

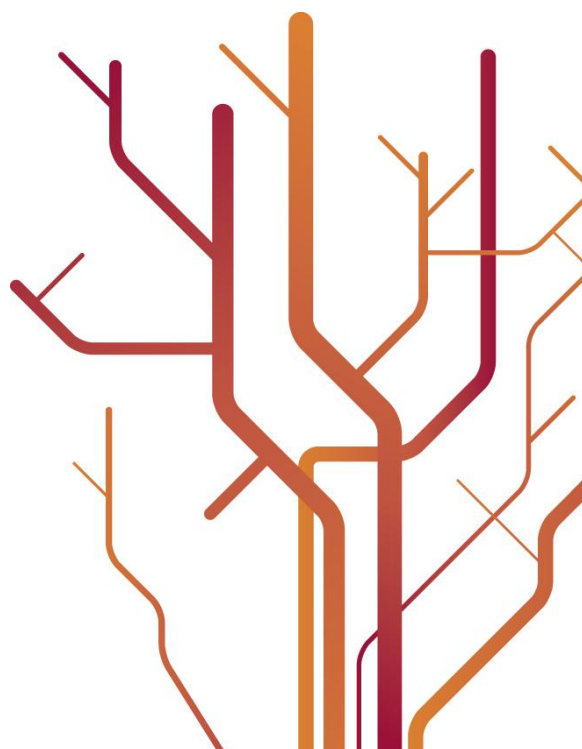
Antiviral effekt av type I interferon hos atlantisk laks (*Salmo salar* L.) mot infeksjøs lakseanemi virus

Av

Jenni Kristin Holand

August 2012

Mastergradsoppgave i fiskehelse
BIO-3959 (30 stp)
Fakultet for biovitenskap, fiskeri og økonomi
Universitetet i Tromsø



Forord

Denne oppgaven med tilhørende laboratorieforsøk inngår i 30 studiepoengskurset BIO-3959 Mastergradsoppgave i fiskehelse ved fakultet for biovitenskap, fiskeri og økonomi, Universitetet i Tromsø.

Forsøkene ble gjennomført våren 2012 ved institutt for Marin bioteknologi ved Norges fiskerihøgskole i Tromsø.

Jeg vil gjerne få takke min veileder professor Børre Robertsen for god veiledning under planlegging av forsøkene og oppfølging i skriveprosessen. Jeg vil også takke doktorgradstipendiat Tina Svingerud for den gode hjelpen under det praktiske arbeidet og for gode råd og tips under skriveprosessen. En takk går også til Linn Greiner-Tollersrud for hjelp på cellelaben, og for de utallige cellebrettene du har sådd ut for meg.

Vil også takke familie og venner for god hjelp og støtte under studieperioden, og for alt barnepassen under arbeidet med oppgaven. Takk til Truls for at du har vært så tålmodig, og til flinke Emma som har klart seg med en mamma som har vært litt for mye fraværende til tider. Og til sist, takk til mine medstudenter for en flott studietid.

Tromsø 15.08.12

Jenni Kristin Holand

Sammendrag

Infeksiøs lakseanemi (ILA) er en virussykdom som har innvirkning på, og fører til tap i den norske lakseoppdrettsindustrien. Det å kjenne til hvordan det influensaliknende infeksiøs lakseanemi viruset (ILAV) virker på laksens celler, og hvordan laksens immunforsvar fungerer for å hemme en infeksjon, er viktig for å kunne gjøre noe med denne sykdommen. Interferonsystemet spiller en viktig rolle i det medfødte immunforsvaret hos pattedyr, men også hos fisk.

Det er tidligere undersøkt om interferon (IFNa1) kan hemme infeksjon av ILAV, noe det har vist seg å ikke kunne. I tidligere forsøk har hemming av et høyvirulent virusisolat (ILAV4) vært testet ut i TO-celler. I denne oppgaven var det derfor ønskelig å teste ut et mindre virulent virusisolat (ILAV7) i tillegg til det høyvirulente ILAV4. ASK- celler ble valgt til forsøkene siden jeg i en prosjektoppgave i 2010 klarte å vise hemming av ILAV i denne cellelinjen. Vi ønsket også å benytte flere subtyper av interferoner (IFNa1, IFNb og IFNc). Jeg fikk også i oppgave å sammenligne effekten av interferonene ved virusets optimumstemperatur på 15°C med effekten ved 20°C som hadde vært brukt til å påvise antiviral aktivitet i prosjektoppgaven min. Antiviral effekt ble studert ved Cytopatogen effekt-reduksjonsmetode, kvantitativ PCR, Western blotting og virustitrering. Det ble også utført forsøk for å sammenligne induksjon av de antivirale proteinene Mx og ISG15 ved infeksjon av ILAV4 og ILAV7.

Resultatene viste at både ILAV4 og ILAV7 lar seg hemme av IFN i ASK-celler, og det er ingen signifikant forskjell på grad av hemming av de to isolatene. Det ble imidlertid vist at IFN kun har en forsinkende effekt på virusreplikasjon, og etter 3-5 dager ser viruset ut for å ha tatt igjen det tapte. Induksjonen av Mx og ISG15 var høyere hos ASK celler infisert med ILAV7 enn med ILAV4. Virusene replikerer lettere ved 15°C enn ved 20°C.

Innholdsfortegnelse

Forord.....	i
Sammendrag.....	ii
Forkortelser	3
1.0 Innledning.....	5
1.1 ILA problematikken i Norge.....	5
1.2 ILA-viruset.....	7
1.3 Immunforsvaret.....	11
1.3.1 Interferonsystemet i det medfødte immunforsvaret.....	11
1.3.2 Interferonsystemet hos laks	14
1.3.3 Virus kan ha hemmende effekt på IFN-systemet.....	15
1.3.4 Tidligere forskning på effekt av IFN på ILAV	15
1.4 Problemstilling.....	16
2.0 Materialer og metoder	17
2.1 Cellelinjer.....	17
2.2 Virus.....	17
2.2.1 ILAV-isolater.....	17
2.2.2 Titring av ILAV	17
2.3 Interferoner.....	18
2.4 Antiviralt assay med CPE-reduksjons-metoden.....	18
2.4.1 Utsåing av celler, IFN-behandling og virusinfisering.....	19
2.4.2 Farging av celler med krystallfiolett.....	19
2.5 Kvantitativ RT-PCR.....	20
2.5.1 IFN behandling og virusinfisering av celler	20
2.5.2 Høsting av celler	21
2.5.3 RNA isolering.....	21
2.5.4 cDNA syntese	21
2.5.5 Kvantitering av virus med Real time PCR.....	22

2.5.6 Utregninger.....	23
2.6 Western blotting.....	23
2.6.1 IFN behandling og virusinfisering av celler	24
2.6.2 Høsting av celler	24
2.6.3 SDS-PAGE elektroforese	24
2.6.4 Blotting	24
2.6.5 Blokkering og antistoff-inkubering	25
2.6.6 Fremkalling.....	25
2.6.7 Stripping av membran.....	26
2.6.8 Utregning av ROI-verdier.....	26
2.7 Titrering av virus i supernatanter fra celler infisert med ILAV4 og 7 med og uten IFN behandling.....	26
3.0 Resultater.....	28
3.1 Cytopatogen effekt reduksjonsassays - Mål på antiviral aktivitet av IFNa1, IFNb og IFNc mot ILAV4 og ILAV7 i ASK-celler inkubert ved 15 og 20°C.....	28
3.1.1 ILAV7 infiserte celler inkubert ved 15 °C.....	29
3.1.2 ILAV7 infiserte celler inkubert ved 20°C.....	30
3.1.3 ILAV4 infiserte celler inkubert ved 15°C.....	32
3.1.4 ILAV4 infiserte celler inkubert ved 20°C.....	32
3.2 Effekt av IFN på replikasjonen av ILAV4 og ILAV7 målt ved transkripsjonen av hemagglutinin-esterase (HE) gen.....	33
3.3 Induksjon av Mx-protein og hemming av HE-protein ved IFNa1 behandling av celler infisert med ILAV 4 og 7	34
3.3.1 Effekt av IFNa1 på ekspresjon av HE-proteinet.....	35
3.3.2. Induksjon av Mx	35
3.4 Effekt av IFN på replikasjon av ILAV målt ved titrering av virus	36
3.5 Induksjon av Mx og ISG15 24 timer etter infeksjon med ILAV 4 og 7 ved 15° og 20°C.....	37
3.5.1 Mx:.....	38
3.5.2 ISG15.....	39
4.0 Diskusjon.....	42

4.1 Antiviral aktivitet av IFN mot ILAV målt med CPE-reduksjonsmetoden.....	42
4.2 Effekt av IFN på replikasjonen av ILAV4 og ILAV7 målt ved transkripsjonen av hemagglutinin-esterase (HE) genet.....	44
4.3 Effekt av IFN på replikasjon av ILAV målt ved Western blotting av HE- protein.....	44
4.4 Effekt av IFN på replikasjon av ILAV målt ved virus-titrering.....	45
4.5 Oppsummering av de antivirale assayene	45
4.6 Sammenligning av induksjon av Mx og ISG15 i ASK celler infisert med ILAV4 og ILAV7... ..	47
4.7 Konklusjon	48
5.0 Referanser.....	49
6.0 Appendiks.....	56
6.1 Løsninger	56
6.1.2 Western blotting.....	56
6.2 Tilleggsdata resultater	57
6.2.1 CPE-reduksjonsassays	57
6.2.2 Real-time PCR	59
6.2.3 Induksjon av Mx og ISG15 24 timer etter infeksjon med ILAV 4 og 7 ved 15 og 20°C	60
6.2.4 Titrering av virussupernatanter.....	63

Forkortelser

AS-IFN - Interferonlignende aktivitet hos atlantisk laks

ASK - Atlantic salmon kidney

cDNA - Komplementært DNA

CHSE-214 - Chinook salmon embryo cell line

CPE - Cytopatogen effekt

Ct - Terskelverdi Real-Time PCR

DC - Dendritiske celler

DNA - Deoxyribonucleic acid

dsRNA - Doddetrådig RNA

FBS - Fetal bovine serum

HE - Haemagglutinin-esterase

HEK - Human embryonic kidney

HPR - Hypervariable polymorph region

IFN - Interferon

ILA - Infeksiøs lakseanemi

ILAV - Infeksiøs lakseanemi virus

IPNV - Infeksiøs pankreas nekrose virus

IRF - Interferon regulatorisk faktor

ISG - Interferon stimulert gen

JAK - Janus kinase

MDA5 - Melanoma differentiation associated gene 5

MHC - Major histocompatibility complex

MOI - Multiplicity of infection

mRNA - Messenger RNA

Mx – Myxovirus resistensprotein

NEEA - Ikke-essensielle aminosyrer

NFH - Norges fiskerihøgskole

NF κ B - Nukleær factor kappa B

NK celler - Naturlige dreperceller

ORF - åpen leseramme

PBS - Phosphate buffered saline

PCR - Polymerase chain reaction

pDC - Plasmacytoide dendritiske celler

PKR - dsRNA avhengig protein kinase R

Poly:IC - Polyinosinic polycytidylic acid

RIG-I - Retinoic acid-inducible gene- I

RNA - Ribonucleic acid

RT-PCR - Reverse transcription polymerase chain reaction

SDS-PAGE - Sodium dodecyl sulphate polyacrylamid gel electrophoresis

SHK - Salmon head kidney

ssRNA - Enkeltrådig RNA

STAT - Signal transducers and activators of transcription

TBS - Tris-buffret saltløsning

TCID₅₀ - 50% Tissue Culture Infectivity Dose

TO-celler - Cellelinje generert fra hodenyre hos atlantisk laks

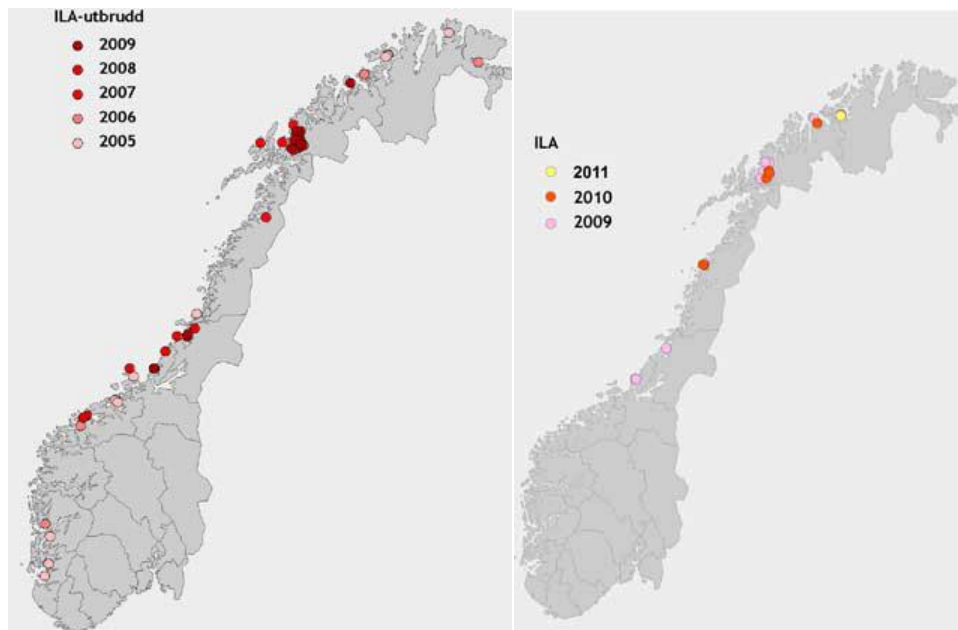
TLR - Toll liknende reseptorer

1.0 Innledning

1.1 ILA problematikken i Norge

Norge er den største produsenten av atlantisk laks (*Salmo salar L.*) internasjonalt, og i 2011 ble det produsert 1.005.600 tonn laks. Svinn i oppdrett er et stort problem, og en stor del av dette svinnet skyldes fiske sykdommer. Kjente virusinfeksjoner og infeksjoner med mulig viral årsak er i dag en stor utfordringen med hensyn til tap og redusert tilvekst av laksen (Olsen *et al.*, 2011). Lidelser på bakgrunn av patologiske forandringer ved virusinfeksjoner utgjør også et betydelig velferdsproblem i norsk oppdrett av laksefisk. En av de mest fryktede virussykdommene er infeksiøs lakseanemi (ILA), selv om antall utbrudd de siste årene er gått betraktelig ned grunnet gode forebyggende tiltak (Olsen *et al.*, 2011).

ILA ble første gang påvist i Norge i et settefiskanlegg i Hordaland i 1984. ILA spredte seg raskt og forårsaket store økonomiske tap i oppdrettsnæringen langs mesteparten av norskekysten. I 1990 nådde epidemien en topp med utbrudd på 80 nye lokaliteter. På slutten av 80-tallet og begynnelsen av 90-tallet innførte norske myndigheter en rekke tiltak for å bekjempe sykdommen, og i 1991 var 141 lokaliteter pålagt ILA-restriksjoner. Siden 1993 har det i gjennomsnitt vært 10 utbrudd per år (Olsen *et al.*, 2011; Poppe *et al.*, 2002). I løpet av 2009 ble det påvist utbrudd av ILA på ti ulike lokaliteter med laks i Norge, noe som er en nedgang fra årene før. Kjerneområdet for sykdommen har siden 2007 ligget i Sør- og Midt-Troms (se figur 1). I 2010 var det syv tilfeller av ILA, mens i 2011 var det kun ett tilfelle. Sykdomssituasjonen synes nå å være under kontroll. Det pågår prosesser for strukturendring og overvåkning i forbindelse med gjenoppbygning av oppdrettsvirksomheten i området som en tid har vært tømt for laks (Olsen *et al.*, 2011).



Figur 1: Utbrudd av ILA i Norge fra 2005-2011. (Bornø *et al.*, 2009, Helsenisituasjonen hos laksefisk 2009, virussykdommer, Infeksiøs lakseanemi- ILA, side 6; Olsen *et al.*, 2011, Helsenisituasjonen hos laksefisk 2011, virussykdommer, Infeksiøs lakseanemi- ILA, side 8).

ILA-utbrudd forekommer nesten utelukkende hos atlantisk laks i sjøvannsoppdrett. Vanligvis starter utbruddet i en merd og sprer seg over uker og måneder til nabomerdene. Sykdommen kan på mange måter karakteriseres som en ”ulmebrann” og undersøkelser har vist at mindre enn halvparten av fiskene i et angrepet anlegg infiseres. Den daglige dødeligheten i merder med fisk er lav (0,5-1 promille), men kan øke tidlig sommer og vinter (Poppe *et al.*, 2002). Den totale dødeligheten i et oppdrettsanlegg kan variere helt fra 15-100%. Tradisjonelt sett har sykdomsutbrudd blitt delt inn i to ulike forløp; et akutt forløp med rask sykdomsutvikling og høy dødelighet, og et mer kronisk sykdomsforløp, hvor en langsom økning i dødelighet over flere måneder kan observeres (Mjaaland *et al.*, 2005).

Generelle smittehygieniske tiltak og rask diagnostikk er viktig i forebygging av ILA. Når en ser etter ILA-forandringer i syk fisk, legger en ofte stor vekt på den oppsiktsvekkende mørke leveren. ILA skyldes at viruset infiserer og skader blodceller og celler i blodkarets vegg. Blodige lesjoner i indre organer er vanlige på grunn av dette, men varierer mye fra tilfelle til tilfelle. Anemi og det tynne blodet som kommer av skadene på blodcellene og blødningene er imidlertid typiske symptomer. Alvorlig anemi kombinert med sirkulasjonsforstyrrelser indikerer ILA (Veterinærinstituttets faktabank, 2011).

ILA er en meldepliktig sykdom på liste 2. Diagnostikken baserer seg på flere kriterier, der kliniske funn av typiske sykdomsforandringer blir sett på i sammenheng med påvisning av ILA virus ved hjelp av minst to deteksjonsmetoder. Kriteriene baserer seg på det internasjonale regelverket fra OIE (Verdens dyrehelseorganisasjon) og EU. Den vanligste kombinasjonen av metoder i sykdomsdiagnostikken er PCR og immunhistokjemifarging av vevssnitt, hvor ILA-virus blir rødfarget dersom det er tilstede. PCR i seg selv er ikke nok til å utløse forvaltningsmessige tiltak. Mistanke om ILA ut i fra kliniske tegn og symptomer kan være nok til å iverksette restriksjoner. Tiltak mot ILA iverksettes etter en bekjempelsesplan tilpasset EUs regelverk og anbefalinger fra OIE. Hovedmålsetningen i bekjempelsesplanen for ILA er fremdeles å fjerne all fisk fra infiserte anlegg så raskt som mulig (Olsen *et al.*, 2011; Veterinærinstituttets faktabank, 2011).

1.2 ILA-viruset

Infeksiøs lakseanemi virus (ILAV) har en stor økonomisk betydning innen lakseoppdrettsindustrien i et økende antall land. ILAV-isolater fra ulike geografiske regioner har vist seg å variere svært i patogenitet for atlantisk laks (Workenhe *et al.*, 2009).

ILAV tilhører slekten *Isavirus* under familien *Orthomyxoviridae*, som er samme familie som influensavirusene tilhører. ILAV gir i motsetning til influensavirusene ikke sykdom hos varmlodige dyr og mennesker. Så langt er sykdommen ILA bare påvist hos atlantisk laks (Kibenge *et al.*, 2005; Poppe *et al.*, 2002).

Viruset består av kappeklede partikler på 90-140 nm i diameter der overflatestrukturen består av haemagglutinin-esterase proteinet (HE) og et fusjonsprotein (Kibenge *et al.*, 2005). HE er ansvarlig for reseptor-binding, og er det ILAV molekylet som har høyest variabilitet. Variabiliteten er konsentrert til en liten region kalt HPR (highly polymorphic region) (Mjaaland *et al.*, 2002; Mjaaland *et al.*, 2005). HE binder seg til en reseptor på laksecellene som fører til at viruset blir tatt opp i cellen og begynner å replikere. Binding av ILAV til erytrocyttene fører til agglutinerings som da kalles hemagglutinasjon. ILAV angriper endotelceller og makrofager, og påvirker uttrykket av genene både i det medfødte og det adaptive immunforsvaret (Kibenge *et al.*, 2005; Workenhe *et al.*, 2008).

I likhet med influensa A og B virus består ILAV genomet av åtte segmenter av enkelttrådig (ss) negativt orientert RNA, som koder for minst ti proteiner (García-Rosado *et al.*, 2008; Falk

et al., 2004; Mjaaland *et al.*, 1997). Karakterisering av ILAV-genomet er nærmest komplett, og det er vist at gensammensetningen og ILAV proteinene er signifikant forskjellig fra andre orthomyxovirus. ILAV segment 1 til 6 koder for et protein hver, mens segment 7 koder for to proteiner (s7ORF1 protein og s7ORF2) og segment 8 koder for to proteiner (s8ORF1 og s8ORF2) (Bierin, *et al.*, 2002; Falk *et al.*, 2004; Kibenge *et al.* 2007). HE kodes av segment 6 og fusjonsproteinet av segment 5 (García-Rosado *et al.*, 2008; Mjaaland *et al.*, 2002). Segment 7-ORF1 produktet, som er et av de mest variable av ILAV genene som er karakterisert, er rapportert å ha en interferonhemmende funksjon. Gensegment 8 koder for et matriksprotein, og et strukturelt protein som har type I interferon bekjempende virkning (García-Rosado *et al.*, 2008; Workenhe *et al.*, 2008; Workenhe *et al.*, 2009).

