

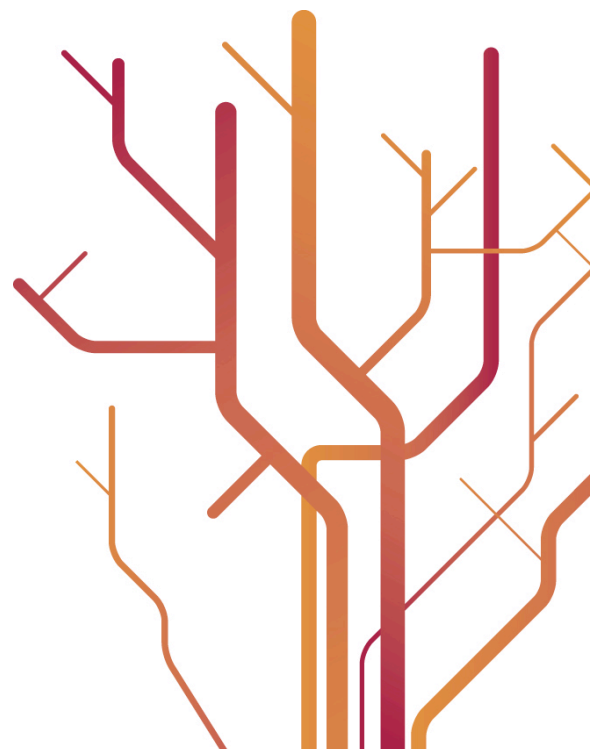
Induksjon av antivirale gener hos atlantisk laks (*Salmo salar* L.) ved intramuskulær injeksjon av ekspresjonsplasmid for interferon c (IFNc)



Camilla Robertsen

BIO-3955 Mastergradsoppgave i fiskehelse (60 stp)

Mai 2013



Forord

Dette mastergradsarbeidet ble utført ved fakultetet for biologi, fiskeri og økonomi, ved Norges Fiskerihøgskole, Universitetet i Tromsø.

Først og fremst vil jeg takke min veileder professor Børre Robertsen for å ha loset meg gjennom en spennende, lærerik og til tider frustrerende tid som mastergradsstudent i fiskeimmunologi. Takk for at du har introdusert meg for en interessant verden med interferoner og antivirale gener i tillegg til uvurderlig veiledning gjennom hele perioden. En stor takk rettes også til biveileder Sami (Chia Jung Chang) for god opplæring på lab i tillegg til utrettelig veiledning, forklaring og oppmuntring. Takk til Linn for detaljert opplæring på lab og for god oppfølging underveis. Takk til Baojian for god hjelp til celloarbeidet og takk til resten av "Team Robertsen" som har vært fantastiske som støtte når immunologiverden har blitt for stor. I tillegg skal alle dyktige arbeidere hos "Team Jørgensen" og "Team Dalmo" ha tusen takk for hjelp ved alle store og små kriser på lab. Tusen takk til alle ansatte ved landanlegget i Kårvika, særlig Tina Thesslund, for god hjelp under forsøkene.

Tusen takk til Tiril for oppmuntring og støtte hele veien i tillegg til utfyllende svar på alle dumme spørsmål. Takk for at vi har kunnet dele de frustrasjoner og gleder vi har møtt på laben og tusen takk for konstruktiv tilbakemelding under skriveprosessen. - Denne tiden hadde vært ensom uten deg. Takk til Martin for gjennomlesning av oppgaven, dette er nok ikke lettfordøyelig stoff for en samfunnsviter. Videre vil jeg takke mine medstudenter, særlig Gunhild, Kristoffer, Tom-Erik og Morten for en utviklende og spennende studietid ved NFH. Tusen takk til alle flotte venner og alle skjønne mennesker i kollektivet i Fr. Langes gate. Tusen takk til mamma og pappa for all støtte og heiiing inn mot mål. Sist, men ikke minst, tusen takk til Mats for upåklagelig støtte, oppmuntring og tålmodighet gjennom hele mastergradsperioden.

Med dette setter jeg strek for studenttilværelsen ved NFH og ser frem til å starte hverdagen som fiskehelsebiolog.

Tromsø 15.05.2013

Camilla Robertsen

Sammendrag

Virusinfeksjoner utgjør lakseoppdrettsnæringens største sykdomsproblem på landsbasis og forårsaker årlig store tap i form av dødelighet, redusert tilvekst, samt reduksjon i fiskehelse og -velferd. Dette til tross for omfattende smitteforebyggende tiltak og vaksinasjon. Interferonsystemet spiller en nøkkelrolle i det medfødte antivirale forsvaret hos pattedyr, hvor alarmproteinet interferon (IFN) produseres og skilles ut av virusinfiserte celler og videre inducerer økt antiviralt forsvar i andre celler ved å binde reseptorer som resulterer i induksjon av antivirale gener. Laks har et velfungerende IFN-system som spiller en viktig rolle i fiskens medfødte virusforsvar. Det har blitt vist at IFN-stimulering kan gi økt genuttrykk av antivirale gener i fisk og studier om bruken av IFN som vaksineadjuvant har gitt lovende resultater hos pattedyr. Tidligere forskning i Børre Robertsens gruppe har vist at intramuskulær injeksjon av ekspresjonsplasmid for IFNc gir beskyttelse av laks mot ILAV både ved injeksjonssmitte og kohabitantsmitte. Injeksjon av ekspresjonsplasmider for IFNa1 eller IFNb ga imidlertid ingen beskyttende effekt. På bakgrunn av dette ble effekt av IFNc på genekspresjon hos laks studert videre i denne oppgaven.

I første del av oppgaven ble induksjon av antivirale gener i fornyreleukocytter fra atlantisk laks studert etter stimulering med rekombinant IFNa1 og IFNc. Det ble ved kvantitativ RT-PCR vist at begge IFN ga en klar og relativt lik induksjon i genuttrykk av antivirale gener og reseptorer for viralt RNA. Det ble videre utført et forsøk hvor effekt av et ekspresjonsplasmid for IFNc på genuttrykk av antivirale gener og virusreseptorer hos presmolt av laks ble studert i en periode på åtte uker, for å undersøke mulige forklaringer på hvorfor i.m. injeksjon av IFNc-plasmid ga beskyttende effekt mot ILAV. Ved bruk av kvantitativ RT-PCR ble det vist at IFNc-plasmid inducerer økt uttrykk av antivirale gener ved injeksjonsstedet i muskelen i hele forsøksperioden. I tillegg ble det observert en økning i genuttrykk av antivirale gener og virusreseptorer i fornyre ved samme periode, samt økte transkripter av Mx vFed indre organer én uke etter injeksjon. Disse resultatene samsvarte med og ble bekreftet av resultater fra Western blotting og immunhistokjemi som viste detekterbare proteinuttrykk av Mx i lever ved uke 1, 3 og 8 og hjerte ved uke 8.

Resultater fra forsøkene utført i dette mastergradsarbeidet indikerer at IFNc kan benyttes til å øke medfødt antiviralt forsvar hos laks og følgelig kan ha potensiale til å benyttes som immunstimulant eller vaksineadjuvant for å forebygge virussykdommer i oppdrett.

INNHold

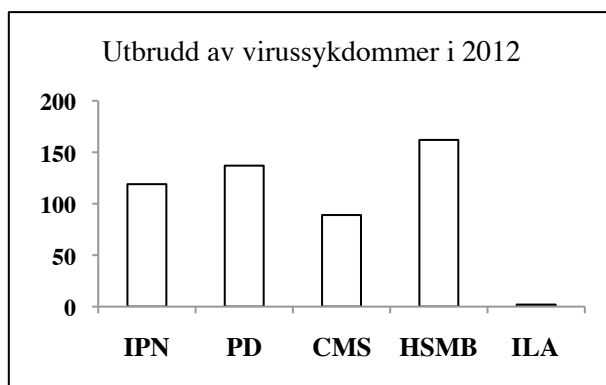
FORORD	III
SAMMENDRAG	V
INNHold	VI
1 INNLEDNING	1
1.1 VIRUSSYKDOMMER I LAKSEOPPDRETT	1
1.2 FOREBYGGENDE TILTAK	3
1.2.1 SMITTEFOREBYGGENDE TILTAK	3
1.2.2 VAKSINER	3
1.2.3 VAKSINERING I LAKSEOPPDRETT	4
1.2.4 AVL AV LAKS MED ØKT MOTSTANDSDYKTIGHET MOT VIRUSINFEKSJON	5
1.3 ADAPTIV OG MEDFØDT IMMUNITET MOT VIRUS HOS VERTEBRATER	6
1.3.1 ADAPTIV IMMUNITET MOT VIRUSINFEKSJONER	6
1.3.2 MEDFØDT IMMUNITET MOT VIRUSINFEKSJONER	7
1.4 INTERFERONSYSTEMET	7
1.5 RESEPTORER FOR VIRALT RNA	9
1.5.1 RLR	9
1.5.2 TLR	10
1.5.3 ANTIVIRALE IFN-STIMULERTE GENER	12
1.6 INTERFERONSYSTEMET HOS ATLANTISK LAKS	15
1.7 KOPLINGEN MELLOM DET MEDFØDTE OG DET ADAPTIVE IMMUNSYSTEMET	16
1.8 KAN IFN BENYTTES TIL Å ØKE FISKENS MOTSTANDSDYKTIGHET MOT VIRUSINFEKSJONER?	17
1.9 PROBLEMSTILLING	18
2. MATERIALER OG METODER	19
2.1 INDUKSJON AV ANTIVIRALE GENER OG RESEPTORER FOR VIRALT RNA I LEUKOCYTTER FRA FORNYRE ETTER BEHANDLING MED REKOMBINANT IFNα1 OG IFNγ	19
2.1.1 REKOMBINANTE IFN	19
2.1.2 ISOLERING AV LEUKOCYTTER FRA FORNYRE	19
2.2 EFFEKT AV EKSPRESJONSPLASMID FOR IFNγ PÅ GENEKSPRESJON HOS LAKS	21
2.2.1 FORSØKSDYR	21
2.2.4 ANALYSER	22
2.3 KVANTITATIV RT-PCR	23
2.3.1 PRIMERE	25
2.3.2 ISOLERING AV RNA	25
2.3.3 GELELEKTROFORESE AV RNA	26
2.3.4 CDNA-SYNTSE	27
2.3.5 KVANTITATIV RT-PCR	27
2.3.6 DATABEHANDLING	28
2.4 WESTERN BLOTTING	29
2.4.1 EKSTRAKSJON AV PROTEINER	29
2.4.2 MÅLING AV PROTEINKONSENTRASJON	30
2.4.3 LDS-PAGE	30
2.4.4 BLOTTING	31
2.4.5 BLOKKING	31
2.4.6 IMMUNDETEKSJON	31

2.5	IMMUNHISTOKJEMI	32
2.5.1	DEHYDRERING	33
2.5.2	INNSTØPING I PARAFINBLOKKER	33
2.5.3	KUTTING AV VEV	33
2.5.4	REHYDRERING	34
2.5.5	ANTIGENJENVINNING OG BLOKKING	34
2.5.6	IMMUNDETEKSJON	34
3.	RESULTATER	35
3.1	EFFEKT AV EKSPRESJONSPLASMID FOR IFN, ALENE ELLER I KOMBINASJON MED HE, PÅ GENEKSPRESJONEN HOS LAKS	35
3.2	INDUKSJON AV ANTIVIRALE GENER OG RESEPTORER FOR VIRALT RNA I LEUKOCYTTET FRA FORNYRE ETTER STIMULERING MED REKOMBINANT IFNA1 OG IFNC	35
3.2.1	EFFEKT AV REKOMBINANT IFNA1 OG IFNC PÅ ANTIVIRALE GENER I LEUKOCYTTET FRA FORNYRE	37
3.2.2	EFFEKT AV REKOMBINANT IFNA1 OG IFNC PÅ RESEPTORER FOR VIRALT RNA I LEUKOCYTTET FRA FORNYRE	38
3.3	EFFEKT AV EKSPRESJONSPLASMID FOR IFNC PÅ GENEKSPRESJONEN HOS LAKS	39
3.3.1	UTTRYKK AV IFNC, SAMT EFFEKT AV IFNC-PLASMID PÅ ANTIVIRALE GENER VED INJEKSJONSSTED I MUSKEL	41
3.3.2	EFFEKT AV IFNC-PLASMID PÅ ANTIVIRALE GENER I FORNYRE	42
3.3.3	EFFEKT AV IFNC-PLASMID PÅ RESEPTORER FOR VIRALT RNA I FORNYRE	43
3.3.4	EFFEKT AV IFNC-PLASMID PÅ EKSPRESJON AV MX I INDRE ORGANER	44
3.3.5	EFFEKT AV IFNC-PLASMID PÅ GENER KNYTTET TIL ADAPTIV IMMUNITET	44
3.3.6	EFFEKT AV IFNC-PLASMID PÅ UTTRYKK AV MX-PROTEIN I LEVER	45
3.3.7	EFFEKT AV IFNC-PLASMID PÅ UTTRYKK AV MX-PROTEIN I HJERTEMUSKEL	46
4.	DISKUSJON	47
4.1	EFFEKT AV REKOMBINANT IFNA1 OG IFNC PÅ EKSPRESJON AV ANTIVIRALE PROTEINER OG RESEPTORER FOR VIRALT RNA I FORNYRELEUKOCYTTET	47
4.2	EFFEKT AV IFNC-PLASMID PÅ GENEKSPRESJONEN HOS LAKS	49
4.2.1	EFFEKT AV IFNC-PLASMID PÅ GENEKSPRESJONEN I MUSKEL VED INJEKSJONSSTEDET	49
4.2.2	EFFEKT AV IFNC-PLASMID PÅ GENEKSPRESJONEN I INDRE ORGANER	49
4.2.3	GENER KNYTTET TIL ADAPTIV IMMUNITET	51
4.2.4	EFFEKT AV IFNC-PLASMID PÅ UTTRYKK AV MX PROTEIN I LEVER OG HJERTE	53
4.3	MULIGE FORKLARINGER PÅ BESKYTTENDE EFFEKT AV IFNC-PLASMID MOT ILAV	54
4.4	FREMTIDSPERSPEKTIVER OM BRUKEN AV IFN-PLASMID FOR Å ØKE FISKENS MOTSTANDSDYKTIGHET MOT VIRUS?	55
4.6	KONKLUSJON	57
	APPENDIKS I	67
	APPENDIKS II	69
	APPENDIKS III	70
	APPENDIKS IV	71

1 Innledning

Virusinfeksjoner utgjør oppdrettsnæringens største sykdomsproblem på landsbasis og gir årlig store tap i form av dødelighet og redusert tilvekst (83). Dessuten påfører virusinfeksjoner lidelse hos fisken og svekker immunforsvaret, noe som gjør den mer utsatt for sekundærinfeksjoner. Syk fisk takler også håndtering og ugunstige miljøfaktorer dårligere. Til tross for at det finnes tilgjengelige virusvaksiner på markedet, er flere av sykdommene svært utbredte og forårsaker vesentlige økonomiske tap for oppdretter. Det er derfor et klart behov for å forbedre virusvaksiner til laks, samt utvikle andre metoder som kan redusere omfang og utbredelse av virussykdommer i oppdrettsnæringen. Børre Robertsens forskningsgruppe studerer om interferon (IFN) kan brukes til å styrke laksens forsvar mot virusinfeksjoner. IFN er nøkkelproteiner i det antivirale forsvaret hos vertebrater. Som respons på en virusinfeksjon, vil celler syntetisere og skille ut IFN som videre stimulerer produksjon av antivirale proteiner i uinfiserte celler og gjør at cellene blir beskyttet mot virusinfeksjon (107). Det har blitt vist at atlantisk laks (*Salmo salar* L.) har et velutviklet IFN-system (98, 100). IFN-systemet er nærmere beskrevet nedenfor. Denne oppgaven omhandler bruken av IFNc fra laks til å stimulere fiskens forsvar mot virusinfeksjon.

1.1 Virussykdommer i lakseoppdrett



Figur 1. Antall utbrudd av virussykdommer på laks og ørret i 2012. Tallene er hentet fra Fiskehelsesrapporten 2012 (83).

Infeksiøs pankreas nekrose (IPN) forårsakes av infeksiøs pankreas nekrosevirus (IPNV), et dobbelttrådig (ds) RNA-virus i familien *Birnaviridae* (23). IPN kan forårsake høy dødelighet hos lakseyngel i settefiskfasen, men kan også føre til betydelige tap etter smoltutsett i sjø (97). Pankreas disease (PD) forårsakes av salmonid alfavirus (SAV), et enkelttrådig (ss) RNA-virus i familien

Innledning

Togaviridae som forårsaker høy dødelighet, redusert tilvekst og - slaktekvalitet hos laks i sjø (51). PD forårsaket av subtypen SAV3 regnes som endemisk fra Agder til Hustadvika i Møre og Romsdal, og strenge tiltak er iverksatt for å forhindre spredning av sykdommen utover dette området (7). Det har imidlertid nylig blitt registrert PD utenfor den endemiske sonen, men disse utbruddene forårsakes av subtypen SAV2. Både IPN og PD rammer blant annet pankreas, noe som medfører fordøyelsesproblemer for fisken. Kardiomyopatisyndrom (CMS) forårsakes av piscint myokardittvirus (PMV), et dsRNA-virus (*Totiviridae*) som forårsaker hjertesvikt hos stor, slakteklar fisk (41). Hjerte- og skjelettmuskelbetennelse (HSMB) forårsakes av piscint reovirus (PRV) (*Reoviridae*), et dsRNA-virus som angriper hjerte- og skjelettmuskel hos laks og kan gi høy dødelighet 5-9 måneder etter sjøutsett (29). Stor utbredelse og hyppige utbrudd gjør IPN, PD, CMS og HSMB til økonomisk viktige sykdommer i norsk oppdrettsnæring. Infeksiøs lakseanemi (ILA) forårsakes av infeksiøs lakseanemivirus (ILAV), et ssRNA-virus (*Orthomyxoviridae*) som forårsaker alvorlig anemi hos laks (25). ILA har tidligere medført store tap i norsk oppdrett, men grunnet gode smitte-forebyggende tiltak, med blant annet forebygging av horisontal smitte, ansees sykdommen i dag som under kontroll. Infeksiøs hematopoetisk nekrose virus (IHNV) og viral hemoragisk septikemi virus (VHSV) er ssRNA-virus (*Rhabdoviridae*) som forårsaker høy dødelighet i oppdrett av regnbueørret (*Oncorhynchus mykiss*) og laks utenfor Norge (108).

1.2 Forebyggende tiltak

1.2.1 Smitteforebyggende tiltak

Oppdrettsnæringen praktiserer omfattende smitteforebyggende tiltak, hvorav flere er nedfelt i forskrifter, som har vært av stor betydning for dagens høye produksjon av laks og ørret. Slike tiltak omfatter blant annet god avstand mellom anleggene, generasjonsskille, desinfeksjon av smittefarlig utstyr og fjerning av død fisk (30). Før smoltutsett i sjø, har det blitt vanlig å screene fisk for noen virus. Det er begrenset interaksjon av personell og utstyr mellom anlegg og lokaliteter brakklegges mellom produksjonene, i tillegg skal alt sjøvann desinfiseres før inntak i settefiskanlegg (31). Brønnbåter blir grundig rengjort og desinfisert etter transport av fisk, og transport gjennom smittefarlige områder unngås dersom det er mulig. Fiskehelsepersonell, Mattilsynet og Fiskeridirektoratet holder jevnlig tilsyn med anleggene for å sørge for optimale miljøbetingelser for fisken. Ved mistanke om eller påvisning av smittsomme sykdommer gir ”*Forskrift om smittsomme sykdommer, akvatiske dyr*” myndighetene hjemmel i lov til å iverksette tiltak og sanksjoner overfor oppdretter hvor det blant annet kan kreves utslakt av fisk ved påvisning av meldepliktig sykdom (30). VHS, IHN og ILA er meldepliktige sykdommer på liste 2 (ikke-eksotiske), mens PD og HSMB er liste 3-sykdommer (nasjonale).

1.2.2 Vaksiner

Vaksinasjon ansees som det mest effektive tiltaket mot infeksjøs sykdom hvor hensikten er å indusere en spesifikk, langvarig immunrespons som kan hindre eller begrense infeksjon av infeksjøs agens (65). Vaksine defineres som ”*et preparat av mikrobielt antigen, ofte kombinert med adjuvant, administrert til individer for å indusere beskyttende immunitet mot mikrobielle infeksjoner*” (1). Ved vaksinasjon blir det adaptive immunforsvaret aktivert, noe som fører til proliferasjon og differensiering av lymfocytter til effektorceller og hukommelsesceller. Videre gir dette beskyttende immunitet mot mikroben (1). B-celler produserer spesifikke antistoffer og cytotoksiske T-celler (CTL) dreper celler infisert med intracellulære mikrober (1). Tradisjonelle vaksiner består av inaktiverte eller attenuerte mikrober, men genet som koder for et spesifikt antigen kan også uttrykkes rekombinant i bakterier og videre isoleres til bruk i subenhetsvaksiner. Spesifikk immunitet kan også oppnås ved DNA-vaksinasjon hvor genet som koder for et mikrobielt antigen kloneres inn i et plasmid som består av bakterielt DNA (126). Plasmider kan bli injisert intramuskulært (i.m.) i verten og videre tatt opp av muskelcellene hvor genet transkriberes og mRNA translateres av cellens eget apparat (126). Dette medfører at verten selv blir vaksineprodusenten.

