiande konsentrasjonsstudie vart gjennomført for å betre kunnskapen om kva for konsentrasjon av dei ulike stimulantane som gir størst ASC-respons. Stimulantane som vart undersøkt var klasse B CpG oligonukleotid (ODN 2006) med basesekvens T\*CG T\*CG T\*TT T\*GT C\*GT T\*TT G\*TC G\*T\*T, poly I:C og imiquimod. Det er B-klasse CpG som aktiverer B-celler (Vollmer et al., 2004). nonCpG som nyttast som kontroll, er identisk til CpG, men CG-sekvensar er inverterte til GC. Det vart tatt ut hovudnyre og milt frå tre fisk. Leukocytane vart isolert og talt som beskrive tidlegare, og stimulerte i 96-brønnersplater med tre ulike konsentrasjonar av CpG, poly I:C og imiquimod, som vist i tabell 7. Etter

stimulering i 72 timar vart cellene hausta ved å pipettere cellesuspensjonen i brønnane opp og ned fleire gonger, for så å overføre dette til sterile Eppendorf-rør. For å sikre fullstendig hausting av cellene, vart det tilsett 100 µl av L-15 med 5% FBS til brønnane. Dette vart igjen pipettert og overført til brønnen sitt respektive Eppendorf-rør. Røra vart sentrifugert ved 500g i 5 minutt, før supernatanten vart fjerna. Pelleten vart resuspendert i 500 µl L-15 med 5% FBS. Cellene vart talde som beskrive i 4.2.2. og 50 000 celler vart sådd ut på ELISpot-plater for talfesting av IgM<sup>+</sup> ASC.

**Tabell 7: Stimulering av celler med ulike konsentrasjonar av TLR-ligandar i 96-brønnerplate.**

	Ktrl	CpG 1 µM	CpG 2 µM	CpG 5 µM	Poly I:C 1 µg/ml	Poly I:C 5 µg/ml	Poly I:C 10 µg/ml	Imiquimod 1 µg/ml	Imiquimod 5 µg/ml	Imiquimod 10 µg/ml
<b>A</b>	HK1	HK1	HK1	HK1	HK1	HK1	HK1	HK1	HK1	HK1
<b>B</b>	HK2	HK2	HK2	HK2	HK2	HK2	HK2	HK2	HK2	HK2
<b>C</b>	HK3	HK3	HK3	HK3	HK3	HK3	HK3	HK3	HK3	HK3
<b>D</b>	SP1	SP1	SP1	SP1	SP1	SP1	SP1	SP1	SP1	SP1
<b>E</b>	SP2	SP2	SP2	SP2	SP2	SP2	SP2	SP2	SP2	SP2
<b>F</b>	SP3	SP3	SP3	SP3	SP3	SP3	SP3	SP3	SP3	SP3

### 4.3.2 Gjennomføring av ELISpot

I denne oppgåva vart ELISpot-assay nytta for å måle talet på IgM-sekrerande celler frå ulike vev hos atlantisk laks (Jenberie et al., 2020). Til analysa vart det nytta ei MSIPS4510-plate (Merck Millipore) med immobilon-PDVF membran. Den vart aktivert ved å tilsetje 15 µl 35% etanol (99,8% etanol (Sigma-Aldrich) fortynna i ultrapure H<sub>2</sub>O) i kvar brønn i maksimalt eitt minutt og minimum fem sekund. Plata vart tømd og vaska grundig. Dei første vasken vart gjennomført med 200 µl milli-Q H<sub>2</sub>O, medan dei tre siste vart gjort med 200 µl steril phosphate-buffered saline (PBS). Membranen vart dekt med 100 µl anti-ørret IgM/mAb [F1-18 antistoff (6-1-18)] (Hedfors et al., 2012), fortynna i PBS til 1,5 µg/brønn og inkubert ved 4°C over natta.

Etter fire vaskar med PBS vart plata blokkert i 90 minutt ved romtemperatur med L-15 med penicillin og streptomycin tilsett 2% bovine serum albumin (BSA) (Sigma). Etter fire vaskar vart 50 000 celler frå cellesuspensjonane sådd ut i to parallelle brønner saman med 100 µl L-15 (tilsett penicillin og streptomycin og 5% FBS). I forsøka der stimulantar var i bruk, nytta ein 100 µl av stimulant-suspensjonen i dette steget. Platene vart deretter inkubert ved 15°C i 48 timar før dei vart vaska fem gonger med PBS som inneheldt 0,1% Tween 20 (vaskebuffer) for å vaske vekk attverande celler og ubunden IgM. Deretter vart 1,5 µg/ml biotinylert reinsa

anti-ørret IgM mAb [F1-18 antistoff (6-1-18)] tilsett og inkubert i 90 minutt ved romtemperatur. Platene vart så vaska to gonger med PBS og to gonger med PBS tilsett 0,1% Tween 20. Platene vart inkubert i romtemperatur i éin time med streptavidin-HRP (horseradish peroxidase) (1:500) (Mabtech). Ubunden kompleks vart vaska vekk før 100 µl filtrert Tetramethylbenzidine (TMB)-substrat (Mabtech) vart tilsett i kvar brønn i 10 minutt, medan platene stod mørkt i romtemperatur. Platene vart deretter vaska grundig med vatn og tørka i kjøleskap over natta. Brønner utan celler (NCC) og detection biotinylated antibody (DBA) vart inkludert i forsøket som kontrollar på kvar plate. NCC-kontrollen inneheld alt i beskrive i prosedyren, unntatt cellesuspensjon. DBA-kontrollen inneheld celler, men ikkje det biotinylerte antistoffet. Ved bruk av ImmunoSpot image acquisition software vart platene avlesne digitalt. Talet på «prikkar» vart bestemt automatisk ved hjelp av C.T.L programvare. Kvar prikk representerer ein IgM ASC.

## 4.4 Antal IgM<sup>+</sup> ASC frå laks etter stimulering med ulike TLR-ligandar og interferon

### 4.4.1 Stimulering av leukocytter med TLR-ligandar og interferonar

Stimulantane vart blanda til planlagde konsentrasjonar saman med L-15 og FBS, vist i tabell 8. Hundre µl av kvar stimulant i dobbelt av ønska konsentrasjon vart tilsett i ei 96-brønners plate. Deretter vart det sådd ut 100 µl cellesuspensjon til den respektive, merka brønner. Platene vart inkuberte ved 15°C fram til framkalling.

**Tabell 8: Utrekning av planlagde konsentrasjonar av stimulantar (etter gjennomføring av konsentrasjonsforsøk beskrive i 4.3.1.1).** (\*)=Før konsentrasjonskurveforsøket var konsentrasjonen 5 µg/ml. (\*\*)=Før konsentrasjonsforsøket var konsentrasjonen 10 µg/ml. u=units.

STIMULANT	ENDELEG KONSENTRASJON	2X ENDELEG KONSENTRASJON	KONSENTRASJON STOCK-LØYSING
LPS	50 µg/mL	100 µg/mL	1 mg/ml
CpG	2 µM	4 µM	400µM
Imiquimod	1 µg/ml*	2 µg/ml	1 mg/ml
Poly I:C	1 µg/ml**	2 µg/ml	1,5 mg/ml
nCpG	2 µM	4 µM	400µM
IFNα1	1000 u/ml	2000 u/ml	1,2×10 <sup>6</sup> u/ml
IFNγ	1000 u/ml	2000 u/ml	2,6×10 <sup>6</sup> u/ml

## 4.5 RT-qPCR

Real-time kvantitativ polymerase kjedereaksjon (RT-qPCR) er ein metode som blir brukt for å måle uttrykket av utvalde gen celler eller i vev, kor ein spesifikk DNA-sekvens i materialet blir oppformert og samstundes kvantifisert. Metoden er har høg sensitivitet og spesifisitet. DNA, i form av komplementært DNA (cDNA), blir nytta som templat i metoden. I dette forsøket er det utført RT-qPCR på materiale frå *in vitro* eksperiment med lakseleukocyttar. For å lage cDNA frå materialet, må det først bli isolert RNA. Deretter blir RNA omdanna til cDNA i cDNA-syntesen.

### 4.5.1 Ekstraksjon og isolering av totalt RNA

Celler til bruk i RT-qPCR vart sådd ut i 24 eller 96-brønnarsbrett. Stimulantane vart tilsett i konsentrasjonar som vist i tabell 8. Det vart sådd ut 250 µl av stimulantløysinga og 250 µl av cellesuspensjonen. Dette vart så inkubert i 48 timar ved 15°C. Settet RNeasy® Mini kit (Qiagen) var nytta til ekstraksjon og isolering av totalt RNA. Protokollen beskriven i settet var følgd ved utføring av metoden.

Brønnane med leukocyttar inneheld både adherente og non-adherente celler og cellene var hausta for å få med begge desse populasjonane. To ulike metodar vart brukt for å hauste cellene i ulike forsøk:

- Sentrifugering av plata i 5 minutt ved 500 g. Mediet vart sugen av og det vart tilsett 500 µl PBS til kvar brønn. Plata blei sentrifugert og mediet sugen av ein gong til. 350 µl RLT-buffer med 20 µl 2M/ml DTT (dithiothreitol) vart overført til kvar brønn og blanda godt med pipettering for å lausne og lysere cellene. Bufferen denaturerer også RNasar og hindrar at RNA degraderer. Alt innhaldet i brønnen vart overført til Eppendorf-rør.
- Mediet i brønnane vart overført til Eppendorf-rør og sentrifugert i 5 minutt ved 500 g. Lysisbuffer (350 µl RLT-buffer med 20 µl 2M/ml DTT) vart tilsett direkte i kvar brønn. Cellemediet vart fjerna frå eppendorf-røra. Lysisbufferen frå brønnane vart overført til eppendorf-røyra og blanda godt.

Prøvene vart lagra ved -80°C til RNA skulle isolerast. Ved isolering av RNA blir cellesuspensjonen køyrd gjennom ein selektiv silicamembran i RNeasy Mini spinkolonne. Den binder berre RNA som er lengre enn 200 basepar, mens kontaminantar og RNA under 200 basepar blir fjerna. Prøvene vart tint i romtemperatur og tilsett 1 volum etanol (70%).

Etanol gjer bindinga mellom RNA og silicamembranen sterkare før overføring til ei RNeasy Mini spin-kolonne. Suspensjonen vart sentrifugert gjennom kolonna og tilsett 700 µl RW1-buffer (Qiagen) som effektivt fjernar biomolekyl som ikkje er spesifikt bunden til silicamembranen, som til dømes karbohydrat, protein og feittsyrer. Cellene vart sentrifugert på nytt og tilsett 500 µl RPE-buffer i to omgangar. RPE-bufferen er ein mild vaskebuffer som fjernar saltar som kan ligge i kolonna etter bufferar nytta tidlegare i protokollen. RNA vart eluert frå membranen ved å tilføre 30 µl RNase-fritt H<sub>2</sub>O. Konsentrasjon av RNA og reinheit av prøvene vart målt i eit Nanodrop® spektrofotometer ND-1000 (Thermo Fisher Scientific). Spektrofotometret målar absorpsjonen til løysinga ved 260 nm bølgelengd, som er absorbansmaksimum for nukleinsyrer. Dette talet nyttast for å bestemme konsentrasjonen av RNA (ng/µl) i løysinga. I tillegg blir absorpsjon målt ved 280 nm. Forholdet mellom 260 og 280 nm bølgelengd blir nytta til å bestemme reinheita av RNA. Eit forhold større eller lik 1,8 blir rekna som eit akseptabelt resultat (QIAGEN®, 2019). Dersom forholdet mellom absorbans ved dei to bølgelengdene er lågare enn 1,8, kan det indikere at prøvene er kontaminerte med andre stoff som absorberer lys ved 280 nm. Dette kan vere stoff frå isoleringa som ikkje er fjerna tilstrekkeleg eller andre kontaminantar.

#### **4.5.2 cDNA-syntese**

For å kunne nytte PCR som analysemetode, må ein ha DNA til bruk som templat. Dette blir syntetisert som komplementært DNA (cDNA) frå isolert RNA. Settet Quantitect Reverse Transcriptase® (Qiagen) vart brukt i denne prosedyra. Degradering av RNA vart motverka ved å arbeide med prøvene på is. I det første steget av prosedyren vart genomisk DNA fjerna frå RNA-prøvene ved bruk av ein gDNA wipeout buffer. I neste steg vart RNA blanda med enzymet revers transkriptase, nukleotidar og primersekvensar. Revers transkriptase vil binde til oligonukleotidar på RNA og syntetisere ein DNA-tråd som er komplementær til RNA-tråden. Bunden mRNA degraderast. Stega i prosedyren blir initiert ved ulike temperaturar. Mengda av ulike reagensar brukt er oppført i tabell 9.

ThermalCycler 2720 (Applied biosystems) vart brukt for å kontrollere temperaturen under inkuberingane. Prøvene med isolert RNA vart fortynta med RNase-fritt vatn slik at alle prøvene hadde same konsentrasjon. Tabell 9 viser kva mengd av RNA, gDNA og vatn som vart tilsett i kvar cDNA-reaksjon. Dette vart blanda saman i røyr og sentrifugert, og inkubert ved 42°C i 2 minutt. Deretter vart det nedkjølt til 4°C. Quantiscript Revers Transcriptase, Quantiscript RT-buffer og RT primer mix vart tilsett i kvart rør (tabell 9). Prøvene vart blanda

og sentrifugert, før dei vart inkubert i 42°C i 15 minutt og 95°C i 3 minutt. Det siste steget inaktiverer transkriptasen. Prøvene vart deretter avkjølt til 4°C. cDNA vart fortynna 1:5 og lagra ved -80°C.

**Tabell 9: Mengd av ulike reagensar brukt i syntese av cDNA.**

Reagensar	Volum
RNA + H <sub>2</sub> O	12 µl (10 µl RNA-prøve + 2 µl H <sub>2</sub> O)
gDNA Wipeout buffer 7x	2 µl
Quantiscript RT-buffer 5x	4 µl
RT primer mix	1 µl
Quantiscript Revers Transkriptase	1 µl
<b>Totalt volum</b>	<b>20 µl</b>

### 4.5.3 Kvantitativ RT-qPCR

Fargestoffet SYBR® Green vart nytta i metoden. Når SYBR® Green blir lagt til i prøva, vil det umiddelbart binde til all dobbeltrådig DNA i prøva og gi fluorescens. Etersom mengda dobbeltråda DNA doblar seg for kvar PCR-syklus, vil fluorescensen auke. Dei spesifikke primerane sørger for at det berre er cDNA-templatet som dei er spesifikke for, som blir kopiert opp og fordoblast i ein eksponentiell fase. Cycle threshold (Ct) uttrykker talet syklusar som blir gjennomført etter at fluorescens-signalet når terskelverdien for amplifisering (Life-Technologies, 2012). Ct-verdien er invers relatert til mengda cDNA i prøva som analyserast. Det blir nytta eit referansegen som målgenet blir normalisert mot. Dette er mogleg fordi referansegenet skal ha stabilt uttrykk uansett behandling. Elongeringsfaktor 1 (EF1ab) er eit veileigna referansegen ved undersøking av genuttrykk i atlantisk laks (Løvoll et al., 2011; Olsvik et al., 2005) og vart derfor brukt her.

Tabell 10 viser blandingsforholdet ved tillaging av mastermix. Ti µl mastermix og 5 µl cDNA (fortynna 1:5) vart overført til den respektive brønnen, i duplikat. Det vart sett opp to negative cDNA-kontrollar, utan tilsett revers transkriptase enzym. Dette for å sikre at prøvene ikkje var kontaminert med genomisk DNA. To vatnprøver utan cDNA vart satt opp for å utelukke kontaminering med DNA i reagensane brukt i forsøket. Det vart også sett opp ein internkontroll. Prøvene vart analysert med 7500 Fast Real-Time PCR-system (Applied Biosystems).

**Tabell 10: Mengd av ulike reagensar brukt i RT-qPCR.**

Reagensar	Mengd ( $\mu$ l)
<b>SYBR® Green</b>	7,5
<b>Forward primer (5 <math>\mu</math>M)</b>	0,8
<b>Revers primer (5 <math>\mu</math>M)</b>	0,8
<b>H<sub>2</sub>O</b>	1
<b>cDNA-templat</b>	5
<b>Volum</b>	~15

Dei ulike stega i ein syklus av real time PCR blir styrt av temperaturen og er delt inn i tre: denaturering, hybridisering og polymerisering (tabell 11). Ved første denaturering aukar temperaturen til 95°C i 20 sekund for å aktivere AmpliTaq Gold® DNA polymerase. Ved andre denaturering blir dsDNA splitta til enkelttrådig DNA (ssDNA) på tre sekund. Temperaturen senkast så til 60°C i 30 sekunder. Då vil hybridiseringa skje, der forward- og revers-primerar binder seg til dei riktige sekvensane på ssDNA-trådane. Deretter syntetiserer DNA-polymerase danninga av to nye dsDNA-trådar frå to ssDNA-trådar ved å kople saman nukleotidar og primerar. I våre forsøket vart reaksjonen utført med 40 syklusar.

For å vere sikre på at prøvene ikkje er kontaminerte eller har DNA-mutasjonar, vart det laga ein smeltekurve etter den siste syklusen i alle qPCR-køyringane. SYBR® Green binder uspesifikt til all dsDNA. Dette gjeld og primer-dimer, kontaminerande gDNA og ikkje-spesifikke PCR-produkt ved feil sekvensbinding mellom primerar og DNA. For å lage ei smeltekurve aukar ein temperaturen sakte og registrerer reduksjonen i fluorescens for å finne ut om reaksjonen har produsert eitt eller fleire produkt, fordi større PCR-produkt har høgare smeltepunkt enn mindre. Dersom det blir produsert fleire toppar i smeltekurva, er det fleire produkt i til stades i reaksjonen. For kvar qPCR-køyring vart smeltekurvane undersøkt.



**Tabell 11: Program for RT-qPCR ved bruk av SYBR® Green.**

Steg	Temperatur (°C)	Varighet (sekund)	Antal syklusar
Denaturering	95	20	Hold fase
Denaturering	95	3	40
Hybridisering og polymerisering	60	30	40

For å stadfeste effektiviteten til primerane brukt i RT-qPCR vart det laga ein 2-fold fortyningsserie av cDNA. Der vart sju fortyningar av cDNA testa for primerane til gena vi skulle bruke i RT-qPCR. Stigningstalet til kurva som vart danna ved standard kurve-analyse i RT-qPCR gav eit stigningstal som vart nytta i følgende formel:

$$\text{Effektivitet av primer} = 10\left(-\frac{1}{\text{stigningstal}}\right)$$

(Pfaffl, 2001). Vi brukte stigningstalet frå standardkurva i Thermo Fischer sin eigen primer-effektivitets-kalkulator som gav oss amplifikasjonseffektiviteten til PCR-reaksjonen basert på stigningstalet av standardkurva (ThermoFisher Scientific, 2022). Primersekvensar og -effektivitet er vist i tabell 12.

**Tabell 12: Primersekvensar for gen brukt i RT-qPCR og tilhøyrande genbanknummer. Fw = forward primer, Rev = reverse primer.**

<b>Gen</b>	<b>Sekvens</b>	<b>Genbanknummer</b>	<b>Primereffektivitet</b>
<b>ELF1aB</b>	Fw: TGCCCCTCCAGGATGTCTAC	BG933897	2,18
	Rev: CACGGCCACAGGTAAGT	BG933853	
<b>mIgM</b>	Fw: CCTACAAGAGGGAGACCGA	S48658	2,07
	Rev: GATGAAGGTGAAGGCTGTTTT		
<b>sIgM</b>	Fw: CTACAAGAGGGAGACCGGA	BT060420	2,09
	Rev: AGGGTCACCGTATTATCACTAGTTT		
<b>IgT</b>	Fw: CAACACTGACTGGAACAACAAGGT	HQ379938.1	2,06
	Rev: CGTCAGCGGTTCTGTTTTGGA		
<b>IgD</b>	Fw: GTGTCTGCAGCAGCCTATGA	AF278717.1	2,08
	Rev: GTGAAGTCCTTCCCCTGGTT		
<b>Mx1</b>	Fw: GATGCTGCACCTCAAGTCCTATTA	U66475	2,00
	Rev: CGGATCACCATGGGAATCTGA		
<b>IFN<math>\alpha</math>1</b>	Fw: CCTTTCCCTGCTGGACCA	XM-014187640.1	2,02
	Rev: TGTCTGTAAAGGGATGTTGGGAAAA		
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	Fw: TGCTGGCAATGCAAAAGTAG	AY848945.1	1,97
	Rev: AGCCTGGCTGTAAACGAAGA		

## 4.6 Sorterte B-celler

### 4.6.1 Fluorescent activated cell sorting (FACS)

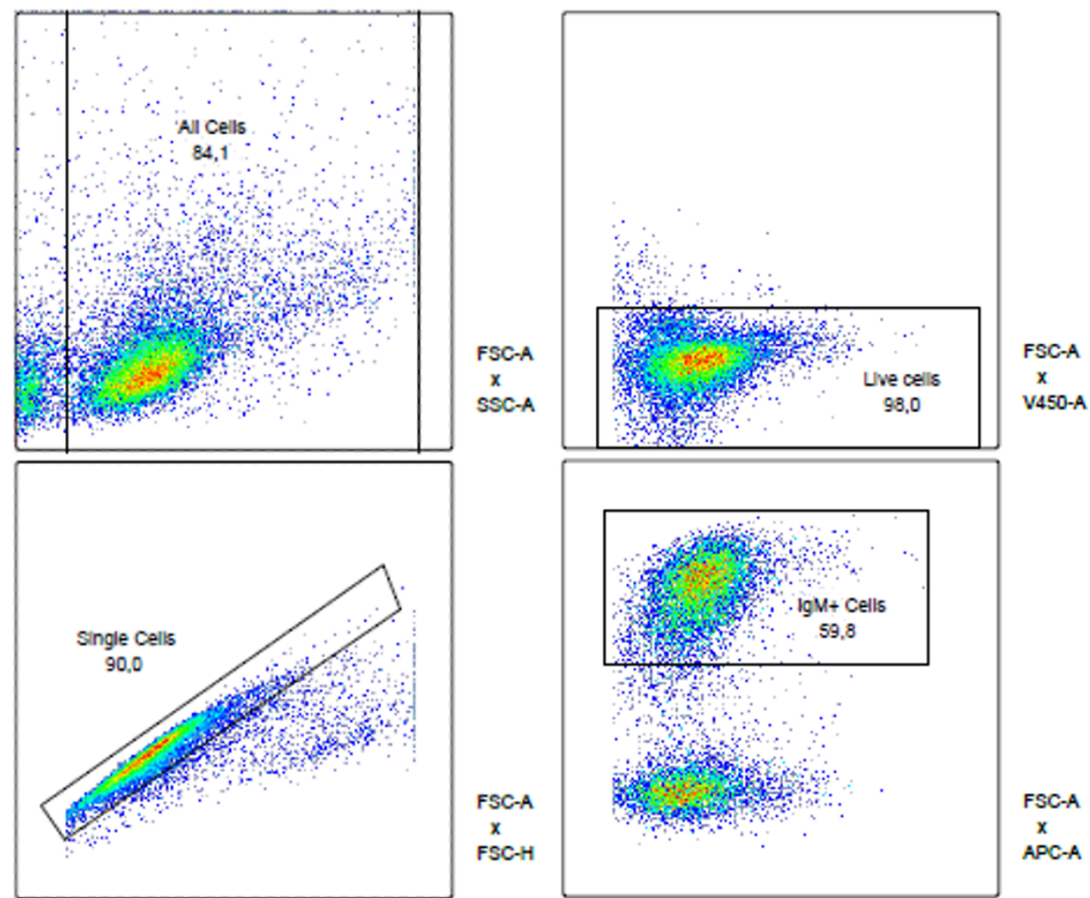
Fluorescent activated cell sorting (FACS) er ein metode som gjer det mogleg å sortere ut celler med eit bestemt protein på overflata frå ein cellekultur eller eit vev, ved hjelp av fluoriserande merking. Det blir på førehand produsert eit antistoff som er spesifikt for målproteinet. Antistoffet sin Fc-del blir så merka med eit fluoriserande molekyl. Ved å lage eit antistoff med ei spesifikk farge som binder til eit spesifikt protein, kan maskinen finne eit protein i ein miks av celler og med dette sortere ut cellene som har dette proteinet på overflata. I dette forsøket skulle IgM<sup>+</sup> B-celler blir sortert ut frå den totale leukocyttpopulasjonen. I protokollen som vart brukt her var anti IgM på førehand blitt merka med Alexa 647 som fluoriserande markør. I tillegg vart cellene merka med ein fluoriserande markør som merker døde celler (FVD 450). På dette viset vart det mogleg og også sortere ut dei døde cellene. Behandling av cellene før sortering og sorteringa vart gjennomført av Shiferaw Jenberie.

For å kunne sortere cellene i ulike typar nyttast instrumentet BD FACS Aria III flow cytometer (BD Biosciences). Dei ulike celletypane må først bli satt som «eventer» i systemet i maksina. Cellene som skal bli sortert ut må bli sett som mål-«event». Dette blir gjort ved å analysere spreinga av det fluoriserande signalet (Alexa 647) som identifiserar dei IgM<sup>+</sup> cellene. Maskinen har eit lite kammer kor løysinga med celler vil passere i dropar. Dersom målcella møter kriteria sett av maskina, vil den få eit støyt av elektrisitet medan dropen bryt av frå straumen. Akkurat kva tid støytet sendast blir bestemt av ei «drop-delay»-setting. Når dropen er ladd, vil den passere langs to ulike ladda trådar og bli dirigert inn i riktig sorteringsrør. Cellene som ikkje møter kriteria, blir sortert i avfallsstraumen (BD Biosciences, 2012).