I både villfisk og i oppdrettsfisk uten sykdomstegn er det funnet ILA virus med en HPR-region som er lengre enn i de ILAV isolatene som finnes i fisk med sykdomsutbrudd. Denne regionen er blitt kalt HPR0. Tar man utgangspunkt i denne regionen, ser det ut til at alle isolater av viruset som gir sykdom inneholder delesjoner i HPR regionen, altså en forkortet versjon av HPR0 regionen. Det kan se ut til at mutasjoner og dannelse av delesjoner i HPR0 regionen er nødvendig for at ILA virus skal forårsake sykdomsutbrudd, og at virusisolater som gir sykdom stammer opprinnelig fra den ufarlige ILAV varianten med HPR0 regionen (Mjaaland *et al.*, 2002; Mjaaland *et al.*, 2005).

Ulike isolater av ILAV varierer i virulens og dødelighet. Virulensen til et virus er definert av dets kapasitet til å forårsake sykdom i en vert. Mjaaland *et al.* (2005) testet virulensen til elleve ulike ILAV isolater. Virusisolat 1-6 og isolat 8 ga akutt sykdom med en dødelighet på 11- 46,8 %, mens de andre isolatene ga et kronisk forløp med en dødelighet på 2,5-7.7 %. De virusisolatene som blir fokusert på i denne oppgaven er isolat 4 (ILAV4), også kalt Glesvær, og isolat 7 (ILAV7). ILAV7 er det isolatet som ga den laveste dødeligheten på 2,5 % i Mjaalands forsøk, mens ILAV4 ga en dødelighet på 17,7 %. Selv om ILAV4 og ILAV7 har stor variasjon i virulens, har de en identisk HPR region i HE. En sammenligning av HE-gensekvensen og proteinsekvensen til ILAV4 og ILAV7 er vist i figur 2. Overlevende fisk smittet med ILAV4 hadde høy konsentrasjon av antistoffer i serum mens fisk smittet med ILAV7 ikke hadde påvisbart antistoff i serum (Mjaaland *et al.*, 2005).

B)

```

>lcl|16371 unnamed protein product
Length=391

Score = 797 bits (2059), Expect = 0.0, Method: Compositional matrix adjust.
Identities = 387/391 (99%), Positives = 388/391 (99%), Gaps = 0/391 (0%)

Query 1 MARFIILFLLAPYSRLCLRNYPDTTWIGDSRSDQSRVNPQSLDLVTEFKGVLQAKNGN 60
Sbjct 1 MARFIILFLLAPYSRLCLRNYPDTTWIGDSRSDQSRVNPQSLDLVTEFKGVLQAKNGN 60

Query 61 GLLKQMSGRFSPDWYPTTKYRILYLGTDNDCTDGFDMIIPTSMFLDNAARELYLGACRG 120
Sbjct 61 GLLKQMSGRFSPDWYPTTKYRILYLGTDNDCTDGFDMIIPTSMFLDNAARELYLGACRG 120

Query 121 DVRVTPTFVGAAIVGLVGRDATTGFSVKVLTFSSTIVVVGLNGMSGIYKVCIAATSGN 180
Sbjct 121 DVRVTPTFVGAAIVGLVGRDATTGFSVKVLTFSSTIVVVGLNGMSGIYKVCIAATSGN 180

Query 181 VGGVLLINGCGYFNTPLRFDNFQGGIYVSDTFEVRGTKNKCVLLRSSDTPLCSHIMRNV 240
Sbjct 181 VGGVLLINGCGYFNTPLRFDNFQGGIYVSDTFEVRGTKNKCVLLRSSDTPLCSHIMRNV 240

Query 241 ELDEYVDFPNTGGVYPSDGFDSLHGSASVRTFLTDALTCPDIDWSRIDAASCEYDSCPKM 300
Sbjct 241 ELDEYVDFPNTGGVYPSDGFDSLHGSASVRTFLTDALTCPDIDWSRIDAASCEYDSCPKM 300

Query 301 VKDFDQTSLGNTDTLIMREVALHKEMISKLQRNITDVKIRVDAIPPQLNQTMGVAGFGIA 360
Sbjct 301 VKDFDQTSLGNTDTLIMREVALHKEMISKLQRNITDVKIRVDAIPPQLNQTMGVAGFGIA 360

Query 361 LFLAGWKACIWIAAFMYKSRGRIPSSLSVA 391
Sbjct 361 LFLAGWKACIWIAAFMYKSRGRIPSSLSVA 391

```

Figur 2: A) Sammenligning av HE-gensekvens for ILAV 4 (øverst) og ILAV 7 (nederst). Det grå feltet viser HPR regionen, mens de røde feltene viser hvor det er forskjeller i genene. Selv om det er en nukleotid forskjell i HPR regionen mellom ILAV4 og ILAV7, fører ikke den til en aminosyresubstitusjon. Begge virusene tilhører samme PR- gruppe 4 (Polymorphic region group) (Mjaaland *et al.*, 2002).

B) Sammenligning av aminosyresekvensen for HE for ILAV4 (øverst) og ILAV 7 (nederst). De røde feltene indikerer forskjeller i aminosyresekvensen. Det grå feltet viser HPR regionen.

1.3 Immunforsvaret

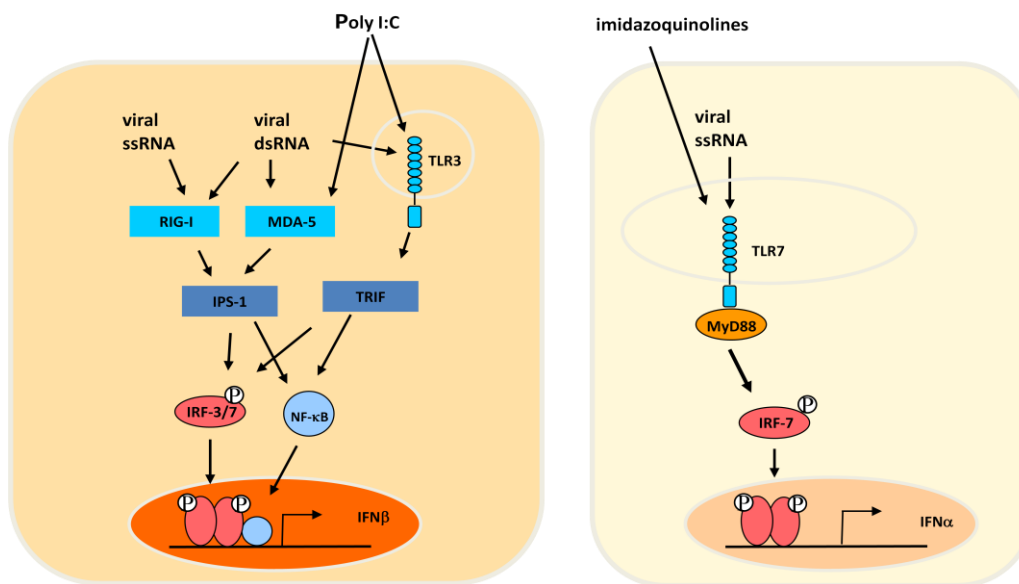
Immunforsvaret består av to deler, det medfødte ("innate") forsvaret og det adaptive ("tillærte") forsvaret. Det medfødte immunforsvaret er vertens innledende, eller første forsvar mot infeksjon. Denne typen forsvar er alltid tilstede i friske individer, forberedt på å blokkere invasjon av mikrober, og til raskt å eliminere mikrober som klarer å invadere vertens vev. Det adaptive immunforsvaret utvikles saktere og starter senere, men er et enda mere effektivt forsvar mot infeksjon. Det stimuleres av mikrober som invaderer vertens vev, og forsvaret adapteres og forbedres etter en infeksjon. Det adaptive forsvaret er antigen-spesifikt og gjenkjenner altså antigener som verten tidligere har vært eksponert for. Når en antigenreseptor hos B-celler eller T-lymfocytter bindes til et antigen, fører dette til en oppformering av celler med denne reseptoren, noe som tar lang tid. Andre gangs eksponering av samme antigen fører derimot til en rask og målrettet respons som kan bekjempe den fremmede mikroben før den gir sykdom hos verten. Det medfødte immunforsvaret er arvelig og forbedres ikke ved gjentatte infeksjoner med samme mikrobe, men reagerer på fremmede strukturer som ikke er en naturlig del av vertsorganismen (Abbas *et al.*, 2009).

Det medfødte og det adaptive immunforsvaret består begge av både cellulære og humorale komponenter. Det medfødte immunforsvaret består av fagocytter og NK-celler, og komponenter som komplementproteiner, antimikrobielle peptider, akutt fase proteiner og cytokiner. Lymfocytter, antistoff, cytokiner og perforiner er celler og komponenter i det adaptive immunforsvaret (Abbas *et al.*, 2009).

1.3.1 Interferonsystemet i det medfødte immunforsvaret

Vertens reaksjon på en virusinfeksjon starter med at det medfødte immunforsvaret gjenkjenner virusets nukleinsyrer ved hjelp av reseptorer, som for eksempel Toll-liknende reseptorer (TLR), RIG-I eller MDA5. Immunsystemets celler reagerer med fagocytose, sekresjon av cytokiner (for eksempel type I interferon) og kjemokiner, eller med å direkte drepe infiserte celler (Kawai *et al.*, 2006). I 1957 oppdaget Isaacs and Lindenmann en substans som beskyttet celler fra virusinfeksjoner, og denne substansen kalte de for interferon (IFN) (Pestka *et al.*, 2004). Interferonsystemet består av proteiner med antiviral aktivitet som skilles ut fra celler som respons på ekstern stimuli, som for eksempel ved en virusinfeksjon (Samuel, 2001).

Hos pattedyr spiller interferoner (IFN) en viktig rolle i det medfødte immunforsvaret mot virusinfeksjoner. Ved en infeksjon vil de infiserte vertscellene produsere og skille ut IFN ved gjenkjennelse av virale nukleinsyrer. IFN beskytter andre celler mot videre infeksjon av virus ved å binde seg til reseptorer på celleoverflaten, noe som resulterer i induksjon av gener som koder for antivirale proteiner (Haller *et al.*, 2006). Hos pattedyr kan man skille mellom tre ulike familier av interferoner, type I IFN, type II IFN og type III IFN ut fra genstruktur, proteinstruktur og funksjonelle egenskaper (Kotenko *et al.*, 2003; Pestka *et al.*, 2004; Samuel, 2001). Type I IFN inneholder flere subtyper som IFN- α , IFN- β , IFN- ω , IFN- ϵ , IFN- κ , IFN- τ og limitin, og kodes av intronfrie gener på kromosom 9. (Kawamoto *et al.*, 2004; Petska *et al.*, 2004). De fleste celletyper produserer IFN α og β , og alle celler med cellekjerne har reseptorer for denne typen IFN. Den viktigste funksjonen til type I IFN er å indukere en antiviral tilstand i disse cellene (Sen, 2001). Type II IFN er identisk med IFN- γ , som produseres kun av naturlige dreperceller (NK-celler) og T-lymfocytter i respons på interleukin-12 (IL-12), IL-18 eller antigener. Type II IFN har en sentral rolle i det adaptive immunsystemet, og kodes av gener med tre introner lokalisert på kromosom 12 (Samuel, 2001; Sen, 2001). Type III IFN, som også kalles IFN- λ , har liknende biologiske egenskaper som type I IFN, men kodes av gener som inneholder introner og er lokalisert på kromosom 19. IFN- λ binder seg også til en reseptor som er forskjellig fra IFN- α/β reseptoren (Vilcec, 2003). Siden det er type I IFN som er studert i denne oppgaven, er det kun denne typen IFN som blir omtalt videre.



Figur 3: Virusinfiserte celler gjenkjenner RNA ved at de virale nukleinsyrer binder seg til ulike reseptorer inne i cellen, og produksjon av IFN settes i gang (figuren er lånt fra Professor Børre Robertsen).

En av de mest studerte reaksjonene på en virusinfeksjon i det medfødte immunsystemet hos pattedyr og mennesker er induksjonen av type I IFN. De infiserte cellene gjenkjenner enkelttrådig RNA (ssRNA) eller dobbeltrådig RNA (dsRNA) fra virus ved at de virale nukleinsyrene binder seg til reseptorproteiner inne i cellen (figur 3). De fleste celler produserer IFN på bakgrunn av gjenkjennelse av viralt dsRNA eller ssRNA av reseptorene RIG-I eller MDA5, som er RNA helikaser lokalisert i cytoplasma. Dette fører til induksjon av IFN- β (Kawai *et al.*, 2006; Loo *et al.*, 2008; Yoneyama *et al.*, 2004; Yoneyama *et al.*, 2007). Makrofager produserer også IFN- β gjennom gjenkjennelse av dsRNA av TLR3 som ligger i endosomale membraner, men rollen til denne reseptoren i det medfødte immunforsvaret mot virus er fortsatt usikker (Edelmann *et al.*, 2004). Plasmacytoide dendrittiske celler (pDC), som er spesialiserte IFN produserende celler, gjenkjenner viralt ssRNA gjennom TLR7 og TLR8, som er lokalisert i endosomer og fører til induksjon av både IFN- α og β (Haller *et al.*, 2006; Heil *et al.*, 2003; Nishya *et al.*, 2005). Viralt DNA gjenkjennes av TLR9, og finnes også i endosomene hos pDC (Kadowaki *et al.*, 2001). Binding av virale nukleinsyrer til reseptorene setter i gang en koordinert aktivering av transkripsjonsfaktorer som interferonregulerende faktorer (IRF) og NF κ B. Aktivering av disse transkripsjonsfaktorene starter transkripsjonen av IFN-genene. IFN skilles ut fra den infiserte cellen og transporteres via blodet for å ”advare” andre celler i kroppen. Den antivirale effekten oppnås ved at IFN- α og β bindes til type I IFN reseptorer som finnes på alle kjerneholdige celler. Bindingen trigger signaloverføring gjennom JAK-STAT veien, og fører til transkripsjon av flere hundre IFN-stimulerte gener (ISG-er) (Stark *et al.*, 1998). Noen av disse koder for antivirale proteiner som Mx, PKR (dsRNA avhengig protein kinase R) og ISG15. Dette setter i gang en rekke mekanismer som til sammen stopper replikasjonen av virus. De antivirale funksjonene er bare kjent for enkelte av de IFN-induserte proteinene (deVeer *et al.*, 2001). Et av de mest studerte IFN-induserte proteinene er Mx-proteinet, som hos mennesker hemmer replikasjon av influensavirus og flere andre virustyper (Haller *et al.*, 1998; Haller *et al.*, 2009; Lee *et al.*, 2002). ISG15 er et av proteinene som induseres tidligst og i størst mengde i IFN stimulerte celler (Der *et al.*, 1998). Proteinet har evne til å binde seg kovalent til andre cellulære proteiner, og det ser ut til å være involvert i antivirale mekanismer (Zhao *et al.*, 2005)

I tillegg til induksjon av cellulær antiviral aktivitet, har IFN- α og β flere regulerende virkninger på både det medfødte og adaptive immunsystemet. IFN- α og IFN- β øker NK-cellenes potensiale til å drepe infiserte celler, øker uttrykket av MHC klasse I for å promotere

antigenpresentasjon, stimulere apoptose av virusinfiserte celler og hemmer celleproliferasjon (Abbas *et al.*, 2009).

1.3.2 Interferonsystemet hos laks

Interferoner spiller som sagt en stor rolle i det medfødte immunforsvaret mot virale infeksjoner hos pattedyr. Senere års forskning har vist at også fisk har et interferonsystem som likner mye på dette interferonsystemet, og antagelig er viktigheten av IFN like stor hos fisk som hos pattedyr (Sun *et al.*, 2009). Betydningen av interferonsystemet i virusforsvar hos pattedyr er grundig dokumentert, og de første IFN- genene hos mennesker ble klonet allerede i 1980. IFN-liknende aktivitet i fisk ble detektert så tidlig som 1965, men de første IFN- genene hos fisk ble ikke klonet før i 2003. Atlantisk laks var en av de første (Robertsen *et al.*, 2003). Grunnen til at det tok så lang tid før IFN hos fisk ble klonet, er at sekvenslikheten mellom IFN hos pattedyr og fisk er svært liten. Pattedyr har som tidligere nevnt tre hovedtyper av IFN (type I (α/β) og III ($\text{IFN}\lambda$) som virker i det medfødte immunforsvaret, og type II ($\text{IFN}\gamma$), som virker i det adaptive immunforsvaret). Hos fisk har man foreløpig funnet IFN som har sekvenslikheter og viser strukturelle og funksjonelle egenskaper som er lik type I IFN, samt $\text{IFN}\gamma$. Fiskens IFN har derimot i motsetning til pattedyrenes type I IFN gener med introner (Robertsen, 2006). De IFN-genene som er identifisert hos fisk har en genstruktur som ligner $\text{IFN}\lambda$ hos pattedyr, mens IFN proteinsekvensene er mer lik $\text{IFN-}\alpha/\beta$ (Robertsen, 2006). Kloning av type I IFN og $\text{IFN}\gamma$ fra mange ulike fiskearter har ført til store gjennombrudd innen forskning på IFN hos fisk. Antallet IFN-gener og IFN-subtyper i de ulike fiskeartene er foreløpig ikke klart. Forskning gjort ved Norges fiskerihøgskole i Tromsø (NFH) har identifisert en samling av 11 IFN gener i laksegenomet, noe som antyder at IFN systemet hos enkelte arter kan være like komplekst som det hos pattedyr (Sun *et al.*, 2009). Disse elleve genene koder for tre ulike subtyper av IFN, IFNa (to gener), IFNb (fire gener) og IFNc (fem gener). De ulike subtypene er svært forskjellig i sekvens og har dessuten forskjellige ekspresjonsegenskaper, noe som tyder på at de har helt ulike funksjoner i fisken (Sun *et al.*, 2009). I tillegg har laks og andre fisk en IFN subtype som kalles IFNd, men som er lite studert funksjonelt (Chang *et al.*, 2009).

To IFN-subtyper ble identifisert hos laks i 2003 (Robertsen *et al.*, 2003). Disse ble navngitt SasaIFN- α 1 og SasaIFN- α 2 (nå kalt IFNa1 og IFNa2) på grunn av at sekvensene var mest lik IFN- α hos pattedyr. I ettertid har forskning vist at IFNa1/a2 funksjonelt er mer lik IFN- β hos pattedyr (Sun *et al.*, 2009). Forskning tyder på at IFNa1/a2 produseres først og i størst

mengde ved virusinfeksjon i lakseceller (Berg *et al.*, 2009). Rekombinant lakse- IFN α 1 har vist seg å inducere både Mx og ISG15, som er blant de mest prominente antivirale ISG-ene i atlantisk laks (Larsen *et al.*, 2004; Larsen *et al.*, 2005). Det er også vist at IFN α 1 gir beskyttelse mot infeksjøs pankreasnekrose virus (IPNV) i lakseceller (Jensen *et al.*, 2002a; Jensen *et al.*, 2002b; Kileng *et al.*, 2007; Kileng, 2008; Robertsen, 2006).

Informasjon om og forskning på reseptorer for virale nukleinsyrer i fisk er også kommet langt på vei. I pattedyr har poly I:C som er et syntetisk dsRNA, vist seg å inducere IFN- β gjennom MDA5 eller TLR-3, som begge er avhengig av NF- κ B (Alexopoulou L. *et al.*, 2001; Hayden *et al.*, 2006; Kang *et al.*, 2002). Imidazoquinoline S-27609, som er en ligand for TLR7 hos pattedyr, har vist seg å inducere IFN- α i plasmacytoide dendrittiske celler gjennom TLR7 veien uavhengig av NF- κ B (Doxsee *et al.*, 2003). Hos laksen indikerer NF- κ B bindende motiv i IFN α promotorene og den sterke oppreguleringen etter poly I:C stimulering, at IFN α 1/2 blir induisert gjennom lignende signalveier som IFN- β . Den tilsynelatende mangelen på NF- κ B i IFN β og IFN γ promoterne og den sterke oppreguleringen etter S-27609 stimulering, indikerer at IFN β og IFN γ gener induseres gjennom tilsvarende signalvei som pattedyrs IFN- α (Sun *et al.*, 2009). IFN γ gener viser uttrykksmønster forskjellig fra både IFN α og IFN β ved stimulering med poly I:C (Sun *et al.*, 2009).

1.3.3 Virus kan ha hemmende effekt på IFN-systemet

Virus har vist seg å utvikle mekanismer som hemmer eller unnslipper vertens IFN-system ved å tilpasse seg verten over tid. Ulike mekanismer som viruset kan benytte er å nedregulere vertens proteinsyntese, hemme vertens IFN produksjon, hemme IFN signalet som virker på andre celler, eller hemme induksjon av ISG og funksjonen til ISG- produktene (Levy *et al.*, 2001, Sen, 2001). Ulike typer av Orthomyxovirus, som har vist seg å være sensitive for den antivirale effekten til interferonsystemet, er eksempler på virus som har utviklet antagonistiske egenskaper mot IFN-systemet (Garcia-Sastre *et al.*, 1998). Og det er under denne familien ILAV hører hjemme.