1.2.3 Vaksiner i lakseoppdrett

Utvikling av vaksiner til atlantisk laks har vært en forutsetning for dagens høye produksjonsvolum og lave antibiotikaforbruk. På begynnelsen av 1980-tallet økte produksjonen av norsk oppdrettslaks, noe som resulterte i en økning av antall sykdomsutbrudd. Særlig kaldtvannsvibriose forårsaket av *Vibrio salmonicida* ga betydelige tap. Store mengder antibiotika ble benyttet, som videre førte til store miljøutslipp og resistens mot medikamentene (9). Vaksiner basert på formalininaktiverte bakterier har siden gitt tilnærmet full beskyttelse mot kaldtvannsvibriose, vibriose forårsaket av *Vibrio anguillarum*, samt furunkulose forårsaket av *Aeromonas salmonicida* (117). For å oppnå full beskyttelse mot furunkulose, må de inaktiverte bakteriene emulgeres i mineralolje, noe som gir en depoteffekt av vaksinen og dermed en forbedret immunrespons (122). Disse vaksinene administreres via intraperitoneal (i.p.) injeksjon som er ansett som den mest effektive metoden (77, 89). Bruk av oljeadjuvans fører imidlertid i ulik grad til adhesjoner i bukhulen, samt melaninansamlinger i fileten og kan dermed redusere fiskevelferd og slaktekvalitet (9). Laks kan også vaksineres ved immersjon mot *Vibrio* og *Yersinia* i suspensjoner av inaktiverte bakterier, men disse vaksinene er i mindre grad benyttet. I dag er det påbudt å vaksinere all settefisk av atlantisk laks mot minimum furunkulose, vibriose og kaldtvannsvibriose (31).

Virusvaksiner mot IPN, PD og ILA, basert på enten inaktiverte virus eller rekombinante subenheter, er tilgjengelige, men de mange sykdomsutbrudd av IPN og PD indikerer en moderat effekt. Vaksiner basert på attenuerte virus kan kanskje gi bedre beskyttelse, men er ikke lov å bruke av miljøsikkerhetsmessige hensyn. En undersøkelse av tre ulike viruskonsentrasjoner av en ILA-vaksine fastslo at beskyttende effekt korrelerte med mengde virus injisert, en sammenheng som også har blitt vist for en IPN-vaksine (57, 80). Produksjon av adekvate mengder viruspartikler eller rekombinant virusantigen er kostbart og arbeidskrevende, noe som gjør at produksjonskostnaden for å produsere tilstrekkelige mengder virusantigen kanskje ikke er økonomisk forsvarlig i lakseoppdrett (67).

DNA-vaksiner baserer seg på i.m. injeksjon av et DNA-segment som koder for et mikrobielt antigen. Det har blitt vist at injeksjon av et plasmid som koder for rhabdovirusenes glykoprotein (G-protein) har gitt god beskyttelse mot IHN og VHS hos både regnbueørret og laks (117, 126). DNA-vaksiner mot IPNV og ILAV har også vært testet hos laks, men ga imidlertid langt dårligere beskyttelse enn vaksinene mot rhabdovirusene (75-76). Fordelen ved bruk av en DNA-vaksine sammenlignet med en vaksine basert på hele eller deler av viruspartikler, er at celler som tar opp plasmidet vil produsere virus-antigen, noe som vil føre til en etterligning av en reell virusinfeksjon

Innledning

og følgelig aktivere både humoral og cellulær immunitet (122). Vaksiner basert på rekombinant protein eller inaktivert virus vil derimot hovedsakelig føre til aktivering av humoral immunitet. I tillegg til god beskyttelse av DNA-vaksiner mot IHN og VHS har det også blitt vist at plasmider kan uttrykkes i fiskemuskel over lang tid. Tonheim og medarbeidere (2007) viste at i.m. injisert plasmid var detekterbart 535 dager etter injeksjon, noe som viser at DNA-vaksiner har potensiale til å indusere langvarig immunitet i sjøvannsfasen (127). I Norge og EU defineres foreløpig DNA-vaksinert fisk som genmodifiserte organismer (GMO). Muligheten for at plasmid kan integreres i vertens genom ansees som lite sannsynlig, men grunnet føre-var-prinsippet er DNA-vaksiner foreløpig ikke tillatt i Europa (126). En vaksine mot IHN er imidlertid godkjent i Canada og har vært i salg der siden 2005 (105). I Norge er GMO omfattet av genteknologiloven som skal sikre at fremstilling av GMO skjer uten miljømessige skadevirkninger (34).

1.2.4 Avl av laks med økt motstandsdyktighet mot virusinfeksjon

Økt resistens mot virusinfeksjon kan være en arvbar egenskap og benyttes i dag av rognprodusentene til å produsere laks med økt resistens mot IPN. Slik fisk blir populært kalt QTL-fisk, da avlsmetoden er basert på såkalte ”quantitative trait loci” (QTL). QTL er et område på genomet som kan styre en bestemt, kvantitativ egenskap og som kan defineres med genetiske markører (79). Lokalisering av QTL for sykdomsresistens er av stor interesse, da dette vil gi viktig kunnskap om den genetiske reguleringen av resistens mot virusinfeksjoner, samt vert/virus interaksjoner i fisk (45). Moen og medarbeidere fant i 2007 en QTL for ILA-resistens, men denne betegnes som svak og er ikke i bruk (79). En QTL for IPN-resistens ble funnet av Houston og medarbeidere i 2008 og selskapet SalmoBreed har nylig meldt om at det har blitt funnet en relativt sterk QTL for PD-resistens (45, 104). QTL-rogn for IPN-resistens har vært tilgjengelig på det norske markedet siden 2009 og selskapet Aquagen rapporterer at QTL-laks har høyere motstandsdyktighet mot IPNV i både ferskvannsfasen og sjøvannsfasen sammenlignet med tidligere generasjoner og referansegrupper uten QTL (5-6).

Nedgangen i antall innmeldte IPN-utbrudd de siste årene kan være et resultat av at QTL-rogn i dag benyttes i større grad i settefiskanleggene, men kan også delvis skyldes at IPN ikke lenger er en meldepliktig sykdom, noe som kan ha ført til underrapportering. En vet foreløpig lite om mekanismene bak IPN-resistensen hos QTL-fisk, men dette kan involvere gener forbundet med medfødt immunitet mot virus eller gener som påvirker opptak og replikasjon av IPNV generelt.

1.3 Adaptiv og medfødt immunitet mot virus hos vertebrater

Både det medfødte og adaptive immunforsvaret er viktig for å bekjempe virusinfeksjoner hos vertebrater (15). En oversikt er oppsummert i tabell 1.

Tabell 1. Oversikt over medfødt og adaptiv immunitet mot virus hos vertebrater. Modifisert etter Chaplin 2010 (15).

	MEDFØDT IMMUNFORSVAR	ADAPTIVT IMMUNFORSVAR
FUNKSJON	Førstelinjeforsvar	Ervervet immunitet
RESPONS OG VARIGHET	Hurtig respons, kort varighet	Langsommere respons, lang varighet
KOMPONENTER	Hud, mukus, fagocytter (DC, NK-celler, monocytter/makrofager og neutrofiler), cytokiner, kjemokiner, reseptorer for viralt arvestoff komplement	Lymfocytter (B-celler, T-hjelpeceller, cytotoksiske T-celler)
SPESIFISITET	Lav, gjenkjenner relativt få antigener	Høy, gjenkjenner relativt mange antigener
HUKOMMELSE	Nei	Ja

1.3.1 Adaptiv immunitet mot virusinfeksjoner

Ved vaksinasjon av en vertebrat mot en mikrobe vil lymfocytter differensiere til effektorceller og hukommelsesceller som vil indusere nøytralisering og eliminering av mikroben, samt gi en rask og spesifikk immunrespons ved andregangs eksponering (1). Mikroben vil dermed bekjempes før den forårsaker sykdom hos verten og dette prinsippet benyttes ved vaksiner. Adaptiv immunitet er mediert av reseptorer uttrykt på B- og T-celler (15). Høy spesifisitet oppnås ved somatisk rearrangering av genelementer for å danne spesifikke T-cellerreseptorer (TCR) og B-cellerreseptorer (BCR), også kalt immunoglobuliner (Ig). Det har blitt vist at fisk har BCR og det er karakterisert tre Ig isotyper; IgM, IgD og IgT/IgZ (142). Disse har imidlertid ikke isotopbytte og lav affinitet (122). I tillegg innehar B-celler hos fisk fagocytisk aktivitet (62). Adaptiv immunitet mot virus oppnås ved aktivering av det cellulære immunforsvaret hvor T-celler gjenkjenner peptidantigen presentert av antigenpresenterende celler (APC) via major histocompatibility complex (MHC) uttrykt i membranen. T-celler differensierer til CTL som dreper celler som uttrykker virusantigen i tillegg til hukommelsesceller som sørger for en potent eliminering av mikroben ved reinfeksjon (1). Det har blitt vist at fisk har T-celler med liknende aktivitet som hos pattedyr, samt TCR og co-reseptorene CD8 og CD4 (12, 126).

1.3.2 Medfødt immunitet mot virusinfeksjoner

Flere komponenter er involvert i medfødt immunitet mot virus og disse har, i motsetning til immunceller i det adaptive immunforsvaret, relativt lav patogenspesifisitet og aktivering av disse medfører ikke hukommelse. I tillegg til fysiske barrierer (hud og mukus) består medfødt immunitet mot virus av komplement, kjemokiner, cytokiner og reseptorer for viralt arvestoff (1). NK-celler spiller en viktig rolle i bekjempelsen av virusinfeksjoner ved å drepe virusinfiserte celler og aktivere fagocytter ved å skille ut cytokiner. Dendritiske celler (DC), monocytter (i blod), makrofager (i vev) og neutrofiler fagocytterer mikrober og degraderer dem i intracellulære vesikler. DC, monocytter og makrofager er også antigenpresenterende celler (APC) (1). DC finnes i de fleste vev, men er konsentrert i immunologiske organer og uttrykker både MHC I og MHC II noe som fører til at de kan aktivere både CTL og T_h -celler (15). Plasmacytoide DC (pDC) er spesialiserte IFN-produserende celler som skiller ut store mengder IFN α , men også IFN β under virusinfeksjoner (140).

Flere immunceller er konserverte i fisk og inkluderer monocytter, makrofager, neutrofiler og NK-celler (134). DC har nylig blitt identifisert i zebrafisk og regnbueørret (8, 68). I tillegg har flere cytokiner og samtlige reseptorer for viralt arvestoff også blitt karakterisert hos fisk (130, 142).

1.4 Interferonsystemet

IFN er cytokiner som spiller en nøkkelrolle i vertebratenes førstelinjeforsvar mot virusinfeksjoner (107). Viralt RNA gjenkjennes av reseptorer i cellene og initierer en signaltransduksjon som leder til transkripsjon og produksjon av IFN. IFN skilles ut, transporteres med blodbanen og binder IFN-reseptorer (IFNR) som finnes på de fleste kroppsceller som videre stimulerer produksjon av antivirale proteiner i uinfiserte celler (107). IFN-mediert signaltransduksjon fører til økt transkripsjon av flere hundre ISG, deriblant flere som koder for antivirale proteiner som hindrer replikasjon eller spredning av virus (38). IFN kan også indusere apoptose av virusinfiserte celler, samt aktivere både medfødte og adaptive lymfocytter (123). Hos pattedyr deles IFN inn i type I, II og III på grunnlag av sekvenslikhet, kromosomal lokalisasjon, samt hvilket reseptorkompleks som blir benyttet til signaltransduksjon (16). Hos mennesker består type I IFN av IFN α , IFN β , IFN ω , IFN κ og IFN ϵ hvor IFN α og IFN β ansees for å være viktigst i førstelinjeforsvaret mot virus (87). Type I IFN hos pattedyr mangler introner i genene og benytter én og samme IFN-reseptor (IFNR) til signaltransduksjon. Denne består av subenhetene IFNAR1 og IFNAR2 (107). Viktigheten av IFN-systemet i forsvar mot virus ble fastslått gjennom generering av "knock out" mus, hvor type I

Innledning

IFNR ble fjernet. Disse musene døde raskt av virusinfeksjoner til tross for et velfungerende adaptivt immunforsvar (38). Type I IFN hos fisk består av minst fire subtyper (IFNa, IFNb, IFNc og IFNd) og er forskjellig fra type I IFN hos pattedyr på flere måter (120). Hos fisk har genene for type I IFN fire introner og har lav sekvenslikhet med type I IFN hos pattedyr. Fisk benytter dessuten minst to ulike IFNR til signaltransduksjon (3).

Type II IFN er identisk med IFN γ (87). I motsetning til type I IFN som kan produseres av de fleste celletyper, blir IFN γ hovedsakelig produsert av NK-celler ved den medfødte immunresponsen og av T-celler ved den adaptive immunresponsen (120). IFN γ signalerer gjennom en egen reseptor som består av subenhetene IFNGR1 og IFNGR2 (107). IFN γ er karakterisert i flere fiskearter, deriblant laks hvor det har blitt vist at fisk har lik ekson/intron struktur i genene som pattedyr og innehar antiviral effekt mot akvatiske virus (120).

Type III IFN består av IFN λ 1, IFN λ 2, IFN λ 3 (116). IFN λ likner strukturelt sett på IL-10, men innehar lignende antivirale, antiproliferative og immunomodulerende egenskaper som type I IFN (116). IFN λ signalerer gjennom reseptorkomplekset IFNLR1/IFNLR2 noe som fører til en lignende signaltransduksjon som for type I IFN (143). IFN λ er hittil ikke funnet hos fisk.

1.5 Reseptorer for viralt RNA

Virusinfiserte celler syntetiserer IFN som en respons på at cellene gjenkjenner og binder viralt RNA via RIG-I-lignende reseptorer (RLR) i cytoplasma eller toll-lignende reseptorer (TLR) som er forankret i membranen hos intracellulære organeller som endosomer (143). Reseptorer for viralt RNA binder mikrobielle komponenter som er essensielle for mikrobens overlevelse, noe som sikrer at mikroben ikke kan modifisere strukturen for å unnsnippe å bli gjenkjent av vertens immunforsvar (4).

1.5.1 RLR

RLR-familien består av RIG-I, MDA5 og LGP2, hvor RIG-I og MDA5 er de viktigste reseptorene for viralt RNA i de fleste nukleære celler med unntak av pDC hos pattedyr (124, 142). I tillegg til å binde viralt RNA, binder RIG-I og MDA5 også polyinosinic polycytidylic acid (poly I:C), et syntetisk dsRNA som induserer type I IFN i celler (69). RIG-I og MDA5 er konstitutivt uttrykt i cytoplasma hos de fleste celler (124). RIG-I og MDA5 inneholder CARD-domener, viktig for aktivering av nedstrøms signalveier som fører til økt produksjon av IFN, i tillegg til et DExD/H-boks RNA helikasedomene, ansvarlig for gjenkjenning og binding av ligand (54). RIG-I, MDA5 og LGP2 har blitt karakterisert hos flere fiskearter, deriblant laks (14, 56).

RIG-I og MDA5 signalerer via IPS-1

Ved binding til viralt RNA vil RIG-I og MDA5 assosiere med adaptorproteinet IFN- β promoter stimulator 1 (IPS-1) gjennom CARD-CARD interaksjoner (Fig.2) (4). IPS-1 er bundet til mitokondrier via et C-terminalt transmembrandomene, men det har også blitt vist at IPS er lokalisert på peroxisomer (54). IPS-1 assosierer med TRAF3 som rekrutterer og aktiverer kinasene TBK1 og IKK ϵ . Disse fosforylerer og aktiverer interferon regulatory transcription factor 3 (IRF3) og IRF7, samt nuclear factor kappa B (NF κ B) (123). NF κ B, samt fosforylerte homo/heterodimere av IRF3 og IRF7, translokerer inn i kjernen og binder seg til promotoren hos IFN, noe som aktiverer transkripsjonen av type I IFN (54).

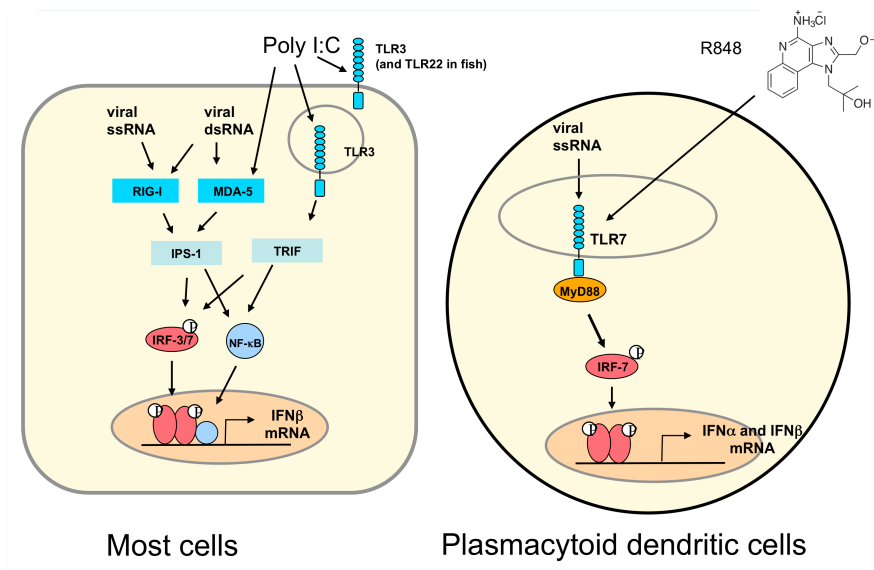
Flere studier har blitt utført på RLR-signalering hos fisk og både IRF3 og IRF7 er karakterisert (139). Lauksund og medarbeidere (2009) har dessuten vist at IPS-1 spiller en tilsvarende rolle hos atlantisk laks som hos pattedyr til tross for lav sekvenslikhet mellom artene (56).

1.5.2 TLR

TLR er forankret i membraner enten på celleoverflaten eller i cellulære organeller. Disse uttrykkes hovedsakelig på APC som DC og makrofager, men også på B-celler, noen typer T-celler, neutrofiler, fibroblaster og epitelceller (4, 54). TLR består av tre deler; en ekstracellulær N-terminal med en leucin-rich repeat region (LRR), et transmembrandomene, samt et intracellulært C-terminal med et toll/IL-1 reseptor (TIR) domene (85). LRR-regionen er involvert i gjenkjenning av viralt arvestoff, transmembrandomenet er ansvarlig for forankring i membranen, mens TIR-domenet er ansvarlig for signaltransduksjon (95).

Det er karakterisert ti ulike TLR hos mennesker hvor TLR3, TLR7, TLR8, TLR9 er involvert i gjenkjenning av viralt RNA (54, 112). TLR er lokalisert i membranen til intracellulære organeller som endosomer og lysosomer, med LRR lokalisert inn mot lumen hvor de binder nukleinsyrer fra fagocytterte virus (112). TLR3 gjenkjenner dsRNA som blir produsert av de fleste virus i replikasjonszyklusen, i tillegg til poly I:C, og uttrykkes hos DC og epitelceller (4, 59). TLR7 og TLR8 viser høy sekvenslikhet med hverandre og gjenkjenner ssRNA, samt den syntetiske RNA-analogen R848. De er lokalisert i endosomale membraner hvor de binder RNA fra degraderte virus (4). TLR9 gjenkjenner umetylert DNA med cytosine-guanine (CpG) sekvenser som finnes i genomet til DNA-virus og bakterier (143).

TLR3, TLR7, TLR8 og TLR9 er konservert i fisk og ligandspesifisitet er vist for TLR3 og TLR9 (46, 71). Matsuo og medarbeidere (2008) har dessuten vist at fisk til forskjell fra pattedyr har TLR22 som har lignende funksjon som TLR3 (71). TLR22 i fugu (*Takifugu rubripes*) sitter i plasmamembranen og gjenkjenner ekstracellulært dsRNA samt poly I:C, og induserer produksjon av type I IFN *in vitro* (71). Det er foreslått at TLR22 supplementerer TLR3 i å binde viralt RNA, da fisk lever i et akvatisk miljø som potensielt kan inneholde store mengder viruspartikler og følgelig kan ha behov for flere virusreseptorer enn pattedyr (71).



Figur 2. Signaltransduksjon via RLR og TLR. Figuren viser en oversikt over IPS-avhengig signalvei, TRIF-avhengig signalvei og Myd88-avhengig signalvei. Figuren er lånt av professor Børre Robertsen.

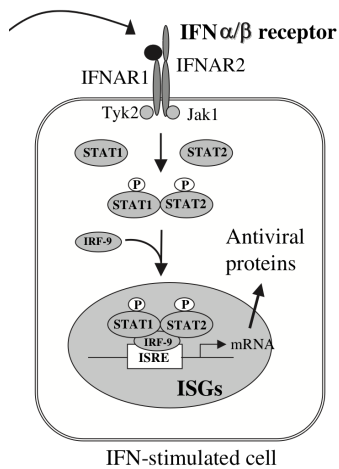
TLR3 signalerer via TRIF

Etter ligandbinding vil TLR3 assosiere med adaptorproteinet TRIF som igjen rekrutterer TRAF6 og RIP-1 (136). Dette fører til aktivering av NF-κB, IRF3 og IRF7 som videre aktiverer transkripsjonen av IFNβ. Det er vist at fisk har TRIF, TRAF6, IRF3 og IRF7, noe som indikerer at TRIF-avhengig signaltransduksjon er konserverv i fisk (93).

