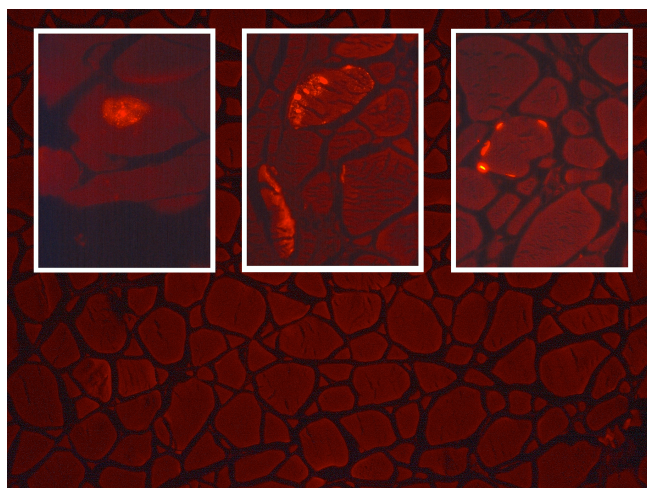


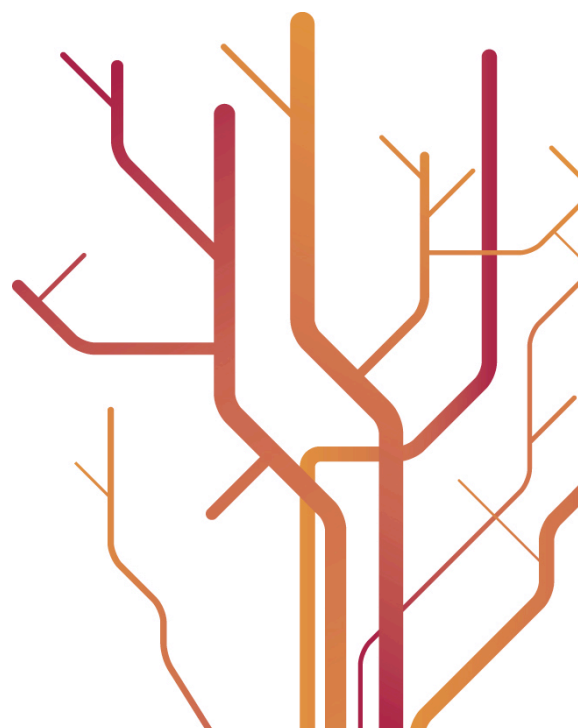
## Utvikling av molekylær vaksinestrategi for atlantisk laks mot ekstra- og intracellulære patogener



**Hege Jørstad Sekkenes & Tiril Hoffstrøm Slettjord**

**Mastergradsoppgave i fiskehelse (60 stp)**

**Mai 2012**





## Forord

*Oppgaven ble utført ved Norges Fiskerihøgskole, Fakultet for Biovitenskap, fiskeri og økonomi ved Universitetet i Tromsø i perioden januar 2011 til mai 2012. Vi har hatt fantastiske år på fiskehelsestudiet og Norges Fiskerihøgskole, og denne masteroppgaven markerer avslutningen på studietiden vår og begynnelsen på en ny og spennende del av livet.*

*Det er mange som har vært med på å gjøre denne masteroppgaven mulig og derfor mange vi ønsker å takke. Først og fremst vil vi takke veiledere Roy A. Dalmo og Jarl Bøgwald for spennende oppgave og utfordringer innen immunologi og vaksineutvikling. Takk for at dere har støttet, veiledet og hatt tro på oss, og for fantastisk tilbakemelding og alltid åpen dør. Til de utrolig tålmodige sjelene som har guidet oss gjennom en skog av teknikker og labmanualer, tusen takk Jaya Kumari og Heng Chi. Vi vil også rette en stor takk til resten av forskningsgruppen. Takk til Pharmaq ved Bjørn Brudeseth og Marianne Bordevik og Nofima ved Helene Mikkelsen for bakterieisolater.*

*Kontorgjenget, medstudenter og andre som måtte føle seg truffet, takk for flotte år og mange kopper kaffe i kantina og rundt omkring på NFH under ufaglig (og faglig) prat! Dere er en fantastisk gjeng! Også en stor takk til Kull-11 for eminent hjelp under prøvetaking i Kårvika.*

*Til våre foreldre som alltid har hatt støttet og oppmuntret oss, vi er dere evig takknemlige. Takk til øvrig familie og venner. Til Ingar og Tom Arne, takk for at dere er så utrolig tålmodige og enestående, vi kunne ikke gjort dette uten deres støtte. Kjære Daniel, du er mamma sin solstråle!*

*Fra begynnelse til slutt, vi kunne ikke skrevet denne masteren med noen andre! Ved konstant sukker- og koffeininntak har vi taklet alle opp- og nedturer sammen. Tiden på NHF er over, men det unike vennskapet som startet her vil alltid vare!*

*Tromsø, Mai 2012*

*Hege Jørstad Sekkenes & Tiril Hoffstrøm Slettjord*





## Sammendrag

DNA-vaksiner har vist seg meget effektive mot enkelte virussykdommer – som for eksempel mot infeksiøs hematopoietisk nekrose (IHN) og viral hemoragisk septikemi (VHS). Beskyttelsen er mest sannsynlig mediert av antistoffer og cytotoxisk antiviral respons. Det er også vist at antistoffer er viktig i beskyttelse mot ekstracellulære bakterier (for eksempel *Vibrio* sp.), mens både cytotoxiske og cellemedierte mekanismer er sentrale i beskyttelse mot intracellulære bakterier (for eksempel *Piscirickettsia* sp.). Ved å benytte plasmid DNA, inneholdende molekylære adjuvaner ønsket vi å undersøke immunologiske mekanismer for sykdomsbeskyttelse samtidig som vi ønsket å utvikle molekylære vaksiner. Målet var å vise at overekspressjon av T-bet og GATA-3 hos laks kan gi en bedre beskyttelse mot hhv. intra- og ekstracellulære bakterier, mens TGF- $\beta$  resulterer i dårligere beskyttelse.

Gener som kodet for transkripsjonsfaktorene T-bet, GATA-3 eller det immundempende cytokinet TGF- $\beta$  ble klonet inn i pDNA (pTagRFP). Studiet ble utført både *in vitro* ved transfeksjon av cellekultur og *in vivo* ved i.m. injeksjon i atlantisk laks.

Det ble bekreftet i cellekultur og muskelceller (injeksjonssted) tilstedeværelse av RFP ved fluorescensmikroskopisk analyse. Resultatene fra *in vivo* studiet viste at en ved rekombinant DNA teknologi med innsatte gener i ekspresjonsvektor fikk økt uttrykk av TGF- $\beta$ , T-bet og GATA-3. Med få unntak ble ikke uttrykket av relaterte gener (IFN- $\gamma$ , IL-4/13A og IL-17A) påvirket etter injeksjon av ekspresjonsvektorene. Det ble heller ikke vist økt sykdomsbeskyttelse mot hhv. ekstra- og intracellulær patogener ved overekspressjon av T-bet og GATA-3.

Nøkkelord: Overekspressjon; pDNA; TGF- $\beta$ ; T-bet; GATA-3; Adaptiv immunitet; atlantisk laks; RFP

# Innholdsfortegnelse

<b>1. INTRODUKSJON</b> .....	<b>1</b>
1.1 IMMUNSYSTEMETS MORFOLOGI OG FUNKSJONER.....	1
1.1.1 <i>Det medfødte immunforsvar</i> .....	2
1.1.2 <i>Det adaptive immunforsvar</i> .....	3
1.1.3 <i>Transkripsjonsfaktorer og cytokiner</i> .....	5
1.2 VAKSINASJON I AKVAKULTUR.....	10
1.3 DNA-VAKSINE.....	11
1.3.1 <i>Produksjon av DNA-vaksine og dens stimulering av immunforsvaret</i> .....	12
1.4 pTAGRFP-N VEKTOR.....	14
1.5 BAKTERIER.....	15
1.5.1 <i>Piscirickettsia salmonis</i> .....	15
1.5.2 <i>Vibrio anguillarum, Klassisk vibriose</i> .....	16
1.6 OVEREKSPRESJON AV T <sub>H</sub> TRANSKRIPSJONSFAKTORER OG TGF- $\beta$ <i>IN VIVO</i> SOM MOLEKYLÆRE ADJUVANSER.....	17
1.7 HENSIKT OG PROBLEMSTILLING.....	18
<b>2 MATERIAL OG METODER</b> .....	<b>19</b>
2.1 CELLELINJER.....	19
2.1.1 <i>CHSE-214 celler</i> .....	19
2.2 FISK.....	19
2.3 PRODUKSJON AV PLASMID.....	20
2.3.1 <i>Design av plasmid og kloning av gener</i> .....	20
2.3.2 <i>Kopiering og rensing av plasmid</i> .....	22
2.4 DYRKNING OG TRANSFEKSJON AV CELLEKULTUR.....	23
2.4.1 <i>Opprettholdelse av cellekultur</i> .....	23
2.4.2 <i>Transfeksjon av cellekultur</i> .....	23
2.4.3 <i>Fiksering av celler og DAPI farging</i> .....	23
2.5 DYRKNING AV <i>VIBRIO ANGUILLARUM</i> .....	24
2.6 PRESMITTEFORSØK.....	24
2.6.1 <i>Presmitteforsøk: Smitte med Vibrio anguillarum</i> .....	24
2.6.2 <i>Presmitte: Smitte med Piscirickettsia salmonis</i> .....	25
2.7 TRANSIENT GENEKSPRESJONSSTUDIE OG PRØVEUTTAK.....	25
2.7.1 <i>Pilotforsøk – transient genekspressjon</i> .....	25
2.7.2 <i>Smitteforsøk - hovedforsøk</i> .....	26
2.8 RNA ISOLERING.....	27
2.9 CDNA SYNTESE.....	28
2.10 Q-REAL TIME PCR.....	28
2.11 HISTOLOGI.....	32
2.12 STATISTIKK.....	33
<b>3. RESULTATER</b> .....	<b>34</b>
3.1 TRANSFEKSJON AV CHSE-CELLER ( <i>IN VITRO</i> ).....	34
3.2 PILOTFORSØK: TRANSIENT GENEKSPRESJON.....	35
3.2.1 <i>QPCR-analyse - generelt</i> .....	35
3.2.2 <i>Histologisk analyse – generelt</i> .....	35
3.2.3 <i>Tilstedeværelse og relativt uttrykk av TGF-<math>\beta</math></i> .....	36
3.2.4 <i>Tilstedeværelse og relativt uttrykk av T-bet</i> .....	38
3.2.5 <i>Tilstedeværelse og relativt uttrykk av GATA-3</i> .....	40
3.3 PRESMITTEFORSØK.....	41
3.3.1 <i>V. anguillarum</i> .....	41
3.3.2 <i>P. salmonis</i> .....	41
3.4 HOVEDFORSØK: TRANSIENT GENEKSPRESJON.....	42
3.4.1 <i>QPCR-analyse</i> .....	42

3.4.2 Histologisk analyse .....	42
3.4.3 Smitte med <i>V. anguillarum</i> .....	43
3.4.4 Smitte med <i>P. salmonis</i> .....	53
<b>4. DISKUSJON .....</b>	<b>59</b>
4.1 BAKGRUNN FOR OPPGAVEN .....	59
4.2 TRANSFEKSJON AV CHSE-CELLER ( <i>IN VITRO</i> ) .....	59
4.3 SMITTE MED <i>V. ANGUILLARUM</i> OG <i>P. SALMONIS</i> .....	59
4.3.1 <i>V. anguillarum</i> .....	61
4.3.2 <i>P. salmonis</i> .....	62
4.4 UTTRYKK AV TRANSKRIPSJONSFAKTORER OG CYTOKINER .....	62
4.4.1 Uttrykk av <i>TGF-β</i> .....	63
4.4.2 Uttrykk av <i>T-bet</i> .....	64
4.4.3 Uttrykk av <i>GATA-3</i> .....	65
4.4.4 Injeksjon med kontrollplasmid ( <i>pTagRFP</i> ) – medfødte immunresponser.....	66
4.5 HISTOLOGISKE ANALYSER.....	67
4.6 PLASMID DNA .....	67
4.7 FORSØKSFISK.....	68
<b>5. KONKLUSJON.....</b>	<b>70</b>
<b>6. REFERANSER.....</b>	<b>71</b>
<b>7. APPENDIKS.....</b>	<b>82</b>
APPENDIKS 1: GENSEKVENSER.....	82
APPENDIKS 2: LØSNINGER.....	85
APPENDIKS 3: GJENNOMSNIITTLIGE CT-VERDIER.....	89

# 1. Introduksjon

## 1.1 Immunsystemets morfologi og funksjoner

Selv om kartleggingen av fiskens immunforsvar ikke er kommet så langt som i enkelte pattedyrarter, antydes det at hovedtrekkene er de samme som hos pattedyr (Nerland & Sommerset, 2004). Immunsystemets hovedoppgave er å beskytte verten mot patogene bakterier, virus, sopp og parasitter. Ulike immunmekanismer sørger for at patogenene inaktiveres eller drepes. Dette skjer enten spesifikt ved at immunresponsen er rettet mot et spesifikt antigen – gjerne en liten del av antigenet (epitop), eller uspesifikt ved at immunresponsen er rettet mot en rekke ulike patogener og deres molekyler. Immunsystemet har også evne til å huske og gjenkjenne ulike mikrober. Dette legger grunnlaget for utvikling av vaksiner mot sykdom (Poppe, 2002).

Morfologien til fiskens immunsystem skiller seg fra immunsystemets oppbygging og form hos pattedyr ved at fisken mangler beinmarg og lymfeknuter som blant annet er hhv. bloddannende og immunologiske organer hos pattedyr. For fisken er det nyren som er det sentrale lymfoide organet i tillegg til thymus, milt og slimhinneassosierte organer som tarm, hud og gjeller (Press & Evensen, 1999). Leukocytter hos fisk kan deles i granulocytter, monocytter/makrofager og lymfocytter. Lymfocytene kan igjen deles i B- og T- lymfocytter. Det er disse som har hovedansvar for den adaptive og spesifikke gjenkjennelsen av antigener. Cellene som inngår i immunsystemet er lokalisert til ulike organer og vev og fraktes rundt ved hjelp av blod og lymfe (Poppe, 2002).

Thymus er lokalisert øverst i gjellekammeret (Press & Evensen, 1999). Organet består hovedsakelig av lymfoide celler som T-lymfocytter (Poppe, 2002; Ellis, 1998). Fra pattedyr er det kjent at T-lymfocytter migrerer fra beinmarg til thymus hvor lymfocytene modnes før de sendes ut via sirkulasjonen til de perifere lymfoide organene (Abbas & Lichtmann, 2009). Thymus hos fisk har sannsynligvis tilsvarende oppgaver, da det har lignende struktur og sammensetning av celletyper (Poppe, 2002).

Hodenyre er lokalisert i fremre del av fiskens nyre ventralt for ryggraden. Den er et av de viktigste hematopoetiske (bloddannende) og immunologiske organene fisken har (Ellis, 1998) og har lignende morfologi til beinmargen hos høyerestående vertebrater

## Introduksjon

(Meseguer *et al.*, 1995). Makrofagene og endotelcellene i sinusoidene i hodenyren fanger opp partikler og substanser fra blodstrømmen (Dannevig *et al.*, 1994) og relativt store mengder antistoffer blir produsert i hodenyre.

Histologisk deles milten inn i rød og hvit pulpa. Den hvite pulpaen er ofte lite utviklet og deles i melanomakrofagsentra og ellipsoider (Press & Evensen, 1999). Den røde pulpaen består av sinusoider og inneholder immunceller som makrofager og lymfocytter (Poppe, 2002).

Den fysiologiske funksjonen til immunsystemet er å forebygge og utslette infeksjoner og dens interaksjoner mot infeksiose mikrober kalles immunrespons. Immunitet er dermed definert som vertens evne til å motstå sykdom, og deles inn i det medfødte- og adaptive forsvar (Abbas & Lichtman, 2009).

### 1.1.1 Det medfødte immunforsvar

Det medfødte immunforsvaret er fiskens førstelinjeforsvar og er alltid beredt til å stå i mot og eliminere mikrober når de entrer verten. Epitelbarrieren (epitelceller, spesialiserte celler og naturlig antibiotika) sammen med forsvarsmolekyler er en stor del av forsvaret. Dersom mikrobene kommer seg forbi epitelet blir de møtt av fagocytter, spesialiserte lymfocytter, som kalles "natural killer" (NK) celler, og flere plasmaproteiner inkludert C-reaktive proteiner og proteiner i komplementsystemet. Det medfødte immunforsvaret kan dermed deles inn i en cellulær og en humoral del. Komponentene i det medfødte forsvaret gjenkjenner strukturer for klasser av mikrober og reagerer raskt med påfølgende immunrespons. Det reagerer hovedsakelig mot mikrober og vil i de fleste tilfellene ikke respondere mot ikke-infeksiøse substanser (Abbas & Lichtman, 2009). Det medfødte immunsystemet kan aktivere den adaptive immunresponsen gjennom stimulering av T- og B-celler samt antigenpresenterende celler (APC) (Lo *et al.*, 1999).

Dendritiske celler, monocytter, makrofager og nøytrofiler har en gruppe reseptorer kalt "Pattern Recognition Receptors" (PRR). Disse reseptorene kan kjenne igjen "Pathogen Associated Molecular Patterns" (PAMP), som for eksempel lipopolysakkarider (LPS) og mikrobielle nukleinsyrer (Medzhitov & Janeway, 2000; Abbas & Lichtman, 2009). Toll-lignende reseptorer (TLR) er en familie av PRR og vil kjenne igjen PAMP (Medzhitov &

## Introduksjon

Janeway, 2000). Som eksempel: CpG er relativt utbredt i bakterielt DNA (Bird, 1987) og fungerer som naturlig adjuvans/immunstimulant ved å fremme funksjon av APC og kostimulere lymfocytter (Carrington & Secombes, 2006). TLR 9 gjenkjenner umetylerte CpG "motifs", som er viktig for induksjon av det medfødte immunforsvaret (Medzhitov & Janeway, 2000) og for produksjon av antivirale cytokiner (Jørgensen *et al.*, 2003). Det høye innholdet av umetylerte CpG i bakterielt DNA vil oppfattes som faresignal av immunforsvaret hos vertebrater. Studier har vist at CpG stimulering av immunforsvaret hos laks har gitt en økt overlevelse ved infeksjon av Infeksiøs Pankreas Nekrose Virus (IPNV) (Jørgensen *et al.*, 2003).

### 1.1.2 Det adaptive immunforsvar

Det adaptive immunforsvaret består hovedsakelig av lymfocytter og deres produkter. Disse uttrykker reseptorer som spesifikt gjenkjenner ulike antigener fra mikrober og ikke-infeksiøse substanser. Responsene til det adaptive immunforsvaret er spesialisert for å nedkjempe ulike typer infeksjoner (Abbas & Lichtman, 2009). De adaptive immunresponsene deles i to hovedgrupper; humoral og cellemediert respons. Hvilken del som blir stimulert ved infeksjon, avhenger av om mikroorganismens antigener har evne til å stimulere hhv. B- eller T-lymfocytter (B- og T-celler) og hvordan disse antigenene blir presentert for immunsystemet (Nerland & Sommerset, 2004).

#### ***Humoralt immunforsvar***

Det humorale forsvaret består hovedsakelig av B-celler og løselige forsvarsmolekyler. Det er mediert av antistoffer og er den delen av immunforsvaret som nøytraliserer og eliminerer ekstracellulære mikrober og toksiner. Naive B-celler gjenkjenner antigener ved hjelp av reseptorer i form av membranbundne antistoffer: Immunglobulin M, D og T (IgM, IgD, IgT) (Hansen *et al.*, 2005). Ig består av fire polypeptidkjeder; to "heavy chains" og to "light chains", hver av kjedene består av et variabelt og et konstant domene. Ved aktivering av Ig reseptorer og ved hjelp av cytokiner vil B-cellene differensiere til effektorceller kalt antistoffutskillende plasmaceller og hukommelsesceller. Under differensiering vil enkelte B-celler produsere antistoffer av ulike isotyper av "heavy chain". Dette fører til spesifikke effektorfunksjoner mot ulike mikrober – basert på hva denne regionen (Fab region) gjenkjenner. T-hjelpeceller (T<sub>H</sub>-celler) gjenkjenner proteinantigener uttrykt på APC og spiller derfor en viktig rolle i B-celle aktivering ved å

## Introduksjon

indusere blant annet "heavy-chain isotype switching". Uten hjelp fra T<sub>H</sub>-celler vil man ikke få antistoffrespons mot proteinantigener, og man er derfor avhengig av interaksjoner mellom B- og T-celler. Denne responsen kalles T-avhengig. Polysakkarid-, lipid- og enkelte proteinantigener stimulerer antistoffproduksjonen uten involvering av T-celler og prosessen er derfor kalt en T-uavhengig respons. En del av aktiverte B-celler, ofte etterkommere av "isotype switched high affinity" B-celler, blir til hukommelsesceller. De kan overleve opptil flere år i blod og vev i påvente av en reinfeksjon (Abbas & Lichtman, 2009).

### ***Cellulært immunforsvar***

Mikrober som overlever den fagocytiske aktiviteten i det medfødte immunsystemet samt mikrober som har infisert ikke-fagocytterende celler, utgjør grunnlaget for det cellulære immunforsvaret. Det cellemedierte forsvaret er en viktig del av det adaptive immunforsvaret som hovedsakelig nedkjemper mikrober som forårsaker intracellulære infeksjoner. Forsvaret er mediert av T-celler som etter aktivering via T-celle reseptorer (TCR), MHC (major histocompatibility complex), samt en rekke enzymer (for eksempel tyrosin kinaser), kofaktorer (for eksempel CD28), koreseptorer (for eksempel CD4 og CD8), hjelpemolekyler (for eksempel CD3) og transkripsjonsfaktorer (for eksempel T-bet og GATA-3) kan differensiere til ulike T<sub>H</sub>-effektorceller. Naive T-celler uttrykker antigenreseptorer og andre molekyler som muliggjør antigengjenkjenning. De har imidlertid ikke mulighet til å respondere mot antigenene før de har differensiert til T<sub>H</sub>-effektorcellene; CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> og hukommelsesceller. Aktiverte T-celler kan differensiere til de langtidslevende hukommelsescellene; CD4<sup>+</sup> og CD8<sup>+</sup> - "memory" celler. Disse vil i etterkant av en infeksjon finnes i lymfoide organer, mukosalt vev og i sirkulasjonssystemet, og vil kunne reagere raskt ved en eventuell reinfeksjon. Denne mekanismen er derfor grunnlaget for vaksinasjon og langtidsbeskyttelse mot sykdom. CD8<sup>+</sup> T-celler fungerer som cytotoksiske T-lymfocytter (CTL) og vil gjenkjenne peptider fra cytoplasmatiske mikrober tatt opp av APC og presentert gjennom MHC klasse I. Også andre celletyper kan presentere peptider via MHC I. CD4<sup>+</sup> T-celler fungerer som en cytokinproduserende T<sub>H</sub>-celle og vil gjenkjenne mikrobielle antigener som er tatt opp av APC fra det ekstracellulære miljøet og uttrykkes gjennom MHC klasse II (Abbas & Lichtman, 2009).

## Introduksjon

Naive CD4<sup>+</sup> T-celler kan "polarisere" og differensiere til T<sub>H</sub>1-, T<sub>H</sub>2- og T<sub>H</sub>17-celler (Abbas & Lichtman, 2009). T-bet og GATA-3 er hovedtranskripsjonsfaktorene som bestemmer skjebnen til T<sub>H</sub>1- og T<sub>H</sub>2-cellene (Aune *et al.*, 2009). Dette er en essensiell egenskap i det cellulære immunsystemet hos pattedyr mot ulike patogener og for utvikling av langtidsimmunitet (Takizawa *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2010).

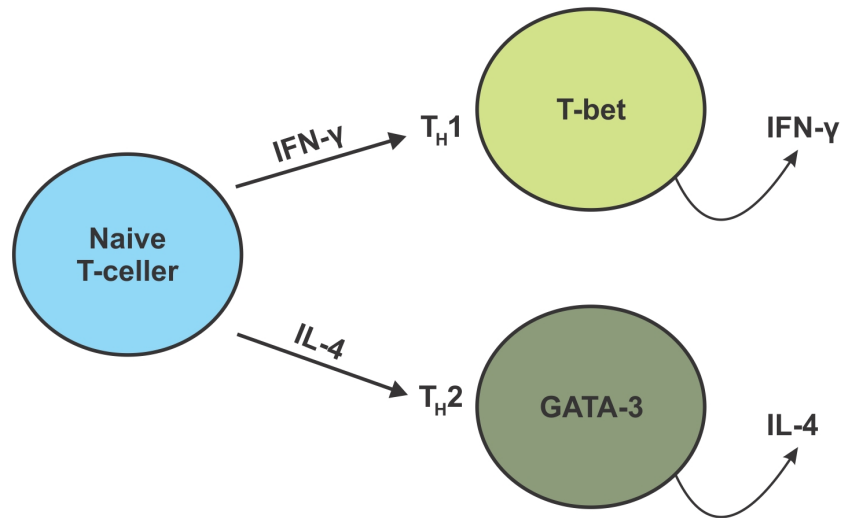
T<sub>H</sub>1-celler er viktige i forsvaret mot intracellulære patogener, mens T<sub>H</sub>2-celler er viktige i bekjempelsen av ekstracellulære patogener (Heinzel *et al.*, 1989). Ved økende uttrykk av T-bet i T<sub>H</sub>1-celler, vil uttrykket av GATA-3 synke. Dette vil føre til at IFN- $\gamma$  transkriberes, mens man vil få nedregulering av IL-4. Det motsatte vil skje i T<sub>H</sub>2-celler hvor økende uttrykk av GATA-3 vil gi nedregulering av T-bet. IL-4 vil transkriberes mens uttrykket av IFN- $\gamma$  vil undertrykkes (Aune *et al.*, 2009). De funksjonelle forskjellene mellom T<sub>H</sub>-cellene vil bli bestemt av ulike cytokiner og deres aktivitet. IFN- $\gamma$  er signaturcytokinet til T<sub>H</sub>1-cellene, mens IL-4 er signaturcytokinet til T<sub>H</sub>2-cellene. Begge skiller i tillegg ut andre cytokiner (Szabo *et al.*, 2000; Ho *et al.*, 2009).

### 1.1.3 Transkripsjonsfaktorer og cytokiner

Transkripsjonsfaktorer er proteiner som kontrollerer når gener er på eller av og dermed om gener transkriberes eller ikke. Transkripsjonsfaktorer binder seg til regulatoriske seter på genomet og er med på å kontrollere genuttrykket (MedicineNet, 2003). To sentrale transkripsjonsfaktorer som regulerer differensieringen av naive T-celler, er T-bet og GATA-3 (Fig. 1.1). Cytokiner er utskilte proteiner som medierer immun- og inflammatoriske funksjoner. Cytokiner blir produsert av makrofager og "natural-killer" celler (NK-celler) ved medfødte responser, mens det i hovedsak er T-celler som produserer cytokiner ved adaptive responser (Abbas & Lichtman, 2009).



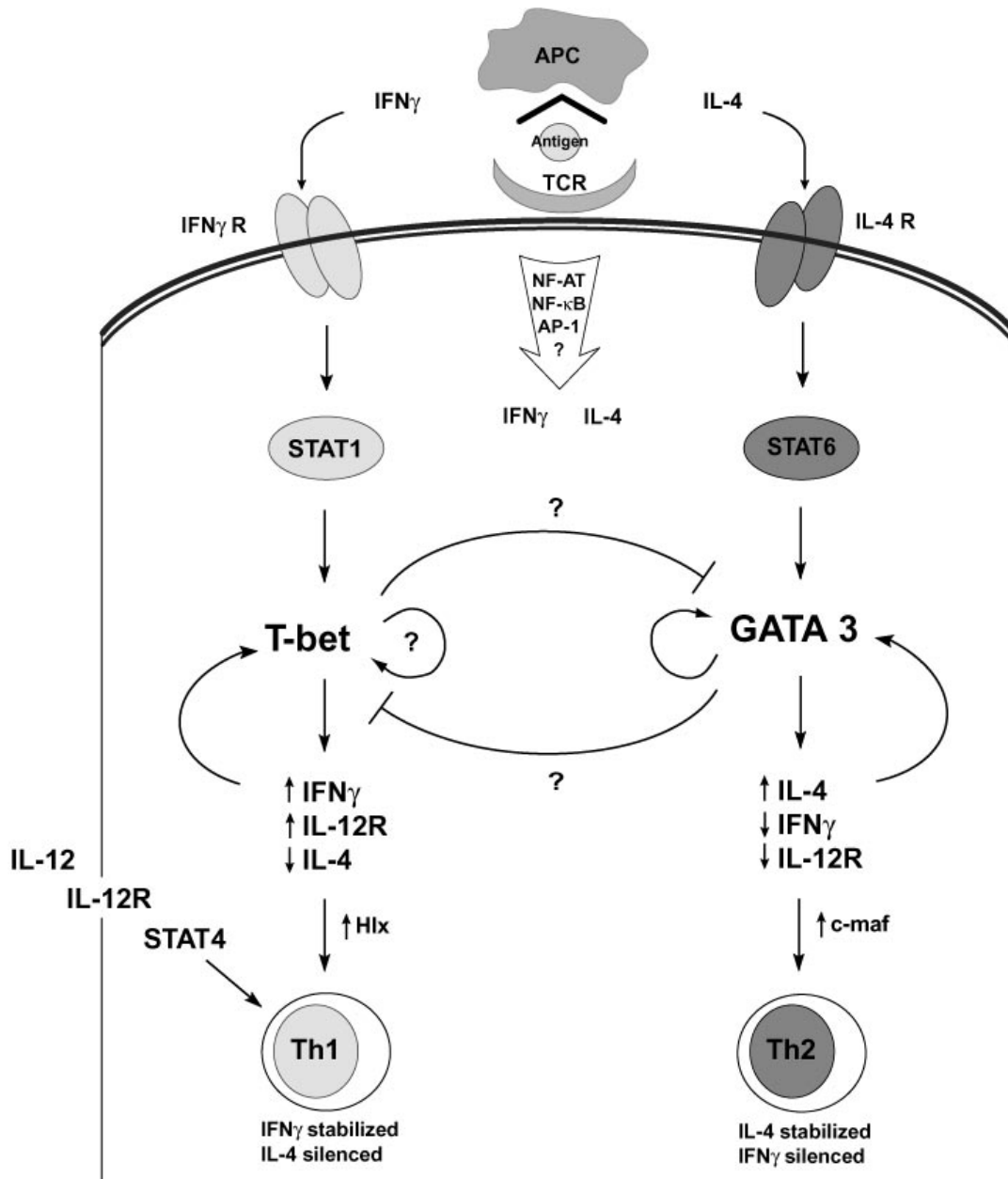
## Introduksjon



**Figur 1.1.** Differensiering av naive T-celler til  $T_H1$ - og  $T_H2$ -celler, avhenger av T-bet industert IFN- $\gamma$  og GATA-3 industert IL-4. Figuren er modifisert fra Murphy & Reiner, (2002).

Figur 1.2 gir en oversikt over hvilken innvirkning transkripsjonsfaktorene og deres cytokiner har på hverandre samt hvordan de ved hjelp av signalveier regulerer  $T_H$ -cellene når de blir presentert for antigener. IFN- $\gamma$  og IL-4 har positiv og negativ regulatorisk feedback på  $T_H1$  og  $T_H2$  polariseringen. Uttrykket av T-bet avhenger av IFN- $\gamma$ , produsert av celler i det medfødte forsvar eller fra naive CD4 T-celler. Sistnevnte vil fremme  $T_H1$ -utvikling ved aktivering av STAT 1 ("Signal Transducers and Activators of Transcription family of transcription factors").  $T_H2$ -differensiering skjer gjennom aktivering av STAT 6 av IL-4 slik at man får et økt uttrykk av GATA-3. T-bet og GATA-3 kan også hemme den motsatte  $T_H$ -linjen, sannsynligvis ved å hemme  $T_H$ -regulatoren til hverandre (Szabo *et al.*, 2003).

## Introduksjon



Figur 1.2. Igangsetting av  $T_H1$  og  $T_H2$  differensiering via T-bet og GATA-3. Figuren er hentet fra Szabo *et al.*, (2003).

### **GATA-3 og IL-4**

GATA-familien, slik vi kjenner den fra pattedyr, består av seks grupper; GATA-1 til 6. GATA-1 til 3 er hematopoetiske faktorer, mens GATA-4 til 6 er endodermale faktorer (Burch, 2005; Ho *et al.*, 2009). Uttrykket av GATA-3 i de hematopoetiske linjene er knyttet til T-, NK-, og NKT-celler og er den av GATA-familien som er sterkest uttrykt i immunceller (Ho *et al.*, 2009). GATA-3 spiller en aktiv og viktig rolle i utvikling og modning av T-celler og differensiering av  $CD4^+$  T-celler til  $T_H2$ -celler (Zhang *et al.*, 1997; Zheng & Flavell, 1997; Murphy & Reiner, 2002). RT-PCR-analyser har vist at GATA-3 fra

## Introduksjon

atlantisk laks er sterkt uttrykt i gjeller, thymus og hjerne. GATA-3 cDNA er identifisert og karakterisert i full lengde hos laks, og består av 3074 basepar. GATA-3 har et N-terminalt transaktiverende domene og to sinkfingre; N-terminal og C-terminal (Kumari *et al.*, 2009). Den C-terminale sinkfingeren er essensiell for DNA-binding, mens bindingen stabiliseres av den N-terminale sinkfingeren samtidig som den fysisk interagerer med andre sinkfingerproteiner som FOG (Friends of GATA)(Fox *et al.*, 1998). GATA-3 hemmer uttrykket av IFN- $\gamma$  og transaktiverer produksjon av IL-5 og IL-13 direkte (Ho *et al.*, 2009). N- og C-terminal sinkfingre har ulike roller i induksjonen av IL-4, IL-13 og IL-5 (Takemoto *et al.*, 2002). IL-4 kan virke triggende på differensieringen av T<sub>H</sub>-celler (Ho *et al.*, 2009) og indusere humoral immunrespons (Gratacap, 2008). IL-4 binder seg til IL-4 reseptorer og stimulerer cellene slik at flere signalveier aktiveres (Murphy & Reiner, 2002). En av disse er STAT 6, som er essensiell ved differensiering av T-celler til T<sub>H</sub>2 celler (Kaplan *et al.*, 1996) slik at det blir et høyt nivå av GATA-3 i T<sub>H</sub>2-cellene (Murphy & Reiner, 2002). GATA-3 har sentral rolle i både STAT 6-avhengig og STAT 6-uavhengig signalvei ved differensiering av T<sub>H</sub>2-celler (Ho *et al.*, 2009). Uttrykket av GATA-3 i atlantisk laks er relativt høyt etter infeksjon og immunstimulering. Dette indikerer at den har en rolle i fiskens immunsystem (Kumari *et al.*, 2009). Takizawa *et al.* (2011) har vist at GATA-3 og IL-4/13A er sterkt uttrykt i gjeller, thymus og hud, i atlantisk laks og regnbueørret, i motsetning til hos mus hvor det kun ble funnet sterkt uttrykt i thymus. Det er nærliggende å tro at det høye uttrykket i thymus står i sammenheng med tidlig T-celle utvikling slik det er kjent i pattedyr, mens uttrykket i gjellene og huden kan beskytte mot parasitter og inflammatoriske T<sub>H</sub>-celle responser (Takizawa *et al.*, 2011).