1.3.4 Tidligere forskning på effekt av IFN på ILAV

Tidligere forskning tydet på at IFN α 1 ikke hadde hemmende effekt på ILAV-replikasjon (Kileng *et al.*, 2007). Uttrykket av IFN α 1, Mx og ISG15 i ILAV-infiserte TO-celler ble også analysert (Kileng *et al.*, 2007). ILAV-infeksjon førte til at TO-cellene tidlig inneholdt høye transkript-nivåer av Mx og ISG15. IFN α 1 transkripsjonen ble induisert senere enn både Mx og

ISG15 transkripsjon, noe som tyder på at Mx og ISG15 induseres uavhengig av IFN i tidlige stadier av ILAV-infeksjon. Resultatene kunne tyde på at ILAV hemmer sentrale antivirale mekanismer i IFN-systemet hos laksen. Det at ILAV ble vist å ikke hemmes av Mx-protein var overraskende siden det er et orthomyxovirus, og mammalske orthomyxovirus som influensavirus A og B blir effektivt hemmet av vertens Mx-protein (Jensen *et al.*, 2002a; Kileng *et al.*, 2007).

1.4 Problemstilling

I en prosjektoppgave fra 2010 viste jeg at ILAV faktisk lar seg hemme av IFN α 1 i ASK-celler (Holand, 2010). IFN α 1 viste seg også å gi noe beskyttelse mot ILAV i TO-celler dyrket på L15 i stede for MEM som prøvd tidligere.

I denne oppgaven skulle jeg studere nærmere den antivirale effekten av IFN α 1, IFN β og IFN γ mot ILAV. Til disse forsøkene valgte vi ut både det høyvirulente Glesvær-isolatet, ILAV4, og det lavvirulente isolatet, ILAV7 (Mjaaland *et al.*, 2005). De to stammene med ulik virulens ble brukt for å se om de hadde ulik evne til å motsette seg effekten av IFN, og om dette dermed kunne være en medvirkende årsak til ulik virulens. Jeg fikk også i oppgave å sammenligne effekten av interferonene ved virusets optimumstemperatur på 15°C med effekten ved 20°C som hadde vært brukt til å påvise antiviral aktivitet i prosjektoppgaven min. Antiviral effekt ble studert ved følgende metoder: Cytopatogen effekt-reduksjonsmetode, kvantitativ PCR, Western blotting og virustitrering. Det ble også utført forsøk for å sammenligne induksjon av de antivirale proteinene Mx og ISG15 ved infeksjon av ILAV7 og ILAV4.

2.0 Materialer og metoder

2.1 Cellelinjer

Det ble benyttet to typer cellelinjer i forsøkene, TO-celler og ASK-celler, som begge har sitt opphav i fornyre hos atlantisk laks.

ASK-celler (Atlantic Salmon Kidney cells) ligner makrofager og er svært mottagelige for ILAV infeksjon (Devold *et al.*, 2000). ASK-cellene ble kjøpt fra ATCC© (lgcstandards-atcc.org) og dyrket på L15 Glutamax (Leibovitz medium) tilsatt 1% ikke-essensielle aminosyrer (NEAA), 1% streptomycin/penicillin og 10% føtalt bovint serum (FBS).

TO-celler uttrykker CD83 som er en markør for dendritiske celler og har fagocytisk aktivitet (Pettersen *et al.*, 2008; Wergeland *et al.*, 2001). TO-cellene var hente hos Heidrun Wergeland ved Universitetet i Bergen og dyrket på L15. Mediet ble tilsatt 1% NEAA, 1% streptomycin/penicillin og 8% FBS.

2.2 Virus

2.2.1 ILAV-isolater

Det høyvirulente ILAV4-isolatet Glesvaer/2/90 (ISAV4) og det lavvirulente ILAV7-isolatet (ISAV7) ble levert av Veterinærinstituttet i Oslo og er nærmere beskrevet i Mjaaland *et al.* (2005). Virusisolatene ble oppformert i ASK celler.

2.2.2 Titrering av ILAV

ASK celler ble infisert med ILAV4 og ILAV7, med en MOI på 0,1, fortynnet i 8 ml L15 uten serum. MOI betyr ”multiplicity of infection”, og vil si antall infeksjøs viruspartikler tilsatt til en brønn dividert med antall celler i brønnen. Cellene fikk absorbere virus i 3 timer før medium med virus ble fjernet og 20 ml L15 med 10% FBS ble tilsatt. Flaskene som ble brukt var 500 ml Nunc cellekulturflasker. Da nesten alle cellene var lysert, ble hele flaskene frosset ved -80°C. De ble så tint på is, og deretter frosset ned på nytt for å frigjøre intracellulære virus-partikler. Mediet ble sentrifugert ved 3000 rpm i 15 min ved 4°C for å fjerne cellerester. Til slutt ble virus-stocken fordelt på cryorør og frosset ned ved -80°C.

Virus- stockene ble titrert i TO-celler i 96-brønnersbrett ved følgende metode:

TO-celler i vekstmedium (L15 med 8% FBS) ble sådd ut i 96-brønnersbrett, 100 µl cellesuspensjon med 20 000 celler per brønn. Brettene ble inkubert ved 20 °C over natt. Lagde 10-folds fortyninger fra 10^{-1} til 10^{-11} av virus-stockene i L15 tilsatt 2% FBS. Mediet ble fjernet fra cellene i 96-brønnersbrettene, og hver av fortyningene ble tilsatt i åtte parallelle brønner. Det ble også tatt med åtte brønner med uinfiserte celler som kontroll (100% overlevelse). Cellebrettene ble inkubert ved 15°C inntil avlesning. Titrene ble beregnet ut fra metoden til Reed og Muench (Reed, 1938) da antall brønner med CPE hadde stabilisert seg etter 13 dager for begge isolater. Titeret for ILAV4 ble beregnet til $1,0 \times 10^8$ og titeret for ILAV7 til $3,7 \times 10^7$.

2.3 Interferoner

Stock-løsninger av rekombinant IFNa1, IFNb og IFNc fra atlantisk laks forelå som supernatanter fra humane HEK293 celler som var blitt transfektert med plasmider som uttrykker hver av de respektive interferonene. Disse var laget av forskere i Professor Børre Robertsens laboratorium som beskrevet i Robertsen *et al.* (2003). Konsentrasjonen av interferonene ble målt ved å teste antiviral aktivitet mot IPNV med cytopatogen effekt (CPE)-reduksjonsmetoden som beskrevet i Berg K. *et al.* (2009). Titeret til IFNa1 ble beregnet til 856.000 U/ml, titeret til IFNb ble beregnet til 5700 U/ml og titeret til IFNc ble beregnet til 8.173.000 U/ml. En unit interferon ble definert som den fortynningsfaktoren som beskyttet 50% av cellene mot virusindusert CPE.

2.4 Antiviralt assay med CPE-reduksjons-metoden

Måling av IFNa1, IFNb og IFNc sin evne til å beskytte lakseceller mot lysis forårsaket av ILAV infeksjon ble gjort med cytopatogen effekt (CPE)-reduksjonsmetoden som beskrevet for IPNV (Berg K. *et al.*, 2009). Assayene ble utført på IFNa1-, IFNb- og IFNc-behandlede ASK-celler smittet med ILAV4 og ILAV7. Det ble benyttet to inkubasjonstemperaturer ved virusinfeksjonen og påfølgende inkubering, 15° og 20°C.

2.4.1 Utsåing av celler, IFN-behandling og virusinfisering

ASK-celler ble sådd ut i 96-brønnersbrett, 100 µl medium med 25.000 celler per brønn. Disse ble inkubert ved 20°C. IFN ble tilsatt 24 timer etter utsåing av celler. Stock-løsningene av IFN ble fortynnet i vekstmedium (L15 tilsatt 10% FBS). IFNa1 og IFNc ble tilsatt i fortynninger fra 5 til 10.000 U/ml. IFNb ble kun tilsatt i fortynninger fra 5 til 500 U/ml på grunn av lavt IFNb-titer i stock-løsningen. Vekstmediet i 96-brønnersbrettene ble fjernet og IFN-fortynningene ble tilsatt i fire replikate brønner, 100 µl i hver brønn. I kontrollbrønnene (cellekontroll og viruskontroll) ble det tilsatt 100 µl vekstmedium uten IFN. Cellebrettene ble inkubert ved 20°C i 24 timer før infisering med virus.

Stock-løsningene av ILAV4 og ILAV7 ble fortynnet i medium uten FBS til en MOI som varierte fra 0,1 til 5. Fjernet medium med IFN fra cellene i brettene og tilsatte 100 µl ILAV-fortynning til alle brønnene bortsett fra brønnene som fungerte som cellekontroll (100 % overlevelse). Disse brønnene ble tilsatt 100 µl medium uten FBS. Cellebrettene ble inkubert ved 15° eller 20°C. Etter 3 timer ble medium fjernet fra brønnene, og det ble tilsatt 100 µl nytt medium med 2,5 % FBS. Brettene ble så inkubert ved henholdsvis 15° eller 20°C frem til full CPE utviklet seg i viruskontrollbrønnene uten IFN stimulering.

2.4.2 Farging av celler med krystallfiolett

Da de ustimulerte cellene hadde utviklet full CPE, ble mediet i brønnene fjernet, og 100 µl 1% krystallfiolett i 20% etanol ble tilsatt hver brønn. Cellebrettet ble så inkubert i 10 min ved romtemperatur. Vasket deretter brønnene fire ganger med 200 µl destillert H₂O. Vannet ble sugd av og brettene fikk tørke uten lokk ved romtemperatur (ca. 15 min). Overflødig krystallfiolett rundt brønnekantene ble fjernet med Q-tips og brønnene ble tilsatt 100 µl løsningsbuffer (0,05 M Na₃-sitratt og 0,5 M sitronsyre i 50% etanol). Satte så brettene på en ristmaskin i 5 min for å løse opp fargen i brønnene. Avleste lysabsorpsjonen ved 550 nm på en Softmax Pro 4.3 LS plateleser for å bestemme graden av overlevelse hos cellene i forhold til infiserte ustimulerte celler og uinfiserte celler.

Resultatene fra avlesningene ble videre behandlet i Excel. For å beregne celleoverlevelse ved OD550 ble det sett på gjennomsnittet av målingene for de ulike fortynningene. Celleoverlevelsen i prosent ble beregnet ut i fra uinfiserte celler (100% overlevelse) og infiserte ustimulerte celler (0%).

2.5 Kvantitativ RT-PCR

Kvantitativ, eller Real time, RT-PCR (reverse transkriptase polymerase chain reaction) av HE-genet hos ILAV ble utført for å undersøke om stimulering av ASK-celler med IFN α 1 kunne hemme replikasjon av ILAV4 og ILAV7 ved 15° og 20°C. Disse to virusene har identiske HE-sekvenser. Metoden går kort ut på å bestemme hvor mye et spesifikt gen er uttrykt ved å benytte seg av sekvensspesifikke primere og et fluoriserende fargestoff som binder dobbeltrådig DNA (gjelder for SYBR Green fra Applied Biosystems brukt i dette studiet). Etter å ha laget cDNA fra RNA, amplifiseres den aktuelle gensekvensen ved hjelp av kvantitativ RT-PCR, og det er dermed mengden av RNA som indirekte måles. PCR metoden har tre steg. Først splittes den dobbeltrådig DNA-kjeden opp ved at temperaturen økes. I neste steg senkes temperaturen og primerne fester seg på komplementære sekvenser på DNA-tråden. I steg tre amplifiserer en DNA polymerase en ny komplementær tråd, og man sitter igjen med dobbeltrådig DNA. Ved enden av hver syklus vil mengden DNA doubles fra den foregående, og økningen skjer derfor eksponentielt. Reaksjonen repeteres som regel i sykluser på 40 ganger. Forskjellen mellom vanlig PCR og Real time PCR er bruken av det fluoriserende fargestoffet som binder dobbeltrådig DNA. Ved bruk av standard PCR beregnes kun sluttmengden DNA etter de 40 syklusene. Ved real time PCR derimot kan mengden oppkopierte DNA bestemmes ved slutten av hver PCR syklus ved å måle fluoresensen på en Real time PCR maskin. I real time PCR kan man derfor i “real time” følge med på hvor mange PCR sykluser som må til før en kan begynne å detektere et dobbeltrådig DNA produkt. Dess færre sykluser en trenger før DNA produktet detekteres, dess større mengde hadde man uttrykt av genet fra starten av (Real-time PCR: From theory to Practice, 2008, ©InvitrogenCorporation; forklaring av Tina Svingerud, 2012).

2.5.1 IFN behandling og virusinfisering av celler

Sådde ut 100.000 ASK-celler i 1 ml L15 med 10% FBS per brønn i 24-brønners dyrkningsbrett. Etter 24 timer ved 20°C ble mediet fjernet og halvparten av brønnene ble tilsatt 1 ml 1000 U/ml IFN α 1 i vekstmedium mens resten ble kun tilsatt 1 ml vekstmedium. Brettene ble så inkubert videre ved 20°C. Etter 24 timer ble medium fjernet fra brønnene og ILAV4 og ILAV7 (MOI=1), fortynnet i L15 uten FBS, tilsatt i seks paralleller hver per brett. Halvparten av disse parallellene var stimulert med IFN α 1 og halvparten ustimulert.

Kontrollbrønnene ble kun tilsatt L15 uten FBS. Etter 3 timer ble medium fjernet, og brønnene ble tilsatt vedlikeholdsmedium. Cellebrettene ble inkubert i 15° og 20°C frem til høsting.

2.5.2 Høsting av celler

Cellene ble høstet 4, 24, 72 og 120 timer etter infisering med ILAV. Medium ble fjernet fra brønnene og cellene ble vasket i 1 x PBS, 1 ml per brønn. Høstet deretter cellene i 350 µl RLT høstebuffer (fra RNeasy® Mini Kit fra Qiagen) tilsatt 10 µl β-mercaptoethanol. For å homogenisere prøvene ble de spylt gjennom 1 ml sprøyter med 0,9 mm kanyler 5-7 ganger. Prøvene ble frosset ned ved - 80°C.

2.5.3 RNA isolering

Til å rense RNA ble det benyttet RNeasy® Mini Kit fra Qiagen. RNA-prøvene ble tint på is og mikset med et lett knips for å løse opp utfelling. Prøvene ble så sentrifugert før de ble tilsatt 350 µl 70% etanol, og blandet godt. Hadde alt over i hver sin RNeasy spinkolonne og sentrifugerte prøvene i 1 min ved 8.000 x g. Byttet oppsamlingsrør og vasket kolonnene med 700 µl RW1 buffer før de på nytt ble sentrifugert i 1 min ved 8.000 x g. Oppsamlingsrøret ble på nytt byttet og 500 µl RPE buffer ble tilsatt før spinning i 1 min ved 8.000 x g. Gjentok en gang til med 500 µl RPE buffer, men sentrifugerte denne gangen 2 min. Satte kolonnen med prøve i et 1,5 ml Eppendorfrør og sentrifugerte 1 min ved full hastighet for å tømme kolonnene. Gjentok dette trinnet. Overførte kolonnene til et nytt Eppendorfrør og tilsatte 30 µl RNase-fritt vann direkte på membranen i kolonnene. Sentrifugerte i 1 min ved 8.000 x g. Overførte eluatene til nye Eppendorfrør som ble satt på is. Leste så av RNA-konsentrasjonen ved bruk av NANODROP-apparatet. Frøs prøvene ved - 80°C.

For å kontrollere at RNA ikke var degradert, ble det kjørt en elektroforese etter RNA isoleringen. Benyttet en 1% agarosegel som ble kjørt i 15 min ved 200 V. Gelsystemet benyttet var Liberty2System.

2.5.4 cDNA syntese

cDNA syntese ble utført på RNA prøvene ved bruk av QuantiTect Reverse Transcriptase kit fra QIAGEN. RNA-prøvene ble fortynnet ut i RNase-fritt H₂O til 150 ng/µl for å kunne pipettere et egnet volum. Tilsatte 2 µl gDNA Wipeout Buffer, 7x, til det antall brønner i sterile strips som det var RNA-prøver. RNase-fritt H₂O og RNA prøve ble så tilsatt i stripsene.

Volumet av RNase-fritt H₂O og RNA prøve i hver strips skulle til sammen være 12 µl. Hvor mye av hver som ble tilsatt kom an på hvor stort RNA innhold som var målt på NANODROP. Stripsene med prøvene ble inkubert i 2 min ved 42°C. Prøvene ble satt på is etter inkuberingen.

Etter inkuberingen ble revers-transkriptase mastermix laget etter antall RNA prøver:

Komponent	Volum per reaksjon/prøve
Quantiscript Reverse Transcriptase	1 µl
Quantiscript RT Buffer, 5 x	4 µl
RT primermix	1 µl

Tilsatte 6 µl mastermix til hver prøve, og stripsene ble sentrifugert. Inkuberte prøvene i en PCR maskin ved 42°C i 10 min, og så ved 95°C i 3 min for å inaktivere revers-transkriptasen. Oppbevarte deretter prøvene i -20°C frem til PCR ble utført.

2.5.5 Kvantitering av virus med Real time PCR

Alle prøvene ble analysert både med primere for 18S rRNA og ILAV HE (se tabell 1) på en ABI 7500 Real-Time PCR maskin. 18S rRNA ble benyttet som referanseggen, dvs. at mengden av ILAV HE i hver prøve ble relatert til mengden av 18S rRNA i samme prøve for å justere for små forskjeller mellom RNA brukt i hver enkelt cDNA syntese reaksjon (se utregning i punkt 2.5.6). cDNA prøvene ble analysert i fortykning 1:10 for HE-primere, mens de ble analysert i fortykning 1:1000 for 18S primere. Laget mastermix ut i fra antall prøver:

Komponent	Volum per reaksjon/prøve
SYBR® Green PCR Mastermix (fra Applied Biosystems)	7,5 µl
Primer R (18S eller s6)	0,7 µl
Primer F (18S eller s6)	0,7 µl

Tabell 1: Informasjon om primerne benyttet i Real-Time PCR.

Målgen	Primer		Amplikonstørrelse (bp)	E(primer-effektivitet)
	Navn	Sekvens (5' - 3')		
18S	As18F (forward)	TGTGCCGCTAGAGGTGAAATT	110	1.863
	As18R (revers)	GCAAATGCTTTTCGCTTTCG		
ILAV HE	ISAV s6 F (forward)	GAAGCAGATGAGTGGAAAGGTTTC	93	2
	ISAV s6 R (revers)	CCGTCAGTGCAGTCATTGGT		

Tilsatte 8,9 µl mastermix til brønnene i MicroAmp® Fast Optical 96- brønners reaksjonsplate fra ABI (Applied biosystems). 6,1 µl fortynnet prøve ble deretter tilsatt i brønnene, og en MicroAmp® Optical Adhesive film ble lagt over. Sentrifugerte platen og satte den i PCR maskinen. Real time PCR oppsettet bestod av tre steg. I steg 1 ble prøvene holdt ved 95°C i 20 sek. I steg 2 ble prøvene holdt ved 95°C i 3 sek og 60°C i 30 sek. Steg 2 ble gjentatt 40 ganger. I steg 3 ble prøvene holdt ved 95°C i 15 sek, 60°C i 1 min og 95°C i 15 sek. Etter endt PCR-analyse ble resultatene behandlet i Excel

2.5.6 Utregninger

For å se på den relative kvantifiseringen av målgenet i forhold til et referansegene ble det benyttet en metode kalt Pfaffl-metoden (Pfaffl, 2001), med denne ligningen:

$$\text{Oppregulering av gen (Ratio)} = \frac{(E_{\text{målgen}})^{\Delta\text{Ct målgen (kontroll-prøve)}}}{(E_{\text{ref}})^{\Delta\text{Ct ref (kontroll-prøve)}}$$

Oppreguleringen (R) for et målgen er kalkulert basert på E (primereffektiviteten) og forskjellen i Ct verdi til en ukjent prøve i forhold til en kontroll, uttrykt i forhold til et referansegene. $E_{\text{målgen}}$ er effektiviteten til målgenet, i dette tilfellet ISAV s6, mens E_{ref} er effektiviteten til referansegene 18S. $\Delta\text{Ct}_{\text{målgen}}$ er Ct-verdien for målgenet til kontrollprøven minus Ct-verdien til en ukjent prøve. $\Delta\text{Ct}_{\text{ref}}$ er Ct-verdien til referansegene til kontrollprøven minus Ct-verdiene til en ukjent prøve (Pfaffl, 2001). Primereffektiviteten for hvert primerpar er oppgitt i Tabell 1.

2.6 Western blotting

Deteksjon av HE, Mx, ISG15 og aktin i ASK-celler infisert med ILAV4 og ILAV7, ble utført med Western blotting etter produsentens (Invitrogen) anbefalinger i protokollen NuPAGE® Technical Guide, General information and protocols for using the NuPAGE® electrophoresis system. Rev. date: 29 October 2010, (http://tools.invitrogen.com/content/sfs/manuals/nupage_tech_man.pdf).

2.6.1 IFN behandling og virusinfisering av celler

ASK-celler ble sådd ut i 24 brønners brett med 150.000 celler i 1 ml L15 med 10% FBS per brønn. Brettene ble inkubert i 20°C. 24 timer senere ble medium fjernet fra cellene, og hver brønn ble tilsatt 1000 U/ml IFN α 1 i 1 ml L15 med 10% FBS eller medium uten IFN som kontroll.

Etter 24 timer ble medium fjernet fra brønnene og ILAV4 og ILAV7 (MOI=1 eller 5) fortynnet i L15 uten FBS ble tilsatt i seks paralleller hver per brett. Tre av disse parallellene var stimulert med IFN α 1, og tre var ustimulerte. Kontrollbrønnene ble kun tilsatt L15 uten FBS. Etter 3 timer ble medium fjernet, og brønnene ble tilsatt vedlikeholdsmedium (L15 med 2,5 % FBS). Cellebrettene ble inkubert ved 15° og 20°C frem til høsting.