TLR7, TLR8 og TLR9 signalerer via Myd88

Til forskjell fra TLR3, benytter TLR7, TLR8 og TLR9 adaptorproteinet Myd88 til signaltransduksjon (4). Spesielt pDC uttrykker høye nivåer av TLR7 og TLR9. Etter at ssRNA har bundet til TLR7, vil Myd88 rekruttere en rekke proteiner deriblant IRAK4, IRAK1 og IRAK2 aktivert til et kompleks som interagerer med TRAF6 (54). Dette resulterer i fosforylering av IRF7 som har et høyt basaluttrykk i pDC. Fosforylert IRF7 translokerer til kjernen hvor det binder til seg til promoterne til IFNα og IFNβ, noe som fører til produksjon av IFN. Myd88 har blitt identifisert i fisk, noe som indikerer at Myd88-avhengig signaltransduksjon er konserverv (93).

1.5.3 Antivirale IFN-stimulerte gener



Figur 3. Type I IFN signaltransduksjon gjennom JAK/STAT signalvei. Figuren viser de ulike stegene i JAK/STAT signalvei etter type I IFN har bundet IFNR. Figuren er tatt fra Robertsen (2006) (100).

Hos pattedyr signalerer type I IFN gjennom en IFNR som består av subenhetene IFNAR1 og IFNAR2, som uttrykkes på de fleste celler (107). Fisk har minst to IFNR som foreløpig bare er beskrevet for zebrafisk. Når IFN α/β binder IFNR, vil dette føre til en aktivering av Tyk-2 og JAK-1 som fosforilerer STAT1 og STAT2. Disse danner en dimer og interagerer deretter med IRF9 til å danne transkripsjonsfaktorkomplekset interferon stimulated gene factor 3 (ISGF3) (100). ISGF3 translokerer til kjernen hvor det fester seg til en ISRE-sekvens i promoterne til ISG som dermed initierer transkripsjonen av disse. Flere arbeider tyder på at fisk har en lignende JAK-STAT-signalvei, men foreløpig er bare STAT1 godt karakterisert hos fisk (115, 138). Flere hundre ulike ISG blir produsert når IFN binder IFNR på cellene, men antiviral aktivitet er bare påvist hos et begrenset antall (113). Den samlede antivirale aktiviteten av ISG er imidlertid mye større enn aktiviteten av hver enkelt ISG (113). Fisk har homologer av de fleste antivirale ISG som er funnet hos pattedyr og disse har sannsynligvis tilsvarende antiviral rolle hos fisk (130).

I dette arbeidet har vi valgt å studere effekten av IFN i laks på noen av de viktigste antivirale proteinene identifisert hos pattedyr; Mx, viperin, ISG15, IFIT5 (tidligere kjent som ISG58) og IFITM3. De antivirale egenskapene til disse ISG er nærmere beskrevet nedenfor.

Mx-proteiner

Orthomyxovirus resistance gene (Mx) ble først identifisert av Horisberger og medarbeidere (1983) i en innavlet musestamme som viste høy resistens mot influensavirus A (43). Mx-proteiner er GTPaser med antiviral effekt overfor flere RNA-virus og noen DNA-virus (36, 42). Det er identifisert to Mx-gener i mennesker (MxA og MxB) hvor bare MxA har vist å ha antiviral effekt (37). MxA er lokalisert i glatt endoplasmatisk retikulum (ER) hvor det danner aggregater i IFN-stimulerte celler (60). Renset Mx-protein danner oligometriske ringstrukturer *in vitro*, noe som er viktig for GTPase-aktivitet, proteinstabilitet og gjenkjennelse av virus og trolig danner Mx slike ringstrukturer rundt virusets nukleokapsid under en infeksjon (39). MxA i mennesker og Mx1 i mus danner granulerte aggregater i henholdsvis cytoplasma og nukleus i IFN-stimulerte celler, noe som forhindrer degradering og sørger for en depoteffekt som følgelig gir langvarig virkning av proteinet (39). Mx blir sterkt induisert under virusinfeksjoner eller poly I:C stimulering i salmonider (99). Hos laks har man funnet tre Mx-gener, Mx1, Mx2 og Mx3, hvor Mx1 har vist å ha antiviral aktivitet mot IPNV i lakseceller (55). Det har blitt vist at Mx danner aggregater i både nukleus og cytoplasma i IFN-stimulerte fiskeceller og trolig har disse lengre varighet enn i pattedyr da fisk lever i et akvatisk miljø med relativt lave temperaturer (47, 60).

Viperin

Viperin er et av få ISG som er vist å ha direkte antiviral effekt og proteinet er forankret i ER og lipiddråper ved en N-terminal, amfipatisk α -heliks, mens C-terminal ende er cytosolsk (72). Viperin har et lavt basalnivå, men blir induisert i de fleste celletyper av type I og II IFN, samt flere typer RNA- og DNA-virus (72, 110). Lipiddråper er involvert i lagring og degradering av protein, samt lagring og transport av fett. Det har blitt vist at flere virus, blant annet hepatitt C-virus og denguefebvirus benytter disse til replikasjon (78, 106). Selv om antiviral effekt av viperin har blitt vist for flere virus, er eksakt virkningsmekanisme bare kjent for noen få. Det er vist at viperin hemmer "knopping" av influensavirus fra plasmamembranen hos infiserte celler ved å endre membranens fluiditet, mens hepatitt C-virus hemmes ved å hindre formasjon av virusets replikasjonskompleks (72, 132). Kanskje har viperin en lik virkningsmekanisme overfor virus som ligner HCV eller influensavirus. Det imidlertid vist at humant cytomegalovirus (CMV) kan benytte viperin for å øke sin evne til å infeksjon, da virusreplikasjonen er svekket i celler som mangler proteinet (111). Viperin ble først identifisert av Boudinot og medarbeidere (1999) som et virus induced gene (vig) i regnbueørret infisert med VHS, før en human homolog ble funnet av Chin og Cresswell (10, 18). Det har blitt vist at viperin blir kraftig induisert av ILAV og type I IFN i lakseceller (121, 133).

ISG15

Interferonstimulert gen 15 (ISG15) ble først identifisert av Farrell og medarbeidere (1979) som et 15 kDa protein i IFN-stimulerte tumorceller fra mus (26). ISG15 er et ubiquitin-lignende protein som indueres sterkt av type I IFN i pattedyr og er en bredspektret, kraftig hemmer av virusinfeksjon (40, 109, 130). Det er også foreslått at løselig ISG15 fungerer som et cytokin ved å inducere IFN γ i T-celler, samt stimulere proliferasjon av NK-celler (103). Proteinet konjugerer til proteiner ved liknende mekanismer som ubiquitin ved en prosess kalt ISGylering som resulterer i en forstyrrelse av proteinets stabilitet, funksjon eller lokalisasjon (96). ISG15 har blitt identifisert i flere fiskearter, blant annet atlantisk laks, hvor det er vist at ISG15 indueres kraftig av IFN, dsRNA og virale infeksjoner, noe som indikerer at proteinet har tilsvarende antiviral virkning i laks og pattedyr (103).

IFIT

IFN-induced proteins with tetratricopeptide repeats (IFIT) indueres raskt under virusinfeksjoner, IFN-stimulering eller gjenkjenning av viralt arvestoff i pattedyr og begrenser virusinfeksjoner ved å binde virale proteiner eller viralt RNA i cytoplasma, eller nedregulere initiering av translasjonen. IFIT binder også viralt mRNA som enten mangler eller delvis har fått tilført en cap-struktur, viktig for at ribosomet skal gjenkjenne og binde mRNA før translasjonen (22). IFIT samarbeider også med andre ISG og bidrar dermed til å begrense virusreplikasjon (141). De fleste pattedyr har IFIT1 (ISG56), IFIT2 (ISG54), IFIT3 (ISG60) og IFIT5 (ISG58), mens fisk ser ut til bare å ha IFIT5 (141).

IFITM

IFN-induced transmembran proteiner (IFITM) er små proteiner som indueres kraftig av type I og type II IFN (22). De fleste vertebrater har to eller flere IFITM-proteiner og disse er basalt uttrykt hos mennesker. IFITM3 ansees å være spesielt viktig for å hemme influensa A-virus, men eksakt antiviral mekanisme for IFITM-proteinene er ikke fullstendig karakterisert.

1.6 Interferonsystemet hos atlantisk laks

IFN fra atlantisk laks ble klonet av Robertsen og medarbeidere i 2003 og det ble funnet to funksjonelle gener, Sasa IFN α 1 og Sasa IFN α 2, nå kalt IFNa1 og IFNa2 (101). I 2009 publiserte Sun og medarbeidere at de hadde identifisert og karakterisert 11 gener av type I IFN i samme genomisk region hos laks (119). Dette er det største antall IFN-gener funnet i noen fiskeart. Regionen består av IFNa1 (1 gen), IFNa3 (1 gen), IFNb (4 gener) og IFNc (5 gener), mens IFNa2 (1 gen) og IFNd (1 gen) er lokalisert i andre regioner (119). Atlantisk laks er foreløpig den eneste arten der en har påvist alle fire subtyper av type I IFN. Type I IFN kan videre deles inn i to grupper, 2C IFN og 4C IFN, basert på om de har to eller fire konserverte cysteiner som henholdsvis danner en eller to disulfidbroer. IFNa og IFNd tilhører 2C IFN, mens IFNb og IFNc tilhører 4C IFN (121). Det er vist i zebrafisk at 2C IFN og 4C IFN binder to ulike reseptorer, noe som avviker fra type I IFNR i pattedyr (3). Dette er så langt ikke vist for laks. Som hos andre fisk har type I IFN-gener hos laks fem eksoner og fire introner (101). Nyere forskning tyder på at IFNa1 induseres via RIG-I/MDA5 mens IFNb og IFNc hovedsakelig induseres via TLR7 (121). IFNd har så langt ikke vist å inneha antiviral aktivitet i laks (121). IFNa1, IFNb og IFNc induserer Mx og ISG15 i lakseceller, i tillegg til å ha antiviral aktivitet mot IPNV i celler (99, 121) I tillegg er det blitt vist at IFNa1, IFNb og IFNc induserer en kortvarig resistens mot ILAV (Svingerud og medarbeidere, upubliserte data). Til tross for at det ikke finnes ekte pattedyrshomologer av type I IFN i fisk, har IFNa1 i laks en lignende rolle som IFN β i pattedyr, mens IFNb og IFNc har en lignende rolle som IFN α (121). Svingerud og medarbeidere (2012) har vist at laks har spesialiserte celler i hodenyre og milt som produserer høye nivå av IFNb og IFNc som respons på R848, noe som indikerer at disse cellene har en lignende rolle som pDC i pattedyr (121).

Som hos pattedyr består type II IFN hos laks av bare ett medlem, IFN γ (120). IFN γ hos laks er lite studert, men Sun og medarbeidere (2011) har vist at IFN γ har antiviral effekt overfor IPNV og SAV3 i celler (120). I tillegg ble det vist at IFN γ sammenlignet med IFNa1 er mindre potent til å inducere transkripsjonen av typiske antivirale gener, men desto mer potent til å inducere guanylatbindende protein (GBP) og flere IRF. Det ble også fastslått at de antivirale egenskapene og evne til å inducere ISG delvis avhenger av IFNa1. IFN γ induserer ISG som også induseres av type I IFN, men det kreves imidlertid store doser type II IFN for å oppnå antiviral effekt (135) Ulikhet i antiviral aktivitet hos type I IFN og type II IFN antas å være et resultat av at det benyttes ulike reseptorer og dermed ulike JAK/STAT signalveier.

1.7 Koplingen mellom det medfødte og det adaptive immunsystemet

Omfang og styrke av en adaptiv immunrespons avhenger av signaler fra celler i det medfødte immunforsvaret (59). DC er sentrale immunceller i både det medfødte og adaptive immunforsvaret og spiller en nøkkelrolle i koplingen mellom disse (13). pDC produserer store mengder type I IFN som respons på virusinfeksjoner, men kan også differensiere til DC og dermed fungere som profesjonelle APC (140).

Type I IFN induserer proliferasjon av både B- og T-celler (11). Type I IFN har også blitt vist å promotere differensiering av monocytter i blodet til DC og IFN-behandlede DC har et høyere uttrykk av MHC I og MHC II i tillegg til økt uttrykk av costimulatorer (59). Det er også vist at IFN-modnede DC vil oppregulere kjemokinreseptorer, nødvendig for å entre lymfeknutene, noe som indikerer at IFN er viktig for DC-migrasjon til lymfoide organer hvor T-celleresponser blir initiert (59). Det er vist at IFNAR er viktig for regulering av TLR-medierte B-celleresponser, samt at type I IFN produsert av pDC i mennesker er nødvendig for TLR7-mediert proliferasjon av naive B-celler (90). Type I IFN kan i tillegg promotere isotopbyttning ved å stimulere DC, samt forsterke BCR-avhengige B-celleresponser (11, 58). Forbindelsen mellom det medfødte og adaptive immunforsvaret ser enda ikke ut til å være godt beskrevet hos fisk.

1.8 Kan IFN benyttes til å øke fiskens motstandsdyktighet mot virusinfeksjoner?

IFN har hatt stor innvirkning på klinisk medisin hos mennesker og benyttes til behandling av flere kreftformer, MS og hepatitt (86, 128). IFN kan benyttes til å øke motstandsdyktighet mot virus ved enten å stimulere medfødt immunitet gjennom induksjon av ISG, eller ved å stimulere adaptiv immunitet ved bruk av IFN som vaksineadjuvant.

Det er vist at rekombinant IFN stimulerer det medfødte immunforsvaret gjennom induksjon av ISG både i laksecellelinjer og i atlantisk laks (101). Ooi og medarbeidere (2008) har vist at rekombinant IFN α 2 injisert i regnbueørret ga en økning i antivirale gener samt beskyttelse mot IHNV (84). 1 μ g IFN α 2 per gram kroppsvekt i.p. injisert 7, 3 og 0 dager før smitte ga beskyttelse inntil forsøksslutt (tre uker), i motsetning til IFN α 2 administrert via immersjon eller oral. En lignende effekt har også blitt vist av Li og medarbeidere (2010) som observerte en økning av antivirale gener etter i.p. injeksjon rekombinant IFN1 i zebrafisk (63). Det ble i samme forsøk også observert en uspesifikk beskyttelse mot *infeksiøs spleen og kidney nekrosevirus* (ISKNV) ved 24, 6 og 0 timer før, samt 6 timer etter injeksjon med IFN1. Det finnes imidlertid hittil ingen publiserte artikler som omhandler effekt på medfødt immunitet av ekspresjonsplasmider for IFN hos fisk.

Bruk av type I IFN som vaksineadjuvant er studert hos mennesker, mus og gris og en oversikt er gitt i Toporovski og medarbeidere (2010) (128). Proietti og medarbeidere (2002) viste at i.m. injeksjon av type I IFN i en influensavaksine ga beskyttelse mot virusinfeksjon i mus (91). Adjuvant effekt av rekombinant IFN α i en vaksine mot *Aphthovirus* som forårsaker munn og klovsyke ble studert i svin av Cheng og medarbeidere (2007) som viste at i.m. injeksjon av et plasmid som koder for IFN α sammen med en lav dose antistoff mot viruset, ga god beskyttelse sammenlignet med kontrollgruppen som bare ble injisert med antistoff (17). Det er hittil ingen publiserte artikler som omhandler IFN som vaksineadjuvant i fisk.

1.9 Problemstilling

Til tross for omfattende smitteforebyggende tiltak og vaksinasjon, forårsaker virussykdommer årlig store tap for oppdrettsnæringen. Som beskrevet over har laks har et velutviklet IFN-system. Hos pattedyr har det blitt vist at IFN kan benyttes terapeutisk mot flere lidelser, i tillegg til å fungere som en kraftig adjuvant i flere vaksiner. Dette har åpnet for spørsmål om IFN kan benyttes til å øke det antivirale forsvaret hos laks. Nyere forskning på Børre Robertsens forskningsgruppe har vist at et ekspresjonsplasmid som koder for IFN γ gir beskyttelse mot ILAV, både ved injeksjonssmitte og ved kohabitantsmitte (Chang og Robertsen, upubliserte data). Hensikten med denne oppgaven har vært å undersøke mulige forklaringer på hvorfor i.m. injeksjon av IFN γ -plasmid ga beskyttende effekt mot ILAV. Hypotesen er at IFN γ uttrykkes over lang tid ved injeksjonsstedet og dermed vil indusere en langvarig produksjon av antivirale proteiner i indre organer. Alternativt kan IFN γ skape en økning av reseptorer for viralt RNA som TLR og RLR. I denne oppgaven ble antiviral effekt av IFN γ studert i atlantisk laks *in vitro* og *in vivo*.

Delmål 1

Undersøke om behandling med rekombinant IFN α 1 og IFN γ i leukocytter fra fornyre gir en økning i genuttrykk av antivirale gener og reseptorer for viralt RNA etter henholdsvis 6 og 24 timer.

Delmål 2

Undersøke ekspresjon av IFN γ og utvalgte antivirale gener ved injeksjonsstedet i muskelen i løpet av 1 til 8 uker.

Delmål 3

Undersøke om injeksjon av IFN γ -plasmid induserer systemisk induksjon av antivirale gener og reseptorer for viralt RNA i samme tidsrom.

Delmål 4

Undersøke om injeksjon av IFN γ -plasmid induserer detekterbare mengder av Mx-protein i lever og hjerte i samme tidsrom.

2. Materialer og metoder

I forbindelse med dette mastergradsarbeidet ble det gjennomført tre forsøk, ett *in vitro* og to *in vivo*. Første forsøk utført med presmolt av laks er i stor grad utelatt fra oppgaven og forsøksoppsettet er beskrevet i Appendiks IV. Kvantitativ RT-PCR ble benyttet til å måle relativ økning i genuttrykk av antivirale gener og virusreseptorer i celler og vev, mens Western blotting og immunhistokjemi ble benyttet til å detektere Mx-protein i vev. Løsninger og reagenser er oppført i Appendiks I-III.

2.1 Induksjon av antivirale gener og reseptorer for viralt RNA i leukocytter fra fornyre etter behandling med rekombinant IFN α 1 og IFN γ

2.1.1 Rekombinante IFN

Rekombinant IFN α 1 og IFN γ var produsert i HEK293-celler som beskrevet i Svingerud og medarbeidere (2012) (121).

2.1.2 Isolering av leukocytter fra fornyre

Isolering av leukocytter fra fornyre ble utført i samarbeid med forsker Dr. Baojian Sun. Det ble tatt ut fornyrer fra tre atlantisk laks (gjennomsnittsvekt 1 kg) ved Havbruksstasjonen i Tromsø landanlegg, avdeling A. Laksen ble drept ved et slag mot hodet og det ble tappet blod fra *Vena caudalis*. Fornyrene ble tatt ut med skalpell og overført til 50 ml Falconrør med 10 ml L-15 medium (Life Technologies Gibco®) tilsatt 60 μ g/ml penicillin og 100 μ g/ml streptomycin, samt 40 U/ml heparin (LEO Pharma AS) og 2 % fetal bovine serum (FBS) (Zenbio). Cellesuspensjoner av fornyrene ble laget ved å dele opp vevet i små biter og presse dem gjennom en 100 μ m Falcon cell strainer (BD Biosciences) og deretter tilsatt L-15 medium til et volum på 5 ml. Suspensjonene ble forsiktig tilsatt på en 5 ml 54 % Percollfase i et 11 ml sentrifugerør (Nunc™) før den ble sentrifugert på 400 G i Multifuge 1S-R (Heraeus) i 30 min ved 4 °C. Øverste fase inneholdt leukocytter og denne ble overført til nye rør og suspendert i 10 ml L-15 medium. Suspensjonen ble deretter sentrifugert på nytt i 30 min ved 4 °C og videre resuspendert i 5 ml L-15 medium. Cellene ble talt i Nucleocounter YC-100 (Chemotec) og resuspendert i nytt L-15 medium tilsatt 0,5 % FBS inntil konsentrasjonen var 5×10^6 celler per ml. 1 ml cellesuspensjon ble tilsatt til hver brønn i en 24-brønners Nunclon™ Surface plate (Nunc™) celledyrkningsplate.

2.1.3 Stimulering med rekombinant IFN

Celler fra duplikate brønner fra hver fisk ble overført til eppendorfrør tilsatt 1 ml Trizol (Invitrogen) like etter isolering (0-prøve) eller stimulert med 1000 U rekombinant IFN α 1 eller IFN γ i 1 ml L-15-medium med 5 % FBS eller inkubert i bare 1 ml L-15 medium (kontroll) ved 14 °C. Etter henholdsvis 6 og 24 timer ble cellesuspensjonene overført til eppendorfrør tilsatt Trizol.

2.1.4 Analyser

RNA ble ekstrahert og cDNA syntetisert av forsker Dr. Baojian Sun som beskrevet i Sun og medarbeidere (2011) (120). Kvantitativ RT-PCR, gjennomført som beskrevet i kapittel 2.3.5, ble benyttet til å undersøke økning i genuttrykk av antivirale gener (Mx, viperin, ISG15, IFIT5, IFITM3) og reseptorer for viralt RNA (TLR3, TLR7, TLR8, TLR22 og RIG-I). Primerne som ble brukt er beskrevet i tabell 4.