### 4.6.2 Gjennomføring av FACS

Leukocyttar frå frisk, atlantisk laks vart isolert og talt. Opp til  $15 \times 10^6$  celler vart sentrifugert ved 500 g i 5 minutt ved 4°C og mediet vart sugen av. Celler vart vaska ein gong ved resuspending i 1 mL FACS buffer (FB) (Dulbecco PBS med 1% BSA, filter-sterilisert). Cellene vart deretter farga med anti-laks IgM (IgF1-18) monoklonalt antistoff (mAb) (2,5 µg/ml) konjugert med Alexa 647 i 1 ml FB i 20 minutt ved 4°C i mørket. Etter to rundar med vasking som beskrive over, vart viability farge FVD 450 (1 µl/ml; eBioscience) i FB lagt til og inkubert i 20 minutt ved 4°C i mørket. Cellene vart deretter vaska to gongar som beskrive

over og resuspendert i opp til 1 ml FB. Sortering av cellene vart gjort ved å bruke BD FACS Aria III flow cytometer (BD Biosciences). Cellene vart dirigert i rett populasjon basert på deira distribuering av FSC-A og SSC-A. Daude celler (FSC-A vs. FVD780<sup>+</sup>) og duplikatar (FSC-A vs. FSC-H) vart ekskludert før lymfocyttane vart dirigert til riktig populasjon for vidare analyse. Alexa 647-positive celler, som er celler som uttrykker membranbunden IgM<sup>+</sup>, vart tatt ut frå lymfocyttopopulasjonen og samla i avkjølt kulturmedium. Sorterte IgM<sup>+</sup> celler vart sentrifugert og resuspendert til den ønska konsentrasjonen med kulturmedium og sådd i ELISpot-plater for vidare analyse av antistoffsekrerende celler.



**Figur 10: Gating-strategi ved sortering av leukocytter.** Leukocytter vart isolert frå frisk, uvaksinert laks og farga med anti-laks IgM (IgF1-18) monoklonalt antistoff (mAb) (2,5 µg/ml) konjugert med Alexa 647. Viability farge FVD 450 (1 µl/ml; eBioscience) vart så lagt til. Sortering av cellene vart gjort med BC FACS Aria III flow cytometer. Cellene vart skild frå kvarandre basert på distribuering av FSC-A og SSC-A. Daude celler (FSC-A vs. FVD780<sup>+</sup>) og duplikatar (FSC-A vs. FSC-H) vart ekskludert, før lymfocyttane vart dirigert til riktig populasjon for vidare analyse. Figuren er laga av Shiferaw Jenberie.

## 4.7 Databehandling

Alt datamateriale vart behandla med Microsoft Excel versjon 16.60, medan statistisk analyse og grafiske framstillingar vart utført ved bruk av GraphPad Prizm (versjon 9).

For å rekne ut den relative fold endringa i genuttrykk, vart metoden etter Pfaffl nytta (Pfaffl, 2001). Utrekningar vart gjort ved bruk av likning 1.

$$Ratio = \frac{(E_{Målgen})^{\Delta Ct_{Målgen(kontrollprøve)}}}{(E_{Referansegen})^{\Delta Ct_{Referansegen(kontrollprøve)}}} \quad (1)$$

Ved denne metoden finn ein fold-endring av genuttrykk i ei stimulert gruppe samanlikna med ei kontrollgruppe, normalisert mot eit referansegen. Vi brukte ELF1aB som referansegen.

$E_{Målgen}$  og  $E_{Referansegen}$  representerer effektivitet til primerane for høvesvis målgenet og referansegenet.  $\Delta Ct$  representerer ulikskapen mellom gjennomsnittet av Ct-verdiane for stimulerte og ikkje-stimulerte grupper med celler.

Det relative genuttrykket var rekna ut ved  $2^{-\Delta Ct}$ -metoden (Schmittgen et al., 2008). I denne metoden blir kvar Ct-verdi normalisert mot eit referansegen, men ikkje samanlikna med ei kontrollprøve. Utrekningar vart gjort ved bruk av likning 2.

$$Relativt uttrykk = 2^{-(Gjennomsnitt Ct_{Målgen} - Gjennomsnitt Ct_{Referansegen})} \quad (2)$$

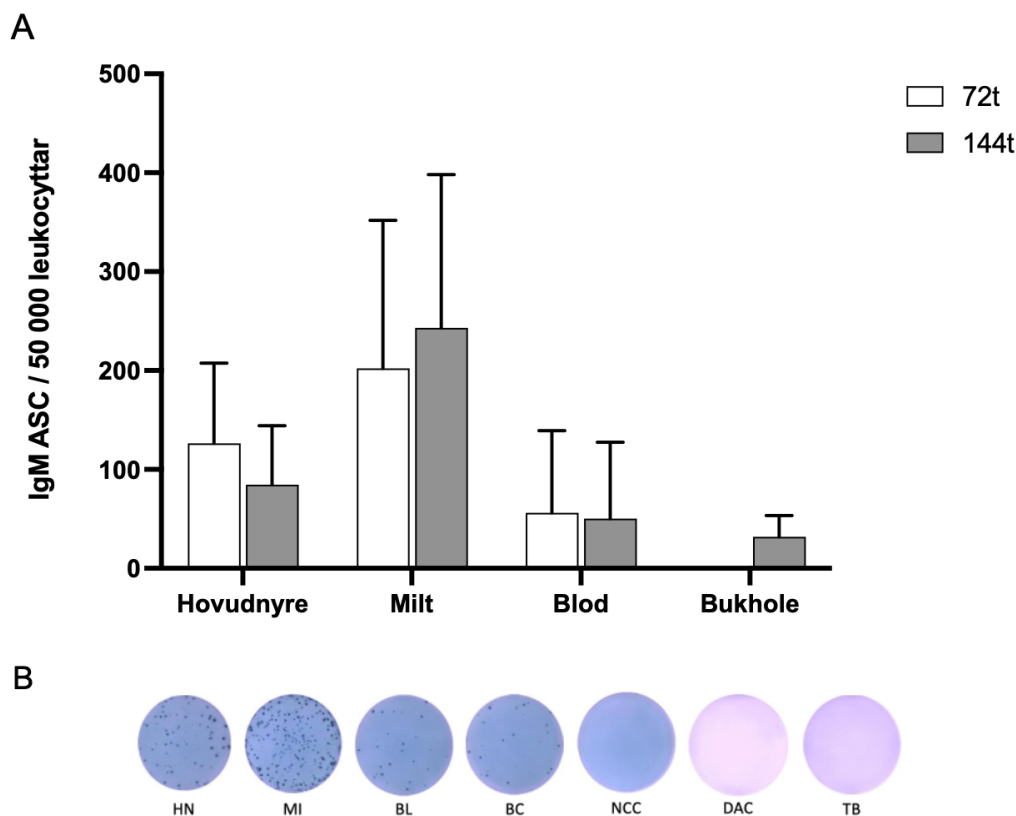
Datasetta er merka med standardavvik som tek utgangspunkt i gjennomsnittsverdiane. Statistisk signifikante ulikskapar mellom kontrollprøvene og dei stimulerte gruppene vart rekna ut med ikkje-parametrisk Kruskal Wallis-test. P-verdien vart etterjustert ved bruk av Dunn's post hoc-test. Ulikskapar vart rekna som signifikante dersom p-verdien var mindre enn 0,05 ( $p < 0,05$ ). Signifikante ulikskapar er gitt i grafane som \*, der \* =  $p < 0,05$ .

## 5 Resultat

### 5.1 Verknad av immunmodulatorar på B-celler frå laks

#### 5.1.1 Basalt nivå av IgM<sup>+</sup> ASC

Tidlegare forsøk i vår forskingsgruppe har vist at utskiljing av IgM kan bli observert i ikkje-stimulerte leukocyttpopulasjonar frå fleire vev. Dette gir signal om at det finst vedvarande antistoffsekrerende celler, kalla plasmaceller, i desse veva (Abrahamsen, 2019; Jenberie et al., 2018). For å få ei betre forståing av kva for antal IgM<sup>+</sup> ASC som finst i leukocyttpopulasjonar frå hovudnyre, milt, blod og bukhole i ubehandla laks, og om det samsvarar med tidlegare forsøk, vart kontrollprøver (ikkje-stimulerte celler) frå kvart vev frå to ELISpot-forsøk (beskrive i 5.1.2 og 5.1.4) satt opp i ein eigen figur (figur 11).



**Figur 11: (A) Frekvensen av IgM ASC for hovudnyre, milt, blod og bukhole i ubehandla celler.** Leukocyttar vart isolert frå frisk, uvaksinert laks og sådd ut i 96-brønners Brett ( $1 \times 10^6$  celler) i 72 og 144 timar. Leukocyttar frå bukhole inkubert i 72 timar er ikkje analysert. Cellene vart hausta og sådd ut i ELISpot-plater dekt med anti-laks IgM i duplikat (50 000 celler per brønn). Etter 48 timar vart ELISpot-plata framkalla. Søylene viser gjennomsnittsverdiar av IgM<sup>+</sup> ASC  $\pm$  standardavvik og er resultat av datamateriale frå to ulike uttak ( $n=8$  individ). **(B)** Digital ELISpot-avlesing av kontrollbrønner med IgM<sup>+</sup> ASC i hovudnyre, milt, blod og bukhole etter 144 timar inkubering. HN=hovudnyre, MI=milt, BL=blod, BC=bukceller, NCC=brønn utan celler, med biotinylert antistoff, DAC=brønn med celler, utan det biotinylerte antistoffet, TB=ikkje aktivert, tom brønn.

Figur 11A viser gjennomsnittleg antal ASC per 50 000 celler frå dei ulike organa, medan figur 11B viser fordelinga av prikkar frå den digitale avlesinga av ELISpot-plata ved 144 timar inkubering, der ein prikk representerer ein IgM<sup>+</sup> ASC. I ELISpot-prosedyra vart det inkludert kontrollar i form av brønner utan celler (NCC) og brønner som ikkje vart tilsett det biotinylerte antistoffet (DAC).

Det var ingen signifikante ulikskapar i antal ASC mellom dei to tidspunkta for inkubering. Ved inkubering i 72 timar var 0,40% av leukocyttpopulasjonen frå milt IgM<sup>+</sup> ASC. Deretter følgde hovudnyre med 0,25% og blod med 0,11%. Grunna lavt celledetal finst det berre datamateriale frå 144 timar inkubering av cellene frå bukhole, der IgM<sup>+</sup> ASC utgjorde 0,06% av leukocyttpopulasjonen (figur 11A). Frekvensen av ASC i dei ulike veva viste at milt hadde ~1,6 gongar fleire ASC enn hovudnyre og ~3,6 gongar meir enn blod ved inkubering i 72 timar. Dersom ein samanliknar antal ASC i milt ved 144 timar inkubering mot ASC i bukhole ved same tidspunkt, har milt ~7,6 gongar fleire ASC.

Den digitale avlesinga (figur 11B) viser at IgM<sup>+</sup> ASC var jamt fordelt i brønnane, og ein kan med det blotte auge observere flest prikkar i brønnen med celler frå milt. Det var ikkje store forskjellar i størrelsen på prikkane, og det var heller ikkje område kor prikkane hopa seg opp. Det vart ikkje observert prikkar i NCC eller DAC.

### 5.1.2 Innleiande ELISpot-assay for måling av sekret IgM i leukocyttar stimulerte med TLR-ligandar

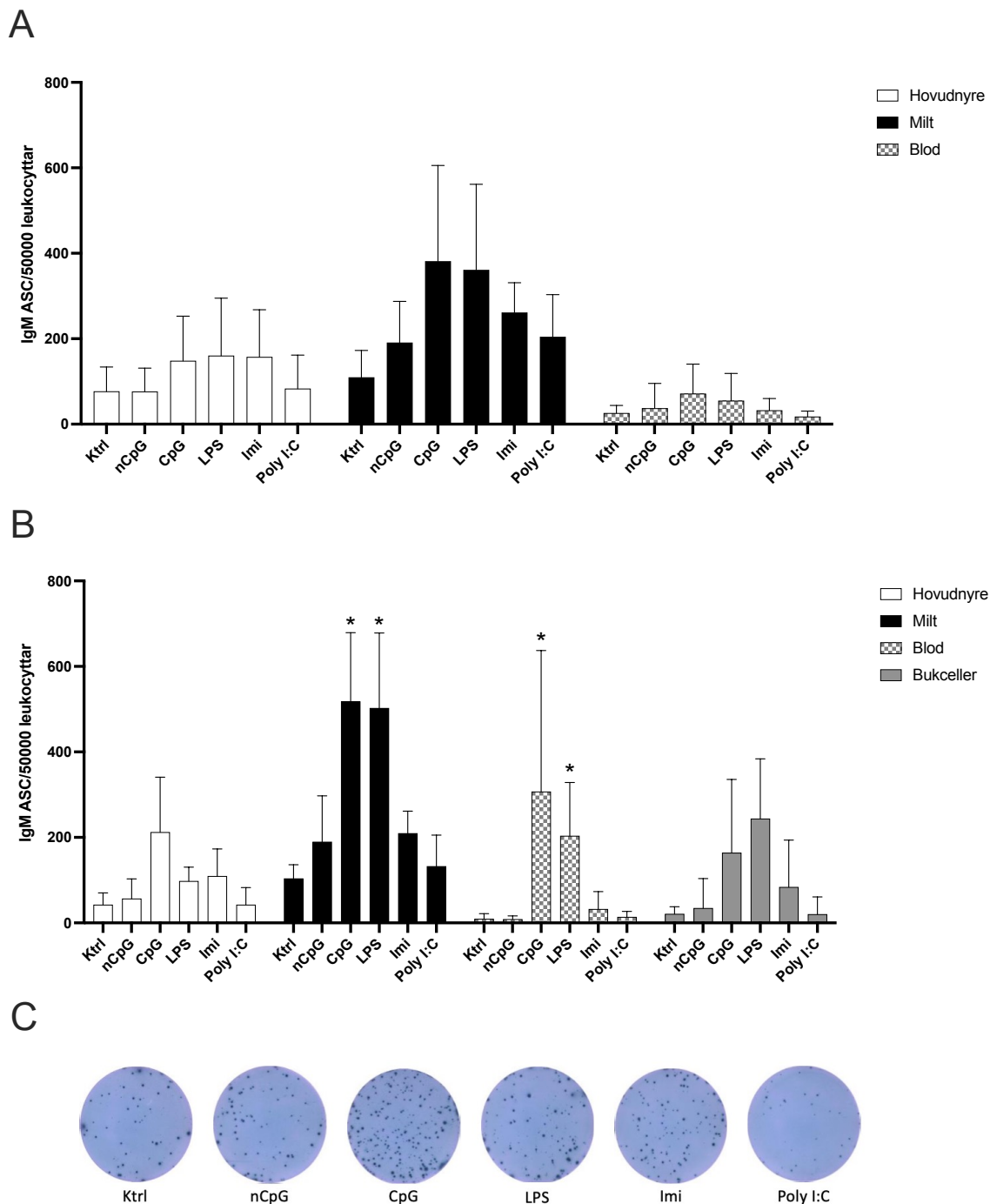
Tidlegare studiar har vist at B-celler frå hovudnyre, milt og blod frå laks uttrykker TLR-reseptorar som kjenner att ulike nukleinsyreligandar (Jenberie et al., 2018). I dette forsøket testa vi effekt av tre ulike nukleinsyre-analogar på leukocyttar frå hovudnyre, milt, blod og bukhole hos laks. CpG er ligand for TLR9 og TLR21 hos fisk, medan imiquimod og poly I:C er ligandar for høvesvis TLR7 og TLR3/MDA5 hos pattedyr (tabell 2).

Det vart gjennomført to separate forsøk der leukocyttar vart isolert frå hovudnyre, milt, blod og bukhole og stimulert med ulike TLR-ligandar. Konsentrasjonen av desse vart vald på bakgrunn av optimaliseringsforsøk gjort tidlegare av vår forskingsgruppe. Tidlegare forsøk (Wold, 2018) har vist at *in vitro* stimulering av leukocyttar frå laks med LPS gir auka antal IgM<sup>+</sup> ASC, og denne behandlinga vart difor med som positiv kontroll i våre oppsett. L-15-behandling (ingen stimulering) vart nytta som negativ kontroll, medan non-CpG vart nytta som kontroll for stimulering med CpG. Det vart i tillegg inkludert kontrollar i ELISpot-oppsettet i form av brønner utan celler (no cell control (NCC)) og brønner som ikkje vart tilsett det biotinylerte antistoffet (detection antibody control (DAC)). Dette vart gjort for å bekrefte at prikkane på ELISpot-platene faktisk representerer IgM<sup>+</sup> ASC og at det ikkje er uspesifikk binding av nokon av antistoffa som nyttast i ELISpot-proseduren.

Leukocytane vart heldt i cellekultur med og utan stimulering i 3 (72 timar) og 6 dagar (144 timar), før dei vart hausta og sådd ut på ELISpot-plater (50 000 celler per brønn i duplikat) på førehand dekt med anti-IgM. Platene vart avlesne etter 48 timar. Det vart ikkje observert prikkar i brønnane for NCC eller DAC, noko som stadfestar at metoden er spesifikk for IgM<sup>+</sup> ASC. Antal IgM<sup>+</sup> ASC etter stimulering i 72 timar er vist i figur 12A.

Eit gjennomgåande resultat etter 72 timar inkubering, var auka i IgM<sup>+</sup> ASC ved stimulering med CpG og LPS. Desse stimulantane gav auke av IgM<sup>+</sup> ASC i alle tre vev, samanlikna med deira respektive kontrollar, sjølv om denne auka ved dette tidspunktet ikkje var signifikant ulik kontrollcellene. Den største effekten vart sett i cellene frå milt, kor stimulering med





**Figur 12: Effekt av TLR-ligandar på frekvens av IgM<sup>+</sup> ASC i leukocyttar frå hovudnyre, milt, blod og bukceller frå laks.** Leukocyttar vart isolert frå frisk, uvaksinert laks og sådd ut i 96-brønners brett ( $1 \times 10^6$  celler per brønn) og stimulert med non-CpG ( $2 \mu\text{M}$ ), CpG ( $2 \mu\text{M}$ ), LPS ( $50 \mu\text{g/ml}$ ), imiquimod ( $5 \mu\text{g/ml}$ ) og poly I:C ( $10 \mu\text{g/ml}$ ) i **(A)** 72 timar og **(B)** 144 timar. Kontrollar er celler tilsett berre medium. Cellene vart hausta og sådd ut i ELISpot-plater dekt med anti-laks IgM i duplikat ( $50\,000$  celler per brønn). Etter 48 timar vart ELISpot-plata framkalla. Søylen i grafen viser gjennomsnittsverdiar av IgM<sup>+</sup> ASC  $\pm$  standardavvik ( $n=4$  individ ( $n=3$  for hovudnyre i figur 12A,  $n=3$  for bukhole stimulert med CpG og imiquimod i figur 12B,  $n=1$  for bukhole stimulert med nCpG og poly I:C i figur 12B)). Signifikans er målt mellom stimulerte celler og deira respektive kontrollar. Signifikansnivå er satt til 0,05 der  $p < 0,05$  svarar til (\*). **(C)** Representative ELISpot-brønner med celler frå hovudnyre. Ktrl = kontroll, Imi = imiquimod.

CpG og LPS gav høvesvis ~3,5 og ~3,3 gonger fleire IgM<sup>+</sup> ASC enn kontrollane. Non-CpG-kontrollen hadde i alle veva eit lågare antal ASC samanlikna med CpG. Stimulering med imiquimod gav ei auke i antal ASC i leukocyttar frå hovudnyre og milt, medan verknaden på leukocyttar frå blod var liten.

Det var ikkje ulikskap i frekvens av ASC mellom kontrollprøvene og leukocyttar som var stimulerte med poly I:C, og det var med det tydeleg at Poly I:C i konsentrasjon på 10 µg/ml ikkje stimulerte leukocyttopulasjonen frå hovudnyre til å differensiere til IgM<sup>+</sup> ASC ved 72 timar inkubering. Cellene frå blod viste ikkje effektar av stimuleringa, der effekten av CpG og LPS også var avgrensa.

Antal IgM<sup>+</sup> ASC etter stimulering i 144 timar blir vist i figur 12B. Likt som for 72 timar inkubering var den største effekten å sjå i milt ved stimulering med CpG og LPS. Der hadde stimulering med CpG og LPS gitt ei signifikant auke samanlikna med kontroll med høvesvis ~5 og ~4,8 gonger så mange IgM<sup>+</sup> ASC. Stimulering med imiquimod gav ei dobling av antal IgM<sup>+</sup> ASC ved stimulering av miltceller.

Det var generelt høgare antal IgM<sup>+</sup> ASC ved 144 timar inkubering samanlikna med 72 timar. Stimulering med CpG og LPS i milt gav begge ~1,4 gongar høgare antal IgM<sup>+</sup> ASC ved 144 timar inkubering samanlikna med 72 timar. Den største endringa i antal IgM<sup>+</sup> ASC mellom dei to tidspunkta som blei nytta vart observert i leukocyttar frå blod, der CpG og LPS gav høvesvis ~4,3 og ~3,7 gongar så mange IgM<sup>+</sup> ASC ved den lengste inkuberinga.

Kontrollprøva for blodcellene inkubert i 144 timar var lav, med berre 9 ASC per 50 000 leukocyttar. Stimulering med CpG og LPS på leukocyttar frå blod gav signifikante verdiar på høvesvis ~33 og ~22 gonger så mange IgM<sup>+</sup> ASC.

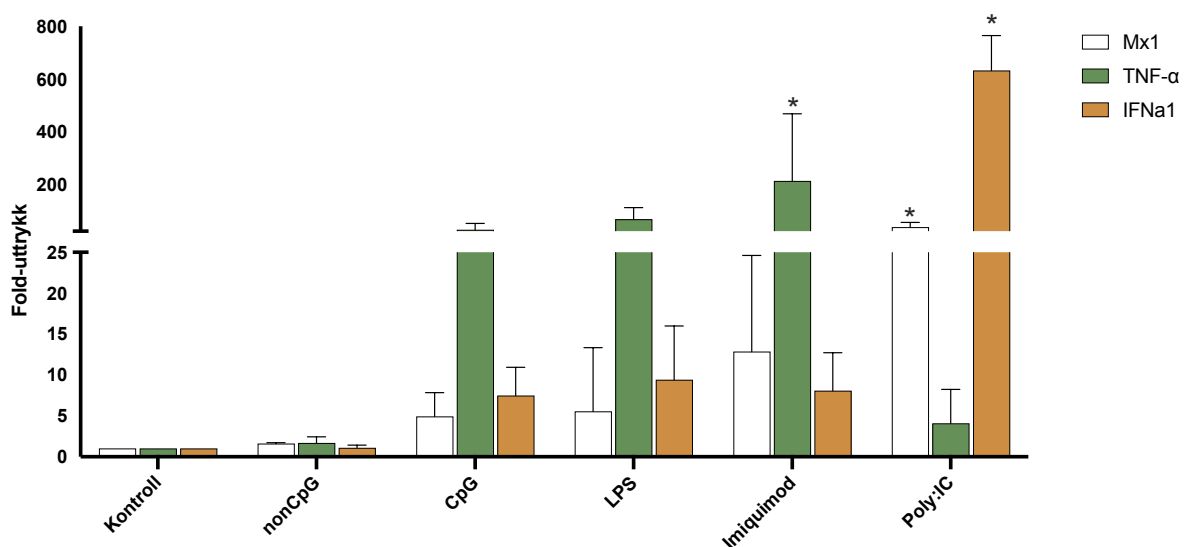
Det var ikkje samanlikningsgrunnlag for leukocyttar frå bukhole mellom 72 og 144 timar, då det ikkje vart isolert nok celler til å inkubere ved begge tidspunkta. Også i leukocytane frå bukhole var det CpG og LPS som hovudsakleg stimulerte til auka nivå av ASC i desse cellene, samt det vart sett ein verknad av imiquimod.

Den digitale avlesinga av brønnar med celler frå hovudnyre inkubert i 144 timar (figur 12C) viste at fordelinga av celler på membranen av ELISpot-plata var jamn. Det vart sett flest prikkar i brønnane stimulert med CpG, LPS, og imiquimod, noko som samsvarar med det som kan bli observert frå den grafiske framstillinga av resultatata.

For å kontrollere om dei ulike stimulantane fungerte, vart det gjennomført RT-qPCR-analysar av genuttrykk for kvar behandling på celler frå hovudnyre frå same forsøk. I oppsettet målte vi mRNA-nivå av gen som tidlegare er vist å bli oppregulert ved stimulering med desse ligandane. Ved stimulering med poly I:C og imiquimod er det vist at IFN $\alpha$ 1 blir induisert (Tafalla et al., 2014; Tanekhy et al., 2019). Mx1 er eit interferon-indusert gen, og vil dermed bli regulert opp ved stimulering med desse syntetiske nukleinsyrene.

Frå same batch med celler nytta i ELISpot-forsøket, vart leukocyttar frå hovudnyre stimulert med 2  $\mu$ M CpG, 50  $\mu$ g/ml LPS, 5  $\mu$ g/ml imiquimod og 10  $\mu$ g/ml poly I:C.

Stimulantløysingane som vart nytta var dei same som vart nytta i ELISpot-forsøket. RNA vart ekstrahert frå cellene 24 timar etter stimulering for å studere uttrykk av genane for Mx, TNF og IFN $\alpha$ 1. Alle prøvene vart analysert i duplikatar. Resultatet frå RT-qPCR blir vist som fold-ending i figur 13.