2.6.2 Høsting av celler

Cellene ble høstet 24, 48, 72, 96 og 120 timer etter infisering med ILAV. Medium ble fjernet fra brønnene og cellene ble vasket i 1 x PBS, 1 ml per brønn. Høstet deretter cellene i 70 μ l 2 x SDS høstebuffer (se vedlegg for oppskrift). Prøvene ble frosset ned ved - 80°C.

2.6.3 SDS-PAGE elektroforese

Til SDS-PAGE elektroforesen ble det brukt 12 og 17 brønners ferdigstøpte NuPAGE® 4-12% Bis-Tris geler. Elektroforesesystemet benyttet var XCell SureLock® Mini-Cell fra Novex® (Katalognummer EI0001, EI0020, EI0002, <http://www.lifetechnologies.com/global/en/home.html>). Brukerveiledning finnes på: http://tools.invitrogen.com/content/sfs/manuals/surelock_man.pdf, Revisjonsdato 15.02.12, Publication Part number IM-9003, MAN0000739. Prøvene ble varmet til 90°C i 10 min før påsetting på gel. Til påsetting i brønnene på gelen ble det benyttet 10 μ l av hver prøve. I tillegg ble det påsatt 1,5 μ l Magic Mark™ Western Protein Standard (20-220 kDa) fra Invitrogen i en brønn og 5 μ l SeeBlue®Plus2 Prestained Standard 2 fra Invitrogen i en brønn. Elektroforesen ble kjørt i NuPAGE MOPS SDS Running buffer i 50 min ved 200 V.

2.6.4 Blotting

Blotting av gelene ble gjort for å overføre proteinbåndene fra elektroforesegelen og over på en PVDF (polyvinylidene fluoride) 0,45 μ m poresize Immobilon®-P transfer membran hvor proteinene binder seg sterkt og blir tilgjengelig for videre påvisning. Blottingen ble utført i

glycin/Tris 1 x blottingbuffer med 20% metanol i 60 minutter ved 30 Volt. Blottingsystem benyttet til denne prosedyren var XCell II™ Blot Module fra Invitrogen™ (Katalog nummer EI9051, <http://www.lifetechnologies.com/global/en/home.html>). Brukerveiledning finnes her: http://tools.invitrogen.com/content/sfs/manuals/blotmod_pro.pdf, Revisjonsdato 14.12.09, Manual part no. IM9051, MAN0000740.

2.6.5 Blokkering og antistoff-inkubering

Etter blottingen ble membranene vasket 2 x 5 min med TBS på ristemaskin før de ble blokkert i 1 time med 5% tørrmelk i TTBS. Membranene ble så lagt i 50 ml Falconrør med primært antistoff fortynnet i TTBS med 0,5% tørrmelk og inkubert rullende over natt ved 4°C. Dagen etter ble membranene vasket i 3 x 5 min med TTBS før de ble inkubert med sekundært antistoff fortynnet i TTBS 1 time på ristemaskin. Fortynningene av primært og sekundært antistoff er vist i tabell 2. Membranene ble deretter vasket i 2 x 5 min med TTBS, 1 x 5 min i TBS og 1 x 5 min i PBS på ristemaskin.

Tabell 2: Polyklonale antistoffer benyttet ved Western blotting.

Primært antistoff	Fortynning	Referanse
Kanin anti-ISG15 laks	1:20.000	Røkenes, T.P. <i>et al.</i> (2007)
Anti-Mx laks (1mg/ml)	1:3000	Laget i Robertsens lab (upublisert)
Kanin anti-ILAV HE	1:2000	Krossøy B. <i>et al.</i> (2001)*
Anti-aktin antistoff produsert i kanin	1:4000	Sigma-Aldrich, katalog nr: A2066
Sekundært antistoff		
Goat anti-rabbit IgG-HRP	1:10.000	Santa Cruz Biotechnology, katalog nr: sc-2004

* Gave fra Dr. Anita Müller, NFH.

2.6.6 Fremkalling

Før fremkalling ble membranene tilsatt Super Signal West Pico Chemiluminescent Substrate fra Thermo Scientific. Bilder av membranene ble digitalt fremkalt ved hjelp av Carestream Molecular Imagine Software standard edition v 5.0.2.30.

2.6.7 Stripping av membran

Aktin ble analysert for å vurdere proteinmengden som var påsatt gelene. For å kunne analysere aktin, måtte membranene i noen tilfeller strippest for antistoffer etter analyse av de andre proteinene. Dette fordi molekylvekten på enkelte av de andre proteinene var veldig nær aktinets molekylvekt og det kunne være vanskelig å skille båndene fra hverandre. Etter fremkalling ble membranene vasket 5 min i H₂O, 15 min i 0,2 M NaOH, 5 min i H₂O og 5 min i TTBS. Deretter ble samme prosedyre med tilsetning av primærantistoff, sekundærantistoff og fremkalling som beskrevet i punkt 2.6.5 og 2.6.6 utført.

2.6.8 Utregning av ROI-verdier

ROI-verdiene står for "region of interest" og angir signalstyrken hos protein-båndene på membranen. Disse ble målt på et "molecular imaging system" fra Carestream Health ved hjelp av Carestream Molecular Imagine Software standard edition v 5.0.2.30. For å kunne sammenligne styrken på de ulike båndene på en membran ble ROI-verdiene til proteinbåndene dividert med ROI-verdiene for aktin på samme membran. De prøvene hvor signalstyrken på båndene ble målt, ble kjørt i tre parallelle forsøk slik at standardavvik og eventuelle signifikante forskjeller kunne beregnes.

2.7 Titrering av virus i supernatanter fra celler infisert med ILAV4 og 7 med og uten IFN behandling

For å måle virusmengden av ILAV4 og ILAV7 i prøver med og uten interferonbehandling, ble det utført titreringer av virus etter TCID₅₀-metoden til Reed og Muench (Reed, 1938). Her ble virusmengdene målt i mediesupernatantene fra ASK-celler som var stimulert med IFN α 1 og høstet etter 72 timer, fra forsøket med Real time PCR. Hver prøve ble sådd ut i tre paralleller som ble titrert. Til sammen ble 24 prøver titrert.

TO-celler i vekstmedium (L15 med 8% FBS) ble sådd ut i 96-brønnersbrett, 100 μ l celleduspensjon per brønn, hvor det var beregnet å være 20.000 celler per brønn. Brettene ble inkubert ved 20°C over natten. Lagde 10-folds fortyninger av de 24 supernatantprøvene fra 10⁻¹ til 10⁻¹⁰ i L15 med 2% FBS. Mediumet ble fjernet fra cellene i 96-brønnersbrettene, og fortyningene ble tilsatt i åtte paralleller hver. Det ble også tatt med åtte brønner med

uinfiserte celler som kontroll. Cellebrettene ble dyrket ved 15°C inntil avlesning. Titrene ble avlest etter 14 dager da antall brønner med CPE hadde stabilisert seg.

Titrene ble beregnet ut fra og et gjennomsnitt av de tre parallellene av hver prøve, og ble brukt videre til å sette opp figurer i Excel.

3.0 Resultater

3.1 Cytopatogen effekt reduksjonsassays - Mål på antiviral aktivitet av IFNa1, IFNb og IFNc mot ILAV4 og ILAV7 i ASK-celler inkubert ved 15 og 20°C.

Tidligere studier har vist at type I IFN (IFNa1) fra laks ikke har antiviral effekt mot et høyvirulente ILAV-isolat av Glesvær-typen i SHK-1 og TO-celler (Jensen *et al.*, 2001; Kileng *et al.*, 2007). Resultater fra prosjektoppgaven min viste imidlertid at IFNa1 har antiviral effekt mot ILAV i ASK-celler (Holand, 2010). Disse cellene ble derfor valgt for å undersøke nærmere om type I IFN fra laks har evne til å hemme ILA-virus. I første omgang ble det utført cytopatogen effekt (CPE) reduksjonsassay med ASK-celler basert på IFN sin evne til å hemme virus-mediert lysis av cellene. I dette arbeidet ble det bestemt å undersøke antiviral effekt mot det høyvirulente ILAV4-isolatet som er av Glesvær-type og det lavvirulente ILAV7-isolatet. Det var disse virusisolatene som ble benyttet i prosjektoppgaven i 2010. I første omgang ble assayene utført ved 15°C, som er temperaturoptimum for ILAV (Falk *et al.*, 1997). Til dette ble det valgt å bruke ILAV7 siden det er lavvirulent og lot seg hemme godt ved IFN stimulering i prosjektoppgaven min. Da IFN viste seg å ha liten antiviral effekt ved 15°C, ble det også utført assays ved 20°C som var den temperaturen brukt i prosjektoppgaven min. Det ble satt opp assays med fire ulike virusdoser av ILAV7 (MOI 0,1, 0,5, 1 og 5) og tre ulike doser av ILAV4 (MOI 0,5, 1 og 5) ved 20°C. ASK-cellene ble tilsatt fortyningsserier av IFNa1, IFNb eller IFNc og inkubert i 24 timer før mediet med IFN fjernet og cellene infisert med ILAV. Da de ubehandlede infiserte cellene viste full cytopatogen effekt (CPE), ble cellene farget med krystallfiolett og lysabsorpsjon avlest ved 550 nm. Prosent overlevelse av cellene ble beregnet i forhold til ubehandlede uinfiserte celler (100 % overlevelse) og ubehandlede infiserte celler (0% overlevelse). Et sammendrag av de samlede resultatene for CPE-reduksjonsassayene er gitt i Tabell 3.

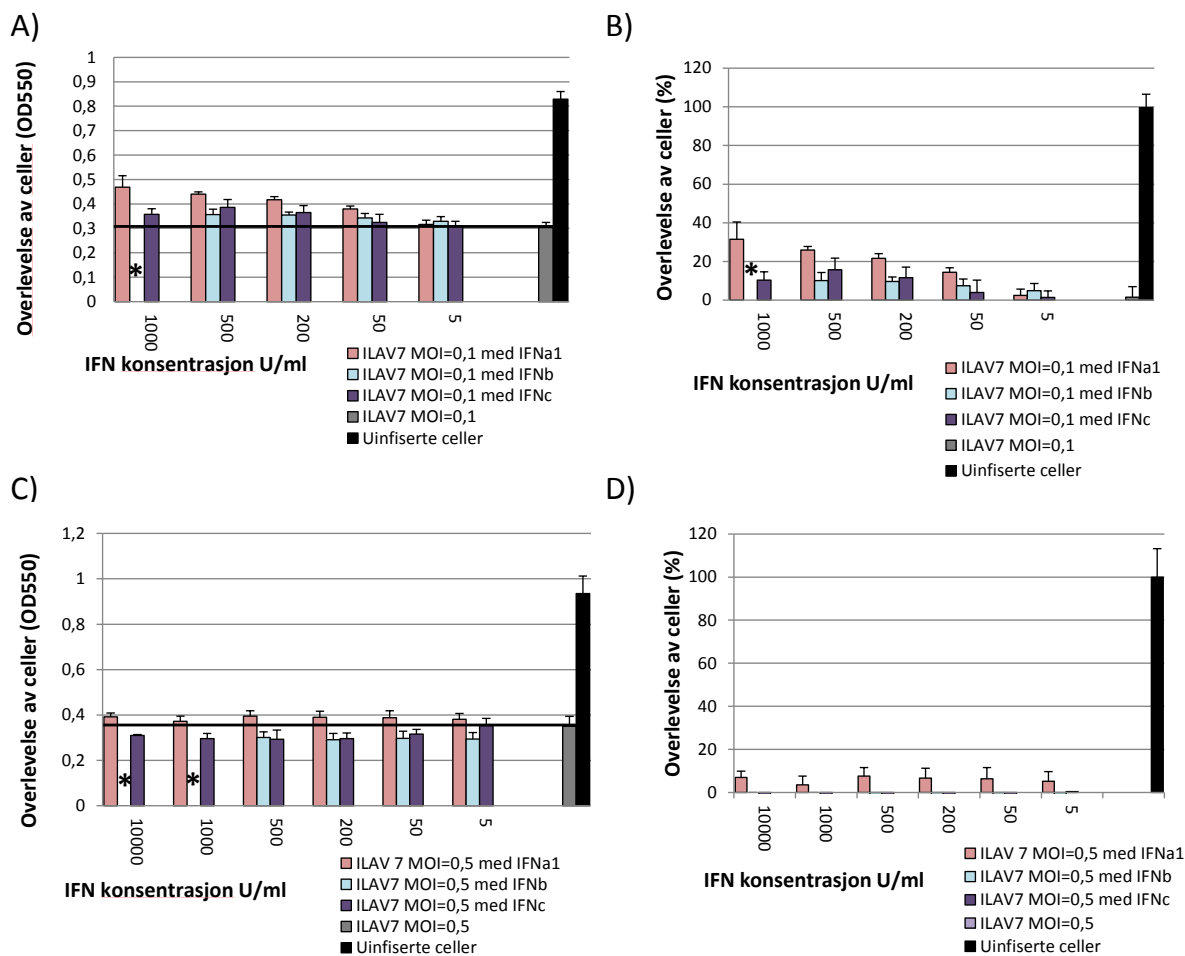
Tabell 3: CPE- reduksjonsassays: Prosentvis overlevelse av IFN behandlede celler infisert med ILAV4 og 7 ved ulike temperaturer og MOI. *Ikke analysert. - Ingen overlevelse.

Konsentrasjon U/ml		ILAV4		ILAV7				
		20°C		15°C		20°C		
		MOI=1	MOI=5	MOI=0,1	MOI=0,5	MOI=0,5	MOI=1	MOI=5
IFNa1	10.000	*	*	*	7%	84%	*	*
	1000	82%	56%	32%	4%	85%	54%	21%
	500	83%	60%	26%	8%	83%	65%	30%
	200	79%	50%	22%	7%	60%	56%	32%
	50	79%	51%	15%	6%	39%	46%	37%
	5	31%	-	3%	5%	7%	4%	-
IFNb	10.000	*	*	*	*	*	*	*
	1000	*	*	*	*	*	*	*
	500	54%	4%	10%	-	35%	0,03%	-
	200	55%	9%	10%	-	29%	7%	7%
	50	48%	22%	8%	-	29%	6%	0,3%
	5	13%	-	5%	-	5%	-	-
IFNc	10.000	*	*	*	-	69%	*	*
	1000	66%	19%	10%	-	67%	39%	14%
	500	75%	29%	16%	-	44%	53%	20%
	200	76%	32%	12%	-	22%	52%	27%
	50	74%	39%	4%	-	5%	62%	23%
	5	49%	8%	1%	0,4%	7%	13%	-

3.1.1 ILAV7 infiserte celler inkubert ved 15 °C

På grunn av at ILAV har sitt temperaturoptimum ved 15°C, ble det valgt lave MOI konsentrasjoner ved CPE-reduksjonsassayene ved denne temperaturen. Assayene infisert med ILAV7 med en MOI på 0,1 oppnådde full CPE etter 9 dager, mens infeksjon med ILAV7 med en MOI på 0,5 oppnådde full CPE etter 8 dager.

Alle assayene inkubert ved 15°C viste liten beskyttelse av IFN mot ILAV7 (Figur 4). Selv ved MOI på 0,1 og IFNa1-konsentrasjon på 1000 U/ml, var beskyttelsen bare på ca. 30%. Beskyttelsen med IFNb var \leq 10% (500 U/ml), mens beskyttelsen med IFNc var \leq 16%. Ved MOI på 0,5 var beskyttelsen med IFNa1 $<$ 10%, mens IFNb og c ikke ga noen beskyttelse.



Figur 4: Antiviral aktivitet av IFNα1, IFNβ og IFNγ mot ILAV7 i ASK-celler ved 15°C. Cellene ble inkubert med IFN i 24 timer før de ble infisert med ILAV7 ved to ulike MOI. Cellene ble farget med krystallfiolett da det ble observert full CPE etter 8-9 dager. OD ble målt ved 550nm og gjennomsnittsverdien for uinfiserte ubehandlede celler ble fratrukket. Prosent overlevelse er beregnet i forhold til OD550 av uinfiserte celler (100% overlevelse). A) og B) ILAV7 ved MOI=0,1. C) og D) ILAV7 ved MOI=0,5. *Ikke analysert.

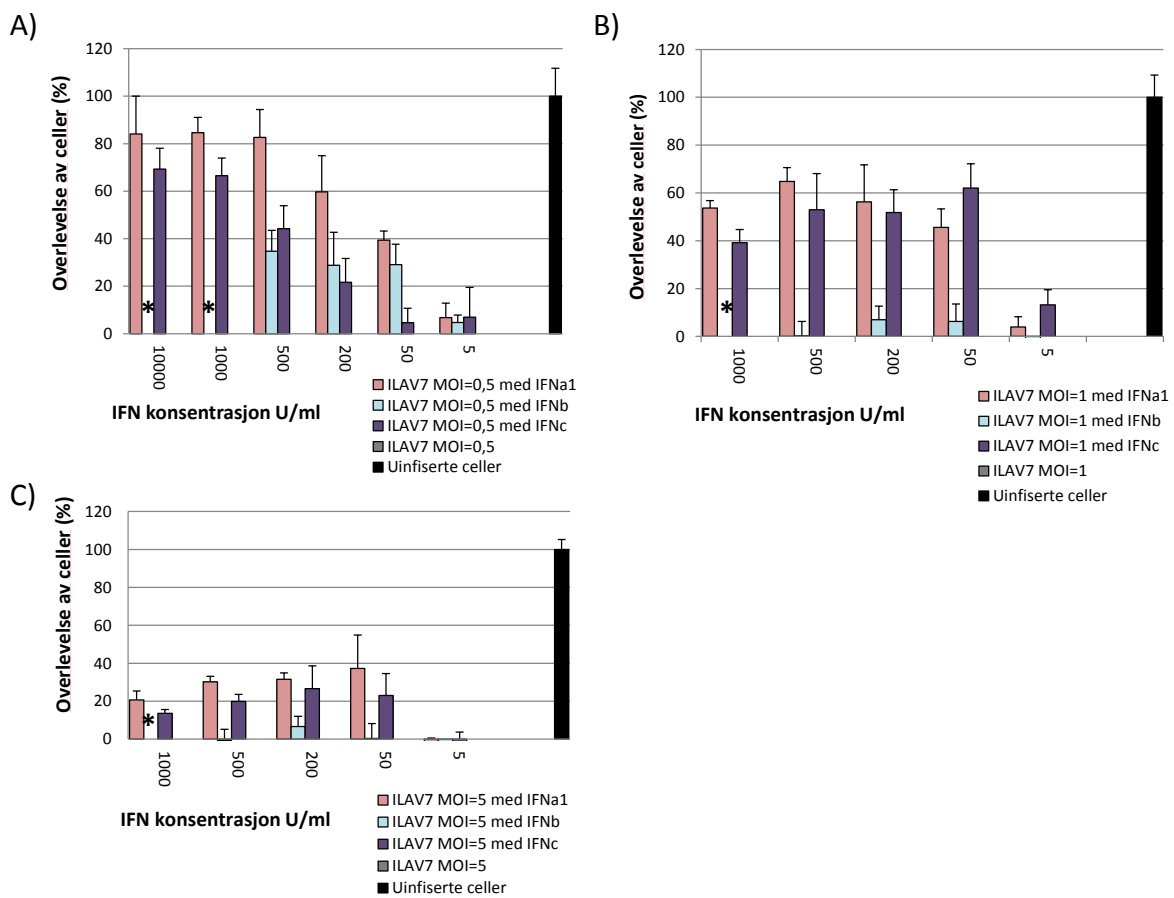
3.1.2 ILAV7 infiserte celler inkubert ved 20°C

ASK-celler infisert med ILAV7 med MOI på 0,5, 1 og 5 oppnådde full CPE etter henholdsvis 11, 7 og 6 dager ved 20°C. ASK-celler infisert med ILAV7 med MOI på 0,1 utviklet ikke CPE ved denne temperaturen.

Som vist på figur 5, ga både IFNα1, IFNβ og IFNγ beskyttelse av celler som ble infisert med ILAV7 ved MOI 0,5. Den beskyttende effekten avtok ved infeksjon med høyere virusdoser. Med MOI 0,5 ga IFNα1 en maksimal overlevelse på ca 80% ved konsentrasjoner ≥ 500 U/ml. IFNγ ga en maksimal overlevelse på ca. 70% ved konsentrasjoner ≥ 1000 U/ml. Den høyeste

konsentrasjonen av IFNb som ble testet var 500 U/ml og ga en overlevelse på ca 35%. Høyere konsentrasjoner av IFNb kunne ikke testes fordi utbyttet av rekombinant IFNb er svært lite sammenlignet med IFNa1 og IFNc.

Celleoverlevelsen hos ILAV7 infiserte celler stimulert med IFNa1 hadde en overlevelse på opp mot 65% ved MOI 1, mens ved den høyeste MOI 5 sank celleoverlevelsen ned til rundt 30%. De IFNb stimulerte cellene hadde en overlevelse på under 10% ved MOI=1 og 5. IFNc hadde en overlevelse på henholdsvis 60% og 20% ved MOI 1 og 5.