2.2 Effekt av ekspresjonsplasmid for IFN α på genekspressjon hos laks

2.2.1 Forsøksdyr

Forsøket ble utført i henhold til bestemmelser i Dyrevelferdsloven og Forskrift om forsøk med dyr ved Havbruksstasjonen i Tromsøs landanlegg, avdeling C i perioden 08.01.13-26.02.13 (32-33). Det ble benyttet presmolt av atlantisk laks av stammen ”standard Atlantic QTL-innOva™ IPN” fra Aquagen og gjennomsnittsvekt ved forsøksstart var 35 gram. Fire uker før forsøksstart ble fisk sortert og holdt i 10 °C ferskvann ved kontinuerlig lys. Fisken ble føret med Skretting Nutra Parr 2,0 og førfaktor ble beregnet til 0,75 av personell ved Havbruksstasjonen.

2.2.2 Ekspresjonsplasmid for IFN α , rekombinant IFN α og poly I:C

Ekspresjonsplasmidet for IFN α er beskrevet av Svingerud og medarbeidere (121) og består av åpen leseramme for IFN α innsatt bak CMV promoteren i plasmidet pcDNA3.3 (Invitrogen). pcDNA3.3 uten innsatt IFN α -gen ble benyttet som kontrollplasmid. Oppformering av plasmidene ble foretatt av stipendiat Chia Jung Chang. Rekombinant IFN α ble produsert i HEK293-celler som beskrevet i Svingerud og medarbeidere (2012) mens poly I:C ble kjøpt fra Sigma-Aldrich (121).

2.2.3 Forsøksoppsett og prøveuttak

Tabell 2 gir en oversikt over antall og behandlinger av fisk, hvilke analyser som ble gjort, samt tidspunkter for uttak av prøver. Grupper av fisk ble ved forsøksstart (dag 0) bedøvd i 2 ml Benzoak (ACD Pharmaceuticals) i 10 liter vann og injisert i.m. med 50 μ l PBS, 15 μ g IFN α -plasmid i 50 μ l PBS eller 15 μ g kontrollplasmid i 50 μ l PBS. Som positive kontroller til Western blotting ble i tillegg en gruppe fisk injisert i.p. med 200 μ g poly I:C i 200 μ l PBS og en gruppe fisk injisert i.p. med 200 μ l celledsupernatant fra HEK293 celler som inneholdt $1,2 \times 10^6$ U rekombinant IFN α . Gruppene ble fordelt i fire 500 L kar ved forsøksstart, men flyttet etter 14 dager til 150 L kar. Registrert vannforbruk var 3 L/min per kar. I kar nr. 1 ble det plassert tre fisk i.p. injisert med poly I:C, samt tre fisk i.p. injisert med rekombinant IFN α . Da to ulike grupper ble plassert i samme kar, ble gruppen som ble behandlet med rekombinant IFN α gruppemerket ved klipping av fettfinnen. Det ble plassert 46 fisk i hvert av karene for IFN α -plasmid og kontrollplasmid. I karet med PBS-injisert fisk ble det imidlertid bare plassert 41 individer, grunnet begrenset mengde fisk.

Materialer og metoder

Tabell 2. Forsøksoppsett.

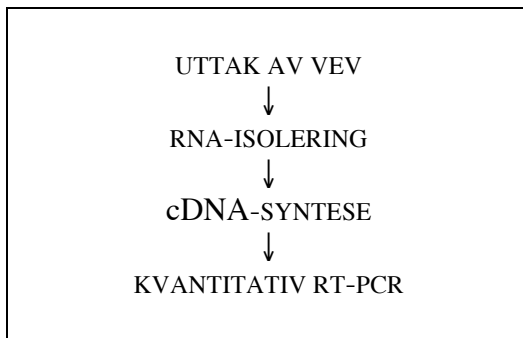
BEHANDLINGSGRUPPE	DOSE	KVANTITATIV RT-PCR <i>n</i> = 5	WESTERN BLOTTING <i>n</i> = 4	IMMUNHISTOKJEMI <i>n</i> = 4
PBS (i.m.)	50 µl	Dag 5, uke 1, 2, 3 og 8	Uke 1, 3 og 8	Uke 8
IFNC PLASMID (i.m.)	15 µg/50µl PBS	Dag 5, uke 1, 2, 3, 5 og 8	Uke 1, 3 og 8	Uke 8
KONTROLLPLASMID (i.m.)	15 µg/50µl PBS	Dag 5, uke 1, 2, 3, 5 og 8	Uke 1, 3 og 8	Uke 8
POLY I:C (i.p.)	200 µg/200µl PBS	Dag 3		
REKOMBINANT IFNC (i.p.)	1,2x10 ⁶ U/200µl HEK293 supernatant	Dag 3		

Fisk ble sultet i ett døgn før prøveuttak. All fisk ble avlivet med en overdose Benzoak, samt et slag mot hodet før blod ble tappet fra *Vena caudalis*. Det ble tatt ut vevsprøver fra fem fisk til kvantitativ RT-PCR ved dag 5, uke 1, 2, 3, 5 og 8. Det ble tatt ut prøver av injeksjonssted i muskel og fornyre ved samtlige uttak. Ved uke 1 ble det i tillegg tatt ut vevsprøver fra lever, hjerte, milt, gjeller og tarm. Alle vevsprøver ble oppbevart på RNA-later (Ambion) ved 4 °C over natt og videre ved -20 °C inntil RNA-isolering. Det ble ved dag 3 tatt ut leverprøver fra samtlige fisk injisert med poly I:C og rekombinant IFNc, mens det ved uke 1, 3 og 8 tatt ut leverprøver fra fire fisk fra hver behandlingsgruppe til Western blotting, som straks ble innfrysning i flytende nitrogen og senere oppbevart ved -80 °C. Ved uke 8 ble det tatt ut vevsprøver fra hjerte til immunhistokjemi som ble fiksert på 4 % para-formaldehyd i PBS (Sigma-Aldrich) i ett døgn før de ble overført til 70 % etanol (Sigma-Aldrich).

2.2.4 Analyser

RNA ble ekstrahert og cDNA syntetisert som beskrevet i henholdsvis kapitlene 2.3.2 og 2.3.4. Kvantitativ RT-PCR, gjennomført som beskrevet i kapittel 2.3.5, ble benyttet til å bestemme relativ økning i genuttrykk av IFNc, antivirale gener (Mx, viperin, ISG15, IFIT5), reseptorer for viralt RNA (TLR3, TLR7, TLR8, RIG-I), samt gener knyttet til adaptiv immunitet (IgM og IFN γ). Primerne som ble benyttet er beskrevet i tabell 4. Mx ble detektert i lever- og hjertevev ved bruk av henholdsvis Western blotting og immunhistokjemi, utført som beskrevet i kapitlene 2.4 og 2.5.

2.3 Kvantitativ RT-PCR



Figur 4. Flytskjema over hovedstegene i kvantitativ RT-PCR.

Kvantitativ revers transkriptase polymerase chain reaction (RT-PCR), også kjent som real-time PCR, er en teknikk som benyttes til å kvantitere spesifikke DNA-sekvenser fra celler, blod eller vev. Et fluorescerende fargestoff blir benyttet til å detektere mengde gentranskripter under en syklisk amplifisering av en bestemt gensekvens. Fluorescensen blir målt etter hver amplifiseringssyklus og vil følgelig øke når genuttrykket øker. Dette gjør at man kan observere det amplifiserte genuttrykket i "real time" (64). Hver amplifiseringssyklus består av tre hovedsteg; denaturering, amplifisering og ekstensjon. Under denatureringen blir høy temperatur benyttet til å splitte dsDNA til ssDNA. I amplifiseringsfasen senkes temperaturen og spesifikke primere, samt komplementære baser fester seg til DNA-tråden. I ekstensjonsfasen vil en DNA-polymerase syntetisere en ny DNA-tråd. Denatureringen skjer vanligvis ved 95°C, mens amplifisering og ekstensjon skjer ved en lavere temperatur, her ved 60°C. En oversikt over antall sykluser, temperatur og varighet av ulike steg benyttet til kvantitering av genuttrykk er gitt i tabell 3.

SYBR®Green (Applied Biosystems) er et fargestoff som fluorescerer når det er bundet til dsDNA, men ikke i fri form og ble benyttet for å detektere økning i genuttrykk. Dette er et anvendelig fargestoff som kan benyttes med alle primerpar og binde alt dsDNA, noe som imidlertid kan føre til at det oppstår uspesifikk binding (64). For å undersøke at dette ikke har oppstått under reaksjonen kan man benytte et smeltekurveprogram hvor PCR-reaksjonen blir presentert i en smeltekurve/dissosiasjonskurve etter at reaksjonen er ferdig. Denne gir en grafisk fremstilling av endring i fluorescens når dsDNA med bundet SYBR®Green smelter til et ssDNA under denatureringen. Uspesifikk binding vil observeres med ulik kurve sammenlignet med de andre prøvene.

Materialer og metoder

Tabell 3. RT-PCR program uten smeltekurve (A) og med smeltekurve (B).

	STEG	TEMPERATUR (°C)	VARIGHET	ANTALL SYKLUSER
A	Denaturering	95	20 sekunder	Hold
	Denaturering	95	3 sekunder	40
	Amplifisering og ekstensjon	60	30 sekunder	40
B	Denaturering	95	20 sekunder	Hold
	Denaturering	95	3 sekunder	40
	Amplifisering og ekstensjon	60	30 sekunder	40
	Smeltekurve	95	15 sekunder	kontinuerlig
		60	60 sekunder	
		95	15 sekunder	
		60	15 sekunder	

Relativ kvantitering ble benyttet til å bestemme relativ økning av antivirale gener og virusreseptorer av samtlige antivirale gener, en metode ansett som adekvat for å studere fysiologiske endringer i genuttrykk (88). Grunnet positive erfaringer fra forskningsgruppen ble elongeringsfaktor α/B , ($EF\alpha/B$) benyttet som referansegen for å normalisere eksperimentell variasjon.

Materialer og metoder

2.3.1 Primere

Tabell 4. Primersekvens, genbanknummer og primereffektivitet. Tabellen viser primersekvenser, genbanknummer og effektivitet til samtlige primerpar benyttet under forsøket. Alle primere er fra Sigma-Aldrich og er vist i 5' til 3' retning. Bruksløsning av primere, fortynnet med TE-buffer (Sigma-Aldrich), hadde en konsentrasjon på 5 µM. Det ble benyttet 250 nM av hver primer til hver reaksjon.

GEN	SEKVEN (5 - 3')	GENBANK NR.	EFFEKTIVITET
EFαB FW	TGCCCTCCAGGATGTCTAC	BG933897	99,99 %
EFαB RW	CACGGCCACAGGTACTG		
Mx FW	TGCAACCACAGAGGCTTTGAA	U66475.1	98,84 %
Mx RW	GGCTTGGTCAGGATGCCTAAT		
ISG15 FW	CTGAAAAACGAAAAGGGCCA	AY926456.1	97,79 %
ISG15 RW	GCAGGGACTCCCTCCTTGTT		
IFIT5 FW	AGAGAGGTGCCAGGCTAACA	BT046021	105,73 %
IFIT5 RW	GGGCATCTGTGAGGTCATCT		
Viperin FW	TCCTTGATGTTGGCGTGGAA	BT047610	95,07 %
Viperin RW	GCATGTCAGCTTTGCTCCACA		
TLR 3 FW	TTTGATGAGTCTCCGCCAACTCCA	BK008646	102,82 %
TLR 3 RW	AATCTGCGAGGGACACAAAGGTCT		
TLR 7 FW	TACAGCTTGGAACATGACTCTCC	AGKD01152847	93,76 %
TLR 7 RW	CAACTCTCTGAGACTTGTCGGTAA		
TLR 8 FW	ACCAAACCACTAATGACATCATCTTCA	NM_001161693	95,91 %
TLR 8 RW	TGGTGATGCCATCAGGTATGTTT		
TLR 22 FW	GAGGGTCAAGGCTCTCACTGA	AM233509	100,66 %
TLR 22 RW	GCAGTCGGAGCAAGCTAAGTGT		
RIG-I FW	ACGCCTTGAAGAGCTGGATA	FN178459	104,6 %
RIG-I RW	CTGGCTGGACTTGTGTCCTC		
IFNc FW	ATGTATGATGGCAGTGTGG	EU768890	94 %
IFNc RW	CCAGGCGCAGTAACTGAAAT		
IFNγ FW	AAGGACCAGCTGTTCAACGG	AY795563.1	66,22 %
IFNγ RW	CACACCCTCCGCTCACTGT		
IgM FW	TGAGGAGAACTGTGGGCTACACT	BT058539.1	98,43 %
IgM RW	TGTTAATGACCACTGAATGTGCAT		
IFITM3 FW	GGCCAAGTGGTACAACATC	EU621898.1	93 %
IFITM3 RW	TCCTCTCCGAAGAAGTCGA		

2.3.2 Isolering av RNA

RNA ble isolert fra vevsprøver ved bruk av RNeasy Fibrous Mini Kit (Qiagen) beregnet til fibrøst vev. Grunnet positive erfaringer med renhet og totalt utbytte RNA fra forskningsgruppen ble dette kittet benyttet til samtlige RNA-isoleringer. RNA-isoleringene ble gjennomført i avtrekkskap og alle sentrifugeringer ble gjort i Eppendorf Centrifuge 5417R (USA Scientific) ved romtemperatur. Det ble benyttet RNasefritt utstyr under hele prosessen. ≤ 30 mg vev ble veid ut og homogenisert i 600 µl RLT lysisbuffer (Qiagen) tilsatt 1 % 2-mercaptoetanol (Sigma-Aldrich). Vev ble homogenisert i 2 x 15 sek på 5900 rpm i Precellys 24 lysis & homogenizer (Bertin Technologies). Det ble benyttet mikrotuberør med keramiske kuler som ble RNasebehandlet med RNaseZAP™

Materialer og metoder

(Sigma-Aldrich) før bruk. Lysat ble kort sentrifugert i en bordsentrifuge for å skille skum fra lysat og deretter overført til eppendorfrør tilsatt 590 μ l ultrapure H₂O (Biochrom AG) og 10 μ l proteinase K (New England Biolabs). Prøvene ble inkubert på 55 °C i 10 min og sentrifugert på 13 000 rpm i 3 min. Supernatanten ble overført til 2 ml eppendorfrør tilsatt 450 μ l 99,98 % etanol (Sigma-Aldrich) og videre overført til en spinnkolonne (Qiagen), 700 μ l om gangen. Kolonnen ble suksessivt vasket med 1 x 700 μ l RW1 buffer (Qiagen), samt 2 x 700 μ l RPE buffer (Qiagen) og videre tørrsentrifugert for å fjerne all buffer. RNA fra muskel og hjerte ble eluert ut i 40 μ l ultrapure H₂O, mens RNA fra resterende vev ble eluert i 50 μ l ultrapure H₂O. Etter isolering ble RNA holdt på is. Dersom det ikke ble syntetisert cDNA like etter RNA-isolering ble prøvene aliquotert og oppbevart på -80 °C. Kvantitet og kvalitet av RNA ble målt med NanoDrop® ND-1000 Spektrofotometer (Thermo Scientific). A_{260}/A_{280} ratio er forholdet mellom RNA og proteinkontaminasjon. Verdier over 1,8 ble ansett som rene.

2.3.3 Gelelektroforese av RNA

For å kontrollere at RNA ikke hadde degradert eller var kontaminert med DNA, ble et vilkårlig utvalg RNA-prøver analysert ved gelelektroforese. 5 μ l RNA-templat ble tilsatt 2 μ l loading dye (Invitrogen) og kjørt på 1 % agarosegel tilsatt 2 μ l Ethidium Bromid (Sigma-Aldrich). Elektroforesen ble kjørt i XcellSureLock™ (Invitrogen) ved 130 V i 25 min. Etter endt kjøring ble gelen avlest ved GeneGenious Bio Imaging System. Intakt RNA vises som to klare bånd hvor det smaleste er 18S rRNA og det bredeste er 28S rRNA.

2.3.4 cDNA-syntese

QuantiTect® reverse transcription kit (Qiagen) ble benyttet til syntetisering av komplementært DNA (cDNA) og metoden ble utført i henhold til produsent. Dersom RNA ble fryst før cDNA-syntese, ble prøvene tint på is og konsentrasjonen avlest på nytt. Prøvene ble DNasebehandlet på 42 °C i 2 min for å eliminere genomisk DNA før de ble revers transkribert på 42 °C i 15 min og 95 °C i 3 min. Alle inkubasjoner ble utført i GeneAmp® PCRsystem 2700 (Applied Biosystems). Det ble syntetisert cDNA med endelig konsentrasjon på 1 µg. Deretter ble cDNA fortynnet 1:20, alikvotert og oppbevart på -80 °C inntil videre bruk.

2.3.5 Kvantitativ RT-PCR

Kvantitativ RT-PCR ble gjennomført i henhold til protokoll fra produsent (QuantiTect® SYBR Green RT-PCR). Alle prøvene ble analysert i ABI 7000 Real-Time PCR. 6 µl (15 ng) cDNA ble tilsatt 9 µl standard mastermix til hver brønn i MicroAmp® Optical 96-brønners brett (Applied Biosystems). Brettene ble forseglet med MicroAmp® Optical Adhesive Film (Applied Biosystems) og sentrifugert i MPS mini plate spinner 1000 (Labnet). Det ble benyttet tre ulike kontroller i dette oppsettet. For å avdekke uspesifikk binding som følge av kontaminering av cDNA, SYBR®Green, primere eller vann, ble 6 µl ultrapure H₂O tilsatt til standard mastermix som negativ kontroll for hvert primerpar til samtlige plater. I tillegg ble de fleste plater kjørt med standard, laget av en pool cDNA. Dette ble gjort for å kunne sammenligne Ct-verdier dersom noen av platene måtte kjøres på nytt, som en kontroll på at behandlingen var lik for begge kjøringene. Det ble i tillegg valgt ut tilfeldig DNasebehandlet RNA som ble tilsatt standard mastermix for å undersøke at prøvene ikke inneholdt genomisk DNA. Primereffektivitet ble kalkulert for hvert primerpar ved hjelp av en standardkurve. En mengde cDNA med kjent konsentrasjon ble benyttet. Det ble laget en tofolds fortynning av cDNA i en fortynningsrekke på seks fortynninger med utgangskonsentrasjonen 0,2. 6 µl av hver fortynning ble tilsatt i tripletter til standard mastermix. Resultatene ble presentert i en standardkurve hvor stigningstallet for kurven ble brukt for å kalkulere effektiviteten (E).

$$E = 10^{(-1/\text{slope})} \quad (88)$$

2.3.6 Databehandling

Alle data fra kvantitativ RT-PCR ble behandlet i Microsoft Excel. Phaffl-metoden ble benyttet til å kalkulere relativ økning i genuttrykk av de studerte genene. Denne metoden kalkulerer forholdet mellom målgenet mot kontrollgruppen relativt til referansegenet mot kontrollgruppen og tar høyde for ulik effektivitet for de ulike primerparene, i motsetning til $\Delta\Delta Ct$ -metoden som tar utgangspunkt i primere med 100 % effektivitet (88).

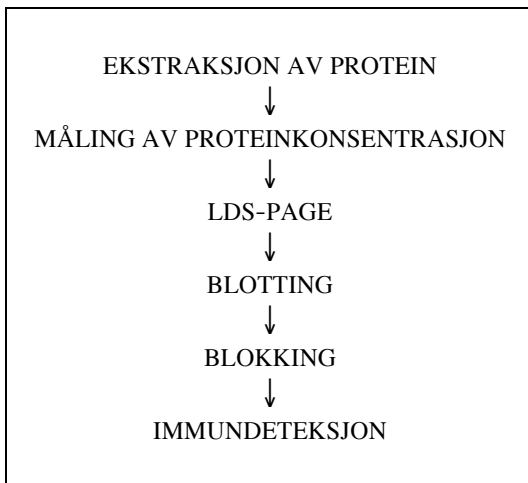
Likning 1.

$$ratio = \frac{\left(E_{mål}\right)^{\Delta Ct_{mål(kontroll-prøve)}}}{\left(E_{ref}\right)^{\Delta Ct_{ref(kontroll-prøve)}}$$

I likning 1 er $E_{mål}$ primereffektiviteten til genet man ønsker å studere (målgenet), mens E_{ref} er primereffektiviteten til referansegenet. $\Delta Ct_{mål}$ er differansen av gjennomsnittet til Ct-verdiene i kontrollgruppen og Ct-verdiene til målgenet. ΔCt_{ref} er differansen av gjennomsnittlige Ct-verdiene av kontrollgruppen og Ct-verdiene til referansegenet (88). Ct-verdier for PBS-gruppen i forsøk "Effekt av IFNc-plasmid på genekspressjon hos laks" består av gjennomsnittlige Ct-verdier fra dag 5 t.o.m. uke 3, da det ikke ble tatt ut vevsprøver ved uke 5.

Det ble benyttet en parret t-test for å beregne om økning i transkripter i behandlede celler eller fisk var signifikant. P-verdier under 0,05 ble ansett signifikante, mens p-verdier under 0,001 ble ansett meget signifikante.

2.4 Western blotting



Figur 5. Flytskjema over hovedstegene i Western blotting.

Western Blotting er en laboratorieteknikk som benyttes til å detektere bestemte proteiner fra vev eller celler ved hjelp av spesifikt antistoff. Protein blir ekstrahert fra vev og separert etter molekylvekt i en polyakrylamid gelelektroforese (PAGE) og deretter overført til en membran (blotting). Membranen har høy affinitet for å binde protein og blir derfor blokket med tørrmelk for å forhindre uspesifikk binding av antistoff. Deretter blir primært og sekundært antistoff tilført før membranen kan eksponeres for film. I denne oppgaven ble membranen tilsatt antistoff mot Mx i tillegg til aktin som positiv kontroll. Alle sentrifugeringer ble gjort i Eppendorf Centrifuge 5417R.