### ***T-bet og IFN- $\gamma$***

T-bet tilhører T-box familien, som er definert ved et felles DNA-bindende domene, kalt T-box (Naiche *et al.*, 2005). T-bet er et protein bestående av 530 aminosyrer, med et DNA-bindende T-box domene på 189 aminosyrer (Szabo *et al.*, 2000). I atlantisk laks er cDNAet identifisert til 2293 bp (Zhang *et al.*, upublisert data). T-bet er det eneste T-box genet som selektivt blir uttrykt i det lymfatiske systemet (Szabo *et al.*, 2003), og uttrykkes kun i immunsystemets celler (Szabo *et al.*, 2000). T-bet som transkripsjonsfaktor driver differensiering av T<sub>H</sub>1-celler (Szabo *et al.*, 2003). I tillegg til å virke på T-celler, induserer og vedlikeholder T-bet et differensieringsprogram i B-celler

## Introduksjon

(Harris *et al.*, 2005). Uttrykket av T-bet kan også bli induert i både monocytter og dendrittiske celler og er nødvendig i sistnevnte for å oppnå en optimal produksjon av interferoner og promotering av T<sub>H</sub>1 programmer i T<sub>H</sub>-celler (Lugo-Villarino *et al.*, 2005). I tillegg er T-bet viktig for cellelinjebinding av CD4<sup>+</sup> T<sub>H</sub>-lymfocytter (Szabo *et al.*, 2000). T-bet transaktiverer IFN- $\gamma$ , induserer IFN- $\gamma$  produksjon i retroviralt transduerte primære T-celler og omdirigerer polariserte T<sub>H</sub>2-celler inn i T<sub>H</sub>1 signalveien (Szabo *et al.*, 2000). Siden transaktiveringen av IFN- $\gamma$  av T-bet er så sterk, er det vanskelig å avgjøre hvilke gener som er mål for T-bet og hvilke som ligger nedstrøms for IFN- $\gamma$ . Dette er fordi IFN- $\gamma$  er kjent for å inducere uttrykk av flere hundre gener (Lord *et al.*, 2005). IFN- $\gamma$  vil i tillegg inducere cellulær immunrespons (Gratacap, 2008). Tidligere studier har vist at T-bet i karpe er sterkt uttrykt i hodenyre og milt og lavt til moderat uttrykt i gjeller, hjerne og hud. Det ble også antydnet på bakgrunn av uttrykk av T-bet i lymfoid vev og lymfocytter at T-bet er involvert i T-cellemediert forsvar og utvikling av T-celler, slik som hos pattedyr (Takizawa *et al.*, 2008). Wang *et al.* (2010) foreslår, på bakgrunn av sine studier på regnbueørret, at T-bet fremmer ekspresjon av IFN- $\gamma$  i frisk fisk.

### **TGF- $\beta$ og IL-17A**

TGF- $\beta$  er et cytokin som har flere ulike regulatoriske funksjoner i immunforsvaret (Letterio & Roberts, 1998). Det er kjent at TGF- $\beta$  er delaktig i generering av regulatoriske T-celler, og det er mulig at dette skjer ved stimulering av transkripsjonsfaktoren Foxp3 (Abbas & Lichtman, 2009). TGF- $\beta$  er i mennesker produsert av de fleste immunceller; aktiverte T-celler (Kehrl *et al.*, 1986a), B-celler (Kehrl *et al.*, 1986b) og DC (Cerwenka & Swain, 1999). En av rollene til cytokinet er å hemme differensieringen av naive T-celler til effektorcellene T<sub>H</sub>1 og T<sub>H</sub>2 (Sad & Mosmann, 1994; Cerwenka & Swain, 1999). TGF- $\beta$  inhiberer differensieringen til T<sub>H</sub>2-celler ved å hemme uttrykket av GATA-3 (Heath *et al.*, 2000; Gorelik *et al.*, 2000). Det er vist både *in vitro* og *in vivo* at TGF- $\beta$  kan hemme differensiering av T<sub>H</sub>1-celler ved hemming av T-bet (Gorelik *et al.*, 2002; Cerwenka & Swain, 1999). TGF- $\beta$  regulerer aktivering og differensiering av B-celler (Kehrl *et al.*, 1986b), monocytter (Mc Cartney-Francic *et al.*, 1990), makrofager (Celada & Maki, 1992) og DC (Strobl *et al.*, 1996). TGF- $\beta$  er målt i ulike vev, i leukocytter, makrofager i nyre, hjerne, gjeller og milt (Hardie *et al.*, 1998) og har blitt klonet og sekvensert fra blant annet regnbueørret og karpe (Daniels &

## Introduksjon

Secombes, 1999). Yang & Zhou (2008) foreslo at TGF- $\beta$  potensielt sett har en rolle i immunsystemet hos karpe da det høyeste uttrykket av dette cytokinet er målt i viktige lymfoide organer. Det er også vist at nivået av TGF- $\beta$  øker i milt og lever etter infeksjon av VHSV i regnbueørret. Selv om det er kjent at TGF- $\beta$  har flere nedregulerende effekter kan den også ved tidlige stadier av infeksjon fremme CD8+ T-celle responser (Tafalla, 2005).

TGF- $\beta$  kan regulere uttrykket av IL-17A ved blant annet å stimulere utskillelsen gjennom T<sub>H</sub>17. IL-17A er hovedmedlemmet i IL-17 familien som består av seks cytokiner. Familien deler ingen homologiske sekvenser med andre kjente pattedyrproteiner og skiller seg derfor distinkt fra andre cytokinfamilier. Nyere studier viser at IL-17A kan fungere som en krysslink mellom det medfødte og det adaptive forsvaret (Weaver *et al.*, 2007). Tidligere har IL-17A vært assosiert med CD4 hukommelsesceller. Nyere studier har vist at cytokinet i tillegg er koblet til T<sub>H</sub>17-linjen (Weaver *et al.*, 2006), CD8 T-celler (Happel *et al.*, 2003),  $\gamma\delta$  T-celler, NK-celler (Stark *et al.*, 2005) og nøytrofiler (Ferretti *et al.*, 2003). IL-17A kan øke uttrykket av proinflammatoriske cytokiner og chemokiner (Kolls & Linden, 2004).

### 1.2 Vaksinasjon i akvakultur

En vaksine er et preparat som forbedrer immunresponsen mot en bestemt sykdom eller patogen. Vanligvis inneholder vaksinen et agens som er identisk eller ligner mikroorganismen som fremkaller sykdom. I en vaksine kan det benyttes drepte, svekkede eller komponenter av mikroorganismer. Disse injiseres i kroppen og fremkaller en beskyttende antistoffrespons mot eventuelt senere infeksjon med samme mikroorganisme (Poppe, 2002).

Bakteriesykdommer som vibriose og furunkulose gav på slutten av 1980-tallet oppdrettsnæringen store sykdomsproblemer. Disse ble bekjempet ved bruk av store mengder antibakterielle midler. Forbruket har siden den gang blitt betydelig redusert og bruken er i dag begrenset til et minimum. Hovedårsaken til at forbruket har gått så drastisk ned, er innføring av effektive vaksiner som fører til at dødeligheten og tapene blir betydelig lavere ved et eventuelt sykdomsutbrudd. Vaksinasjon av oppdrettsfisk er

## Introduksjon

derfor et av de viktigste forebyggende tiltak mot sykdomsutbrudd. Til tross for dette er det fortsatt en del sykdommer som gir næringen utfordringer. Mot disse finnes det per i dag ikke tilstrekkelige vaksiner. Blant annet er det utfordrende å få til en effektiv vaksine mot intracellulære mikroorganismer. Årsaken er at fiskens immunforsvar ved bruk av de tradisjonelle vaksinene (inaktiverte antigener), ikke blir trigget på tilfredstillende måte. Injeksjon av inaktiverte antigener vil kun føre til en humoral immunrespons, mens det er ønskelig å trigge både det humorale og det cellulære forsvaret for å bekjempe infeksjoner forårsaket av intracellulære mikroorganismer. En DNA-vaksine kan være en mulig løsning mot slike mikroorganismer, da den vil trigge både humoral og cellulær immunrespons (Gurunathan *et al.*, 2000; Nerland & Sommerset, 2004; Tonheim *et al.*, 2007; Myhr, 2009).

### 1.3 DNA-vaksine

Definisjonen av DNA-vaksine gitt av bioteknologinemda er: "Vaksine som består av sirkulære DNA-kjeder (plasmider) som injiseres i muskulatur slik at muskelcellene tar opp plasmidene. Gjennom de regulerende gensekvensene i DNA-vaksinen vil man få produksjon av protein-antigen fra det aktuelle viruset (patogenet) ved hjelp av cellens eget maskineri" (Myhr, 2009).

Allerede i 1990 viste Wolff *et al.* (1990), i et banebrytende *in vivo* studie, at direkte intramuskulær (i.m) injeksjon av plasmid DNA kunne indusere proteinuttrykk i muskelcellene. I.m injeksjon har vist seg å være blant de mest effektive administrasjonsrutene for igangsetting av den humorale og cellulære immunresponsen, og er derfor en av de vanligste injeksjonsmetodene for DNA-vaksinasjon (Fynan *et al.*, 1993; Kjekken *et al.*, 2006). Observasjonene Wolff *et al.* (1990) gjorde ble videre undersøkt av Tang *et al.* i 1992. Det ble senere vist at DNA-vaksinasjon gav en beskyttende immunitet mot influensa hos mus (Ulmer *et al.*, 1993) og kylling (Robinson *et al.*, 1993). Studiet gjort på mus dokumenterte at det ble utløst både antistoff og CD8+ cytotoksisk T-lymfocyt (CTL) respons. Dette bekreftet DNA-vaksinens stimulering av immunforsvaret (Gurunathan *et al.*, 2000).

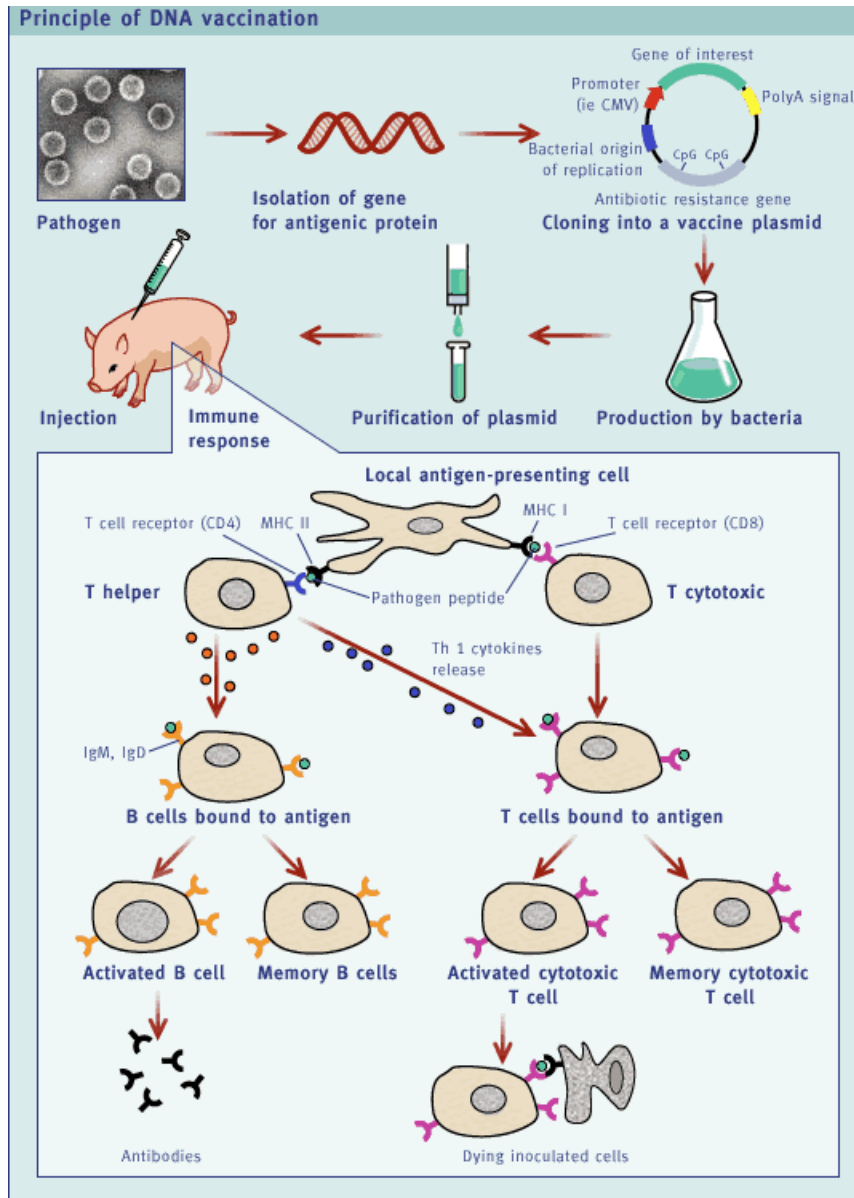
## Introduksjon

Det har blitt gjort flere suksessfulle studier med DNA-vaksiner til fisk mot virale patogener. Traxler *et al.* (1999) viste at injeksjon av plasmid DNA, kodende for glykoprotein i infeksiøs hematopoetisk nekrose virus (IHNV), gav god beskyttelse både ved bad- og kohabitant smitte. DNA-vaksinene ble gitt ved i.m injeksjon, og studiene har vist at DNA vaksinasjon kan være et kraftig og viktig verktøy i bekjempelsen mot enkelte infeksiøse patogener som forårsaker alvorlige sykdommer hos fisk og utfordringer for oppdrettsnæringen (Lorenzen *et al.*, 1998, 1999; Corbeil *et al.*, 2000). I 2006 ble den første DNA-vaksine mot IHNV til laks godkjent i Canada. Vaksinen har vist seg å være meget effektiv mot virussykdommen (Novartis Aquahealth; Letnes, 2006). Det ble konkludert i Tonheim *et al.* (2008a) at det er nødvendig med videre utvikling av vaksinestrategier for fisk for å sikre fremtidig vekst i akvakulturnæringen, og DNA-vaksiner har vist seg svært lovende som vaksinestrategi mot virussykdommer.

### **1.3.1 Produksjon av DNA-vaksine og dens stimulering av immunforsvaret**

Det første steget ved produksjon av DNA-vaksine er å identifisere og klonere et beskyttende antigen fra den patogene organismen. Dette skjer ved at den sykdomsfremkallende patogene organismen blir isolert, genomet blir sekvensert og sekvenser for potensielle antigener blir valgt ut. Ved hjelp av rekombinant DNA-teknologi blir DNA-sekvensene klonet inn i plasmidvektorer. Et plasmid er et ekstrakromosomalt genetisk element som kan fungere som kloningsvektor fordi det kan replikere seg i de cellene det blir satt inn i og dermed replikere de innklonedede genene man ønsker å få uttrykt (Madigan & Matinko, 2006). Plasmidene blir oppkopiert ved innsetting i bakterier med påfølgende dyrking av bakteriene (Dufour, 2001). Plasmidene blir tilslutt reisolerte og renses før de blir injisert direkte i dyret som skal vaksineres (Robinson & Torres, 1997) (Fig. 1.3). Plasmidene brukt i DNA-vaksinestudier inneholder ofte blant annet promotor, genet man ønsker å få uttrykt, antibiotika resistens, sete for replikasjon og sete for transkripsjonsterminering. For å få uttrykt det ønskede genet blir pDNAet transkribert og mRNAet blir translatert til protein av cellens egne funksjoner (Tonheim *et al.*, 2008a).

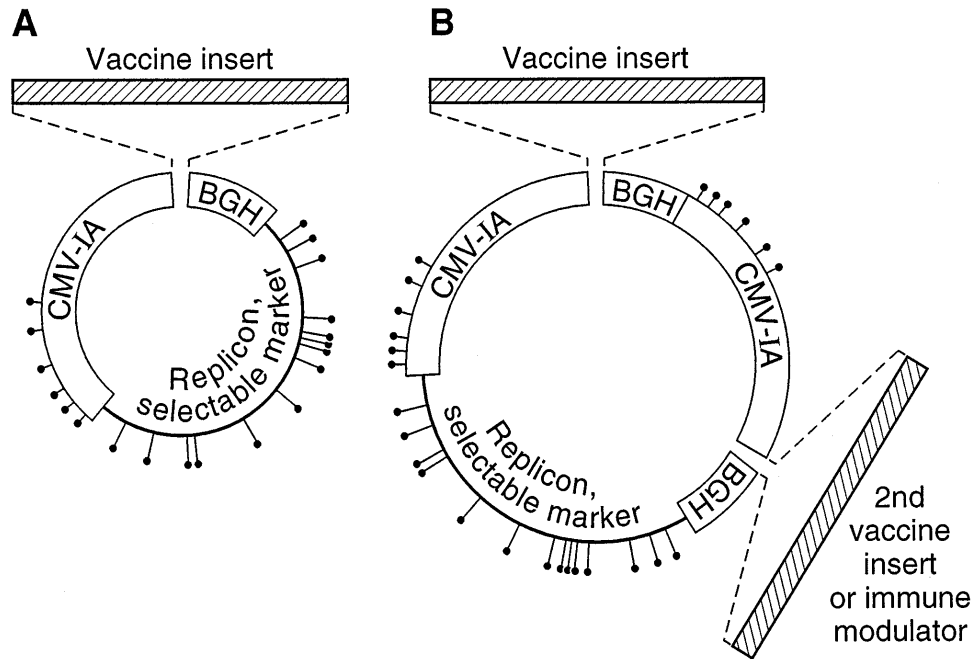
## Introduksjon



Figur 1.3. Skjematisk fremstilling av prinsippet bak DNA-vaksinasjon. Viser også humoral og cellulær immunrespons. Figuren er hentet fra vetscite.org, Dufour, (2001).

Flere gener kan klones inn i samme plasmid (Fig. 1.4). Dette gir hypotetisk en mulighet for beskyttelse mot flere patogener. Kombinasjon av DNA-sekvenser som koder for ulike patogener eller kombinasjoner med innsetting av gener som koder for ulike immunmodulatorer som for eksempel cytokiner (Iwasaki *et al.*, 1997), kan virke som molekylære adjuvanser og blant annet øke den cytotoksiske T-celleresponsen dersom det ønskes. Når plasmidet tas opp av vertens celler kan genene bli uttrykt (Robinson & Torres, 1997; Liu, 2003).





**Figur 1.4. Eksempler på plasmid som kan benyttes i vaksiner. B) viser eksempel på koekspressjon med tilleggsgen. Figuren er hentet fra Robinson & Torres (1997).**

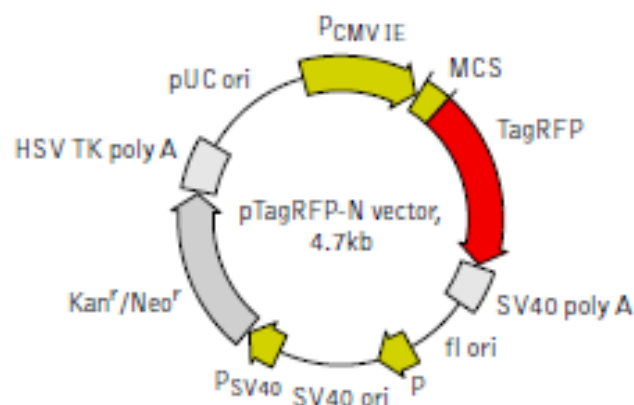
Ved DNA-vaksinasjon vil immunsystemet bli stimulert på samme måte som ved en naturlig infeksjon med virus eller intracellulære bakterier og vil bidra til en beskyttende immunrespons mot intracellulære patogener (Nerland & Sommerset, 2004). Ved injeksjon av plasmid, kodende for antigener, vil antigener bli presentert på celleoverflaten sammen med MHC klasse I og dermed stimulere cytotoksiske T-celler. Fritt antigen vil kunne tas opp av makrofager og andre antigenpresenterende celler. De vil så kunne bli presentert på overflaten sammen med MHC klasse II og dermed stimulere  $T_H$ -celler. DNA-vaksiner vil på denne måten kunne simulere en intracellulær infeksjon og gi en beskyttende immunrespons. En DNA-basert vaksine lar seg i tillegg kombinere med ulike adjuvanser, og den lar seg lett modifisere slik at man får både en humoral og cellulær respons (Nerland & Sommerset, 2004) (Fig. 1.3).

#### 1.4 pTagRFP-N vektor

Det ble i dette studiet benyttet et plasmid kalt pTagRFP-N vector fra Evrogen. Plasmidet er en uttrykksvektor som koder for rødt fluorescerende protein (TagRFP). Vektoren kan

## Introduksjon

brukes alene eller sammen med andre gener eller proteiner. Det multiple kloningssettet (MCS), er lokalisert mellom  $P_{CMVIE}$  og TagRFP (Fig. 1.5). Genene ble klonet inn i MCS. De ble dermed uttrykt sammen med TagRFP N-terminus, da de ble satt inn i den samme leserammen som TagRFP. Ved å la plasmidet være umodifisert, vil det fortsatt uttrykke RFP når det blir transfektert inn i pattedyrceller. Plasmidet har en bakteriell promotor (P) som gir et kanamycinresistent genuttrykk ( $kan^r$ ) i *E. coli*. Plasmidet er kanamycinresistent opp til 30  $\mu\text{g/ml}$  i *E. coli* som vert. Plasmidet vil i *E. coli* kopieres 500 ganger (Evrogen).



Figur 1.5. pTagRFP-N vektor som ble benyttet som ekspresjonsvektor i studiene (Evrogen).

## 1.5 Bakterier

### 1.5.1 *Piscirickettsia salmonis*

Orden → Rickettsiales Familie → Rickettsiaceae Art → *Piscirickettsia salmonis*

*Piscirickettsia salmonis* ble isolert og karakterisert som årsak til sykdom hos fisk for første gang i 1989, men det første registrerte tilfellet i Norge var i 1988 (Poppe, 2002). Det ble i 2011 ikke registrert noen tilfeller med *P. salmonis* i Norge (Olsen *et al.*, 2011).

*P. salmonis* er en obligat intracellulær bakterie som forårsaker Piscirickettsiose. Den er gram negativ og ubevegelig. Bakterien har en diameter på 0,5-1,8  $\mu\text{m}$  og har en rund eller kokkoid form. Det er oppdaget ulike isolater av bakterien som kan skilles ved bruk av monoklonale antistoffer. Siden den er obligat intracellulær, replikerer den ved todeling i membranavgrensede vakuoler i fiskecellecitoplasma eller i vev hos infisert

## Introduksjon

fisk. Ved dyrkning *in vitro* er den optimale temperaturen 15-18 °C. Bakterien krever blod i dyrkningsagaren (Mauel *et al.*, 2008), sau- eller humant blod er ofte brukt. Ved dyrkning i dette studiet ble det benyttet Cysteine Heart Agar med 5% blod (CHAB-agarplater). Det blir i dag brukt histologi for å påvise bakterien i vev hos fisk. Egnede fargemetoder er hematoksylin- og eosinfarge, Giemsa og metylenblått. I tillegg brukes immunhistokjemi, immunfluorescens eller ELISA som bekreftelse for å stille diagnose. Det er også vist at man kan benytte PCR (Corbeil & Crane, 2009) og qPCR for deteksjon og kvantifisering av *P. salmonis* i fisk (Corbeil *et al.*, 2003).

Piscirickettsiose er en systemisk septisk infeksjon. Denne har også har vært kalt Salmon Rickettsial Septicaemia (SRS) på grunn av sitt septiske sykdomsbilde. Den er stadig et problem i Chilensk oppdrett. De vanligste utvendige symptomene er sløv fisk med dårlig appetitt som svømmer i overflaten eller langs noten. Fisken kan være mørk i huden med bleke gjeller, blodige sår, faste hevelser i huden og sår i munnhulen. Den kan også være infisert uten å vise ytre tegn. I Norge er de vanligste indre symptomene kremgule knuter eller ringer i lever, svullen milt, gråhvite flekker i hjertesekken, og i serosa på milt og nyre og lyse faste partier i skjelettmuskulaturen. De mest affiserte organene er lever, milt og nyre. Sykdommen er knyttet til eksponering av sjøvann, ca. 10-12 uker etter utsett, men den kan forekomme i ferskvann (Bravo, 1994). Det ser ut til at yngre fisk blir kraftigere angrepet. Sykdommen smitter horisontalt, men man kan ikke utelukke vertikal smitte (Poppe, 2002).

### **1.5.2 *Vibrio anguillarum*, Klassisk vibriose**

Familie→ Vibrionaceae Art→ *Vibrio anguillarum*

Den bakterielle fiskesykdommen som har vært kjent lengst skyldes *Vibrio anguillarum*. Den ble første gang beskrevet i Italia i 1718 og har siden tidlig på 1900-tallet vært forsket på i Skandinavia (Poppe, 2002). I 2011 ble det isolert ett tilfelle av serotype O1 fra laks i Norge (Olsen *et al.*, 2011).

*V. anguillarum* forårsaker klassisk vibriose. Det er en ekstracellulær, gram negativ bakterie. Den er formet som bevegelige staver (rette eller bøyde). De er fakultativ anaerobe og kjemo-organotrof med både oksidativ og fermentativ metabolisme (Poppe, 2002). Bakterien har antigener bestående av LPS og overflateproteiner i membranen

## Introduksjon

(Chart & Trust, 1984). Det er rapportert 23 ulike serotyper av *V. anguillarum* (Sørensen & Larsen, 1986; Pedersen *et al.*, 1999). De to vanligste serotypene er: serotype O1 og O2, serovariant O2a som dominerer hos laks, mens O2b går på torsk (Poppe, 2002). Det blir brukt ulike metoder for å stille diagnose, blant annet ELISA, hurtig kit og kolonihybridisering. Tidligere studier har vist at *V. anguillarum* kan identifiseres og kvantifiseres ved qPCR-analyse (Prol *et al.*, 2009).

*V. anguillarum* gir akutt hemoragisk septikemi, men kan også forekomme subakutt eller kronisk med hudsår og lesjoner. Det er ofte massiv dødelighet uten karakteristiske symptomer. Fisken mister appetitt, blir inaktiv, mørkfarget og har ofte eksoftalmus. Det kan være erytemer ved finnebasis, munnregion og gatt. Petecchier og ecchymoser i huden oppstår ofte, samt bleke gjeller grunnet blødninger. De indre symptomene er petecchier i fettvev og andre indre organer. Svullen, mørk og henflytende milt, ødemer og sår i muskulatur, dilatert tarm fylt med klar væske samt blødninger. Sykdommen opptrer oftest ved høye vanntemperaturer i sjøvannsfasen, men kan opptre i ferskvann. Stressituasjoner som temperaturendringer, for tette bestander, overfôring, håndtering av fisk, dårlig vannkvalitet som lavt oksygeninnhold og høyt innhold av partikler, er ofte utløsende faktorer. Infeksjonsveiene er uklare, men sykdom har forekommet både ved immersjon, oral applikasjon og anal intubasjon. I dag vaksineres all norsk oppdrettslaks mot *V. anguillarum*, og vaksineringen og det forbyggende arbeidet fungerer godt (Poppe, 2002).

### **1.6 Overekspresjon av T<sub>H</sub> transkripsjonsfaktorer og TGF- $\beta$ *in vivo* som molekulære adjuvanser**

Det fins relativt lite litteratur på hvilke effekter overekspresjon av T-bet, GATA-3 og TGF- $\beta$  kodende plasmider har *in vivo* på dyr – sett i vaksinesammenheng. Det er antydning at overekspresjon av T-bet (som molekylær adjuvant i DNA-vaksine) hos mus induserer T<sub>H</sub>1 respons med økt uttrykk av IFN- $\gamma$  og IL-2. Ekspresjon av IL-4 og IL-10 ble for øvrig påvirket av injeksjon med T-bet kodende plasmid DNA (Hu *et al.*, 2012). Genterapi med bruk av TGF- $\beta$  kodende plasmid DNA mot avstøtning av transplantert vev (allograft) har vist seg lovende – dette viser at TGF- $\beta$  som molekylær adjuvans satt inn i plasmid virker

immundependende *in vivo* (Qin *et al.*, 1994). Det forefinnes ikke studier som belyser effekten av GATA-3 injisert som GATA-3 kodende plasmid på sykdomsbeskyttelse.

### 1.7 Hensikt og problemstilling

DNA-vaksiner har vist seg meget effektive mot enkelte virussykdommer som infeksiøs hematopoetisk nekrose (IHN) og viral hemoragisk septikemi (VHS). Beskyttelsen er mest sannsynlig mediert av antistoffer og cytotoksisk antiviral respons. Det er også vist at antistoffer er viktig i beskyttelse mot ekstracellulære bakterier som *Vibrio* sp., mens både cytotoksiske og cellemedierte mekanismer er sentrale i beskyttelse mot intracellulære bakterier som *P. salmonis*. Ved å kombinere DNA-vaksinekonsept med molekylære adjuvaner ønsker vi å undersøke immunologiske mekanismer for sykdomsbeskyttelse samtidig som vi ønsker å utvikle molekylære vaksiner. T-bet og GATA-3 er transkripsjonsfaktorer som fremmer differensiering av hhv. T<sub>H</sub>1- og T<sub>H</sub>2-celler fra naive T-celler. TGF- $\beta$  er et immundependende cytokin produsert av blant annet aktiverte T-celler og mononukleære fagocytter. Hypotesen er at overekspresjon av T-bet og GATA-3 hos laks kan gi en bedre beskyttelse mot hhv. intra- og ekstracellulære bakterier, mens TGF- $\beta$  resulterer i dårligere beskyttelse. Vi ønsker derfor å undersøke hvorvidt:

- Rekombinant DNA teknologi med innsatte gener for TGF- $\beta$ , T-bet og GATA-3 i ekspresjonsvektorer resulterer i økt uttrykk av TGF- $\beta$ , T-bet og GATA-3 både *in vitro* og *in vivo*.
- Uttrykk av relaterte gener (IFN- $\gamma$ , IL-4/13A og IL-17A) påvirkes etter injeksjon av ekspresjonsvektorene.
- Overekspresjon av TGF- $\beta$  vil gi en lavere overlevelse hos atlantisk laks etter eksperimentell smitte med hhv. intra- og ekstracellulær bakterie, *P. salmonis* og *V. anguillarum*.
- Overekspresjon av T-bet vil indusere sykdomsbeskyttelse hos atlantisk laks etter eksperimentell smitte med intracellulær bakterie, *P. salmonis*.
- Overekspresjon av GATA-3 vil indusere sykdomsbeskyttelse hos atlantisk laks etter eksperimentell smitte med ekstracellulær bakterie, *V. anguillarum*.

## 2 Material og metoder

### 2.1 Cellelinjer

Til *in vitro* forsøk ble det benyttet "Chinook Salmon Embryo Cells" (CHSE-214). Alt arbeid med cellene ble utført i "laminar air flow" kabinett (sterilkabinett).

#### 2.1.1 CHSE-214 celler

CHSE-214 celler ble dyrket i L-15 medium (Gibco) som inneholdt 8 % føtalt kalveserum (FCS), 1% ikke-essensielle aminosyrer (NEAA) og penicillin. Dette vil heretter bli benevnet som vekstmedium. Cellene ble dyrket i 645 ml Nuncflasker (Thermo scientific) med 25 ml vekstmedium.

### 2.2 Fisk

Fisken som ble benyttet i forsøkene var parr av atlantisk laks, *Salmo salar*. Den var uvaksinert og veide 30-50 gram. Laksestammen som ble brukt i pilotforsøket var standard laks fra Aqua Gen (Aqua Gen A/S, Kyrksæterøra) og generasjonen var klekket i 2010. Fisken i presmitte- og hovedforsøket var fra samme leverandør, men fra ulike batcher og var klekket i hhv. 2010 og 2011. Fisken ble holdt ved Havbruksstasjonen i Tromsø (Kårvika), og forsøkene ble utført ved fiskehelselaboratoriet. Studiet involverte tre forsøk med totalt 1235 fisk fordelt på: pilotforsøk, presmitteforsøk og smitteforsøk. Fisken ble holdt på ferskvann ved naturlig temperatur og "24/0" lys frem til forsøksstart og "24/0" lys i hele forsøksperioden, med unntak av presmitten som gikk på "12/12". Forsøkene ble utført i henhold til dyrevelferdsloven (LOV-2009-06-19-97) og forskrift om forsøk med dyr (FOR 1996-01-15 nr 23).

I pilotforsøket ble det benyttet 125 fisk med snittvekt på 50 gram. Fisken ble holdt på 10 °C og ble vedlikeholdsføret med Skretting spirit 4 mm (Skretting AS). Forsøket ble utført i perioden mai-juni 2011.

## Material og metoder

I presmitteforsøket ble det benyttet 60 fisk med snittvekt på 50 gram. Fisken var fordelt i to grupper (*V. anguillarum* og *P. salmonis*) og ble holdt på hhv. 12 °C og 14 °C og vedlikeholdsfôret med Skretting Olympic 2,0 mm (Skretting AS). Forsøket ble utført i desember 2011.

I smitteforsøket ble det benyttet 1050 fisk med en snittvekt på 30 gram. Fisken ble fôret etter tabell med Skretting Olympic 2,0 mm og holdt på 14°C. Forsøket ble utført i perioden februar-mars 2012.

### 2.3 Produksjon av plasmid

Alle PCR program i dette studiet ble utført med 2720 Thermal Cyclers (Applied Biosystems). Mixer, sykluser og temperaturer er oppgitt i appendiks. Sentrifugeringer ble utført med BIOFUGE *PICO* (Heraus), MULTIFUGE 1 S-R (Heraus) og Avanti®J-26XP Centrifuge (BECKMAN COULTER™).

#### 2.3.1 Design av plasmid og kloning av gener

Gener som kodet for TGF- $\beta$ , T-bet og GATA-3 ble klonet inn i p-TagRFP-N vektor. I tabell 2.1 er det gjengitt en oversikt over de ulike primerne som ble benyttet. Gensekvensene for de tre genene og plasmidet er oppgitt i appendiks 1.

## Material og metoder

**Tabell 2.1. Primere og primersekvenser benyttet for plasmidproduksjon.**

Gen-primer	Sekvens	Genbank
TFG- $\beta$ forward	TCAGATCTCGAGATGAGGGCAGAATGTTTTGACGCTGG	BT059581
TGF- $\beta$ reverse	CCGGGCCCGCGGCTAGCTACACTTGCAGGACTTAACA	
T-bet forward	TCAGATCTCGAGATGGGCGGCATAGGTGGCAATCTTT	GU979861
T-bet reverse	CCGGGCCCGCGGTCAGTGGGAATAAAAAGCCGTAGTAG	
GATA-3 forward	TCAGATCTCGAGATGGAAGTATCCGCCGACCAACCCC	EU418015
GATA-3 reverse	CCGGGCCCGCGGCTAGCCCATGGCAGAGACCATACTG	
pTag-RFP-N- forward	ACAACCTCCGCCCCATTGACGCAAAT	Cat. # FP142
pTAG-RFP-N reverse	CCGCCCTCGACCACCTTGATTCTCATG	

High Fidelity PCR ble gjennomført med påfølgende gelelektroforese ved bruk av Power Pac 300 (Bio Rad). Det ble benyttet 1% agarose gel ved 300 V i 12 min. 20  $\mu$ l PCR-produkt ble amplifisert på gelen sammen med 6  $\mu$ l loading dye (Qiagen). Som kontroll ble det benyttet 5  $\mu$ l DNA ladder 1 kb (Invitrogen). Visualisering av prøvene ble gjort ved bruk av GeneGenius Bio Imaging system og Genesnap fra SynGene. I UV-lys ble genene visualisert som klare bånd i gelen. Båndene ble kuttet ut av gelen og rensset ved hjelp av QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen), og prosedyren ble utført etter protokoll fra leverandør. Mengde DNA fra gelrensingen ble kvantifisert med nanodrop<sup>®</sup> (ND-1000 Spectrophotometer). PCRMix med genene/plasmidet og restriksjonsenzymene Sac II og Xho I (Biolab) ble laget og PCR-produktet ble separert ved gelelektroforese med påfølgende gelrensing. Genene ble klonet inn i plasmidet p-TagRFP-N ved inkubering i 30 min med ligeringsenzymet T4 DNA Ligase (BioLabs).