Figur 5: Antiviral aktivitet av IFNa1, IFNb og IFNc mot ILAV7 i ASK-celler ved 20°C. Cellene ble inkubert med IFN i 24 timer før de ble infisert med ILAV7 ved tre ulike MOI. Cellene ble farget med krystallfiolett da det ble observert full CPE etter 6-11 dager. OD ble målt ved 550nm og gjennomsnittsverdien for uinfiserte ubehandlede celler ble fratrukket. Prosent overlevelse er beregnet i forhold til OD550 av uinfiserte celler (100% overlevelse). A) ILAV7 ved MOI=0,5 B) ILAV7 ved MOI=1. C) ILAV7 ved MOI=5. *Ikke analysert.

3.1.3 ILAV4 infiserte celler inkubert ved 15°C

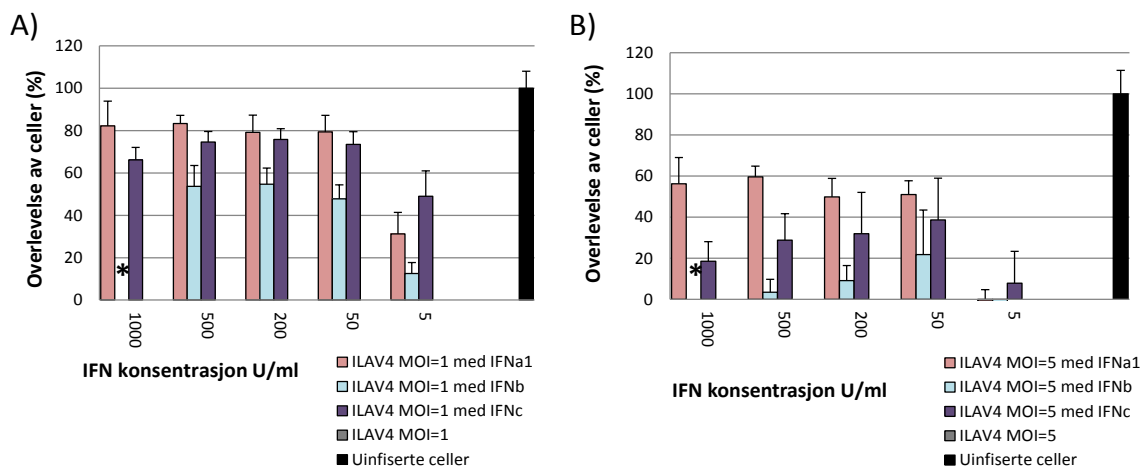
På bakgrunn av at forsøk med det lavvirulente isolatet ILAV7 ikke viste noen celleoverlevelse ved 15°C ble det bestemt å ikke sette opp antivirale assays for ILAV4 ved denne temperaturen. ILAV4 er et høyvirulent isolat, og det ble derfor ikke forventet at det skulle gi mere overlevelse enn det lavvirulente isolatet ved optimumstemperatur.

3.1.4 ILAV4 infiserte celler inkubert ved 20°C

ASK-cellene infisert med ILAV4 ved en MOI på 1 og 5 oppnådde full CPE etter henholdsvis 7 og 6 dager. Assayet med en MOI på 0,5 utviklet aldri CPE.

Som vist i figur 6, ga IFNa1, IFNb og IFNc beskyttelse av ASK-celler også mot ILAV4 og beskyttelsen var høyere ved MOI=1 enn MOI=5. Med MOI=1 ga IFNa1 en maksimal overlevelse på ca 80% ved konsentrasjoner ≥ 50 U/ml. IFNc ga en maksimal overlevelse på ca. 76% ved konsentrasjoner ≥ 50 U/ml. IFNb ga en maksimal overlevelse på ca. 55% ved konsentrasjoner ≥ 200 U/ml. Ved MOI=5 var celleoverlevelsen på 60%, 22% og 39% ved IFNa1, IFNb og IFNc stimulering ved konsentrasjoner ≥ 50 U/ml.

Siden IFNa1 var det interferonet som så ut til å gi den høyeste celleoverlevelsen ved ILAV-infeksjon, var det denne type I IFN som ble brukt videre i de andre metodene.



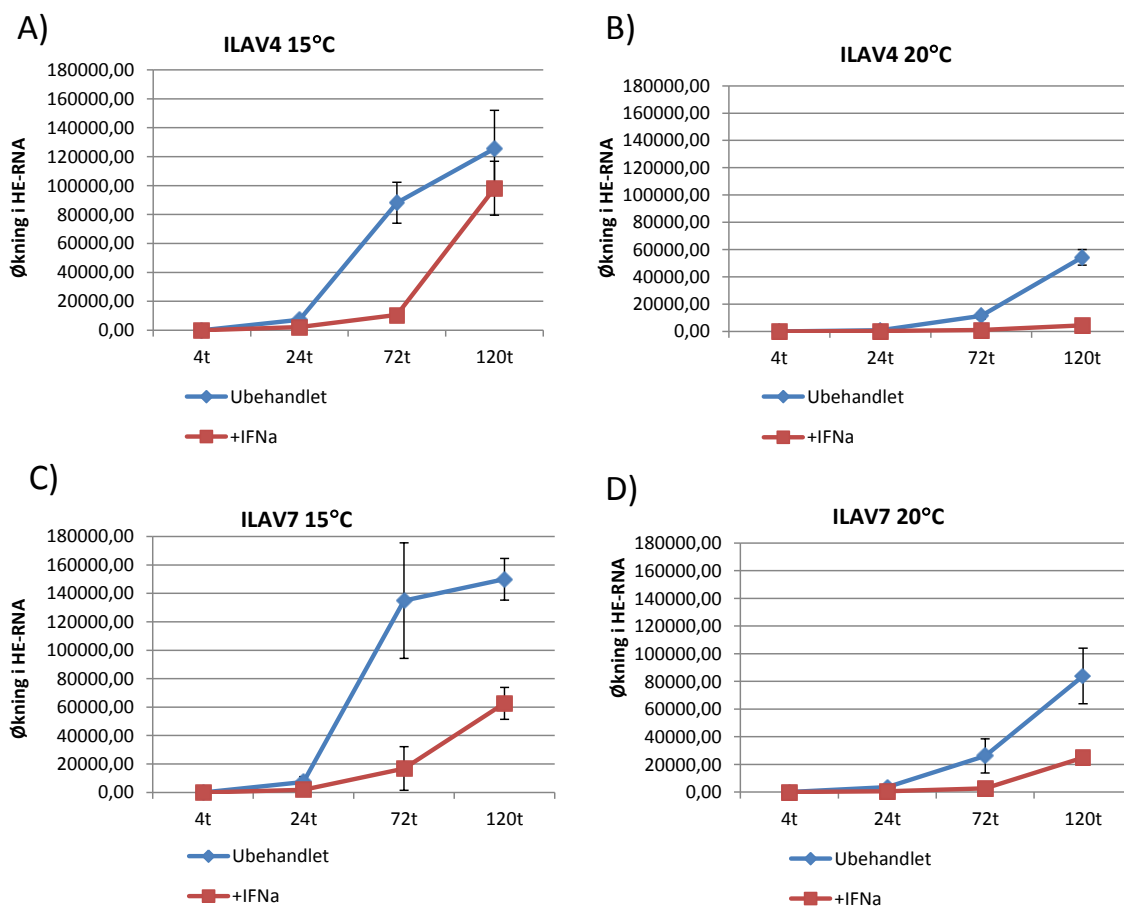
Figur 6: Antiviral aktivitet av IFNa1, IFNb og IFNc mot ILAV4 i ASK-celler ved 20°C. Cellene ble inkubert med IFN i 24 timer før de ble infisert med ILAV4 ved to ulike MOI. Cellene ble farget med krystallfiolett da det ble observert full CPE etter 6-7 dager. OD ble målt ved 550nm og gjennomsnittsverdien for uinfiserte ubehandlede celler ble fratrukket. Prosent overlevelse er beregnet i forhold til OD550 av uinfiserte celler (100% overlevelse). A) ILAV4 ved MOI=1 B) ILAV4 ved MOI=5. *Ikke analysert.

3.2 Effekt av IFN på replikasjonen av ILAV4 og ILAV7 målt ved transkripsjonen av hemagglutinin-esterase (HE) genet

Kvantitativ PCR av HE-genet (segment 6) ble brukt for å se på replikasjonen til ILAV4 og ILAV7 ved 15°C og 20°C med eller uten IFN α 1 behandling ved fire ulike tidspunkt post-infeksjon (p.i.). Siden HE-gensekvensen til de to stammene er (tilnærmet) like, kunne samme primere benyttes i studiet, og genuttrykkene kunne derfor også relateres til hverandre. Celler ble sådd ut i 24 brønners brett hvor halvparten av cellene ble behandlet med IFN α 1 med en konsentrasjon på 1000 U/ml i 24 timer. Cellene ble infisert med virus med MOI=1. RNA isolering, cDNA syntese, og kvantitativ PCR av HE-genet, som er vist i figur 2, ble deretter utført.

For å kunne sammenligne uttrykket mellom de to stammene på de to temperaturene ble alle verdiene relatert til mengden av HE fire timer p.i. i de ILAV4 infiserte cellene dyrket ved 20°C. Dette fordi det her var lavest uttrykk av HE (det vil si, den høyeste Ct-verdien på 31,33). Utover dette var uttrykket av HE-genet veldig likt ved 4 timer mellom ILAV4 og ILAV7 på de to ulike temperaturene. Ved dette tidspunktet er sannsynligvis ikke virusreplikasjonen ordentlig i gang, og det tyder derfor på at et veldig likt antall celler er infisert, noe som kan brukes som en bekreftelse på at relativt like mengder virus er tilsatt.

Som vist i figur 7, var replikasjonen av virus-isolatene som forventet høyere ved 15°C enn ved 20°C. De to virusene ser ut til å replikere relativt likt, men det er en antydning til at ILAV7 har noe bedre vekst enn ILAV4 ved 20°C, og at den totale mengden ILAV7-HE ved 120 t er noe høyere enn ved ILAV4. IFN α 1 hemmet replikasjonen av begge virusene ved begge temperaturene. Ved 15°C er hemmingen tydeligst ved 72 timer p.i. (8 ganger reduksjon i transkripsjonsnivået av HE-genet både for ILAV4 og ILAV7). IFN α 1-indusert hemming av replikasjon er mindre ved 120 t (1,3 x lavere transkripsjon av ILAV4-HE og 2,4 ganger for ILAV7), og når det gjelder replikasjonen av ILAV4 i IFN α 1-behandlede celler ved dette tidspunktet var det ikke lengre noen signifikant forskjellig fra ubehandlede celler. Ved 20°C hemmer IFN α 1 ILAV4 replikasjonen 11.5 gang ved 72t, mens ILAV7 hemmes 9.6 ganger. Det var fremdeles en uttalt hemming også ved 120 timer (12,5 x for ILAV4 og 3,4 x for ILAV7).



Figur 7: ILAV4 og ILAV7 replikasjon i ASK celler med og uten IFN behandling ved 15 og 20°C målt ved kvantitativ PCR. Celler ble sådd ut i 24 brønners Brett hvor halvparten av cellene ble behandlet med IFN α 1 med en konsentrasjon på 1000 U/ml i 24 timer. Cellene ble infisert med virus med MOI=1. RNA isolering, cDNA syntese, og kvantitativ PCR av HE-genet ble deretter utført. Figuren viser antall ganger økning i HE-mRNA i forhold til ILAV4 ved 20°C som hadde den laveste verdien ved 4 timer (Ct=31,33). A) ILAV4 inkubert ved 15°C. B) ILAV4 inkubert ved 20°C. C) ILAV7 inkubert ved 15°C. D) ILAV7 inkubert ved 20°C.

3.3 Induksjon av Mx-protein og hemming av HE-protein ved IFN α 1 behandling av celler infisert med ILAV 4 og 7

IFN α 1 sin evne til å hemme produksjonen av virusprotein HE og indukere det antivirale proteinet Mx i ILAV4 og ILAV7 infiserte ASK-celler ble analysert med Western blotting (figur 8). Ubehandlede celler og celler behandlet med 1000 U/ml IFN α 1 ble infisert med virus (MOI=1). Cellene ble høstet i lysis-buffert 24, 48, 72, 96 og 120 timer etter virusinfeksjon og analysert for Mx, HE og aktin ved Western blotting. Forsøkene ble utført både ved 15°C og 20°C.

3.3.1 Effekt av IFN α 1 på ekspresjon av HE-proteinet

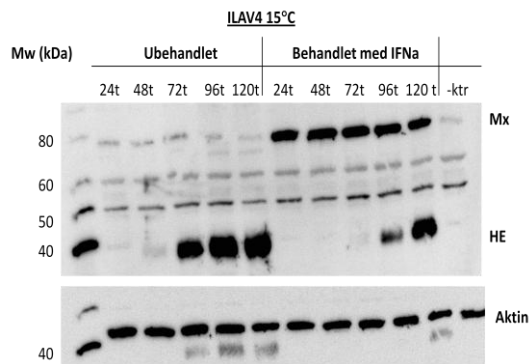
Resultatene fra Western blottingen av HE var relativt like både for ILAV4 og ILAV7 (figur 8). Ustimulerte celler infisert med ILAV4 og ILAV7 viste økning i HE protein fra 48 til 120 timer både ved 15°C og 20°C. Intensiteten i HE-båndene mettes antakelig utover i infeksjonsforløpet og økningen blir dermed mindre tydelig. Derimot var HE-protein i IFN α 1 behandlede celler som var infisert med ILAV4 og ILAV7 nesten ikke detekterbart ved noen tidspunkter ved 20°C. For både ILAV4 og ILAV7 ved 15°C, var HE-mengden sterkt redusert mellom 24 og 96 timer i IFN- behandlede celler, men økte tydelig ved 96 til 120 timer.

3.3.2. Induksjon av Mx

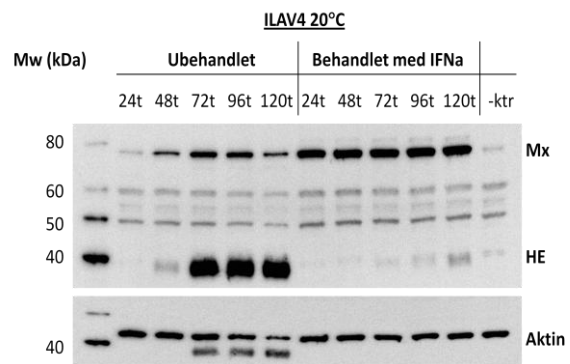
Som vist i figur 8A, inneholdt ubehandlede celler infisert med ILAV4 ved 15°C svakt detekterbare mengder Mx-protein gjennom hele infeksjonsperioden på 120 timer mens infiserte IFN-behandlede celler inneholdt relativt høye konsentrasjoner av Mx-protein i hele infeksjonsperioden. Som vi ser av figur 8B, induseres Mx av ILAV4 i ubehandlede celler ved 20°C med en topp ved 72 til 96 timer for deretter å avta ved 120 timer. Ved IFN α 1 stimulering var Mx nivået høyt gjennom hele infeksjonsperioden.

I motsetning til ILAV4, ga ILAV7 induksjon av Mx i ubehandlede celler også ved 15°C, med en topp ved 48 til 72 timer for deretter å bli redusert til basalnivå ved 120 timer. ILAV7 synes å gi en noe sterkere induksjon av Mx ved 20°C enn ved 15°C, men forskjellene er neppe signifikante. Induksjonen av Mx var høy hele infeksjonsløpet i stimulerte celler ved begge temperaturene

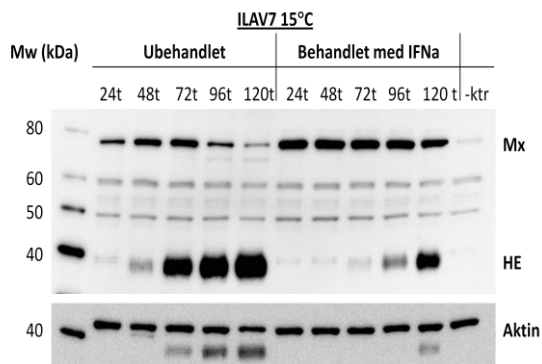
A)



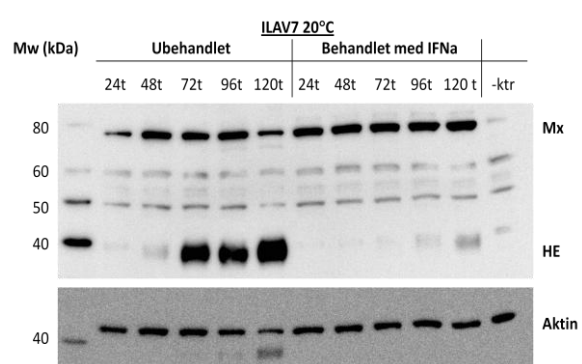
B)



C)



D)

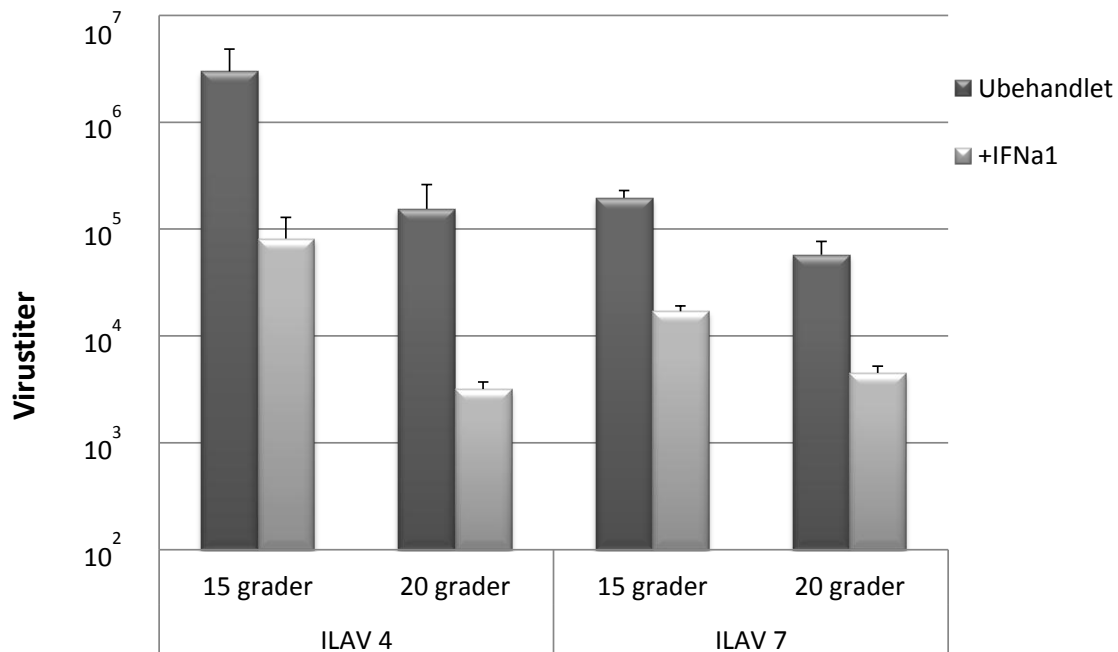


Figur 8: Uttrykk av Mx protein og hemming av HE virusprotein i ASK-celler infisert med ILAV4 og ILAV7 24 timer etter behandling med IFNa1 inkubert ved to ulike temperaturer vist med Western blot. Ubehandlede celler og celler behandlet med 1000 U/ml IFNa1 ble infisert med virus (MOI=1). Cellene ble høstet i lysis-buffer 24, 48, 72, 96 og 120 timer etter virusinfeksjon og analysert for Mx, HE og aktin ved Western blotting. Forsøkene ble utført både ved 15°C og 20°C. Bildene viser bånd for Mx, HE og Aktin. A) ILAV4 inkubert i 15°C. B) ILAV4 inkubert i 20°C. C) ILAV7 inkubert i 15°C. D) ILAV7 inkubert i 20°C. * Aktinbåndene viser at påsatt proteinmengde var tilnærmet lik i hvert forsøk. Dobbeltbåndene under aktin er rester av HE-båndene etter stripping av membranene.

3.4 Effekt av IFN på replikasjon av ILAV målt ved titrering av virus

For å undersøke IFNa1 sin evne til å redusere virusmengden av ILAV4 og ILAV7 i ASK-celler ved 15°C og 20°C, ble cellene behandlet med 1000 U/ml IFNa1 i 24 timer og infisert med virus (MOI=1). Cellemediet ble høstet etter 72 timer for titrering av virus (figur 9). Som forventet ut fra kvantitativ PCR av HE-genet, var titrene for ubehandlede celler høyere ved 15°C enn ved 20°C. ILAV4 ga høyere titer enn ILAV7. IFNa1 behandling av cellene ga en

klar nedgang i titer for både ILAV4 og ILAV7 ved begge temperaturer. Ved 15°C sank ILAV4 titeret 37 ganger ved IFNa1 behandling, mens ILAV7 titeret sank 12 ganger. Ved 20°C sank ILAV4 titeret 48 ganger ved IFNa1 behandling, og ILAV7 titeret sank 13 ganger.