2.4.1 Ekstraksjon av proteiner

Frosne leverprøver fra atlantisk laks ble tint på is og overført til homogeniseringsrør tilsatt keramiske kuler og veid. Det ble tilsatt 500 µl "Tissue extraction reagent" (Invitrogen) til 50 mg vev. Deretter ble vevet homogenisert i Precellys 24 lysis & homogenizer (Bertin Technologies) i 10 sek på 5900 rpm. Lysat ble kort sentrifugert på en bordsentrifuge for å skille skum fra lysat og deretter overført til nye rør. Prøvene ble sentrifugert ved 10 000 G i 5 min ved 4 °C. Supernatanten ble overført til nye rør, aliquotert og oppbevart på -80 °C.

2.4.2 Måling av proteinkonsentrasjon

Pierce BCA protein assay kit (Thermo Scientific) ble benyttet til å bestemme proteinkonsentrasjonen i prøvene. En fortynningsrekke med kjent utgangskonsentrasjon ble benyttet for å lage en standardkurve. 25 µl av denne fortynningsrekken, samt 25 µl av 1:10 fortykning av protein-supernatanten, ble tilsatt i duplikater til et 96 brønners NunClon™ Surface brett (Nunck™) i tillegg til 200 µl BCA protein assay kit-reagens og forseglet med SealMate™ (Excel Scientific_{INC}). Absorbansen ble avlest ved 562 nm i SpectraMAX 190 spektrofotometer og denne ble brukt til å bestemme proteinkonsentrasjonen i dataprogrammet SoftMax Pro 4.3.

2.4.3 LDS-PAGE

En 15-brønners NuPAGE™ Novex 10 % Bis-Tris Mini gel (Invitrogen) ble benyttet til å separere protein etter molekylvekt. For å bryte disulfidbindinger i proteinprøvene ble 20 µg protein (variabelt volum) inkubert med 5 µl NuPAGE™ litium dodecyl sulfat (LDS) Sample Buffer (Invitrogen), 2 µl NuPAGE™ Reducing Agent (Invitrogen) og dH₂O (variabelt volum) i et totalt volum på 20 µl ved 70 °C i 10 min. Videre ble 19 µl mastermix tilsatt til hver brønn i Bis-Tris Mini gel og 2,5 µl Magic Mark™ XP (Invitrogen) ble benyttet som molekylær vektstandard til å bestemme proteinenes molekylvekt. Både ytre og indre kar ble fylt med NuPAGE® MOPS SDS Running Buffer (Invitrogen) tilsatt NuPAGE® Antioxidant (Invitrogen) og gelen ble kjørt på 200 V i 50 min i XCell SureLock™ Mini-Cell (Invitrogen).

2.4.4 Blotting

Etter at proteinprøvene var separert etter størrelse, ble de overført til en polyvinyl difluoride membran (PVDF) (Life Sciences) med 0,45 μm porestørrelse. PVDF-membranen ble aktivert i metanol (Sigma-Aldrich) i ett min før den ble vasket i destillert vann i ett min og videre lagt i blottebuffer inntil bruk. Blottemodulen ble sammensatt av svamper, filterpapir, proteingelen, samt PDVF-membranen og mett med blottebuffer. Indre kar ble fylt med blottebuffer, mens ytre kar ble fylt med dH_2O . Overføring av protein fra gel til membran ble utført ved 30 V i 60 min i XCell II™ Blot Module (Invitrogen).

2.4.5 Blokking

PVDF-membranen ble blokket i 50 ml Tris Buffered Saline Tween (TBST) tilsatt 5 % fettfri tørrmelk (Normilk) under svak risting i 60 min ved romtemperatur for å forhindre uspesifikk bakgrunnsbinding av antistoff. Etter blokking ble membranen vasket i TBST i 3 x 5 min.

2.4.6 Immundeteksjon

Primærantistoff mot Mx1 fra laks (Professor Børre Robertsén) og aktin (Invitrogen) ble fortynnet henholdsvis 1:3000 og 1:2000 i TBST med 1 % tørrmelk i et Falconrør. Membranen ble deretter inkubert over natt ved 4 °C og vasket 6 x 10 min i TBST. Det ble benyttet et horseraddish peroxidase (HRP) konjugert geit anti-kanin sekundærantistoff (St. Cruz Biotechnology) fortynnet 1:10 000 i 1 % tørrmelk. Membranen ble inkubert i 60 min ved romtemperatur under svak risting.

Etter endt inkubering ble membranen vasket 6 x 5 min i TBST før den ble overført til en fremkallingsfolder (Tropix) og tilsatt 1000 μl Super Signal West Pico Chemiluminescent Substrat og 1000 μl Super Signal West Pico Luminol/Enhancer Solution (Thermo Scientific). Deretter ble membranen inkubert i 5 min i mørke før den ble eksponert for film (Lumi-Film Chemiluminescent Detection Film) og fremkalt.

2.5 Immunhistokjemi



Figur 6. Flytskjema over hovedstegene i immunhistokjemi

Immunhistokjemi (IHC) er en metode som benyttes til å detektere lokalisasjonen til gitte proteiner i vevssnitt ved bruk av spesifikt antistoff. Deteksjon av antigen kan skje enten direkte eller indirekte. Direkte deteksjon baserer seg på å benytte et antistoff som spesifikt binder et gitt antigen. For en mer sensitiv deteksjon av antistoff bruker man en indirekte metode, basert på sekundært eller tertiært antistoff (94). Det er flere metoder for å visualisere antistoff i vev. En metode går ut på å benytte antistoff konjugert til et enzym som katalyserer en fargeproduserende reaksjon som kan detekteres ved lysmikroskopi, mens en annen metode går ut på å benytte antistoff konjugert til et fluorescerende protein som dermed vil fluorescere ved ultrafiolett mikroskopering.

I dette forsøket har vi benyttet HRP-konjugert antistoff som gir en rødbrun farge ved mikroskopering etter inkubering med substrat. Protokollen for IHC er basert på Das og medarbeidere (2007) (21). Formalinfiksert vev ble oppbevart ved 4 °C over natt og videre dehydrert under tre steg: 2 x 10 min i 70 % etanol og 1 x 30 min i 70 % etanol.

2.5.1 Dehydrering

Vevet ble fullstendig dehydrert gjennom en alkoholgradient og videre innstøpt i parafin (Sigma-Aldrich) i Citadel 1000 (Shandon), program A. Protokollen består av 10 steg (Tabell 5) og er innarbeidet av ansatte ved Norges fiskerihøgskole.

Tabell 5. Framføringsmaskin, program A. Tabellen viser de ulike stegene i dehydreringsprosessen av vevsbiter i Citadel 1000.

KAR NR.	INNHold
1	2 timer 96 % etanol
2	2 timer 96 % etanol
3	2 timer 100 % etanol
4	2 timer 100 % etanol
5	1 time 100 % etanol + xylen (1:1)
6	1 time xylen
7	1 time xylen
8	1 time xylen
9	1 time xylen + parafinvoks (1:1)
10	Minimum 3 timer parafinvoks

2.5.2 Innstøping i parafinblokker

Dehydrert vev ble innstøpt i parafinblokker i støpeformer i Leica EG1150H (Leica biosystems) og videre nedkjølt på kjøleplate (Axil Johnson Lab System). Parafinblokkene ble deretter oppbevart ved 4 °C inntil bruk.

2.5.3 Kutting av vev

Kaldt vev ble kuttet i 3-5 mikrometer tykke skiver i Leica RM2235 Microtome (Leica Biosystems) og plassert i et 40 °C vannbad før de ble overført til dekkglass toppet med poly-L-lysine (Sigma-Aldrich) og lagt til tørking over natt ved 38 °C.

2.5.4 Rehydrering

Vevssnittene ble behandlet med HistoClear (National Diagnostics) i 2 x 10 min for å fjerne parafinvoks og rehydrert gjennom en alkoholgradient som vist i tabell 6. Alle inkubasjoner ble gjennomført i avtrekksskap.

Tabell 6. Dehydrering av vev gjennom en alkoholgradient.

KAR NR.	INNHold	LENGDE
1	100 % etanol	5 min
2	100 % etanol	5 min
3	90 % etanol	2 min
4	70 % etanol	2 min
5	50 % etanol	2 min

2.5.5 Antigengjenvinning og blokkering

For å forsikre en effektiv binding av antistoff til antigen ble vevssnittene inkubert i sitratbuffer med pH 6 (Dako) ved 90 °C i 60 min for å bryte eventuelle kryssbindinger av protein dannet under formalinfikseringen. Videre ble vevssnittene behandlet med 3 % hydrogenperoxid (H₂O₂) (Sigma-Aldrich) i en mørk beholder for å forhindre at substrat (H₂O₂) senere ville binde til endogen hydrogenperoxidase. Vevssnittene ble deretter vasket i 3 min i TBS, 3 min i TBST og videre blokket i én time med 100 µl TBS tilsatt 5 % albumin fra kalveserum (Sigma-Aldrich) i en fuktig boks.

2.5.6 Immundeteksjon

Overflødig albumin ble fjernet før vevssnittene ble tilsatt 100 µl primærantistoff mot Mx fortynnet 1:500 og inkubert på 4 °C over natt. Neste dag ble snittene vasket 2 x 5 min i TBST og behandlet med HRP konjugert geit anti-kanin sekundærantistoff i 30 min i en fuktig boks. Etter inkubering ble snittene vasket 5 min i TBST og 5 min i TBS. Snittene ble inkubert i 10 min med 100 µl substrat aminoetylcabazol (Dako) før de ble vasket 5 min i dH₂O. Deretter ble snittene farget med haematoxylin (Sigma-Aldrich) i 2 min og vasket 10 min i rennende vann. Snittene ble toppet med en dråpe eukitt (Fluka analytical) og dekkglass (Fisherbrand) før de ble mikroskopert i LeicaDM6000B (Leica Biosystems).

3. Resultater

3.1 Effekt av ekspresjonsplasmid for IFN, alene eller i kombinasjon med HE, på genekspresjonen hos laks

Et smitteforsøk med presmolt av atlantisk laks ble tidligere utført på Børre Robertsens forskningsgruppe der fisk ble i.m. injisert med ekspresjonsplasmider for IFNa1, IFNb eller IFNc, alene eller i kombinasjon med hemagglutinin-esterase (HE). Her ble det vist at ekspresjonsplasmid for IFNc alene ga beskyttende effekt mot ILAV, mens verken IFNa1 eller IFNb ga beskyttelse (Chang og Robertsen, upubliserte data). På bakgrunn av dette ble effekten av i.m. injeksjon av plasmidene på genekspresjon av antivirale gener i fornyre hos laks studert i en periode på 1 til 9 uker. Resultatene viste imidlertid så store variasjoner at det var vanskelig å analysere dem. Det ble observert at IFNa1-plasmid ikke ga økning i genuttrykk av Mx i fornyre sammenlignet med fisk som ble injisert med kontrollplasmider, mens IFNb-plasmid ga noe økning ved uke 9 og IFNc-plasmid ga noe økning ved uke 2 og uke 9. Dette samsvarer med tidligere observasjoner på forskningsgruppen (Børre Robertsen, Pers. Med.) Store variasjoner i ekspresjon av Mx i fornyre kan skyldes at det i dette forsøket ble benyttet to plasmider (pEGFP og pcDNA3.3), noe som kan ha ført til ujevnt opptak av plasmid i cellene ved injeksjonsstedet. På bakgrunn av dette var det ønskelig å studere effekt av ekspresjonsplasmid for IFNc alene i videre forsøk.

3.2 Induksjon av antivirale gener og reseptorer for viralt RNA i leukocytter fra fornyre etter stimulering med rekombinant IFNa1 og IFNc

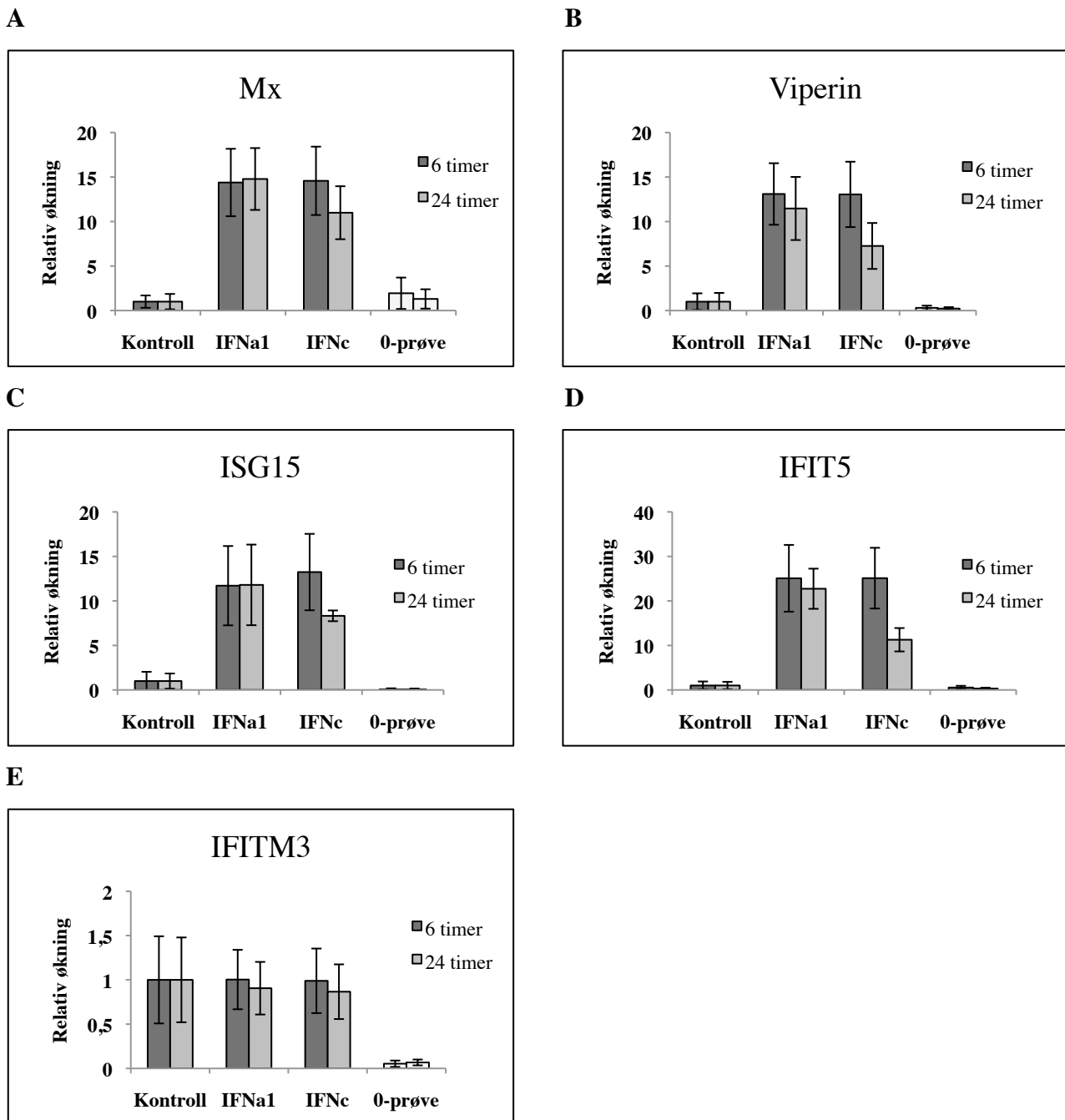
I dette forsøket ønsket vi å undersøke om forskjellen i beskyttende effekt av IFNa1 og IFNc kunne skyldes ulik evne til å indusere antivirale gener eller reseptorer for viralt arvestoff *in vitro*. Leukocytter fra fornyre ble isolert fra tre laks og overført til RNA-later umiddelbart (0-prøve) eller etter dyrkning i L-15 medium (kontroll), L-15 medium tilsatt 1000 U/ml rekombinant IFNa1 eller 1000 U/ml rekombinant IFNc i henholdsvis 6 og 24 timer. Forandring i genuttrykk av antivirale gener (Mx, viperin, ISG15, IFIT5 og IFITM3) og reseptorer for viralt RNA (TLR3, TLR7, TLR8, TLR22 og RIG-I) ble deretter målt i forhold til kontrollcellene med kvantitativ RT-PCR.

Resultater

Som vist i Figur 7, ga både rekombinant IFN α 1 og IFN γ klare og relativt like økninger i genuttrykk av Mx, viperin, ISG15 og IFIT5, 6 timer etter stimulering. Økning i uttrykk av Mx, viperin og ISG15 i IFN-stimulerte celler var mellom 10-15x høyere enn kontrollcellene, mens uttrykket av IFIT5 var ca. 25x høyere enn kontrollcellene. IFN α 1 ga tilsvarende økning i genuttrykk 24 timer etter stimulering, mens IFN γ -behandlede leukocytter viste en liten nedgang i uttrykk fra 6 til 24 timer. Genuttrykk av Mx, viperin, ISG15 og IFIT5 var da økt mellom 5-10x fra kontrollcellene. Stimulering med IFN ga ingen økning i uttrykk av IFITM3. Det ble gjennomført en parett-test for å undersøke om økning i genuttrykk av antivirale gener i leukocytter stimulert med IFN α 1 og IFN γ var signifikant sammenlignet med kontrollceller. Det ble også undersøkt om forskjell i genuttrykk mellom celler stimulert med ulikt IFN var signifikant. T-testen viste at økningen i uttrykk av samtlige antivirale gener var signifikant etter stimulering med både IFN α 1 og IFN γ ved begge tidspunkt ($p < 0,001$). Det ble også vist at det ikke var signifikant forskjell i uttrykk av Mx, viperin og ISG15 mellom celler stimulert med IFN α 1 og IFN γ . Genuttrykk av IFIT5 var imidlertid lavere i celler stimulert med IFN γ etter 24 timer, sammenlignet med celler stimulert med IFN α 1 ($p < 0,001$).

Det ble også observert økning i genuttrykk av TLR3, TLR7 og TLR8 i celler stimulert med både IFN α 1 og IFN γ (Fig. 8). Det ble observert en nedgang i uttrykk fra 6 til 24 timer i celler stimulert med begge IFN. Etter seks timer var uttrykk av TLR3, TLR7 og TLR8 økt henholdsvis 10x, 8x og 6x sammenlignet med kontrollcellene, mens økningen var redusert til ca. 3x-6x etter 24 timer. IFN α 1 og IFN γ ga også klare og relativt like økninger i uttrykk av RIG-I, men i motsetning til TLRene, ble det observert en liten økning (6-8x) i uttrykk fra 6 til 24 timer. Det ble imidlertid ikke observert en signifikant økning i uttrykk av TLR22 ved noen av tidspunktene. T-testen viste at økning i genuttrykk av samtlige virusreseptorer, unntatt TLR22, var signifikant etter stimulering med begge IFN etter både 6 og 24 timer ($p < 0,001$). Det ble også vist at det ikke var signifikant forskjell i uttrykk av RIG-I og TLR3 mellom celler stimulert med IFN α 1 og IFN γ . Genuttrykk av TLR7 og TLR8 var imidlertid signifikant lavere i celler stimulert med IFN γ etter 24 timer sammenlignet med celler stimulert med IFN α 1 ($p < 0,05$).