**Figur 13: Genuttrykk i leukocyttar frå hovudnyre i laks stimulert med LPS og ulike TLR-ligandar.** Frå same batch med celler nytta i ELISpot-forsøket, vart leukocyttar frå hovudnyre sådd ut i 24-brønnars Brett (2,5 mill. celler/brønn). Cellene vart stimulerte med nonCpG (2  $\mu$ M), CpG (2  $\mu$ M), LPS (50  $\mu$ g/ml), Imiquimod (5  $\mu$ g/ml) og poly I:C (10  $\mu$ g/ml). Cellene vart hausta etter 24 timar og RNA isolert. cDNA vart syntetisert (input=200 ng). Genuttrykket vart målt ved RT-qPCR og normalisert mot referansegenet ELF1aB. Søylen viser gjennomsnittsverdiar  $\pm$ standardavvik (n=4 individ). Resultata er presentert som fold-uttrykk samanlikna med ubehandla kontroll. Det er undersøkt signifikans mellom behandla celler og deira respektive kontroll. Signifikansnivå er satt til 0,05 der p<0,05 svarar til (\*).

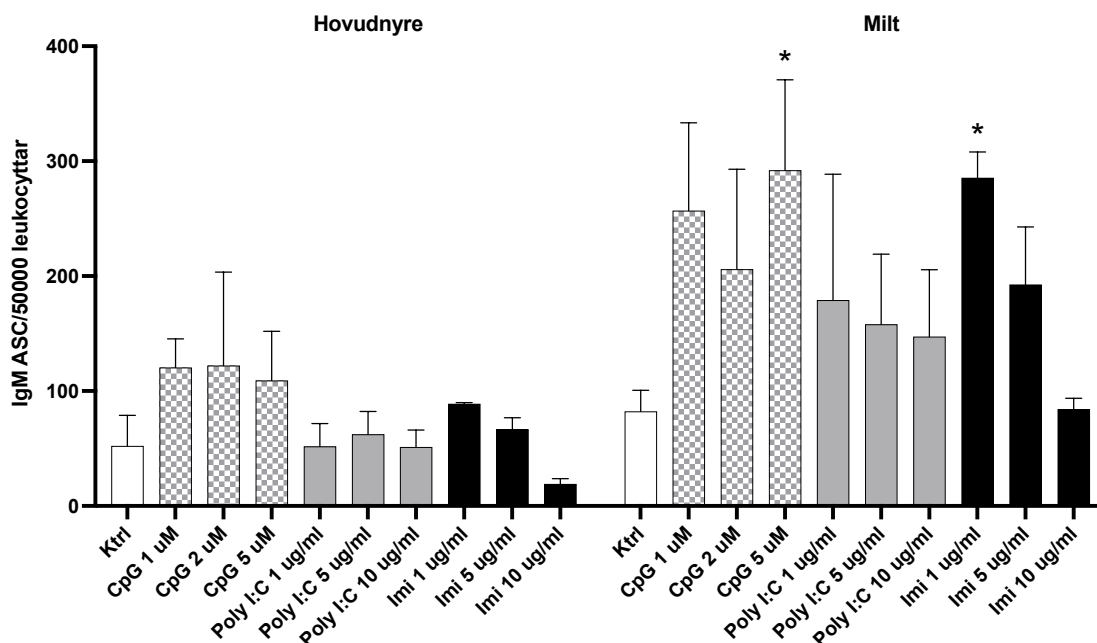
Resultata viste at stimulering med både LPS og dei tre TLR-ligandane stimulerte til auka genuttrykk i leukocyttkulturen frå hovudnyre. Det høgaste transkripsjonsnivået av TNF- $\alpha$  vart observert i celler stimulerte med imiquimod, kor det var ein signifikant verdi som hadde ~214 gongar høgare genuttrykk enn den ikkje-stimulerte kontrollen. TNF- $\alpha$  vart også uttrykt i celler stimulerte med CpG og LPS, med høvesvis ~29 og ~70 gongar høgare genuttrykk,

medan ved stimulering med poly I:C var endringa i uttrykk av TNF- $\alpha$  mykje mindre (~4 gongar høgare uttrykk).

Det høgaste transkripsjonsnivået av Mx1 vart observert ved stimulering med poly I:C, med ein signifikant verdi på ~39 gongar høgare genuttrykk. I tillegg gav stimulering med imiquimod eit ~12 gongar høgare uttrykk av Mx1. Genuttrykket for IFN $\alpha$ 1 var signifikant høgast ved stimulering med poly I:C, kor denne behandlinga viste eit ~632 gongar høgare uttrykk samanlikna med kontrollen. NonCpG-kontrollen er lik den ikkje-stimulert kontrollen. Oppsummert så viste resultatata frå qPCR at stimuleringsløysingane nytta i ELISpot-forsøket fungerte.

### 5.1.3 Optimal konsentrasjon for CpG, poly I:C og imiquimod

Sidan nokre av stimulantane ikkje verka inn på frekvensen av ASC i det innleiande ELISpot-forsøket, ville vi undersøke om konsentrasjonen av ligandane kunne bli optimalisert. Vi utførte derfor eit konsentrasjonsstudie. I forsøket vart celler frå hovudnyre og milt stimulert med tre ulike konsentrasjonar av CpG (1  $\mu$ M, 2  $\mu$ M, 5  $\mu$ M), poly I:C (1  $\mu$ g/ml, 5  $\mu$ g/ml, 10  $\mu$ g/ml) og imiquimod (1  $\mu$ g/ml, 5  $\mu$ g/ml, 10  $\mu$ g/ml) (figur 14) i 72 timar, før cellene vart hausta og sådd ut på ELISpot-plater. Platene vart avlesne etter 48 timar.



**Figur 14: Effekten på frekvens IgM<sup>+</sup> ASC etter stimulering med TLR-ligandar i ulike konsentrasjonar på leukocytter frå hovudnyre og milt hos laks.** Leukocytter vart isolert frå hovudnyre og milt frå frisk, uvaksinert laks og sådd ut i 96-brønners Brett (1x10<sup>6</sup> celler per brønn) og stimulert med CpG, imiquimod og poly I:C i konsentrasjon som vist i figuren i 72 timar. Kontrollar er celler tilsett berre medium. Cellene vart hausta og sådd ut i ELISpot-plater dekt med anti-laks IgM i duplikat (50 000 celler per brønn). Etter 48 timar vart ELISpot-plata framkalla. Søylen viser gjennomsnittsverdiar av IgM<sup>+</sup> ASC  $\pm$  standardavvik (n=3 individ). Signifikans er målt mellom stimulerte celler og deira respektive kontrollar. Signifikansnivå er satt til 0,05 der p<0,05 svarar til (\*). Ktrl=kontroll, Imi=imiquimod.

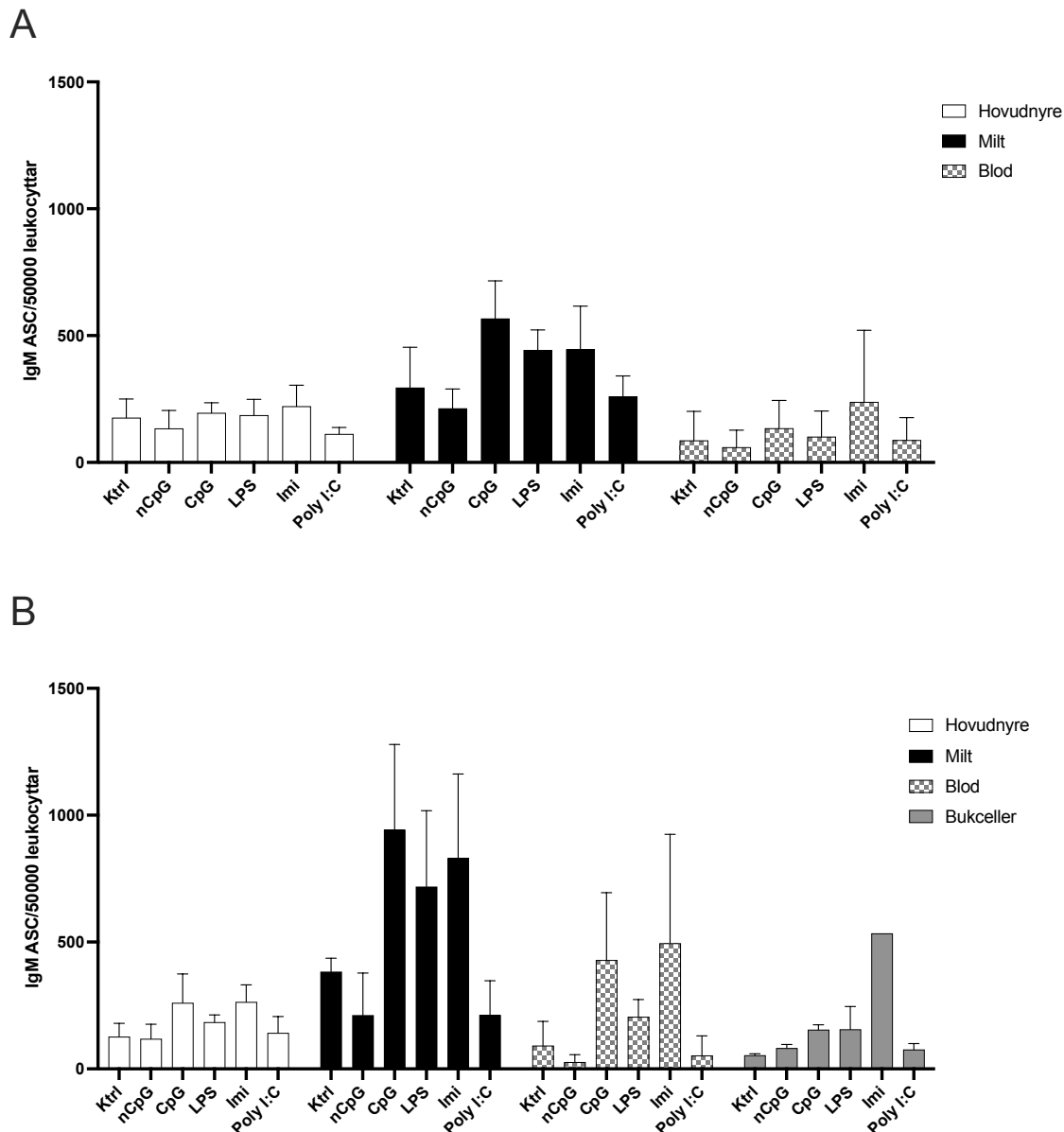
Stimulering av leukocytter frå hovudnyre med CpG gav tilnærma lik frekvens IgM<sup>+</sup> ASC uavhengig av konsentrasjon. Berre hos leukocytter frå milt var det ei signifikant auke i frekvens IgM<sup>+</sup> ASC samanlikna med ikkje-stimulerte celler ved stimulering med 5  $\mu$ M CpG. For dei andre konsentrasjonane var det også ei auke, men den var ikkje signifikant ulik det som vart observert for kontrollcellene.

Poly I:C hadde stimulerande effekt på frekvens IgM<sup>+</sup> ASC i milt, men omtrent ikkje nokon effekt i leukocyttane frå hovudnyre. I begge veva gav stimulering med imiquimod i den lågaste konsentrasjonen størst auke av ASC. Det hadde vore interessant og testa for endå

lågare konsentrasjonar enn 1  $\mu\text{g/ml}$  med imiquimod, men på grunn av for lite tid vart ikkje dette gjennomført. I vidare forsøk vart det nytta konsentrasjonar av CpG på 2  $\mu\text{M}$ , poly I:C på 1  $\mu\text{g/ml}$  og imiquimod på 1  $\mu\text{g/ml}$ .

### 5.1.4 CpG, LPS og imiquimod stimulerer differensiering til IgM<sup>+</sup> ASC

For å sjekke om resultatene fra det innleiende forsøket var moglege å reproducere, vart ELISpot-forsøket gjenteke med dei same ligandane. Konsentrasjonen av poly I:C vart endra frå 10 µg/ml til 1 µg/ml og imiquimod frå 5 µg/ml til 1 µg/ml etter resultat frå optimaliseringsforsøket (5.1.3). Resultat frå stimulering i 72 timar er vist i figur 15A og stimulering i 144 timar i figur 15B.



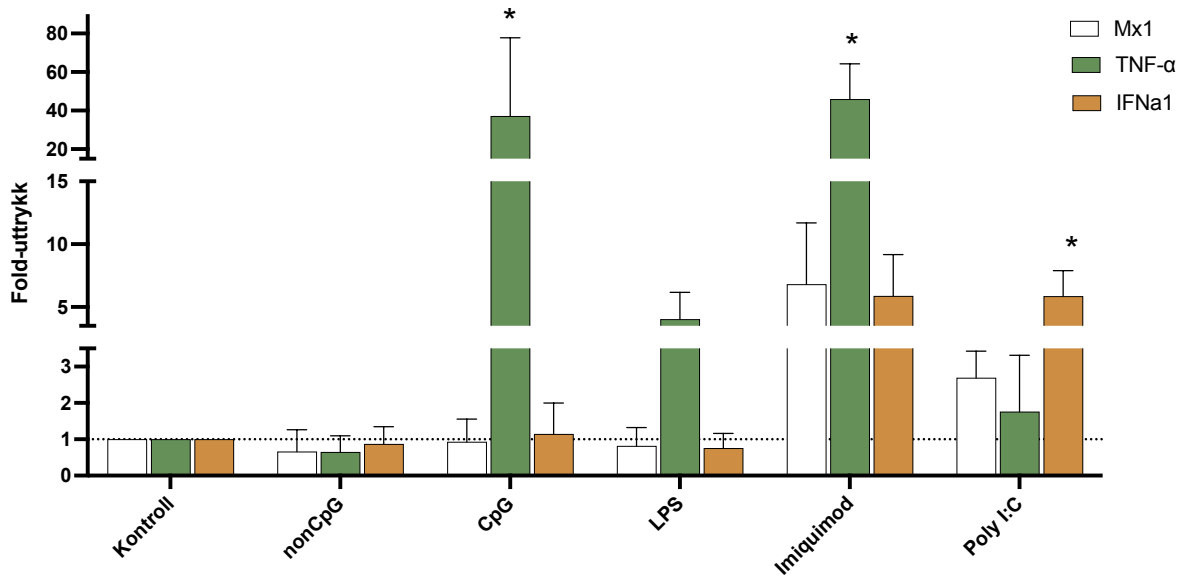
**Figur 15: Effekt av TLR-ligandar på frekvens av IgM<sup>+</sup> ASC i leukocyttar frå hovudnyre, milt, blod og bukceller frå laks.** Leukocyttar vart isolert frå frisk, uvaksinert laks og sådd ut i 96-brønners Brett (1×10<sup>6</sup> celler per brønn) og stimulert med non-CpG (2 µM), CpG (2 µM), LPS (50 µg/ml), imiquimod (1 µg/ml) og poly I:C (1 µg/ml) og i (A) 72 timar og (B) 144 timar. Kontrollar er celler tilsett berre medium. Cellene vart hausta og sådd ut i ELISpot-plater dekt med anti-laks IgM i duplikat (50 000 celler per brønn). Etter 48 timar vart ELISpot-plata framkalla. Søylen i grafen viser gjennomsnittsverdiar av IgM<sup>+</sup> ASC ± standardavvik (n=4 for alle grupper, unntatt n=2 for bukceller og n=1 for bukceller stimulert med imiquimod). Det vart ikkje funne nokon signifikante verdiar i datasettet.

Hovudtrekka i dette forsøket samsvarar med det vi såg i det innleiande ELISpot-forsøket, kor CpG og LPS stimulerte til høgare frekvens IgM<sup>+</sup> ASC i alle vev. I tillegg gav imiquimod, etter endra konsentrasjon, ein høgare respons i dette forsøket. Generelt var responsen i alle vev for antal IgM<sup>+</sup> ASC høgare i dette forsøket enn i det innleiande forsøket, men det vart ikkje observert nokon signifikante endringar i frekvens av ASC samanlikna med ikkje-stimulerte kontrollar. Ved stimulering med poly I:C vart det framleis ikkje observert nokon effekt, sjølv om konsentrasjonen var endra frå det innleiande forsøket. For kontrollgruppa var det igjen i miltcellene det vart sett det høgaste antalet ASC. Cellene frå hovudnyre viste generelt liten respons til stimuleringane. I cellene frå blod inkubert i 72 timar var det imiquimod som hadde den største stimuleringseffekten.

Frå inkubering ved 72 timar til 144 timar auka antalet ASC hos cellene som var stimulerte. Stimulering med CpG, LPS og imiquimod i milt gav høvesvis ~1,7, ~1,6 og ~1,8 gongar fleire ASC ved den lengre inkuberingsperioden (figur 15B). For blodcellene gav stimulering med imiquimod over ei dobling av antal ASC mellom dei to tidspunkta. Bukcellene hadde i utgangspunktet få ASC (kontroll), men resultatata indikerte ein verknad av CpG, LPS og imiquimod også her. Stimulering med imiquimod gav ~10 gongar fleire ASC enn i kontrollen. Resultatet er derimot usikkert, då verdien berre stammar frå éin fisk. Felles for begge forsøka var at det vart observert relativt store standardavvik og det var få signifikante verdiar.

Frå same batch av leukocytter nytta i ELISpot-forsøket, vart leukocytter frå hovudnyre stimulert med 2 µM CpG, 50 µg/ml LPS, 1 µg/ml imiquimod og 1 µg/ml poly I:C. RNA vart ekstrahert frå cellene 24 timar etter stimulering for å studere uttrykk av genane for Mx, TNF og IFN $\alpha$ 1. Alle prøvene vart studert i duplikatar. Resultatet frå RT-qPCR blir vist som fold-endring i figur 16.



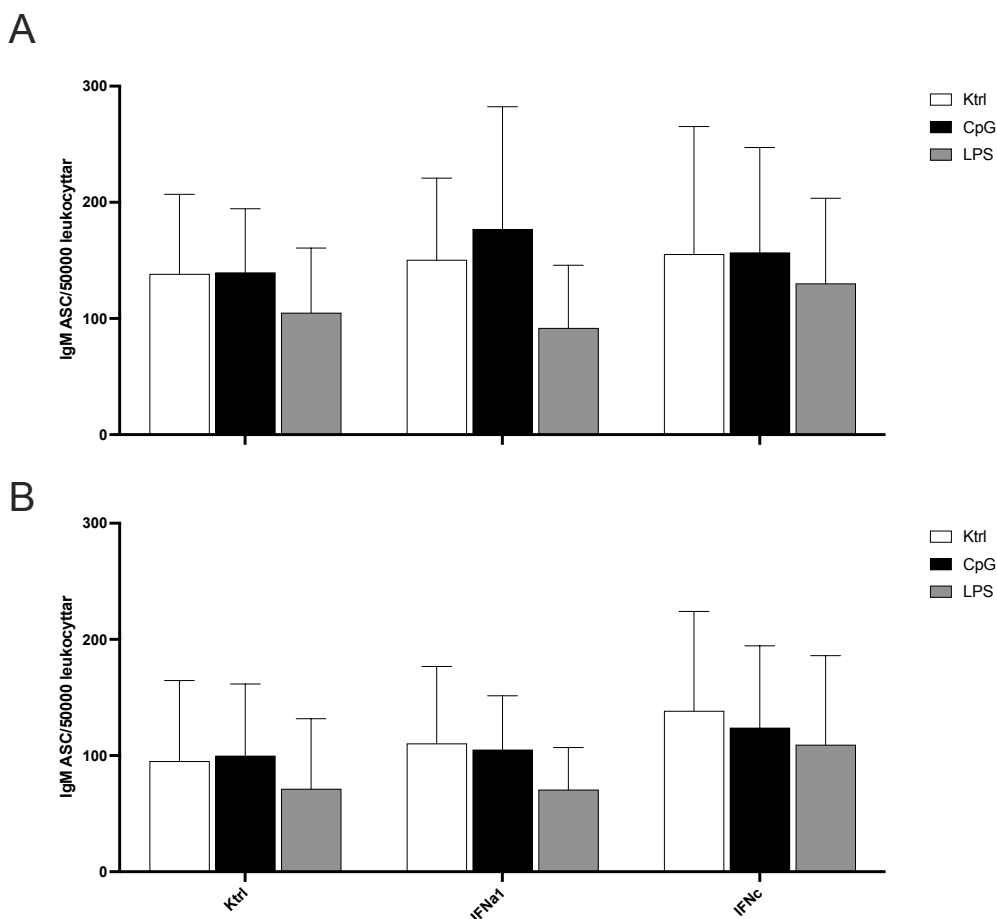


**Figur 16: Genuttrykk i leukocytter frå hovudnyre i laks stimulert med LPS og ulike TLR-ligandar.** Frå same batch med celler nytta i ELISpot-forsøket, vart leukocytter frå hovudnyre sådd ut i 24 -brønnars brett (2,5 mill. celler/brønn). Cellene vart stimulerte med nonCpG (2  $\mu$ M), CpG (2  $\mu$ M), LPS (50  $\mu$ g/ml), Imiquimod (1  $\mu$ g/ml) og poly I:C (1  $\mu$ g/ml). Cellene vart hausta etter 24 timar og RNA isolert. cDNA vart syntetisert (input=200 ng). Genuttrykket vart målt ved RT-qPCR og normalisert mot referansegenet ELF1aB. Søylen viser gjennomsnittsverdiar  $\pm$ standardavvik (n=4 individ). Resultata er presentert som fold-uttrykk samanlikna med ubehandla kontroll. Det er undersøkt signifikans mellom behandla celler og deira respektive kontroll. Signifikansnivå er satt til 0,05 der  $p < 0,05$  svarar til (\*).

Det høgaste transkripsjonsnivået av TNF- $\alpha$  vart detektert i celler stimulerte med CpG og imiquimod, med signifikante verdiar på høvesvis  $\sim 37$  og  $\sim 45$  gongar høgare genuttrykk enn kontrollane. Stimulering med LPS gav eit  $\sim 4$  gongar så høgt genuttrykk av TNF- $\alpha$ . Det høgaste transkripsjonsnivået av både Mx og IFN $\alpha$ 1 vart observert ved stimulering med imiquimod og poly I:C, der Mx hadde  $\sim 6$  gongar så høgt genuttrykk ved stimulering med imiquimod. Genuttrykket for IFN $\alpha$ 1 var  $\sim 5$  gongar så høgt ved stimulering med imiquimod og poly I:C, kor verdien for stimulering med poly I:C var signifikant. Begge kontrollane (kontroll og nonCpG) viste ingen endring i genuttrykk i forhold til referansegenet, med verdiar på 1 i fold-uttrykket. Dette viser at det er stimuleringa med TLR-ligandane som gav det auka genuttrykket som vart sett i resultatet.

## 5.2 Stimulering av leukocyttar frå laks med type 1 IFN

Type 1-IFN (IFN $\alpha$ 1 og IFN $\gamma$ ) er cytokinar som induserer medfødde antivirale responsar, men kan også gi signal som initierer adaptive immunresponsar i fisk (Robertsen, 2018). Sidan det er vist i menneske at forbehandling av makrofagar med IFN- $\alpha$  gir ein oppregulering av fleire TLR (Sirén et al., 2005), ønska vi å undersøke om ein slik behandling også ville verke inn på antal IgM<sup>+</sup> ASC i ein leukocyttopulasjon frå laks, ettersom fisk uttrykker TLR på overflata av B-celler. Det er også interessant å finne ut om type I-IFN hos laks i seg sjølve kan aktivere B-celler til å differensiere til ASC. Dermed vart leukocyttar frå laks først stimulert med type 1-IFN (1000 einheiten/ml IFN $\alpha$ 1 og 1000 einheiten/ml IFN $\gamma$ ) i 72 timar. Deretter vart cellene hausta og overført til ELISpot-plater, kor dei vart stimulert med TLR-ligandane CpG (2  $\mu$ M) og LPS (50  $\mu$ g/ml) i 72 (figur 17A) og 144 timar (figur 17B) før ELISpot-plata vart framkalla. Figur 17 viser ei oversikt over antal IgM<sup>+</sup> ASC per 50 000 leukocyttar ved dei ulike stimuleringane.



**Figur 17: Effekt på frekvens IgM<sup>+</sup> ASC ved pre-stimulering av leukocyttar frå milt hos laks med IFNa1 og IFNc før tilsetjing av TLR-ligandar.** Leukocyttar vart isolert frå milt frå frisk, uvaksinert laks og sådd ut i 96-brønners Brett (1x10<sup>6</sup> celler per brønn) og stimulert med 1000 einheiter/ml IFNa1 og IFNc i 72 timar. Kontrollar er celler tilsett berre medium. Cellene vart hausta og sådd ut i ELISpot-plater dekt med anti-laks IgM i duplikat (50 000 celler per brønn). CpG (2 µM) og LPS (50 µg/ml) (100 µl/brønn) vart tilsett direkte i ELISpot-platene for kvar av dei ulike gruppene. Etter (A) 72 og (B) 144 timar vart ELISpot-plata framkalla. Ktrl = kontroll. Søylen viser gjennomsnittsverdiar av IgM<sup>+</sup> ASC ±standardavvik (n=4 individ). Det vart ikkje funne nokon signifikante verdiar i datasettet.

Kontrollgruppa, som ikkje var behandla med IFN, inneheldt både ein kontroll som ikkje var stimulert i det heile og celler som var stimulerte med CpG og LPS. I dette forsøket gav stimulering med CpG og LPS åleine inga auke i antal IgM<sup>+</sup> ASC.