Plasmidene ble satt inn i kompetente *E.coli* ved hjelp av ONE SHOT<sup>®</sup> TOPO 10 Chemically Competent *E.coli* (Invitrogen). Det ble tilsatt 5  $\mu$ l ligeringsmix til 100  $\mu$ l kompetente celler. Cellene ble inkubert på is i 30 min, sjokkvarmet i vannbad ved 42 °C i 45 sekunder og inkubert 2 min på is. S.O.C. medium (250  $\mu$ l) ble tilsatt og satt til resting ved 37 °C i 60 min. Kulturen ble fortynnet i 900  $\mu$ l LB medium. 150  $\mu$ l steril glyserol og 850  $\mu$ l kultur ble blandet og lagret på -80°C. 100  $\mu$ l av kulturen ble platet ut på agar tilsatt 20  $\mu$ l kanamycin, 50  $\mu$ g/ $\mu$ l (Sigma) og inkubert ved 37 °C over natt.



## Material og metoder

Enkeltkolonier fra agarplatene ble plukket ut og satt til risting i 6 ml LB-medium tilsatt 6  $\mu$ l kanamycin, ved 37 °C over natt. Det ble utført PCR og elektroforese for å detektere at plasmidet med de klonede genene var tatt opp av *E.coli*. To ml fra de ønskede prøvene ble sentrifugert i ett minutt ved 13 000 rpm. Plasmidene ble rensset ved bruk av QiA prep spin (miniprep kit) fra Qiagen. Prosedyren ble utført etter protokoll fra leverandør. Plasmidkonsentrasjonene ble målt ved nanodrop. Plasmidene ble sendt til sekvensering for å detektere de innsatte gensekvensene. Sekvensene ble bekreftet ved hjelp av dataprogrammene BioEdit og BLAST.

### 2.3.2 Kopiering og rensing av plasmid

For å kopiere og rense plasmider til pilot- og smitteforsøket ble det benyttet hhv. Qiagen Plasmid MEGA- og Qiagen GIGA kit. I startmediet ble 6 ml LB medium blandet med 6  $\mu$ l kanamycin (50  $\mu$ g/ $\mu$ l) og en koloni fra agarskål. Kolonien ble valgt ut basert på resultat fra sekvensering. Rørene ble satt til risting (200 rpm) i 6-8 timer ved 37 °C. Komponentene i vekstmediet for Mega og Giga kittet var som vist i tabell 2.2. Vekstmediet ble satt til risting (200 rpm) i 16 timer ved 37 °C. Prosedyren ble i begge tilfeller utført i henhold til protokoll fra leverandør. Eluatet ble fortynnet i hhv. 2,5 og 5 ml "phosphate buffered saline" pH 7,4 (PBS) (Sigma).

**Tabell 2.2. Komponenter i vekstmedium**

Komponenter	MEGA	GIGA
Kanamycin	2 ml	2,5 ml
Startmedium	3 ml	5 ml
LB medium	1,5 l	2,5 l

## **2.4 Dyrkning og transfeksjon av cellekultur**

### **2.4.1 Opprettholdelse av cellekultur**

Vekstmediet ble fjernet og cellene (CHSE-214) vasket to ganger med 10 ml PBS. 1,5 ml 5x trypsin (Sigma) ble tilsatt for å få cellene til å løsne fra flaskebunnen. Cellene ble resuspendert i 10 ml vekstmedium uten penicillin og tatt ut av flaskene. For å opprettholde cellekulturen ble 25 ml vekstmedium tilsatt og 2 ml av cellekulturen ble overført til flaskene og satt til vekst ved 20 °C i 48 timer.

### **2.4.2 Transfeksjon av cellekultur**

Cellene ble hentet ut av nuncflasken, for deretter å bli sentrifugert og vasket med PBS. Antall celler ble beregnet ved hjelp av NucleoCounter YC-100 (Chemometec). Etter telling ble cellene sådd ut i 24 brønners brett (Nunclon™ Surface, Nunc™)  $9,81 \times 10^4$  celler/brønn. Det ble tilsatt vekstmedium uten penicillin til hver brønn. Plasmidmengde ble beregnet ut i fra nanodropverdi: 6-8 µl pr brønn. Transfeksjon av plasmider til cellene ble utført med Invitrogens Neon™ Transfection System. Prosedyren ble utført etter leverandørens protokoll (Invitrogen).

### **2.4.3 Fiksering av celler og DAPI farging**

Mediet i brønnene ble pipettert ut og cellene vasket med PBS. For at cellene skulle bli fiksert, ble det tilsatt 200 µl formaldehyd (16 %) (Thermo SCIENTIFIC) og inkubert i 30 min. Cellene ble vasket to ganger med PBS. I henhold til produsentens protokoll ble det tilsatt 50 µl DAPI (2 µg/ml) (Sigma) i hver brønn, og etter 3 min inkubering ble de igjen vasket to ganger med PBS. Litt PBS ble tilsatt hver brønn for at cellene ikke skulle tørke ut. Cellene ble visualisert og fotografert i mikroskop, Axiovert 40 CFL (Zeiss) ved bruk av DAPI-365 og Texas Red 530-585 filtre.

## 2.5 Dyrkning av *Vibrio anguillarum*

*Vibrio anguillarum* ble dyrket etter dyrkningsforslag fra Helene Mikkelsen ved Nofima. Organismene som ble benyttet, var *V. anguillarum* O2a isolert fra torsk og passert i laks i 2004: LFI 323. Bakteriene ble dyrket i Marine Broth 2216 (Difco). 37,4 gram ble suspendert i 1 liter destillert vann, blandet, kokt i 1 min og autoklavert. En bakteriekoloni fra agarplater ble overført til en liten kolbe med 10 ml vekstmedium (Marine Broth) og dyrket i 24 timer ved risting på 15 °C. Optisk tetthet (OD600) ble målt og bakteriesuspensjonen ble fortynnet i PBS før injeksjon.

## 2.6 Presmitteforsøk

For å finne riktig dosering for hovedforsøket ble det ble foretatt presmitteforsøk med *V. anguillarum* og *P. salmonis*. 60 fisk ble benyttet fordelt på de to agensene og tre ulike doser ble injisert (10 fisk/dose).

Fisken ble bedøvd med Benzoak (2 ml/10 l) (ACD Pharmaceuticals AS) og injisert med engangssprøyter (1 ml) og vaksinasjonskanyler (0,5 x 6 mm). Gruppene ble holdt i adskilte kar. Dødfisk og svimere ble daglig registrert og plukket ut.

### 2.6.1 Presmitteforsøk: Smitte med *Vibrio anguillarum*

Bakteriesuspensjonen, fra dyrkingen av *V. anguillarum*, ble målt, spektrofotometrisk, til  $2 \times 10^9$  bakterier per ml. Suspensjonen ble fortynnet med PBS til tre ulike konsentrasjoner før injeksjon, hhv. 100 000, 1 000 000 og 10 000 000 bakterier per ml. Fisken ble injisert intraperitonalt (i.p) med 100 µl bakteriesuspensjon. Dette skulle tilsvare 10 000, 100 000 og 1 000 000 bakterier/ fisk. Det ble parallelt gjort utstryk på Marine broth agarplater for å finne antall kimdannende enheter (kde) (colony forming units). Platene ble inkubert ved 12 °C. Etter telling av kde i utstrykene ble antall bakterier i injiserte doser bestemt til å være hhv. 7 300, 73 000 og 730 000 kde/fisk. Forsøket ble utført i ferskvann med vanntemperatur på 12 °C.

### 2.6.2 Presmitte: Smitte med *Piscirickettsia salmonis*

Titret TCID (Tissue Culture Infectious Dose) 50/ml for *P. salmonis*, levert av Pharmaq, var bestemt til  $4,2 \times 10^7$  bakterier. Bakteriene ble fortynnet i PBS hhv. 1:10, 1:100 og 1:1000. Fisken ble injisert i.p. med 100  $\mu$ l av de nevnte fortynningene. Fortynningene 1:1000, 1:10 000, og 1:100 000 ble strøket ut på CHAB-agarplater. Platene ble inkuberte ved 22 °C. Selve smitteforsøket ble utført i ferskvann ved 15 °C.

## 2.7 Transient genekspresjonsstudie og prøveuttak

### 2.7.1 Pilotforsøk – transient genekspresjon

120 fisk ble delt inn i fire grupper med 30 fisk i hver gruppe. Fisken ble bedøvd med Benzoak (2 ml/10 l). Hver fisk i de ulike behandlingsgruppene ble injisert intramuskulært (i.m) med engangssprøyter (1 ml) og med kanylestørrelse 0,50 x 16 mm (25 G x 5/8”) (Tab. 2.3). To av gruppene ble merket ved klipping av fettfinne (Tabell 2.3). Fisken ble så fordelt i to kar. Kontrollgruppens fisk ble injisert med 100  $\mu$ l PBS, mens fisk i de andre gruppene ble injisert med 70  $\mu$ g pDNA løst i 50  $\mu$ l PBS tilsvarende 1,4 mg pDNA kg<sup>-1</sup> kroppsvekt (Tonheim, 2007) av hhv. TGF- $\beta$ , T-bet og Gata-3, alle løst og fortynnet i PBS.

**Tabell 2.3. Grupper og behandling**

Gruppe:	Vaksine:	Merket	Kar
1	100 $\mu$ l PBS	Ingen	1
2	50 $\mu$ l TGF- $\beta$ -TagRFP-N	Avklipt fettfinne	1
3	50 $\mu$ l Gata-3-TagRFP-N	Ingen	2
4	50 $\mu$ l T-bet-TagRFP-N	Avklipt fettfinne	2

Det ble gjort organuttak av fem fisk før injeksjon. Disse utgjorde null-gruppen, - det vil si ikke-injiserte kontroller. Vevs- og organprøver fra seks fisk ble tatt ut ved dag 3, 7, 14, 21 og 28 etter injeksjon. Fisken ble bedøvd med dødelig dose Benzoak (4 ml/10 l) og

## Material og metoder

drept ved slag mot hodet. Den ble så blodtappet med vacutainerrør for å minimere kontaminering med blod i organprøvene. Ved hvert uttak ble det tatt ut organprøver til PCR (muskel, hodenyre og milt) og histologi av muskel med stikksted. PCR-prøver ble lagt på rør med 1 ml RNAlater (Ambion). Prøvene ble holdt på 4 °C i 24 timer og deretter lagret på -20 °C frem til videre bearbeiding. Muskelprøvene for histologi ble lagt på 10 % formalin i 24 timer før de ble lagret i 70 % etanol.

### 2.7.2 Smitteforsøk - hovedforsøk

1050 fisk ble delt inn i fem ulike grupper (behandlingsgrupper) og injisert med hhv. TGF- $\beta$ , T-bet, Gata-3, plasmid (p-TagRFP-N) og PBS (Tabell 2.4). Engangssprøyter (1 ml) med kanylestørrelse 0,50 x 16 mm (25 G 5/8 ") ble benyttet til plasmidinjeksjon. Da det er vist at lave doser pDNA kan gi samme respons som høyere doser ble det bestemt å bruke 20  $\mu$ g plasmid per fisk, istedenfor 70  $\mu$ g som det ble benyttet i pilotforsøket (Heppell *et al.*, 1998). Det viste seg i midlertid at fisken hadde en snittvekt på 30 g istedenfor 50 g, dermed ble plasmidmengden som ble injisert noe høyere enn 20  $\mu$ g pr fisk. Forsøket ble utført ved 14 °C.

**Tabell 2.4. Oversikt over grupper og behandling i smitteforsøket.**

<b>Gruppe</b>	<b>Behandling</b>
1	50 $\mu$ l TGF- $\beta$ -TagRFP-N
2	50 $\mu$ l T-bet-TagRFP-N
3	50 $\mu$ l Gata-3-TagRFP-N
4	50 $\mu$ l Plasmid (p-TagRFP-N)
5	50 $\mu$ l PBS

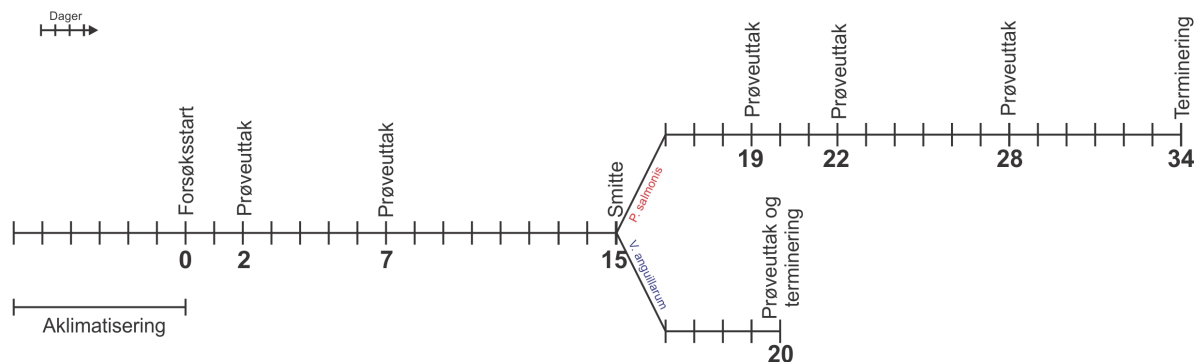
Fisk fra disse fem behandlingsgruppene ble deretter fordelt i seks "urørtkar" og to "uttakskar". I hvert av "urørtkarene" var det totalt 100 fisk, 20 fisk fra hver gruppe. I hvert av "uttakskarene" var det totalt 225 fisk, 45 fisk fra hver gruppe. Det ble tatt ut

## Material og metoder

vevs- og organprøver fra seks fisk fra hver behandlingsgruppe ved hvert tidspunkt. Planlagte uttaksdager var dag to og sju etter DNA injeksjon samt dag 4, 7, 14 og 28 etter smitte. Det ble også gjort prøveuttak av seks fisk før DNA injeksjon. Disse utgjorde nullgruppen, det vil si ikke-injiserte kontrollfisker. Ved hvert prøveuttak ble det tatt ut prøver for PCR og histologi som i pilotforsøket.

Smitten ble utført ved dag 15 etter immunisering. I forsøket med *V. anguillarum* ble fisken smittet i.p. med en dose på  $10^2$  bakterier/fisk – på grunnlag av resultatene som framkom etter presmitteforsøket. Bakteriene var suspendert i 100  $\mu$ l PBS. Dosen ble strøket ut på Marin Broth agarplate og telling av kde viste at den faktiske injiserte dosen var ni kde per fisk. *P. salmonis* ble fortynnet 1:25 i PBS etter anbefaling fra Pharmaq. 100  $\mu$ l ble injisert i.p. i fisken. Det ble i forsøket med *V. anguillarum* foretatt prøveuttak fem dager etter smitte, mens det i forsøket med *P. salmonis* ble foretatt prøveuttak ved dag 4, 7 og 13 etter smitte (Fig. 2.1). Dødfisk og svimere ble daglig registrert og plukket ut.

Relativ overlevelse i prosent ble regnet ut etter følgende formel:  $(1 - (\text{antall døde} / \text{totalt antall})) \times 100$  (Modifisert etter Costa *et al.*, 2011).



**Figur 2.1. Tidslinje med oversikt over hovedforsøket forløp.**

## 2.8 RNA isolering

RNA fra muskel, hodenyre og milt ble isolert ved hjelp av RNase Mini Kit fra Qiagen. Vevsprøver (ca 30 mg) ble tilsatt rør med keramiske kuler (precellys), 600  $\mu$ l RLT lysis

buffer og 6  $\mu\text{l}$   $\beta$ -Mercaptoethanol. Homogenisering og lysing av vevsprøvene ble gjort ved hjelp av Precellys 24 lysis & homogenization instrument (Bertin technologies) tre ganger ved 5500-1x08-020. Isoleringen ble videre utført etter protokoll fra leverandør.

RNAet ble eluert fra spinnkolonnen ved hjelp av 50  $\mu\text{l}$  RNase fritt vann. Kvantitet og kvalitet ble målt i nanodrop ved 260 nm. 1,5  $\mu\text{l}$  total RNA (prøve) ble målt ved nanodrop. Når  $A_{260/280}$  verdiene lå mellom 1,8-2,1 ble RNA prøvene betraktet som rene – og gode nok for qPCR. Kvalitet ble også målt ved gel elektroforese. Her ble 1-5  $\mu\text{l}$  RNA amplifisert på 1 % agarose gel sammen med 1  $\mu\text{l}$  loading dye (Qiagen). Som kontroll ble det benyttet 5  $\mu\text{l}$  DNA ladder 1 kb. Gelen ble kjørt med 220 V i 15 min. Ved gode prøver ble det observert to tydelige bånd fra hver brønn. RNA prøvene ble lagret ved  $-80^{\circ}\text{C}$ .

### 2.9 cDNA syntese

cDNA syntesen ble utført i henhold til protokoll fra leverandør (Qiagen) - med bruk av QuantiTect® Reverse Transcription kit. På grunn av varierende konsentrasjoner av totalt RNA fra noen prøver (83-2500 ng/ $\mu\text{l}$ ), ble det brukt varierende mengder RNA og RNase fritt vann, dette for at det skulle bli 1  $\mu\text{g}$  RNA til cDNA syntesen. cDNA prøvene ble lagret ved  $-20^{\circ}\text{C}$ .

### 2.10 Q-Real Time PCR

Kvantitativ-Real-time PCR (QPCR) ble utført på fortynnet cDNA (1:10). Det ble tilsatt 25 ng cDNA i hver brønn. Det ble analysert tripletter av hver prøve i 96-brønners brett [MicroAmp™ Fast Optical 96-Well Reactions Plate with Barcode (brønn: 0,1 ml)]. Disse ble forseglet med Microamp™ Optical Adhesive Film (Applied Biosystems).

Til analysene ble det benyttet SYBR® Green Fast (Applied Biosystems). SYBR Green er et fargestoff som binder seg til dobbeltrådet DNA. Når bindingen har funnet sted vil produktet fluorescere og Ct-verdier vil bli beregnet. Alt arbeid ble utført med sterilt utstyr.

## Material og metoder

I pilotforsøket ble ekspresjon av TGF- $\beta$ , T-bet og GATA-3 analysert. I smitteforsøket ble det i tillegg analysert for ekspresjon av IL-17A, IL-4/13A, IFN- $\gamma$  mRNA, og innhold av 16S rRNA fra *V. anguillarum* og *P. salmonis*. Elongeringsfaktoren EF1a ble brukt som referansegen (Tab. 2.5). Det ble satt opp reaksjoner bestående av Fast SYBR® Green master mix, forward og reverse primere, RNase fritt vann og cDNA. Dette gav totalt et volum på 20  $\mu$ l i hver brønn. Før analysering i 7500 Fast RealTime PCR Systems fra Applied Biosystems, ble prøvene spunnet ned ved sentrifugering i Mini Plate Spinner MPS 1000 (Labnet). Det ble kjørt negative kontroller med RNase fritt vann som templat for hvert gen.

I smitteforsøket med *V. anguillarum* var hovedfokuset å konsentrere seg om en mulig påvisning av T<sub>H</sub>2-liknende respons da det er vist at T<sub>H</sub>2 celler er viktige ved bekjempelse av ekstracellulære infeksjoner. Derfor ble ikke IFN- $\gamma$  uttrykket målt. I smitteforsøket med *P. salmonis* var hovedfokuset å konsentrere seg om en mulig påvisning av T<sub>H</sub>1-liknende respons da det er vist at T<sub>H</sub>1 celler er viktige ved bekjempelse av intracellulære infeksjoner. Derfor ble ikke IL-4/13A uttrykket målt.



## Material og metoder

**Tabell 2.5. Annotering og sekvensinformasjon for primerne benyttet i QPCR.**

Gen	Primer	Sekvens	[ mM ]	Genbank
TGF- $\beta$	AsTGF- $\beta$ forward	AGTTGCCTTGTGATTGTGGGA	10	BT059581
	AsTGF- $\beta$ reverse	CTCTTCAGTAGTGGTTTGTTCG		
T-bet	AsT-bet forward	CAGCAAAGTGTACCTCCAA	10	GU979861
	AsT-bet reverse	GGGCTTGTAGAAGCTGTTGC		
Gata-3	AsGata-3 forward	CCCAAGCGACGACTGTCT	10	EU418015
	AsGata-3 reverse	TCGTTTGACAGTTTGCACATGATG		
IL-17a	AsIL17A forward	TGGTTGTGTGCTGTGTGTCTATGC	6	GW574233
	AsIL17A reverse	TTTCCTCTGATTCTCTGTGGG		
IL-4	AsIL4/13A forward	CCGACATCTGAGGGTTTACAAC	10	AB574339
	AsIL4/13A reverse	TGCCCTCCGCCTGGTTGTC		
IFN- $\gamma$	AsIFN $\gamma$ forward	CGTGTATCGGAGTATCTTCAACCA	10	AY795563
	AsIFN $\gamma$ reverse	CTCCTGAACCTTCCCCTTGAC		
<i>V. anguillarum</i>	Vang16SRNA forward	CATGGCTCAGATTGAACGCTG	10	X71830
	Vang16SRNA reverse	CCACATCAGGGCAATTTCTTAG		
<i>P. salmonis</i>	Pisci16SRNA forward	AGGGAGACTGCCGGTGATA	6	PSU36941
	Pisci16SRNA reverse	ACTACGAGGCGCTTTCTCA		
EF1a	AsEF1 $\beta$ forward	CACCACCGGCCATCTGATCTACAA	10	AF321836
	AsEF1 $\beta$ reverse	CACCACCGGCCATCTGATCTACAA		

For å bestemme primereffektivitetene til de ni primerene (Tab. 2.5) ble det laget standardkurver basert på to-folds fortykning. Effektiviteten ble beregnet ut fra ligningen:  $E = 10^{(-1/\text{slope})}$  (Pfaffl, 2001). Slope og effektivitet er vist i tabell 2.6.

## Material og metoder

**Tabell 2.6. Slope, R<sup>2</sup> og primer effektivitet, kalkulert fra standardkurvene.**

Målgen	Slope	R <sup>2</sup>	E
TGF-β	-3,54	0,98	1,92
T-bet	-3,11	0,99	2,10
Gata-3	-3,25	0,99	2,03
IL-17a	-3,32	0,99	2,00
IL-4/13A	-3,18	0,99	2,06
IFN-γ	-3,27	0,99	2,02
<i>V. anguillarum</i>	-3,31	0,99	2,00
<i>P. salmonis</i>	-3,31	0,99	2,00
EF1a	-2,55	0,99	2,46

Analysene ble utført på 7500 Fast Real-Time PCR system maskin (Applied Biosystems). Syklusene som ble benyttet er presentert i tabell 2.7. Videre beregninger med Ct-verdier ble utført etter  $\Delta\Delta C_t$  metoden (Livak & Schmittgen, 2001).

**Tabell 2.7. QPCR: steg, prosess, temperatur, tid og antall sykluser.**

Steg	Prosess	Temperatur (°C)	Tid	Antall sykluser
1	Enzym aktivering	95	0:20	1
2	Denaturering	95	0:03	40
	Forlengelse	60	0:30	
3	Dissosiasjon	95	0:15	1
		60	1:00	
		95	0:15	

### 2.11 Histologi

Muskelprøver lagret på 70 % etanol (EtOH) ble lagt i histologikassetter. Prøvene ble dehydrert og satt inn med parafin ved hjelp av Shandon Citadel 1000. Instrumentet består av 12 ulike kar med: 96% EtOH, 100% EtOH, blandingskar med 100% EtOH og Xylene/HistoClear (1:1), rene Xylene/Histoclear kar, blandingskar av parafin og Xylene/Histoclear (1:1) og rent parafinkar. Prøvene ble dehydrert etter prosedyre presentert i tabell 2.8. Prosessen gikk over natt og kassetene ble hentet ut dagen etter. Vevsbitene ble støpt i parafin ved hjelp av Leica EG 115 OH og kjølt ned på Axel Johnson CP-4 kjøleplate.

Prøvene ble snittet (4  $\mu\text{m}$ ) ved hjelp av mikrotom (Leica RM2235). Snittene ble overført til 40 °C vannbad (Leica HI 1210). I vannbadet rettet snittene seg ut og ble overført til objektglass. De ble tørket i 60 min i varmeskap ved 60 °C eller over natt i romtemperatur. For å fjerne parafin fra snittene ble de vasket i tre Xylene/HistoClear (Merck/National diagnostics) bad (3x 5 min). Dekkglass ble montert på objektene med en dråpe Eukitt (Sigma). Snittene ble analysert og fotografert i Leica DM 6000 B og CTR 6000 ved 100x og 400x forstørrelse. Billedprogrammet som ble brukt var Leica Application Suite.

**Tabell 2.8. Informasjon om dehydreringsprosessen av muskelprøvene ved histologi.**

Kar	Løsning	Tid (timer)
1	Tomt	
2	Tomt	
3	96 % EtOH	2
4	96 % EtOH	2
5	100 % EtOH	2
6	100 % EtOH	2
7	100 % EtOH: Xylene/HistoClear (1:1)	1
8	Xylene/HistoClear	1
9	Xylene/HistoClear	1
10	Xylene/HistoClear	1
11	Xylene/HistoClear:Parafin (1:1)	1
12	Parafin	3 (minimum)

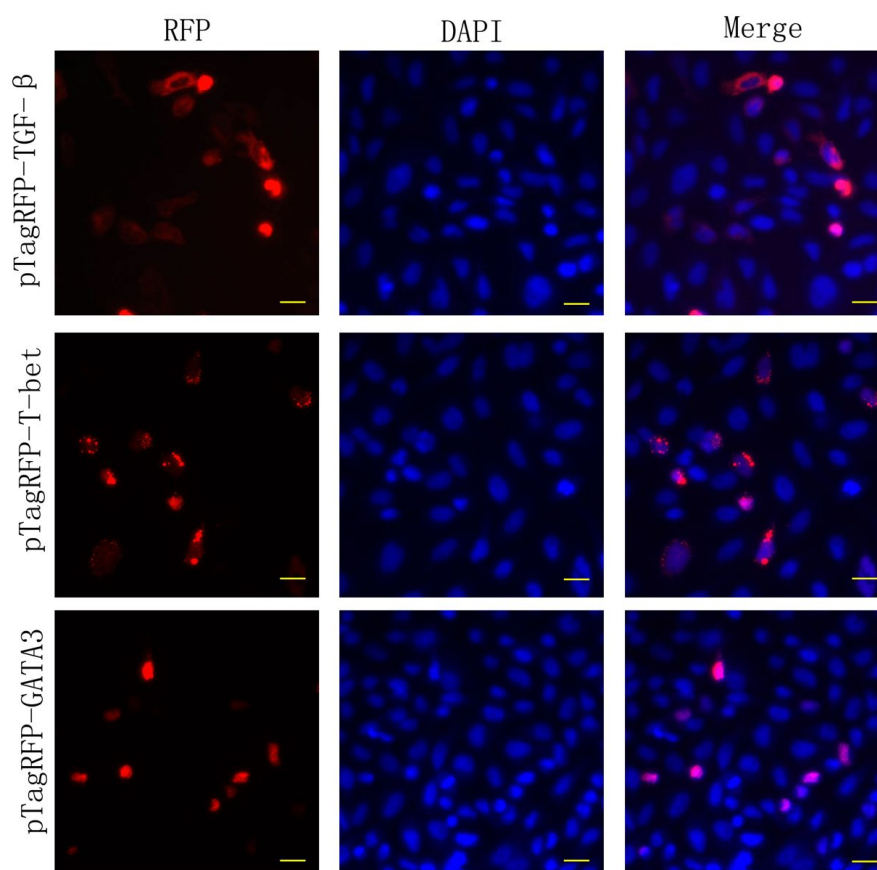
## 2.12 Statistikk

Statistiske analyser ble utført på log transformerte data. Dataene ble analysert ved hjelp av "one-way analysis of variance" (ANOVA) SYSTAT 13 software med Turkey som "post hoc test". Forskjeller ble ansett som statistisk signifikant når  $P < 0,05$ . Grupper med signifikante forskjeller ble merket med \* og \*\* i figurene og som henviser til hhv.  $P < 0,05$  og  $p < 0,001$  – dvs. 95 og 99 prosents sikkerhetsnivå.

### 3. Resultater

#### 3.1 Transfeksjon av CHSE-celler (*in vitro*)

Fluorescensmikroskopisk analyse av CHSE-214 celler transfektert med plasmid DNA, pTagRFP, kodende for hhv. TGF- $\beta$  (TGF- $\beta$ -pTagRFP), T-bet (T-bet-pTagRFP) og GATA-3 (GATA-3- pTagRFP) ble utført for å undersøke hvorvidt RFP ble uttrykt – som mål på om konstruktet (RFP og det kodende gen) ble uttrykt. DAPI ble benyttet som kjernefarging (blå). Etter transfeksjon uttrykte celler rød fluorescens ofte samlokalisert med kjernefarging (T-bet og GATA-3). Celler som uttrykte RFP (TGF- $\beta$ ) etter transfeksjon med TGF- $\beta$ -pTagRFP plasmid inneholdt RFP i cytoplasma (Fig. 3.1). Det ble ikke utført kvantitativ måling på andel celler som uttrykte transgenet.



**Figur 3.1.** Fluorescensmikroskopisk analyse av CHSE-214 celler 48 timer etter transfeksjon. Bildene i venstre kolonne: Uttrykk av RFP (rød farge) i celler transfektert med plasmid som også kodet for TGF- $\beta$ , T-bet og GATA-3. Bildene i midten: Kjernefarging av cellekultur med DAPI. Bildene i høyre kolonne: S sammensatte bilder med kjernefargede celler og celler som uttrykte transgenene.

## **3.2 Pilotforsøk: Transient genekspresjon**

### **3.2.1 QPCR-analyse - generelt**

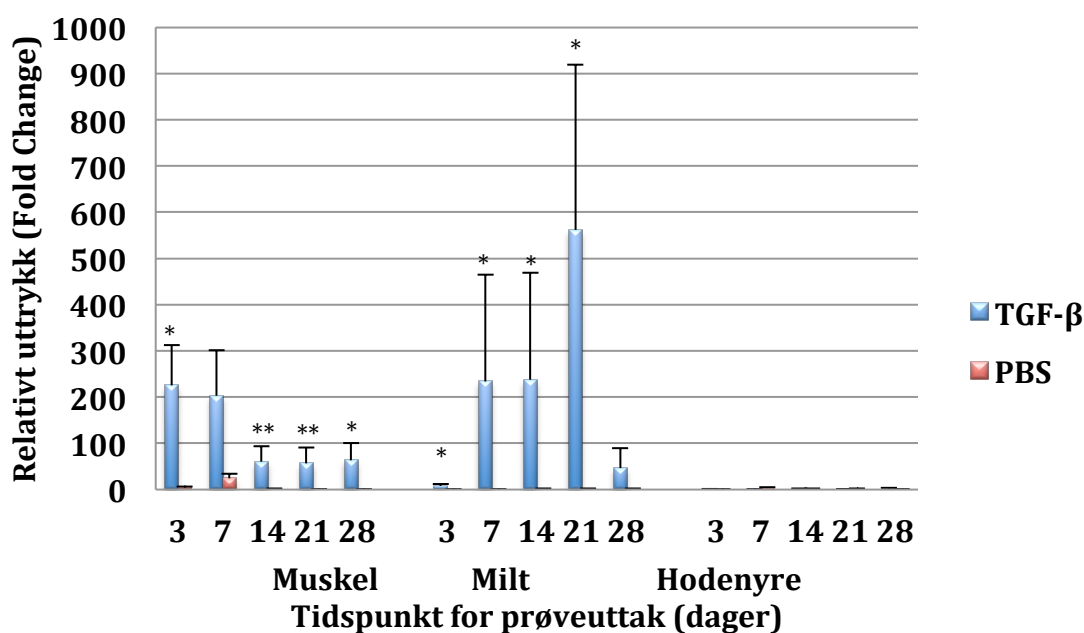
Pilotforsøket ble utført for å finne ut hvorvidt det var mulig å få uttrykk av ulike faktorer (TGF- $\beta$ , T-bet og GATA-3) *in vivo* hos laks etter injeksjon av kodende plasmid. Resultatet i studiet viser nivået av det relative uttrykket som gjennomsnittlige verdier. Enkeltindivider som gav store eller betydelige utslag ble ikke tatt ut av resultatsettet. Det ble foretatt qPCR-analyser av muskel, milt og hodenyre ved dag 0, 3, 7, 14, 21 og 28 etter plasmidinjeksjon. Gjennomsnittlige Ct-verdier i pilot- og hovedforsøk er lagt ved i appendiks 3.

### **3.2.2 Histologisk analyse - generelt**

Muskelprøvene som ble prosessert til histologisk undersøkelse (dag 0, 3, 7, 14, 21 og 28 etter plasmidinjeksjon) ble undersøkt fluorescensmikroskopisk. RFP ble detektert, som lyserøde strukturer, i muskelsnitt hentet fra samtlige grupper av fisk injisert med RFP kodende plasmid. Generelt ble det gjort funn (innhold av RFP) i injeksjonsstedet ved dag 21, men RFP ble også observert i enkelte prøver allerede ved dag sju. I snitt fra fisk i kontrollgruppen injisert med PBS var det ingen tegn til RFP. Det var vanskelig å se injeksjonsstedet ved dag 14, og ved dag 21 var det ikke lenger mulig å detektere injeksjonsstedet makroskopisk. Ved mikroskopisk analyse ble det observert etablering av bindevev ved dag 14. Dette ble observert både i fisk injisert med plasmid og i kontrollfisk.