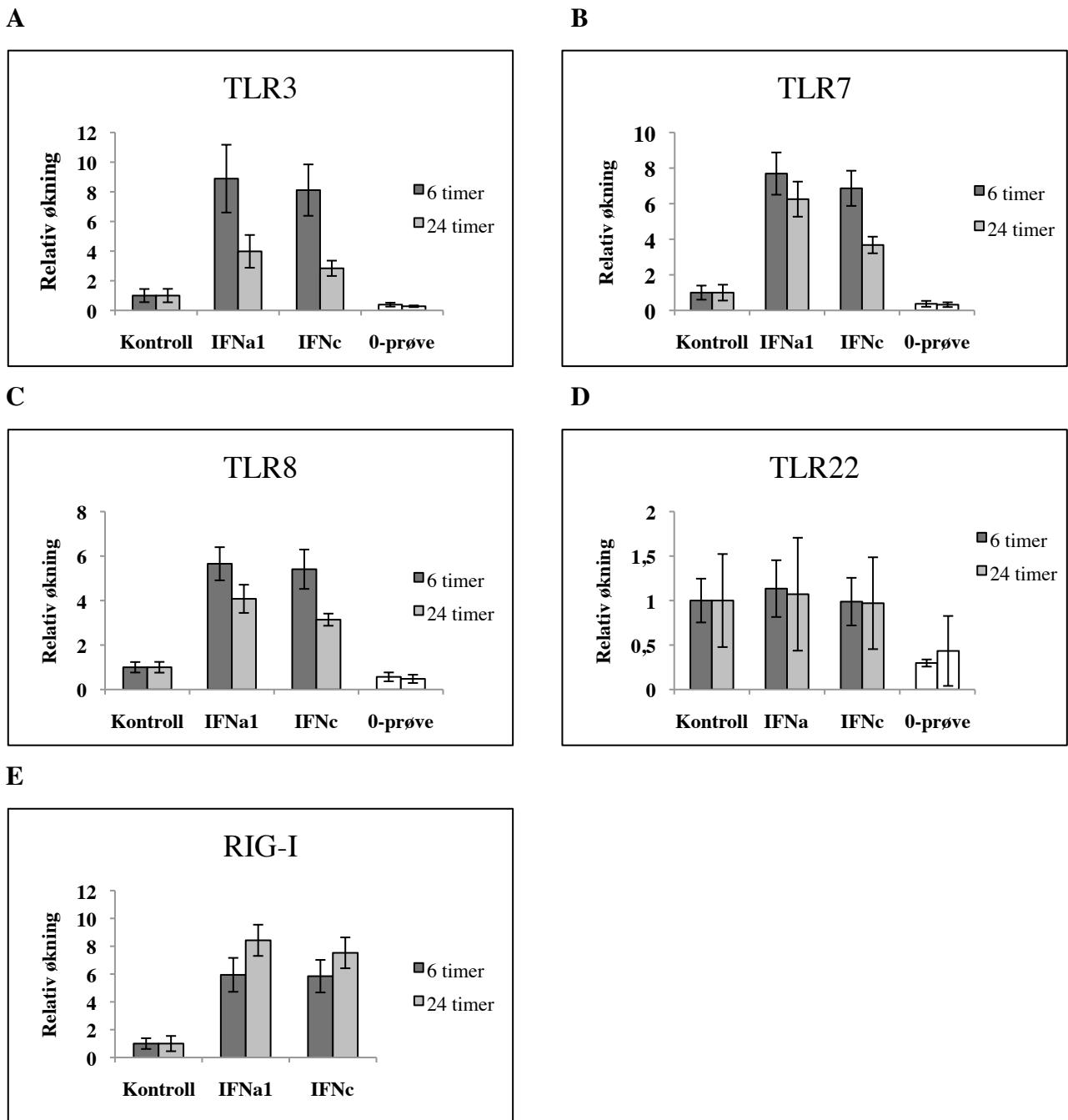
3.2.1 Effekt av rekombinant IFNa1 og IFNc på antivirale gener i leukocytter fra fornyre



44

Figur 7. Relativ økning i genuttrykk av antivirale gener i leukocytter fra fornyre etter behandling med rekombinant IFNa1 og IFNc. Søylen viser relativ økning i genuttrykk av Mx (A), viperin (B), ISG15 (C) IFIT5 (D) og IFITM3 (E) i leukocytter fra fornyre fra laks. Cellene ble behandlet med 1000 U/ml rekombinant IFNa1 eller IFNc i henholdsvis 6 og 24 timer. Forandringer i genuttrykk ble målt med kvantitativ RT-PCR i forhold til ubehandlede celler (kontroll) som ble satt til verdien 1. Genuttrykket ble også målt i leukocytter før utsåing (0-prøve) for å undersøke om dyrkingen hadde effekt på gentranskripsjonen. Hver søyle viser gjennomsnittlige verdier med standardavvik av celler fra tre fisk, hvor duplikater av celler (5×10^6) fra hvert individ ble dyrket i 24 brønners Brett med 1 ml L-15 medium. Gjennomsnittlige Ct-verdier for kontrollcellene var 22,6 for Mx; 22,9 for viperin; 22,1 for ISG15; 22,4 for IFIT5 og 28,3 for IFITM3.

3.2.2 Effekt av rekombinant IFNa1 og IFNc på reseptorer for viralt RNA i leukocytter fra fornyre



Figur 8. Relativ økning i genuttrykk av reseptorer for viralt RNA i leukocytter fra fornyre etter behandling med rekombinant IFNa1 og IFNc. Søylene viser relativ økning i genuttrykk av TLR3 (A), TLR7 (B), TLR8 (C), TLR22 (D) og RIG-I (E) i leukocytter fra fornyre fra laks. Cellene ble behandlet med 1000 U/ml rekombinant IFNa1 eller IFNc i henholdsvis 6 og 24 timer. Forandringer i genuttrykk ble målt med kvantitativ RT-PCR i forhold til ubehandlede celler (kontroll) som ble satt til verdien 1. Genuttrykket ble også målt i leukocytter før utsåing (0-prøve) for å undersøke om dyrkingen hadde effekt på gentranskripsjonen. Hver søyle viser gjennomsnittlige verdier med standardavvik av celler fra tre fisk, hvor duplikater av celler (5×10^6) fra hvert individ ble dyrket i 24 brønners brett med 1 ml L-15 medium. Gjennomsnittlige Ct-verdier for kontrollcellene var 25,8 for TLR3; 27,6 for TLR7; 24,1 for TLR8; 25,4 for TLR22 og 22,9 for RIG-I.

3.3 Effekt av ekspresjonsplasmid for IFNc på genekspressjonen hos laks

I dette forsøket ønsket vi å studere mekanismen bak hvordan IFNc gir langvarig, økt antiviral beskyttelse mot ILAV ved å analysere et større antall immungener over en periode på åtte uker. Hypotesen var at IFNc-plasmid uttrykkes i muskel over lang tid og dermed vil inducere en langvarig, systemisk produksjon av antivirale gener i indre organer. Alternativt kunne beskyttelsen skyldes økning av reseptorer for viralt RNA. PBS (50 µl), IFNc-plasmid (15µg/50µl PBS) eller kontrollplasmid (15µg/50µl PBS) ble i.m. injisert i 35 grams presmolt av atlantisk laks. Forandring i genuttrykk for IFNc, antivirale gener (Mx, viperin, ISG15) og IFN γ ved injeksjonsstedet i muskelen ble deretter målt i forhold til kontrollfisk (PBS og kontrollplasmid) med kvantitativ RT-PCR. Forandring i genuttrykket for antivirale gener (Mx, viperin, ISG15, IFIT5, IFITM3), reseptorer for viralt RNA (TLR3, TLR7, TLR8, RIG-I), samt gener knyttet til adaptiv immunitet (IgM og IFN γ) ble målt i fornyre med samme metode. I tillegg ble forandringer i genuttrykk for Mx målt i flere andre indre organer (lever, hjerte, milt, tarm og gjelle) én uke etter injeksjon av IFNc-plasmid.

Muskel

Som forventet ga injeksjon av IFNc-plasmid en sterk økning i genuttrykk for IFNc i muskel ved injeksjonsstedet sammenlignet med fisk som ble injisert med kontrollplasmid og PBS (Fig. 9A). Økningen var størst to uker etter injisering og viste deretter en gradvis nedgang. Økningen i genuttrykk var signifikant gjennom hele perioden ($p < 0,05$) unntatt mot kontrollplasmid ved uke 3. Det ble følgelig også observert økt uttrykk av de antivirale genene Mx, viperin og ISG15 i hele perioden (Fig. 9B, C og D). Det ble observert størst uttrykk av Mx ved dag 5 (ca. 40x) og uke 1 (ca. 60x), deretter sank Mx-uttrykket og var ved uke 8, ca. 7x høyere enn i PBS-injisert fisk. Uttrykket av viperin og ISG15 var relativt stabilt i hele perioden med økninger på henholdsvis 25-30x og 30-40x, men uttrykket av ISG15 sank noe ved uke 8. Det ble utført en paret t-test mot kontrollfisk injisert med kontrollplasmid og PBS som viste at genuttrykket av samtlige antivirale gener var signifikant oppregulert gjennom hele perioden ($p < 0,05$).

Indre organer

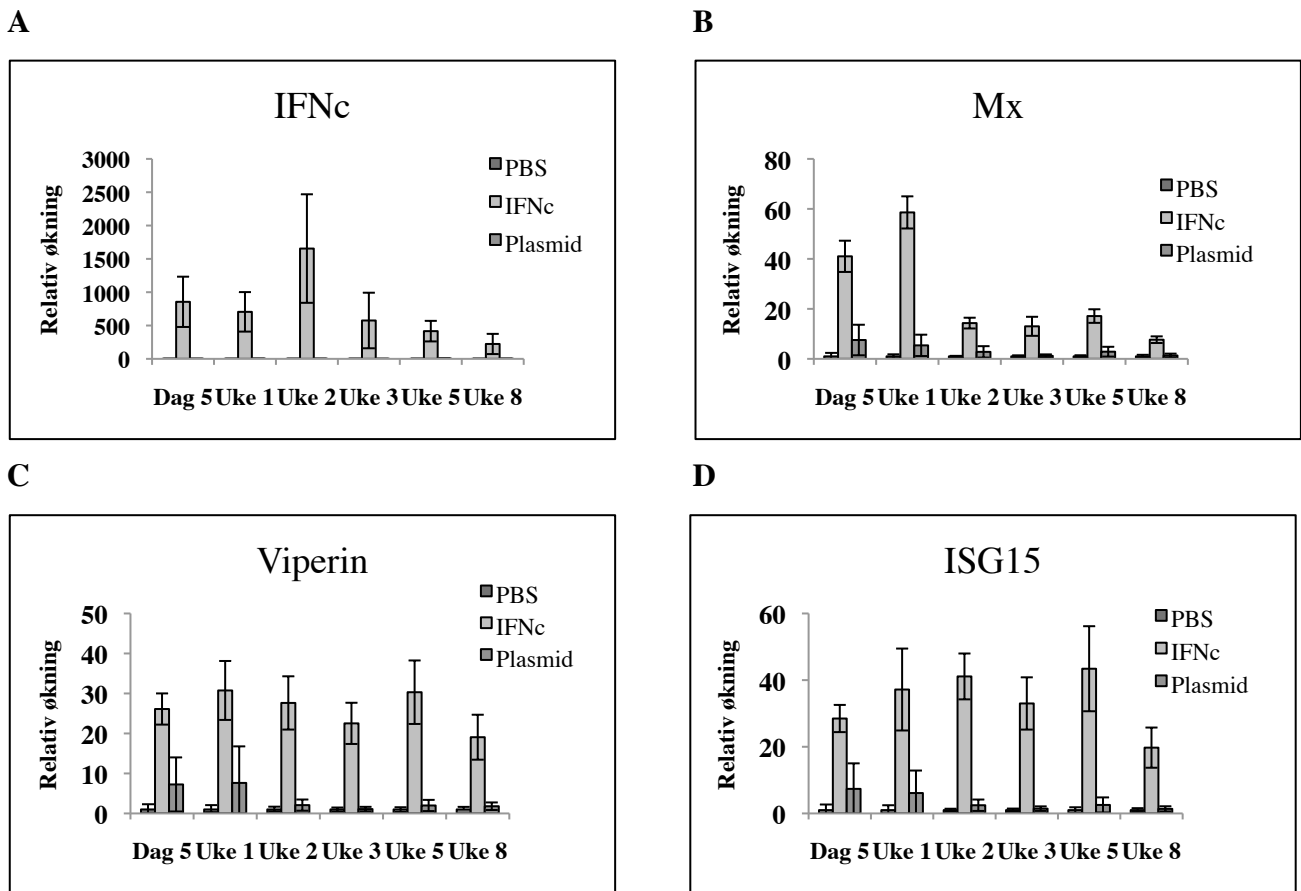
Som vist i Figur 10 ga IFNc-plasmid en klar økning i genuttrykk for antivirale gener i fornyre ved dag 5 og uke 1, før det ble observert en nedgang i uttrykk for samtlige gener. Økning i genuttrykk for Mx og ISG15 var størst én uke etter injeksjon (22x og 30x), mens økning for viperin og IFIT5 var størst fem dager etter injeksjon (24x og 17x). Etter åtte uker var uttrykket av Mx, viperin og IFIT5, ca 10x høyere i fisk injisert med IFNc-plasmid sammenlignet med fisk injisert med kontrollplasmid eller PBS. Genuttrykket av ISG15 i IFNc-injisert fisk var ca. 20x høyere enn kontrollgruppene ved uke 8. En paret t-test ble utført for å undersøke om økning i genuttrykk hos fisk injisert med IFNc-plasmid var signifikant. Samtlige økninger i uttrykk for antivirale gener var signifikant i hele perioden ($p < 0,05$). Økning i genuttrykk for Mx, viperin og ISG15 var meget signifikant ($p < 0,001$), unntatt for ISG15 ved uke 3 ($p < 0,05$).

IFNc-plasmid ga en økning i genuttrykk av samtlige reseptorer for viralt RNA i fornyre (Fig. 11). Størst økning i uttrykk ble observert én uke etter injeksjon, før denne sank til et lavere, relativt stabilt nivå. Ved uke 1 var uttrykket av TLR3 ca. 5x høyere enn PBS-injisert fisk, men bare 1,5x høyere ved uke 8. Genuttrykket for RIG-I og TLR7 var henholdsvis 11x og 9x høyere enn PBS-injisert fisk ved én uke etter injeksjon, men etter åtte uker var uttrykket redusert til 5,5x. TLR8 hadde imidlertid en mer stabil økning i genuttrykk med mellom 2-4x ganger høyere genuttrykk enn PBS-injisert fisk i hele forsøksperioden. T-testen viste at økning i uttrykk av TLR3 mot PBS-injisert fisk var signifikant unntatt ved uke 8 ($p < 0,05$), mens det ikke ble observert signifikant økning mot fisk injisert med kontrollplasmid. Det ble observert en signifikant økning i genuttrykk av TLR7 ($p < 0,001$), TLR8 ($p < 0,05$) og RIG-I ($p < 0,001$) mot begge kontrollgrupper gjennom hele perioden.

Det ble også observert økning i genuttrykk av Mx i flere indre organer én uke etter i.m. injeksjon av IFNc-plasmid. Denne økningen var signifikant i lever, milt, hjerte, tarm og fornyre ($p < 0,001$), samt i gjelle ($p < 0,05$). Størst økning i genuttrykk ble observert i lever (35x), hjerte (25x) og fornyre (25x).

Ekspresjon av to gener knyttet til adaptiv immunitet, IgM og IFN γ ble også studert i fornyre. Det var ingen signifikant økning i genuttrykk av IFN γ , men det ble observert en liten økning i uttrykk av IgM fra uke 3 til 8. I dette tidsrommet var IgM signifikant oppregulert fra begge kontrollgrupper ($p < 0,05$).

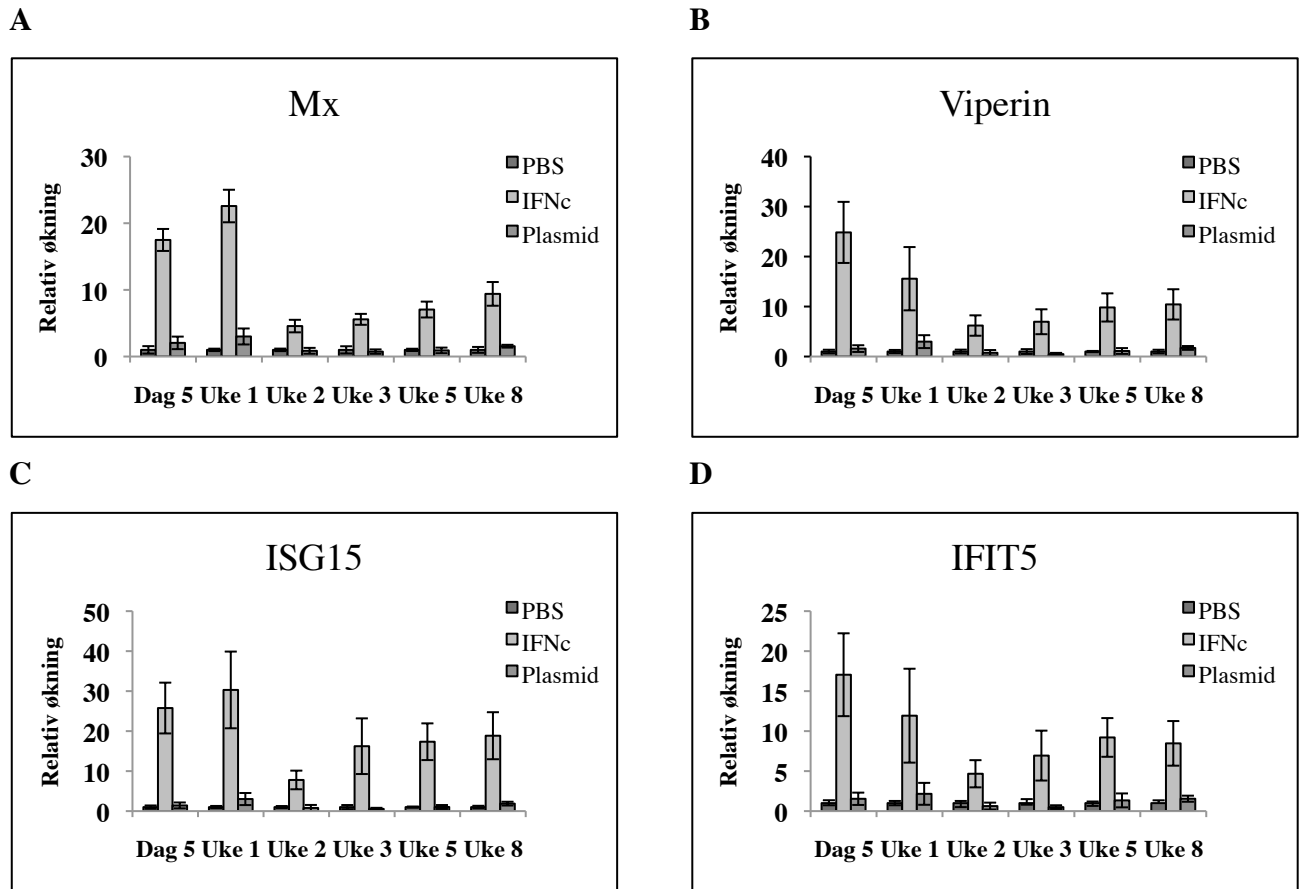
3.3.1 Uttrykk av IFN α , samt effekt av IFN α -plasmid på antivirale gener ved injeksjonssted i muskel



Figur 9. Relativ økning i genuttrykk av IFN α og antivirale gener ved injeksjonssted i muskel etter i.m. injeksjon med IFN α -plasmid, kontrollplasmid eller PBS. Presmolt ble injisert i.m. med 15 μ g kontrollplasmid (pcDNA3.3) eller IFN α -plasmid i 50 μ l PBS eller i.p. injisert med 50 μ l PBS. Det ble tatt prøver av muskel ved injeksjonsstedet fra fem fisk ved dag 5, uke 1, 2, 3, 5 og 8. Søylene viser relativ økning i genuttrykk av IFN α (A), Mx (B), viperin (C) og ISG15 (D). Forandringer i genuttrykk ble målt med kvantitativ RT-PCR i forhold til fisk injisert med PBS (kontroll) som ble satt til verdien 1. Ved uke 5 ble det ikke tatt prøver av PBS-injisert fisk. Her er Ct-verdier for PBS-gruppen gjennomsnittlige Ct-verdier fra dag 5 t.o.m. uke 3. Ved uke 3 bestod kontrollplasmid-gruppen av tre fisk, mens samme gruppe bestod av fire fisk ved uke 8. Gjennomsnittlige Ct-verdier for PBS-injisert fisk for hele perioden var 34,0 for IFN α ; 27,7 for Mx; 29,3 for viperin og 27,8 for ISG15.