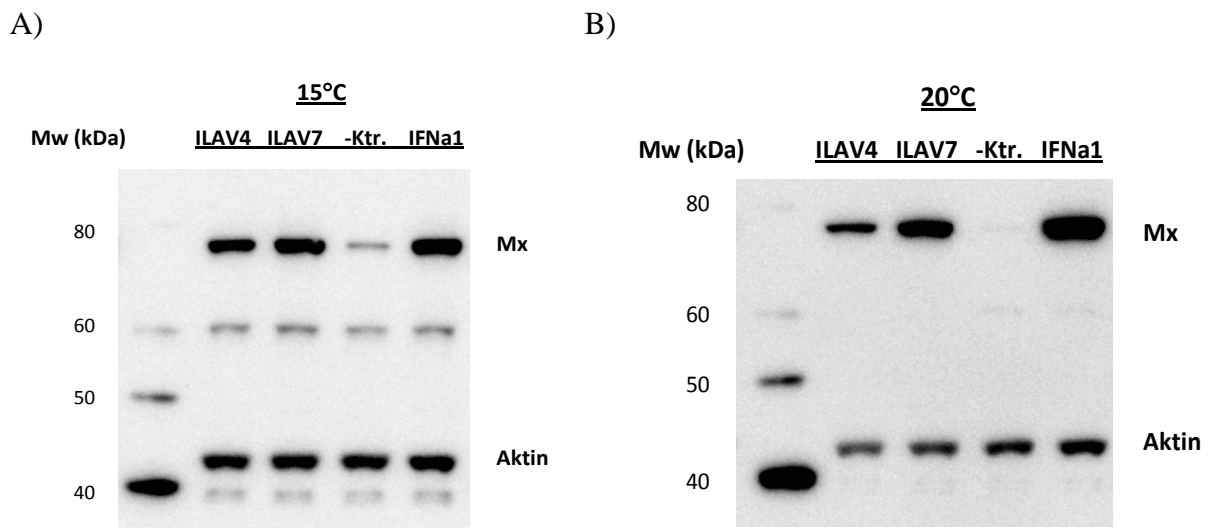
Figur 9: ILAV4 og ILAV7 titer i ubehandlede og IFNa-behandlede ASK-celler som var ubehandlet eller stimulert i 24 t med IFNa1 (1000 U/ml). Ubehandlede celler og celler behandlet med 1000 U/ml IFNa1 ble infisert med virus (MOI = 1) 24 timer etter tilsetning av IFN. Infeksjon og påfølgende inkubering ble utført både ved 15°C og 20°C. Medie- supernatanene ble høstet 72 timer etter virusinfeksjon, og virusmengde ble bestemt ved TCID₅₀-metoden.

3.5 Induksjon av Mx og ISG15 24 timer etter infeksjon med ILAV 4 og 7 ved 15° og 20°C

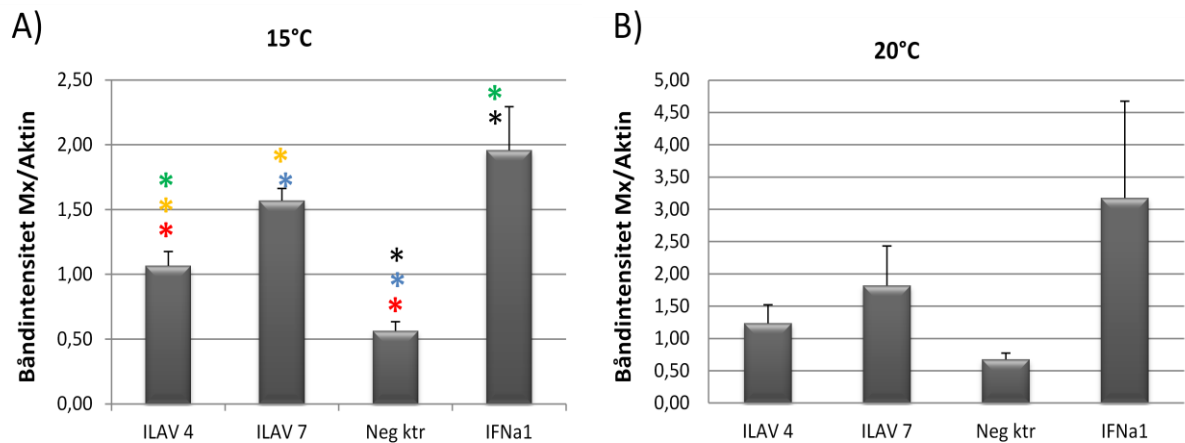
Ettersom resultatene under pkt. 3.3.2 indikerte at ILAV7 hadde større evne til å indusere Mx-protein i ustimulerte celler enn ILAV4, ble det bestemt å analysere induksjonen av både Mx og ISG15-protein ved 15° og 20°C. Tre parallelle brønner med celler på hvert brett ble infisert med ILAV4 og tre med ILAV7, begge med en MOI på 5. Seks parallelle ble ikke infisert med virus, men tre av disse ble behandlet med IFNa1 i konsentrasjonen 1000 U/ml. Cellene ble høstet 24 timer etter infisering med virus og analysert for ISG15 og Mx ved Western blotting, og intensiteten i båndene ble deretter målt og normalisert i forhold til aktin.

3.5.1 Mx:

ILAV7 induerte Mx kraftigere enn det ILAV4 gjør, både ved 15°C og 20°C (figur 10). Den aller høyeste induksjonen er ved behandling med IFNa1 uten virusinfeksjon, som ble tatt med som en kontroll. Resultatene fra figur 10 ble repetert to ganger til (ikke vist), og båndintensiteten til Mx og aktin ble målt på membranene fra alle tre kjøringen. Ekspresjonen av Mx i hver brønn ble deretter relatert til de tilhørende aktinverdiene. Båndintensiteten ble beregnet for å kunne kvantifisere forskjellene og for å kunne bestemme om forskjellene vi ser er statistisk sett signifikante. I figur 11 er gjennomsnittsverdien fra de tre parallelle prøvene vist, og en t-test ($p \leq 0.05$) bekreftet at det var en statistisk signifikant forskjell mellom alle prøvene fra oppsettet ved 15°C bortsett fra ILAV7 og IFNa1. Ved 20°C var det ingen signifikant forskjell mellom noen av prøvene.



Figur 10: Uttrykk av Mx protein i ASK-celler infisert med ILA virus ved to ulike inkubasjonstemperaturer målt med Western blotting. De ulike prøvene bestod av celler infisert med ILAV 4 og ILAV 7 med MOI=5, uinfisert negativ kontroll og IFNa1 (positiv kontroll). Cellene ble høstet 24 timer etter tilsatt ILAV og IFNa1. Prøvene ble kjørt i tre paralleller, men her er det bare tatt med et eksempel på hver prøve. A) Uttrykk av Mx ved 15°C. B) Uttrykk av Mx ved 20°C. *Sterke bånd rett under 100 kDa og rett under 80 kDa er mest sannsynlig uspesifikke bindinger.

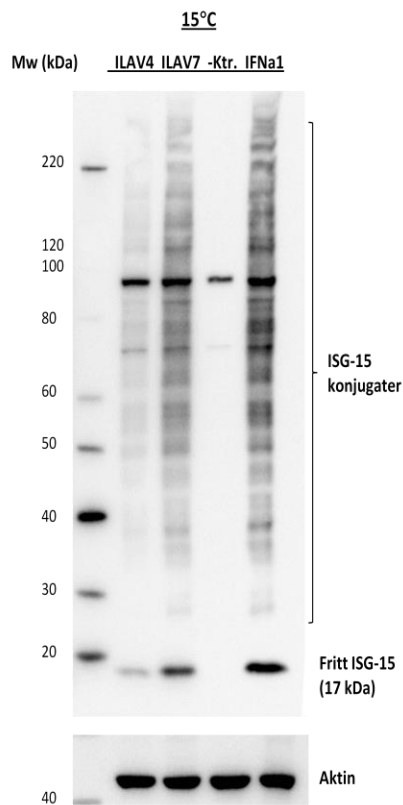


Figur 11: Western blot-båndintensitet av Mx protein i ASK-celler infisert med ILA virus ved to ulike inkubasjonstemperaturer. Signalstyrken på båndene fra tre parallelle kjøringar av Western blot bildene vist figur 10 er benyttet til å lage denne figuren. Mx verdien er delt på Aktin verdien for å justere for forskjeller i mengde prøve påsatt (Se appendiks for verdier). A) Infeksjon og inkubering utført ved 15°C, B) infeksjon og inkubering utført ved 20°C. *Angir en signifikant forskjell ($p \leq 0.05$) mellom verdiene. Lik *farge indikerer hvilke prøver som det er signifikant forskjell mellom. Den negative kontrollen kommer opp med verdi siden det alltid vil være noe bakgrunnsfarge i western blot bilder.

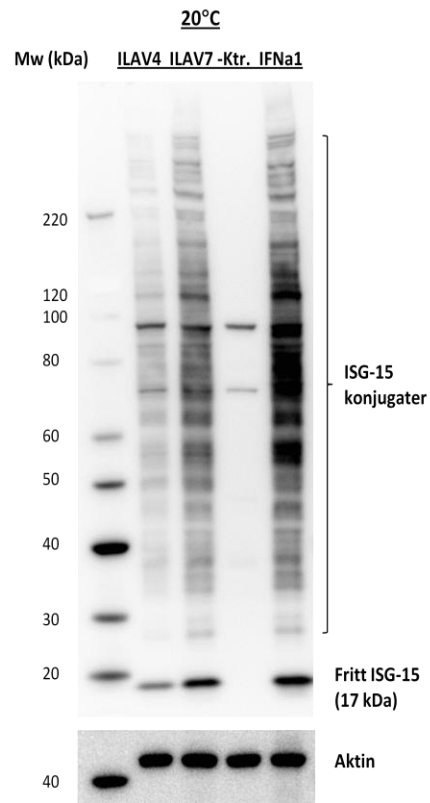
3.5.2 ISG15

Som en ser av figur 12 og 13 ga infeksjon med begge virus-isolater en induksjon av fritt ISG15 og nærvær av ISG15-konjugerte proteiner, mens ustimulerte uinfiserte celler ikke inneholdt ISG15 positive proteiner. Infeksjon med ILAV7 ga sterkest intensitet i bånd av fritt ISG15 og ISG15-konjugerte proteiner ved begge temperaturer. Mønsteret av ISG15-konjugerte proteiner i ILAV7 infiserte celler lignet i stor grad på mønsteret i IFNa1-stimulerete celler. Ser man på t-test verdiene i figur 13 får man bekreftet at det er signifikant forskjell mellom alle prøvene ved 20°C, mens ved 15°C er det kun forholdet mellom de virusinfiserte cellene og negativ kontroll, og de IFNa1 behandlede cellene og negativ kontroll som er signifikant forskjellige.

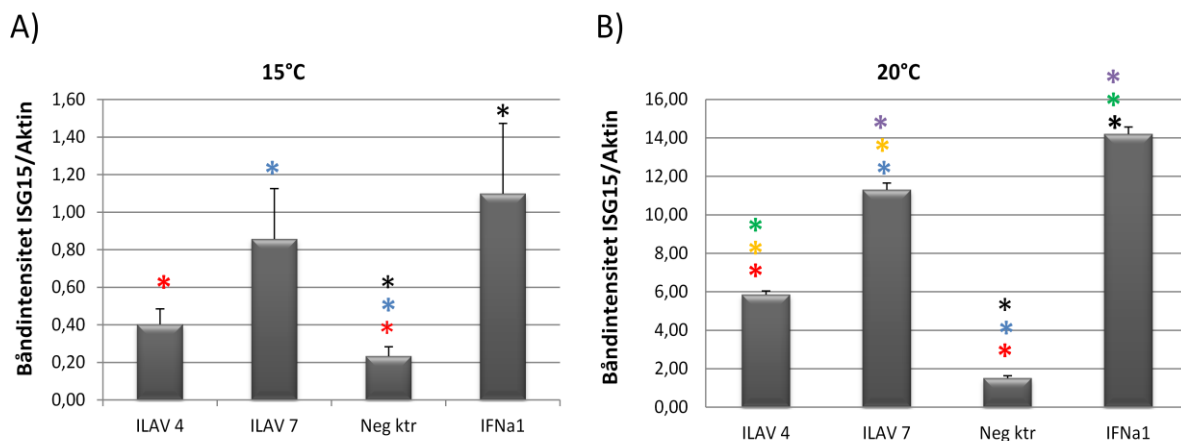
A)



B)



Figur 12: Western blot-båndintensitet av ISG15 protein i ASK-celler infisert med ILA virus ved to ulike inkubasjonstemperaturer. De ulike prøvene bestod av celler tilsatt ILAV4, ILAV7, Negativ kontroll og IFNa1. Cellene ble høstet 24 timer etter tilsatt ILAV og IFNa1. Prøvene ble kjørt i tre paralleller, men her er det bare tatt med et eksempel på hver prøve. A) Uttrykk av ISG15 ved 15°C. B) Uttrykk av ISG15 ved 20°C. *Sterke bånd rett under 100 kDa og rett under 80 kDa er mest sannsynlig uspesifikke bindinger.



Figur 13: Signalstyrkeforholdet mellom prøver infisert med ILAV4, ILAV7, negativ kontroll (uinfisert) og IFNa1 (positiv kontroll) inkubert ved to ulike temperaturer. Signalstyrken av fritt ISG15 på båndene fra tre parallelle kjøring av Western blotting bildene vist i figur 12 er benyttet til å lage denne figuren. Mx verdien er delt på Aktin verdien for å justere for forskjeller i mengde prøve påsatt (Se appendiks for verdier). A) Infeksjon og inkubering utført ved 15°C, B) infeksjon og inkubering utført ved 20°C. *Angir en signifikant forskjell ($p \leq 0.05$) mellom verdiene. Lik *farge indikerer hvilke prøver som det er signifikant forskjell mellom. Den negative kontrollen kommer opp med verdi siden det alltid vil være noe bakgrunnsfarge i western blot bilder.

4.0 Diskusjon

Tidligere forskning har gitt resultater som tyder på at interferonsystemet hos laks ikke har noen hemmende effekt mot infeksjon av ILAV selv om Mx og ISG15 har vært til stede i cellene (Jensen *et al.*, 2001; Kileng *et al.*, 2007). Mx og ISG15 er proteiner som induseres av IFN, og de er kjent for å ha antivirale funksjoner i celler. At interferon ikke hemmet ILAV-infeksjon var overraskende siden viruset er et orthomyxovirus i likhet med influensa A og B, og replikasjon av disse virusene hemmes både i interferonbehandlede celler og i celler som uttrykker det antivirale Mx-proteinet konstitutivt (Haller *et al.*, 2009).

De tidligere studiene av antiviral aktivitet av type I IFN mot ILAV ble utført i SHK-1 og TO-celler der det ble brukt et høyvirulent isolat av ISAV4-typen (Jensen *et al.*, 2001; Kileng *et al.*, 2007; Professor Børre Robertsen personlig meddelelse). Antiviral aktivitet ble målt med CPE-reduksjonsmetoden. I prosjektoppgaven min fra 2010 viste jeg imidlertid med samme metode at IFN α 1 faktisk har antiviral effekt mot ILAV dersom forsøkene blir utført i en annen celle type, nemlig ASK-celler (Holand, J., 2010). Årsaken til at hemmingen i ASK-celler er større enn i TO-celler kan skyldes at cellene har forskjellig natur, og at konsentrasjon og type antivirale proteiner som induseres av IFN α 1 er forskjellig i ulike celletyper.

For å undersøke den antivirale aktiviteten av type I IFN hos laks nærmere, ble det i denne oppgaven valgt både det høyvirulent isolatet ILAV4 og det lavvirulente isolatet ILAV7. Disse to isolatene har tilnærmet identisk HE-sekvens (Mjaaland *et al.*, 2002; Mjaaland *et al.*, 2005).

Antiviral aktivitet ble målt med fire forskjellige metoder, CPE reduksjonsmetoden, kvantitativ RT-PCR, Western blotting og virustitrering. Det ble i tillegg målt antiviral aktivitet både ved 20°C og ved virusets optimumstemperatur på 15°C.

4.1 Antiviral aktivitet av IFN mot ILAV målt med CPE-reduksjonsmetoden

For å undersøke IFN α 1, IFN β og IFN γ sin evne til å beskytte ASK-celler mot lysis forårsaket av ILAV4 og ILAV7 ble det satt opp CPE-reduksjonsassays med en rekke ulike viruskonsentrasjoner (MOI 0,1-5).

Ved 15°C ble det kun satt opp CPE-reduksjonsassays med ILAV7. Årsaken til at dette virusisolatet ble valgt til oppsettene ved optimumstemperatur, var at resultatene fra prosjektoppgaven i 2010 viser at dette isolatet lett lot seg hemme ved IFN behandling. Resultatene i dette forsøket viste imidlertid svært liten beskyttelse av IFN mot ILAV7 selv om det ble benyttet en lav MOI. Det var tydelig at den observerte effekten av IFN var avhengig av virusmengde, da noe høyere beskyttelse ble observert i celler infisert med en MOI på 0,1 i forhold til 0,5 (Tabell 3). Selv ved den høyeste konsentrasjonen av IFNa1 (1000 U/ml) og MOI 0,1 ble det bare oppnådd en maksimal celleoverlevelse på 30%. IFNb og IFNc ga bare henholdsvis 10% og 16% overlevelse.

Interferonene hadde en mye klarere beskyttende effekt både mot ILAV4 og ILAV7 ved 20°C. Siden ILAV4 tidligere har blitt vist å ha optimal replikasjon ved 15°C (Falk *et al.*, 1997), er dette sannsynligvis et resultat av lavere virusreplikasjon, noe som gjør at den beskyttende effekten til interferon lettere kan observeres. Fordi MOI=1 var den laveste viruskonsentrasjonen hvor det foreligger resultater fra begge virusisolater, og som ble benyttet videre i de andre metodene, har jeg valgt å konsentrere meg om resultatene fra denne viruskonsentrasjonen videre. IFNa1 ga en maksimal celleoverlevelse på over 80% hos ILAV4 infiserte celler, mens IFNb kun ga en maksimal overlevelse på ca 50%. Hos IFNc stimulerte celler var maksimal celleoverlevelse på ca 70%. Hos ILAV7 infiserte celler var maksimal overlevelse på henholdsvis 65%, <10% og ca 60% for IFNa1, IFNb og IFNc stimulerte celler. Ut fra disse resultatene var det umulig å avgjøre om det var forskjell på interferonenes evne til å hemme det lavvirulente ILAV7 i forhold til det høyvirulente ILAV4 isolatet.

IFNa1 hemmer replikasjon av både ILAV4 og ILAV7, men det er ingen tydelig forskjell i den hemmende effekten på de to virus- isolatene. IFNa1 er det interferonet som har den største antivirale effekten både mot ILAV4 og 7, men effekten av IFNc er ikke langt unna. IFNb har derimot den klart laveste effekten. Generelt sett ser det ikke ut til at noen av interferontypene beskytter bedre mot det lavvirulente isolatet ILAV7 enn mot det høyvirulente isolatet ILAV4 ved CPE-reduksjonsmetoden.

4.2 Effekt av IFN på replikasjonen av ILAV4 og ILAV7 målt ved transkripsjonen av hemagglutinin-esterase (HE) genet

For å se på IFN α 1 sin påvirkning på replikasjon av ILAV4 og ILAV7 ble det gjort kvantitativ RT-PCR av HE-genet. IFN α 1 ble tilsatt i en konsentrasjon på 1000 U/ml og virusisolatene hadde MOI=1. For å se på utviklingen over tid ble cellene høstet fra 4 til 120 timer etter virusinfeksjon.

I samsvar med tidligere publiseringer (Falk *et al.*, 1997) replikerte ILAV dårligere ved 20°C enn ved 15°C. IFN α 1 hemmet replikasjon av både ILAV4 og ILAV7, og graden av hemming var ganske lik. Ved 15°C var hemmingen imidlertid mest uttalt ved tidlige tidspunkt (72 timer og tidligere), og 5 dager etter infeksjon (120t) hadde virusmengden i de behandlede cellene nesten tatt igjen den som ble observert i de ubehandlede cellene. Dette viser at IFN kun har en innledende effekt og at det kan holde en ILAV-infeksjon under kontroll i noen dager. IFN α 1 har altså en forsinkende effekt på viruset, men over tid ser det ut til at viruset overviner den antivirale effekten og infeksjonen utvikler seg for fullt. Graden av hemming, det vil si ganger reduksjon i HE-transkripter, er ikke uttalt større ved 20°C enn ved 15°C når vi ser på ganger genuttrykk av HE i ubehandlet dividert med IFN α 1-behandlet celler.

4.3 Effekt av IFN på replikasjon av ILAV målt ved Western blotting av HE- protein

Hemming av HE proteinsyntese med IFN α 1 (1000 U/ml) ble også undersøkt ved Western blotting der ASK-cellene ble infisert med ILAV4 og ILAV7 (MOI=1). Cellene ble høstet i et tidsintervall fra 24 til 120 timer etter virusinfeksjon.

Resultatene var nokså like både for ILAV4 og ILAV7. Ustimulerte celler infisert med begge virusisolat viste økning i HE-protein fra 72 timer, både ved 15°C og 20°C. HE-protein i IFN α 1 behandlede celler infisert med ILAV4 og ILAV7 var nesten ikke detekterbart ved 20°C ved noe tidspunkt mens HE ved 15°C først ble detekterbart ved 96 timer i IFN-behandlede celler, for deretter å øke kraftig i intensitet ved 120 timer.

4.4 Effekt av IFN på replikasjon av ILAV målt ved virus-titrering

IFN α 1 sin evne til å påvirke virusreplikasjon ble også undersøkt ved titrering av virus, hvor det ble benyttet medie-supernatanter fra 72 timers tidspunktet i forsøket med kvantitativ PCR. Også med denne metoden viste IFN α 1 en klar hemmende effekt på virusreplikasjonen hos både ILAV4 og ILAV7 ved begge temperaturer.