I gruppa som vart behandla med IFNa1 antydde resultatane ei liten auke i IgM<sup>+</sup> ASC ved stimulering med CpG, men dei andre stimuleringane gav ingen effekt på antal ASC. I gruppa stimulert med IFNc såg vi heller ikkje nokon effekt av behandlingane med CpG og LPS. Det var gjennomgåande for heile forsøket at stimulering med LPS gav ein viss nedgang i antal ASC, også i cellene stimulert med LPS åleine, utan IFNa eller IFNc.

Dei to inkuberingstidene gav relativt like resultat etter behandling. Det var jamt over færre IgM<sup>+</sup> ASC ved den lengste inkuberinga, noko som truleg kjem av at cellene i kulturen dør.

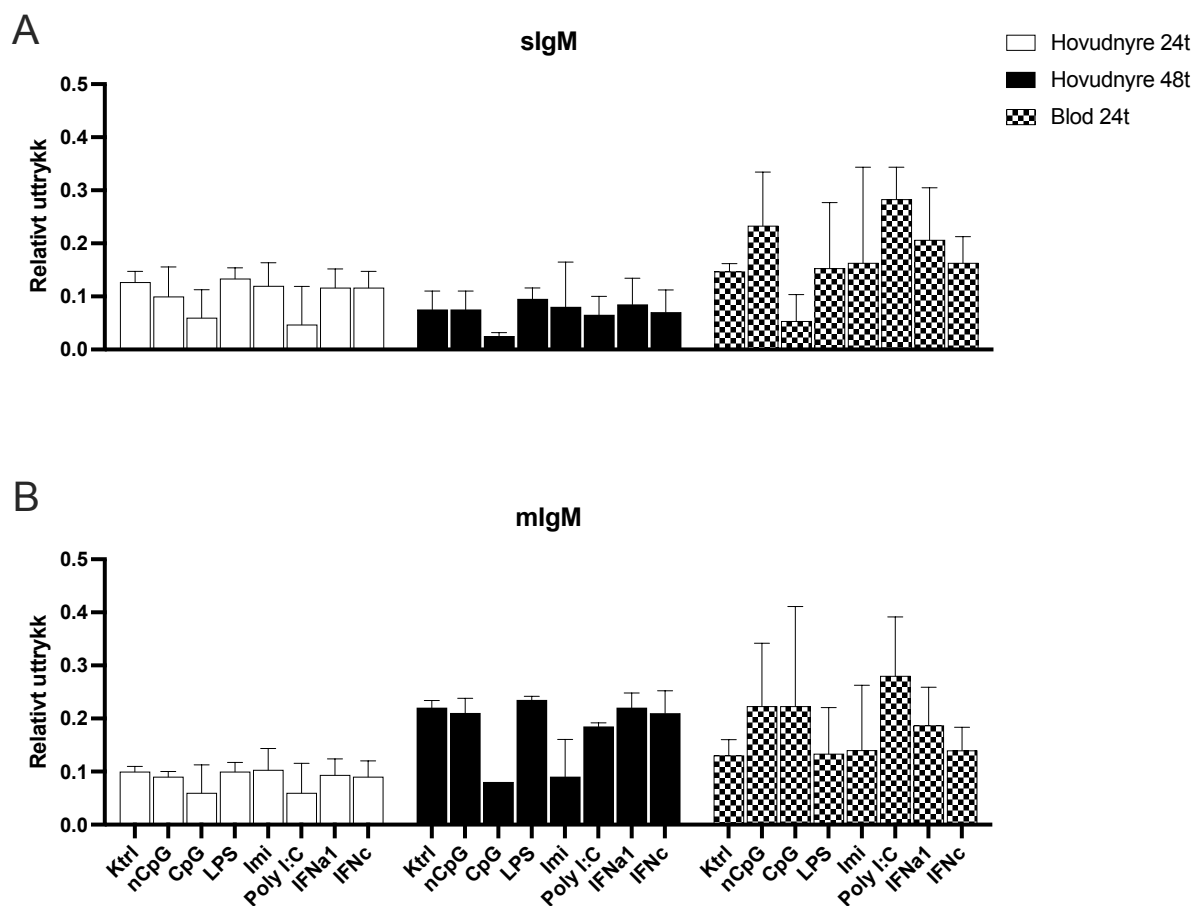
### 5.3 Transkripsjon av immunoglobulinane IgM, IgD og IgT hos leukocyttar stimulert med TLR-ligandar og type I IFN

Vi ville undersøke korleis stimulering med dei ulike TLR-ligandane og IFN nytta i ELISpot-forsøka verka inn på uttrykket av ulike gen for immunoglobulinar. I ELISpot-analysane har vi vist at celler stimulerte med TLR-ligandar sekreterer IgM, og det ville derfor vere interessant å finne ut om desse stimuleringane verka inn på transkripsjonen av IgM, i tillegg til IgD og IgT.

IgM finst både i sekretert (sIgM) og membranbunden (mIgM) form. Naive IgM<sup>+</sup> B-celler aktiverast av patogen (eller stimulantar) som binder til immunoglobulinet på overflata og B-celler med dette immunoglobulinet vil proliferere og auke i antal. Dermed aukar mengda membranbunden IgM. Aktiverte IgM<sup>+</sup> B-celler vil også kunne differensiere til ASC som skil ut IgM, som i sin tur vil auke mengda av den sekreterte forma av IgM (Abbas et al., 2019).

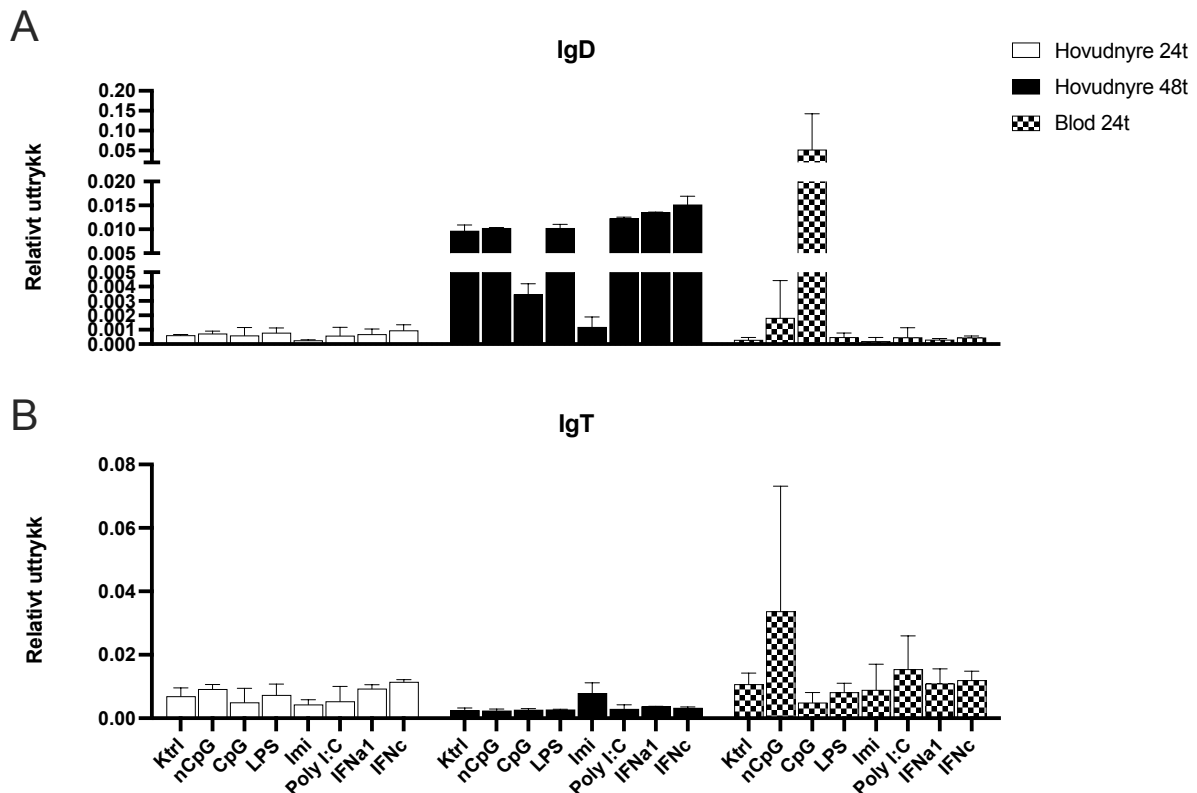
Ved å undersøke genuttrykk for dei ulike typane immunoglobulin kan ein finne ut kva for immunoglobulin, og kor stor mengd av dei, som blir produsert. Forsøka vart utført med leukocyttar isolert frå hovudnyre, milt og blod. Dei isolerte leukocytane vart stimulert med CpG, LPS, imiquimod, poly I:C, IFN $\alpha$ 1 og IFN $\gamma$ . Cellene vart hausta og RNA isolert, før det vart laga cDNA. Ulike tekniske problem under utføringa av desse forsøka gjorde at resultat frå nokre av gruppene (gruppe 3 stimulert 48 timar) vart tekne ut. Dette kom av at det vart observert ein ekstra «skulder» på smeltekurva ved RT-qPCR, som indikerer at det er noko anna DNA-materiale til stades i prøva etter PCR-amplifisering. I tillegg fekk vi høge verdiar for ELF1aB på nokre av kontrollprøvene. Relativt uttrykk for blod stimulert i 48 timar kan sjåast i vedlegg 5, medan Ct-verdiane for heile dette forsøket er oppført i vedlegg 2. Det vart ikkje gjort RT-qPCR-analyse av milt-celler, då det ikkje var nok RNA-materiale til å gjennomføre dette.

Figur 18A viser uttrykket av sIgM for leukocyttar frå hovudnyre og blod stimulert med TLR-ligandar og interferonar i 24 og 48 timar. I leukocytane frå hovudnyre såg vi generelt liten effekt av stimuleringa. For leukocyttar frå blod stimulert i 24 timar såg vi om lag to gonger så høgt uttrykk av sIgM ved stimulering med poly I:C. IFN $\alpha$ 1-stimulering gav ~1,4 gonger høgare uttrykk av sIgM. Alle CpG-stimulerte grupper viste eit lågare uttrykk av sIgM samanlikna med ikkje-stimulerte kontrollprøver.



**Figur 18: Genuttrykk i leukocytter frå hovudnyre og blod frå laks stimulert med LPS, ulike TLR-ligandar og type I-IFN.** Leukocytter vart isolert frå hovudnyre og blod frå frisk, atlantisk laks og sådd ut i 48-brønnars Brett (2,5 mill. celler/brønn). Cellene vart stimulert med nonCpG (2 µM), CpG (2 µM), LPS (50 µg/ml), Imiquimod (1 µg/ml), poly I:C (1 µg/ml), IFNα1 (1000 u/ml) og IFNγ (1000 u/ml) i 24 og 48 timar. Cellene vart hausta og RNA isolert. cDNA ble syntetisert (input=500 ng). Genuttrykket vart målt ved qPCR og er presentert som relativt uttrykk der kvar Ct-verdi er normalisert mot referansegenet ELF1aB. Søylen i grafen viser gjennomsnittsverdiar ± standardavvik (n=3 individ for hovudnyre 24t og blod 24t, n=2 for hovudnyre 48t). Det vart ikkje funne nokon signifikante ulikskapar mellom prøvene i datasettet.

I figur 18B kan ein observere at dei ulike stimuleringane ikkje påverka genuttrykket av mIgM i hovudnyre, verken ved 24 eller 48 timar inkubering. Det var like fullt eit tydeleg høgare genuttrykk av mIgM i leukocyttane frå hovudnyre inkubert i 48 timar samanlikna med det same tidspunktet ved undersøking av genuttrykk av sIgM. I leukocyttane frå blod gav stimulering med poly I:C to gonger så høgt genuttrykk av mIgM som kontrollen. Også stimulering med CpG og IFNα1 gav eit høgare uttrykk av mIgM enn kontrollprøva, men det var ingen signifikante endringar.



**Figur 19: Genuttrykk i leukocytter frå hovudnyre og blod frå laks stimulert med LPS, ulike TLR-ligandar og type I-IFN.** Leukocytter vart isolert frå hovudnyre og blod frå frisk, atlantisk laks og sådd ut i 48-brønnars Brett (2,5 mill. celler/brønn). Cellene vart stimulert med nonCpG (2  $\mu$ M), CpG (2  $\mu$ M), LPS (50  $\mu$ g/ml), Imiquimod (1  $\mu$ g/ml), poly I:C (1  $\mu$ g/ml), IFNa1 (1000 u/ml) og IFNc (1000 u/ml) i 24 og 48 timar. Cellene vart hausta og RNA isolert. cDNA ble syntetisert (input=500 ng). Genuttrykket vart målt ved qPCR og er presentert som relativt uttrykk der kvar Ct-verdi er normalisert mot referansegenet ELF1aB. Søylen i grafen viser gjennomsnittsverdiar  $\pm$ standardavvik (n=3 individ for hovudnyre 24t og blod 24t og n=2 for hovudnyre 48t). Det vart ikkje funne nokon signifikante verdiar i datasettet.

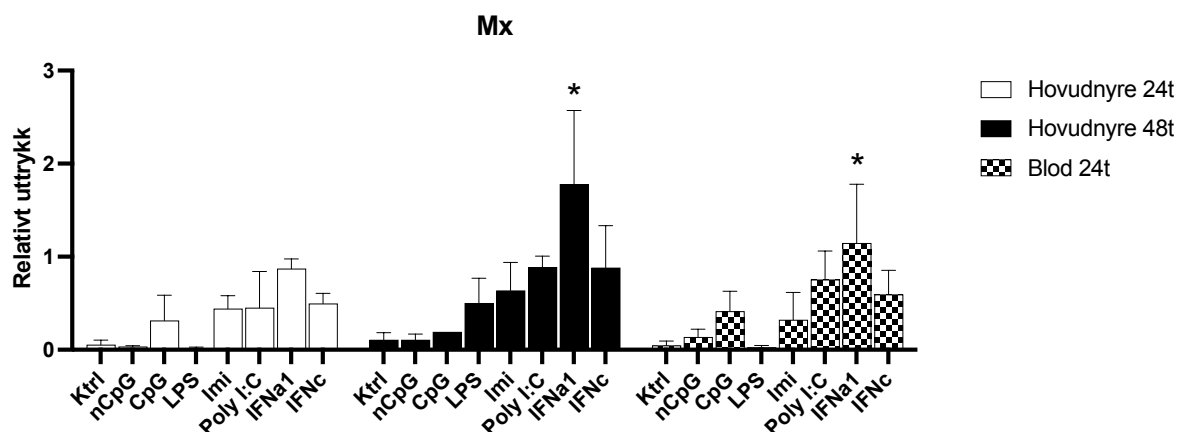
Generelt var uttrykket av IgD og IgT lågare enn uttrykket av sIgM og mIgM (figur 19).

Leukocyttane frå blod som vart stimulerte med CpG i 24 timar viste eit 183 gonger høgare uttrykk av IgD enn kontrollprøva (figur 19A), men denne verdien var ikkje statistisk signifikant. Uttrykket av IgD i leukocytter frå hovudnyre var generelt noko høgare ved 48 timar inkubering enn ved 24 timar. For leukocyttane frå hovudnyre stimulert i 48 timar med CpG og imiquimod vart uttrykket av IgD noko nedregulert.

Generelt vart IgT, presentert i figur 19B, noko høgare uttrykt enn IgD, men jamt over var uttrykket av begge svært lågt. Verknaden av stimuleringane var så små at det ikkje ser ut til at cellene var blitt stimulerte. For leukocyttane frå hovudnyre som vart stimulert i 48 timar viste stimulering med imiquimod om lag tre gonger så høgt genuttrykk som kontrollen, medan dei andre stimuleringane ikkje gav nokon effekt på genuttrykket. Leukocyttane frå blod viste eit om lag 1,4 gongar så høgt uttrykk av IgT ved stimulering med poly I:C. Generelt hadde

stimulering med TLR-ligandar liten effekt på genuttrykket av Ig, og det vart ikkje observert nokon signifikante verdiar i datasettet.

Påfallande for resultatane frå dette forsøket, var at leukocytane frå blod viste auka uttrykk av alle gen etter stimulering med nonCpG. Desse verdiane er ikkje statistisk signifikante, men det er like fullt interessant. For å verifisere at dei ulike stimuleringane fungerte generelt på leukocyttopopulasjonen, testa vi uttrykk av Mx1 etter stimulering med ligandane, vist i figur 20.



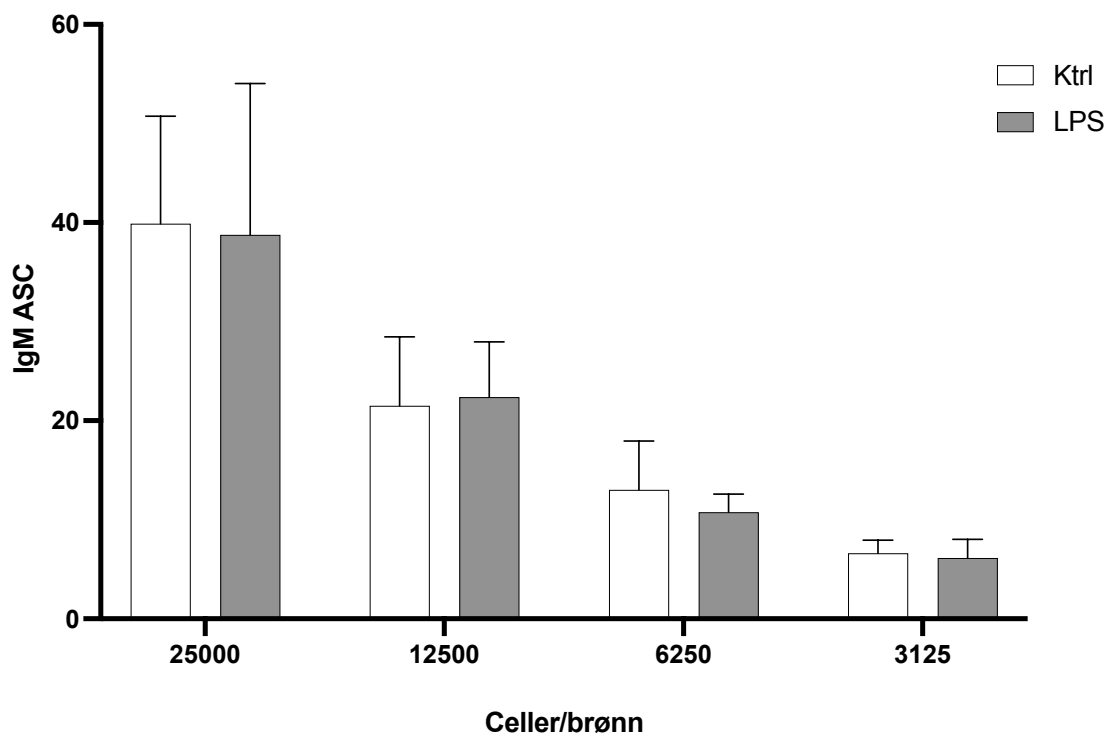
**Figur 20: Genuttrykk i leukocytar frå hovudnyre og blod frå laks stimulert med LPS, ulike TLR-ligandar og type I-IFN.** Leukocytar vart isolert frå hovudnyre og blod frå frisk, atlantisk laks og sådd ut i 48-brønnars Brett (2,5 mill. celler/brønn). Cellene vart stimulert med nonCpG (2  $\mu$ M), CpG (2  $\mu$ M), LPS (50  $\mu$ g/ml), Imiquimod (1  $\mu$ g/ml), poly I:C (1  $\mu$ g/ml), IFNa1 (1000 u/ml) og IFNc (1000 u/ml) i 24 og 48 timar. Cellene vart hausta og RNA isolert. cDNA ble syntetisert (input=500 ng). Genuttrykket vart målt ved qPCR og er presentert som relativt uttrykk der kvar Ct-verdi er normalisert mot referansegenet ELF1aB. Søylen i grafen viser gjennomsnittsverdiar  $\pm$ standardavvik (n=3 individ for hovudnyre 24t og blod 24t og n=2 for hovudnyre 48t). Signifikansnivå er satt til 0,05 der  $p < 0,05$  svarar til (\*).

Sett bort frå LPS, gav alle stimuleringane ein oppregulering av uttrykk av Mx1. I cellene frå blod inkubert i 24 timar gav stimulering med IFNa1 ein signifikant auke i genuttrykk av Mx1 med ~24 gongar høgare genuttrykk enn kontrollen. Genuttrykket av Mx1 etter stimulering viste at stimuleringsløysingane hadde stimulert leukocytane.

## 5.4 Sorterte IgM<sup>+</sup> B-celler i ELISpot-analyse

For å kunne studere direkte effektar av LPS og TLR-ligandar på differensiering av B-celler til ASC må ein ha reine kulturar av desse cellene til brukt i ELISpot. Her utførte vi eit pilot-prosjekt med sorterte IgM<sup>+</sup> B-celler i ELISpot i eit konsentrasjonsstudie. Dette vart gjort for å finne ut kor mange sorterte IgM<sup>+</sup> B-celler det ville vere hensiktsmessig å så ut i kvar brønn på ELISpot-plata for å sikre optimale forhold for differensiering til IgM<sup>+</sup> ASC, samt riktig avlesing med programvara. ELISpot på sorterte B-celler hadde ikkje tidlegare blitt gjort i forskingsgruppa.

Leukocyttar frå laks vart isolert og talt. Deretter vart IgM<sup>+</sup> celler merka med anti-IgM og ein fluoriserande markør (som beskrive i 4.6.2) av Shiferaw Jenberie. Ved hjelp av maskina FACS Aria III vart IgM<sup>+</sup> B-celler sortert ut frå leukocyttpopulasjonen. Sorterte IgM<sup>+</sup> B-celler vart sådd ut på ei ELISpot-plate dekt med anti-IgM i ulikt antal celler, som vist i figur 21. Det vart sådd ut IgM<sup>+</sup> B-celler som ikkje var stimulerte og celler stimulerte med LPS (50 µg/ml) direkte i ELISpot-plata. Etter 72 timar vart ELISpot-plata avlesen etter protokoll.



**Figur 21: Effekt av stimulering med LPS på sorterte IgM<sup>+</sup> B-celler frå leukocyttpopulasjonen frå milt hos frisk, uvaksinert laks.** Ei ELISpot-plate vart dekt med anti-laks IgM. Sorterte IgM<sup>+</sup> B-celler vart sådd i duplikat (100 µl/brønn) i ulike konsentrasjonar (25000, 12500, 6250 og 3125 celler/brønn) på ELISpot-plata og stimulert med LPS (50 µg/ml). Etter 72 timar vart ELISpot-plata framkalla. Søylen i grafen viser gjennomsnittsverdiar av IgM<sup>+</sup> ASC ± standardavvik (n=4 individ). Det vart ikkje funne nokon signifikante verdiar i datasettet.



Prosentdel prikkar var tilnærma lik for dei ulike celletala og viste ein lineær samanheng. Vi såg ingen effekt på B-cellene ved stimulering med LPS. Det var flest IgM<sup>+</sup> ASC per utsådde celler i gruppa kor det vart sådd ut 6250 IgM<sup>+</sup> B-celler, med ein prosentdel på 0,20% for den ikkje-stimulerte gruppa. Den lågaste prosentdelen vart observert i gruppa der det vart sådd ut 25 000 IgM<sup>+</sup> B-celler, kor IgM<sup>+</sup> ASC utgjorde 0,15% av cellene i gruppa stimulert med LPS.

## 6 Diskusjon

Vaksinane som hovudsakleg blir nytta i oppdrettsnæringa i dag består av inaktivererte bakterie- og viruskomponentar formulert i olje og vert injiserte i bukhola. Vaksinane induserer humorale immunresponsar kor B-celler dominerer. Kunnskap om korleis B-celler blir aktiverte og gir langvarig beskyttelse, er avgrensa og framleis lite forstått hos fisk. I tillegg til klonalt rearrangerte BCR, uttrykker laks sine B-celler ulike TLR-reseptorar, som gjer at dei direkte kan respondere på PAMPar som ulike mikroorganismar uttrykker. Til no veit vi at laksen sine B-celler uttrykker TLR3, TLR8a1, TLR9, TLR21 og TLR22 (Jenberie et al., 2018). PAMPar, som til dømes LPS, ssRNA og dsRNA, kan binde desse reseptorane og indusere medfødde immunresponsar hos fisk. Det er vist at nokre slike TLR-ligandar også kan påverke den adaptive immunresponsen hos fisk, ved å indusere kraftigare og meir langvarige immunresponsar når dei blir tilsett som adjuvansar i vaksinar, samanlikna med vaksinar gitt utan slik adjuvans (Thim et al., 2012). I studiet vårt har vi testa kva for verknad TLR-ligandane CpG, LPS, imiquimod og poly I:C har på leukocyttopulasjonar frå hovudnyre, milt, blod og bukhole frå laks til å differensiere til ASC. Kva for TLR-ligandar som gir effekt, kva for immunresponsar dei utløyser og kor effektive dei er, kan vere viktige bidrag for å utvikle meir effektive vaksinar i framtida.

### 6.1 Verknad av immunmodulatorar på B-celler frå laks

#### 6.1.1 Frekvens av ASC i hovudnyre og milt hos ikkje-stimulerte leukocyttar

Vi ønska å samanlikne antal ASC i forsøksfisken (naiv laks) vi har brukt i våre forsøk, mot det som er vist i andre forsøk i vår forskingsgruppe. Hos mus er beinmerg og milt organa kor ein i hovudsak finn plasmaceller (Choi et al., 2012), noko som samsvarar med den store mengda IgM<sup>+</sup> ASC vist i hovudnyre og milt hos laksefisk (Zwollo et al., 2008). I to studiar gjort av forskingsgruppa vår vart antal IgM<sup>+</sup> ASC målt ved dag 0 av forsøket og viser basalnivået ASC *in vivo* i ulike vev hos laks (Abrahamsen, 2019; Jenberie, 2020). Frekvensen av IgM<sup>+</sup> ASC var høgast i bukhola. Deretter følgde milt, og så hovudnyre med lågast frekvens.