### 3.2.3 Tilstedeværelse og relativt uttrykk av TGF- $\beta$

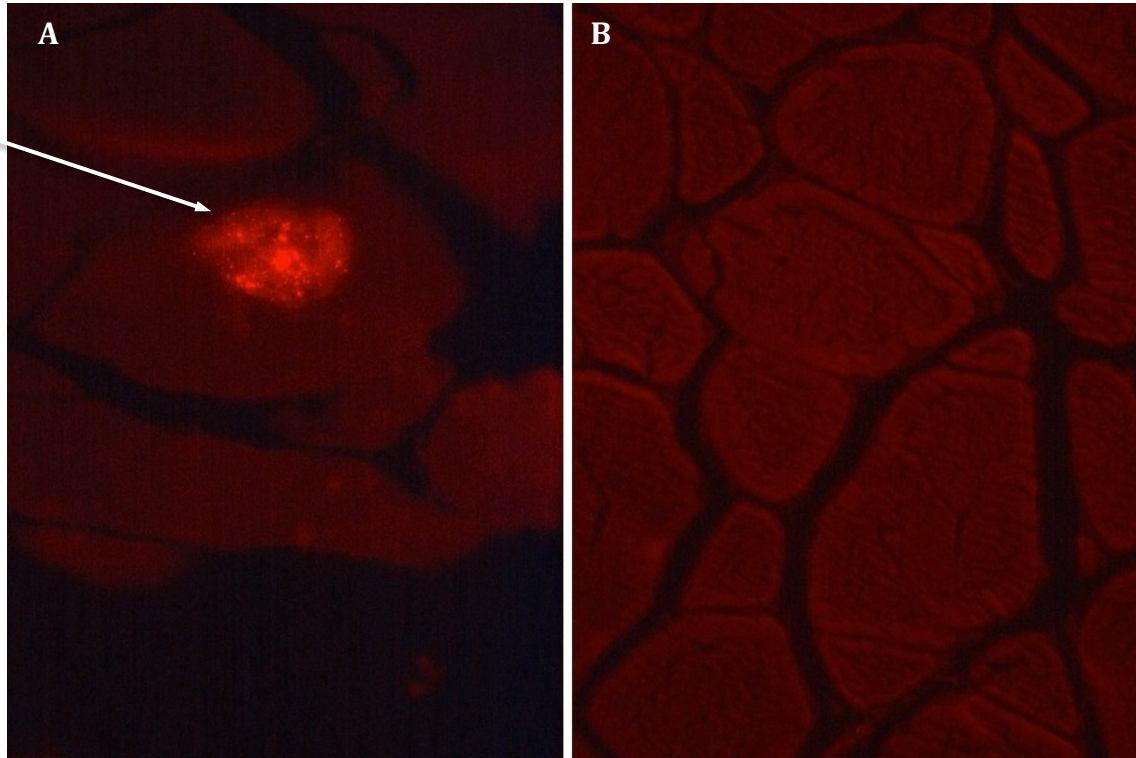
Ekspresjon av TGF- $\beta$  mRNA i injeksjonsstedet var signifikant høyere hos fisk injisert med plasmid kodende for TGF- $\beta$  (TGF- $\beta$ -pTagRFP) enn kontrollfisk injisert med PBS med unntak av dag sju (Fig 3.2). Det høyeste uttrykket ble målt ved dag tre og sank gradvis gjennom prøvetakingsperioden. I milt hos TGF- $\beta$ -pTagRFP behandlet fisk økte nivåene av TGF- $\beta$  fra dag tre til og med dag 21. Ved dag 28 sank nivået. Økningen var signifikant ved alle uttakene med unntak av dag 28 i forhold til kontrollfisk injisert med PBS. I hodenyre ble det ikke observert økning av TGF- $\beta$  i verken behandlet- eller hos kontrollfisk (Fig. 3.2).



Figur 3.2. Relativt uttrykk av TGF- $\beta$  i prøver fra muskel, milt og hodenyre hos fisk injisert med TGF- $\beta$  og kontrollfisk injisert med PBS ved dag 3, 7, 14, 21 og 28. N=5-6. Kolonnene viser gjennomsnitt  $\pm$  SE. Statistiske forskjeller mellom kontroll og behandlet gruppe er merket med \* over kolonnene (\* P < 0,05 og \*\* P < 0,001).

## Resultater

I muskelsnitt fra fisk injisert med TGF- $\beta$ -pTagRFP ble RFP (lys rød) observert i cytoplasma hos muskelceller (Fig. 3.3).

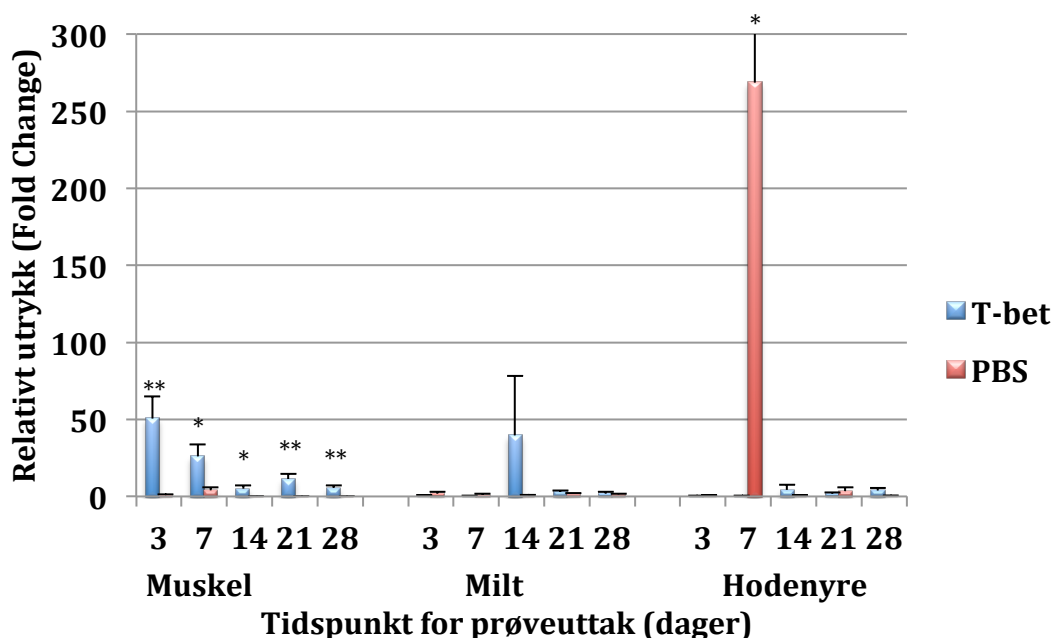


**Figur 3.3.** Histologiske snitt av muskelprøver fra fisk injisert med hhv. TGF- $\beta$  (A) og PBS (B) (kontroll). A) Cellene viste uttrykk av RFP (lys rødfarge, vist ved pil) i cytoplasma hos muskelceller og tydet på tilstedeværelse av TGF- $\beta$ . B) Muskelcellene i kontrollfisk. Bildene er tatt i 400x forstørrelse.



### 3.2.4 Tilstedeværelse og relativt uttrykk av T-bet

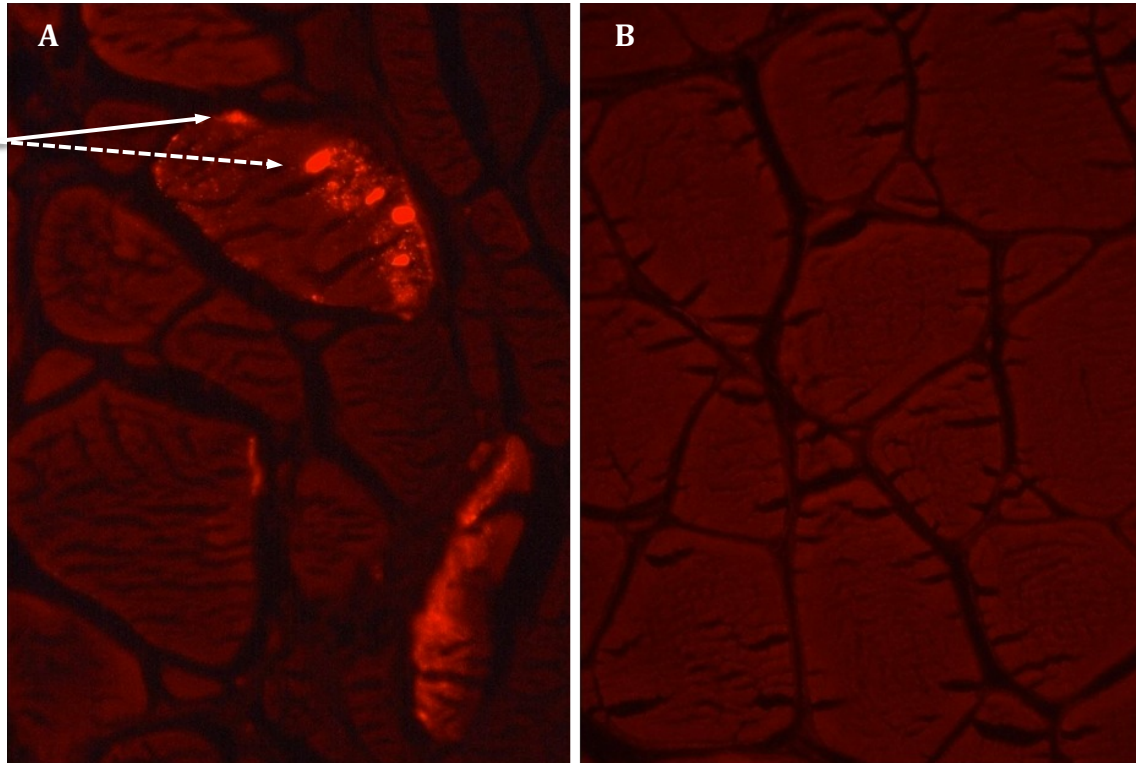
Ekspresjon av T-bet mRNA i muskel var signifikant høyere hos fisk injisert med T-bet (T-bet-pTagRFP) enn hos kontrollfisk injisert med PBS for alle tidspunktene (Fig. 3.4). Uttrykket var høyest ved dag tre og sank gradvis frem til dag 28, med unntak av et fall i nivået ved dag 14. I milt og hodenyre ble det ikke målt økte verdier hos verken behandlet- eller kontrollfisk, med unntak av behandlet fisk ved dag 14 i milt og hos kontrollfisk (PBS) ved dag sju i hodenyre (Fig. 3.4).



Figur 3.4. Relativt uttrykk av T-bet i prøver fra muskel, milt og hodenyre hos fisk injisert med T-bet og kontrollfisk ved dag 3, 7, 14, 21 og 28. N=5-6. Kolonnene viser gjennomsnitt ± SE. Statistiske forskjeller mellom kontroll og behandlet gruppe er indikert med \* over kolonnene (\* P < 0,05 og \*\* P < 0,001).

## Resultater

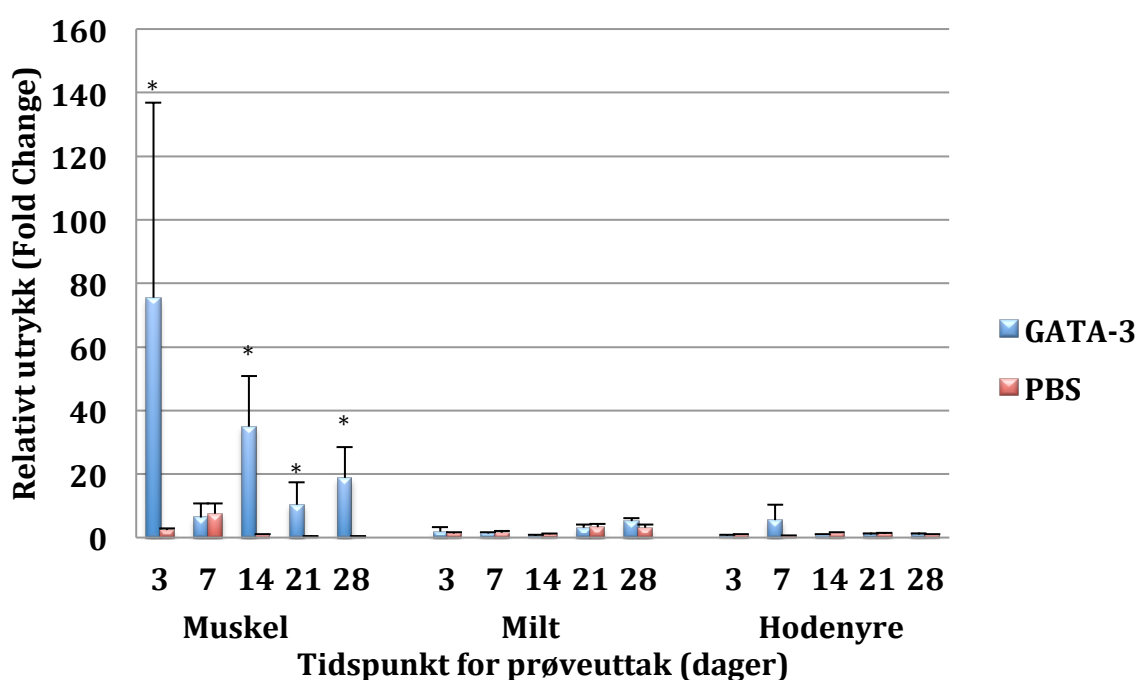
I muskelsnitt fra fisk injisert med T-bet-pTagRFP ble RFP observert både i cytoplasma (brutt pil) og i cellekjernen (pil) (Fig. 3.5).



**Figur 3.5.** Histologisk snitt av muskel fra fisk injisert med hhv. T-bet (A) og PBS (B) (kontroll). A) Cellene viste uttrykk av RFP (lys rød, vist ved piler) i cellekjerne (hel pil) og cytoplasma (brutt pil) og tydet på tilstedeværelse av T-bet. B) Muskelceller fra kontrollfisk. Bildene er tatt i 400x forstørrelse.

### 3.2.5 Tilstedeværelse og relativt uttrykk av GATA-3

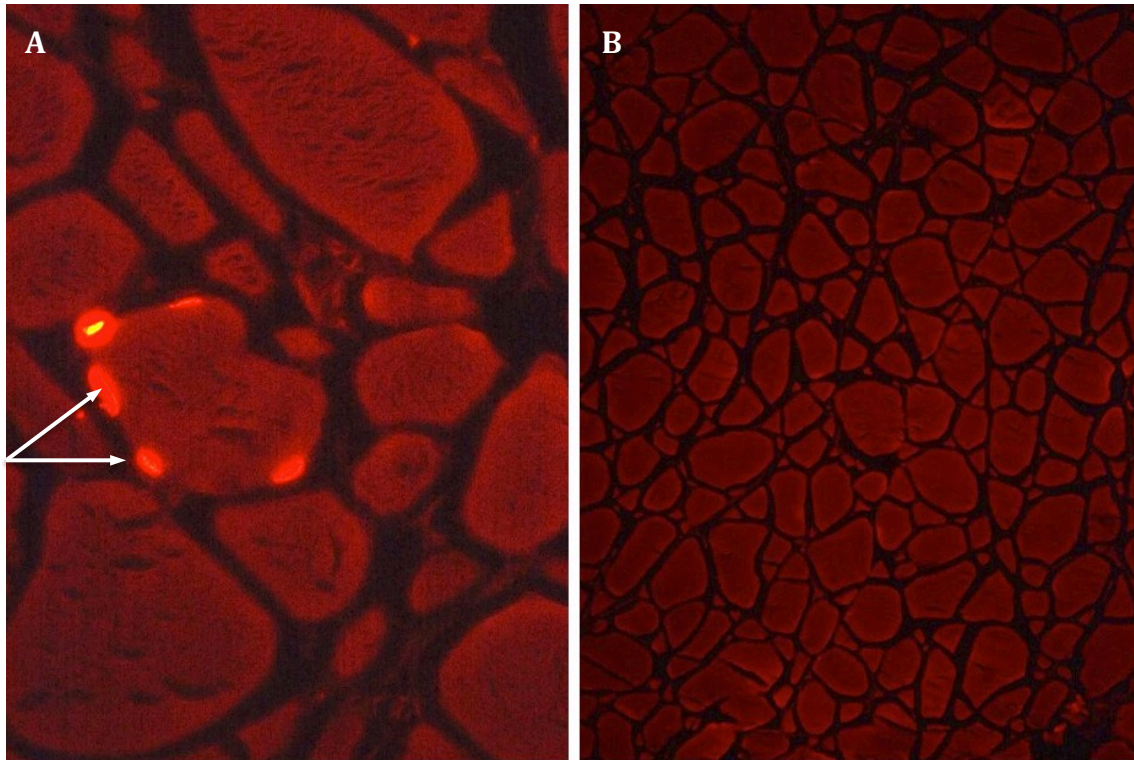
Uttrykket av GATA-3 mRNA i muskel var signifikant høyere i behandlet fisk (GATA-3-pTagRFP) enn nivået hos kontrollfisk, med unntak av dag sju (Fig. 3.6). Uttrykket var høyest ved dag tre og sank gradvis frem til dag 28, med unntak av fall i nivåene ved dag sju og 21. I milt og hodenyre ble det ikke målt forhøyede verdier i verken behandlet eller i kontrollfisk gjennom prøvetakningsperioden (Fig. 3.6).



Figur 3.6. Relativt uttrykk av GATA-3 i muskelprøver hos fisk injisert med GATA-3 og kontrollfisk ved dag 3, 7, 14, 21 og 28. N=5-6. Kolonnene viser gjennomsnitt  $\pm$  SE. Statistiske forskjeller mellom kontroll og behandlet gruppe er indikert med \* over kolonnene (  $P < 0,05$ ).

## Resultater

RFP (lys rød) ble i muskelsnitt lokalisert i cellekjernene hos fisk injisert med GATA-3-pTagRFP (Fig. 3.7).



Figur 3.7. Histologisk snitt av muskelprøver fra fisk injisert med hhv. GATA-3 (A) og PBS (B) (kontroll). A) Cellene viste uttrykk av RFP (lys rød, vist ved piler) i cellekjerner hos muskelceller og tydet på tilstedeværelse av GATA-3. B) Muskelceller hos kontrollfisk. Bildene er tatt i hhv. 400x og 100x forstørrelse.

### 3.3 Presmitteforsøk

#### 3.3.1 *V. anguillarum*

Dag fire etter smitte var omtrent samtlige fisk i presmitteforsøket døde og forsøket ble terminert. I grupper injisert med høy og middels dose var det 100 % dødelighet, mens det i gruppen med lav dosering var 80 % dødelighet etter dag fire.

#### 3.3.2 *P. salmonis*

Da det ikke oppstod dødelighet ved noen av de injiserte dosene ble forsøket terminert etter tre uker.

### 3.4 Hovedforsøk: Transient genekspressjon

Hovedforsøket ble til forskjell fra pilotforsøket utført med to kontrollgrupper: kontroll injisert med pTagRFP (kontrollplasmid) og kontroll injisert med PBS (kontroll).

#### 3.4.1 QPCR-analyse

QPCR-analysene i hovedforsøket ble utført med de samme betingelser som ved pilotforsøket. Enkeltindivider som gav store eller betydelige utslag ble ikke tatt ut av resultatsettet. Smitte med *V. anguillarum* og *P. salmonis* ble utført ved dag 15 etter plasmidinjeksjon. Det ble foretatt qPCR-analyser av muskel, milt og hodenyre ved hhv. dag 0, 2, 7, 20 og dag 0, 2, 7, 19, 22, 26 etter plasmidinjeksjon (Se tidslinje i material og metode; Fig. 2.1) I tillegg til å analysere for TGF- $\beta$ , T-bet og GATA-3, som det ble gjort i pilotforsøket, ble det også analysert for ekspresjon av IL-17A og bakterielt 16S rRNA ved smitte av både *V. anguillarum* og *P. salmonis*. IFN- $\gamma$  ble målt ved smitte av *P. salmonis* og IL-4/13A ved smitte av *V. anguillarum*. I ettertid skulle en ha målt uttrykkene av IFN- $\gamma$  og IL-4/13A mRNA i hovedforsøket (hhv. *V. anguillarum* og *P. salmonis* smitte) siden det kanskje kunne ha indikert mer om T<sub>H</sub>1/T<sub>H</sub>2 balansen.

#### 3.4.2 Histologisk analyse

Det ble foretatt histologiske undersøkelser på snitt fra fisk injisert med samme plasmider som i pilotforsøket (unntaket er kontrollplasmid, pTagRFP) – for å sikre at resultatene fra pilotforsøket var reproducerbare. De histologiske snittene av muskel fra fisk injisert med plasmid kodende for TGF- $\beta$  (TGF- $\beta$ -pTagRFP), T-bet (T-bet-pTagRFP), GATA-3 (GATA-3-pTagRFP), kontrollplasmid (pTagRFP) og kontroll injisert med PBS fra dag 0, 2, 7 og 20 ble undersøkt ved fluorescensmikroskopisk. RFP ble observert i cellekjerner i muskel hos fisk fra alle gruppene injisert med plasmid, mens det i fisk fra kontrollgruppen injisert med PBS var ingen tegn til RFP (Fig. 3.11, 3.13, 3.15 og 3.18). I motsetning til pilotforsøket ble TGF- $\beta$  ikke observert lokalisert til kun cytoplasma, men også i cellekjerner.

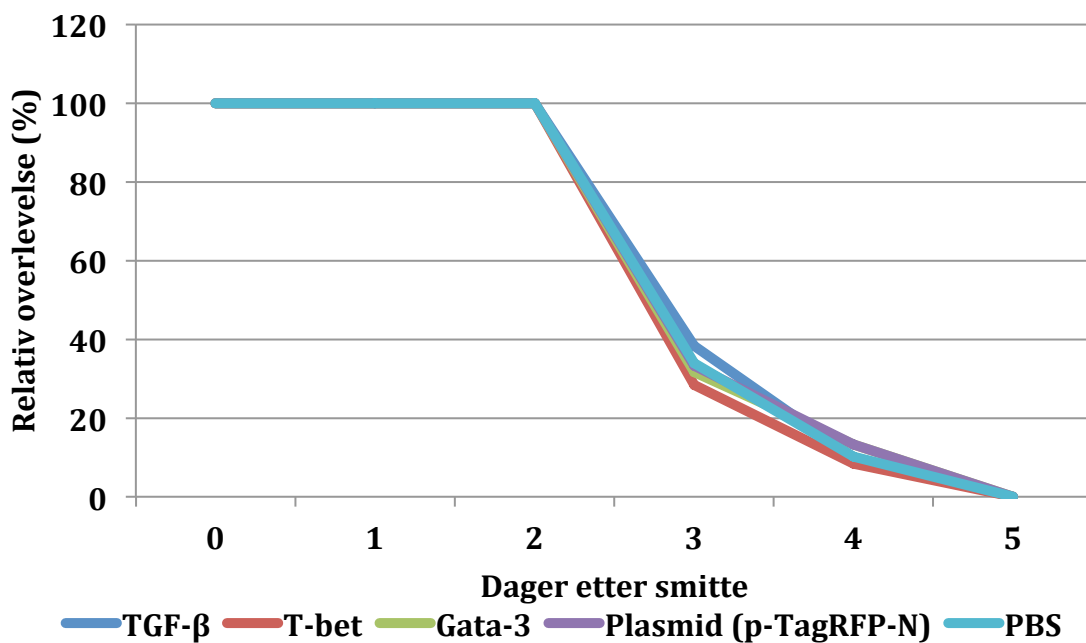
### 3.4.3 Smitte med *V. anguillarum*

Det oppstod akutt dødelighet i forsøket tre dager etter smitte med *V. anguillarum* og forsøket ble derfor terminert tidligere enn planlagt (dag fem etter smitte). Til tross for høy dødelighet ble det observert normal adferd i karene, og få til ingen innvendige tegn til sykdom ved prøvetaking fem dager etter smitte. Ved obduksjon av død fisk ble det registrert få makroskopiske patologiske forandringer med unntak av svært svullen milt. Fisken viste ingen utvendige tegn til sykdom.

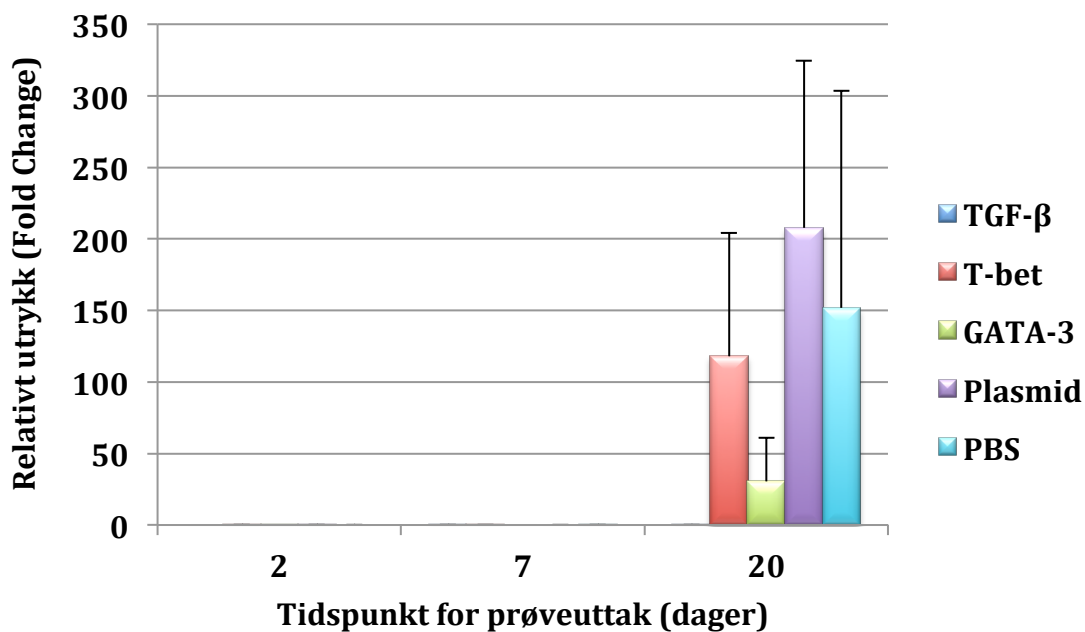
Den relative overlevelsen målt i prosent ved i.p smitte med *V. anguillarum* er presentert i figur 3.8. Siden det oppstod akutt dødelighet som medførte terminering av forsøket ble ikke RPS fra hver av de tre replikate tankene beregnet men dødelighetstallene fra hvert kar ble slått sammen for å lage overlevelsediagram. Fire dager etter smitte var det 20-30 % overlevende fisk igjen i karene og det ble ikke observert forskjell i overlevelse mellom de ulike behandlingsgruppene (Fig. 3.8). Det ble ikke utført kontroll med usmittet fisk.

Det relative uttrykket av *V. anguillarum* (16S rRNA) ble målt i hodenyre både før og etter eksperimentell smitte. Som det framkommer av figur 3.9 ble det ikke detektert målbare verdier ved dag to og sju før smitte, her var omtrent samtlige Ct-verdier over 40. I prøver fem dager etter smitte var de gjennomsnittlige Ct-verdiene for TGF- $\beta$ -pTagRFP, T-bet-pTagRFP, GATA-3-pTagRFP, kontrollplasmid og kontroll hhv. 30, 27, 30, 27 og 31 (Fig. 3.9).

## Resultater



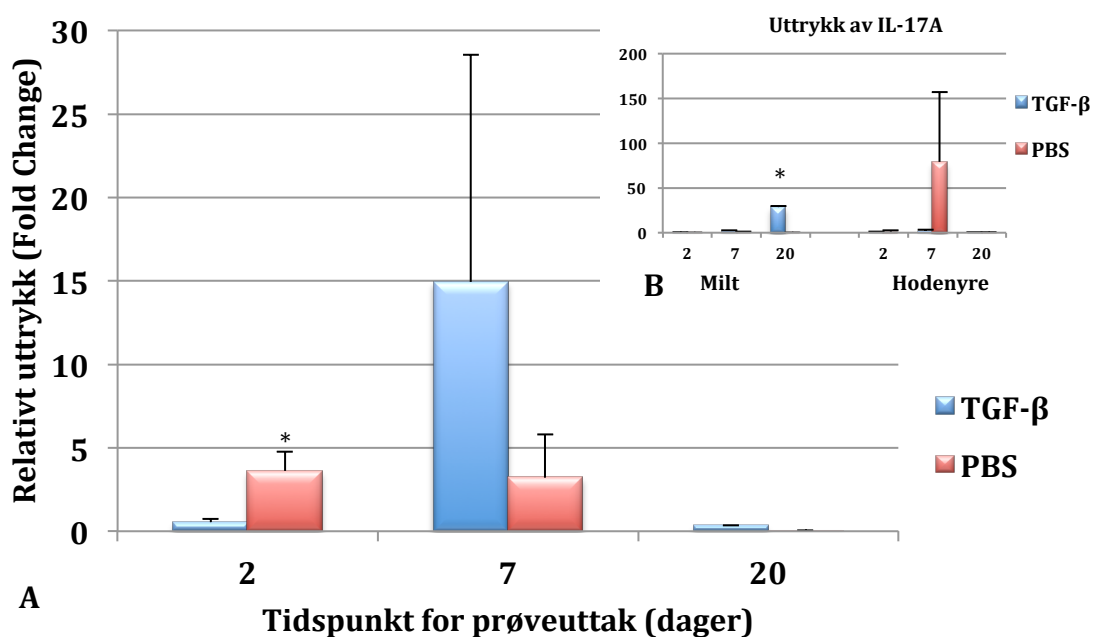
Figur 3.8. Prosentvis overlevelse ved eksperimentell smitte (i.p) med *V. anguillarum*. Ved dag fem var det kun få fisk igjen og forsøket ble terminert. N=60.



Figur 3.9. Relativt uttrykk av *V. anguillarum* 16S rRNA i hodenyre før- (dag 2 og 7) og dag fem etter smitte (dag 20 etter injeksjon av plasmid) . N=1-6. Kolonnene viser gjennomsnitt  $\pm$  SE.

**Uttrykk av TGF- $\beta$  og IL-17A i fisk injisert med TGF- $\beta$ -pTagRFP**

Som det framgår av figur 3.10A var mRNA-nivået av TGF- $\beta$  i muskel ikke signifikant høyere hos fisk injisert med plasmid kodende for TGF- $\beta$  enn kontrollfisk injisert med PBS. TGF- $\beta$  kan være med på å øke ekspresjon av IL-17A, derfor ble ekspresjon av IL-17A også analysert i fisk injisert med TGF- $\beta$ -pTagRFP. I milt fra fisk injisert med TGF- $\beta$ -pTagRFP ble det ikke registrert økning av IL-17A i mRNA nivået ved dag to og sju, men det ble målt signifikant økning av IL-17A ved dag 20, fem dager etter smitte. Det ble ikke detektert økte verdier i kontrollfisk injisert med PBS. I hodenyre ble det ikke observert noen økning av IL-17A i verken behandlet- eller kontrollfisk, med unntak av kontroll ved dag sju (figur 3.10B).

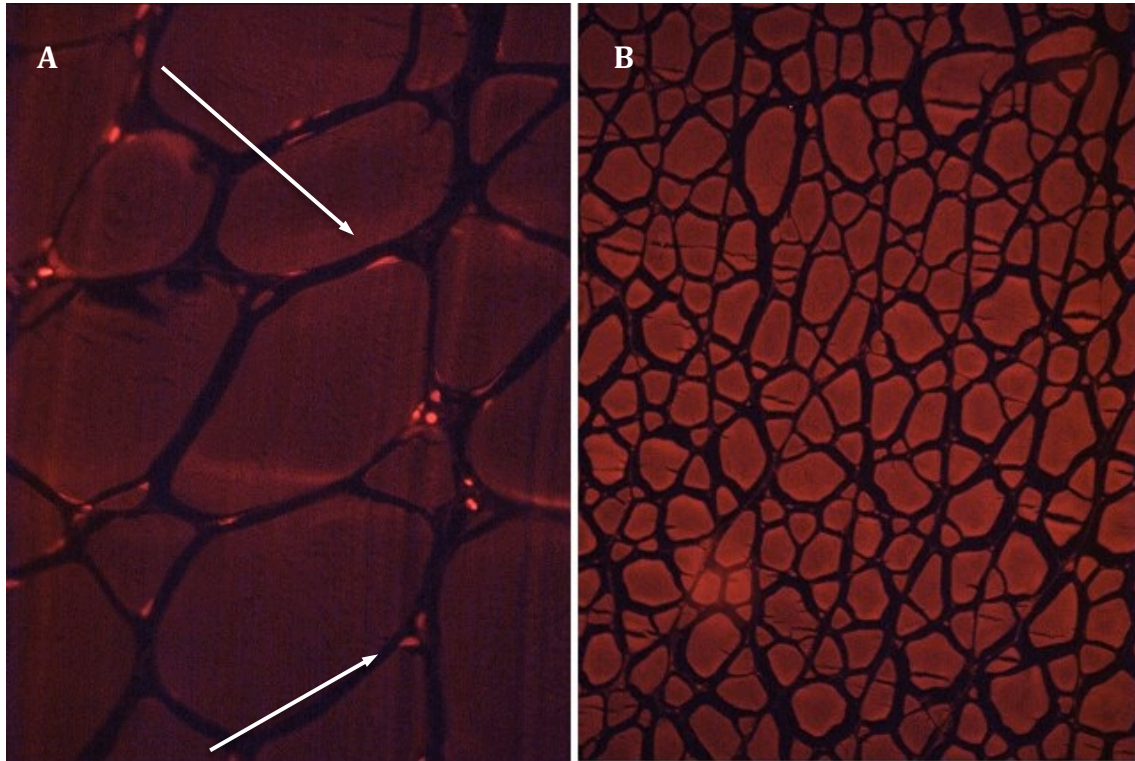


Figur 3.10. A) Relativt uttrykk av TGF- $\beta$  i muskel hos fisk injisert med TGF- $\beta$ -pTagRFP og kontrollfisk injisert med PBS ved dag 2, 7 og 20. B) Relativt uttrykk av IL-17A i prøver fra milt og hodenyre hos fisk injisert med TGF- $\beta$ -pTagRFP og kontrollfisk (PBS) ved dag 2, 7 og 20. Smitten ble utført ved dag 15. Aksetittlene er lik for begge figurer. N=5-6. Kolonnene viser gjennomsnitt  $\pm$  SE. Statistiske forskjeller mellom kontroll og behandlet gruppe er indikert med \* over kolonnene (\* P < 0,05).



## Resultater

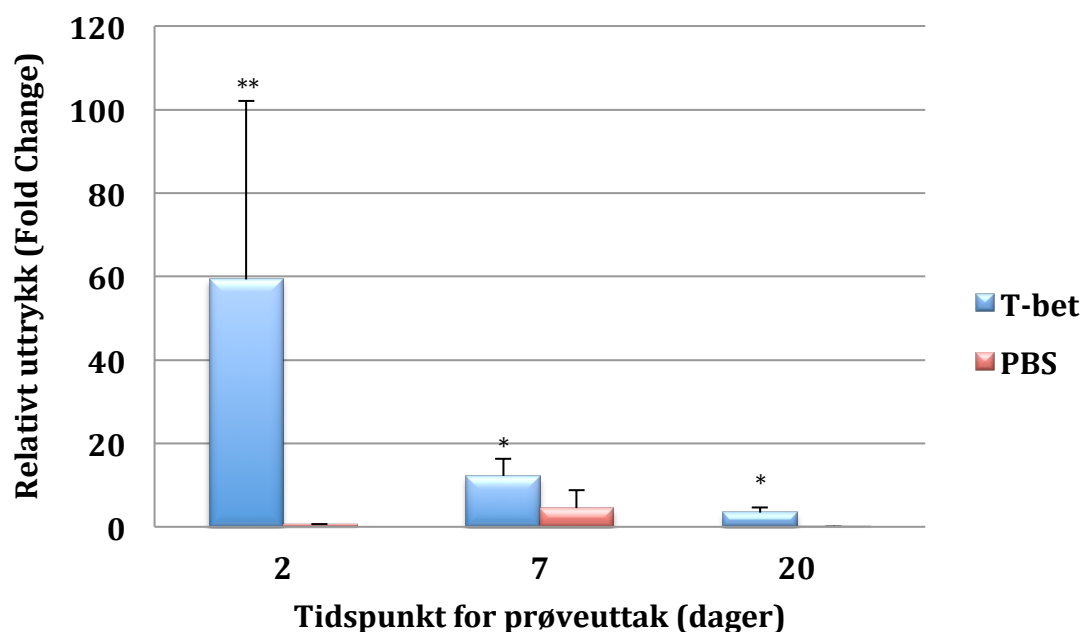
RFP (lys rød) ble i muskelsnitt lokalisert i cellekjernene i fisk injisert med TGF- $\beta$ -pTagRFP, mens det i kontrollfisk injisert med PBS ikke ble observert RFP (Fig. 11).