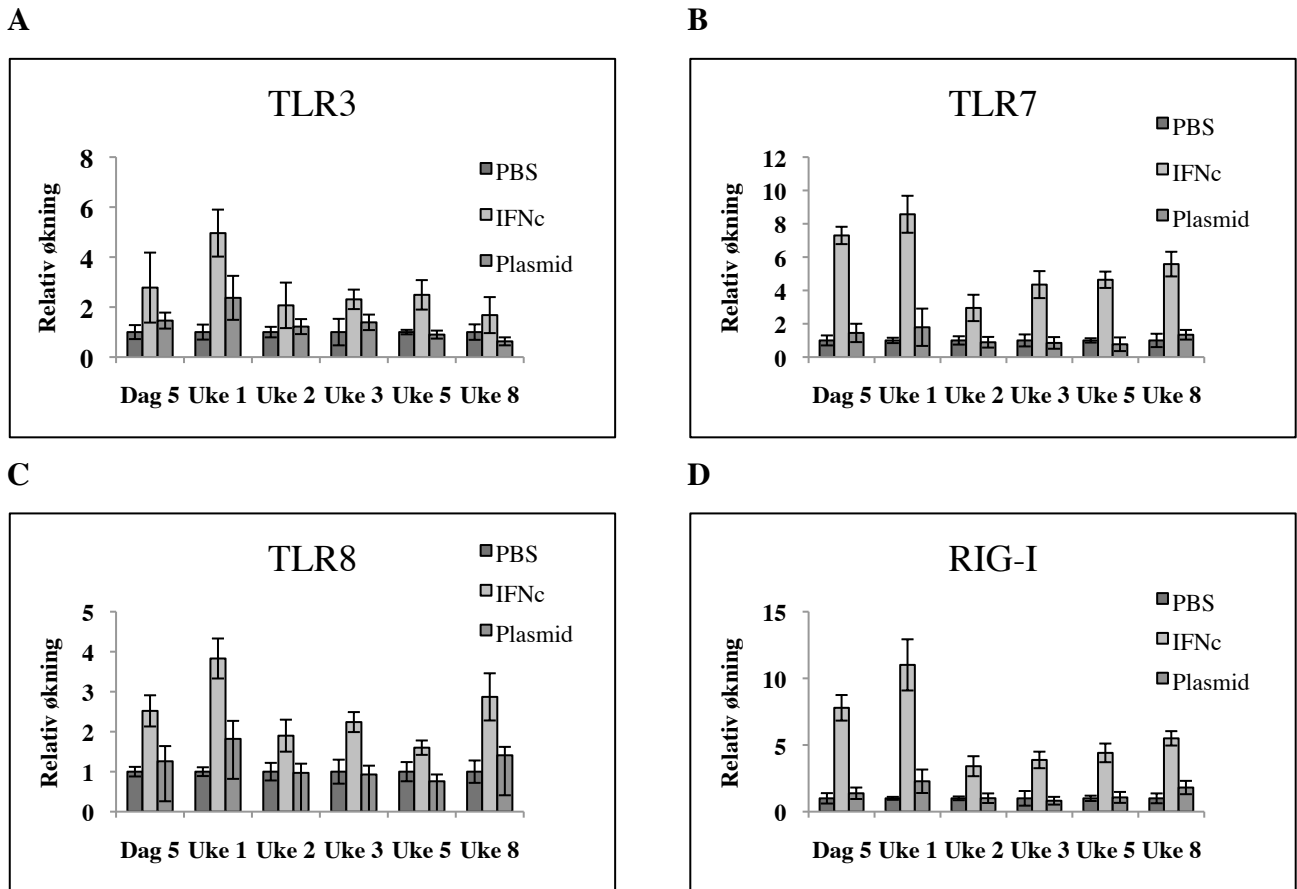
Resultater

3.3.2 Effekt av IFNc-plasmid på antivirale gener i fornyre



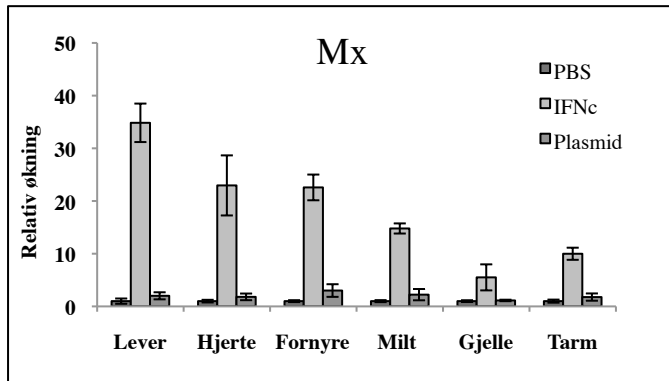
Figur 10: Relativ økning i genuttrykk av antivirale gener i fornyre etter i.m. injeksjon av IFNc-plasmid, kontrollplasmid eller PBS. Presmolt ble injisert i.m. med 15 µg kontrollplasmid (pcDNA3.3) eller IFNc-plasmid i 50 µl PBS eller i.p. injisert med 50 µl PBS. Det ble tatt prøver av fornyre fra fem fisk ved dag 5, uke 1, 2, 3, 5 og 8. Søylene viser relativ økning i genuttrykk av Mx (A), viperin (B), ISG15 (C) og IFIT5 (D). Forandringer i genuttrykk ble målt med kvantitativ RT-PCR i forhold til fisk injisert med PBS (kontroll) som ble satt til verdien 1. Ved uke 5 ble det ikke tatt prøver av PBS-injisert fisk. Her er Ct-verdier for PBS-gruppen gjennomsnittlige Ct-verdier fra dag 5 t.o.m. uke 3. Gjennomsnittlige Ct-verdier for PBS-injisert fisk for hele perioden var 24,2 for Mx; 25,4 for viperin; 23,9 for ISG15 og 22,8 for IFIT5.

3.3.3 Effekt av IFNc-plasmid på reseptorer for viralt RNA i fornyre



Figur 11: Relativ økning i genuttrykk av reseptorer for viralt RNA i fornyre etter i.m. injeksjon av IFNc-plasmid, kontrollplasmid eller PBS. Presmolt ble injisert i.m. med 15 µg kontrollplasmid (pcDNA3.3) eller IFNc-plasmid i 50 µl PBS eller i.p. injisert med 50 µl PBS. Det ble tatt prøver av fornyre fra fem fisk ved dag 5, uke 1, 2, 3, 5 og 8. Søylen viser relativ økning av genuttrykk av TLR3 (A), TLR7 (B), TLR8 (C) og RIG-I (D). Forandringer i genuttrykk ble målt med kvantitativ RT-PCR i forhold til fisk injisert med PBS (kontroll) som ble satt til verdien 1. Ved uke 5 ble det ikke tatt prøver av PBS-injisert fisk. Her er Ct-verdier for PBS-gruppen gjennomsnittlige Ct-verdier fra dag 5 t.o.m. uke 3. Gjennomsnittlige Ct-verdier for PBS-injisert fisk var 28,8 for TLR3; 28,5 for TLR7; 26,1 for TLR8 og 24, 8 for RIG-I.

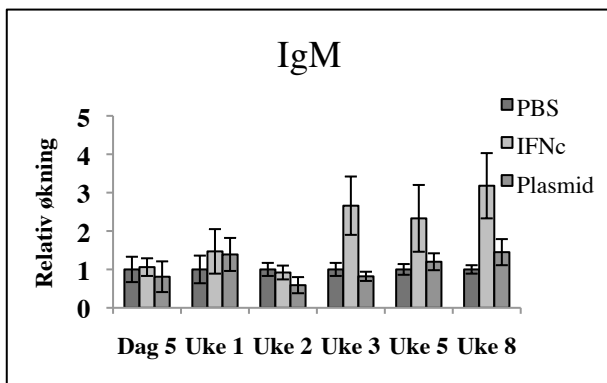
3.3.4 Effekt av IFNc-plasmid på ekspresjon av Mx i indre organer



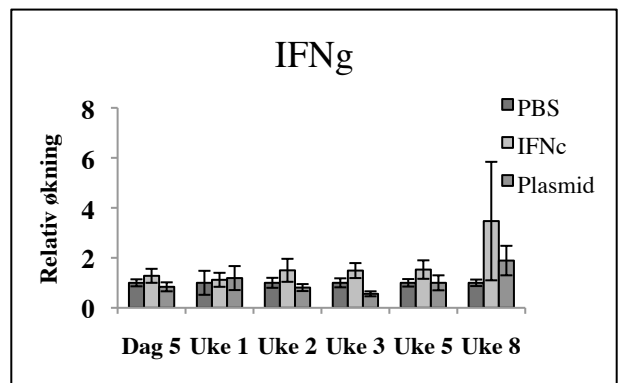
Figur 12. Relativ økning i genuttrykk av Mx i indre organer etter i.m. injeksjon av IFNc-plasmid, kontrollplasmid eller PBS. Presmolt ble injisert i.m. med 15 µg kontrollplasmid (pcDNA3.3) eller IFNc-plasmid i 50 µl PBS eller i.p. injisert med 50 µl PBS. Det ble tatt prøver av lever, milt, hjerte, fornyre, tarm og gjelle en uke etter injeksjon. Søylene viser relativ økning i genuttrykk av Mx i ulike organer, målt med kvantitativ RT-PCR i forhold til fisk injisert med PBS (kontroll) som ble satt til verdien 1. Ved uke 5 ble det ikke tatt ut vevsprøver fra PBS-injisert fisk. Her er Ct-verdier for PBS-gruppen gjennomsnittlige Ct-verdier fra dag 5 t.o.m. uke 3. Gjennomsnittlige Ct-verdier av Mx i PBS-injisert fisk var 30,0 i lever; 27,3 i hjerte; 25,6 i fornyre; 25,1 i milt; 24,4 i gjelle og 26,5 i tarm.

3.3.5 Effekt av IFNc-plasmid på gener knyttet til adaptiv immunitet

A



B

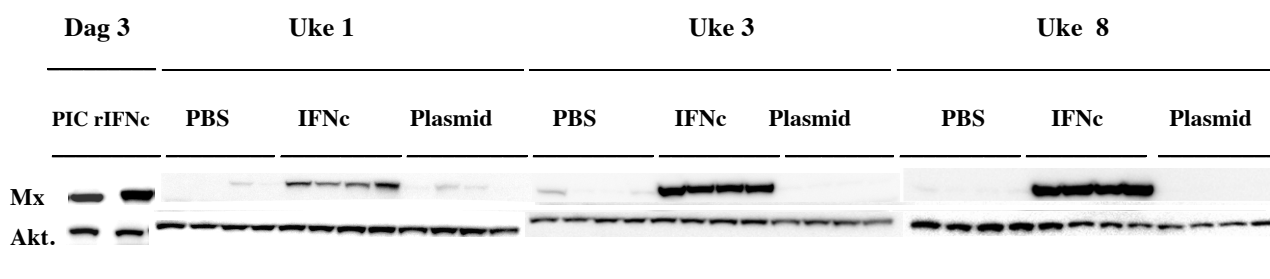


Figur 13. Relativ økning i genuttrykk av IgM og IFNγ etter i.m. injeksjon av IFNc-plasmid, kontrollplasmid eller PBS. Presmolt ble injisert i.m. med 15 µg kontrollplasmid (pcDNA3.3) eller IFNc-plasmid i 50 µl PBS eller i.p. injisert med 50 µl PBS. Det ble tatt vevsprøver av fornyre fra fem fisk ved dag 5, uke 1, 2, 3, 5 og 8. Søylene viser relativ økning i genuttrykk av IgM (A) og IFNγ (B). Forandringer i genuttrykk ble målt med kvantitativ RT-PCR i forhold til fisk injisert med PBS (kontroll) som ble satt til verdien 1. Ved uke 5 ble det ikke tatt prøver av PBS-injisert fisk. Her er Ct-verdier for PBS-gruppen gjennomsnittlige Ct-verdier fra dag 5 t.o.m. uke 3. Gjennomsnittlige Ct-verdier for PBS-injisert fisk var 20,1 for IgM og 29,9 for IFNγ.

3.3.6 Effekt av IFNc-plasmid på uttrykk av Mx-protein i lever

Det var ønskelig å undersøke hvordan i.m. injeksjon av ekspresjonsplasmidet for IFNc ville påvirke uttrykk av Mx-protein i lever fra uke 1 til uke 8. PBS (50 µl), IFNc-plasmid (15µg/50µl PBS) eller kontrollplasmid (15µg/50µl PBS) ble i.m. injisert i 35 grams presmolt av atlantisk laks. Som positiv kontroll ble presmolt injisert med 200 µg poly I:C i 200 µl PBS og med $1,2 \times 10^6$ U rekombinant IFNc i 200µl HEK293 celsesupernatant. Protein ble isolert fra leverprøver fra totalt seks fisk til positiv kontroll ved dag 3, i tillegg til prøver fra fire fisk ved uke 1, 3 og 8. Uttrykk av Mx-protein ble målt med Western blotting hvor aktin ble benyttet som kontroll på proteinmengdene som ble påsatt hver brønn i elektroforesegelen.

Det ble detektert Mx-protein i leverprøver fra positiv kontroll, samt i prøver tatt ut 1, 3 og 8 uker etter injeksjon med ekspresjonsplasmid for IFNc. I leverprøver fra de negative kontrollgruppene ble det enten observert manglende eller svakt uttrykk av Mx-protein. Dette bekrefter resultatene fra kvantitativ RT-PCR. Til forskjell fra PCR-resultatene synes imidlertid mengde Mx-protein å øke utover i forløpet, spesielt fra uke 1 til uke 3. Det kunne imidlertid ikke avgjøres om det var forskjeller i mengde Mx-protein fra uke 3 til uke 8 fordi båndene her er veldig intense. Dette kan delvis skyldes overeksponering av membranen og/eller for høy proteinkonsentrasjon i prøvene.

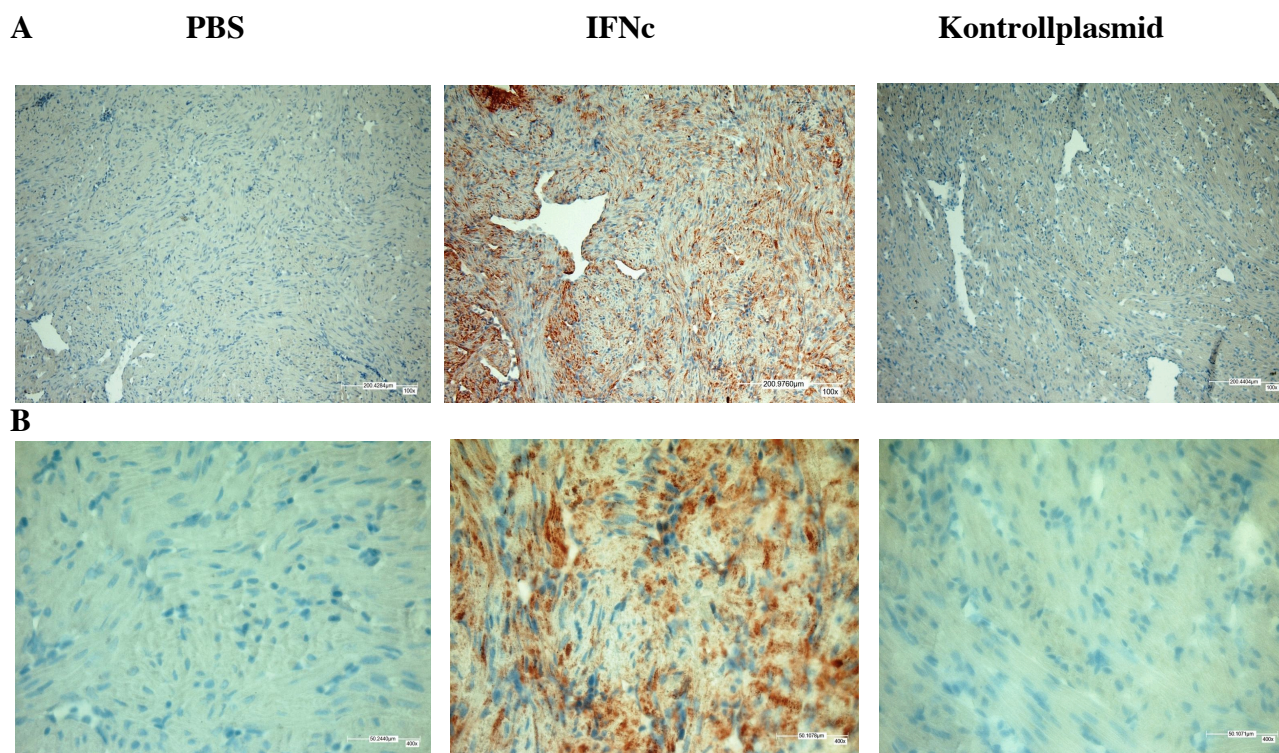


Figur 14. Uttrykk av Mx-protein i lever fra atlantisk laks etter i.m. injeksjon av IFNc-plasmid, kontrollplasmid eller PBS. Presmolt ble injisert i.p. med 200 µg poly I:C (PIC) i 200 µl PBS eller med $1,2 \times 10^6$ U rekombinant IFNc (rIFNc) i 200µl HEK293 celsesupernatant, samt i.m. med 15 µg kontrollplasmid (pcDNA3.3) eller IFNc-plasmid i 50 µl PBS eller i.p. injisert med 50 µl PBS. Det ble tatt vevsprøver av lever til positiv kontroll tre dager etter injeksjon og videre ble det tatt vevsprøver fra fire fisk 1, 3 og 8 uker etter injeksjon. Proteinuttrykk i lever ble målt ved Western blotting i forhold til fisk injisert med PBS og kontrollplasmid og membranen ble eksponert for film i 10 minutter. Øvre bånd er Mx, mens nedre bånd er aktin.

3.3.7 Effekt av IFNc-plasmid på uttrykk av Mx-protein i hjertemuskel

Her ønsket vi å undersøke om i.m. injeksjon av ekspresjonsplasmid for IFNc ville føre til økt uttrykk av Mx-protein i hjertemuskel åtte uker etter injeksjon. PBS (50 µl), IFNc-plasmid (15µg/50µl PBS) eller kontrollplasmid (15µg/50µl PBS) ble i.m. injisert i 35 grams presmolt av atlantisk laks. Det ble laget vevssnitt av hjertemuskel fra fisk fra hver behandlingsgruppe, åtte uker etter injeksjon og immunhistokjemi ble benyttet for å detektere Mx-protein i hjertevev.

Som vist i Figur 15, ga ekspresjonsplasmid for IFNc en klar induksjon av Mx-protein i hjertemuskel, åtte uker etter injeksjon. Mx-protein ble detektert som røde, kornete aggregater i hjerteceller hos fisk injisert med IFNc-plasmid, men det ble ikke observert Mx-uttrykk i kontrollgruppene, noe som bekrefter resultatene fra kvantitativ RT-PCR og Western blotting.



Figur 15. Uttrykk av Mx-protein i hjerte fra atlantisk laks etter i.m. injeksjon av IFNc-plasmid, kontrollplasmid eller PBS. Presmolt ble injisert i.m. med 15 µg kontrollplasmid (pcDNA3.3) eller IFNc-plasmid i 50 µl PBS eller i.p. injisert med 50 µl PBS. Hjerte fra hver behandlingsgruppe ble tatt ut åtte uker etter injeksjon og immunhistokjemi ble benyttet til å detektere Mx-protein i hjertemuskel. Vevssnittene er vist ved 100x (A) og 400x (B) forstørrelse, hvor målestokken i høyre hjørne viser henholdsvis 50 og 200 µm.

4. Diskusjon

Virussykdommer utgjør en vesentlig trussel for norsk oppdrettsnæring og forårsaker store tap på landsbasis (83). Da dagens virusvaksiner ikke er optimale, blir infeksjoner hovedsakelig kontrollert med omfattende smitteforebyggende tiltak, samt utslakt og sanering av anlegg med utbrudd av ILA eller PD utenfor tiltakssonene. Det er derfor et klart behov for mer effektive virusvaksiner og andre forebyggende metoder. I Børre Robertsens forskningsgruppe undersøkes det om IFN kan brukes til å styrke laksens immunitet mot virus. IFN spiller en nøkkelrolle i førstelinjeforsvaret mot virus hos vertebrater og ansees også som viktig i det medfødte immunforsvaret hos laks (100, 107). Medfødt immunitet anses for å være spesielt viktig hos fisk fordi de er vekselvarme og adaptive immunresponser utvikles senere ved lave temperaturer (59). En studie av Ooi og medarbeidere (2008) viste at i.p. injeksjon av rekombinant IFNa2 fra laks ga en kortvarig beskyttelse (tre uker) mot IHNV hos regnbueørret (84). Tidligere studier i Robertsens forskningsgruppe har vist at i.m. injeksjon av ekspresjonsplasmid for IFNc medfører at presmolt av laks får økt beskyttelse mot ILAV-infeksjon 7-9 uker senere. Forsøkene viste dessuten at IFNc-plasmid, men ikke IFNa1-plasmid, induerte økt genuttrykk av Mx i fornyre hos laks én uke etter injeksjon. I denne oppgaven ble det først undersøkt om rekombinant IFNa1 og IFNc har forskjellig evne til å induere antivirale gener i fornyreleukocytter, da de respektive plasmidene hadde ulik effekt *in vivo*. Deretter ble det undersøkt hvordan i.m. injeksjon av ekspresjonsplasmid for IFNc påvirker ekspresjon av antivirale gener hos laks over en periode på åtte uker for å studere varigheten av effekten.

4.1 Effekt av rekombinant IFNa1 og IFNc på ekspresjon av antivirale proteiner og reseptorer for viralt RNA i fornyreleukocytter

Rekombinant IFNa1 og IFNc viste klare og relativt like økninger i genuttrykk av de antivirale proteinene Mx, viperin, ISG15 og IFIT5 etter 6 timer mens det ble observert en tendens til nedgang i genuttrykk etter 24 timer i IFNc-behandlede leukocytter. Dette kan skyldes at IFNa1 og IFNc har inducerer antivirale gener ulikt, grunnet ulik rolle i antiviral immunitet hos laks (121). Nedgangen i transkripter var imidlertid bare signifikant for IFIT5 og en relativt lik induksjon av antivirale gener av IFNa1 og IFNc har også blitt beskrevet av Svingerud og medarbeidere (2012) som viste at begge IFN ga relativt lik økning i genuttrykk, relativt lik antiviral effekt mot IPNV-infeksjon, samt lignende tidsmessig kinetikk i induksjon av Mx-transkripsjonen i lakseceller (121). På grunnlag av resultater fra dette forsøket kan vi ikke konkludere med at IFNa1 og IFNc har ulik evne til å

Diskusjon

indusere antivirale gener i fornyreleukocytter fra laks. Disse resultatene kunne ikke benyttes til å forklare forskjell i antiviral beskyttelse mellom de ulike plasmidene, altså er mekanismen bak hvorfor IFN α 1 i motsetning til IFN γ ikke ga beskyttende effekt fortsatt ukjent. Dette bør imidlertid undersøkes nærmere i videre forsøk. Kanskje skyldes ulik antiviral beskyttelse at IFN α 1- og IFN γ -plasmider gir en ulik induksjon av antivirale gener *in vivo* over tid.

Det ble i samme forsøk vist at IFN α 1 og IFN γ økt genuttrykk av TLR3, TLR7, TLR8 og RIG-I i fornyreleukocytter etter både 6 og 24 timer. Dette er reseptorer for viralt RNA som styrer induksjonen av type I IFN. Det økte uttrykket etter IFN-stimulering indikerer at IFN gir leukocytene økt kapasitet til å respondere på virusinfeksjoner som igjen fører til en raskere aktivering av antiviralt forsvar. Reseptorer for viralt RNA er ikke statisk uttrykt på cellene, men kan moduleres som en respons på infeksjon med patogener, som vist hos mennesker infisert med *human immunodeficiency virus* (HIV) (61). Det har også blitt vist at genuttrykket av TLR3 og TLR7 økes i makrofager fra mennesker etter infeksjon med virus, mens antistoff mot IFN nedregulerte uttrykket av TLR (74). I tillegg stimulerer poly I:C en økning i genuttrykk av TLR3 i flere celletyper hos pattedyr og fisk, samt at type I IFN gir en kraftig induksjon i gen- og proteinuttrykk av både RIG-I og MDA5 i DC og epitelceller fra mennesker (70, 102, 114).