Leukocytane i våre forsøk vart dyrka i 72 og 144 timar før vi bestemte andel IgM<sup>+</sup> ASC per 50 000 celler i hovudnyre, milt, blod og bukhole (figur 11A), og speglar dermed ikkje andelen celler ved dag 0 i forsøket. Forskjell i prosedyre gjer at resultata våre ikkje er direkte samanliknbare med dei nemnte studiane, då cellene vart inkubert opp til 144 timar. Det er

noko fleire ASC ved 72 timar enn ved 144 timar i leukocyttar frå hovudnyre og blod, noko som kan tyde på at cellene dør i kultur. Forskjellane i andel ASC mellom dei to tidspunkta er ikkje signifikante, men det er store ulikskapar mellom individa i desse dataene. Større grupper ville gitt meir robuste datamateriale og sikrere resultat.

I våre forsøk fann vi ein høgare frekvens av IgM<sup>+</sup> ASC i milt (243 ASC), kor denne etter 144 timar inkubasjon var om lag tre gongar høgare samanlikna med hovudnyre (84 ASC). I blod og bukhole var frekvensen av IgM<sup>+</sup> ASC lågast, med høvesvis 50 og 31 ASC per 50 000 leukocyttar ved 144 timar inkubering. Det vi ser er ulikt det som har vore sett i dei tidlegare studiane, kor det blir påvist høgast frekvens av ASC i bukholå (Jenberie et al., 2018). Bukholå er det organet med lågast utbytte av leukocyttar i alle våre forsøk, noko som gjorde at vi berre fekk undersøkt desse cellene ved eitt tidspunkt. Teknikken for å hauste celler frå bukhole er utfordrande, då ein må vaske grundig med vaskebufferen for at cellene skal løyse seg frå bukveggen, i tillegg til at det er vanskeleg å få ut all vaskebufferen frå bukholå. Det vart prøvd å motverke dette på best mogleg vis ved å vere nøyaktig og bruke god tid på haustinga. Hos regnbogeaure er det vist at ein finn flest kvilande IgM<sup>+</sup> B-celler i blod, ikkje den aktiverte forma kor antistoff blir skild ut (Zwollo et al., 2008). Dette kan vere med å forklare den lave mengda IgM<sup>+</sup> ASC hos ikkje-stimulerte leukocyttar frå blod i våre forsøk.

ASC i ikkje-stimulerte kontrollprøver kan anten stamme frå ein tidlegare eksponering for antigen eller at desse cellene skil ut IgM spontant (naturlege antistoff), slik som B-1 B-celler hos pattedyr gjer (Abbas et al., 2019). Vår forsøksfisk var uvaksinert og hadde ikkje fått påvist sjukdom tidlegare, anna enn infeksjon med *Clavochlamydia salmonicola* omtala i vedlegg 3. Dermed kan IgM<sup>+</sup> ASC som finst i organa frå før vere celler som spontant skil ut naturlege antistoff. Etersom fisken har gått på sjøvatn, som er ein potensiell inngangsport for mikroorganismar, kan vi likevel ikkje utelukke at fisken også kan ha gjennomgått annan infeksjon.

### **6.1.2 CpG, LPS og imiquimod stimulerer B-celler til å differensiere til ASC**

Det har lenge vore kjent at TLR-ligandar stimulerer B-celler frå mus til å differensiere til ASC (Coutinho et al., 1974; Krieg et al., 1995). Seinare er det blitt vist at B-celler hos laksefisk uttrykker fleire TLR, og at *in vitro* stimulering med ulike TLR-ligandar gir ein høgare sekresjon av antistoff (Abós et al., 2013; Jenberie et al., 2018). Hovudhensikta med dette studiet var å undersøke med ELISpot-analysar om stimulering med CpG, LPS,

imiquimod og poly I:C i 72 og 144 timar ville ha innverknad på antal IgM<sup>+</sup> ASC i leukocyttpopulasjonar frå hovudnyre, milt, blod og bukhole hos laks. Sidan det blir nytta relativt få individ (n=4) i kvart uttak, vil dette avgrense styrken i dei statistiske testane som er gjort. Dette har vi tatt omsyn til ved tolking av resultatata.

I forsøket viste vi at laksen sine B-celler responderer på CpG, LPS og imiquimod ved at andelen ASC auka samanlikna med kontrollprøvene (figur 12 og 15). Generelt var auka av andel ASC høgast ved den lengste inkuberinga på 144 timar, noko som kan kome av at jo lenger tid B-cellene er i kultur, dess meir vil dei dele seg. Frå desse celledelingane kan fleire B-celler utvikle seg til ASC. Berre hos leukocyttar frå milt og blod stimulert med CpG og LPS fann vi signifikante skilnader mellom stimulerte celler og deira ikkje-behandla kontrollar (figur 12B). Imiquimod viste stimulerande effekt etter 144 timar inkubering, særleg hos leukocyttar frå milt og blod, men dette var ikkje signifikant (figur 15). Non-CpG kontrollen stimulerte ikkje til fleire IgM<sup>+</sup> ASC. Frå qPCR-analysen (figur 13 og 16) kan vi slå fast at stimulering med dei syntetiske nukleinsyrene imiquimod og poly I:C har gitt oppregulering av genuttrykket av IFN $\alpha$ 1 og Mx1. Stimulering med CpG, LPS og imiquimod har gitt eit høgare genuttrykk av TNF- $\alpha$ . Sidan stimulantane har gitt responsar i leukocyttpopulasjonen i form av auka genuttrykk av dei ulike immun gena, kan vi slå fast at stimuleringsløysingane har fungert.

I vårt forsøk gav stimulering med CpG ei auke i frekvens av IgM<sup>+</sup> ASC i leukocyttar isolert frå alle veva som vart undersøkt (figur 12 og 15), samanlikna med den ikkje-stimulerte kontrollprøva. Ein tidlegare ELISpot-analyse vi gjennomførte viste også at stimulering med CpG gir høgare frekvens IgM<sup>+</sup> ASC etter stimulering i 144 timar og kan bli sett i vedlegg 4. I tidlegare studiar av laksefisk er det vist at direkte stimulering med CpG på sorterte IgM<sup>+</sup> B-celler gir auka sekresjon av IgM (Jenberie et al., 2018; Simón et al., 2019), noko våre resultat bygger under. For at CpG skal kunne aktivere B-cellene direkte, må B-cellene ha ein reseptor som kan binde CpG. CpG er ligand for TLR9 og TLR21 i fisk (Yeh et al., 2013), og det er vist at laks uttrykker begge desse reseptorane (Jenberie et al., 2018). Det er B-klasse CpG som stimulerer aktiveringa av B-celler (Vollmer et al., 2004). Denne klassen stimulerer ikkje til auka utskiljing av IFN  $\alpha/\beta$ , som klasse A og C CpG gjer (Strandskog et al., 2007). Resultata frå qPCR-kontrollen (figur 13 og 16) viser effektar i genuttrykket etter stimulering med CpG som samsvarar med verknaden ein klasse B CpG har på leukocyttkulturar.

Stimulering med LPS i våre forsøk gav auka frekvens av IgM<sup>+</sup> ASC i leukocyttpopulasjonane frå alle veva vi undersøkte. Dette resultatet blir også underbygga av ELISpot-analysen vist i vedlegg 4. Det vart berre sett signifikant auke av IgM ASC<sup>+</sup> etter 144 timar stimulering av leukocyttpopulasjonar frå milt og blod. Det er framleis ukjend kva for mekanismar LPS verkar gjennom hos laks. I likskap med vårt studie er det tidlegare vist at stimulering med LPS på leukocyttar frå hovudnyre hos laks gir auka antal IgM<sup>+</sup> ASC (Wold, 2018). LPS er også blitt nytta på sorterte IgM<sup>+</sup> celler frå milt hos regnbogeaure, kor behandlinga aukar evna desse cellene har til å skilje ut IgM (Abós et al., 2016). Sistnemnte studie foreslår at IgM<sup>+</sup> B-celler hos regnbogeaure må ha ein direkte måte for å sanse LPS på. Sidan laks ikkje uttrykker TLR4 som pattedyr sansar LPS via, må det finnast ein annan mekanisme for dette (Palti, 2011; Rawlings et al., 2012). I forsøk der uttrykket av genar for TLR1 og TLR2 er blitt undersøkt i beinfisk, blir det foreslått at TLR1 og TLR2 bidreg i attkjenning av LPS (Wang et al., 2013; Wei et al., 2011; Wu et al., 2008). TLR1 er blitt identifisert hos regnbogeaure (Palti et al., 2010), medan TLR2 er ufullstendig studert hos laksefisk. Ein annan moglegheit for stimulering kan vere at polysakkarid-delen av LPS binder direkte til B-celle-reseptoren. Fisk sine B-celler liknar B-1 B-celler hos pattedyr (Abós et al., 2013; Haugland et al., 2012; Li et al., 2006). B-1 B-celler er kjend for å produsere antistoff som er spesifikke for ulike karbohydrat som finst i celleveggen hos bakteriar, som til dømes LPS (Abbas et al., 2019). Det trengs vidare forskning for å finne ut meir om kva for PRR som deltek i attkjenning av LPS og gjennom kva for bestemte mekanismar LPS stimulerer leukocyttar til å differensiere til ASC hos laks.

Imiquimod etterliknar ssRNA og blir gjenkjent av TLR7 i pattedyr (Akira et al., 2003), men det er ikkje kartlagt eksakt kva for reseptor som binder imiquimod hos fisk. TLR7 er identifisert hos laks (Lee et al., 2013), men stimulering med imiquimod er ikkje tidlegare blitt studert på laksen sine B-celler. Vårt forsøk viste at andelen ASC auka i leukocyttar frå hovudnyre, milt, blod og bukhole frå laks etter stimulering med imiquimod og det var ved den lengste stimuleringa (144 timar) vi såg dei høgaste responsane. Det vart ikkje sett signifikant auke av ASC etter stimuleringa. Tidlegare studiar viser at stimulering med imiquimod på leukocyttar induserer ulike ISGar, som til dømes Mx1 (Kileng et al., 2008). I forsøk der IFN $\alpha$  blir nytta som stimulant på sorterte IgM<sup>+</sup> B-celler frå regnbogeaure, aukar sekresjonen av IgM i perifert blod (Benedicenti et al., 2020). Dermed er det ei moglegheit at imiquimod verkar inn på andel ASC indirekte gjennom produksjon av IFN i leukocyttpopulasjonen.

Poly I:C binder TLR3 i pattedyr (Kato et al., 2006). Det er ikkje fullt ut studert korleis poly I:C verkar hos fisk, men det er foreslått at TLR22 i fisk kan vere analog til TLR3 i pattedyr, og dermed binde poly I:C (Matsuo et al., 2008). Det er vist at laks uttrykker både TLR3 og TLR22 (Jenberie et al., 2018). I våre undersøkingar gav stimulering med poly I:C på leukocyttar frå laks ingen signifikant auke i frekvens av ASC. Tidlegare studiar på mus viser at direkte stimulering av B-celler med poly I:C ikkje har innverknad på produksjonen av IgM (Rubtsov et al., 2008). Ein annan studie på mus viser at ko-stimulering med poly I:C og Pam3CSK4 (ein TLR2-ligand) aukar antistoffrespons til vaksining *in vivo*, samt aukar aktiveringa av B-cellene *in vitro* (Weir et al., 2017). Desse studiane viser motspråkande resultat, og poly I:C sin effekt på B-celler er framleis usikker. Det er kjend at poly I:C stimulerer til produksjon av type I-IFN i beinfisk (Zhou et al., 2014). Det er også vist at intraperitoneal administrering av poly I:C stimulerer til auka beskyttelse mot SAV-smitte hos atlantisk laks, ved å oppregulere type I-IFN og Mx1 (Strandskog et al., 2011). Vi såg signifikant oppregulert uttrykk av både IFN $\alpha$ 1 og Mx1 ved stimulering med poly I:C knytt til det innleiande ELISpot-forsøket (figur 13). Sidan vi ved qPCR såg at poly I:C gir immunreaksjonar i leukocyttopopulasjonen, men ikkje stimulerte til fleire IgM<sup>+</sup> ASC i ELISpot-analysen, kan det vere at poly I:C ikkje har ein effekt på B-celler og deira differensiering til ASC. Dette sett også spørsmålsteikn ved effekten av type I-IFN på B-celler i laks, ettersom poly I:C er ein kjent stimulant av type I-IFN i leukocyttar frå laks *in vitro* (Svingerud et al., 2012). Resultata foreslår at poly I:C gir antivirale immunresponsar hos fisk, men at desse ikkje aktiverer det adaptive immunsystemet i form av å aktivere B-celler til ASC.

I alle forsøksoppsetta våre var det vanskeleg å slå fast kva for mekanisme dei ulike stimuleringane verka gjennom, då heile leukocyttopopulasjonen var til stades i brønnane. Det kan vere tilfelle at TLR-ligandane verkar på andre immunceller enn B-celler til å produsere ulike cytokinar, som i sin tur kan påverke B-celler til å differensiere til ASC. Vi har vist at IFN $\alpha$ 1 og Mx1 blir oppregulert ved stimulering med TLR-ligandane (figur 13 og 16), noko som viser at stimuleringa gir IFN-reaksjonar i leukocyttopopulasjonen. Tidlegare studiar viser at stimulering av makrofag-liknande celler med cytokinar og TLR-ligandar aukar transkripsjonsnivå av BAFF (B-cell activating factor) og APRIL (a proliferation inducing ligand) (Wold, 2018). BAFF og APRIL kan aktivere B-celler og auke deira overleving. Det er også mogleg at B-celler sjølv produserer cytokinar, som i sin tur verkar inn på B-cellene og deira differensiering til ASC i ein feedback-reaksjon. For å finne ut meir om den direkte

effekten IFN og TLR-ligandar har på B-celler, hadde det vore interessant å gjere dei same stimuleringane på sorterte B-celler. Då kan ein sikrare seie at effektane som blir sett, kjem frå reaksjonar i B-cellene og ikkje av andre immunceller i leukocyttpopulasjonen.

Ein annan måte immunmodulatorane kan verke på B-celler i leukocyttpopulasjonen, er indirekte via T-hjelpe-celler. Dersom stimulantane induserer økt produksjon av IFN, kan dette aktivere T-hjelpe-celler som uttrykker CD40L og skil ut cytokinar. Binding av CD40L til CD40 aktiverer B-celler, og utskilde cytokinar kan auke B-cellene si celledeling (Abbas et al., 2019). Tidlegare studiar har vist at cytokinar frå T-celler i kombinasjon med CD40L betrar overleving og aukar celledeling av IgM<sup>+</sup> B-celler, samt sekresjon av IgM hos regnbogeure (Abos et al., 2020) og viser dermed at dette finn stad hos laksefisk.

Når vi samanliknar dei ulike veva, var det i leukocyttar frå milt andelen ASC auka mest etter stimulering (figur 12 og 15). Tidlegare forsøk gjort av vår forskingsgruppe viser at 30% av alle leukocyttar i blod og milt er IgM<sup>+</sup> celler, medan talet for hovudnyre og bukhole ligg mellom 5-10% (Jenberie et al., 2018). Hovudnyre er både eit primært immunologisk organ, kor B celler blir danna og modna, og eit sekundært immunologisk organ der desse B-cellene blir aktiverte og blir til plasmaceller (Zwollo et al., 2005). Modne B-celler vil migrere frå hovudnyre til milt og andre sekundære lymfoide organ, kor dei kan bli aktiverte av antigen. Dette kan forklare kvifor dei største responsane etter stimuleringane som er gjort skjedde hos leukocyttar frå milt og blod, då desse veva inneheld fleire modne, naive IgM<sup>+</sup> B-celler, samanlikna med hovudnyre og bukhole. Naive IgM<sup>+</sup> B-celler vil, ved binding til stimulantane (TLR-ligandar), kunne differensiere til IgM<sup>+</sup> ASC. *In vivo* vil dei ulike stadia av B-celler kontinuerleg bli distribuert mellom ulike lymfoide organ, men dette er ikkje mogleg i eit *in vitro* cellestudie, som det vi har gjort her.

At B-cellene differensierer til ASC ved stimulering med CpG, LPS og imiquimod, er lovande resultat med tanke på utvikling av vaksinar. CpG er allereie vist å kunne fungere som adjuvant i fiskevaksinar (Thim et al., 2012). Uavhengig av verknadsmekanisme viser stimulering med LPS og imiquimod i våre forsøk også innverknad på antal IgM<sup>+</sup> ASC, som foreslår at desse ligandane i framtida kan bli tatt i bruk i vaksinar for å forsterke immunresponsen. For å vidareutvikle bruken av desse ligandane i framtidig vaksineproduksjon, er det nødvendig å finne ut meir om verknadsmekanismene deira og korleis dei indirekte eller direkte påverkar B-celler sin differensiering til ASC.

## 6.2 Undersøking av genuttrykk av IgM, IgD og IgT i leukocyttpopulasjon frå laks etter stimulering med TLR-ligandar og IFN

Vi ville teste om transkripsjonsnivået for immunoglobulinane IgM, IgD og IgT vart endra etter stimulering av leukocyttar frå blod og hovudnyre med dei ulike TLR-ligandane og type I-IFN. Det vart ikkje observert nokon signifikante skilnader i uttrykket av immunoglobulinane mellom kontrollar og stimulerte celler i datasettet (figur 18 og 19).

Forholdet mellom membranbunden IgM (mIgM) og sekret IgM (sIgM) seier noko om modninga av B-celler. mIgM vil dominere hos B-celler før dei har differensiert til plasmaceller, medan sIgM vil dominere hos plasmaceller. Hos dei ikkje-stimulerte kontrollprøvene var basalnivået av sIgM- og mIgM-transkripter tilnærma likt, men mIgM var høgare uttrykt enn sIgM i celler frå hovudnyre inkubert i 48 timar (figur 18). Dette er ulikt det forskingsgruppa vår tidlegare har rapportert, der det er vist at ikkje-stimulerte, sorterte IgM<sup>+</sup> B-celler frå hovudnyre, milt og blod har om lag 16 gonger høgare uttrykk av sIgM mRNA enn mIgM mRNA (Jenberie et al., 2018). I nemnte forsøk er det nytta MACS-sorterte IgM<sup>+</sup> B-celler, som blir merka med anti-IgM før sortering. Binding av anti-IgM til BCR på B-cellene kan ha bidratt til at B-cellene differensierer til ASC, og dette er moglegvis grunnen til det høge nivået av sIgM-transkripter. I vårt forsøk nytta vi heile leukocyttpopulasjonen, noko som gjer at resultatane frå desse to forsøka ikkje er direkte samanliknbare.

Til tross for at leukocyttar stimulerte med CpG og LPS frå ulike vev viste ein signifikant auke av ASC i leukocyttpopulasjonen i ELISpot-forsøka, finn vi ikkje auka mengd sIgM mRNA hos leukocyttar stimulert på same vis. Det er tidlegare vist at stimulering med CpG på sorterte IgM<sup>+</sup> B-celler frå blod gir ei gradvis auke i induksjon av genuttrykk av sIgM, etter 12, 24 og 48 timar (Jenberie et al., 2018). I vårt forsøk var det ein reduksjon i mengd sIgM-transkripter hos CpG-stimulerte leukocyttar frå både hovudnyre og blod. For blod hadde vi berre eitt tidspunkt (24 timar), men det var like fullt forventet å sjå ei liknande auke som tidlegare rapportert. Det at sIgM ikkje blir oppregulert i leukocyttpopulasjonen ved stimulering, kan gi indikasjonar på at noko i forsøket ikkje har fungert slik det skal. Ved undersøking av uttrykk av Mx1 etter stimulering (figur 20), ser vi ein oppregulering ved stimulering med dei fleste stimulantane.

Forsøk med sorterte IgM<sup>+</sup> B-celler frå milt hos regnbogeaure viser at stimulering med LPS gir eit auka uttrykk av både mIgM og total IgM (Abós et al., 2016), men dette såg vi ikkje i vårt



forsøk. Ved stimulering med poly I:C, IFN $\alpha$ 1 og IFN $\gamma$  i 24 timar, såg vi ei lita oppregulering av mIgM i leukocyttar frå blod, men dette er ikkje signifikante verdiar (figur 18). Det er tidlegare vist at CpG ikkje induserar signifikant induksjon av mIgM i hovudnyre, milt eller blod (Jenberie et al., 2018), noko vi heller ikkje såg i vårt forsøk.

Nivået av IgD og IgT transkripter var lågare enn for IgM i både hovudnyre og blod (figur 19). Tidlegare forskning på beinfisk viser også at IgD og IgT er lågare uttrykt enn IgM i prøver frå blod (Hirono et al., 2003; Makesh et al., 2015; Ryo et al., 2010). Våre resultat stadfestar dette. IgD vart nedregulert i leukocyttar frå hovudnyre inkubert med CpG og imiquimod i 48 timar. Ved bruk av dei same stimulantane i ELISpot-forsøka såg vi eim høgare frekvens av IgM<sup>+</sup> ASC hos leukocytane som vart testa. Når ei B-celle differensierer til IgM-utskiljande plasmacelle, vil den slutte å uttrykke IgD på overflata. Nedgangen i genuttrykket for IgD ved stimulering med CpG og imiquimod kan kome av at B-cellene differensierer til plasmaceller og mister uttrykk av IgD på overflata. Det finst få markørar for plasmaceller i fisk og det er difor vanskeleg å studere desse vidare. Dersom vi hadde nytta sorterte B-celler kunne vi undersøkt genuttrykk av Blimp1, for å finne ut om cellene vi måler i ELISpot er plasmaceller eller plasmablastar. Ein faktor som talar i mot at B-cellene differensierer til plasmaceller, er at vi ikkje ser eit auka genuttrykk av sIgM ved stimulering med CpG og imiquimod.

### **6.3 IgM<sup>+</sup> ASC i leukocyttar frå milt stimulerte med type I-IFN**

Det er framleis usikkert korleis interferonar verkar inn på produksjon av antistoff hos laks *in vivo*. Det er vist at Type I-IFN hos pattedyr kan verke inn på funksjonar til B-celler på ulike måtar, som til dømes deira uttrykk av TLR, produksjon av cytokinar og overleving og differensiering (Bekeredjian-Ding et al., 2005; Braun et al., 2002; Jego et al., 2003). B-celler hos fisk uttrykker ulike typar TLR (Abós et al., 2013; Jenberie et al., 2018). I tidlegare forsøk er sorterte IgM<sup>+</sup> B-celler frå blod hos regnbogeaure blitt stimulert med type I-IFN (IFN $\alpha$ ), kor det etter tre dagar inkubering blir sett ei signifikant auke i antal IgM<sup>+</sup> ASC samanlikna med den ikkje-stimulerte kontrollen (Benedicenti et al., 2020). På bakgrunn av dette ville vi undersøke om pre-stimulering med type I-IFN har innverknad på antal IgM<sup>+</sup> ASC når vi seinare stimulerte leukocyttopulasjonar frå milt hos laks med CpG og LPS.

I vårt forsøk stimulerte vi leukocyttar frå laks med IFN $\alpha$ 1 og IFN $\gamma$  først i 72 timar. Deretter tilsette vi TLR-ligandane CpG og LPS og gjorde ELISpot-avlesingane 72 og 144 timar seinare. Det vart også tatt med celler som berre var stimulert med anten IFN eller TLR-ligandar. Vi fant ingen signifikant auke i antal IgM<sup>+</sup> ASC ved nokon av behandlingane ved

begge tidspunkta (figur 17). Sidan det både i vårt studium og i tidlegare er vist at stimulering med CpG og LPS *in vitro* gir ei auke i IgM<sup>+</sup> ASC, var dette eit uventa resultat. Når vi i dette forsøksoppsettet ikkje kan reprodusere den effekten stimulering med LPS og CpG har vist i våre og andre sine tidlegare forsøk, er det grunn til å tru at noko kan ha gått gale i gjennomføringa av forsøket.

Den lange inkuberinga kan vere ein faktor som verker inn på antal ASC, då ASC har dårleg overlevingsevne i kultur. I tidlegare forsøk har leukocytter frå hovudnyre hos laks blitt inkubert med type I-IFN og LPS i 5 og 11 dagar (Abrahamsen, 2019). Desse stimuleringane gir ingen signifikante auke i antal ASC, og antal IgM ASC gjeng drastisk ned mellom dag 5 og 11. Ulikt frå vårt forsøk gir stimulering med LPS eit høgare antal IgM<sup>+</sup> ASC etter både 5 og 11 dagar, samanlikna med kontrollgruppa. Dette stadfestar at LPS fungerer som ein positivt kontroll, noko vi ikkje såg i vårt forsøk.

Sidan det ikkje blir sett nokon effekt av stimulering med IFN på leukocytane, er det mogleg at ELISpot ikkje er optimalisert riktig for denne analysen. I våre tidlegare forsøk med ELISpot, har stimulering blitt gjennomført i 96-brønners plater, før cellesuspensjonane har blitt overført til ELISpot-plater. Det er mogleg at direkte tilsetning av CpG og LPS i ELISpot-platene kan ha negativ innverknad på cellene sin evne til å differensiere til IgM<sup>+</sup> ASC. Resultata i dette forsøket er berre innleiande studiar på IFN sin effekt i leukocytter frå laks, som det ikkje vart tid til å følgje opp vidare.