**Figur 3.11.** Histologisk snitt av muskelprøver fra fisk injisert med hhv. TGF- $\beta$  (A) (TGF- $\beta$ -pTagRFP) og PBS (B) (kontroll). A) Cellene viste uttrykk av RFP (lys rød, vist ved piler) i cellekjerner og tydet på tilstedeværelse av TGF- $\beta$ . B) Muskelceller fra kontrollfisk. Bildene er tatt i hhv. 400x og 100x forstørrelse.

**Uttrykk av T-bet i muskel hos fisk injisert med T-bet-pTagRFP**

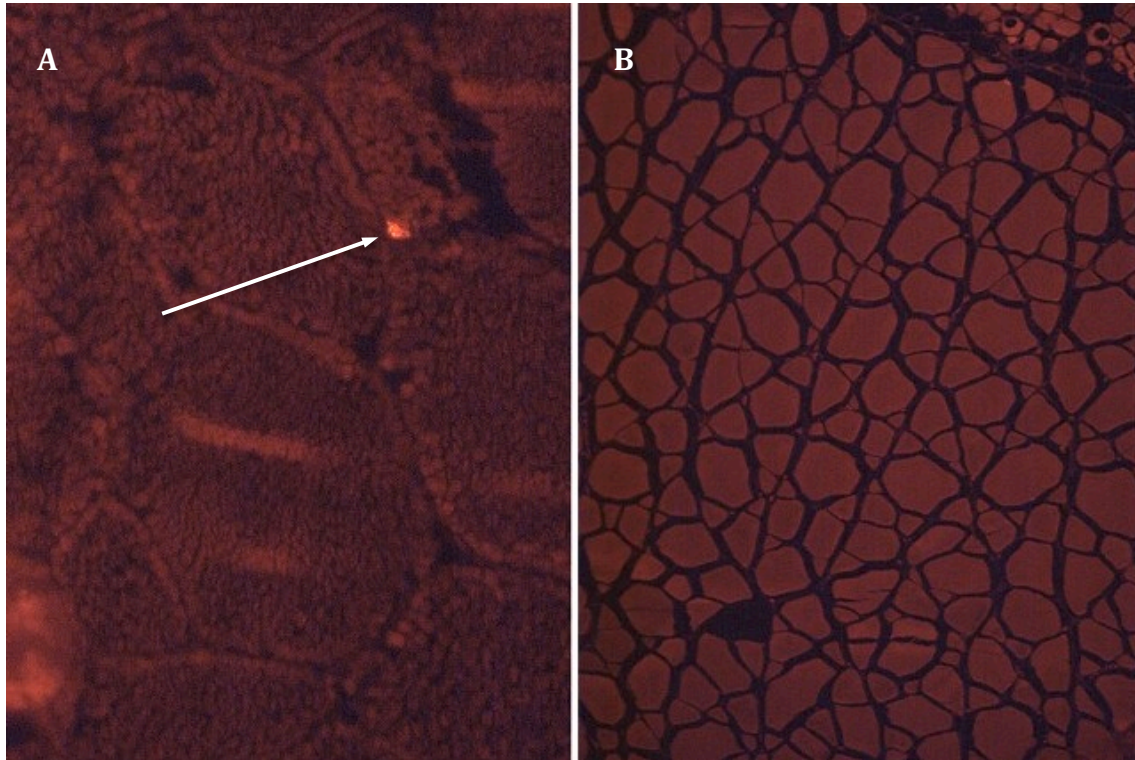
Det relative uttrykket av T-bet i muskel var høyere i fisk injisert med plasmid kodende for T-bet (T-bet-pTagRFP), enn kontrollfisk injisert med PBS gjennom forsøksperioden. Det ble observert at nivået var synkende fra dag to til dag 20. Ved dag to var uttrykket av T-bet signifikant høyere i behandlet fisk enn i kontroll.



Figur 3.12. Relativt uttrykk av T-bet mRNA i prøver fra muskel hos fisk injisert med T-bet kodende plasmid og kontrollfisk (PBS) ved dag 2, 7 og 20. Smitten ble utført ved dag 15. N=6. Kolonnene viser gjennomsnitt  $\pm$  SE. Statistiske forskjeller mellom kontroll- og behandlet gruppe er indikert med \* over kolonnene (\* P < 0,05 og \*\* P < 0,001).

## Resultater

RFP (lys rød) ble i muskelsnitt lokalisert i cellekjernene i fisk injisert med T-bet-pTagRFP, mens det i kontrollfisk injisert med PBS ikke ble observert RFP (Fig. 3.13).

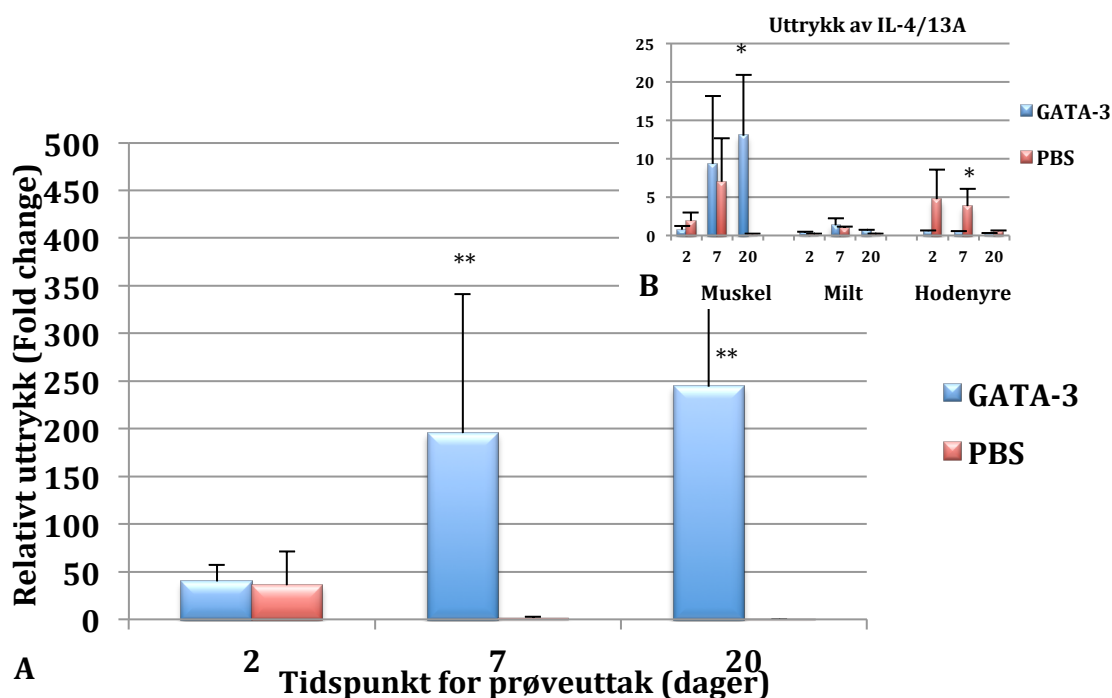


**Figur 3.13.** Histologisk snitt av muskelprøver fra fisk injisert med hhv. T-bet-pTagRFP (A) og PBS (B) (kontroll). A) Uttrykk av RFP i cellekjerne (lys rød, vist ved pil) og tydet på tilstedeværelse av T-bet. B) Muskelceller i kontrollfisk. Bildene er tatt i hhv. 400x og 100x forstørrelse.

## Resultater

### Uttrykk av GATA-3 og IL-4/13A i fisk injisert med GATA-3-pTagRFP

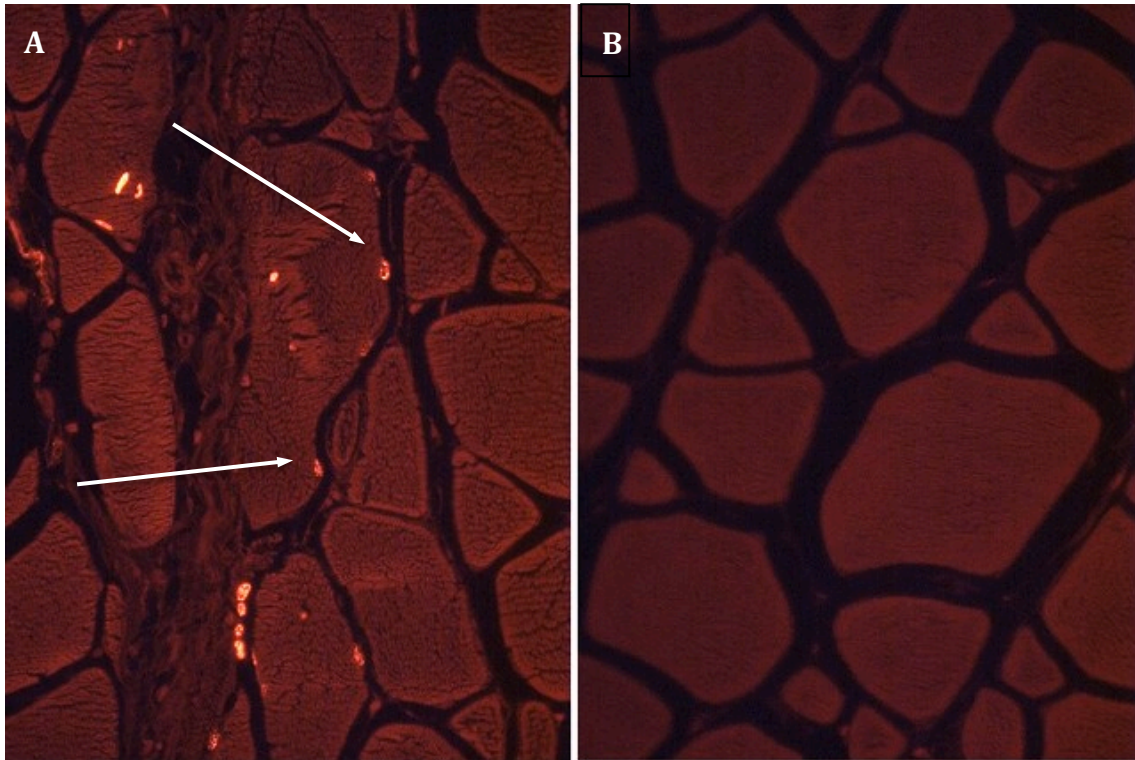
Uttrykket av GATA-3 (Fig. 3.14A) var signifikant høyere gjennom hele prøvetakingsperioden i fisk injisert med plasmid kodende for GATA-3 (GATA-3-pTagRFP) enn hos kontrollfisk, med unntak av dag to. Det høyeste uttrykket ble målt ved dag 20, og var signifikant høyere enn kontroll. GATA-3 er en mulig transkripsjonsfaktor for bl.a. IL-4/13A produksjon, derfor ble uttrykket av IL-4/13A undersøkt. Det ble målt forhøyede verdier av IL-4/13A i muskel ved dag sju og 20 i behandlet gruppe og ved dag sju i kontroll injisert med PBS. I milt og hodenyre ble det ikke målt forhøyede verdier verken i behandlet- eller kontrollfisk (Fig. 3.14B).



Figur 3.14. A) Relativt uttrykk av GATA-3 i prøver fra muskel hos fisk injisert med GATA-3-pTagRFP og kontrollfisk (PBS) ved dag 2, 7 og 20. SE for dag 20 ble målt til 229,47 B) Relativt uttrykk av IL-4/13A i prøver fra muskel, milt og hodenyre hos fisk injisert med GATA-3pTagRFP og kontrollfisk injisert med PBS ved dag 2, 7 og 20. Smitten ble utført ved dag 15. Aksetitlene er lik for begge figurer. N=6. Kolonnene viser gjennomsnitt  $\pm$  SE. Statistiske forskjeller mellom kontroll- og behandlet gruppe er indikert med \* over kolonnene (\* P < 0,05 og \*\* P < 0,001).

## Resultater

Det ble i muskelsnitt observert RFP (lys rød) lokalisert i cellekjernene i fisk injisert med GATA-3-pTagRFP. I kontrollfisk injisert med PBS ble det ikke observert RFP (Fig. 3.15).



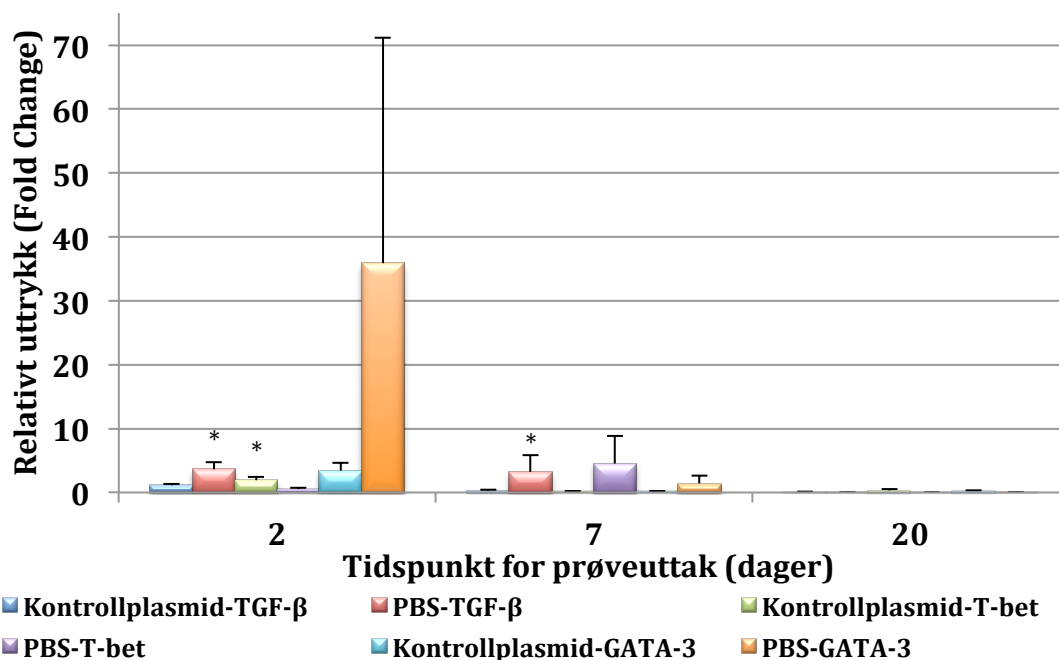
**Figur 3.15.** Histologisk snitt av muskelprøver fra fisk injisert med hhv. A) GATA-3-pTagRFP og B) PBS (kontroll). A) Cellene viste uttrykk av RFP (lys rød, vist ved piler) i cellekjerner og tydet på tilstedeværelse av GATA-3. Bildene er tatt i 400x forstørrelse.

### ***Uttrykk av transkripsjonsfaktorer og cytokiner etter injeksjon av kontrollplasmid (pTagRFP) og PBS***

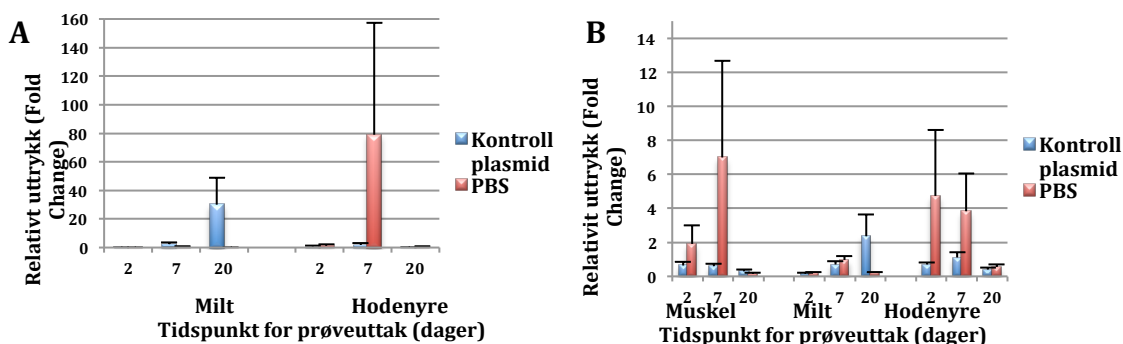
Det ble ikke målt forhøyede verdier av TGF- $\beta$ , T-bet og GATA-3 i muskel (Fig. 3.16) med unntak av uttrykk av GATA-3 i kontroll (PBS) ved dag to. Uttrykket av IL-17A i milt og hodenyre var lavt, med unntak av dag 20 i prøver fra fisk injisert med pTagRFP og dag sju injisert med PBS (figur 3.17A). Målingene av IL-4/13A i muskel viste lavt uttrykk med unntak av dag sju i gruppen injisert med PBS, (Fig. 3.17B). I milt og hodenyre ble det registrert lavt uttrykk i hele prøvetakingsperioden



## Resultater



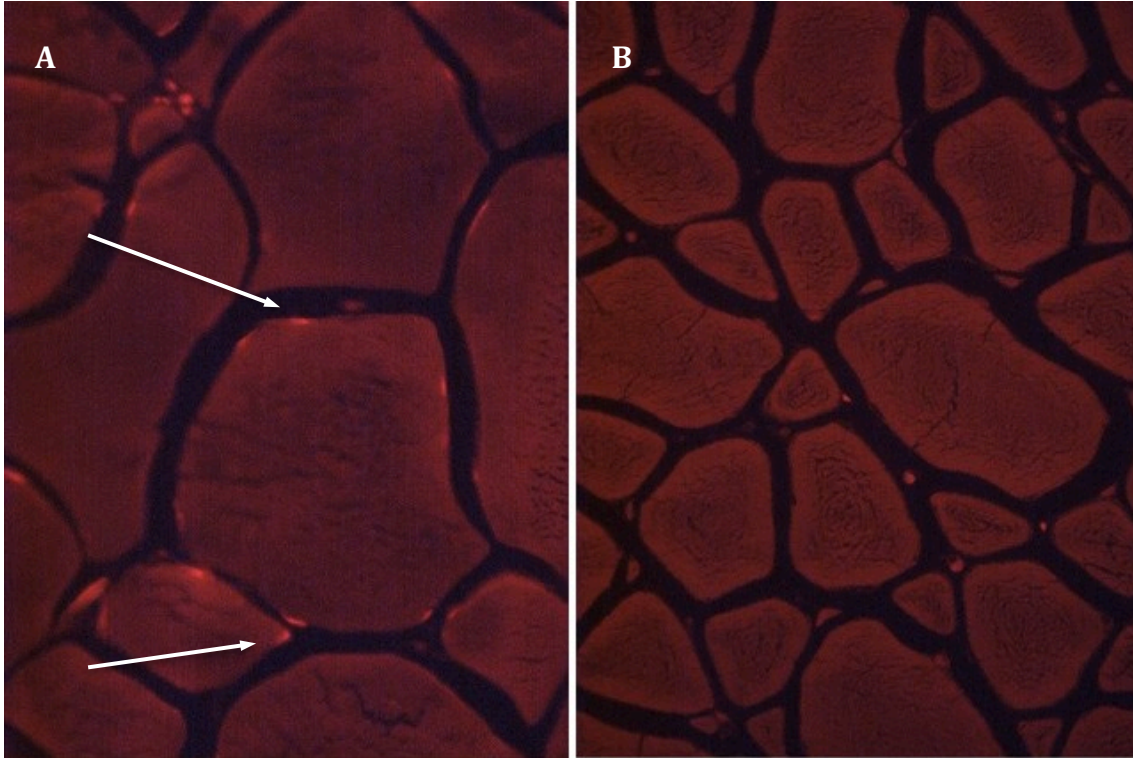
Figur 3.16. Relativt uttrykk av TGF- $\beta$ , T-bet og GATA-3 i prøver fra muskel hos fisk injisert med kontrollplasmid og kontrollfisk injisert med PBS ved dag 2, 7 og 20. Smitte ble utført ved dag 15. Uttrykk av TGF- $\beta$ , T-bet og GATA-3 i kontroll med PBS er vist med hhv. Rød, lilla og orange søyle. Kolonnene viser gjennomsnitt  $\pm$  SE. N=6. Statistiske forskjeller mellom kontroll og kontroll plasmid behandlet gruppe er indikert med \* over kolonnene (\* P < 0,05).



Figur 3.17. A) Relativt uttrykk av IL-17A i prøver fra milt og hodenyre hos fisk injisert med kontrollplasmid og kontrollfisk injisert med PBS ved dag 2, 7 og 20. B) Relativt uttrykk av IL-4/13A i prøver fra muskel, milt og hodenyre hos fisk injisert med kontrollplasmid og kontrollfisk injisert med PBS ved dag 2, 7 og 20. Smitten ble utført ved dag 15. N=6. Kolonnene viser gjennomsnitt  $\pm$  SE.

## Resultater

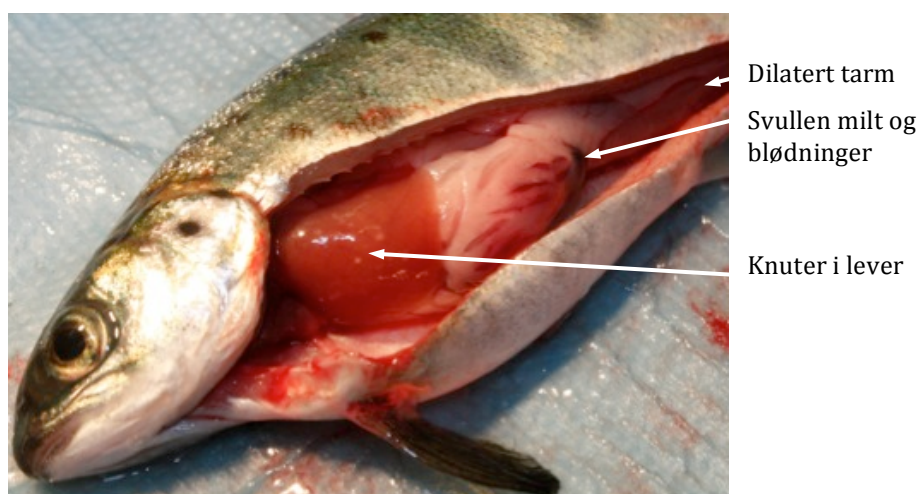
Det ble i muskelsnitt observert RFP (lys rød) lokalisert i cellekjernene i fisk injisert med pTagRFP, i kontrollfisk injisert med PBS ble det ikke observert RFP (figur 3.18).



**Figur 3.18.** Histologisk snitt av muskelprøver fra fisk injisert med hhv. A) kontrollplasmid og B) PBS (kontroll). A) Cellene viste uttrykk av RFP (lys rød, vist ved piler) i cellekjerner og tyder på tilstedeværelse av transgent RFP. B) Muskelceller i kontrollfisk. Bildene er tatt i 400x forstørrelse.

### 3.4.4 Smitte med *P. salmonis*

Sju dager etter smitte ble det hos enkelte fisk observert blødninger i tarmregionen. Utover i prøvetakingsperioden ble det registrert flere symptomer og sykdomsbildet utviklet seg. Det ble funnet klassiske tegn som apatisk adferd, blodig ascites, svullen milt og knuter i lever. I tillegg ble det i noen tilfeller observert dilatert tarm med store mengder gult slim (Fig. 3.19). 13 dager etter smitte oppstod det akutt dødelighet og forsøket ble terminert 19 dager etter smitte.



**Figur 3.19. Fisk 13 dager etter smitte med *P. salmonis*. Fisken viser symptomer som knuter i lever, blødninger, mørk svullen milt og dilatert tarm.**

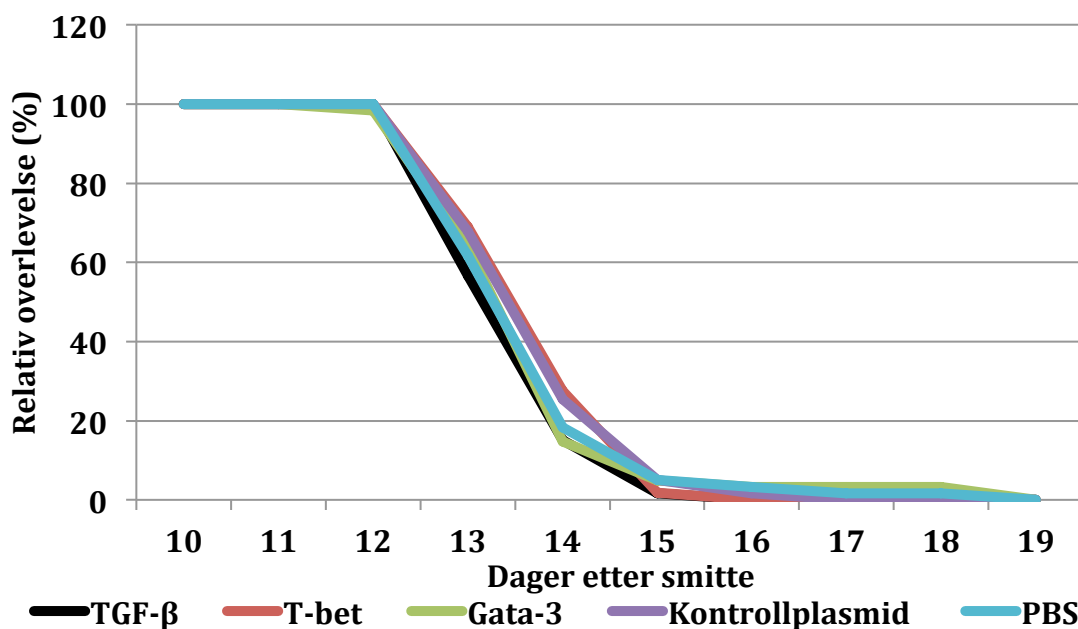
Relativ prosentvis overlevelse i forsøket med *P. salmonis* er presentert i figur 3.20. Siden det oppstod akutt dødelighet i de tre "urørtkarene" ble dødelighetstallene fra hvert kar slått sammen for å lage overlevelsediagram. 14 dager etter smitte var det 15-25 % overlevende fisk igjen i karene og det ble ikke observert forskjell i overlevelse mellom de ulike gruppene. Av kurven kan man se at dødeligheten i alle gruppene var relativt lik (Fig. 3.20). Det ble ikke utført kontroll med usmittet fisk.

Det relative uttrykket av *P. salmonis* (16S rRNA) ble målt i hodenyre både før og etter eksperimentell smitte. Analysene ble utført ved bruk av qPCR og foretatt på prøver fra fisk 2, 7, 19, 22 og 28 dager etter forsøksstart. Smitten ble utført 15 dager etter forsøksstart. Som det framkommer av figur 3.21 ble det funnet lave verdier ved dag to og sju før smitte, da omtrent samtlige Ct-verdier var over 40 sykluser (Fig. 3.21). Allerede fire dager etter smitte var det kraftig økning i uttrykket av *P. salmonis* 16S rRNA. Innholdet av *P. salmonis* 16S rRNA fortsatte å øke fram til dag 22. Ved siste

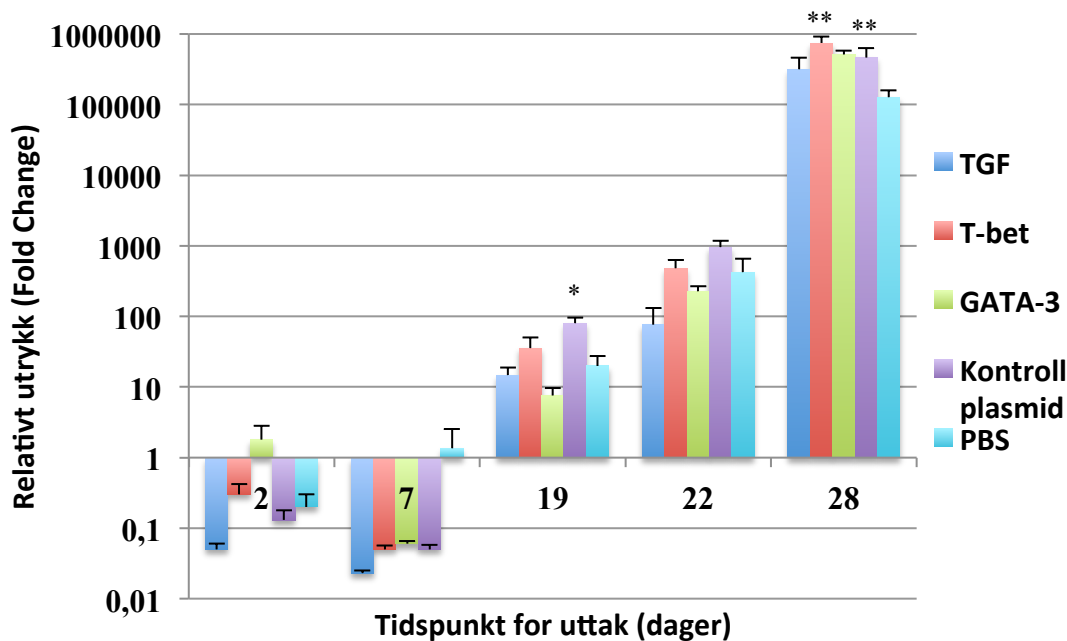


## Resultater

måling, dag 28, hadde uttrykket i alle gruppene eskalert. Det relative uttrykket av TGF- $\beta$ , T-bet, GATA-3, kontrollplasmid og kontroll injisert med PBS ved dag 28 ble fold change målt til hhv. 318178, 746204, 515280, 465405 og 127868 (Fig. 3.21).



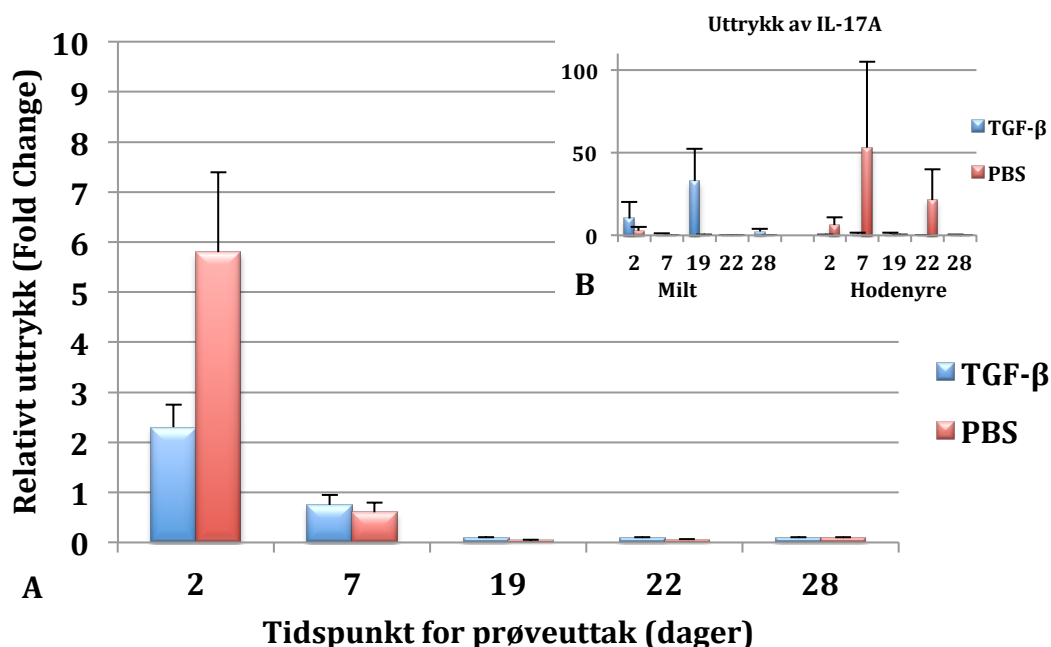
Figur 3.20. Prosentvis overlevelse ved eksperimentell smitte med *P. salmonis*. Ved dag 19 etter smitte var det få individer igjen og forsøket ble terminert. N=60.



Figur 3.21. Relativt uttrykk av *P. salmonis* 16S rRNA i hodenyre før- (dag 2 og 7) og etter- (dag 19, 22 og 28) eksperimentell smitte. N=2-6. Kolonnene viser gjennomsnitt  $\pm$  SE. Statistiske forskjeller mellom kontroll (PBS) og behandlet gruppe er indikert med \* over kolonnene (\* P < 0,05 og \*\* P < 0,001).

**Uttrykk av TGF- $\beta$  og IL-17A i fisk injisert med TGF- $\beta$ -pTagRFP**

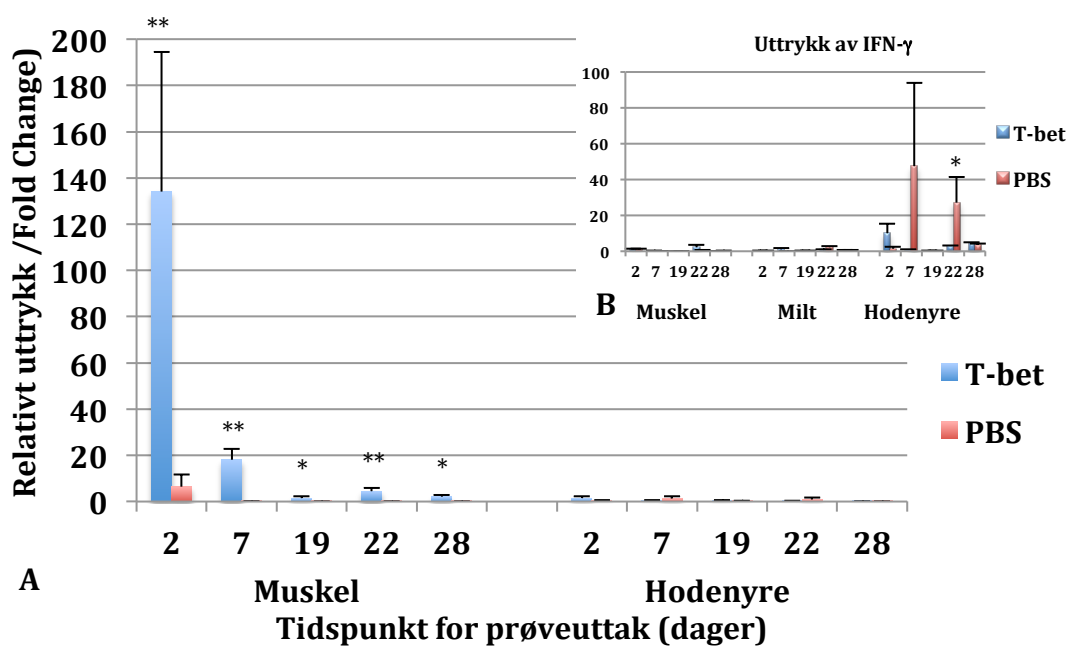
Det ble ikke målt forhøyede verdier i prøvetakingsperioden av TGF- $\beta$  i muskel etter injeksjon av plasmid kodende for TGF- $\beta$  (TGF- $\beta$ -pTagRFP) (Fig. 3.22A). Ved dag to ble uttrykket av TGF- $\beta$  i muskelprøve fra kontrollfisk (PBS) målt til å være høyere enn i plasmidbehandlet fisk. Det ble registrert forhøyede verdier i prøvetakingsperioden av IL-17A ved dag 19 i milt i gruppen injisert med TGF- $\beta$ -pTagRFP og dag sju og 22 i hodenyre i gruppen injisert med PBS (Fig. 3.22B) – imidlertid var forskjellene ikke statistisk signifikante.



Figur 3.22. A) Relativt uttrykk av TGF- $\beta$  i prøver fra muskel hos fisk injisert med TGF- $\beta$ -pTagRFP og PBS (kontrollfisk) ved dag 2, 7, 19, 22 og 28. B) Relativt uttrykk av IL-17A i prøver fra milt og hodenyre hos fisk injisert med TGF- $\beta$ -pTagRFP og kontrollfisk injisert med PBS ved dag 2, 7, 19, 22 og 28. Smitten ble utført ved dag 15. Figurene har like aksetitler. N=6. Kolonnene viser gjennomsnitt  $\pm$  SE.