4.5 Oppsummering av de antivirale assayene

Resultatene fra CPE-reduksjonmetoden, kvantitativ PCR, virustitrering og Western blotting viste alle at IFN α 1 fra laks klarer å hemme både ILAV4 og ILAV7 i ASK-celler, men at hemmingen var større ved 20°C enn 15°C. Dette skyldes sannsynligvis at virusene replikerer bedre ved 15°C, og men det kan ikke utelukkes at interferonene har større effekt ved 20°C. Replikasjon av ILAV4 og ILAV7 (som henholdsvis er en høyvirulent og lavvirulent stamme) lot seg hemme i tilnærmet lik grad i våre studier etter forbehandling av ASK-celler med IFN. Det er derfor lite sannsynlig at forskjellene i virulens mellom de to stammene skyldes at de har utviklet forskjellige evner til å motsette seg effekten av IFN-induserte antivirale proteiner. I de tidligere studiene hvor IFN ikke viste noen hemmende effekt på det høyvirulente ILAV4-isolatet (Kileng *et al.*, 2006), var resultatene i stor grad basert på CPE-reduksjonmetoden, og det ble brukt en infeksjonstemperatur på 17,5°C som kanskje ikke er gunstig for å påvise antiviral aktivitet ved denne metoden. Det ble dessuten brukt TO-celler som heller ikke ser ut til å være optimale for CPE- reduksjonsmetoden.

Resultatene fra forsøkene med kvantitativ RT-PCR og Western blotting viste at IFN α 1 har en klar hemmende effekt på replikasjonen av begge isolater de første 72 timene etter stimulering ved begge temperaturer. Dette kan tyde på at IFN, eller produkter dannet av IFN-stimulering, bremser virusreplikasjonen kun en kort periode før effekten går ned. Dette skyldes sannsynligvis at ILAV har utviklet strategier for å omgå eller motvirke effekten av IFN og IFN-induserte antivirale proteiner. Det er vist at influensa A, som hører til samme virusfamilie som ILAV, uttrykker et IFN-antagoniserende protein som kan blokkere effekten til protein kinase R (PKR) (Li *et al.*, 2006). PKR er et cellulært protein som induseres av IFN og som kan motvirke virus replikasjon ved å skru av/ned cellens generelle nydannelse av proteiner (og dermed også nydannelse av virus) (Ehrhardt *et al.*, 2010).

Det at IFN α 1 viste liten grad av hemming i CPE- reduksjonsassayene våre ved 15°C, og det at tidligere studier ikke har vist beskyttende effekt mot ILAV ved 17,7°C (Kileng *et al.*, 2006), skyldes sannsynligvis at IFN-effekten kun varer 72-96 timer mens metoden tar 8-9 dager før avslutning. Ved 20°C vokser viruset seinere, og effekten av IFN ser derfor ut til å bli forlenget. Dette er sannsynligvis årsaken til at vi ser en større overlevelse ved 20°C.

Det kan være to årsaker til den midlertidige antivirale effekten av IFN: at nivået av IFN-antagonistiske proteiner følger virusreplikasjon og øker i takt med denne, eller at nivået av antivirale proteiner går ned etter en viss tid. For å se på om årsaken kan være at nivået av antivirale proteiner går ned etter en viss tid stemmer, burde det settes opp forsøk som måler ISG15 og Mx nivå over en lengre tidsperiode, på f.eks. 4-10 dager, i uinfiserte, IFN α 1 behandlede celler. Da kan man få en bekreftelse på om antivirale proteiner øker til en topp et visst antall timer etter IFN stimulering, for så å synke igjen.

Replikasjonen av både høyvirulent og lavvirulent virus var tilnærmet lik i kvantitativ-PCR forsøket. Det som var forventet var at det lavvirulente viruset muligens ville replikere noe seinere enn det høyvirulente. Forsøket ble imidlertid kun gjort i cellelinjer *in vitro*, og *in vivo* kan situasjonen være en helt annen. I levende fisk vil for eksempel andre immunceller komme til infeksjonsstedet og påvirke utfallet av infeksjonen. Dette kan forklare hvorfor resultatene avviker fra det som var forventet ut i fra forsøkene til Mjaaland *et al.* (2002), hvor dødelighetsprosenten på laksen var mye høyere for ILAV4-smittet fisk.

Når det kommer til temperaturene benyttet i forsøkene, er de tilrettelagt for forsøk i laboratoriet, og ikke det som er naturlig å finne langs norskekysten. Det hadde derfor vært interessant å sette opp forsøk hvor man tester IFN sin antivirale effekt, og induksjon av antivirale proteiner ved temperaturer lavere enn 15°C, som er det naturlige i miljøet hvor laksen infiseres med ILAV. Dersom man hadde utført forsøk både *in vivo* og *in vitro* ved lave temperaturer, kunne man ha dannet seg et mer realistisk bilde av hvordan IFN og antivirale proteiner påvirker ILAV infeksjoner.

4.6 Sammenligning av induksjon av Mx og ISG15 i ASK celler infisert med ILAV4 og ILAV7.

Forskjell i virulens mellom ILAV4 og ILAV7 kan tenkes å ligge i forskjell i evne til å indusere antivirale proteiner som Mx og ISG15. For å teste dette ble induksjon av Mx og ISG15 ved infeksjon av ASK-celler med ILAV4 og ILAV7 (MOI=5) analysert med Western blotting. Celler stimulert med IFN α 1 (1000 U/ml) i 24 timer ble brukt som positiv kontroll.

Kileng *et al.* (2006) viste at ILAV4 induserer IFN, Mx og ISG15 både *in vivo* og *in vitro*. I TO-celler økte mengden av Mx og ISG15 på tidlige tidspunkt etter ILAV-infeksjon, noe som stemmer godt overens med resultatene vi fikk ved våre forsøk.

I ILAV-infiserte celler uten IFN-stimulering ble de to antivirale proteinene, ISG15 og Mx, induert kraftigere av ILAV7 enn ILAV4. Både Mx og ISG15 er interferon stimulerede gener, som betyr at de indueres av IFN. Ved en virusinfeksjon vil normalt viruset gjenkjennes av reseptorer i cellen som binder virus-nukleinsyrer (f.eks dsRNA). Dette fører til en 2-steps prosess: (1) gjenkjenning av virus fører til signalisering i cellen som resulterer i induksjon, produksjon og utskillelse av IFN. (2) Det utskilte interferonet binder IFN-reseptorer på overflaten av andre celler, en signaleringskaskade startes i cellen, og man får induksjon av interferon stimulerede gener og påfølgende produksjon av antivirale effektorproteiner (som ISG15 og Mx) (Takeuchi, O. et al, 2007). For å få produsert ISG15 og Mx i cellene må man altså først ha fått produsert IFN. Det at ILAV4 gir lavere Mx og ISG15-induksjon enn ILAV7, kan dermed peke mot at ILAV4 har mekanismer for å hemme enten den signalveien som fører til produksjon av IFN (dvs. (1)), eller den signalveien som fører til induksjon av interferon stimulerede gener (dvs. (2)). Eventuelt kan begge signalveiene hemmes. Det at det er en forskjell i denne hemmingen mellom ILAV4 og ILAV7, kan være noe av forklaringen på at de har ulik virulens. Dette er kun en indikasjon og man kan ikke si noe med sikkerhet siden vi ikke har nok resultater, men det er et godt grunnlag for å gjøre eventuelle videre studier.

I forsøkene med CPE-assay, kvantitativ PCR og HE-western blot, har vi forbehandlet cellene med IFN. Da vil antivirale proteiner som Mx og ISG15 være oppregulert før virusinfeksjonen skjer, og vi har dermed sett på om viruset kan hemme effekten av de antivirale effektorproteinene (som Mx og ISG15). Der så vi altså liten forskjell mellom ILAV4 og ILAV7. Bildene fra Western blotting på Mx og ISG15 vist i figur 10 og 12 tyder altså på at hemmingen skjer i tidligere stadier, enten ved (1) signalveien som fører til produksjon av IFN,

eller (2) signalveien som fører til produksjon av antivirale proteiner. Resultatene antyder også at ILAV4 har en større evne til å hemme disse stadiene enn ILAV7.

Arbeidet til García-Rosado *et al.* (2008) støtter teorien om at ILAV har IFN-antagonistiske proteiner. På bakgrunn av at orthomyxovirus har utviklet flere ulike mekanismer for å hemme eller motstå IFN α/β systemet, utførte García-Rosado *et al.* (2008) forsøk for finne ut om ILAV har slike mekanismer. Det ble lagt vekt på proteinet s7ORF1 kodet av segment 7, og proteinet s8ORF2 kodet av segment 8. Resultatene viste at både s7ORF1 og s8ORF2 hadde en nedregulere effekt på den cellulære type I IFN responsen, og at s7ORF1 proteinet så ut til å ha den sterkeste effekten. S7ORF1 reduserte IFN promotor-aktiviteten med en 7,6 fold nedgang, mens S8ORF2 ga en nedgang på 3,1 fold. Det at s7ORF1 proteinet er lokalisert i cytoplasma hos infiserte celler tydet på at det kanskje hemmer via interaksjon med proteiner i cytoplasma som er involvert i signalveien som regulerer IFN og IRF-7 transkripsjon. s8ORF2 proteinet så ut til å hemme viral induksjon av IFN ved å binde virale ssRNA og dsRNA mellomprodukter (García-Rosado *et al.*, 2008). Det er vist at det er forskjeller i aminosyresekvensen til s7ORF1 og s8ORF2 mellom ILAV4 og ILAV7 (García-Rosado *et al.*, 2008), og det ville derfor være interessant å sammenligne disse i lignende studier, for å se om ulikeheter i disse proteinene delvis kan forklare forskjellene i virulens mellom disse to virusene.

4.7 Konklusjon

- ILAV4 og ILAV7 har sammenlignbar replikasjon i ASK celler, og begge virusene replikerer bedre ved 15°C enn ved 20°C.
- ILAV4 og ILAV7 lar seg hemme i ganske lik grad av IFN, og IFN $\alpha 1$ er det type I IFN som har den største effekten.
- IFN har en forsinkende effekt på virusreplikasjon, men etter 3-5 dager ser viruset ut for å ha tatt igjen det tapte. Dette gjør at CPE- assay kan være en lite optimal metode for å bestemme antiviral effekt av IFN mot ILAV siden assayet går over relativt lang tid.
- Induksjonen av Mx og ISG15 er høyere hos ASK celler infisert med ILAV7 enn med ILAV4, dette kan muligens skyldes av ILAV4 har en bedre evne til å hemme induksjon av IFN og/eller induksjon av interferon stimulerte gener.

5.0 Referanser

Abbas, A.K., Lichtman, A.H. Basic Immunology: Functions and Disorders of the Immune System, Saunders Elsevier Inc, 3. Edition 2009.

Alexopoulou, L., Holt, A.C., Medzhitov, R., Flavell, R.A. (2001). Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3. *Nature.*, 413(6857):732-8.

Bierin, E., Falk, K., Hoel, E., Thevarajan, J., Joerink, M., Nylund, A., Endresen, C., Krossøyl, B. (2002). Segment 8 encodes a structural protein of infectious salmon anaemia virus (ISAV); the co-linear transcript from Segment 7 probably encodes a non-structural or minor structural protein. *Diseases of Aquatic Organisms*, 10;49(2):117-22

Berg, K., Svingerud, T., Sun, B., Robertsen, B. (2009). An antiserum against Atlantic salmon IFN α 1 detects IFN and neutralizes antiviral activity produced by poly I:C stimulated cells. *Developmental and Comparative Immunology*, 33(4):638-45.

Bergan, V., Kileng, Ø., Sun, B. (2010). Regulation and function of interferon regulatory factors of Atlantic salmon. *Molecular Immunology*, 47: 2005-2014.

Bornø, G., Sviland, C., Jensen, B.B., Tarpai, A., Garseth, Å.H., Skjelstad, H.R., Johansen, R., Dale, B.D., Fritsvold, C., Nilsen, H., Vaagnes, Ø., Flesjø, K., Aune, S., Colquhoun, D., Ørpetveit, I., Hansen, H., Heuch, P.A., Hjeltnes, B. Fiskehelserapporten 2009, Veterinærinstituttet.

de Veer, M.J., Holko, M., Frevel, M., Walker, E., Der, S., Paranjape, J.M., Silverman, R.H., Williams, B.R. (2001). Functional classification of interferon-stimulated genes identified using microarrays. *Journal of Leukoc. Biol.*, 69(6):912-20.

Der, S.D., Zhou, A., Williams, B.R., Silverman, R.H. (). Identification of genes differentially regulated by interferon alpha, beta, or gamma using oligonucleotide arrays. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 95(26):15623-8.

Devold, M., Krossay, B., Aspehaug, V., Nylund, A. (2000). Use of RT-PCR for diagnosis of infectious salmon anaemia virus (ISAV) in carrier sea trout *Salmo trutta* after experimental infection. *Diseases of Aquatic Organisms*, 40: 9-18.

- Doxsee, C.L., Riter, T.R., Reiter, M.J., Gibson, S.J., Vasilakos, J.P., Kedl, R.M. (2003). The immune response modifier and Toll-like receptor 7 agonist S-27609 selectively induces IL-12 and TNF-alpha production in CD11c+CD11b+CD8- dendritic cells. *Journal of Immunology*, 171(3):1156-63.
- Ehrhardt, C., Seyer, R., Hrinicius, E.R., Eierhoff, T., Wolff, T., Ludwig, S. (2010). Interplay between influenza A virus and the innate immune signaling. *Microbe. Infect.*, 12: 81–87.
- Edelmann, KH., Richardson-Burns, S., Alexopoulou, L., Tyler, KL., Flavell, RA., Oldstone, M.B. (2004). Does Toll-like receptor 3 play a biological role in virus infections? *Virology*, 1;322(2):231-8.
- Falk, K., Namork, E., Rimstad, E., Mjaaland, S., Dannevig, B.H. (1997). Characterization of infectious salmon anemia virus, an orthomyxo-like virus isolated from Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Journal of Virology*, 71(12):9016-23.
- Falk, K., Aspehaug, V., Vlasak, R., Endresen, C. (2004). Identification and characterization of viral structural proteins of infectious salmon anemia virus. *Journal of Virology*, 78(6): 3063-71.
- García-Rosado, E., Markussen, T., Kileng, Ø., Bækkevold, E.S., Robertsen, B., Mjaaland, S., Rimstad, E. (2008). Molecular and functional characterization of two infectious salmon anemia virus (ISAV) proteins with type I interferon antagonizing activity. *Virus Research*, 2: 228-238.
- García-Sastre, A., Egorov, A., Matassov, D., Brandt, S., Levy, D.E., Durbin, J.E., Palese, P., Muster, T. (1998). Influenza A virus lacking the NS1 gene replicates in interferon-deficient systems. *Virology*, 252(2):324-30.
- Haller, O., Frese, M., Kochs, G. (1998). Mx proteins: mediators of innate resistance to RNA viruses. *Rev. Sci. Tech.*, 17(1):220-30.
- Haller, O., Kochs, G., Weber, F. (2006). The interferon response circuit: induction and suppression by pathogenic viruses. *Virology*, 5;344(1):119-30.
- Haller, O., Staeheli, P., Kochs, G. (2009). Protective role of interferon-induced Mx GTPases against influenza viruses. *Rev. Sci. Tech.*, 28(1):219-31.

Hayden, M.S., West, A.P., Ghosh, S. (2006). NF-kappaB and the immune response. *Oncogene.*, 25(51):6758-80.

Heil, F., Ahmad-Nejad, P., Hemmi, H., Hochrein, H., Ampenberger, F., Gellert, T., Dietrich, H., Lipford, G., Takeda, K., Akira, S., Wagner, H., Bauer, S. (2003). The Toll-like receptor 7 (TLR7)-specific stimulus loxoribine uncovers a strong relationship within the TLR7, 8 and 9 subfamily. *European Journal of Immunology*, 33(11):2987-97.

Holand, J. (2010). Effekten av IFN α 1, b og c på infeksjon med infeksiøs lakseanemi virusisolat 4 og 7 i ASK- og TO- celler. Prosjektoppgave BIO-3604.

Jensen, I., Albuquerque, A., Sommer, A.I., Robertsen, B. (2002a). Effect of poly I:C on the expression of Mx proteins and resistance against infection by infectious salmon anemia virus in Atlantic salmon. *Fish and Shellfish Immunology*, 13: 311-326.

Jensen, I., Robertsen, B. (2002b). Effect of double-stranded RNA and interferon on the antiviral activity of Atlantic salmon cells against infectious salmon anemia virus and infectious pancreatic necrosis virus. *Fish and Shellfish Immunology*, 13: 221-241.

Kadowaki, N., Ho, S., Antonenko, S., Malefyt, R.W., Kastelein, R.A., Bazan, F., Liu, Y.J. (2001). Subsets of human dendritic cell precursors express different toll-like receptors and respond to different microbial antigens. *Journal of Exp. Med.*, 194(6):863-9.

Kang, D.C., Gopalkrishnan, R.V., Wu, Q., Jankowsky, E., Pyle, A.M., Fisher, P.B. (2002). mda-5: An interferon-inducible putative RNA helicase with double-stranded RNA-dependent ATPase activity and melanoma growth-suppressive properties. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, 99(2):637-42.

Kawai, T., Akira, S. (2006). Innate immune recognition of viral infection. *Nature Immunology*, 7: 131-137.

Kawamoto, S., Oritani, K., Asakura, E., Ishikawa, J., Koyama, M., Miyano, K., Iwamoto, M., Yasuda, S., Nakakubo, H., Hirayama, F., Ishida, N., Ujiie, H., Masaie, H., Tomiyama, Y. (2004). A new interferon, limitin, displays equivalent immunomodulatory and antitumor activities without myelosuppressive properties as compared with interferon-alpha. *Exp Hematol*, 32(9):797-805.

- Kibenge, M.J.T., Munir, K., Kibenge, F.S.B. (2005). Constitutive expression of Atlantic salmon Mx I protein in CHSE-214 cells confers resistance to Infectious Salmon Anemia virus. *Virology Journal*, 2:75.
- Kibenge, FS., Xu, H., Kibenge, MJ., Qian, B., Joseph, T. (2007). Characterization of gene expression on genomic segment 7 of infectious salmon anaemia virus. *Virology Journal*, 29;4:34.
- Kileng, Ø., Albuquerque, A., Robertsen, B. (2008). Induction of interferon system genes in Atlantic salmon by the imidazoquinoline S-27609, a ligand for Toll-like receptor 7. *Fish and Shellfish Immunology*, 24: 514-522.
- Kileng, Ø., Brundtland, M.I., Robertsen, B. (2007). Infectious salmon anemia virus is a powerful inducer of the key genes of the type I interferon system of Atlantic salmon, but is not inhibited by interferon. *Fish and Shellfish Immunology*, 23: 378-389.
- Kotenko, S.V., Gallagher, G., Baurin, V.V., Lewis-Antes, A., Shen, M., Shah, N.K., Langer, J.A., Sheikh, F., Dickensheets, H., Donnelly, R.P. (2003). IFN-lambdas mediate antiviral protection through a distinct class II cytokine receptor complex. *Nature Immunology*, 4(1): 69-77.
- Krossøy, B., Devold, M., Sanders, L., Knappskog, P.M., Aspehaug, V., Falk, K., Nylund, A., Koumans, S., Endresen, C., Biering, E. (2001). Cloning and identification of the infectious salmon anaemia virus haemagglutinin. *Journal of General Virology*, 82(Pt 7):1757-65.
- Larsen, R., Røkenes, T.P., Robertsen, B. (2004). Inhibition of infectious pancreatic necrosis virus replication by atlantic salmon Mx1 protein. *Journal of Virology*, 78(15):7938-44.
- Lee, S.H., Vidal, S.M. (2002). Functional diversity of Mx proteins: variations on a theme of host resistance to infection. *Genome Res.*, 12(4):527-30.
- Li, S., Min, J. Y., Krug, R. M., Sen, G. C. (2006). Binding of the influenza A virus NS1 protein to PKR mediates the inhibition of its activation by either PACT or double-stranded RNA. *Virology* 349, 13–21.
- Levy, D.E., García-Sastre, A. (2001). The virus battles: IFN induction of the antiviral state and mechanisms of viral evasion. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 12(2-3):143-56.

- Loo, Y.M., Fornek, J., Crochet, N., Bajwa, G., Perwitasari, O., Martinez-Sobrodo, L., Akira, S., Gill, M.A., Garcia-Sastre, A., Katze, M.G., Gale, M. (2008). Distinct RIG-I and MDA5 signaling by RNA viruses in innate immunity. *Journal of Virology*, 82: 335-45.
- Mjaaland, S., Rimstad, E., Falk, K., Dannevig, B.H. (1997). Genomic Characterization of the virus causing infectious salmon anemia in Atlantic salmon (*Salmo salar L.*): An orthomyxo-like virus in a teleost. *Journal of Virology*, 71(10): 7681-7686).
- Mjaaland, S., Hungnes, O., Teig, A., Dannevig, BH., Thorud, K., Rimstad, E. (2002). Polymorphism in the infectious salmon anemia virus hemagglutinin gene: importance and possible implications for evolution and ecology of infectious salmon anemia disease. *Virology*, 304(2): 379-91.
- Mjaaland, S., Markussen, T., Sindre, H., Kjølglum, S., Dannevig, B.H., Larsen, S., Grimholt, U. (2005). Susceptibility and immune responses following experimental infection of MHC compatible Atlantic salmon (*Salmo salar L.*) with different infectious salmon anaemia virus isolates. *Archives of Virology*, 150: 2195-2216.
- Nishiya, T., DeFranco, A.L. (2004). Ligand-regulated chimeric receptor approach reveals distinctive subcellular localization and signaling properties of the Toll-like receptors. *Journal of Biol Chem*, 279(18):19008-17.
- Olsen, A.B., (red), Alarcon, M., Biering, E., Colquhoun, D., Dale, O.B., Falk, K., Fritsvold, C., Grøntvedt, R., Hansen, H., Hellberg, H., Heuch, P.A., Hjeltnes, B., Bang Jensen, B., Johansen, R., Lie K.I., Mejdell, C., Nilsen, H.K., Poppe, T., Skjelstad, H.R., Sviland, C., Taksdal, T., Thoen, E., Vågnes, Ø., Ørpetveit, I. Fiskehelserapporten 2011, Veterinærinstituttet.
- Pestka, S., Krause, C.D., Walter, M.R. (2004). Interferons, interferon-like cytokines, and their receptors. *Immunol Rev* 202: 8-32.
- Pettersen, E.F., Ingerslev, H.C., Stavang, V., Egenberg, M., Wergeland, H.I. (2008). A highly phagocytic cell line TO from Atlantic salmon is CD83 positive and M-CSFR negative, indicating a dendritic-like cell type. *Fish and Shellfish Immunology*, 25: 809-819.
- Pfaffl, M.W. (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.*, 29(9):e45.