## 6.4 Sorterte B-celler i ELISpot-analyse

Stimulering med CpG og LPS i dei tidlegare forsøka våre viste ei signifikant auke av ASC i leukocytter isolert frå milt og blod hos laks (figur 12B). For å undersøke om denne auka skuldast bidrag frå andre leukocytter, eller om det er direkte stimulering av B-cellene, vart det forsøkt å sortere ut IgM<sup>+</sup> B-celler frå leukocyttopulasjon frå milt. For å kunne nytte ELISpot til å studere sorterte IgM<sup>+</sup> celler, måtte vi først arbeide fram ein protokoll for slikt arbeid. I dette forsøket (figur 21) vart den direkte effekten av LPS-stimulering på B-celler undersøkt, samstundes som vi gjorde eit konsentrasjonsstudie for å bestemme antal IgM<sup>+</sup> celler vi burde så ut i ein ELISpot-brønn for optimale avlesingar.

ELISpot-avlesingane viste at i ein populasjon av sorterte IgM<sup>+</sup> celler utgjorde IgM<sup>+</sup> ASC berre mellom 0,15-0,20% av dei sorterte cellene, med 40 ASC per 25 000 leukocytter (figur 21). Til samanlikning såg vi opp til 294 IgM<sup>+</sup> ASC per 50 000 leukocytter i ELISpot-analysen

i kontrollgruppa for leukocyttar frå milt inkubert i 72 timar (figur 15). Dette utgjer ein prosentdel på 0,59%. Frå tidlegare studiar er det kjend at om lag 30% av leukocyttopopulasjonen i milt hos laks er IgM<sup>+</sup> celler (Jenberie et al., 2018). Datamateriale frå våre ELISpot-analyser viser at berre ein liten del av sorterte IgM<sup>+</sup> celler var ASC, og LPS stimulering gav inga auke i talet på ASC hos dei sorterte IgM<sup>+</sup> B-cellene. Sidan LPS var med som ein positiv kontroll, og den ikkje stimulerte til fleire ASC, er det grunn til å tru at det har skjedd noko feil under gjennomføringa av ELISpot, eller at det er noko gale med stimuleringsløysingane.

Når B-celler blir aktivert for å skilje ut antistoff, er i tillegg til stimulering av BCR eller TLR ofte andre faktorar som også bidreg til dette. Det er til dømes ulike cytokinar og CD40L (Abbas et al., 2019). Når ein sorterer ut IgM<sup>+</sup> celler frå heile leukocyttopopulasjonen, er det mogleg at B-cellene mister eller får redusert evna til å differensiere til ASC, fordi nemnte viktige faktorar manglar. Dette kan vere med å forklare dei låge tala av ASC i ein rein populasjon av IgM<sup>+</sup> B-celler, og kvifor dei sorterte cellene ikkje blir påverka av stimulering med LPS.

Dersom vi hadde hatt meir tid, ville det ha vore interessant å undersøke uttrykk av transkripsjonsfaktorane Blimp1 og Pax-5 i sorterte B-celler etter stimulering. Pax-5 er eit protein som er viktig for normal utvikling av B-celler og blir uttrykt i alle stadium av B-cellene si utvikling hos pattedyr, heilt fram til plasmacelle-stadiet, kor det blir nedregulert (Henderson et al., 1998). Pax5 er påvist hos regnbogeaure (Zwollo et al., 2008). Blimp1 er eit protein som krevst for utvikling av ASC og vedlikehald av lenge-levande plasmaceller (Abós et al., 2016), og fungerer som ein transkripsjons-repressor som skiftar uttrykk av Ig frå membranbunden til sekret form (Lin et al., 2002). I tidlegare forsøk med sorterte IgM<sup>+</sup> B-celler frå regnbogeaure blir det vist eit høgare transkripsjonsnivå av Pax-5 i seks ulike vev, som foreslår at dei fleste IgM<sup>+</sup> celler er i ikkje-aktiverte stadium i naiv fisk (Abós et al., 2013). Det hadde vore interessant å undersøke genuttrykket av Pax-5 og Blimp1 i B-celler frå laks etter stimulering, for å sjå om uttrykket av Blimp1 aukar. Dersom det er tilfelle, kan ein seie at ASC som er til stades er plasmaceller.

Ved bruk av FACS Aria III til sortering av cellene, må ein nytte anti-laks IgM antistoff for å merke cellene. Dette er ei svakheit i metoden, fordi bindinga av anti-laks IgM kan vere med på å aktivere B-cella. Dersom ein då gjer vidare forsøk på dei sorterte B-cellene, kan det vere at dei allereie er aktiverte, og har dårleg overlevingsevne. Ein ny stimulering, som det vi gjer

med LPS, kan dermed miste effekten. Å nytte allereie aktiverte B-celler i vidare forsøk er ikkje optimalt. Det bør gjerast vidare studiar for å undersøke aktivering og overleving hos B-celler etter sortering i FACS-maskina, slik at dette ikkje verker inn på framtidige forsøk. I løpet av forsøksperioden vart maskina FACS Aria III øydelagt og måtte reparerast. Det gjorde at vi ikkje fekk gjenteke forsøket for å eventuelt bekrefte resultatata vi ser.

## **6.5 Eksperimentelle føresetnader og metode**

### **6.5.1 Føresetnader for forsøk**

Det er alltid moment av usikkerheit i forskning når ein arbeider med levande celler og dyr som er eksponerte til miljøet. Fisken som vi brukte i våre forsøk, gjekk i sjøvatn. Å nytte sjøvatn i produksjon av fisk til forskning tilfører ein grad av usikkerheit, då det er mogleg at patogene mikroorganismar kan kome inn i anlegget med sjøvatnet. I februar vart det påvist smitte med POX-virus på ei gruppe av fisk i anlegget. Fisken vi har brukt i våre forsøk vart undersøkt for ulike agens (vedlegg 3), men det vart ikkje påvist POX-virus i denne fiskegruppa.

Vi gjennomførte ikkje gjellescoring eller lytekontroll på fisken brukt i forsøka. Vi har undersøkt fisken før den er blitt tatt ut vev frå, og alle fisk har sett friske og normale ut. I det siste uttaket vi brukte celler frå, var vi ikkje sjølve med til Kårvika, men fekk vev frå neste års masterstudentar. All fisk som det vart henta vev frå, såg normal ut (pers. komm., Marte Zachariassen).

Fisken som vi tok prøver av, gjekk i kar med mange andre individ. Ved jamne mellomrom vart det henta ut fisk frå denne tanken. Då vart nivået av vatn i tanken senka, slik at håving av fisk vart enklare. Ein slik inntrenging i miljøet kan stresse fisken, noko som kan auke kortisolnivået i blodet. Dersom fisken er stressa over lang tid, kan det påverke kor mottakeleg fisken er for sjukdom (Tort, 2011). Eit auka kortisolnivå over lengre tid kan også hemme produksjon av B-lymfocytter og IgM ASC-responsar hos anadrom fisk (Zwollo, 2018).

Analysane i denne oppgåva er generelt gjort på eit lite antal individ, (n=1 til 4). Undersøking av fleire individ ville gitt meir robuste datamateriale og moglegvis ikkje så store standardavvik, noko som er verdt å merke seg for vidare arbeid på området.

### **6.5.2 ELISpot for total IgM ASC populasjonar**

Eit ELISpot-assay for B-celler vart vald for å kartlegge endring i antal IgM<sup>+</sup> ASC celler etter stimulering med TLR-ligandar og interferonar. Ved bruk av ELISpot kan resultatata bli påverka

av fleire faktorar. Det kan ha innverknad om det er fleire personar som gjennomfører uttak av organ, størrelsen på fisken, kor mykje vev ein får ut av fisken og om forsøka blir gjort på ulike fiskegrupper gjennom forsøksperioden. Det blir nytta levande celler, og det er dermed heilt avgjerande med riktig lagring og behandling av cellene under utføring av metoden.

Ved ELISpot kan ein oppleve problem med at bakgrunnen av membranen på ELISpot-plata blir farga. Høg bakgrunnsfarging kan kome av at membranen er sprukken eller at TMB-substratet har vore for lenge i brønnane. Dette kan føre til at kontrasten mellom prikkane og bakgrunnen blir for lav, og at dataprogrammet dermed ikkje klarar å skilje prikkane frå bakgrunnen. For å unngå bakgrunnsfarging er det viktig med grundig vasking av brønnane, for å unngå ikkje-spesifikk binding av IgM til membranen. Blokkering med BSA før leukocytane blir tilført brønnane er også viktig for å hindre at IgM binder uspesifikt til membranen. I våre forsøk såg membranane fine ut ved avlesing.

Det er mange steg i ein ELISpot-analyse og det er derfor mange fallgruver i gjennomføringa. Det er heilt avgjerande at det er riktige reagensar som blir brukt og på riktig måte. Dette fekk vi erfare då det vart nytta feil substrat for farging av brønnane. Dette substratet var ikkje spesifikt for HRP-konjugatet i komplekset festa på membranen i ELISpot-plata, og dermed vart ikkje IgM<sup>+</sup> ASC farga. Vi gjennomførte også nokre ELISpot-analysar kor vi ikkje fekk fram prikkar i brønnane, og årsaka til dette er framleis ukjend. Oversikt over alle forsøk er gitt i tabell 5, der forsøk utan resultat er merka med «\*».

### **6.5.3 Optimale konsentrasjonar av TLR-ligandar**

For å finne optimale konsentrasjonar for kvar TLR-ligand, vart leukocytar frå hovudnyre og milt stimulert med ulike konsentrasjonar av CpG, poly I:C og imiquimod (figur 14). Medan det hos leukocytar frå hovudnyre ikkje vart påvist nokon signifikant ulikskap i effekt av ulike CpG-konsentrasjonar testa, viste leukocytane frå milt eit signifikant auka antal IgM<sup>+</sup> ASC ved stimulering med 5 µM CpG. Vi valde å halde fram med stimulering med 2 µM CpG, ettersom denne konsentrasjonen har vore nytta i same type forsøk tidlegare (Jenberie et al., 2018).

Stimulering med poly I:C i ulike konsentrasjonar gav ingen signifikante effektar. I vidare forsøk, kor vi nytta konsentrasjon på 1 µg/ml, vart det framleis ikkje påvist nokon respons ved stimulering med poly I:C, eit resultat som vart reproduisert i vidare forsøk. Lågare

konsentrasjonar vart ikkje testa, og vi kan difor ikkje utelukke heilt at desse ville ha hatt ein effekt.

Ved stimulering med imiquimod viste den lågaste konsentrasjonen, 1 µg/ml, størst respons. Antal IgM<sup>+</sup> ASC auka etterkvart som konsentrasjonen med imiquimod minka. Vi burde derfor ha undersøkt konsentrasjonar lågare enn 1 µg/ml, men dette vart det dessverre ikkje tid til. I vidare forsøk etter at konsentrasjonen av imiquimod var redusert, vart responsane hos leukocyttar frå alle vev høgare ved stimulering med imiquimod (figur 15).

#### **6.5.4 RT-qPCR av stimulerte leukocyttar**

I midten av mars gjennomførte vi ei qPCR-køyring (tabell 5) der resultata frå leukocyttar frå milt vart ekskludert, då vi observerte ein ekstra topp i smeltekurva i qPCR. Då reagensane frå kitet Quantitect Reverse transcriptase vart alikvotert, vart det oppdaga presipitat i botnen av røyret med RT-buffer, som var vanskeleg å få løyst. Kitet vart testa på RNA som det tidlegare har vore køyrd qPCR på. Det vart samstundes nytta restar frå eit eldre Quantitect Revers transcriptase-kit slik at det frå same RNA vart laga cDNA frå det nye og det gamle kitet. Ved qPCR var det meir enn 10 Ct-verdiar lågare uttrykk av elongeringsfaktor i cDNA laga med det nye kitet, samanlikna med det gamle. Qiagen vart kontakta, og dei kunne bekrefte at dei hadde hatt problem med kitet med det aktuelle batch-nummeret (Pers. komm., Henriette Nordli).

### **6.6 Vidare forskning**

Vidare forskning på å nytte interferonar og TLR-ligandar som adjuvansar i vaksinar til fisk vil vere viktig for i framtida å kunne produsere vaksinar som gir fisk eit betre vern mot virussjukdommar. TLR blir uttrykt av mange celletypar, og når desse blir aktiverte, kan dei regulere B-cellene sin funksjon. Å forstå korleis dei medfødde signalvegane bidreg i humorale responsar vil gi eit betre grunnlag for å utvikle vaksinar. Å optimalisere ELISpot-metoden til ein måte kor membranen kan bli dekkja av heile virus- eller bakteriepartiklar vil vere viktig for å kunne studere spesifikke B-celle-responsar hos fisk, og å utvide forskinga på TLR-ligandar og IFN som adjuvansar i vaksinar.

DNA-vaksinar med plasmid som kodar for virale protein, og DNA-vaksinar ko-injisert med plasmid som kodar for type I-IFN, vil truleg bli ein stor del av denne utviklinga, då slike vaksinar allereie er på marknaden og har god innverknad på sjukdomsutbrot. For å effektivt

kunne nytte interferonar som adjuvansar, vil det bli avgjerande å finne ut av dei direkte interaksjonane mellom type I-IFN og B-celler hos laks.

For å finne ut meir om B-cellene si rolle hos beinfisk, må det i framtida også bli utvikla markørar som kan fortelje meir om utvikling, aktivering og proliferering av B-celler. Dette kan bidra til at ein finn meir ut om frekvensen av ASC og korleis slike populasjonar er distribuert i beinfisk, både i naive dyr, under infeksjonar og ved vaksinerings. For å kunne studere sorterte B-celler vidare og deira ulike stadium, må det bli utvikla fleire antistoff som kan bli nytta i sortering av celler. Å få ein større forståing for ASC, om det finst fleire ulike typar og korleis desse fungerer, vil utvilsamt bidra i framtidig utvikling av vaksinar. I samanheng med dette er det viktig å finne ut av bukholas sin rolle i den humorale immunresponsen mot virus, då det blir sett vedvarande ASC-responsar i bukholas ved til dømes infeksjon med SAV3. Ved å forske meir på samansetninga av celler i dette området, kan ein finne ut om bukholas kan fungere som eit sekundært immunorgan hos beinfisk, noko som kan gjere forståinga av beinfisk sin humorale immunitet større. Det vil også bli viktig å finne ut meir om beinfisk sin evne til å utvikle langvarig hukommelse hos B-cellene, samt bestemme rolla til IgD og IgT under virusinfeksjonar.

## 7 Konklusjon

- Stimulering i 144 timar med TLR9/21-liganden CpG gav signifikant auke av andel IgM<sup>+</sup> ASC i leukocyttpopulasjonar frå milt og blod hos laks samanlikna med ikkje-stimulert kontroll. CpG gav også auka andel IgM<sup>+</sup> ASC i leukocyttar frå hovudnyre og bukhole, men auka var ikkje signifikant.
- Stimulering i 144 timar med LPS gav signifikant auke av andel IgM<sup>+</sup> ASC i leukocyttpopulasjonar frå milt og blod hos laks samanlikna med ikkje-stimulert kontroll. LPS gav også auka andel IgM<sup>+</sup> ASC i leukocyttar frå hovudnyre og bukhole, men auka var ikkje signifikant.
- Stimulering i 144 timar med TLR7-liganden imiquimod stimulerte til auka andel IgM<sup>+</sup> ASC i leukocyttpopulasjonar frå hovudnyre, milt, blod og bukhole, men auka var ikkje signifikant samanlikna med ikkje-stimulert kontroll.
- Stimulering med TLR3/TLR22-liganden poly I:C gav inga auke i andel IgM<sup>+</sup> ASC i leukocyttpopulasjonar frå laks.
- Optimal konsentrasjon for stimulering av leukocyttpopulasjonen til ASC i våre analysar var 2 µM for CpG, 1 µg/ml for imiquimod og 1 µg/ml for poly I:C.
- Stimulering med TLR-ligandar og type I-IFN gav små, ikkje-signifikante endringar i genuttrykket av immunoglobulinane IgM, IgD og IgT.
- Korleis type I-IFN verkar inn på B-celler hos laks er ikkje avklart og protokollar for undersøking av dette må bli utvikla vidare.
- For å kunne studere sorterte IgM<sup>+</sup> B-celler i ELISpot, må metoden bli optimalisert vidare. Det er ikkje avklart om ligandane som er testa i denne oppgåva stimulerer B-celler direkte til å differensiere til IgM<sup>+</sup> ASC.



## 8 Referanseliste

- Abbas, A. K., Lichtman, A. H. & Pillai, S. (2019). *Basic immunology e-book: functions and disorders of the immune system*: Elsevier Health Sciences.
- Abós, B., Bailey, C. & Tafalla, C. (2022). Adaptive immunity. I *Principles of fish immunology*.
- Abós, B., Castro, R., González Granja, A., Havixbeck, J. J., Barreda, D. R. & Tafalla, C. (2015). Early activation of teleost B cells in response to rhabdovirus infection. *Journal of virology*, 89(3), 1768-1780.
- Abós, B., Castro, R., Pignatelli, J., Luque, A., González, L. & Tafalla, C. (2013). Transcriptional heterogeneity of IgM<sup>+</sup> cells in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) tissues. *PLoS One*, 8(12), e82737.
- Abós, B., Wang, T., Castro, R., Granja, A. G., Leal, E., Havixbeck, J., . . . Tafalla, C. (2016). Distinct Differentiation Programs Triggered by IL-6 and LPS in Teleost IgM<sup>+</sup> B Cells in The Absence of Germinal Centers. *Scientific Reports*, 6(1), 30004. 10.1038/srep30004
- Abos, B., Wang, T., Secombes, C. J. & Tafalla, C. (2020). Distinct modes of action of CD40L and adaptive cytokines IL-2, IL-4/13, IL-10 and IL-21 on rainbow trout IgM<sup>+</sup> B cells. *Developmental & Comparative Immunology*, 111, 103752.
- Abrahamsen, M. (2019). *Humorale immunresponser i bukhule og systemiske organer hos Atlantisk laks (Salmo salar L.)—sammenligning av levende og inaktivert salmonid alphavirus 3 administrert i bukhulen*. UiT The Arctic University of Norway.
- Agius, C. (1980). Phylogenetic development of melano–macrophage centres in fish. *Journal of zoology*, 191(1), 11-31.
- Agius, C. & Roberts, R. (2003). Melano - macrophage centres and their role in fish pathology. *Journal of fish diseases*, 26(9), 499-509.
- Akira, S. & Hemmi, H. (2003). Recognition of pathogen-associated molecular patterns by TLR family. *Immunology letters*, 85(2), 85-95.
- Alcaide, M. & Edwards, S. V. (2011). Molecular evolution of the toll-like receptor multigene family in birds. *Molecular biology and evolution*, 28(5), 1703-1715.
- Allman, D. & Pillai, S. (2008). Peripheral B cell subsets. *Current opinion in immunology*, 20(2), 149-157.
- Arkoosh, M. R. & Kaattari, S. L. (1991). Development of immunological memory in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). I. An immunochemical and cellular analysis of the B cell response. *Dev Comp Immunol*, 15(4), 279-293. 10.1016/0145-305x(91)90021-p
- Ashfaq, H., Soliman, H., Saleh, M. & El-Matbouli, M. (2019). CD4: a vital player in the teleost fish immune system. *Veterinary research*, 50(1), 1-11.
- Bakke, A. F., Bjørgen, H., Koppang, E. O., Frost, P., Afanasyev, S., Boysen, P., . . . Lund, H. (2020). IgM<sup>+</sup> and IgT<sup>+</sup> B Cell Traffic to the Heart during SAV Infection in Atlantic Salmon. *Vaccines*, 8(3), 493.
- Barreto, V. M., Pan-Hammarstrom, Q., Zhao, Y., Hammarstrom, L., Misulovin, Z. & Nussenzweig, M. C. (2005). AID from bony fish catalyzes class switch recombination. *The Journal of experimental medicine*, 202(6), 733-738.
- Bassity, E. & Clark, T. G. (2012). Functional identification of dendritic cells in the teleost model, rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *PloS one*, 7(3), e33196.
- BD Biosciences. (2012). BD FACSAria™ III User's Guide. Hentet 26.04 fra [https://wwwbdbiosciences.com/content/dam/bdb/marketing-documents/BD\\_FACSAria\\_III\\_User\\_Guide.pdf](https://wwwbdbiosciences.com/content/dam/bdb/marketing-documents/BD_FACSAria_III_User_Guide.pdf)
- Bekeredjian-Ding, I. B., Wagner, M., Hornung, V., Giese, T., Schnurr, M., Endres, S. & Hartmann, G. (2005). Plasmacytoid Dendritic Cells Control TLR7 Sensitivity of

- Naive B Cells via Type I IFN. *The Journal of Immunology*, 174(7), 4043-4050.  
10.4049/jimmunol.174.7.4043
- Benedicenti, O., Wang, T., Morel, E., Secombes, C. J., Soletto, I., Díaz-Rosales, P. & Tafalla, C. (2020). Type I interferon regulates the survival and functionality of B cells in rainbow trout. *Frontiers in Immunology*, 1494.
- Berg, A., Bergh, Ø., Fjelldal, P. G., Hansen, T., Juell, J.-E. & Nerland, A. H. (2006). Dyrevelferdsmessige konsekvenser av vaksinasjon av fisk-effekter og bivirkninger.
- Berg, K., Svingerud, T., Sun, B. & Robertsen, B. (2009). An antiserum against Atlantic salmon IFN $\alpha$ 1 detects IFN and neutralizes antiviral activity produced by poly I:C stimulated cells. *Dev Comp Immunol*, 33(4), 638-645. 10.1016/j.dci.2008.11.005
- Bernard, D., Riteau, B., Hansen, J. D., Phillips, R. B., Michel, F., Boudinot, P. & Benmansour, A. (2006). Costimulatory receptors in a teleost fish: typical CD28, elusive CTLA4. *The Journal of Immunology*, 176(7), 4191-4200.
- Bilal, S., Etayo, A. & Hordvik, I. (2021). Immunoglobulins in teleosts. *Immunogenetics*, 1-13.
- Bjørgen, H. & Koppang, E. O. (2021). Anatomy of teleost fish immune structures and organs. *Immunogenetics*, 73(1), 53-63. 10.1007/s00251-020-01196-0
- Bjørgen, H. & Koppang, E. O. (2022). Anatomy of teleost fish immune structures and organs. *Principles of Fish Immunology*, 1-30.
- Boehm, T. & Bleul, C. C. (2007). The evolutionary history of lymphoid organs. *Nature immunology*, 8(2), 131-135.
- Bowden, T., Cook, P. & Rombout, J. (2005). Development and function of the thymus in teleosts. *Fish & shellfish immunology*, 19(5), 413-427.
- Braun, D., Caramalho, I. & Demengeot, J. (2002). IFN -  $\alpha$  /  $\beta$  enhances BCR - dependent B cell responses. *International immunology*, 14(4), 411-419.
- Bromage, E. S., Kaattari, I. M., Zwollo, P. & Kaattari, S. L. (2004). Plasmablast and plasma cell production and distribution in trout immune tissues. *The Journal of Immunology*, 173(12), 7317-7323.
- Brun, E., Aamelfot, M., Qviller, L., Lyngstad, T. M., Kristoffersen, A. B., Sindre, H. & Falk, K. (2018). *Betydningen av ILAV HPR0 for utbrudd av ILA*: Veterinærinstituttet. Hentet fra <https://www.vetinst.no/rapporter-og-publikasjoner/rapporter/2018/betydning-av-ilav-hpr0-for-utbrudd-av-ila>
- Bøgwald, J. & Dalmo, R. A. (2020). Historisk blikk–og nåværende vaksiner i norsk fiskeoppdrett. *Naturen*, 144(5), 207-213.
- Castro, R., Abós, B., González, L., Granja, A. G. & Tafalla, C. (2017). Expansion and differentiation of IgM<sup>+</sup> B cells in the rainbow trout peritoneal cavity in response to different antigens. *Developmental & Comparative Immunology*, 70, 119-127.
- Chang, C. J., Sun, B. & Robertsen, B. (2015). Adjuvant activity of fish type I interferon shown in a virus DNA vaccination model. *Vaccine*, 33(21), 2442-2448. 10.1016/j.vaccine.2015.03.093
- Chang, M., Nie, P., Collet, B., Secombes, C. J. & Zou, J. (2009). Identification of an additional two-cysteine containing type I interferon in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* provides evidence of a major gene duplication event within this gene family in teleosts. *Immunogenetics*, 61(4), 315-325.
- Choi, Y. S., Dieter, J. A., Rothausler, K., Luo, Z. & Baumgarth, N. (2012). B - 1 cells in the bone marrow are a significant source of natural IgM. *European journal of immunology*, 42(1), 120-129.
- Coutinho, A., Gronowicz, E., Bullock, W. W. & Möller, G. r. (1974). Mechanism of thymus-independent immunocyte triggering: mitogenic activation of B cells results in specific immune responses. *The Journal of experimental medicine*, 139(1), 74-92.