**Uttrykk av T-bet og IFN- $\gamma$  i fisk injisert med T-bet-pTagRFP**

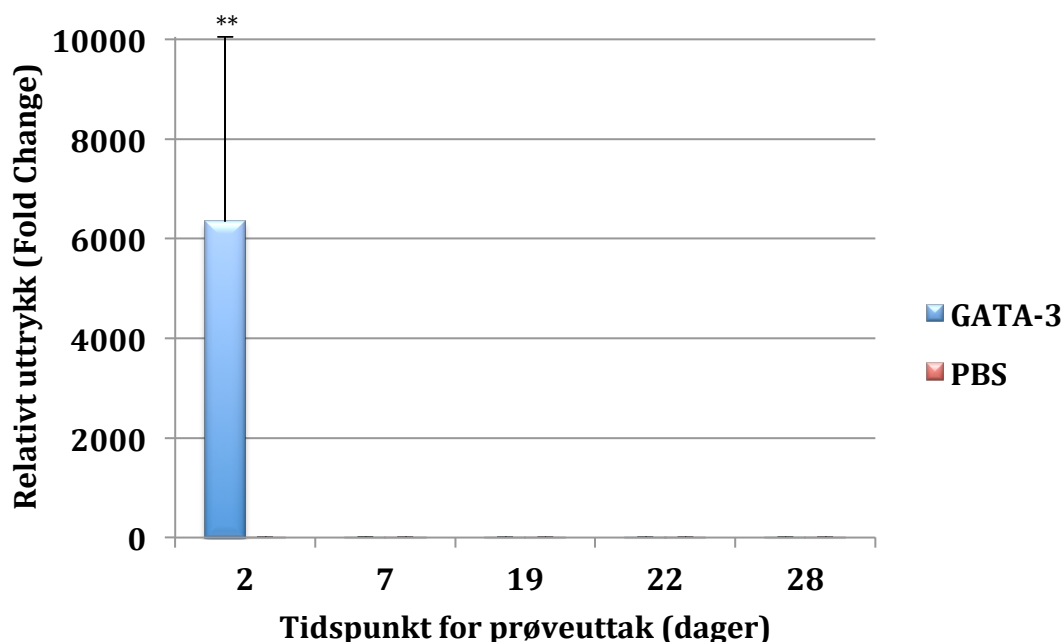
Ved dag 2, 7, 19, 22 og 28 var uttrykket av T-bet i muskel signifikant høyere i fisk behandlet med T-bet-pTagRFP enn i prøver fra kontrollfisk injisert med PBS. Målingene i hodenyre viste ingen forhøyede verdier (Fig. 3.23A). Det ble ikke registrert økte verdier av IFN- $\gamma$  i muskel eller milt hos fisk injisert med T-bet-pTagRFP eller i kontrollfisk injisert med PBS. I hodenyre ble det ikke funnet forhøyede verdier av IFN- $\gamma$  i fisk injisert med T-bet-pTagRFP, med unntak av dag to. Det høyeste uttrykket av IFN- $\gamma$  ble målt i kontrollfisk ved dag sju og 22 og forskjellen fra den behandlede gruppen var signifikant ved dag 22 (Fig. 3.23B).



Figur 3.23. A) Relativt uttrykk av T-bet i prøver fra muskel og hodenyre hos fisk injisert med T-bet-pTagRFP og PBS (kontrollfisk) ved dag 2, 7, 19, 22 og 28. B) Relativt uttrykk av IFN- $\gamma$  i prøver fra muskel, milt og hodenyre hos fisk injisert med T-bet-pTagRFP og PBS ved dag 2, 7, 19, 22 og 28. Smitten ble utført ved dag 15. Figurene har like aksetitler. N=4-6. Kolonnene viser gjennomsnitt  $\pm$  SE. Statistiske forskjeller mellom kontroll og behandlet gruppe er indikert med \* over kolonnene (\* P < 0,05 og \*\* P < 0,001).

**Uttrykk av GATA-3 i fisk injisert med GATA-3-pTagRFP**

Det ble kun registrert forhøyede verdier av GATA-3 i muskel ved dag to hos fisk injisert med GATA-3-pTagRFP. Uttrykket var signifikant høyere ( $p < 0,001$ ) enn de andre målingene i prøvetakingsperioden (Fig. 3.24).

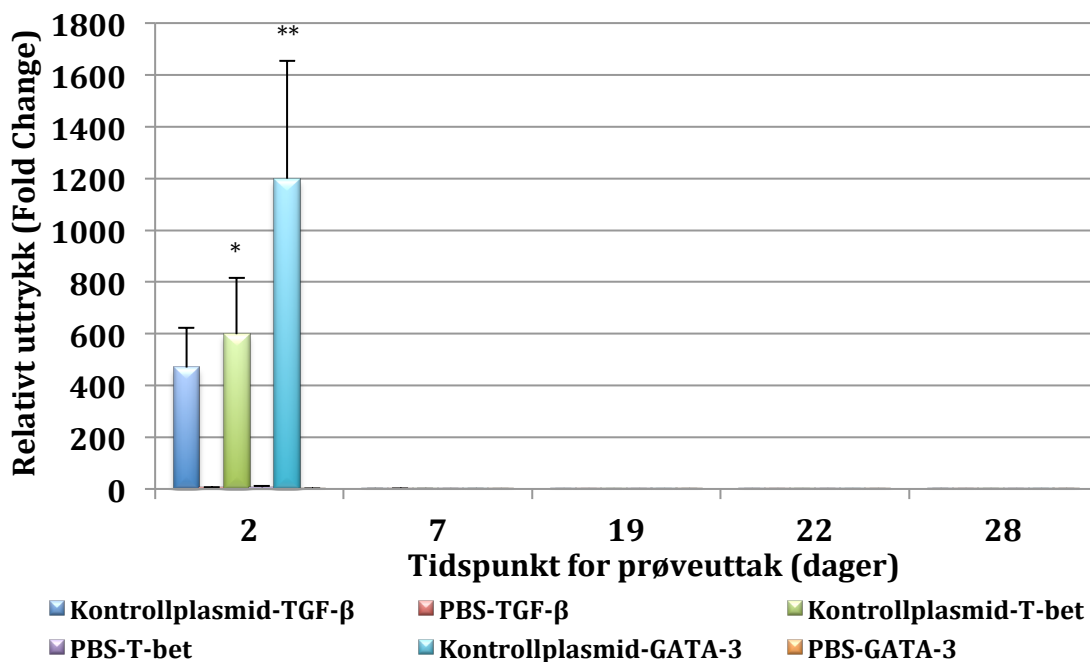


Figur 3.24. Relativt uttrykk av GATA-3 i prøver fra muskel hos fisk injisert med GATA-3-pTagRFP og PBS ved dag 2, 7, 19, 22 og 28. Smitten ble utført ved dag 15. N=6. Kolonnene viser gjennomsnitt  $\pm$  SE. Statistiske forskjeller mellom kontroll og behandlet gruppe er indikert med \* over kolonnene (\*\* P < 0,001).

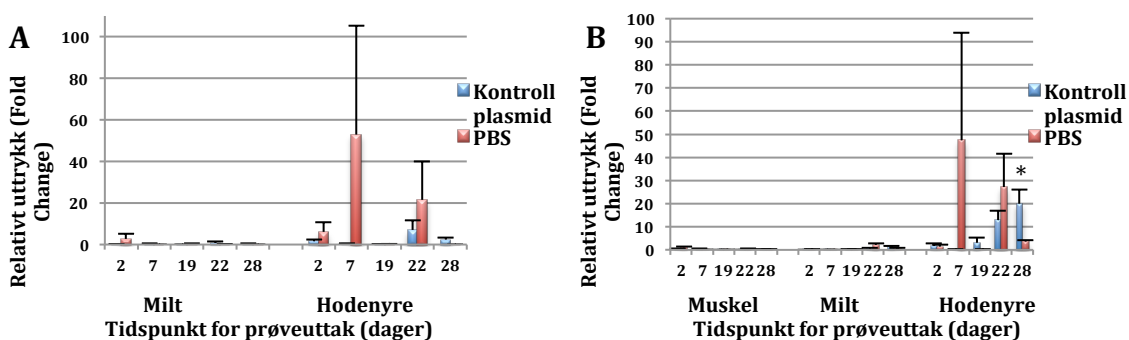
**Uttrykk av transkripsjonsfaktorer og cytokiner etter injeksjon av kontrollplasmid (pTagRFP)**

Det ble målt signifikant forhøyede verdier av TGF- $\beta$ , T-bet og GATA-3 i muskel ved dag to. Kun lave verdier ble målt i prøver fra kontrollfisk injisert med PBS. Ved dag 7, 19, 22 og 28 ble det ikke funnet økning av genuttrykkene (Fig. 3.25). Det ble heller ikke observert signifikante uttrykk av IL-17A i milt etter injeksjon av kontrollplasmid eller PBS. Dette gjaldt for hele prøvetakingsperioden. I hodenyre ble det registrert økte verdier ved dag sju og 22 i gruppen injisert med PBS (Fig. 3.26A). Det ble heller ikke registrert økning i uttrykket av IFN- $\gamma$  i muskel og milt i prøvetakingsperioden. I hodenyre ved dag 22 og 28 ble det målt økning i genuttrykk av IFN- $\gamma$ , med unntak av kontroll ved dag 28. Det ble i tillegg målt økning av IFN- $\gamma$  ved dag sju i kontroll (PBS) (Fig. 3.26B).

## Resultater



Figur 3.25. Relativt uttrykk av TGF- $\beta$ , T-bet og GATA-3 i prøver fra muskel fra fisk injisert med kontrollplasmid og kontrollfisk injisert med PBS ved dag 2, 7, 19, 22 og 28. Smitten ble utført ved dag 15. Uttrykk av TGF- $\beta$ , T-bet og GATA-3 i kontroll er vist med hhv. rød, lilla og orange-farget søyle. N=4-6. Kolonnene viser gjennomsnitt  $\pm$  SE. Statistiske forskjeller mellom kontroll og behandlet gruppe er indikert med \* over kolonnene (\* P < 0,05 og \*\* P < 0,001).



Figur 3.26. A) Relativt uttrykk av IL-17A i prøver fra milt og hodenyre hos fisk injisert med kontrollplasmid og kontrollfisk injisert med PBS ved dag 2, 7, 19, 22 og 28. B) Relativt uttrykk av IFN- $\gamma$  i prøver fra muskel, milt og hodenyre hos fisk injisert med kontrollplasmid og kontrollfisk injisert med PBS ved dag 2, 7, 19, 22 og 28. N=2-6. Kolonnene viser gjennomsnitt  $\pm$  SE. Statistiske forskjeller mellom kontroll og behandlet gruppe er indikert med \* over kolonnene (\* P < 0,05).

## 4. Diskusjon

### 4.1 Bakgrunn for oppgaven

Hovedmålet i studien var å finne ut om overekspresjon av T-bet og GATA-3 *in vivo* ville inducere sykdomsbeskyttelse hos atlantisk laks (*Salmo salar*) og om overekspresjon av TGF- $\beta$  ville gi lavere beskyttelse etter eksperimentell smitte med hhv. intracellulær bakterie, *P. salmonis* og ekstracellulær bakterie, *V. anguillarum*.

### 4.2 Transfeksjon av CHSE-celler (*in vitro*)

Det ble gjort et innledende forsøk på å klonere inn genene for TGF- $\beta$ , T-bet og GATA-3 i plasmid ved bruk av "TOPO 3.3 cloning kit". Plasmidene kodet også for gen som uttrykker His<sub>6</sub>-Tag som for eksempel benyttes til immunoblot påvisning av et transgen protein – samt som en tag for affinitetsopprensning av protein. Det ble utført transfeksjon av CHSE-214 celler. Etter transfeksjon ble ikke His<sub>6</sub>-Tag detektert ved hjelp av immunoblotting, og det ble konkludert med at plasmidet ikke ble transkribert. På bakgrunn av dette ble plasmidet erstattet med pTagRFP. Som det framkommer av figur 3.1 ble det utført en vellykket transfeksjon av CHSE-214 celler. Plasmidene ble tatt opp og RFP-konstruktet ble uttrykt i cytoplasma og cellekjerne. Vi besluttet derfor å benytte dette plasmidet til overekspresjonsstudiene *in vivo*.

### 4.3 Smitte med *V.anguillarum* og *P. salmonis*

Det er kjent at aktiviteten til transkripsjonsfaktorene T-bet og GATA-3 vil påvirke ulike mekanismer i immunforsvaret som for eksempel differensiering av T-celler til hhv. T<sub>H</sub>1- og T<sub>H</sub>2-celler (Aune *et al.*, 2009), mens TGF- $\beta$  kan hemme differensieringen av T-celler til T<sub>H</sub>1- og T<sub>H</sub>2-celler (Sad & Mosmann, 1994; Cerwenka & Swain, 1999). T<sub>H</sub>2 stimulerer det adaptive forsvar mot ekstracellulære patogener (Heinzel *et al.*, 1989). Dersom en injeksjon av plasmid kodende for GATA-3 (GATA-3-pTagRFP) induserer en overekspresjon av GATA-3 og dernest en modulering av en T<sub>H</sub>2 lignende respons hos

## Diskusjon

laks forventet man økt overlevelse ved smitte av den ekstracellulære bakterien *V. anguillarum*.  $T_H1$  stimulerer det adaptive forsvaret spesielt mot intracellulære patogener (Heinzel *et al.*, 1989). På bakgrunn av dette forventet man, at dersom fisken fikk økt ekspresjon av T-bet ved injeksjon av plasmid kodende for T-bet (T-bet-pTagRFP), en økt overlevelse med smitte av den intracellulære bakterien *P. salmonis*.

Tidligere smitteforsøk utført på regnbueørret har vist at uttrykket av T-bet og GATA-3 i milt øker ved infeksjon av Yersinose i PBS injisert fisk. Wang *et al.* (2010) mente dette var forårsaket av stress ved injeksjon og håndtering. Ved infeksjon av proliferativ nyresyke ble det også vist en økning av T-bet- og IFN- $\gamma$  uttrykket i hodenyre, mens GATA-3 viste en svak økning og IL-4 viste ingen økning i uttrykket. Dette tydet på at parasittinfeksjonen ga en  $T_H$ -uttrykksprofil i hodenyre (Wang *et al.*, 2010)

Vi valgte å utføre smitteforsøkene i ferskvann med stikksmitte. Bakgrunn for valget var at vaksinerings av laks hovedsaklig foregår i ferskvann slik at immunforsvaret får opparbeidet responser mot patogene organismer for sjøsetting. I tillegg var det mer praktisk gjennomførbart å utføre forsøkene i ferskvann da fisken er mindre og det krevdes mindre pDNA enn ved bruk av større fisk. Det er vanlig å benytte bad- og kohabitant modeller i smitteforsøk med *V. anguillarum* (Svendsen & Bøggwald 1997; Gildberg & Mikkelsen 1998; Mikkelsen *et al.*, 2011), det vil tilsvare vannbåren smitte i sjøvann, mens det er vanlig med stikksmitte ved eksperimentelle modeller for *P. salmonis* (Kuzyk *et al.*, 2001; Birkbeck *et al.*, 2004). Vi valgte å utføre begge smitteforsøkene med stikksmitte da det var usikkert om smitteforsøkene ville bli vellykket dersom vi utførte det som bad- eller kohabitantsmitte i ferskvann, siden bakteriene vanligvis opptrer i sjøvannsfasen.

På bakgrunn av resultater fra presmitteforsøket hvor det oppstod akutt dødelighet ved dag tre, ble dosene med *V. anguillarum* justert ned til hovedforsøket. På grunn av manglende dødelighet i presmitteforsøket med *P. salmonis* ble dosene justert opp i hovedforsøket etter anbefaling fra Pharmaq. Endringene i doseringene ble gjort for å oppnå vesentlig lavere dødelighet i hovedforsøket enn 100 % ved *V. anguillarum* smitte og økt dødelighet enn 0 % som oppstod etter smitte med *P. salmonis*. Da fisken som ble benyttet i hovedforsøket bare hadde en snittvekt på 30 g mot forventet vekt på 50 g ble dosene noe høyere enn planlagt. Det oppstod akutt dødelighet etter infeksjon, hhv. fem og 13 dager etter injeksjon av *V. anguillarum* og *P. salmonis*. Det uventede

sykdomsforløpet førte til færre prøveuttak i hovedforsøket enn planlagt og førte videre til færre prøver for videre analyser.

Tidligere studier har vist at *V. anguillarum* kan dyrkes i Marine Broth og på blodagar (Mikkelsen *et al.*, 2011) mens *P. salmonis* kan dyrkes opp på anrikete blodagarplater (CHAB-plater) (Mauel *et al.*, 2008; Mikalsen *et al.*, 2008). Det har også blitt vist at bakterielle utstryk ved smitte av *V. anguillarum* og *P. salmonis* bør gjøres fra hodenyre (Gram *et al.*, 1999; Mikalsen *et al.*, 2008). De bakterielle utstrykene i dette studiet ble utført i henhold til tidligere studier samt at *V. anguillarum* ble strøket ut på Marine Broth agarplater (Pers. comm. Mikkelsen, 2012), og det ble registrert oppvekst av begge bakteriene. Det ble ikke utført tester for å verifisere isolatene, men oppveksten på de respektive agarplatene tydet på at fisken har dødd av det injiserte isolatet. I tillegg ble det foretatt mikroskopiering av *V. anguillarum* i forkant av pre- og smitteforsøk. Forekomst av bakterielt 16S rRNA fra begge bakterieartene ble analysert ved qPCR. *V. anguillarum* og *P. salmonis* opptrer begge vanligvis i sjøvannsfasen.

### 4.3.1 *V. anguillarum*

Til tross for høy dødelighet ble det observert få makroskopiske patologiske forandringer i fisk smittet med *V. anguillarum*. Tidligere studier med piggvarlarver har vist at man ved hjelp av qPCR kan identifisere og kvantifisere *V. anguillarum* (Prol *et al.*, 2009). Det ble også i dette forsøket benyttet qPCR for å bekrefte tilstedeværelse av *V. anguillarum* 16S rRNA etter eksperimentell smitte. Det ble ikke utført andre diagnostiske metoder for å utelukke infeksjon av eventuelt andre patogener. Lavt uttrykk/innhold av bakterielt rRNA ble målt både før og etter eksperimentell smitte - med unntak av enkeltindivider ved dag 20 - fem dager etter smitte. Resultatet presentert i figur 3.9 viser at det relative uttrykket av *V. anguillarum* (16S rRNA) i gruppene injisert med TGF- $\beta$ -pTagRFP og GATA-3-pTagRFP, var lavere enn i gruppene injisert med T-bet-pTagRFP, kontrollplasmid (pTagRFP) og PBS. Av figur 3.8 kan vi se at det er minimal forskjell i den prosentvise overlevelsen mellom de ulike gruppene. Resultatet ble derfor ikke som forventet og dette kan skyldes den akutte dødeligheten som oppstod i forsøket. Dødeligheten førte til at det kun ble tatt ut prøver ved dag 20, fem dager etter smitte. Dette gav oss lite sammenligningsgrunnlag mellom gruppene, og det er vanskelig å si om resultatene hadde sett annerledes ut om smitteforsøket hadde forløpt som planlagt.



### 4.3.2 *P. salmonis*

Ved dag 28, altså 13 dager etter smitte, ble det observert flere klassiske patologiske forandringer i fisk smittet med *P. salmonis* (Poppe, 2002). I tidligere studier er det vist at qPCR (TaqMan) kan benyttes til identifisering og kvantifisering av *P. salmonis* (Corbeil *et al.*, 2003). Vi valgte derfor å påvise tilstedeværelse av bakterien i den smittede fisken ved bruk av qPCR (Sybr Green), og det ble ikke utført andre diagnostiske metoder for å utelukke infeksjon av eventuelle andre patogener. Før smitte var det ikke mulig å detektere uttrykk av *P. salmonis* 16S rRNA ved hjelp av qPCR (Fig. 3.21). Etter smitte ble det målt forhøyede verdier allerede etter fire dager og uttrykket fortsatte å øke utover i sykdomsforløpet. Ved siste måling ved dag 28, altså 13 dager etter smitte, ble det laveste uttrykket målt i kontrollgruppen injisert med PBS (127868 fold change). Gruppen som ble injisert med TGF- $\beta$ -pTagRFP, ble målt til 318178. Det høyeste uttrykket ble målt i gruppen injisert med T-bet-pTagRFP (746204) (Fig. 3.21). På bakgrunn av funn ved qPCR-analyser og makroskopiske patologiske forandringer, ble det konkludert med at dødeligheten som oppstod var som følge av smitte forårsaket av *P. salmonis*. Selv om det var store variasjoner i det relative innholdet av *P. salmonis* 16S rRNA, ble ikke dette gjenspeilet i den relative overlevelsen (Fig. 3.20). Det var ikke markant forskjell mellom de ulike gruppene i den prosentvise overlevelsen under forsøket. Resultatene etter smitte med *P. salmonis* ble derfor ikke som forventet. Det manglende samsvaret mellom genuttrykkene og den relative overlevelsen kan skyldes den akutte dødeligheten som oppstod i forsøket.

### 4.4 Uttrykk av transkripsjonsfaktorer og cytokiner

Som nevnt ble det færre uttak etter smitte enn planlagt på grunn av akutt dødelighet i hovedforsøket. Dette resulterte i færre prøver og dermed dårligere sammenligningsgrunnlag mellom de ulike gruppene etter smitte med hhv. *V. anguillarum* og *P. salmonis*. Dette gjaldt spesielt for *V. anguillarum*, der det kun ble foretatt ett uttak etter smitte. Organprøvene som ble tatt for qPCR-analyse var muskel, milt og hodenyre. RNA fra muskel var vanskelig å isolere i motsetning til milt og hodenyre. Prøvene fra muskel inneholdt lavere mengde RNA og hadde generelt dårligere renhet enn RNA isolert fra milt og hodenyre. Det er rapportert fra Qiagen at

RNA isolering fra blant annet skjelettmuskulatur kan være vanskelig på grunn av store mengder kontraktile proteiner, bindevev og kollagen. Ved bruk av proteaser kan dette problemet unngås (Qiagen.com). Dette trinnet ble ikke utført i vårt studie.

Ved enkelte målinger ble det observert individuelt variable uttrykk av transkripsjonsfaktorer og cytokiner gjennom prøvetakingsperioden både i behandlede grupper injisert med TGF- $\beta$ -pTagRFP, T-bet-pTagRFP og GATA-3-pTagRFP og i kontrollgrupper injisert med pTagRFP (kontrollplasmid) og PBS. I de samme gruppene var standardfeil (SE) relativt store. Denne variasjonen skyldtes at enkeltfisk var utslagsgivende for genuttrykkene. Slike variasjoner ble derfor ikke ansett som viktige og er ikke omtalt i diskusjonen. QPCR-analyse av organer som ikke viste forhøyede verdier i verken pilot- eller hovedforsøk vil heller ikke bli omtalt, da fisk hvor prøvene ble tatt fra ikke ble ansett som påvirket av injeksjonen. Det er gjort få studier på plasmidindusert overekspresjon av transkripsjonsfaktorer og cytokiner, og det er vanskelig å forklare de varierende resultatene i hovedforsøket. Årsakene til at ekspresjonsresultatene mht. transgene protein ble ulik fra pilot til hovedforsøket er å anse som ukjente.

### 4.4.1 Uttrykk av TGF- $\beta$

I pilotforsøket ble det registrert signifikant forhøyede verdier av TGF- $\beta$  i muskel (Fig. 3.2). I hovedforsøket ble det derimot målt lave nivåer av TGF- $\beta$  (Fig. 3.10A og Fig. 3.22A). Målingene mht. TGF- $\beta$  uttrykk som ble gjort i de to smitteforsøkene (i hovedforsøket), var derimot sammenfallende. Som nevnt innledningsvis har Qin *et al.* (1994) vist i musemodell at overekspresjon av TGF- $\beta$  ved plasmidinjeksjon kan virke immundempende. De viste dette ved injeksjon av pDNA kodende for TGF- $\beta$  i en transplantat-modell hos mus. Uttrykket ble målt ved histologiske analyser og "overlevelse" av transplantatet, noe som tydet på at TGF- $\beta$  har nedregulert immunresponsen slik at implantatet ikke blir frastøtt (Qin *et al.*, 1994). Da forventet respons av TGF- $\beta$  i hovedforsøket uteble, kan vi ikke si noe ut fra våre resultater om effektene en overekspresjon av TGF- $\beta$  kan gi ved en eventuell infeksjon av hhv. ekstra- og intracellulære bakterier.

## Diskusjon

I pilotforsøket ble det registrert signifikant økning i uttrykket av TGF- $\beta$  i milt hos fisk injisert med TGF- $\beta$ -pTagRFP (Fig 3.2). I hovedforsøket ble det kun målt på uttrykk av IL-17A i milt, og det ble registrert økte verdier ved dag 19 og 20 etter injeksjon av TGF- $\beta$ -pTagRFP. Det er kjent at nivåene av IL-17A vil reguleres gjennom uttrykk av TGF- $\beta$  (Weaver *et al.*, 2007), og det er derfor nærliggende å tro at overekspresjon av TGF- $\beta$  kan føre til et økt uttrykk av IL-17A. Ut fra våre målinger kan vi ikke si for sikkert at økningen av IL-17A er mediert av TGF- $\beta$ . Dette på grunn av den manglende økningen av TGF- $\beta$  i muskel i hovedforsøket og fordi det ikke ble målt på uttrykket av IL-17A i pilotforsøket. I etterkant ser vi at uttrykket av TGF- $\beta$  i milt burde vært målt i hovedforsøket, da det høyeste uttrykket av TGF- $\beta$  i pilotforsøket ble målt ved dag 21, og det høyeste uttrykket av IL-17A ble målt ved dag 19 og 20 i hovedforsøket. Ved injeksjon av kontrollplasmid ble det ikke målt økning i uttrykket av IL-17A i milt, og målingene var derfor sammenfallende i hovedforsøket (Fig. 3.17A og 3.26A). Det er vist at injeksjon av CpG motifs (ikke plasmid DNA) inducerer ekspresjon av TGF- $\beta$  hos havkaruss (gilthead sea bream; *Sparus aurata*) relativt kort tid etter injeksjon. Om TGF- $\beta$  ekspresjon i dette studiet er et uttrykk for induksjon av den medfødte immunresponsen eller er kun et resultat fra injeksjon av TGF- $\beta$  kodende plasmid er usikkert (Cuesta *et al.* 2008). Levetiden for et plasmid injisert i muskel er relativt lang (Tonheim *et al.*, 2007), og det kan derfor tenkes at en tilstedeværelse av plasmid i muskel medfører at en medfødt respons kan være aktiv over lengre tid enn normalt. Dette gjelder også for øvrige vektorer som ble benyttet i dette arbeid.

### 4.4.2 Uttrykk av T-bet

I både pilot- og hovedforsøket ble det målt signifikant høyere verdier av T-bet i fisk injisert med T-bet-pTagRFP (Fig. 3.4, 3.12 og 3.23A). Nivåene var avtagende i prøvetakingsperioden. Trendene i forsøkene var sammenfallende før smitte. I dette studiet ble det ikke funnet en positiv korrelasjon mellom overekspresjon av T-bet og overlevelse ved infeksjon av hhv. ekstra- og intracellulære patogener.

Det økte uttrykket av T-bet i muskel så ikke ut til å påvirke uttrykket av T-bet i milt og hodenyre. Det så heller ikke ut til at økt uttrykk av T-bet i muskel induserte en økning av IFN- $\gamma$  mRNA i muskel, milt eller hodenyre. Dette fordi det kun ble registrert enkelte

økninger i IFN- $\gamma$  uttrykket, og funnene ble gjort både i behandlet- og kontrollfisk (Fig. 3.23B). Det gav derfor ikke noen entydig indikasjon på interaksjon mellom overekspressjon av T-bet og økning av IFN- $\gamma$ . Resultatene samsvarer med funn gjort av Usui *et al.* (2006) som indikerte at hovedfunksjonen til T-bet i utviklingen av T<sub>H</sub>1-celler ikke er å positivt regulere IFN- $\gamma$ , men å nedregulere uttrykket av GATA-3. Dette kan forklare de lave verdiene av IFN- $\gamma$ . Imidlertid viste nylige studier gjort av Hu *et al.* (2012) at overekspressjon av T-bet i mus som resultat av T-bet kodende plasmid gav økt produksjon av IFN- $\gamma$ . Det er kjent at plasmidinjeksjon med bruk av ordinære ikke-IFN- $\gamma$  kodende plasmidvektorer kan inducere økt produksjon av IFN- $\gamma$  - dermed en påfølgende T<sub>H</sub>1 profil (Tudor *et al.*, 2005). I hodenyre hos fisk injisert med kontrollplasmid, ble det målt stigende uttrykk av IFN- $\gamma$  fra dag 19, men uttrykket i kontroll (PBS) var varierende. Ved dag 28, altså 13 dager etter smitte med *P. salmonis*, var det signifikant forskjell mellom gruppene injisert med kontrollplasmid og kontroll med PBS med hensyn til uttrykk av IFN- $\gamma$  (Fig 3.26B). CpG inneholdende DNA og poly I:C har vist seg å påvirke ekspresjon av IFN- $\gamma$  i laks (Strandskog *et al.*, 2011), derfor er det nærliggende å tro at selve plasmidvektoren benyttet i dette studiet var med på å øke ekspresjon av IFN- $\gamma$  - og ikke bare påvirkningen T-bet ekspresjon hadde på IFN- $\gamma$  uttrykket. På den andre siden ble det vist at ekspresjon av T-bet og også GATA-3 ble nedregulert ved poly I:C stimulering av miltceller fra laks (Wang *et al.*, 2010).

### 4.4.3 Uttrykk av GATA-3

Det var generelt lave nivåer av GATA-3 hos kontrollfisk injisert med PBS. Uttrykket av GATA-3 i fisk injisert med GATA-3-pTagRFP var i pilotforsøket og hovedforsøket signifikant høyere enn i kontrollfisk (PBS). Ved smitte av *P. salmonis* ble det kun registrert signifikant økt uttrykk ved dag to. Trendene for GATA-3 er sammenfallende for pilot og hovedforsøk. Ved smitte av *P. salmonis* er det kun dag to som er sammenfallende med de andre forsøkene. Det finnes lite litteratur på hvordan overekspressjon av GATA-3 vil påvirke immunresponser og overlevelse av dyr i smitteforsøk. I dette studiet ble det ikke funnet noen positiv korrelasjon mellom overekspressjon av GATA-3 og redusert påvirkning av infeksjon verken ved *V. anguillarum* eller *P. salmonis*.

## Diskusjon

Det ble målt uttrykk av IL-4/13A i muskel, milt og hodenyre hos fisk injisert med GATA-3-pTagRFP og PBS smittet med *V. anguillarum*. På grunn av varierende uttrykk og høy SE i både kontroll (PBS) og behandlede fisk (GATA-3-pTagRFP) gjennom prøvetakingsperioden, ble det ikke betraktet som generelle forhøyede verdier. Unntaket er uttrykket av IL-4/13A i muskel fra fisk injisert med GATA-3-pTagRFP, da denne økningen var noe høyere enn kontrollfisk (PBS) (Fig. 3.14B). Ut fra disse resultatene kan man ikke se en sammenheng mellom overekspresjon av GATA-3 og uttrykk av IL-4/13A. Ved injeksjon av kontrollplasmid (pTagRFP) ble det kun registrert nevneverdig økning av IL-4/13A ved dag 20, fem dager etter smitte med *V. anguillarum* (Fig. 3.17B). Det er vist at poly I:C ikke induserer nevneverdig IL-4/13A ekspresjon i hodenyre leukocytter og i celler fra gjeller hos laks (Takizawa *et al.*, 2011), dette støtter argumentet at GATA-3-pTagRFP induerte økt ekspresjon av GATA-3 – og var ikke et resultat av selve responsen ekspresjonsvektoren gav.

### 4.4.4 Injeksjon med kontrollplasmid (pTagRFP) – medfødte immunresponser

Ved dag to ble det i smitte med *P. salmonis* målt signifikant høyere uttrykk av T-bet og GATA-3, samt sterk økning av TGF- $\beta$  i fisk injisert med kontrollplasmidet (pTagRFP), enn kontrollfisk injisert med PBS (Fig 3.25). Det ble ikke registrert samme økning i forsøk med *V. anguillarum* (Fig 3.16). Årsaken til det forskjellige uttrykket av TGF- $\beta$ , T-bet og GATA-3 i fisk injisert med kontrollplasmider ved de to smitteforsøkene er ukjent og vanskelig å forklare. Medfødte immunresponser inntreffer timer/dager etter at organismen oppdager fremmedstoffer (Abbas & Lichtman, 2006) og da de økte verdiene er detektert to dager etter injeksjon av pTagRFP er det nærliggende å tro at dette skyldes en medfødt immunrespons hos fisken. Det er kjent at CpG trigger det medfødte immunforsvaret ved aktivering av TLR (Medzhitov & Janeway, 2000). Tidligere studier har vist at injeksjon av CpG kan gi økt overlevelse mot virusinfeksjoner (Jørgensen *et al.*, 2003). Ut fra resultatene med kontrollplasmidet i smitten med *P. salmonis* kan det virke som at plasmidet i seg selv med sine CpG "motifs" kan ha gitt en ekstra effekt/økning av TGF- $\beta$ , T-bet og GATA-3 ved dag to målingene. Dette var tilfelle i både pilot- og hovedforsøket ved injeksjon av samtlige plasmider med unntak av TGF- $\beta$ -pTagRFP i hovedforsøket. Wang *et al.* (2010) foreslo at det økte uttrykket av T-bet og GATA-3 observert i kontrollfisk injisert med PBS ved infeksjon av Yersinose var stressrelatert.

Da vi ikke observert økte verdier i kontrollfisk injisert med PBS ser vi bort fra at dette kan være tilfelle i vårt forsøk, og relaterer de økte verdiene til selve plasmidiet eller plasmidets innsatte gener.

### 4.5 Histologiske analyser

De histologiske analysene bekreftet tilstedeværelse og uttrykk av RFP i muskel som resultat av injeksjon med TGF- $\beta$ -pTagRFP, T-bet-pTagRFP, GATA-3-pTagRFP og pTagRFP. Plasmidene inneholdt TagRFP som nedstrøms-reportergen, og gjennom tilstedeværelse av RFP i muskelcellenes cytoplasma (TGF- $\beta$  og T-bet) og kjerner (TGF- $\beta$ , T-bet, GATA-3 og pTagRFP) kunne en observere lys rød farge i fluorescensmikroskopet. Det ble ikke observert RFP i snitt fra vevsprøver fra kontrollfisk injisert med PBS. Tidligere studier av Heppel *et al.* (1998) viste at i.m injeksjon gir vevsskader opptil 14 dager etter injeksjon. Etter 28 dager kunne de ikke observere skader. Skadene ble relatert til selve injeksjonen da de ble observert ved injeksjon av både pDNA og saltvann. Resultatene fra våre studier hadde sammenfallende observasjoner ved histologiske analyser av injeksjonssted – med observasjonene gjort av Heppel *et al.* (1998). I studie utført av Tonheim *et al.* (2007) ble det påvist pDNA i blod, noe som kan indikere at sirkulasjonssystemet transporterer pDNA fra injeksjonssted til andre organer. I vårt studie ble det fokusert på uttrykk av RFP i muskelceller og vi kan derfor ikke si noe om tilstedeværelsen av pDNA i blod og andre organer ut fra de histologiske analysene som ble utført.