Poppe, T., Bergh, Ø., Espelid, S., Nygaard, S. Fiskehelse og fiske sykdommer, Universitetsforlaget AS, 2. opplag 2002.

Reed, L.a.H.M. (1938). A simple method for estimating fifty percent endpoints. *Am. J. Hyg.*, 27: 493-497.

Robertsen, B. (2006). The interferon system of teleost fish. *Fish and Shellfish Immunology*, 2: 172-191.

Robertsen, B., Bergan, V., Røkenes, T., Larsen, R., Albuquerque, A. (2003). Atlantic Salmon Interferon Genes: Cloning, Sequence Analysis, Expression and Biological Activity. *Journal of Interferon and Cytokine Research*, 23: 601-612.

Røkenes, T.P., Larsen, R., Robertsen, B. (2007). Atlantic salmon ISG15: Expression and conjugation to cellular proteins in response to interferon, double-stranded RNA and virus infections. *Molecular Immunology*, 44(5):950-9.

Samuel, C.E. (2001). Antiviral Actions of Interferons. *Clinical Microbiology*, 14(4): 778–809.

Sen, G.C. (2001). Viruses and interferons. *Annual Review of Microbiology*, 55:255-81.

Stark, G.R., Kerr, I.M., Williams, B.R., Silverman, R.H., Schreiber, R.D. (1998). How cells respond to interferons. *Annual Review Biochemistry*, 67:227-64.

Sun, B., Robertsen, B. (2009). Identification of an Atlantic salmon IFN multigene cluster encoding three IFN subtypes with very different expression properties. *Developmental and Comparative Immunology*, 4: 547-558.

Veterinærinstituttets faktabank, Temasider, Fiske sykdommer, Infeksiøs lakseanemi (ILA), oppdatert 20.09.2011, <http://www.vetinst.no/Temasider/Fiske sykdommer/Infeksioes-lakseanemi-ILA/Infeksioes-lakseanemi-ILA> (hentet ut 18.05.12).

Takeuchi, O., Akira, S. (2007). Recognition of viruses by innate immunity. *Immunol. Rev.* 220: 214-224

Ukjent (2008): Real-time PCR: From theory to Practice, ©Invitrogen Corporation.

Vilcek, J. (2003). Novel interferons. *Nature Immunology*, 4(1): 8-9.

- Wergeland, H.I., Jakobsen, R.A. (2001). A salmonid cell line (TO) for production of infectious salmon anaemia virus (ISAV). *Diseases of Aquatic Organisms*, 44: 183-190.
- Workenhe, S.T., Kibenge, M.J.T., Wright, G.M., Wadowska, D.W., Groman, D.B., Kibenge, F.S.B. (2008). Infectious salmon anemia virus replication and induction of alpha interferon in Atlantic salmon erythrocytes. *Virology Journal*, 5:36.
- Workenhe, S.T., Hori, T.S., Rise, M.L., Kibenge, M.J.T., Kibenge, F.S.B. (2009). Infectious salmon anemia virus (ISAV) isolates induce distinct gene expression responses in the Atlantic salmon (*Salmo salar*) macrophage/dendritic-like cell line TO, assessed using genomic techniques. *Molecular Immunology*, 15: 2955-2974.
- Yoneyama, M., Kikuchi, M., Natsukawa, T., Shinobu, N., Imaizumi, T., Miyagishi, M., Taira, K., Akira, S., Fujita, T. (2004). The RNA helicase RIG-I has an essential function in double-stranded RNA-induced innate antiviral response. *Nature Immunology*, 5(7): 730-737.
- Yoneyama, M., Fujita T. (2007). Function of RIG-I-like receptors in antiviral innate immunity. *Journal of Biol Chem*, 282: 15315-8.
- Zhao, C., Denison, C., Huibregtse, J.M., Gygi, S., Krug, R.M. (2005). Human ISG15 conjugation targets both IFN-induced and constitutively expressed proteins functioning in diverse cellular pathways. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, 102(29):10200-5.

6.0 Appendiks

6.1 Løsninger

6.1.2 Western blotting

2 x SDS Høstebuffer (10 ml)

1,6 ml 1M TrisHCl pH 6,8

4 ml 10% SDS

2,4 ml 85% Glycerol

1,0 ml dH₂O

~ 60 µl mettet bromphenol blue

Running buffer

50 ml 20x MOPS NuPAGE SDS running buffer

950 ml MilliQ vann

10 x Blottebuffer

144g Glycin }
30,3 g Tris Base } Autoklaveres

Fyll opp med MilliQ vann til 1 l

1 x Blottebuffer

100 ml 10 x Blottebuffer

700 ml MilliQ vann

200 ml Metanol

Tilsett 1 ml antioksidant rett før bruk

TBS

10 ml 1 M Tris pH 7,5

50 ml NaCl

440 ml MilliQ vann

TTBS

20 ml 1 M Tris pH 7,5

100 ml NaCl

880 ml MilliQ vann

500 µl Tween 20 (0,05% av TBS løsningen)

Blokkeringsbuffer

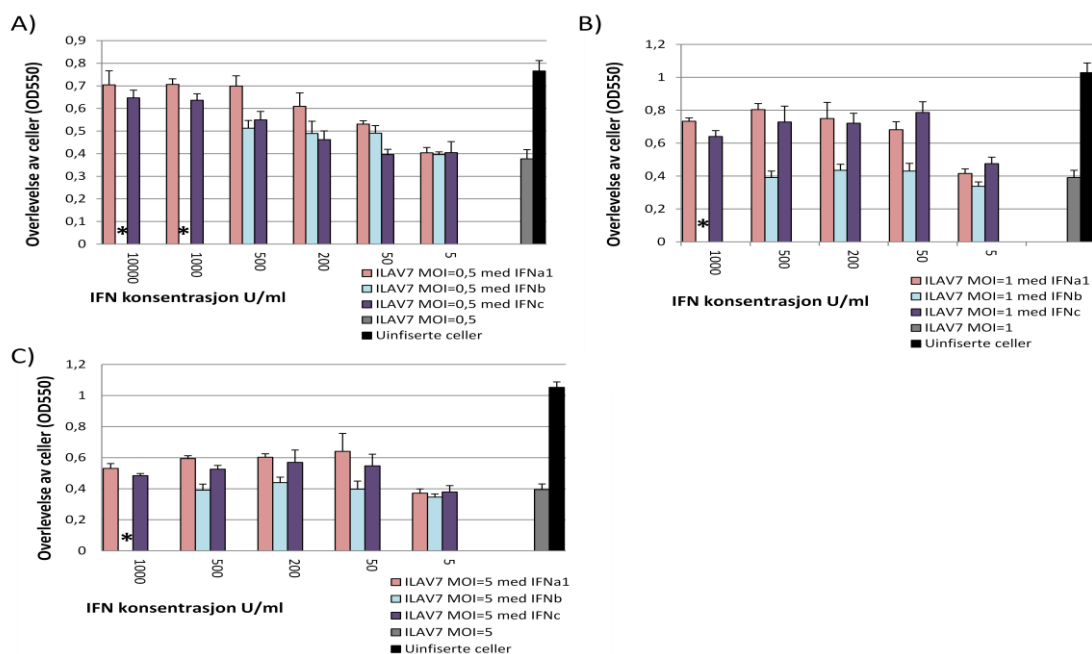
50 ml TTBS

2,5 g Tørrmelkpulver

6.2 Tilleggsdata resultater

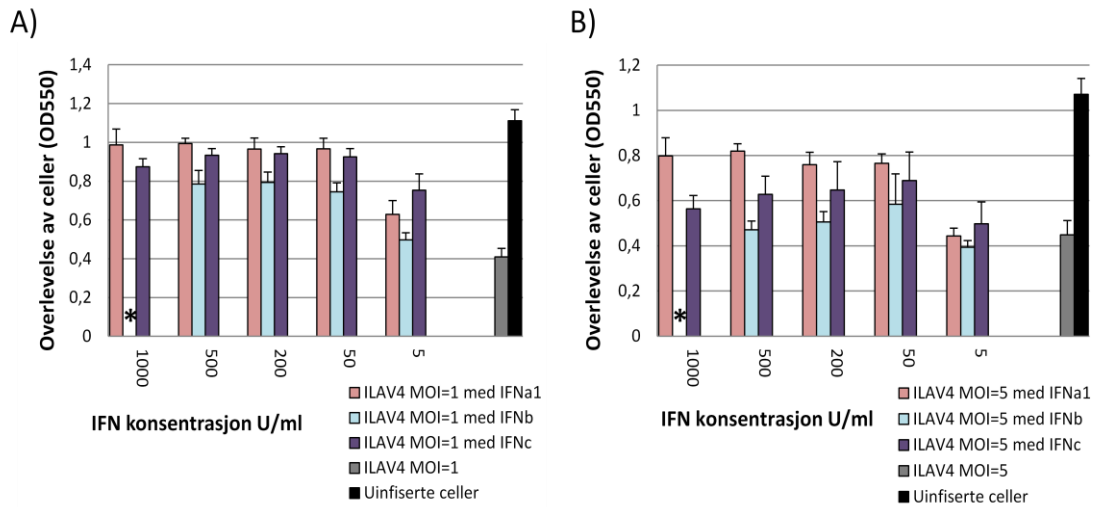
6.2.1 CPE-reduksjonsassays

6.2.1.1 ILAV7 infiserte celler inkubert ved 20°C (punkt 3.1.2)



Figur 14: Antiviral aktivitet av IFNα1, IFNβ og IFNγ mot ILAV7 i ASK-celler ved 20°C. Cellene ble inkubert med IFN i 24 timer før de ble infisert med ILAV7 ved tre ulike MOI. Cellene ble farget med krystallfiolett da det ble observert full CPE etter 6-11 dager. OD ble målt ved 550nm og gjennomsnittsverdien for uinfiserte ubehandlede celler ble fratrukket. A) ILAV7 ved MOI=0,5 B) ILAV7 ved MOI=1. C) ILAV7 ved MOI=5. *Ikke analysert.

6.2.1.2 ILAV4 infiserte celler inkubert ved 20°C (punkt 3.1.4)



Figur 15: Antiviral aktivitet av IFNa1, IFNb og IFNc mot ILAV4 i ASK-celler ved 20°C. Cellene ble inkubert med IFN i 24 timer før de ble infisert med ILAV4 ved to ulike MOI. Cellene ble farget med krystallfiolett da det ble observert full CPE etter 6-7 dager. OD ble målt ved 550nm og gjennomsnittsverdien for uinfiserte ubehandlede celler ble fratrukket. A) ILAV4 ved MOI=1 B) ILAV4 ved MOI=5. *Ikke analysert.

6.2.2 Real-time PCR

6.2.2.1 Effekt av IFN på replikasjonen av ILAV4 og ILAV7 målt ved transkripsjonen av hemagglutinin-esterase (HE) genet (Punkt 3.2)

Tabell 4 og 5: Tabell 4 viser gjennomsnittlige Ct-verdier for ISAV s6, mens tabell 14 viser Ratio s6- verdiene (oppreguleringen av virus) for de ulike prøvene i vekstkurveforsøket. Ct-verdien for ILAV7 behandlet med IFNa1 ved 15°C høstet etter 4t er benyttet som kontroll for å beregne $\Delta Ct_{m\ddot{a}lgen}$, som igjen brukes for å beregne Ratio s6. Denne Ct verdien ble valgt siden det var denne prøven som inneholdt minst virus i forsøket.

	ILAV4 15°C		ILAV4 20°C		ILAV7 15°C		ILAV7 20°C	
	Ubehandlet	+IFNa	Ubehandlet	+IFNa	Ubehandlet	+IFNa	Ubehandlet	+IFNa
4t	30,60	30,88	31,08	30,75	30,42	31,33	29,63	30,53
24t	19,88	21,07	22,15	23,52	18,60	21,11	21,24	23,34
72t	17,12	19,73	17,72	21,33	15,40	18,41	17,85	20,94
120t	14,45	15,85	17,85	22,22	16,16	16,37	18,62	20,41

	ILAV4 15°C		ILAV4 20°C		ILAV7 15°C		ILAV7 20°C	
	Ubehandlet	+IFNa	Ubehandlet	+IFNa	Ubehandlet	+IFNa	Ubehandlet	+IFNa
4t	1,66	1,08	1,19	1,49	1,88	1,29	3,37	3,65
24t	7153,66	2119,62	796,77	277,94	7338,62	1919,80	3577,20	640,85
72t	88095,98	10533,08	11407,12	988,71	134864,08	16845,73	26171,50	2721,31
120t	125587,68	98167,81	54220,02	4347,97	149924,84	62673,47	83933,65	24962,12

6.2.3 Induksjon av Mx og ISG15 24 timer etter infeksjon med ILAV 4 og 7 ved 15 og 20°C

6.2.3.1 Mx (punkt 3.5.1)

Tabell 6 og 7: Viser signalstyrkeforholdet på Western blot-båndene ved 15° og 20°C mellom Mx og Aktin. Verdiene i tabellene er regnet ut i fra ROI- verdiene til Western blot-båndene.

Forhold signalstyrke Mx og Aktin bånd (15°C)

	ROI Gjennomsnitt rå-data (Mean intensity)		Mx (mean intensity)/Aktin(mean intensity)			Gj.snitt paralleller	Std. avvik
	Mx	Aktin	Parallell 1	Parallell 2	Parallell 3		
ILAV 4	313,64	295,21	1,22	1,30	1,10	1,21	0,11
ILAV 7	468,19	298,83	1,76	1,56	1,49	1,60	0,09
Neg ktr	131,72	238,47	0,42	0,46	0,46	0,45	0,07
IFNa1	550,05	283,07	1,82	1,86	2,31	2,00	0,34

Forhold signalstyrke Mx og Aktin bånd (20°C)

	ROI Gjennomsnitt rå-data (Mean intensity)		Mx (mean intensity)/Aktin(mean intensity)			Gj.snitt paralleller	Std. avvik
	Mx	Aktin	Parallell 1	Parallell 2	Parallell 3		
ILAV 4	198,20	189,33	1,13	1,33	1,62	1,36	0,17
ILAV 7	303,65	197,01	1,28	2,13	2,39	1,94	0,43
Neg ktr	112,52	210,61	0,70	0,51	0,46	0,56	0,13
IFNa1	578,67	224,00	2,11	2,88	3,68	2,89	0,98

Tabell 8 og 9: Viser forholdet mellom de ulike prøvene og den negative kontrollen. Verdiene i tabellene er regnet ut i fra ROI- verdiene til Western blot båndene.

Mx og Aktin ved 15°C				
Parallell	1	2	3	Gjennomsnitt
Forhold signalstyrke mellom ILAV 4 og kontroll	2,88	2,81	2,37	2,69
Forhold signalstyrke mellom ILAV 7 og kontroll	4,14	3,37	3,22	3,58
Forhold signalstyrke IFNa1 og kontroll	4,28	4,03	4,97	4,43

Mx og Aktin ved 20°C				
Parallell	1	2	3	Gjennomsnitt
Forhold signalstyrke mellom ILAV 4 og kontroll	1,60	2,62	3,52	2,44
Forhold signalstyrke mellom ILAV 7 og kontroll	1,82	4,19	5,22	3,48
Forhold signalstyrke IFNa1 og kontroll	3,00	5,65	8,03	5,19

Tabell 10: T-test utført på ROI-verdiene for Mx/Aktin fra bildene i figur 5. Testen er utført med tosidig fordeling med ulik varians for å se om det er signifikant forskjell mellom verdiene. En t-test verdi på under 0,05 viser at det er signifikant forskjell mellom ROI-verdiene.

	15°C	20°C
T-test ILAV4 og 7:	0,00413813	0,234193078
T-test ILAV4 og Negativ kontroll	0,00451916	0,063040776
T-test ILAV4 og IFNa1	0,00413813	0,150146372
T-test ILAV7 og Negativ kontroll	0,00018564	0,07917512
T-test ILAV7 og IFNa1	0,17625962	0,254790095
T-test Negativ kontroll og IFNa1	0,01555049	0,101283346

6.2.3.2 ISG15 (punkt 3.5.2)

Tabell 11 og 12: Viser signalstyrkeforholdet på Western blot båndene ved 15 og 20°C mellom ISG-15 og Aktin.

Tallene i tabellene er regnet ut i fra ROI- verdiene til Western blot båndene.

Forhold signalstyrke ISG15 og Aktin bånd (15°C)							
	ROI Gjennomsnitt rå-data (Mean intensity)		ISG15 (mean intensity)/Aktin(mean intensity)			Gj.snitt paralleller	Std. avvik
	ISG15	Aktin	Parallell1	Parallell2	Parallell3		
ILAV 4	250,51	639,47	0,48	0,41	0,32	0,40	0,08
ILAV 7	541,26	664,93	1,11	0,88	0,58	0,86	0,27
Neg ktr	133,03	582,81	0,29	0,19	0,21	0,23	0,05
IFNa1	686,00	665,64	1,49	1,07	0,74	1,10	0,37

Forhold signalstyrke ISG15 og Aktin bånd (20°C)							
	ROI Gjennomsnitt rå-data (Mean intensity)		ISG15 (mean intensity)/Aktin(mean intensity)			Gj.snitt paralleller	Std. avvik
	ISG15	Aktin	Parallell 1	Parallell 2	Parallell 3		
ILAV 4	864,04	147,28	6,01	5,92	5,65	5,86	0,18
ILAV 7	1703,42	151,03	10,95	11,30	11,66	11,31	0,35
Neg ktr	225,65	149,74	1,53	1,62	1,37	1,51	0,13
IFNa1	2159,84	152,11	13,88	14,15	14,59	14,21	0,36

Tabell 13 og 14: Viser forholdet mellom de ulike prøvene og den negative kontrollen ved 15 og 20°C. Tallene i tabellene er regnet ut i fra ROI- verdiene til Western blot båndene.

ISG15 og Aktin ved 15°C				
Parallell	1	2	3	Gjennomsnitt
Forhold signalstyrke mellom ILAV 4 og kontroll	1,66	2,11	1,47	1,75
Forhold signalstyrke mellom ILAV 7 og kontroll	3,84	4,56	2,68	3,69
Forhold signalstyrke IFNa1 og kontroll	5,13	5,51	3,44	4,70

ISG15 og Aktin ved 20°C				
Parallell	1	2	3	Gjennomsnitt
Forhold signalstyrke mellom ILAV 4 og kontroll	3,93	3,65	4,14	3,89
Forhold signalstyrke mellom ILAV 7 og kontroll	7,17	6,97	8,54	7,51
Forhold signalstyrke IFNa1 og kontroll	9,09	8,72	10,68	9,44

Tabell 15: T-test utført på ROI-verdiene for ISG15/Aktin fra bildene i figur 5. Testen er utført med tosidig fordeling med ulik varians for å se om det er signifikant forskjell mellom verdiene. En t-test verdi på under 0,05 viser at det er signifikant forskjell mellom ROI-verdiene.

	15°C	20°C
T-test ILAV4 og 7:	0,08836559	0,00016557149
T-test ILAV4 og Negativ kontroll	0,04988521	0,00001203263
T-test ILAV4 og IFNa1	0,07804837	0,00004961520
T-test ILAV7 og Negativ kontroll	0,05220679	0,00009575089
T-test ILAV7 og IFNa1	0,42085959	0,00056126653
T-test Negativ kontroll og IFNa1	0,05473525	0,00005255697

6.2.4 Titrering av virussupernatanter

6.2.4.1 Effekt av IFN på replikasjon av ILAV målt ved titrering av virus (Punkt 3.4)

Tabell 16: Oversikt over virustiterene for ASK-cellene infisert med ILAV4 og ILAV7, høstet etter 72 timer.

Virus	-/+IFNa1	Temperatur	Titer
ILAV4	Ubehandlet	15°C	$2,99 \cdot 10^6$
		20°C	$1,54 \cdot 10^5$
	IFNa1 (1000U/ml)	15°C	$8,16 \cdot 10^4$
		20°C	$3,19 \cdot 10^3$
ILAV7	Ubehandlet	15°C	$1,96 \cdot 10^5$
		20°C	$5,74 \cdot 10^4$
	IFNa1 (1000U/ml)	15°C	$1,71 \cdot 10^4$
		20°C	$4,50 \cdot 10^3$