- Czerkinsky, C. C., Nilsson, L.-Å., Nygren, H., Ouchterlony, Ö. & Tarkowski, A. (1983). A solid-phase enzyme-linked immunospot (ELISPOT) assay for enumeration of specific antibody-secreting cells. *Journal of immunological methods*, 65(1-2), 109-121.
- Dahle, M. K. & Jørgensen, J. B. (2019). Antiviral defense in salmonids–Mission made possible? *Fish & shellfish immunology*, 87, 421-437.
- Dash, S., Das, S., Samal, J. & Thatoi, H. (2018). Epidermal mucus, a major determinant in fish health: a review. *Iranian Journal of Veterinary Research*, 19(2), 72.
- Díaz-Rosales, P., Muñoz-Atienza, E. & Tafalla, C. (2019). Role of teleost B cells in viral immunity. *Fish & shellfish immunology*, 86, 135-142.
- Eason, D. D., Cannon, J. P., Haire, R. N., Rast, J. P., Ostrov, D. A. & Litman, G. W. (2004). *Mechanisms of antigen receptor evolution*. Foredrag holdt ved Seminars in immunology.
- Ellis, A. E. (1977). The leucocytes of fish: a review. *Journal of fish biology*, 11(5), 453-491.
- Foey, A. & Picchiatti, S. (2014). Immune defences of teleost fish. *Aquaculture nutrition: gut health, probiotics and prebiotics*, 14-52.
- Hamilos, D. L. (1989). Antigen presenting cells. *Immunologic research*, 8(2), 98-117.
- Hansen, J. D. (1997). Characterization of rainbow trout terminal deoxynucleotidyl transferase structure and expression. TdT and RAG1 co-expression define the trout primary lymphoid tissues. *Immunogenetics*, 46(5), 367-375.
- Hansen, J. D., Du Pasquier, L., Lefranc, M.-P., Lopez, V., Benmansour, A. & Boudinot, P. (2009). The B7 family of immunoregulatory receptors: a comparative and evolutionary perspective. *Molecular immunology*, 46(3), 457-472.
- Hansen, J. D. & Kaattari, S. L. (1995). The recombination activating gene 1 (RAG1) of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): cloning, expression, and phylogenetic analysis. *Immunogenetics*, 42(3), 188-195.
- 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.
- Hedfors, I. A., Bakke, H., Skjødt, K. & Grimholt, U. (2012). Antibodies recognizing both IgM isotypes in Atlantic salmon. *Fish & shellfish immunology*, 33(5), 1199-1206.
- Henderson, A. & Calame, K. (1998). Transcriptional regulation during B cell development. *Annual review of immunology*, 16(1), 163-200.
- Hikima, J.-i., Jung, T.-S. & Aoki, T. (2011). Immunoglobulin genes and their transcriptional control in teleosts. *Developmental & Comparative Immunology*, 35(9), 924-936.
- Hirono, I., Nam, B.-H., Enomoto, J., Uchino, K. & Aoki, T. (2003). Cloning and characterisation of a cDNA encoding Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* IgD. *Fish & shellfish immunology*, 15(1), 63-70.
- Hordvik, I. (2015). Immunoglobulin isotypes in Atlantic salmon, *Salmo salar*. *Biomolecules*, 5(1), 166-177.
- Hua, Z. & Hou, B. (2013). TLR signaling in B-cell development and activation. *Cellular & Molecular Immunology*, 10(2), 103-106. 10.1038/cmi.2012.61
- Ichikawa, H. T., Sowden, M. P., Torelli, A. T., Bachl, J., Huang, P., Dance, G. S., . . .Smith, H. C. (2006). Structural phylogenetic analysis of activation-induced deaminase function. *The Journal of Immunology*, 177(1), 355-361.
- Iliev, D. B., Roach, J. C., Mackenzie, S., Planas, J. V. & Goetz, F. W. (2005). Endotoxin recognition: in fish or not in fish? *FEBS letters*, 579(29), 6519-6528.
- Jault, C., Pichon, L. & Chluba, J. (2004). Toll-like receptor gene family and TIR-domain adapters in *Danio rerio*. *Molecular immunology*, 40(11), 759-771.

- Jego, G., Palucka, A. K., Blanck, J.-P., Chalouni, C., Pascual, V. & Banchereau, J. (2003). Plasmacytoid dendritic cells induce plasma cell differentiation through type I interferon and interleukin 6. *Immunity*, 19(2), 225-234.
- Jenberie, S. (2020). Atlantic salmon B cells-local and systemic responses to intraperitoneally administered salmonid alphavirus.
- Jenberie, S., Peñaranda, M., Michelle, D., Thim, H. L., Styrvold, M. B., Strandskog, G., . . . Jensen, I. (2020). Salmonid Alphavirus Subtype 3 Induces Prolonged Local B Cell Responses in Atlantic Salmon (*Salmo salar*) After Intraperitoneal Infection. *Frontiers in immunology*, 1682.
- Jenberie, S., Thim, H. L., Sunyer, J. O., Skjødt, K., Jensen, I. & Jørgensen, J. B. (2018). Profiling Atlantic salmon B cell populations: CpG-mediated TLR-ligation enhances IgM secretion and modulates immune gene expression. *Scientific reports*, 8(1), 1-12.
- Jørgensen, J. B. (2014). The innate immune response in fish. *Fish vaccination*, 1, 84-102.
- Kalyuzhny, A. E. (2005). Chemistry and biology of the ELISPOT assay. *Handbook of ELISPOT*, 15-31.
- Kanwal, Z., Wiegertjes, G. F., Veneman, W. J., Meijer, A. H. & Spaik, H. P. (2014). Comparative studies of Toll-like receptor signalling using zebrafish. *Developmental & Comparative Immunology*, 46(1), 35-52.
- Kato, H., Takeuchi, O., Sato, S., Yoneyama, M., Yamamoto, M., Matsui, K., . . . Ishii, K. J. (2006). Differential roles of MDA5 and RIG-I helicases in the recognition of RNA viruses. *Nature*, 441(7089), 101-105.
- Keestra, A. M., de Zoete, M. R., Bouwman, L. I. & van Putten, J. P. (2010). Chicken TLR21 is an innate CpG DNA receptor distinct from mammalian TLR9. *The Journal of Immunology*, 185(1), 460-467.
- Kileng, Ø., Albuquerque, A. & Robertsen, B. (2008). Induction of interferon system genes in Atlantic salmon by the imidazoquinoline S-27609, a ligand for Toll-like receptor 7. *Fish & shellfish immunology*, 24(5), 514-522.
- 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 immunology*, 23(2), 378-389.
- Koppang, E. O., Fischer, U., Moore, L., Tranulis, M. A., Dijkstra, J. M., Köllner, B., . . . Hordvik, I. (2010). Salmonid T cells assemble in the thymus, spleen and in novel interbranchial lymphoid tissue. *Journal of anatomy*, 217(6), 728-739.
- Korytář, T., Jaros, J., Verleih, M., Rebl, A., Kotterba, G., Kühn, C., . . . Köllner, B. (2013). Novel insights into the peritoneal inflammation of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Fish & shellfish immunology*, 35(4), 1192-1199.
- Krieg, A. M., Yi, A.-K., Matson, S., Waldschmidt, T. J., Bishop, G. A., Teasdale, R., . . . Klinman, D. M. (1995). CpG motifs in bacterial DNA trigger direct B-cell activation. *Nature*, 374(6522), 546-549.
- Kryvi, H. & Poppe, T. (2016). *Fiskeanatomi*. Bergen: Fagbokforl.
- Kumar, H., Kawai, T. & Akira, S. (2011). Pathogen recognition by the innate immune system. *International reviews of immunology*, 30(1), 16-34.
- Kaattari, S. L., Zhang, H. L., Khor, W., Kaattari, I. M. & Shapiro, D. A. (2002). Affinity maturation in trout: clonal dominance of high affinity antibodies late in the immune response. *Developmental & Comparative Immunology*, 26(2), 191-200.
- Ladi, E., Yin, X., Chtanova, T. & Robey, E. A. (2006). Thymic microenvironments for T cell differentiation and selection. *Nature immunology*, 7(4), 338-343.
- Laing, K. J., Wang, T., Zou, J., Holland, J., Hong, S., Bols, N., . . . Secombes, C. J. (2001). Cloning and expression analysis of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* tumour necrosis factor -  $\alpha$ . *European Journal of Biochemistry*, 268(5), 1315-1322.

- Lee, P.-T., Zou, J., Holland, J. W., Martin, S. A., Collet, B., Kanellos, T. & Secombes, C. J. (2014). Identification and characterisation of TLR18-21 genes in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Fish & shellfish immunology*, 41(2), 549-559.
- Lee, P.-T., Zou, J., Holland, J. W., Martin, S. A., Kanellos, T. & Secombes, C. J. (2013). Identification and characterization of TLR7, TLR8a2, TLR8b1 and TLR8b2 genes in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Developmental & Comparative Immunology*, 41(2), 295-305.
- Li, J., Barreda, D. R., Zhang, Y.-A., Boshra, H., Gelman, A. E., LaPatra, S., . . . Sunyer, J. O. (2006). B lymphocytes from early vertebrates have potent phagocytic and microbicidal abilities. *Nature immunology*, 7(10), 1116-1124.
- Life-Technologies. (2012). *Real-Time PCR handbook*. Hentet fra <https://www.gene-quantification.com/real-time-pcr-handbook-life-technologies-update-flr.pdf>
- Lima, K. M., dos Santos, S. A., Rodrigues Jr, J. M. & Silva, C. L. (2004). Vaccine adjuvant: it makes the difference. *Vaccine*, 22(19), 2374-2379.
- Lin, K.-I., Angelin-Duclos, C., Kuo, T. C. & Calame, K. (2002). Blimp-1-dependent repression of Pax-5 is required for differentiation of B cells to immunoglobulin M-secreting plasma cells. *Molecular and cellular biology*, 22(13), 4771-4780.
- Locksley, R. M., Killeen, N. & Lenardo, M. J. (2001). The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. *Cell*, 104(4), 487-501. 10.1016/s0092-8674(01)00237-9
- Lv, J., Huang, R., Li, H., Luo, D., Liao, L., Zhu, Z. & Wang, Y. (2012). Cloning and characterization of the grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) Toll-like receptor 22 gene, a fish-specific gene. *Fish & Shellfish Immunology*, 32(6), 1022-1031.
- Løvoll, M., Austbø, L., Jørgensen, J. B., Rimstad, E. & Frost, P. (2011). Transcription of reference genes used for quantitative RT-PCR in Atlantic salmon is affected by viral infection. *Veterinary research*, 42(1), 1-5.
- Magnadóttir, B. (2010). Immunological control of fish diseases. *Marine biotechnology*, 12(4), 361-379.
- Magnadóttir, B. (2006). Innate immunity of fish (overview). *Fish & shellfish immunology*, 20(2), 137-151.
- Magor, B. G. (2015). Antibody affinity maturation in fishes—our current understanding. *Biology*, 4(3), 512-524.
- Makesh, M., Sudheesh, P. S. & Cain, K. D. (2015). Systemic and mucosal immune response of rainbow trout to immunization with an attenuated *Flavobacterium psychrophilum* vaccine strain by different routes. *Fish & shellfish immunology*, 44(1), 156-163.
- Matsunaga, T. & Rahman, A. (2001). In search of the origin of the thymus: the thymus and GALT may be evolutionarily related. *Scandinavian journal of immunology*, 53(1), 1-6.
- 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. *The Journal of Immunology*, 181(5), 3474-3485.
- Midtlyng, P. J. & Lillehaug, A. (1998). Growth of Atlantic salmon *Salmo salar* after intraperitoneal administration of vaccines containing adjuvants. *Dis Aquat Organ*, 32(2), 91-97. 10.3354/dao032091
- Mutoloki, S., Jørgensen, J. B. & Evensen, Ø. (2014). The adaptive immune response in fish. *Fish vaccination*, 9, 104-115.
- Nakanishi, T., Shibasaki, Y. & Matsuura, Y. (2015). T cells in fish. *Biology*, 4(4), 640-663.
- Nakanishi, T., Toda, H., Shibasaki, Y. & Somamoto, T. (2011). Cytotoxic T cells in teleost fish. *Developmental & Comparative Immunology*, 35(12), 1317-1323.

- Noregs sjømatråd. (2022). Nøkkeltall. Hentet 19.04.2021 fra <https://seafood.no/markedsinnsikt/nokkeltall/>
- Olsvik, P. A., Lie, K. K., Jordal, A.-E. O., Nilsen, T. O. & Hordvik, I. (2005). Evaluation of potential reference genes in real-time RT-PCR studies of Atlantic salmon. *BMC molecular biology*, 6(1), 1-9.
- Owen, J. A., Punt, J. & Stranford, S. A. (2013). *Kuby immunology*: WH Freeman New York, NY, USA:.
- Palti, Y. (2011). Toll-like receptors in bony fish: from genomics to function. *Developmental & Comparative Immunology*, 35(12), 1263-1272.
- Palti, Y., Rodriguez, M. F., Gahr, S. A., Purcell, M. K., Rexroad III, C. E. & Wiens, G. D. (2010). Identification, characterization and genetic mapping of TLR1 loci in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Fish & Shellfish Immunology*, 28(5-6), 918-926.
- PD-forskriften. (2017). § 13. Tiltak ved mistanke om eller påvisning av PD. Hentet fra [https://lovdata.no/pro/#document/SF/forskrift/2017-08-29-1318/KAPITTEL\\_4](https://lovdata.no/pro/#document/SF/forskrift/2017-08-29-1318/KAPITTEL_4)
- Pfaffl, M. W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic acids research*, 29(9), e45-e45.
- Poppe, T. T. & Koppang, E. O. (2014). Side - effects of vaccination. *Fish vaccination*, 153-161.
- Press, C. M. & Evensen, Ø. (1999). The morphology of the immune system in teleost fishes. *Fish & shellfish immunology*, 9(4), 309-318.
- QIAGEN®. (2019). *RNeasy Mini Handbook - (EN)*. Hentet fra <https://www.qiagen.com/us/resources/resourcedetail?id=14e7cf6e-521a-4cf7-8cbc-bf9f6fa33e24&lang=en>
- Quiniou, S., Boudinot, P. & Bengtén, E. (2013). Comprehensive survey and genomic characterization of Toll-like receptors (TLRs) in channel catfish, *Ictalurus punctatus*: identification of novel fish TLRs. *Immunogenetics*, 65(7), 511-530.
- Ranieri, E., Popescu, I. & Gigante, M. (2014). CTL elispot assay. I *Cytotoxic T-Cells* (s. 75-86): Springer.
- Rawlings, D. J., Schwartz, M. A., Jackson, S. W. & Meyer-Bahlburg, A. (2012). Integration of B cell responses through Toll-like receptors and antigen receptors. *Nature Reviews Immunology*, 12(4), 282-294.
- Rey, G. U. (2020). You don't need the whole antibody. Hentet 02.05.22 fra <https://www.virology.ws/2020/10/01/you-dont-need-the-whole-antibody/>
- Robertsen, B. (2018). The role of type I interferons in innate and adaptive immunity against viruses in Atlantic salmon. *Developmental & Comparative Immunology*, 80, 41-52.
- Robertsen, B., Bergan, V., Røkenes, T., Larsen, R. & Albuquerque, A. (2003). Atlantic salmon interferon genes: cloning, sequence analysis, expression, and biological activity. *Journal of Interferon & Cytokine Research*, 23(10), 601-612.
- Rubtsov, A. V., Swanson, C. L., Troy, S., Strauch, P., Pelanda, R. & Torres, R. M. (2008). TLR agonists promote marginal zone B cell activation and facilitate T-dependent IgM responses. *The Journal of Immunology*, 180(6), 3882-3888.
- Ryo, S., Wijdeven, R. H., Tyagi, A., Hermsen, T., Kono, T., Karunasagar, I., . . . Savan, R. (2010). Common carp have two subclasses of bonyfish specific antibody IgZ showing differential expression in response to infection. *Developmental & Comparative Immunology*, 34(11), 1183-1190.
- Sahoo, B. R. (2020). Structure of fish Toll-like receptors (TLR) and NOD-like receptors (NLR). *International Journal of Biological Macromolecules*, 161, 1602-1617.
- Salinas, I. (2015). The mucosal immune system of teleost fish. *Biology*, 4(3), 525-539.
- Savage, H. P. & Baumgarth, N. (2015). Characteristics of natural antibody-secreting cells. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1362(1), 132.

- Schmittgen, T. D. & Livak, K. J. (2008). Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. *Nature protocols*, 3(6), 1101-1108.
- Sepulcre, M. P., Alcaraz-Pérez, F., López-Muñoz, A., Roca, F. J., Meseguer, J., Cayuela, M. L. & Mulero, V. (2009). Evolution of lipopolysaccharide (LPS) recognition and signaling: fish TLR4 does not recognize LPS and negatively regulates NF-kappaB activation. *J Immunol*, 182(4), 1836-1845. 10.4049/jimmunol.0801755
- Simón, R., Díaz-Rosales, P., Morel, E., Martín, D., Granja, A. G. & Tafalla, C. (2019). CpG Oligodeoxynucleotides Modulate Innate and Adaptive Functions of IgM+ B Cells in Rainbow Trout. *Frontiers in Immunology*, 10. 10.3389/fimmu.2019.00584
- Sirén, J., Pirhonen, J., Julkunen, I. & Matikainen, S. (2005). IFN-alpha regulates TLR-dependent gene expression of IFN-alpha, IFN-beta, IL-28, and IL-29. *J Immunol*, 174(4), 1932-1937. 10.4049/jimmunol.174.4.1932
- Skjæveland, I., Iliiev, D. B., Zou, J., Jørgensen, T. & Jørgensen, J. B. (2008). A TLR9 homolog that is up-regulated by IFN- $\gamma$  in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Developmental & Comparative Immunology*, 32(6), 603-607.
- Sobhkhez, M., Krasnov, A., Chang, C. J. & Robertsen, B. (2017). Transcriptome analysis of plasmid-induced genes sheds light on the role of type I IFN as adjuvant in DNA vaccine against infectious salmon anemia virus. *PLoS One*, 12(11), e0188456. 10.1371/journal.pone.0188456
- Sommerset, I., Krossøy, B., Biering, E. & Frost, P. (2005). Vaccines for fish in aquaculture. *Expert review of vaccines*, 4(1), 89-101.
- Sommerset, I., Sviland, C., Jensen, B. B., Wiik-Nielsen, J., Bornø, G., Silva De Oliveira, V., . . . Brun, E. (2022). Fiskehelse rapporten 2021. Hentet fra
- Stanley, M. (2002). Imiquimod and the imidazoquinolones: mechanism of action and therapeutic potential. *Clinical and experimental dermatology*, 27(7), 571-577.
- Strandskog, G., Ellingsen, T. & Jørgensen, J. B. (2007). Characterization of three distinct CpG oligonucleotide classes which differ in ability to induce IFN  $\alpha/\beta$  activity and cell proliferation in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) leukocytes. *Developmental & Comparative Immunology*, 31(1), 39-51.
- Strandskog, G., Villoing, S., Iliiev, D. B., Thim, H. L., Christie, K. E. & Jørgensen, J. B. (2011). Formulations combining CpG containing oligonucleotides and poly I: C enhance the magnitude of immune responses and protection against pancreas disease in Atlantic salmon. *Developmental & Comparative Immunology*, 35(11), 1116-1127.
- Sugamata, R., Suetake, H., Kikuchi, K. & Suzuki, Y. (2009). Teleost B7 expressed on monocytes regulates T cell responses. *The Journal of Immunology*, 182(11), 6799-6806.
- Sun, B., Skjæveland, I., Svingerud, T., Zou, J., Jørgensen, J. & Robertsen, B. (2011). Antiviral activity of salmonid gamma interferon against infectious pancreatic necrosis virus and salmonid alphavirus and its dependency on type I interferon. *Journal of virology*, 85(17), 9188-9198.
- Sunyer, J. O. (2013). Fishing for mammalian paradigms in the teleost immune system. *Nature immunology*, 14(4), 320-326.
- 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 $\beta$ /IFN $\gamma$ -producing cells in fish lymphoid tissues. *The Journal of Immunology*, 189(12), 5912-5923.
- Tadiso, T. M., Lie, K. K. & Hordvik, I. (2011). Molecular cloning of IgT from Atlantic salmon, and analysis of the relative expression of  $\tau$ ,  $\mu$  and  $\delta$  in different tissues. *Veterinary immunology and immunopathology*, 139(1), 17-26.

- Tafalla, C., Bøgwald, J., Dalmo, R. A., Munang'andu, H. M. & Evensen, Ø. (2014). Adjuvants in fish vaccines. *Fish vaccination*, 68-84.
- Takano, T., Hwang, S. D., Kondo, H., Hirono, I., Aoki, T. & Sano, M. (2010). Evidence of molecular toll-like receptor mechanisms in teleosts. *Fish Pathology*, 45(1), 1-16.
- Tanekhy, M. & Sakai, M. (2019). Inflammatory cytokines responses of common carp, *Cyprinus carpio*, leucocytes in vitro treated by immunostimulants.
- Teige, L. H., Kumar, S., Johansen, G. M., Wessel, Ø., Vendramin, N., Lund, M., . . . Dahle, M. K. (2019). Detection of salmonid IgM specific to the Piscine orthoreovirus outer capsid spike protein sigma 1 using lipid-modified antigens in a bead-based antibody detection assay. *Frontiers in immunology*, 2119.
- Thermo-Scientific. (2010). EZ-Link® NHS-PEG Solid Phase Biotinylation Kit – Pre-packed Column. Hentet 07.04.22 fra [https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/MAN0011500\\_EZ\\_NHSPEG\\_SolidPhaseBiotiny\\_Prepak\\_UG.pdf](https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/MAN0011500_EZ_NHSPEG_SolidPhaseBiotiny_Prepak_UG.pdf)
- ThermoFisher. (2022). FluoroSpot Pre-Screening with Thermo Scientific Microplate Readers. Hentet 05.04.22 fra <https://www.thermofisher.com/no/en/home/life-science/cell-analysis/cell-analysis-learning-center/cell-analysis-resource-library/cell-analysis-application-notes/fluorospot-pre-screening-thermo-scientific-plate-readers.html>
- ThermoFisher Scientific. (2022). qPCR Efficiency Calculator. Hentet 22.04.22 fra <https://www.thermofisher.com/no/en/home/brands/thermo-scientific/molecular-biology/molecular-biology-learning-center/molecular-biology-resource-library/thermo-scientific-web-tools/qpcr-efficiency-calculator.html>
- Thim, H. L., Iliiev, D. B., Christie, K. E., Villoing, S., McLoughlin, M. F., Strandskog, G. & Jørgensen, J. B. (2012). Immunoprotective activity of a Salmonid Alphavirus Vaccine: comparison of the immune responses induced by inactivated whole virus antigen formulations based on CpG class B oligonucleotides and poly I: C alone or combined with an oil adjuvant. *Vaccine*, 30(32), 4828-4834.
- Tort, L. (2011). Stress and immune modulation in fish. *Dev Comp Immunol*, 35(12), 1366-1375. 10.1016/j.dci.2011.07.002
- Uribe, C., Folch, H., Enríquez, R. & Moran, G. (2011). Innate and adaptive immunity in teleost fish: a review. *Veterinarni Medicina*, 56(10), 486.
- van der Wal, Y. A., Jenberie, S., Nordli, H., Greiner-Tollersrud, L., Kool, J., Jensen, I. & Jørgensen, J. B. (2021). The importance of the Atlantic salmon peritoneal cavity B cell response: Local IgM secreting cells are predominant upon *Piscirickettsia salmonis* infection. *Dev Comp Immunol*, 123, 104125. 10.1016/j.dci.2021.104125
- Veterinærinstituttet. (2021). Hjarte- og skjelettmuskelbetennelse. Hentet 09.11.2021 fra <https://www.vetinst.no/sykdom-og-agens/hjerte-og-skjelettmuskelbetennelse-hsmb>
- Veterinærinstituttet. (2022a). Infeksiøs lakseanemi Hentet 10.04.22 fra <https://www.vetinst.no/sykdom-og-agens/infeksiøs-lakseanemi-ila>
- Veterinærinstituttet. (2022b). Infeksiøs pankreasnekrose. Hentet 10.04.22 fra <https://www.vetinst.no/sykdom-og-agens/infeksiøs-pankreasnekrose-ipn>
- Veterinærinstituttet. (2022c). Kardiomyopatisyndrom. Hentet fra <https://www.vetinst.no/sykdom-og-agens/kardiomyopatisyndrom-cms>
- Veterinærkatalogen. (2020a). *ALPHA JECT micro 7 ILA*. Hentet 29.04.22. Hentet fra <https://www.felleskatalogen.no/medisin-vet/alpha-ject-micro-7-ila-pharmaq-663201>
- Veterinærkatalogen. (2020b). *Clynav*. Hentet 29.04.22. Hentet fra <https://www.felleskatalogen.no/medisin-vet/clynav-elanco-645975>



- Vollmer, J., Weeratna, R., Payette, P., Jurk, M., Schetter, C., Laucht, M., . . . Davis, H. L. (2004). Characterization of three CpG oligodeoxynucleotide classes with distinct immunostimulatory activities. *European journal of immunology*, 34(1), 251-262.
- Wang, K., Mu, Y., Qian, T., Ao, J. & Chen, X. (2013). Molecular characterization and expression analysis of toll-like receptor 1 from large yellow croaker (*Pseudosciaena crocea*). *Fish & shellfish immunology*, 35(6), 2046-2050.
- Warr, G. W. (1995). The immunoglobulin genes of fish. *Developmental & Comparative Immunology*, 19(1), 1-12.
- Wei, Y. C., Pan, T. S., Chang, M. X., Huang, B., Xu, Z., Luo, T. R. & Nie, P. (2011). Cloning and expression of Toll-like receptors 1 and 2 from a teleost fish, the orange-spotted grouper *Epinephelus coioides*. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 141(3-4), 173-182.
- Weir, G. M., Karkada, M., Hoskin, D., Stanford, M. M., MacDonald, L., Mansour, M. & Liwski, R. S. (2017). Combination of poly I: C and Pam3CSK4 enhances activation of B cells in vitro and boosts antibody responses to protein vaccines in vivo. *PLoS One*, 12(6), e0180073.
- Wiens, G. D. & Glenney, G. W. (2011). Origin and evolution of TNF and TNF receptor superfamilies. *Dev Comp Immunol*, 35(12), 1324-1335. 10.1016/j.dci.2011.03.031
- Wilson, M. R. & Warr, G. W. (1992). Fish immunoglobulins and the genes that encode them. *Annual Review of Fish Diseases*, 2, 201-221.
- Wold, M. F. (2018). *The distribution, expression pattern and effects of TNF superfamily members BAFF and APRIL in Atlantic salmon (Salmo salar L.) and salmon derived leukocytes*. UiT The Arctic University of Norway.
- Wu, X. Y., Xiang, L. X., Huang, L., Jin, Y. & Shao, J. Z. (2008). Characterization, expression and evolution analysis of Toll - like receptor 1 gene in pufferfish (*Tetraodon nigroviridis*). *International journal of immunogenetics*, 35(3), 215-225.
- Ye, J., Kaattari, I. M. & Kaattari, S. L. (2011). The differential dynamics of antibody subpopulation expression during affinity maturation in a teleost. *Fish & shellfish immunology*, 30(1), 372-377.
- Ye, J., Kaattari, I. M., Ma, C. & Kaattari, S. (2013). The teleost humoral immune response. *Fish & shellfish immunology*, 35(6), 1719-1728.
- Yeh, D.-W., Liu, Y.-L., Lo, Y.-C., Yuh, C.-H., Yu, G.-Y., Lo, J.-F., . . . Chuang, T.-H. (2013). Toll-like receptor 9 and 21 have different ligand recognition profiles and cooperatively mediate activity of CpG-oligodeoxynucleotides in zebrafish. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(51), 20711-20716.
- Zhang, J., Kong, X., Zhou, C., Li, L., Nie, G. & Li, X. (2014). Toll-like receptor recognition of bacteria in fish: ligand specificity and signal pathways. *Fish & shellfish immunology*, 41(2), 380-388.
- Zhang, N., Zhang, X.-J., Chen, D.-D., Sunyer, J. O. & Zhang, Y.-A. (2017). Molecular characterization and expression analysis of three subclasses of IgT in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Developmental & Comparative Immunology*, 70, 94-105.
- Zhang, Y.-A., Salinas, I., Li, J., Parra, D., Bjork, S., Xu, Z., . . . Sunyer, J. O. (2010). IgT, a primitive immunoglobulin class specialized in mucosal immunity. *Nature immunology*, 11(9), 827-835.
- Zhao, Y., Pan-Hammarström, Q., Zhao, Z. & Hammarström, L. (2005). Identification of the activation-induced cytidine deaminase gene from zebrafish: an evolutionary analysis. *Developmental & Comparative Immunology*, 29(1), 61-71.
- Zhou, Z.-x., Zhang, B.-c. & Sun, L. (2014). Poly (I: C) induces antiviral immune responses in Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) that require TLR3 and MDA5 and is negatively regulated by Myd88. *PLoS One*, 9(11), e112918.