### 4.6 Plasmid DNA

Sannsynligvis vil en optimal dose av pDNA, for å kunne indusere transgen produksjon og immunrespons, variere med fiskeart og størrelse. Responsøkningen mellom mengde pDNA og fiskestørrelse vil ikke være proporsjonal (Heppell & Davis, 2000). Enkelte forskningsgrupper har vist at høye doser pDNA injisert i fisk vanligvis er assosiert med lavere aktivitet av reportergen, i tillegg til lavere uttrykk av det innsatte genet (Schulte *et al.*, 1998). Imidlertid er det også vist at høye doser kan gi lavere individuelle variasjoner (Heppell & Davis, 2000). Det er vanlig å bruke doser på mellom 1-50  $\mu$ g DNA

## Diskusjon

i 10-50 µl væske (vanligvis PBS/saltvann), og det er vist at enda lavere doser også kan være effektive (Heppell *et al.*, 1998). Det er rapportert at doser på 0,1 µg per fisk har gitt beskyttelse mot virusisolater (Lorenzen *et al.*, 1999). I dette studiet ble det benyttet ulike mengde pDNA (TGF-β-pTagRFP, T-bet-pTagRFP, GATA-3-pTagRFP og pTagRFP) ved i.m. injeksjon i pilot- og hovedforsøk. I pilotforsøket ble det injisert 70 µg pDNA i 50 µl PBS etter Tonheim *et al.* (2007). I hovedforsøket ble det benyttet 20 µg i 50 µl PBS. Dette tilsvarer dosering på hhv. 1.4 µg og 0.67 µg plasmid DNA per gram fisk.

Det ble registrert økt uttrykk av TGF-β i milt i pilotforsøket, mens det for T-bet og GATA-3 ikke ble målt nevneverdige forhøyede verdier i verken milt eller hodenyre. Dette indikerte at plasmidet kodende for TGF-β var tatt opp og ble uttrykt i milt – dersom da ikke en medfødt respons induiserte et distalt TGF-β uttrykk. Da Tonheim *et al.* (2008b) viste at intakte plasmid ble detektert i hodenyre og andre organer uten registrert ekspresjon av transgen (luciferase), kan man ikke si noe om hvorvidt pDNAet er tilstede i de andre organene selv om de ikke er uttrykt. I dette studiet ble genuttrykkene målt i muskel hos de ulike behandlingsgruppene og var synkende utover i prøvetakingsperioden, mens RFP ble detektert ved hjelp av fluorescensmikroskopisk analyse frem til 20 dager etter injeksjon. Tonheim *et al.* (2007) har vist at i.m. injiserte plasmider kan detekteres opp til 535 dager etter injeksjon. Kvantitative målinger på uttrykk av RFP ved for eksempel qPCR-analyser kunne gitt indikasjon på mengde plasmid tilstede i ulike organ. I et annet studie viste Romøren *et al.* (2004) ekspresjon av luciferase i milt etter i.m injeksjon av luciferase kodende plasmid. Alt i alt viser disse studiene at plasmid DNA kan bli tatt opp i sirkulasjonssystemet hos fisk etter parenteral injeksjon og bli transkribert til proteiner i andre vevstyper enn muskel.

### 4.7 Forsøksfisk

Teoretisk skulle pilotforsøket og hovedforsøket fra injeksjon av plasmider (dag 0) til smitte, gitt like resultater mht. uttrykk av gener. Da det ble observert forskjeller i qPCR-målingene av de ulike genene, er det nærliggende å tro at betingelsene forsøkene ble utført ved, kan ha hatt innvirkning på resultatene. Det ble benyttet standard laks generasjon 2010, à 50 gram i pilotstudiet, og standard laks generasjon 2011, à 30 gram i hovedforsøket. I tillegg ble det benyttet ulike fôr og temperaturer i forsøkene. Optimalt

## Diskusjon

sett burde betingelsene vært like, men det lot seg ikke gjøre. En annen forklaring på de ulike resultatene kan være at fisken befant seg i ulike stadier. Laksen som ble benyttet i pilotstudiet, var sølvfarget og uten tegn til parrmerker. I hovedforsøket hadde fisken klare parrmerker ved forsøksstart, og ved terminering var fisken sølvfarget og uten parrmerker. Det ble i tillegg observert forandringer i fiskens k-faktor (kondisjon-faktor) uten at disse parametrene ble målt. Det er tidligere vist at ytre forandringer i fiskens fysiologi, som tap av parrmerker til sølvfarging, kan være en indikator på at fisken gjennomgår smoltifisering (Folmar & Dickhoff, 1980), og det kan derfor tenkes at laksen som ble benyttet i hovedforsøket, kan ha påbegynt smoltifiseringsprosessen. Da det ikke ble målt på noen smoltifiseringsparametere kan vi ikke si dette sikkert. Et studie gjort av Maule *et al.* (1987) viste at stillehavslaks som gjennomgikk smoltifisering medierte en lavere medfødt immunrespons mot antigener fra *V. anguillarum*. Hvis fisken i dette studiet hadde startet smoltifisering, kan dette muligens forklare den akutte dødeligheten som oppstod i forsøket – samt det lavere genuttrykket.

Siden begge smitteforsøkene fikk uventet akutt dødelighet, ser vi i ettertid at helsestatusen til fisken under optimale betingelser burde vært sjekket før forsøksstart. Dette for å muligens kunne utelukke eventuell påvirkning av andre både infeksjøs- og ikke-infeksjøs faktorer. Fisken ble smittet i.p, og det ble dermed ikke gjort forsøk på å etterligne det forholdet mellom fisk og patogener som man finner i det naturlige miljø, og immunforsvaret fikk derfor ikke utspilt sin naturlige rolle. Dette kan ha hatt innvirkning på resultatene som er registrert. Konseptet med bruk av molekylær adjuvaner i vaksinevektorer kan være en vei å gå for å øke immunresponsen mot intracellulære patogener som enkelte bakterier og virus – hvor immunresponser ellers kan være suboptimale. Dette er lettest å få til dersom det er snakk om DNA vaksinerings. For øvrig kan slike overekspresjonsstudier med cytokiner eller andre viktige faktorer benyttes for å studere beskyttende immunitet – hvilke forvarsmekanismer er viktige for sykdomsbeskyttelse hos fisk. I så tilfellet må konseptet videreutvikles med velfungerende smittemodeller.



## 5. Konklusjon

- Rekombinant DNA teknologi med innsatte gener for TGF- $\beta$ , T-bet og GATA-3 i ekspresjonsvektorer resulterte i økt uttrykk av TGF- $\beta$ , T-bet og GATA-3 både *in vitro* og *in vivo*.
- Med få unntak ble ikke uttrykket av relaterte gener (IFN- $\gamma$ , IL-4/13A og IL-17A) påvirket etter injeksjon av ekspresjonsvektorene.
- Det ble ikke vist økt sykdomsbeskyttelse mot hhv. ekstra- og intracellulære patogener ved overekspresjon av T-bet og GATA-3. Det ble heller ikke vist at overekspresjon av TGF- $\beta$  gav lavere overlevelse i smitteforsøkene.

## 6. Referanser

- Abbas A. K. & Lichtman A. H. (2009) *Basic Immunology: Functions and disorder of the immune system*. Philadelphia: SAUNDERS, Elsevier
- Aune T. M., Collins P. L. & Chand S. (2009) Epigenetics and T helper 1 differentiation. *Immunology* **126** (3), 299-305
- Bird A. P. (1987) CpG islands as gene markers in the vertebrate nucleus. *Trends in Genetics* **3**, 342-347
- Birkbeck T. H., Rennie S., Hunter D., Laidler L. A. & Wadsworth S. (2004) Infectivity of a Scottish isolate of *Piscirickettsia salmonis* for Atlantic salmon *Salmo salar* and immune response of salmon to this agent. *Diseases of Aquatic Organisms* **60**, 97-103
- Bravo S. (1994) Piscirickettsiosis in freshwater. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists* **14**, 137-138
- Burch J. B. (2005) Regulation of GATA gene expression during vertebrate development. *Seminars in Cell & Developmental Biology* **16**, 71-81
- Carrington A. C. & Secombes C. J. (2006) A review of CpG and their relevance to aquaculture. *Veterinary Immunology and Immunopathology* **112**, 87-101
- Celada A. & Maki R. A. (1992) Transforming growth factor- $\beta$  enhances the m-CSF and GM-CSF stimulated proliferation of macrophages. *Journal of Immunology* **148**, 1102-1105
- Cerwenka A. & Swain S. L. (1999) TGF- $\beta$ 1: immunosuppressant and viability factor for T-lymphocytes. *Microbes and Infection* **1**, 1291-1296
- Chart H. & Trust T. J. (1984) Characterization of the surface antigens of the marine fish pathogens *Vibrio anguillarum* and *Vibrio Ordalii*. *Canadian Journal of Microbiology* **30**, 703-710
- Corbeil S. & Crane M. S. (2009) *Piscirickettsia salmonis*, [http://www.scahls.org.au/\\_data/assets/pdf\\_file/0005/1516514/Piscirickettsia\\_salmonis.pdf](http://www.scahls.org.au/_data/assets/pdf_file/0005/1516514/Piscirickettsia_salmonis.pdf)

## Referanser

- Corbeil S., Kurath G. & LaPatra S. E. (2000) Fish DNA vaccine against infectious hematopoietic necrosis virus: efficacy of various routes of immunisation. *Fish & Shellfish Immunology* **10**, 711-723
- Corebeil S., McColl K. A. & Crane M. St. J. (2003) Development of a TaqMan quantitative PCR assay for the identification of *Piscirickettsia salmonis*. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists* **23** (3), 95-101
- Costa A. A., Leefa J. M., Bridlea A. R., Carsonb J. & Nowaka B. F. Effect of vaccination against yersiniosis on the relativepercentsurvival, bactericidal and lysozyme response of Atlantic salmon, *Salmo salar*. *Aquaculture* **315** (3-4), 201-206
- Cuesta A., Salinas I., Esteban M. Á. & Meseguer J. (2008) Unmethylated CpG motifs mimicking bacterial DNA triggers the local and systemic innate immune parameters and expression of immune-relevant genes in gilthead seabream. *Fish & Shellfish Immunology* **25**, 617-624
- Daniels G. D. & Secombes C. J. (1999) Genomic organisation of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* TGF- $\beta$ . *Developmental & Comparative Immunology* **23**, 139-147
- Dannevig B. H., Lauve A., Press C. McL. & Landsverk T. (1994) Receptor-mediated endocytosis and phagocytosis by rainbow trout head kidney sinusoidal cells. *Fish & Shellfish Immunology* **4**, 3-18
- Dufour V. (2001) DNA vaccines: new applications for veterinary medicine <http://www.vetscite.org>
- Ellis A. E. (1998) Fish immune system. SOAFED Marine Laboratory Aberdeen, UK. Elsevier 920-926
- Evrogen, pTagRFP-N vectorcat.# FP142 (datablad) <http://www.evrogen.com/vector-descriptions/pTagRFP-N/pTagRFP-N.pdf>
- Ferretti S., Bonneau O., Dubois G. R., Jones C. E. & Trifilieff A. (2003) IL-17, produced by lymphocytes and neutrophils, is necessary for lipopolysaccharide-induced airway neutrophilia: IL-15 as a possible trigger. *Journal of Immunology* **170**, 2106-2112

## Referanser

- Folmar L. C. & Dickhoff W. W. (1980) The parr-smolt transformation (smoltification) and seawater adaption in salmonids, a review of selected literature. *Aquaculture* **21**, 1-37
- Fox A. H., Kowalski K., King G. F., Mackay J. P. & Crossley M. (1998) Key residues characteristic of GATA N-fingers are recognized by FOG. *Journal of Biological Chemistry* **273**, 33595-33603
- Fynan E. F., Webster R G., Fuller D. H., Haynes J. R., Santoro J. C. & Robinson H. L. (1993) DNA vaccines: Protective immunizations by parenteral, mucosal and gene-gun inoculations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA* **90**, 11478-11482
- Gildberg A. & Mikkelsen H. (1998) Effects of supplementing the feed to Atlantic cod (*Gadus morhua*) fry with lactic acid bacteria and immuno-stimulating peptides during a challenge trial with *Vibrio anguillarum*. *Aquaculture* **167** (1-2), 103-113
- Gorelik L., Constant S. & Flavell R. A. (2002) Mechanism of Transforming Growth Factor  $\beta$ -induced Inhibition of T Helper Type 1 Differentiation. *Journal of Experimental Medicine* **195**, 1499-1505
- Gorelik L., Fields P. E. & Flavell R. A. (2000) Cutting edge: TGF- $\beta$  inhibits TH type 2 development through inhibition of GATA-3 expression. *Journal of Immunology* **165**, 4773-4777
- Gram L., Melchiorson J., Spanggaard B., Huber I. & Nielsen T. F. (1999) Inhibition of *Vibrio anguillarum* by *Pseudomonas fluorescens* AH2, a Possible Probiotic Treatment of Fish. *Applied and Environmental Microbiology* **65**, 969-973
- Gratacap R. M. L. (2008) Characterization of *Vibrio anguillarum* for the development of vaccine in cod (*Gadus morhua*). *Institute of Aquacultur, University of Stirling, Stirling, Scotland*. Phd thesis
- Gurunathan S., Klinman M. & Seder R. A. (2000) DNA VACCINES: Immunology, Application and Optimization. *Annual Review of Immunology* **18**, 927-974
- Hansen J. D., Landis E. D. & Phillips R. B. (2005) Discovery of a unique Ig heavy-chain isotype (IgT) in rainbow trout: implications for a distinctive B cell developmental pathway in teleost fish. *Proceedings of the National Academy of Science of the United State of America* **102** (19), 6919-6924

## Referanser

- Happel K. I., Zheng M., Young E., Quinton L. J., Lockhaty E., *et al.* (2003) Cutting edge: roles of toll like receptor 4 and IL-23 in IL-17 expression in responses to *Klebsiella pneumoniae* infection. *Journal of Immunology* **170**, 4432-4436
- Hardie L. J., Lainga K. J., Danielsa G. D., Grabowskic P. S., Cunninghama C. & Secombes C. J. (1998) Isolation of the first piscine transforming growth factor  $\beta$  gene: analysis reveals tissue specific expression and a potential regulatory sequence in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Cytokine* **10** (8), 555-563
- Harris D. P., Goodrich S., Gerth A. J., Peng S. L. & Lund F. E. (2005) Regulation of IFN-gamma production by B effector 1 cell: essential roles for T-bet and the IFN-gamma receptor. *Journal of Immunology* **174**, 6781-6790
- Heath V. L., Murphy E. E., Crain C., Tomlinson M. G. & O'Garra A. (2000) TGF- $\beta$  down-regulates Th2 development and results in decreased IL-4-induced STAT6 activation and GATA-3 expression. *European Journal of Immunology* **30**, 2639-2649
- Heinzel F. P., Sadick M. D., Holaday B. J., Coffman R. L. & Locksley R. M. (1989) Reciprocal expression of interferon gamma or interleukin 4 during the resolution or progression of murine leishmaniasis. Evidence for expansion of distinct helper T cell subset. *Journal of Experimental Medicine* **169**, 59-72
- Heppell J. & Davis H. L. (2000) Application of DNA vaccine technology to aquaculture. *Advanced Drug Delivery Reviews* **43**, 29-43
- Heppell J., Lorenzen N., Armstrong N. K., Wu T., Lorenzen E., Einer-Jensen K., Schorr J. & Davis H. L. (1998) Development of DNA vaccines for fish: vector design, intramuscular injection and antigen expression using viral haemorrhagic septicaemia virus genes as model. *Fish & Shellfish Immunology* **8**, 271-286
- Ho I. C., Tai T. S. & Pai S. Y. (2009) GATA-3 and the T-cell lineage: essential functions before and after T-helper-2-differentiation. *Nature Reviews Immunology* **9**, 125-135
- Hu D., Wu J., Zhang R. & Chen L. (2012) T-bet acts as a powerful adjuvant in Ag85B DNA-based vaccination against tuberculosis. *Department of Medical Immunology, Medical School and Institute of Infection and Immunity, Anhui University of Science and Technology, Huainan, Anhui 232001, P.R. China* Doi: 10.3892/mmr.2012.883

## Referanser

<http://www.spandidos-publications.com/10.3892/mmr.2012.883>

Iwasaki A., Stiernholm B. J. N., Chan A. K., Berinstein N. L. & Barber B. H. (1997) Enhanced CTL Responses Mediated by Plasmid DNA Immunogens Encoding Costimulatory Molecules and Cytokines. *The Journal of Immunology* **158**, 4591-4601

Jørgensen J. B., Johansen L. H., Steiro K. & Johansen A. (2003) CpG DNA induces protective antiviral immune responses in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Journal of Virology* **77**, 11471-11479

Kaplan M. H., Schindler U., Smiley S. T. & Grusby M. J. (1996) Essential role of STAT 6 in IL-4 signalling. *Nature* **380**, 627-630

Kehrl J. H., Roberts A. B., Wakefield L. M., Jallowlew S., Sporn M. B. & Fauci S. (1986a) Transforming growth factor is an important immunomodulatory protein for human B-lymphocytes. *Journal of Immunology* **137**, 3855-3860

Kehrl J. H., Wakefield L. M., Roberts A. B., Jallowlew S., Alvarez-Mon M., Derynck R., Sporn M. B. & Fauci A. S. (1986b) Production of transforming growth factor  $\beta$  by human T lymphocytes and its potential role in the regulation of T cell growth. *Journal of Experimental Medicine* **163**, 1037-1050

Kjeken R., Bogen B. & Mathiesen I. (2006) DNA- fremtidens vaksine? *Tidsskrift for Den norske legeförening*

Kolls J. K. & Linden A. (2004) Interleukin-17 family members and inflammation. *Immunity* **21**, 467-76

Kumari J., Bøgwald J. & Dalmo R. A. (2009) Transcription factor GATA-3 in Atlantic salmon (*Salmo salar*): Molecular characterization, promoter activity and expression analysis. *Molecular Immunology* **46**, 3099-3107

Kuzyk M. A., Burian J., Machander D., Dolhaine D., Cameron S., Thornton J. C. & Kay W. W. (2001) An efficacious recombinant subunit vaccine against the salmonid rickettsial pathogen *Piscirickettsia salmonis*. *Vaccine* **19**, 2337-2344

Letnes O. (2006) Skreddersydd DNA-vaksine løser problemer. <http://www.forskning.no/artikler/2006/juni/1150718534.9>

## Referanser

- Letterio J. J. & Roberts A. B. (1998) Regulation of immune responses by TGF- $\beta$ . *Annual Review of Immunology* **16**, 137-161
- Liu M. A. (2003) DNA vaccines: a review. *Journal of Internal Medicine* **253**, 402-410
- Livak K. J. & Schmittgen T. D. (2001) Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta C_T}$  Method. *Methods* **25**, 402-408
- Lo D., Feng L., Carson M. J., Crowley M., Pauza M., Nguyen A. *et al.* (1999) Integrating innate and adaptive immunity in the whole animal. *Immunological Reviews* **169**, 225-239
- Lord G. M., Rao R. M., Choe H., Sullivan B. M., Lichtman A. H., Lusinskas F. W. & Glimcher L. H. (2005) T-bet is required for optimal proinflammatory CD4+ T-cell trafficking. *Blood* **106** (10), 3432-3439
- Lorenzen N., Lorenzen E., Einer-Jensen K., Heppell J. & Davies H. L. (1999) Genetic vaccination of rainbow trout against viral haemorrhagic septicemia virus: small amounts of plasmid DNA protect against a heterologous serotype. *Virus Research* **63**, 19-25
- Lorenzen N., Lorenzen E., Einer-Jensen K., Heppell J., Wu T. & Davies H. L. (1998) Protective immunity to VHS in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum) following DNA vaccination. *Fish & Shellfish Immunology* **8**, 261-270
- Lugo-Villarino G., Ito S., Klinman D. M. & Glimcher L. H. (2005) The adjuvant activity of CPG DNA requires T-bet expression in dendritic cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA* **102**, 13248-13253
- Madigan M. T. & Martinko J. M. (2006) *Brock Biology of microorganisms*. PEARSON Benjamin Cummings. Eleventh edition
- Mauel M. J., Ware C. & Smith P. A. (2008) Culture of *Piscirickettsia salmonis* on enriched blood agar. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* **20**, 213-214
- Maule A. G., Schreck C. B. & Kaattari S. L. (1987) Changes in the ImmunSystem of Coho Salmon (*Oncorhynchus kisutch*) during the Parr-to-Smolt Transformation and after Implantation of Cortisol. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* **44**, 161-166

## Referanser

- Mc Cartney-Francis N., Mizel D., Wong H., Wahl L. & Wahl S. (1990) TGF- $\beta$  regulates production of growth factors and TGF- $\beta$  human peripheral blood monocytes. *Growth Factors* **4**, 27-35
- MedicineNet (2003) <http://www.medterms.com/script/main/art.asp?articlekey=25194>
- Medzhitov R. & Janeway Jr C. (2000) The toll receptor family and microbial recognition. *Trends in Microbiology* **8**, 452-456
- Meseguer J., Lopez-Ruiz A. & Garcia -Ayala A. (1995) Reticulo-endothelial stroma of the head-kidney from the seawater teleost gilthead seabream (*Sparus aurata* L.): an ultrastructural and cytochemical study. *Anatomical Record* **241**, 303-309
- Mikalsen J., Skjærvik O., Wiik-Nielsen J., Wasmuth M. A. & Colquhoun D. J. (2008) Agar culture of *Piscirickettsia salmonis*, a serious pathogen of farmed salmonid and marine fish. *FEMS Microbiology Letters* **278**(1), 43-47
- Mikkelsen H., Lund V., Larsen R. & Seppola M. (2011) Vibriosis vaccines based on various sero-subgroups of *Vibrio anguillarum* O2 induce specific protection in Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) juveniles. *Fish & Shellfish Immunology* **30**, 330-339
- Murphy K. M. & Reiner S. L. (2002) The lineage decisions of helper T cells. *Nature Reviews Immunology* **2**, 933-944
- Myhr A. I.: "Bioteknologi og genteknologi" (Sist oppdatert: 13. mars 2009). De nasjonale forskningsetiske komiteer. <http://etikkom.no/no/FBIB/Temaer/Forskning-og-miljo/Bioteknologi-og-genteknologi/>
- Naiche L. A., Harrelson Z., Kelly R. G. & Papaioannou V. E. (2005) T-box genes in vertebrate development. *Annual Review of Genetics* **39**, 219-239
- Nerland A. H. & Sommerset I. (2004) Vaksineutvikling på gennivå i *Havbruksrapport 2004*. Havforskningsinstituttet, Intervet Norbio AS
- Olsen A. B. *et al.* (2011) Fiskehelsesrapporten 2011, *Veterinærinstituttet*, 20
- Pedersen K., Grisez L., van Houdt R., Tiainen T., Ollivier F. & Larsen J. L. (1999) Extended Serotyping Scheme for *Vibrio anguillarum* with Definition and Characterization of Seven Provisional O-Serogroups. *Current Microbiology* **38**, 183-189



## Referanser

Pfaffl M. W. (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research* **29** (9), 2002-2007

Poppe T. *et al.* (2002, 2. utgave) Fiskehelse og Fiskesykdommer. Del 2 Fiskens immunsystem, del 5 Bakteriesykdommer og del 11 forebyggende helsearbeid. Universitetsforlaget AS

Press C. McL., & Evensen Ø. (1999) The morphology of the immune system in teleost fishes. *Fish & Shellfish Immunology* **9**, 309-318

Prol M. J., Bruhn J. B., Pintado J. & Gram L. (2009) Real-time PCR detection and quantification of fish probiotic *Phaeobacter* strain 27-4 and fish pathogenic *Vibrio* in microalgae, rotifer, *Artemia* and first feeding turbot (*Psetta maxima*) larvae. *Journal of Applied Microbiology* **106** (4), 1292-1303

Qiagen.com, Special considerations for isolation of RNA from different sample sources [www.qiagen.com/litterature/render.aspx?id=23574](http://www.qiagen.com/litterature/render.aspx?id=23574)

Qin L., Chavin K. D., Ding Y., Woodward J. E., Favaro J. P., Lin J. & Bromberg J. S. (1994) Gene transfer for transplantation. Prolongation of allograft survival with transforming growth factor-beta 1. *Annals of Surgery* **220** (4), 508-519

Robinson H. L., Hunt L. A. & Webster R. G. (1993) Protection against a lethal influenza virus challenge by immunization with a haemagglutinin-expressing plasmid DNA. *Vaccine* **11**, 957-960

Robinson H. L. & Torres C. A. T. (1997) DNA vaccines. *Immunology* **9**, 271-283

Romøren K., Thu B. J. & Evensen Ø. (2004) Expression of luciferase in selected organs following delivery of naked and formulated DNA to rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) by different routes of administration. *Fish & Shellfish Immunology* **16**, 251-264

Sad S. & Mosmann T. R. (1994) Single IL-2-secreting precursor CD4 T-cell can develop into either Th1 or Th2 cytokine secretion phenotype. *Journal of Immunology* **153**, 3511-3522

## Referanser

- Schulte P. M., Powers D. A. & Scharl M. (1998) Efficient gene transfer into Xiphophorus muscle and melanoma by injection of supercoiled plasmid DNA. *Molecular Marine Biology and Biotechnology* **7** (4), 241-247
- Stark M. A., Huo Y., Burcin T. L., Morris M. A., Olson T. S. & Ley K. (2005) Phagocytosis of apoptotic neutrophils regulates granulopoiesis via IL-23 and IL-17. *Immunity* **22**, 285-94
- Strandskog G., Villoing S., Iliev D. B., Thim H. L., Christie K. E & Jørgensen J. B. (2011) Formulations combining CpG containing oligonucleotides and poly I:C enhance the magnitude of immune responses and protection against pancreas disease in Atlantic salmon. *Developmental & Comparative Immunology* **35** (11), 1116-1127
- Strobl H., Riedl E., Scheinecker C., Pickl W. F., Rappersberger K. & Majdic Oknapp W. (1996) TGF-beta1 promotes *in vitro* development of dendritic cells from CD34+ hemopoietic progenitors. *Journal of Immunology* **157**, 1499-1507
- Svendsen Y. S. & Bøggwald J. (1997) Influence of artificial wound and non-intact mucus layer on mortality of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) following a bath challenge with *Vibrio anguillarum* and *Aeromonas salmonicida*. *Fish & Shellfish Immunology* **7** (5), 317-325
- Szabo S. J., Kim S. T., Costa G. L., Zhang X., Fathman C. G. & Glimcher L. H. (2000) A novel transcription factor, T-bet, directs Th1 lineage commitment. *Cell* **100**, 655-669
- Szabo S. J., Sullivan B. M., Peng S. L. & Glimcher L. H. (2003) Molecular mechanisms regulating Th1 immune responses. *Annual Review of Immunology* **21**, 713-58
- Sørensen U. B. & Larsen J. L. (1986) Serotyping of *Vibrio anguillarum*. *Applied and Environmental Microbiology* **51** (3), 593-597
- Tafalla C., Coll J. & Secombes C. J. (2005) Expression of genes related to the early immune response in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) after viral haemorrhagic septicemia virus (VHSV) infection. *Developmental & Comparative Immunology* **29**, 615-626
- Takemoto N., Arai K. & Miyatake S. (2002) Cutting edge: the differential involvement of the N-finger of GATA-3 in chromatin remodeling and transactivation during Th2 development. *Journal of Immunology* **169**, 4103-4107

## Referanser

- Takizawa F., Koppang E. O., Ohtani M., Nakanishi T., Hashimoto K., Fischer U. & Dijkstra J. M. (2011) Constitutive high expression of interleukin-4/13A and GATA-3 in gill and skin of salmonid fishes suggests that these tissues form Th2-skewed immune environments. *Molecular Immunology* **48** (12-13), 1360-1368
- Takizawa F., Mizunaga Y., Araki K., Moritomo T., Orotake M. & Nakanishi T. (2008) GATA3 mRNA in ginbuna crucian carp (*Carassius auratus langsdorffii*): cDNA cloning, splice variants and expression analysis. *Developmental & Comparative Immunology* **32**, 898-907
- Tang D. C., De Vit M. & Jonston S. A. (1992) Genetic immunization is a simple method for eliciting an immune response. *Nature* **356**, 152-154
- Tonheim T. C., Bøgwald J. & Dalmo R. A. (2008a) What happens to the DNA vaccine in fish? A review of current knowledge. *Fish & Shellfish Immunology* **25** (1-2), 1-18
- Tonheim T. C., Dalmo R. A., Bøgwald J. & Seternes T. (2008b) Specific uptake of plasmid DNA without reporter gene expression in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) kidney after intramuscular administration. *Fish & Shellfish Immunology* **24**, 90-101
- Tonheim T. C., Leirvik J., Løvoll M., Myhr A. I., Bøgwald J. & Dalmo R. A., (2007) Detection of supercoiled plasmid DNA and luciferase expression in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) 535 days after injection. *Fish & Shellfish Immunology* **23**, 867-876
- Traxler G. S., Anderson E., LaPatra S. E., Richard J., Shewmaker B. & Kurath G. (1999) Naked DNA vaccination of Atlantic salmon *Salmo salar* against IHNV. *Diseases of Aquatic Organisms* **38**, 183-190
- Tudor D., Dubuquoy C., Gaboriau V., Lefèvre F., Charley B. & Riffault S. (2005) TLR9 pathway is involved in adjuvant effects of plasmid DNA-based vaccines. *Vaccine* **23**, 1258-1264
- Ulmer J. B., Donnelly J. J., Parker S. E., Rhodes G. H., Felgner P. L., Dwarki V. J., Gromkowski S. H., Deck R. R., De Witt D. M., Friedman A., Hawe L. A., Leander K. R., Martinez D., Perry H. C., Shiver J.W., Montgomery D. C. & Liu M. A. (1993) Heterologous protection against influenza by injection of DNA encoding a viral protein. *Science* **259**, 1745-1749

## Referanser

- Usui T., Preiss J. C., Kanno Y., Yao Z. J., Bream J. H., O'Shea J. J. & Strober W. (2006) T-bet regulates Th1 responses through essential effects on GATA-3 function rather than on IFNG gene acetylation and transcription. *The Journal of Experimental Medicine* **203** (3), 755-766
- Wang T., Holland J. W., Martin S. A. M. & Secombes C. J. (2010) Sequence and expression analysis of two T helper master transcription factors, T-bet and GATA3, in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* and analysis of their expression during bacterial and parasitic infection. *Fish & Shellfish Immunology* **29**, 705-715
- Weaver C. T., Harrington L. E., Mangan P. R., Gavrieli M. & Murphy K. M. (2006) Th17: an effector CD4 T cell lineage with regulatory T cell ties. *Immunity* **24**, 677-688
- Weaver C. T., Hatton R. D., Mangan P. R. & Harrington L. E. (2007) IL-17 family cytokines and the expanding diversity of effector T cell lineages. *Annual Review of Immunology* **25**, 821-852
- Wolff J. A., Malone R. W., Williams P., Chong W., Acsadi G., Jani A. & Felgner P. L. (1990) Direct gene transfer into mouse muscle *in vivo*. *Science* **247**, 1465-1468
- Yang M. & Zhou H. (2008) Grass carp transforming growth factor- $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1): Molecular cloning, tissue distribution and immunobiological activity in teleost peripheral blood lymphocytes. *Molecular Immunology* **45**, 1792-1798
- Zhang D. H., Cohn L., Ray P., Bottomly K. & Ray A. (1997) Transcription factor GATA-3 is differentially expressed in murine Th1 and Th2 cells and controls Th2-specific expression of the interleukin-5 gene. *Journal of Biological Chemistry* **272**, 21579-21603
- Zhang Z., Chi H., Niu C., Børgwald J. & Dalmo R. A. Cloning, characterization and expression analysis of T-bet, the master transcription factor of Th1 cells, in Atlantic salmon (*Salmo salar*). Upublisert data
- Zheng W. & Flavell R. A. (1997) The transcription factor GATA-3 is necessary and sufficient for Th2 cytokine gene expression in CD4 T cells. *Cell* **89**, 587-596

## 7. Appendiks

### Appendiks 1: Gensekvenser

#### Salmon TGF-beta CDS

ATGAGGGCAGAATGTTTGACGCTGGTTGTCTTATTGGCGCTGGAATATATGTGTCCGAGT  
 GAAGCCATGTCCACCTGTAAGTCACTGGACTTGGAGCTGATGAAGAGAAAACGCATTGAG  
 GCCATCCGTGGACAGATACTGAGCAAGCTGCGGCTGCCAAGGAGCCAGAGATTGACCAG  
 GAGGGAGACTTCGAGAAAAGTCCCAACCTCCCTGATATCCATCTACAACAGCACAGTGGAG  
 CTGAGTGAGGAGCAGGTGCACACATGCATACCACCCACTCAGGATACAGAAGAGGAAGCA  
 TACTTTGCAAAGGAGGTCCACAAGTTCAACATGAAACAAAAGTGAGAACAACATTAAGCAC  
 CAAATGCTCTTCAACATGTCTGAGATGCGGTCTGTATTAGGGACAGATCGACTGCTCTCT  
 CAAGCTGAGCTCCGTCTCCTCATCAAAAATCGTGGCATGCAGGACAGCAGCGAGCAGAGG  
 CTGGAACTCTACAGAGGCGTTGGAGATAAGGCACGTTACATGAAGTCCCATTTTATCTCA  
 AAGGAATGGGCCAATCGCTGGATCTCCTTTGATGTTACACAGACTCTGAGGGAGTGGCTG  
 CAAGGGGCTGAAAGGAGCAAGGATCCAATTGAAGTGCCTTGTGATTGTGGGAAAACA  
 ATGGAAGAATTCGCTTTGAAATAGCAGGGATGAACAAGCCAGGGGAGATAAAGAAACT  
 CTCTCATGAACATGCCAAAGCCTCACATTTTACTGATGTCACCTCCTGTGGAACGCCAC  
 AGCCAGCTTAGCTCTCGGAAGAAACGACAAAACCACTACTGAAGAGATCTGCTCAGACAAA  
 TCGGAGAGTTGCTGTGTGCGAAAAGCTTTACATTGACTTCCGTAAGGACCTGGGCTGAAAA  
 TGGATCCATGAACCCACTGGCTACTTTGCTAACTACTGCATGGGCCCCCTGCACCTATATA  
 TGGAACACAGAGAACAAGTACTCCAGGTAAGTGGCTCTGTATAAGCACCACAATCCTGGA  
 GCCTCTGCCAACCTTGCTGTGTCCACAGGCTTGGAGCCCCTACCCATTCTCTACTAT  
 GTGGGTAGACAACAAGGTGGAGCAGTTGTCCAATATGATTGTTAAGTCCCTGCAAGTGT  
 AGCTAG

#### Salmon GATA3 CDS

ATGGAAGTATCCGCCGACCAACCCCGATGGATGAGCCATCACCACCCATCGGTGCTAAAC  
 GAACAGCATCCCGGCTCGCACCACCCGGGCTCGGCCACTCGTACATGGACCCCTCGCAG  
 TATCCCCTCGCCGACGATGTGGATGTACTGTTAATATCGACTCACAGGGCAACCACGTA  
 TCTCCATACTATGGGAAGTCAAGTCCGAGCCGTCAGAGGTATCCACCTCCTCCACATAGT  
 AGTCAGGTGTGTGCCCCCTCTACTGCACGGCTCTTGCCGTGGCTGGACGGAAGCAAA  
 GCGATGCAGCACCACAGCACTTCCCCGTGGAACCTGAGTCCTTTCCAGAAGAGCTCACTG  
 CACCACGGTTCCCCGGCAGGTCTCTGTCTACCCTTCGGCGTCTCCTCCTCCTGTCT  
 GGGGGCCACTCAAGCCCGCACCTTTCACCTTTCCCCCCTCCTCCGAAAGACGTGTCC  
 CCAGACCCAGGCATCTCCACTCCGGGCTCAAGCAGCAACAGTCGCCAACAGGAGGAGAAA  
 GAGTGCATAAAGTACCAGGTGTCCCTGGCCGAGAGCATGAAACTGGAGTCTCACAGCCGG  
 AGCATGGCATCAATCGGAGCGCAATCCTCCGCCACCATCATCACCCATCGCCACATAC  
 CCATCCTATGTCCCCGAATACGGCCCAGGCTTCTCCACCAAGTAGCCTGATAGGTGGG  
 TCATCTTCTAGTTATGGTTCCAAAACAAGACCAAAAAACAAGGTCATGTTGAGAAGGTAGA  
 GAGTGCCTTAACTGTGGAGCTACGTGACCCCGCTCTGGAGGGCGGGATGGCACGGGTAC  
 TATTTGTGTAACGCCTGCGGACTCTATCACAAGATGAACGGGCAGAATCGGCCCTCATC  
 AAACCAAGCGCAGACTGTCTGCAGCAAGACGGGCAGGAACATCATGTGCAAAGTGTCAA  
 ACGAGCAGCAACACTGTGGCGAAGAAAACGCCAACGGGGACCCCGTGTGTAACGCTTGC  
 GGTCTATACTACAACTGCACAATATCAACCGACTCTCACCATGAAGAAGGAGGGCATT  
 CAGACCAGGAACAGGAAGATGTCCAGCAAGTCGAAGAAGAGCAAAAAGTCCCACGACAGC  
 ATGGACGACTTCTCAAAGAGCCTGATGGAGAAGAGCAGCTCGTTAGCCCCGCGCTCTG  
 TCCCGCCACATGTCTCCTTCCCCCCTTCTCACACTCCGGCCACATGCTGTCCACCCCC  
 ACGCCCATGCACCCCTCCTTTCGCGCCTCACCCCACTCCAGTATGGTCTCTGCCATG  
 GGCTAG

## Appendiks

### Salmon T-bet CDS

ATGGGCGGCATAGGTGGCAATCTTTACCTCAGTATGTTGAATGGGACTGATACGCAA  
ACTTTCGGAAAAGACACCGATATCAACAATCACCTTCAACGCAGAAAGAATTCCGTGGATTTT  
AAAATGGGAATTCAGGACACCAGATTATATCACCAAGACTCAATTCAAAACGGACAGGAC  
GGATCGGCACTGCCGTACCACGCAGACCAAACCTGTGGCTGGATACGGAGCGCAACCCGGG  
AGGTTTTACTCACCAACTCCCCACAATAGCTGCCATTTTCAGCAGTGTCCGGTCGCCGACT  
AGAAACGGAACGGGACAGACTTATTTACCAACGGGAAGCGAAGTTTTCTCGACAACCTAGC  
AAAGAAGTTTACCCTGCCTCTGCGGAGAGTTATCCCGCACCCGTTCAACATGGGTACTAT  
CGCGCGCCACTCTACCCGTTACCTGGGCTACAGGTGTGCGGGAAGACGCAGGCTCTCCTC  
AACAACCTATCCTCTGTGGGCGAAGTTCCACAAATATCAAACCGAAATGATCATAACGAAA  
CAGGGGCGGAGGATGTTCCCCTTCTGAGTTTTCAACATCAGCGTTCTGGACCCGTCAGCC  
CACTACAATGTGTATGTGGACGTGGTCTATCCGACCAGCACCCTGGAGGTACCAGGGA  
GGCAAGTGGGTCCAGTGTGGCAAAGCAGAGGGTAACATGCCAGGGAACAGGAGGTATATG  
CACCCAGACTCCCCAACACAGGGGCTCACTGGATGAGGCAGGAGGTGTCTTTGGCAAG  
CTCAAGCTCACCAACAACAAGGGCAGCGCAACAACGTGGGGCAGATGATCGTTCTGCAG  
TCGCTTCATAAGTACCAGCCACGGCTGCACATCATCGAAGTGAAGGAGGATGGTTCTGAG  
GACCTCTCCTCACCGCCAAGGCCAGACCTTCGTCTTCCCAGAGACCCAATTCATAGCC  
GTCACAGCCTATCAGAACGCAGACATCACCCAGCTGAAAATAGACCATAACCCCTTTGCT  
AAAGTTTTCCGGGACAATTATGACGCGCTGTACGCACCGCCTGACTCGGACCGTGTACC  
CCCTCTCCACCGAGGGCCAGCAGCTTTTGGCAGGTACCTGCTATACCCAGGGGTACCTG  
ATGGACCAGTACATGAACCTCTGCCCCAGAACCCTTCTACAGCCGGGAGCACATGGCA  
GCCATGGGCCATCAGACCAAAGACCCCTCAGCCAGCCCCACAGCCGCTGGTACCTCTCC  
CCCCAGCAAAGTGTACCTCAACCGGCTGGACTTCAACTCCTATGAGGGTGACTTCTCC  
AGCAACAGCTTCTACAAGCCCTTCCCCCTGCAGACATCGGGCCACCACACGCTGAGCTAT  
TATGAGGACAGCCCGTTTCGCCACGGCCAGCGGATCCGTCTCAGGAGCCTCCTCGGCAGCC  
TGGAGCACCGGCCGGCCCTCCCCCTCAGTACCTCAACCATCCCTGTCCCAGTAAAGTCGGC  
CCCAGTCTAGGCTGGTTCAGGCCGTGTCTCTACCTCTCCAGGTCACCCCAGGCTCCAC  
CCCCGTCCTCCTGGAGCCACTCCGCCCCCACCATCGCTGCAGGACAAGCCCAAGGAG  
GCGGGGTGGGGGAGAGGACCCCTGGCTGGAACCCCTCGGTCAAATCGGTGGACTCT  
GCTGACTCCGGCTGTTTGGAGGGCGGGCAGAGGGCAAGAAGCGGCGAGTGTACCCCTAC  
GCTTCCAGCACGGAGAACTCGCCGCCNCCCGCAGCGTGGAGGTCTGTGAAAAGGACTGC  
GGTAGTGATGCCGGCTACTACGGCTTTTATTCCCACTGA

### p-TagRFP-N

TAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGGTCATTAGTTTCATAGCCATATATGGAGTTCGGCGTTACATAACTTAC  
GGTAAATGGCCCGCCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCGCCATTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTA  
ACGCCAATAGGGACTTTCATTGACGTCAATGGGTGGAGTATTTACGGTAAACTGCCCACTTGGCAGTACATCAA  
GTGTATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCGCCTGGCATTATGCCCAGTACA  
TGACCTTATGGGACTTTCCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGGTGATGCGGTTTT  
GGCAGTACATCAATGGGCGTGGATAGCGGTTTACTCACGGGGATTTCCAAGTCTCCACCCCATTTGACGTCAATG  
GGAGTTTGTGGCACAAAATCAACGGGACTTTCAAAATGTGTAACAACCTCCGCCCCATTGACGCAAAATGG  
GCGGTAGGCGTGTACGGTGGGAGGTCTATATAAGCAGAGCTGGTTTGTAGTGAACCGTCAGATCCGCTAGCGCTACC  
GGACTCAGATCTCGAGCTCAAGCTTCAATTCTGCAGTCGACGGTACCGCGGGCCCGGGATCCACCGGTCCGCCACC  
ATGGTGTCTAAGGGCGAGAGCTGATTAAGGAGAACATGCACATGAAGCTGTACATGGAGGGCACCGTGAACAACC  
ACCACTTCAAGTGCACATCCGAGGGCGAAGGCAAGCCCTACGAGGGCACCCAGACCATGAGAATCAAGGTGGTGC  
AGGGCGGCCCTCTCCCCCTCGCCTTCGACATCCTGGCTACCAGCTTCATGTACGGCAGCAGAACCTTCATCAACCA  
CACCCAGGGCATCCCCGACTTCTTTAAGCAGTCTTCCCTGAGGGCTTCACATGGGAGAGAGTACCACATACGAA  
GACGGGGCGTGTGACCGCTACCCAGGACACCAGCCTCAGGACGGCTGCCTCATCTACAACGTCAAGATCAGAG  
GGGTGAACCTCCCATCAACGGCCCTGTGATGCAGAAGAAAACACTCGGCTGGGAGGCCAACCCGAGATGCTGT  
ACCCCGCTGACGGCGCCCTGGAAGGCAGAAGCGACATGGCCCTGAAGCTCGTGGGCGGGGGCCACCTGATCTGCAA  
CTTCAAGACCACATACAGATCCAAGAAACCCGCTAAGAACCTCAAGATGCCCGGCGTCTACTATGTGGACCACG  
ACTGAAAGAATCAAGGAGCCGACAAAGAGACTACGTCGAGCAGCAGGAGGTGGCTGTGGCCAGATACCGCA  
CTCCCTAGCAAACCTGGGGCACAAACTTAATTGAGCGGCCGACTCTAGATCATAATCAGCCATACCACATTTGT  
AGAGTTTTTACTTGCTTTAAAAAACCTCCACACCTCCCCCTGAACCTGAAACATAAAAATGAATGCAATTGTTGT  
TGTTAACTTGTTTATTGCAGCTTATAATGGTTACAAATAAAGCAATAGCATCACAATTTTACAATAAAGCATT  
TTTTTACTGCATTCTAGTTGTGGTTTTGTCCAAACTCATCAATGTATCTTAAAGCGTAAATTTGTAAGCGTTAATA  
TTTTGTTAAAATTCGCGTTAAATTTTTGTTAAATCAGCTCATTTTTTTAACCAATAGCCGAAATCGGCAAAATCC

## Appendiks

CTTATAAATCAAAGAATAGACCGAGATAGGGTTGAGTGTGTTCCAGTTTGAACAAGAGTCCACTATTAAGA  
ACGTGGACTCCAACGTCAAAGGGCGAAAAACCGTCTATCAGGGCGATGGCCACTACGTGAACCATCACCTAAT  
CAAGTTTTTTGGGGTCGAGGTGCCGTAAAGCACTAAATCGGAACCCTAAAGGGAGCCCCGATTTAGAGCTTGAC  
GGGAAAGCCGGCGAACGTGGCGAGAAAGGAAGGAAGAAAGCGAAAGGAGCGGGCGCTAGGGCGCTGGCAAGT  
GTAGCGGTACGCTGCGCGTAACCACCACACCCGCCGCTTAATGCGCCGCTACAGGGCGGCTCAGGTGGCACTT  
TTCGGGGAAATGTGCGCGGAACCCCTATTTGTTTATTTTTCTAAATACATTCAAATATGTATCCGCTCATGAGAC  
AATAACCTGATAAATGCTTCAATAATATTGAAAAAGGAAGAGTCCTGAGGCGAAAGAACCAGCTGTGGAATG  
TGTGTCAGTTAGGGTGTGGAAAGTCCCCAGGCTCCCCAGCAGGCAGAAGTATGCAAAGCATGCATCTCAATTAGT  
CAGCAACCAGGTGTGGAAAGTCCCCAGGCTCCCCAGCAGGCAGAAGTATGCAAAGCATGCATCTCAATTAGTCAG  
CAACCATAGTCCCGCCCCTAACTCCGCCCATCCCGCCCCTAACTCCGCCCAGTTCCGCCCATTTCCGCCCCATGGC  
TGACTAATTTTTTTTATTTATGCAGAGGGCCGAGGCCGCTCGGCCTCTGAGCTATTCAGAAGTAGTGAGGAGGC  
TTTTTTGGAGGCCTAGGCTTTTGCAAAGATCGATCAAGAGACAGGATGAGGATCGTTTCGCATGATTGAACAAGA  
TGGATTGCACGCAGGTTCTCCGGCCGCTTGGGTGGAGAGGCTATTCGGCTATGACTGGGCACAACAGACAATCGG  
CTGCTCTGATGCCGCCGTGTTCCGGCTGTCAGCGCAGGGCGCCCGTTCTTTTTGTCAAGACCGACCTGTCCGGT  
GCCCTGAATGAACTGCAAGACGAGGCAGCGCGCTATCGTGGCTGGCCACGACGGGCGTTCCTTGCGCAGCTGTGC  
TCGACGTTGTCACTGAAGCGGAAGGGACTGGCTGCTATTGGGCGAAGTGCCGGGGCAGGATCTCCTGTATCTC  
ACCTTGCTCCTGCCGAGAAAGTATCCATCATGGCTGATGCAATGCGGCGGCTGCATACGCTTGATCCGGCTACCTG  
CCCATTCCGACCACCAAGCGAAACATCGCATCGAGCGAGCACGTAICTGGATGGAAGCCGGTCTTGTGATCAGGA  
TGATCTGGACGAAGAGCATCAGGGGCTCGCGCCAGCCGAATGTTCCGCCAGGCTCAAGGCGAGCATGCCCGACGGC  
GAGGATCTCGTCTGACCCATGGCGATGCCCTGCTTCCCGAATATCATGGTGGAAAATGGCCGCTTTTCTGGATTC  
ATCGACTGTGGCCGGCTGGGTGTGGCGGACCGCTATCAGGACATAGCGTTGGCTACCCGTGATATTGCTGAAGAG  
CTTGGCGGCGAATGGGCTGACCGCTTCCCTCGTGTCTTACGGTATCGCCGCTCCCGATTCCGACGCGCATCGCTCT  
ATCGCTTCTTGACGAGTTCTTCTGAGCGGGACTCTGGGGTTCGAAATGACCGACCAAGCAGCCCAACCTGCCA  
TCACGAGATTTGATTCCACCGCCGCTTCTATGAAAGTTGGGCTTCGGAATCGTTTTCCGGGACCGCGGCTGGA  
TGATCCTCCAGCGGGGATCTCATGCTGGAGTTCTTCGCCACCCTAGGGGGAGGCTAACTGAAACACGGAAGG  
AGACAATACCGGAAGGAACCCGCGCTATGACGGCAATAAAAAGACAGAATAAAACGCACGGTGTGGGTGTTTTG  
TTCATAAACGCGGGGTTCCGTCCCAGGGCTGGCACTCTGTGATACCCACCAGACCCCATTTGGGGCCAATACGC  
CCGCGTTTTCTTCTTTTCCCCACCCCAACCCCAAGTTCCGGGTGAAGGCCAGGGCTCGCAGCCAACGTCGGGGCG  
GCAGGCCCTGCCATAGCCTCAGGTTACTCATATATACTTTAGATTGATTTAAAACTTCATTTTTAATTTAAAAAGG  
ATCTAGGTGAAGATCCTTTTTGATAATCTCATGACCAAAAATCCCTTAACGTGAGTTTTCGTTCCACTGAGCGTCA  
GACCCCGTAGAAAAGATCAAAGGATCTTCTTGAGATCCTTTTTTTCTGCGCGTAATCTGCTGCTTGCAAAACAAA  
AAACCACCGCTACCAGCGGTGGTTTTGTTTCCGGATCAAGAGCTACCAACTCTTTTTCCGAAGGTAAGTGGCTTCA  
GCAGAGCGCAGATAACAAATACTGTCCTTCTAGTGTAGCCGTAGTTAGGCCACCACTTCAAGAACTCTGTAGCACC  
GCCTACATACCTCGCTCTGCTAATCCTGTTACCAGTGGCTGCTGCCAGTGGCGATAAGTCGTGTCTTACCGGGTTG  
GACTCAAGACGATAGTTACCGGATAAGGCGCAGCGGTCCGGCTGAACGGGGGGTTCGTGCACACAGCCAGCTTG  
GAGCGAACGACCTACACCGAACTGAGATACCTACAGCGTGAGCTATGAGAAAAGCGCCACGCTTCCCGAAGGGAGA  
AAGGCGGACAGGTATCCGGTAAGCGGCAGGGTCCGGAACAGGAGAGCGCACGAGGGAGCTTCCAGGGGGAAACGCC  
TGGTATCTTTATAGTCTGTCCGGTTTTCCGCACCTCTGACTTGAGCGTCGATTTTTGTGATGCTCGTCAGGGGGC  
GGAGCCTATGAAAAACGCCAGCAACGCGGCTTTTTACGGTTCCTGGCCTTTTGTGCTGCTTGTGCTCACATGTT  
CTTCTGCGTTATCCCTGATTCTGTGGATAACCGTATTACCGCCATGCAT

## Appendiks 2: Løsninger

**Tabell 7.1. Agarosegel.**

	1 % agarose gel
Agarose for routine	1 g
TAE	100 ml
Etidium Bromide	6 $\mu$ l

**Tabell 7.2. DNA-ladder.**

	1 kb
TE Buffer (pH 7,5)	80 $\mu$ l
DNA ladder (invitrogen)	10 $\mu$ l
Loading dye 5x	5 $\mu$ l

**Tabell 7.3. CHAB-plater.**

L-Cysteine	1.0 g
D+ Glucose	10.0 g
Hemoglobinløsning 2%	100 ml
Bacto Heart infusion Brot	25.0 g
Blod (humant)	50 ml
Destillert vann	840 ml
Agarose for routine use	15.0 g

**Tabell 7.4. Dyrkningsmedium for *V. anguillarum*.**

Marine Broth 2216 (Difco)	37,4 g
Destillert vann	1 liter

**Tabell 7.5. Restriksjonsenzymmix.**

	1x
H <sub>2</sub> O	8 $\mu$ l
Buffer 4	2 $\mu$ l
Plasmid	8 $\mu$ l (2,5 $\mu$ l plasmid +5,5 $\mu$ l milliQ-vann)
Endoenzyme	
1. SacII	1 $\mu$ l
2. XhoI	1 $\mu$ l
Totalt volum	20 $\mu$ l

Inkubering:

37 °C/ 2 t → 65 °C/ 20 min → over natt på 4 °C



## Appendiks

**Tabell 7.6. Ligeringsmix.**

	1x
dH <sub>2</sub> O	6,5 µl
PCR-produkt	1,5 µl
pTagRFP-N vektor	0,5 µl
Buffer	1 µl
T <sub>4</sub> ligation enzym	0,5 µl
Totalt volum	10 µl

Inkubering:  
30 min RT

**Tabell 7.7. Revers transkripsjonsmix.**

	1x
gDNA wipeout Buffer 7x	2 µl
Templat RNA	1000/resultat fra nanodråpe ng/ µl
RNase fritt vann	12 µl – templat RNA
Totalt volum	14 µl

Inkuber:  
42 °C/ 2 min

**Tabell 7.8. cDNA syntesemix.**

	1x
Genomic DNA	14 µl
Quantiscript Reverse Transcriptase	1 µl
Quantiscript RT Buffer, 5x	4 µl
RT Primer mix	1 µl
Totalt volum	20 µl

Inkubering:  
42 °C/15 min → 95 °C/ 3 min

**Tabell 7.9. Real-Time PCRmix.**

	1x
Fast SYBR Green master mix	10 µl
Primer forward	1 µl
Primer reverse	1 µl
Templat	5 µl
RNase fritt vann	3 µl
Totalt volum	20 µl

## Appendiks

**Tabell 7.10. HiFi PCRmix.**

	1x
H <sub>2</sub> O (milliQ)	15,1 µl
Buffer	2 µl
dNTP	0,5 µl
MgSO <sub>4</sub>	0,8 µl
Enzym (PlatiumTAG HiFi)	0,1 µl
Primer 1	0,5 µl
1.1 ssgata3Xholcdsfw	
1.2 ssTGFXholcdsfw	
1.3 sst-betXholcdsfw	
Primer 2	0,5 µl
2.1 ssgata3Sacllrfprv	
2.2 ssTGFSacllrfprv	
2.3 sst-betSacllrfprv	
Templat	0,5 µl
Totaltvolum	20 µl

PCR syklus:

94 °C/ 4 min → 94 °C/ 30 sek → 68 °C/ 30 sek → 68 °C/ 3 min → 68 °C/ 10 min → 4

└──┘

35 sykluser

**Tabell 7.11. Standard PCRmix.**

	1x
H <sub>2</sub> O	8,2 µl
10x buffer for DyNAzyme EXT	1 µl
dNTP	0,2 µl
DyNAzyme EXT DNA polymerase	0,1 µl
Templat	
Primer 1	0,25 µl
1.1 ssgata3Sacllrfprv	
1.2 ssTGFSacllcdsrfrv	
1.3 sst-betSacllrfprv	
Primer 2	0,25 µl
2.1 ptagRFP-N-fw	
Totalt volum	10 µl

PCR syklus:

94 °C/ 2 min → 94 °C/ 30 sek → 68 °C/ 30 sek → 72 °C/ 3 min → 72 °C/ 7 min → 4 °C

└──┘


38 sykluser

Tabell 7.12. Sekvenserings PCRmix.

	1x
H <sub>2</sub> O	13 µl
BigDye-Buffer	3 µl
BigDye	2 µl
Templat (plasmid)	1 µl (200ng/ µl)
Primer FW/RV	1 µl
Totalt volum	20 µl

PCR syklus:

96°C/ 1 min → 96°C/ 10 sek → 50°C/ 5 sek → 60°C/ 4 min → 4°C



25 sykluser

**Appendiks 3: Gjennomsnittlige Ct-verdier**

**Tabell 7.10: Gjennomsnittlige Ct-verdier for muskel, milt og hodenyre i pilotforsøk.**

Uttak (dager etter plasmidinjeksjon):	Behandling:	Primer:	Gjennomsnittlig Ct-verdi (muskel, milt, hodenyre)		
3	TGF- $\beta$	TGF- $\beta$	24,64	26,17	26,43
7	TGF- $\beta$	TGF- $\beta$	26,93	26,05	25,91
14	TGF- $\beta$	TGF- $\beta$	28,05	26,49	27,35
21	TGF- $\beta$	TGF- $\beta$	27,87	27,65	26,89
28	TGF- $\beta$	TGF- $\beta$	28,29	27,74	26,59
3	PBS	TGF- $\beta$	31,50	27,04	26,23
7	PBS	TGF- $\beta$	30,48	27,22	24,86
14	PBS	TGF- $\beta$	30,78	27,61	26,62
21	PBS	TGF- $\beta$	30,50	28,06	26,83
28	PBS	TGF- $\beta$	32,04	27,34	26,85
3	T-bet	T-bet	24,98	26,78	27,04
7	T-bet	T-bet	23,00	26,49	25,99
14	T-bet	T-bet	25,38	26,50	27,78
21	T-bet	T-bet	25,80	27,38	27,38
28	T-bet	T-bet	24,64	29,45	26,00
3	PBS	T-bet	31,30	24,85	26,56
7	PBS	T-bet	31,15	25,85	22,94
14	PBS	T-bet	30,91	27,33	26,84
21	PBS	T-bet	29,94	27,35	26,72
28	PBS	T-bet	30,75	26,65	27,01
3	GATA-3	GATA-3	26,50	27,09	26,90
7	GATA-3	GATA-3	28,53	24,15	30,57
14	GATA-3	GATA-3	26,68	25,91	29,24
21	GATA-3	GATA-3	28,70	24,98	28,13
28	GATA-3	GATA-3	28,23	24,43	29,56
3	PBS	GATA-3	31,36	24,58	27,43
7	PBS	GATA-3	30,66	25,13	28,07
14	PBS	GATA-3	29,96	27,42	27,55
21	PBS	GATA-3	29,74	26,47	28,54
28	PBS	GATA-3	30,99	25,81	27,84

## Appendiks

**Tabell 7.11: Gjennomsnittlige Ct- verdier målt i hovedforsøket ved injeksjon av TGF- $\beta$  ved smitte av *P. Salmonis*.**

Uttak (dager etter plasmidinjeksjon):	Primer:	Behandling:	Gjennomsnittlig Ct-verdi (muskel, milt, hodenyre)	
2	TGF- $\beta$	TGF- $\beta$	27,92	
7	TGF- $\beta$	TGF- $\beta$	30,32	
19	TGF- $\beta$	TGF- $\beta$	32,47	
22	TGF- $\beta$	TGF- $\beta$	32,24	
28	TGF- $\beta$	TGF- $\beta$	32,42	
2	TGF- $\beta$	Kontrollplasmid	31,19	
7	TGF- $\beta$	Kontrollplasmid	29,56	
19	TGF- $\beta$	Kontrollplasmid	32,06	
22	TGF- $\beta$	Kontrollplasmid	31,74***	
28	TGF- $\beta$	Kontrollplasmid	31,09	
2	TGF- $\beta$	PBS	28,58	
7	TGF- $\beta$	PBS	29,00	
19	TGF- $\beta$	PBS	32,44	
22	TGF- $\beta$	PBS	31,73	
28	TGF- $\beta$	PBS	31,00	
2	IL-17A	TGF- $\beta$		32,23 32,04
7	IL-17A	TGF- $\beta$		33,21 30,78
19	IL-17A	TGF- $\beta$		29,92 33,48
22	IL-17A	TGF- $\beta$		34,06 33,75
28	IL-17A	TGF- $\beta$		31,04 35,02
2	IL-17A	Kontrollplasmid		33,28 30,35
7	IL-17A	Kontrollplasmid		32,01 30,63
19	IL-17A	Kontrollplasmid		33,90 34,29
22	IL-17A	Kontrollplasmid		32,17 30,10
28	IL-17A	Kontrollplasmid		32,84 31,57
2	IL-17A	PBS		33,54 30,92
7	IL-17A	PBS		32,76 26,29
19	IL-17A	PBS		31,70 31,97
22	IL-17A	PBS		34,03 31,35
28	IL-17A	PBS		34,68 33,45
2	<i>P. salmonis</i>	TGF- $\beta$		38,27**
7	<i>P. salmonis</i>	TGF- $\beta$		38,94**
19	<i>P. salmonis</i>	TGF- $\beta$		32,62
22	<i>P. salmonis</i>	TGF- $\beta$		28,49
28	<i>P. salmonis</i>	TGF- $\beta$		18,45
2	<i>P. salmonis</i>	Kontrollplasmid		37,88***
7	<i>P. salmonis</i>	Kontrollplasmid		38,25
19	<i>P. salmonis</i>	Kontrollplasmid		29,71
22	<i>P. salmonis</i>	Kontrollplasmid		26,42
28	<i>P. salmonis</i>	Kontrollplasmid		18,36
2	<i>P. salmonis</i>	PBS		37,99***
7	<i>P. salmonis</i>	PBS		37,84
19	<i>P. salmonis</i>	PBS		30,82
22	<i>P. salmonis</i>	PBS		27,85
28	<i>P. salmonis</i>	PBS		17,12

\*\* Basert på tre individ

\*\*\*Basert på fire individ

## Appendiks

**Tabell 12: Gjennomsnittlige Ct- verdier målt i hovedforsøket ved injeksjon av T-bet ved smitte av *P. salmonis***

Uttak (dager etter plasmidinjeksjon):	Primer:	Behandling:	Gjennomsnittlig Ct-verdi (muskel, milt, hodenyre)		
2	T-bet	T-bet	23,86		26,19
7	T-bet	T-bet	23,79		25,45
19	T-bet	T-bet	28,48		26,01
22	T-bet	T-bet	26,65		26,68
28	T-bet	T-bet	26,15		28,33
2	T-bet	Kontrollplasmid	29,72		
7	T-bet	Kontrollplasmid	28,26		
19	T-bet	Kontrollplasmid	31,56		
22	T-bet	Kontrollplasmid	31,11***		
28	T-bet	Kontrollplasmid	30,94		
2	T-bet	PBS	28,80		27,13
7	T-bet	PBS	29,25		25,87
19	T-bet	PBS	31,01		26,20
22	T-bet	PBS	30,35		27,85
28	T-bet	PBS	30,37		27,53
2	IFN- $\gamma$	T-bet	31,84	27,30	28,92
7	IFN- $\gamma$	T-bet	32,99	27,29	29,52
19	IFN- $\gamma$	T-bet	32,19***	27,43	31,10
22	IFN- $\gamma$	T-bet	30,87	25,13	26,43
28	IFN- $\gamma$	T-bet	33,30	25,86	26,95
2	IFN- $\gamma$	Kontrollplasmid	31,26**	28,83	29,45
7	IFN- $\gamma$	Kontrollplasmid	31,49	28,64	29,84
19	IFN- $\gamma$	Kontrollplasmid	35,03	26,97	29,70
22	IFN- $\gamma$	Kontrollplasmid	34,06***	26,46	25,92
28	IFN- $\gamma$	Kontrollplasmid	34,00	26,31	26,34
2	IFN- $\gamma$	PBS	32,44	29,65	30,22
7	IFN- $\gamma$	PBS	33,54	27,92	28,06
19	IFN- $\gamma$	PBS	33,84***	26,49	30,04
22	IFN- $\gamma$	PBS	31,76	25,06	25,98
28	IFN- $\gamma$	PBS	32,10	25,20	25,52
2	<i>P. salmonis</i>	T-bet			38,78***
7	<i>P. salmonis</i>	T-bet			38,42***
19	<i>P. salmonis</i>	T-bet			31,01
22	<i>P. salmonis</i>	T-bet			26,16
28	<i>P. salmonis</i>	T-bet			16,37
2	<i>P. salmonis</i>	Kontrollplasmid			37,88***
7	<i>P. salmonis</i>	Kontrollplasmid			38,25
19	<i>P. salmonis</i>	Kontrollplasmid			29,71
22	<i>P. salmonis</i>	Kontrollplasmid			26,42
28	<i>P. salmonis</i>	Kontrollplasmid			18,36
2	<i>P. salmonis</i>	PBS			37,99
7	<i>P. salmonis</i>	PBS			37,84
19	<i>P. salmonis</i>	PBS			30,82
22	<i>P. salmonis</i>	PBS			27,85
28	<i>P. salmonis</i>	PBS			17,12

\*\* Basert på to individ

\*\*\* Basert på fire individ

## Appendiks

**Tabell 13: Gjennomsnittlige Ct- verdier målt i hovedforsøket ved injeksjon av GATA-3 ved smitte av *P. salmonis***

Uttak (dager etter plasmidinjeksjon):	Primer:	Behandling:	Gjennomsnittlig Ct-verdi (muskel, milt, Hodenyre)
2	GATA-3	GATA-3	29,11
7	GATA-3	GATA-3	25,60
19	GATA-3	GATA-3	26,97
22	GATA-3	GATA-3	28,26
28	GATA-3	GATA-3	26,74
2	GATA-3	Kontrollplasmid	28,94
7	GATA-3	Kontrollplasmid	28,81
19	GATA-3	Kontrollplasmid	31,12
22	GATA-3	Kontrollplasmid	30,89***
28	GATA-3	Kontrollplasmid	30,30
2	GATA-3	PBS	28,69
7	GATA-3	PBS	29,56
19	GATA-3	PBS	30,18
22	GATA-3	PBS	30,34
28	GATA-3	PBS	29,60
2	<i>P. salmonis</i>	GATA-3	38,00*
7	<i>P. salmonis</i>	GATA-3	37,73**
19	<i>P. salmonis</i>	GATA-3	32,76
22	<i>P. salmonis</i>	GATA-3	27,53
28	<i>P. salmonis</i>	GATA-3	17,53
2	<i>P. salmonis</i>	Kontrollplasmid	37,88***
7	<i>P. salmonis</i>	Kontrollplasmid	38,25
19	<i>P. salmonis</i>	Kontrollplasmid	29,71
22	<i>P. salmonis</i>	Kontrollplasmid	26,42
28	<i>P. salmonis</i>	Kontrollplasmid	18,36
2	<i>P. salmonis</i>	PBS	37,99 ***
7	<i>P. salmonis</i>	PBS	37,84
19	<i>P. salmonis</i>	PBS	30,82
22	<i>P. salmonis</i>	PBS	27,85
28	<i>P. salmonis</i>	PBS	17,12

\* Basert på to individ

\*\* Basert på tre individ

\*\*\*Basert på fire individ

## Appendiks

**Tabell 7.14: Gjennomsnittlige Ct- verdier målt i hovedforsøket ved smitte av *V. anguillarum*.**

Uttak (dager etter plasmidinjeksjon):	Primer:	Behandling:	Gjennomsnittlig Ct-verdi (muskel, milt, hodenyre)		
2	TGF-β	TGF-β	27,36		
7	TGF-β	TGF-β	29,89		
20	TGF-β	TGF-β	31,29		
2	TGF-β	Kontrollplasmid	27,59		
7	TGF-β	Kontrollplasmid	29,06		
20	TGF-β	Kontrollplasmid	31,52		
2	TGF-β	PBS	27,15		
7	TGF-β	PBS	29,69		
20	TGF-β	PBS	30,95		
2	IL-17A	TGF-β		32,29	31,64
7	IL-17A	TGF-β		31,10	29,97
20	IL-17A	TGF-β		24,10	32,47
2	IL-17A	Kontrollplasmid		33,22	32,58
7	IL-17A	Kontrollplasmid		29,65	32,83
20	IL-17A	Kontrollplasmid		31,32	33,70
2	IL-17A	PBS		32,71	31,64
7	IL-17A	PBS		32,08	29,97
20	IL-17A	PBS		33,21	32,47
2	T-bet	T-bet	22,33		
7	T-bet	T-bet	26,67		
20	T-bet	T-bet	27,46		
2	T-bet	Kontrollplasmid	27,00		
7	T-bet	Kontrollplasmid	29,65		
20	T-bet	Kontrollplasmid	30,55		
2	T-bet	PBS	29,74		
7	T-bet	PBS	30,61		
20	T-bet	PBS	30,86		
2	GATA-3	GATA-3	23,29		
7	GATA-3	GATA-3	23,80		
20	GATA-3	GATA-3	26,25		
2	GATA-3	Kontrollplasmid	26,58		
7	GATA-3	Kontrollplasmid	29,43		
20	GATA-3	Kontrollplasmid	29,89		
2	GATA-3	PBS	28,90		
7	GATA-3	PBS	30,81		
20	GATA-3	PBS	30,31		
2	IL-4	GATA-3	30,30	27,28	27,75
7	IL-4	GATA-3	32,00	27,70	27,23
20	IL-4	GATA-3	31,56	28,68	28,76
2	IL-4	Kontrollplasmid	30,27	26,70	27,13
7	IL-4	Kontrollplasmid	29,97	26,83	27,77
20	IL-4	Kontrollplasmid	31,37	28,51	28,05
2	IL-4	PBS	30,37	26,74	26,55
7	IL-4	PBS	30,46	27,01	25,84
20	IL-4	PBS	30,94	27,41	28,22
2	<i>V.anguillarum</i>	TGF-β			37,08**
7	<i>V.anguillarum</i>	TGF-β			37,89**
20	<i>V.anguillarum</i>	TGF-β			30,36
2	<i>V.anguillarum</i>	T-bet			36,73**
7	<i>V.anguillarum</i>	T-bet			39,32**
20	<i>V.anguillarum</i>	T-bet			26,58
2	<i>V.anguillarum</i>	GATA-3			37,97*
7	<i>V.anguillarum</i>	GATA-3			38,13*
20	<i>V.anguillarum</i>	GATA-3			29,95
2	<i>V.anguillarum</i>	Kontrollplasmid			36,73**



## Appendiks

7	V.anguillarum	Kontrollplasmid		39,32**
20	V.anguillarum	Kontrollplasmid		26,58
2	V.anguillarum	PBS		38,21***
7	V.anguillarum	PBS		36,25**
20	V.anguillarum	PBS		31,18

\*Basert på ett individ

\*\*Basert på to individer.

\*\*\*Basert på fire individer