- Zhu, L.-y., Lin, A.-f., Shao, T., Nie, L., Dong, W.-r., Xiang, L.-x. & Shao, J.-z. (2014). B cells in teleost fish act as pivotal initiating APCs in priming adaptive immunity: an evolutionary perspective on the origin of the B-1 cell subset and B7 molecules. *The Journal of Immunology*, 192(6), 2699-2714.
- Zou, J., Gorgoglione, B., Taylor, N. G., Summathed, T., Lee, P.-T., Panigrahi, A., . . . Hassan, M. U. (2014). Salmonids have an extraordinary complex type I IFN system: characterization of the IFN locus in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* reveals two novel IFN subgroups. *The Journal of Immunology*, 193(5), 2273-2286.
- Zwollo, P. (2018). The humoral immune system of anadromous fish. *Developmental & Comparative Immunology*, 80, 24-33.
- Zwollo, P., Cole, S., Bromage, E. & Kaattari, S. (2005). B cell heterogeneity in the teleost kidney: evidence for a maturation gradient from anterior to posterior kidney. *The Journal of Immunology*, 174(11), 6608-6616.
- Zwollo, P., Haines, A., Rosato, P. & Gumulak-Smith, J. (2008). Molecular and cellular analysis of B-cell populations in the rainbow trout using Pax5 and immunoglobulin markers. *Developmental & Comparative Immunology*, 32(12), 1482-1496.

# Vedlegg

## Vedlegg 1

Tabell: Oversikt over reagensar brukt i forsøka.

Reagensar	Produsent
Bovine Serum albumin 5%	Sigma-Aldrich
B class CpG 2006 ODN (CpG)	Sigma-Aldrich
Etanol (>99,8%)	Sigma-Aldrich
Fast SYBR®Green Mastermix	Applied biosystems, Life Technologies
Fetal bovine serum, FBS	Gibco®, Life Technologies
Heparin	LEO Pharma AS
IFN $\alpha$ 1	Rekombinant framstilt (Berg et al., 2009)
IFN $\gamma$	Rekombinant framstilt (Svingerud et al., 2012)
Imiquimod	Sigma, katalognummer: SML2915-5MG
Leibovitz's L-15 medium, L-15	Gibco®, Life Technologies
Lipopolysakkarid frå <i>Escherichia coli</i> O111:B4 (LPS)	Sigma-Aldrich, katalognummer: L2630-25 MG
MSIPS4510 ELISpot-plate	Merck Millipore
nonCpG	Integrated DNA technologies (IDT)
Percoll	GE Healthcare
Phosphate-buffered Saline, PBS	Sigma-Aldrich
Poly I:C	Cytiva, produktnummer: 27473201
Quantitect Reverse Transcriptase®	Qiagen
RNA-Mini Extraction Kit	Qiagen
RNeasy® Mini Kit	Qiagen
Streptavidin-HRP	Mabtech
Streptomycin/Penicillin	Gibco®, Life Technologies
Tetramethylbenzidine-substrat	Mabtech
Tween 20	Sigma-Aldrich

## Vedlegg 2

### Uttrykk av slgM, mlgM, IgD, IgT og Mx i leukocytter isolert frå hovudnyre og blod frå atlantisk laks stimulert med TLR-ligandar og type I-interferon.

**Tabell: Ct-verdiar for leukocytter frå hovudnyre ved ulike stimuleringar.** Tabellen viser Ct-verdiar (lågaste og høgaste verdi), samt gjennomsnitt for alle verdiar for uttrykk av ELF1aB, slgM, mlgM, IgD, IgT og Mx i leukocytter frå hovudnyre isolert frå atlantisk laks stimulert med ubehandla kontrollceller og non-CpG (A), CpG og LPS (B), imiquimod og poly I:C (C), IFN $\alpha$ 1 og IFN (D) hausta etter 24 og 48 timar. (\*)=manglar éin Ct-verdi, (\*\*)=tatt ut frå datasett ved oppsetting av graf.

#### A.

Gen	Kontroll				Non-CpG			
	24 timer		48 timer		24 timer		48 timer	
	Variasjon	Snitt	Variasjon	Snitt	Variasjon	Snitt	Variasjon	Snitt
ELF1aB	18,1-19,6	20,14609146	16,0-17,3	16,69928932	18,8-21,9	19,99770037	17,0-18,1	17,69198608
slgM	20,8-26,0	23,18190765	19,0-19,9	19,4742864	21,4-26,3	23,47813416	19,6-21,0	19,85452779
mlgM	21,2-26,2	23,43909009	19,3-19,9	19,69132996	22,1-25,4	23,44643911	19,5-20,6	19,9664917
IgD	28,7-33,6	30,83403206	27,3-30,3	28,78014247	29,0-32,8	30,44041189	25,7-29,8	28,0375824
IgT	25,2-30,7	27,41675186	23,1-23,4	23,3016758	25,5-28,5	26,78478305	21,7-24,2	23,28513336
Mx	22,8-28,0	24,85595767	20,6-22,8	21,55241712	23,4-26,7	25,14749972	20,2-21,4	20,8652019

#### B.

Gen	CpG				LPS			
	24 timer		48 timer		24 timer		48 timer	
	Variasjon	Snitt	Variasjon	Snitt	Variasjon	Snitt	Variasjon	Snitt
ELF1aB	19,1-21,8	19,98811849	16,5-23,3	18,90190379	17,3-24,9	20,29483732	15,7-15,9	15,85188325
slgM	22,4-25,0	23,36933072	19,8-39,1	26,63963509	20,0-27,8	23,24201012	17,7-20,0	18,91739019
mlgM	22,4-25,1	23,41883151	19,7-24,5	21,45074399	20,4-28,5	23,66709264	18,0-19,9	18,98787626
IgD	28,9-32,7	30,40064621	26,0-28,0	27,57154401	27,1-35,8	30,67975171	26,2-28,0	27,0848484
IgT	25,9-28,6	26,98924573	23,7-33,0	26,93693924	24,2-31,6	27,53933843	22,3-23,2	22,83711878
Mx	20,1-22,3	20,89347903	18,2-23,9	20,30032476	24,3-30,0	26,63444265	20,1-22,9	21,58554268

#### C.

Gen	Imiquimod				Poly I:C			
	24 timer		48 timer		24 timer		48 timer	
	Variasjon	Snitt	Variasjon	Snitt	Variasjon	Snitt	Variasjon	Snitt
ELF1aB	17,4-19,2	18,57982763	15,5-17,0	16,3729922	18,9-20,1	19,51789665*	17,9-20,2	19,13008626
slgM	20,7-22,7	21,67084058	18,4-20,3	19,59332021	21,8-26,9	23,88200887	19,5-22,4	20,96249898
mlgM	21,0-23,0	21,93778292	18,8-20,0	19,54965909	22,1-24,1	23,12922096	19,3-22,7	21,04892794
IgD	29,1-31,3	30,47239176	28,0-30,7	29,79788844	28,6-31,1	30,21297709	27,6-34,4	31,56315231
IgT	24,9-27,7	26,51798757	22,8-24,1	23,58725293	26,2-27,2	26,81354841	23,2-27,5	25,37921206
Mx	19,0-20,1	19,80996068	17,6-19,0	18,43239594	19,6-20,8	20,04881477	18,0-21,5	19,63732656

#### D.

Gen	IFN $\alpha$ 1				IFN $\gamma$			
	24 timer		48 timer		24 timer		48 timer	
	Variasjon	Snitt	Variasjon	Snitt	Variasjon	Snitt	Variasjon	Snitt
ELF1aB	18,8-21,5	19,93013954	16,5-17,4	16,98532804	18,9-21,2	19,96910795	16,2-17,4	16,75857417
slgM	21,5-25,1	23,03334618	18,6-20,2	19,35836093	22,3-23,9	23,06386248	19,0-20,4	19,42974854
mlgM	21,9-25,6	23,44066111	18,9-20,3	19,47589811	22,9-24,3	23,50222715	19,1-20,6	19,62507566
IgD	28,8-33,3	30,61992709	28,3-29,5	28,6843427	29,7-30,8	30,10172526	27,3-28,9	27,91392008
IgT	25,6-28,4	26,68774033	22,9-24,1	23,58926201	25,5-27,6	26,42132187	22,9-23,6	23,17903646
Mx	18,9-21,6	20,13361677	16,1-17,4	16,94796817	20,0-22,5	21,00203768	17,0-18,0	17,62537575

**Tabell: Ct-verdiar for leukocytter frå blod ved ulike stimuleringar.** Tabellen viser Ct-verdiar (lågaste og høgaste verdi), samt gjennomsnitt for alle verdiar for uttrykk av *ELF1aB*, *slgM*, *mIgM*, *IgD*, *IgT* og *Mx* i leukocytter frå hovudnyre isolert frå atlantisk laks stimulert med ubehandla kontrollceller og non-CpG (A), CpG og LPS (B), imiquimod og poly I:C (C), IFN $\alpha$ 1 og IFN (D) hausta etter 24 og 48 timar. (\*)=manglar ein Ct-verdi, (\*\*)=fatt ut frå datasett ved oppsetting av graf.

## A.

Gen	Kontroll				Non-CpG			
	24 timer		48 timer		24 timer		48 timer	
	Variasjon	Snitt	Variasjon	Snitt	Variasjon	Snitt	Variasjon	Snitt
ELF1aB	17,8-19,9	19,2409732	26,3-27,7	27,0468763**	18,1-21,6	19,8128834	28,3-31,6	29,79802**
slgM	21,2-25,0	23,5083192	32,9-34,4	33,4901797**	21,4-25,1	23,5117353	35,8-36,5*	24,0793126**
mIgM	19,9-24,4	22,1936347	32,0-37,5	35,2997615**	20,2-24,8	22,3638522	36,7-37,6	37,0557493**
IgD	24,5-29,5	26,9150003	37,3-39,2	38,3252144**	24,7-30,3	27,093188	34,9-36,5*	23,8257955**
IgT	26,3-29,0	28,0415961	35,1-37,6	36,559227**	26,6-30,8	28,7038689	36,7-39,7	37,8345375**
Mx	21,1-22,6	21,9905192	25,9-27,9	26,9627088**	22,4-20,6	21,7436256	26,6-30,5	28,6456477**

## B.

Gen	CpG				LPS			
	24 timer		48 timer		24 timer		48 timer	
	Variasjon	Snitt	Variasjon	Snitt	Variasjon	Snitt	Variasjon	Snitt
ELF1aB	16,9-19,7	18,3820012	17,8-19,2	18,6924362**	18,2-20,1	18,3820012	17,8-19,8	19,1182162**
slgM	22,2-24,8	23,7519175	20,3-23,9	22,6010825**	21,8-24,3	23,0487569	21,2-24,0	22,7278023**
mIgM	20,7-24,2	22,3076032	20,1-23,8	22,0161489**	20,2-23,2	21,839901	20,5-23,6	21,9565856**
IgD	24,9-29,2	26,9960899	26,3-30,6	28,1444728**	24,8-28,6	26,6296635	26,3-30,6	28,262476**
IgT	25,6-29,7	27,4239502	24,4-27,6	26,2399591**	26,7-29,3	28,1257954	25,4-28,0	26,902895**
Mx	20,9-19,4	19,8792013	18,5-19,3	18,7748394**	19,9-20,3	20,1665688	20,2-20,6	20,4322503**

## C.

Gen	Imiquimod				Poly I:C			
	24 timer		48 timer		24 timer		48 timer	
	Variasjon	Snitt	Variasjon	Snitt	Variasjon	Snitt	Variasjon	Snitt
ELF1aB	19,0-21,7	19,9303608	19,7-20,7	20,1933657**	18,5-21,0	19,8555342	24,7-25,8	25,2042319**
slgM	22,0-26,3	24,3018481	22,6-25,8	24,3132706**	21,9-25,9	24,2274818	25,5-31,3	29,3447247**
mIgM	21,9-26,5	24,0000242	23,2-26,2	24,685372**	20,9-25,4	22,9514052	25,9-31,6	29,5040925**
IgD	28,3-34,3	30,7233626	32,7-33,5	32,7660828**	24,8-30,6	27,27705	34,0-36,5	35,3745995**
IgT	25,7-30,3	27,4995569	26,0-30,5	27,7862631**	26,5-31,2	28,9120941	32,2-36,5	34,7727763**
Mx	19,4-20,7	20,0856482	19,5-20,8	20,276577**	18,8-20,1	19,5865459	22,0-23,4	22,6308702**

## D.

Gen	IFN $\alpha$ 1				IFN $\gamma$			
	24 timer		48 timer		24 timer		48 timer	
	Variasjon	Snitt	Variasjon	Snitt	Variasjon	Snitt	Variasjon	Snitt
ELF1aB	19,0-21,5	20,1046651	18,4-22,8	20,8953342**	18,6-21,6	20,1309853	18,1-22,8	20,8419075**
slgM	22,0-25,7	23,9318638	21,7-25,2	23,8439903**	21,8-25,5	24,0161572	21,5-25,0	23,5607554**
mIgM	21,0-25,1	22,7677339	21,1-25,4	23,7293193**	20,6-25,3	22,856575	21,2-24,6	23,4588979**
IgD	25,2-30,5	27,2220624	26,3-31,9*	29,7984034**	24,5-30,1	26,9998461	26,0-32,1	29,9585985**
IgT	27,0-30,5	28,4707813	25,9-30,0	28,5924664**	26,7-31,0	28,7752673	26,1-30,0	28,6147753**
Mx	18,6-18,7	18,6754831	17,6-19,3	18,4599101**	19,4-19,9	19,6896426	19,0-20,8	19,8466269**

## Vedlegg 3

RT-qPCR analyserapport frå Pharmaq Analytiq. I april 2021 vart det oppdaga positive prøver med *Clavochlamydia salmonicola* på fiskegruppa vi har nytta i våre forsøk. Dette er ein gjellebakterie som dukkar opp på laksen ved Havbruksstasjonen når fisken er om lag eitt år, men den forsvinn etter nokre veker i sjøvann. Den gir ingen dødelegheit eller problem ved Havbruksstasjonen (pers. komm, Jan Erik Jensen).

### Informasjon fra kunde

<b>Firma</b>	HAVBRUKSSTASJONEN I TROMSØ AS	<b>Lokalitet</b>	LANDANLEGGET
		<b>Lokalitetnr.</b>	0010767
<b>Fiskeart</b>	Laks	<b>Vev</b>	Gjelle, Hjerte, Nyre
<b>Stamme</b>		<b>Generasjon</b>	2020
<b>Uttaksdato</b>	15.04.2021	<b>Antall prøver</b>	30
<b>Gruppe</b>	Gruppe 2		
<b>Rapportmottaker</b>	Astrid Elisabeth Hanssen	<b>E-post</b>	astrid.chr.hanssen@havbruksstasjonen.no

### Informasjon fra PHARMAQ Analytiq

<b>Prøve mottatt</b>	17.04.2021	<b>Analyseperiode</b>	17.04.2021 - 22.04.2021, Lab: Bergen
----------------------	------------	-----------------------	--------------------------------------

### Oppsummering av analyseresultater

Agens	Vev	Antall analyser	Antall positive	Godkjente
CLAVOchl-PA*	Gjelle	10	5	10
BRANCHIOc-PA*	Gjelle	10	0	10
ILAVHPR0-PA*	Gjelle	10	0	10
IPNV-PA	Nyre	10	0	10
ILAV-PA	Hjerte	10	0	10
PRV-PA*	Hjerte	10	0	10
SGPV-PA*	Gjelle	10	0	10
PMCV-PA	Hjerte	10	0	10
SAVuni-PA	Hjerte	10	0	10

Resultater markert med \* omfatter tjenester som ikke er dekket av akkrediteringen.

For detaljert informasjon om analyse, se neste side.

Kunden står fri til å kopiere denne analyserapporten, men ufullstendig gjengivelse må ha skriftlig godkjenning fra laboratoriet.

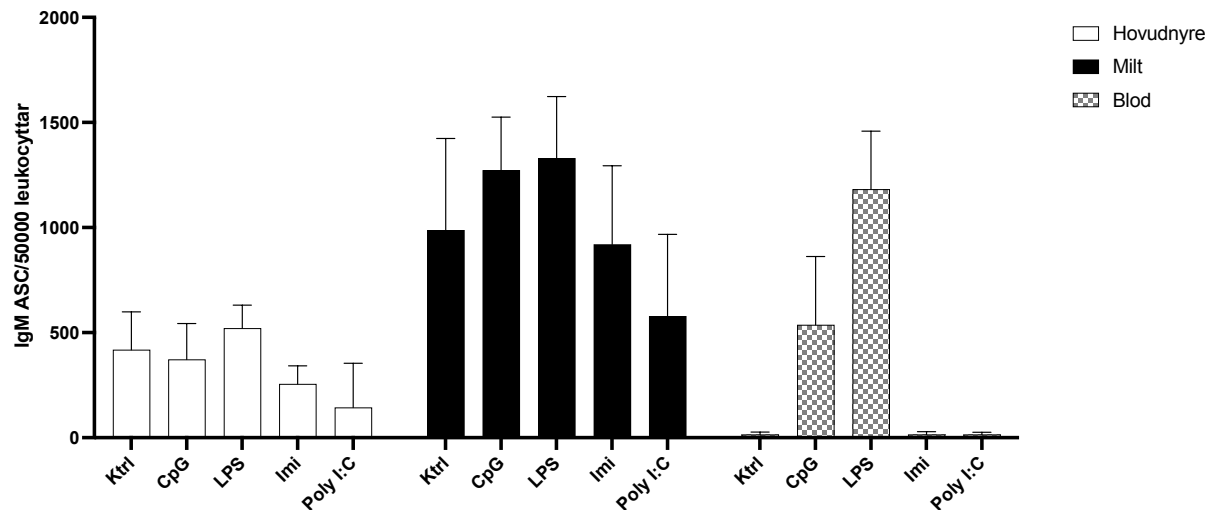
Laboratoriet er akkreditert av Norsk Akkreditering med registreringsnummer TEST 257

PHARMAQ Analytiq  
Bergen, 22.04.2021  
  
Kjetil Thorstensen (sign.)  
Laboratorieingeniør / Laboratory technician

PHARMAQ Analytiq tar ansvar for korrekte analyseresultater basert på det innsendte materialet i henhold til gjeldende prosedyrer og metodologi. Bruk av resultatene er utenfor PHARMAQ Analytiq sitt ansvarsområde. Rapporten leveres i henhold til vilkårene i våre salgs- og leveringsvilkår som finnes på [www.pharmaq-analytiq.com](http://www.pharmaq-analytiq.com)

## Vedlegg 4

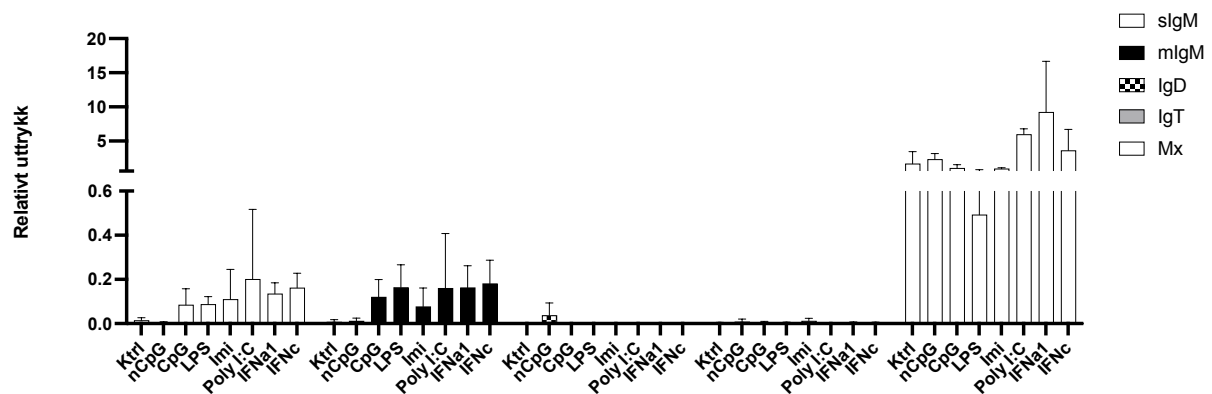
Innleiande ELISpot-forsøk med stimulering av leukocytterpopulasjonar frå hovudnyre, milt og blod frå laks.



**Figur: Effekt på mengd IgM ASC etter stimulering med ulike PRR-ligandar på leukocytter frå hovudnyre, milt, blod og bukceller hos laks.** Leukocytter vart isolert frå frisk, uvaksinert laks og sådd ut i 96-brønners brett ( $1 \times 10^6$  celler) og stimulert med CpG ( $2 \mu\text{M}$ ), LPS ( $50 \mu\text{g/ml}$ ), Imiquimod ( $5 \mu\text{g/ml}$ ) og Poly I:C ( $10 \mu\text{g/ml}$ ) 144 timar. Kontrollar med celler tilsett berre medium vart tatt med. Ei ELISpot-plata vart dekt med anti-laks IgM ( $1,5 \mu\text{g}/0,1 \text{ ml PBS}$ ) over natta ved 4 grader celcius. Cellene vart hausta frå 96-brønners brettet, telt og sådd ut i ELISpot-plata i duplikat ( $50\,000$  celler per brønn). Etter 48 timar vart ELISpot-plata framkalla og avlesen etter protokollen. Figuren viser gjennomsnittsverdiar av  $\text{IgM}^+$  ASC  $\pm$  standardavvik ( $n=4$ ).

## Vedlegg 5

Forsøk med stimulering med TLR-ligandar og type I-interferon i 48 timar på leukocyttar frå blod hos laks.



**Figur: Genuttrykk i leukocyttar frå blod frå laks stimulert med LPS, ulike TLR-ligandar og type I-IFN.** Leukocyttar vart isolert frå blod frå frisk, atlantisk laks og sådd ut i 48-brønnars Brett (2,5 mill. celler/brønn). Cellene vart stimulert med nonCpG (2  $\mu$ M), CpG (2  $\mu$ M), LPS (50  $\mu$ g/ml), Imiquimod (1  $\mu$ g/ml), poly I:C (1  $\mu$ g/ml), IFNa1 (1000 u/ml) og IFNc (1000 u/ml) i 48 timar. Cellene vart hausta og RNA isolert. cDNA ble syntetisert (input=500 ng). Genuttrykket vart målt ved qPCR og er presentert som relativt uttrykk der kvar Ct-verdi er normalisert mot referansegenet ELF1aB. Søylen i grafen viser gjennomsnittsverdiar  $\pm$ standardavvik. Det vart ikkje funne nokon signifikante verdiar i datasettet.