Dette forsøket viser altså at IFN α 1 og IFN γ gir økt motstand mot virusinfeksjon i fornyreleukocytter fra laks ved å stimulere en økning i genuttrykk av både antivirale proteiner og virusreseptorer.

Det ble imidlertid ikke registrert en økning i genuttrykk for IFITM3 eller TLR22, noe som indikerer at disse genene har en annen regulering enn andre antivirale gener og TLR. Det fremgår av Ct-verdiene til både IFITM3 og TLR22 (Fig. 4 og 5) at genene er basalt uttrykt i kontrollcellene, som bekrefter at det ikke var noe galt med RT-PCR metodikken. Genuttrykk av IFITM3 og TLR22 ser dermed ut til ikke å påvirkes av IFN-stimulering. Det har blitt vist at uttrykk av IFITM3 øker etter smitte med influensa A-virus i mus, samt at IFN β -aktivitet i celler transfektert med TLR22 fra fugu øker etter stimulering med poly I:C (27, 71). Dette indikerer at genuttrykket av IFITM3 og TLR22 påvirkes direkte av viralt RNA og syntetiske analoger, men ikke av type I IFN, men dette bør imidlertid undersøkes nærmere hos laks.

4.2 Effekt av IFNc-plasmid på genekspresjonen hos laks

4.2.1 Effekt av IFNc-plasmid på genekspresjonen i muskel ved injeksjonsstedet

Det ble observert en sterk økning i genuttrykk av IFNc ved injeksjonsstedet i muskelen etter injeksjon av IFNc-plasmider i forhold til prøver fra laks injisert med PBS og kontrollplasmider gjennom hele forsøksperioden. Økning i genuttrykk av IFNc var størst to uker etter injeksjon hvor det ble observert en økning på ca. 1600x relativ til PBS-injisert fisk, mens denne var redusert til ca. 200x ved forsøksslutt. Dette bekrefter at IFNc-plasmider ble tatt opp og transkribert av celler ved injeksjonsstedet i muskelen. Det ble følgelig observert en klar økning av Mx, viperin og ISG15 gjennom hele forsøksperioden, noe som bekrefter at økt uttrykk av IFNc har induisert en produksjon av antivirale gener i muskelcellene.

Økning i genuttrykk av Mx var størst én uke etter injeksjon, før uttrykket stabiliserte seg på ca. 10x økning sammenlignet med PBS-injisert fisk inntil forsøksslutt. Derimot var genuttrykket av viperin og ISG15 relativt likt oppregulert gjennom hele forsøksperioden. Den observerte forskjellen i økning av genuttrykk kan skyldes ulik stabilitet i transkriptene, eventuelt at IFN har ulik virkning på induksjon av antivirale gener i muskelceller.

4.2.2 Effekt av IFNc-plasmid på genekspresjonen i indre organer

Det ble observert en signifikant økning i genuttrykk av antivirale gener (Mx, viperin, ISG15, IFIT5) i fornyre i inntil åtte uker etter injeksjon av IFNc-plasmid. Alle de antivirale ISG viser lignende trend i uttrykk etter injeksjon av plasmid ved at de har en topp etter 5-7 dager hvoretter genuttrykket synker merkbart ved uke 2 før det igjen øker og ser ut til å stabilisere seg ved fem uker etter injeksjon inntil forsøksslutt. En lavere økning i genuttrykk av antivirale gener over tid kan være et resultat av at plasmider i muskelen har blitt degradert og at det dermed har blitt skilt ut mindre IFNc, noe som bekreftes av Figur 9A. Det kan også være et resultat av en negativ feedback mekanismer av IFNc.

Mx er et ISG med antiviral aktivitet mot flere RNA-virus og induseres av IFN-systemet som respons på en virusinfeksjon, dsRNA eller syntetiske analoger hos pattedyr og fisk (36, 81, 100). DNA-vaksiner basert på G-proteinet til IHNV og VHSV gir langvarig beskyttelse mot de respektive sykdommer hos regnbueørret, noe som er tenkt å skyldes en tidlig uspesifikk antiviral immunrespons, etterfulgt av en langvarig, spesifikk immunrespons (4). Det har i flere studier vist at i.m. plasmid som koder for G-proteinet til IHNV og VHSV gir en induksjon av Mx i indre organer,

Diskusjon

samt en uspesifikk, antiviral beskyttelse i inntil 1-2 uker, etterfulgt av et dropp i både Mx-uttrykk og uspesifikk beskyttelse (2, 53, 92). Årsaken til hvorfor den uspesifikke immunresponsen er kortvarig er uklar, men det er vist at myocytter som inneholder G-proteinplasmid gradvis degraderes etter injeksjon (66). Kanskje vil celler som produserer G-protein oppfattes som infiserte, grunnet uttrykk av G-protein i cellemembranen og dermed elimineres av det cellulære immunforsvaret (66). Dette kan dermed føre til en reduksjon av celler som produserer G-protein som igjen kan føre til en nedgang i medfødte immunresponser. Degradering av celler som produserer plasmider, eventuelt degradering av plasmid, vil igjen redusere den uspesifikke immunresponsen. Tidlig, uspesifikk beskyttelse mot virus etter injeksjon av et plasmid som koder for G-protein er trolig koplet til økte nivå av antivirale ISG som Mx (73, 92). I dette forsøket ble det vist at IFN γ i muskel og Mx i fornyre var oppregulert gjennom hele forsøksperioden hos laks injisert med IFN γ -plasmid, men kanskje kan effekten vare enda lengre. Dette indikerer at reduksjonen i genuttrykk av IFN γ i muskelen ikke skyldes eliminering av myocytter av det adaptive immunforsvaret. Tonheim og medarbeidere (2007) har tidligere vist at et plasmid med innsatt gen for luciferase var detekterbart ved injeksjonsstedet i muskelen 535 dager etter i.m. injeksjon (127). Den lange levetiden til luciferase kan skyldes en lite effektiv evne til å indusere en adaptiv immunrespons, som kan eliminere celler som produserer transgenet (127). Sett i sammenheng med resultatene fra dette forsøket indikerer det at IFN γ -plasmid har et stort potensiale til å indusere langvarig, uspesifikk beskyttelse mot virusinfeksjoner, da myocytter som produserer IFN trolig ikke vil være et mål for immunforsvaret og dermed vil kunne produsere IFN og følgelig antivirale gener over lang tid.

Det ble også observert en økning i genuttrykk av reseptorer for viralt RNA (TLR3, TLR7, TLR8, RIG-I) i fornyre under hele forsøket, noe som bekrefter at virusreseptorer er positivt regulert av IFN i fisk. Dette gir som tidligere nevnt cellene en økt sensitivitet og responsevne mot infeksjon av RNA-virus.

Det ble observert at IFN γ -plasmid ga økt genuttrykk av Mx i gjelle, tarm, milt, hjerte og lever, én uke etter injeksjon, noe som viser at IFN γ har blitt distribuert til indre organer via sirkulasjonssystemet, som videre har ført til en systemisk økning av antiviralt forsvar. Gjeller og tarm representerer viktige inngangsporter for patogene mikroorganismer hos fisk og et høyt konstitutivt uttrykk av antivirale gener i disse vevene vil være gunstig for å forhindre infeksjon. I dette forsøket ble det observert relativt høye Ct-verdier av Mx i gjelle og tarm (henholdsvis 24,4 og 26,5) sammenlignet med lever (30,0) i PBS-injisert fisk, noe som indikerer et høyt konstitutivt

uttrykk av Mx. Etter injeksjon med IFNc-plasmidet var imidlertid Ct-verdiene 22,8 og 23,6, noe som indikerer at økningen i genuttrykk av Mx har gitt en sterkere barriere mot virusinfeksjoner.

Plasmider har bakterielt opphav og inneholder følgelig CpG-sekvenser som gjenkjennes av immunsystemet hos vertebrater (50). Det er rapportert at CpG-sekvenser fra plasmider aktiverer leukocytter og uspesifikke CTL, i tillegg til en tidlig uspesifikk beskyttelse hos laks (50, 75). Genuttrykk av antivirale gener og virusreseptorer i fisk injisert med kontrollplasmid (pcDNA3.3) var som regel økt 2-3x sammenlignet med PBS-injisert fisk, men var imidlertid betydelig lavere enn økning i uttrykket i IFNc-injisert fisk. Dette indikerer at plasmidet alene har induert en lav økning i genuttrykk, som kan skyldes at CpG-sekvenser i plasmidet har induert en uspesifikk immunrespons. Det ble imidlertid vist en signifikant økning i uttrykk av antivirale gener og reseptorer for viralt RNA i IFNc-injisert fisk, relativt til fisk injisert kontrollplasmid i alle undersøkte organer. Dette indikerer at økning i genuttrykk av antivirale gener og virusreseptorer etter injeksjon av IFNc-plasmid skyldes det innsatte genet for IFNc og ikke selve plasmidkonstruktet.

Resultatene fra dette forsøket er i samsvar med resultatene fra *in vitro*-forsøket og viser at IFNc inducerer økt genuttrykk av antivirale gener og reseptorer til viralt RNA i fornyre under hele forsøksperioden, samt økt uttrykk av Mx i andre indre organer etter én uke. Dette bekrefter at disse genene er positivt regulert av IFN. I fremtidige forsøk vil det være interessant å studere langtidseffekt av IFNa1- og IFNb-plasmider på gennivå parallelt med effekt av IFN-plasmid for å detektere eventuelle forskjeller i evne til å oppregulere antivirale gener eller virusreseptorer over tid.

4.2.3 Gener knyttet til adaptiv immunitet

Type I IFN inducerer proliferasjon av både B- og T-celler hos pattedyr (11). IgM ble i denne oppgaven benyttet som markør på B-celler for å undersøke om IFNc-plasmidene aktiverte adaptive immunresponser. IgM uttrykkes på B-celler som finnes i høye konsentrasjoner i fornyre, noe som bekreftes av en relativt høy Ct-verdi i PBS-injisert fisk (20,1) sammenlignet med Ct-verdier i lever fra PBS-injisert fisk (30,0) én uke etter injeksjon (28). IFNc-plasmid ga ikke økning av genuttrykk av IgM i fornyre de to første ukene etter injeksjon, men fra og med tre uker ble det imidlertid observert en liten økning. En økning i genuttrykk av IgM på én til to ganger i fornyre kan bety at B-cellepopulasjonen har økt betydelig, noe som kan ha innvirkning på antistoffresponsen. Dette bør

Diskusjon

undersøkes nærmere ved å studere B-cellepopulasjonen og IgM-konsentrasjonen i blod hos laks behandlet med IFN γ -plasmid.

Det ble ikke observert en klar økning i genuttrykk av IFN γ i fornyre. IFN γ produseres av celler i både medfødt og adaptivt immunforsvar, men T-celler produserer IFN γ først etter en infeksjon og IFN γ kan dermed ikke utelukkende bli brukt som markør for nivåer av T-celler. Ooi og medarbeidere (2008) så heller ingen økning i genuttrykk av IFN γ i fornyre etter i.p. injeksjon av rekombinant IFN α 2 i regnbueørret (84). Dette indikerer at IFN γ alene ikke induserer klare økninger i IFN γ -uttrykk, men dette burde vært undersøkt i forsøket med fornyreleukocytter.

4.2.4 Effekt av IFN α -plasmid på uttrykk av Mx protein i lever og hjerte

Mx-protein ble detektert i leverprøver fra samtlige fisk injisert med rekombinant IFN α og poly I:C, samt i leverprøver fra fisk injisert med IFN α -plasmid både 1, 3 og 8 uker etter injeksjon. Dette bekrefter resultatene fra kvantitativ RT-PCR og viser IFN α har ført til transkripsjon og translasjon av Mx-proteiner i lever i inntil åtte uker etter injeksjon. Økt uttrykk av Mx-protein i lever etter behandling med IFN og poly I:C i celler har tidligere blitt vist på Børre Robertsens forskningsgruppe (48, 81). Det ble også observert et svakt uttrykk av Mx i lever hos individer behandlet med PBS og kontrollplasmid, men dette var betydelig svakere sammenlignet med uttrykk av Mx i fisk injisert med IFN α -plasmid, særlig ved uke 3 og uke 8. Basaluttrykk av Mx i lever forventes å være lavt, men en lignende effekt har også blitt observert i tidligere studier og beskrevet som en mulig konsekvens av konstitutivt uttrykt type I IFN, som vist hos mennesker (21, 47). Alternativt kan dette være et resultat av at fisk har vært utsatt en uoppdaget infeksjon eller stress enten i forkant av eller under forsøket. Das og medarbeidere (2009) hevder det er lite sannsynlig at lave nivå av Mx-protein i kontrollfisk er et resultat av konstitutivt uttrykt type I IFN i lever, men at det heller skyldes miljømessige stimuli som for eksempel eksponering for virus (20).

Det ble observert et kraftigere uttrykk av Mx-protein ved uke 3 og uke 8 sammenlignet med uke 1 til tross for at genuttrykket av Mx var høyere ved uke 1. Dette kan enten bety at det ikke er helt sammenheng mellom målinger av genuttrykk og protein for Mx og/eller at økningene i Mx-protein skyldes Mx-proteinenes stabilitet som følge av evnen til å danne aggregater i celler (44, 60). Det var ikke imidlertid ikke mulig å kvantifisere mengde protein, eller skille mellom de ulike fiskene i gruppen, da membranen ble overeksponert for prøvene fra uke 3 og uke 8. For å kunne kvantifisere, samt sammenligne mengde protein mellom individene ble det utført et nytt blot hvor proteinkonsentrasjon og eksponeringstid ble halvert (Fig. ikke vist). Membranen ble likevel overeksponert for uke 3 og uke 8 og det ble observert et meget svakt uttrykk for uke 1. Dette indikerer at proteinkonsentrasjonen av Mx i lever fra uke 3 og uke 8 var betydelig høyere enn ved forsøksstart. For å finne ut om det er forskjell i proteinuttrykk av Mx i lever ved uke 3 og uke 8 må Western blotting gjentas med lavere påsatte proteinmengder.

For å ytterligere å bekrefte systemisk induksjon av Mx ved injeksjon av IFN α -plasmid, ble immunhistokjemi benyttet for å detektere protein i vevssnitt fra hjerte, åtte uker etter injisering med plasmid. I vevssnitt fra fisk behandlet med IFN α -plasmid ble det observert et klart uttrykk av Mx-protein, detektert som rødbrune, kornete ansamlinger i cytoplasma i muskelcellene. På grunn av

snittets kvalitet kan det imidlertid ikke utelukkes at Mx ikke finnes i nukleus. Hos mennesker og mus danner Mx-protein granulerte aggregater i henholdsvis cytoplasma og nukleus i celler behandlet med IFN, mens det i fiskeceller har blitt vist at Mx danner slike aggregater både i nukleus og cytoplasma (24, 60, 81, 118). Nygaard og medarbeidere (2000) viste at Mx var likt distribuert i cytoplasma i CHSE-214-celler, makrofager og AS-celler, noe som også har blitt vist for Mx3 i regnbueørret, i motsetning til Mx2 i regnbueørret som er lokalisert i nukleus (81). I vevssnitt fra fisk behandlet med PBS og kontrollplasmid ble det observert negativt resultat. Resultatene fra immunhistokjemi bekrefter data fra kvantitativ RT-PCR og viser at IFNc-plasmid induerte en systemisk økning av Mx i indre organer.

4.3 Mulige forklaringer på beskyttende effekt av IFNc-plasmid mot ILAV

Tidligere forskning har, som nevnt over, vist at IFNc gir beskyttende effekt overfor ILAV, mens IFNa1 og IFNb ikke gir beskyttende effekt (Chang og Robertsen, upubliserte data). ILAV tilhører familien *Orthomyxoviridae*, samme familie som influensavirusene (25). Målcelle for ILAV er endotelceller i blodårene i alle organer, men patologiske funn er hovedsakelig begrenset til lever, nyre, milt og tarm (19, 125). I dette forsøket ble det vist at IFNc inducerer økt transkript av Mx i alle ovennevnte organer én uke etter injeksjon. Det ble også vist økte mengder Mx-protein i lever gjennom hele forsøksperioden etter injeksjon med IFNc-plasmid. Induksjon av Mx laksecellelinjer med IFN eller poly I:C gir imidlertid liten beskyttelse mot ILAV-infeksjon (48, 52). Den beskyttende effekten av IFNc-plasmid *in vivo* kan dermed skyldes en langvarig induksjon av multiple antivirale gener og reseptorer for viralt RNA i indre organer, samt at eventuelt IFNc har en bedre beskyttende effekt på målceller for ILAV.

4.4 Fremtidsperspektiver om bruken av IFN-plasmid for å øke fiskens motstandsdyktighet mot virus?

Atlantisk laks har et velutviklet IFN-system som er svært viktig for fiskens forsvar mot virus (100). Dette har åpnet for spørsmål om IFN kan benyttes som immunstimulant for å forebygge virusinfeksjoner, for eksemplet i faser hvor fisken er spesielt utsatt for infeksjon som ved sjøusett av smolt.

Cytokiner har et stort potensiale til å kunne benyttes som immunstimulanter og vaksineadjuvanter i vertebrater. Effekt av IL-1 β og IL-8 har allerede blitt testet ut med lovende resultat (49, 137). Som tidligere nevnt, benyttes IFN terapeutisk hos mennesker mot blant annet hepatitt og MS (86, 128). I tillegg blir ligand for TLR tilsatt vaksiner for å beskytte mot infeksiosøst agens (129). Det har også blitt vist at injeksjon av plasmid som koder for type I IFN har adjuvant effekt i vaksiner når de blir administrert sammen med antigen og potensialet for IFN som adjuvant i virusvaksiner bør undersøkes nærmere i videre forsøk (128). Hos fisk har det blitt vist at flere rekombinante type I IFN gir beskyttelse mot virus *in vitro* (84, 101, 131, 144). Antiviral beskyttelse etter stimulering med rekombinant IFN α fra laks har også blitt vist i regnbueørret, hvor i.p. injisert fisk var beskyttet mot virus gjennom hele forsøksperioden (tre uker) (84). Resultater fra forsøkene utført i denne oppgaven viser at injeksjon av IFN α -plasmid i laks gir induksjon av antivirale gener over et mye lengre tidsrom, minst åtte uker. Injeksjon av IFN α -plasmid i presmolt av laks kan derfor tenkes å være gunstig med hensyn til å øke smoltens motstand mot virusinfeksjon som før f.eks sjøusett. Dette behandlingsprinsippet har store likheter med DNA-vaksinasjon som foreløpig ikke er tillatt i Europa grunnet føre-var-problematikken. DNA-vaksiner har en rekke fordeler sammenlignet med tradisjonelle vaksiner, som reduksjon av bivirkninger, lang immunitet i tillegg til humoral og cellulær aktivering (67, 126). En annen fordel ved bruk av DNA-vaksiner er at plasmider inneholder flere CpG-sekvenser, noe som tidligere nevnt kan indusere en uspesifikk antiviral aktivitet, samt aktivere leukocytter (50, 75). Innvendingene mot DNA-vaksinering har blant annet vært at plasmidgener kanskje kan inkorporeres i genomet til fisken og i verste fall overføres til avkommet og den samme problematikken vil gjelde for IFN-plasmider. Dette er imidlertid ikke vist hos vertebrater og det er viktig å vekte fiskevelferd og fiskehelse opp mot ulemper ved bruk av DNA-vaksiner, da den potensielle gevinsten er stor for både oppdretter og fisk.

Diskusjon

Økte nivå av IFN kan oppfattes som en indikasjon på sykdom og stress i fisken og kan dermed ha en hemmende effekt på vekst og andre faktorer som typisk nedreguleres under slike forhold. Hos mennesker behandlet med høye doser IFN α mot hepatitt ble det funnet at flere pasienter fikk alvorlige bivirkninger etter behandlingen, hvorav flere ikke kunne reverseres (82). Det har også blitt vist at IFN administrert sammen med ribavirin blant annet gir utmattelse, influensalignende symptomer og nevropsykiatriske symptomer (35). Da det ikke har blitt publisert noen artikler som basert på IFN som vaksineadjuvant, finnes det følgelig ingen artikler som omhandler bivirkning av IFN-behandling hos fisk. Det vil derfor være nødvendig å undersøke om, og i hvilken grad, IFN gir uønskede bivirkninger hos laks, som for eksempel hemmende effekt på vekst, da dette vil redusere bruksområdet som immunstimulant.

For å videre undersøke immunstimulerende effekt av IFN γ -plasmid i oppdrett vil det være aktuelt å undersøke effekten mot infeksjon av flere laksepatoogene virus som SAV3, IPNV, PRV og PMV. Det har blitt vist at IFN har antivirale effekt mot IPNV og SAV3 i celler, og videre forskning vil kunne avdekke om IFN γ kan gi beskyttelse mot også andre aktuelle laksevirus (120-121).

4.6 Konklusjon

- Stimulering av fornyreleukocytter med rekombinant IFN α 1 og IFN γ ga en økning i genuttrykk av antivirale gener og reseptorer for viralt RNA etter både 6 og 24 timer.
- IFN γ -plasmid ble tatt opp av celler ved injeksjonsstedet i muskelen og transkribert i inntil åtte uker etter injeksjon, som følgelig økte genuttrykket av antivirale gener i samme tidsrom.
- IFN γ -plasmid ga en klar økning i genuttrykk av antivirale gener og reseptorer for viralt RNA i fornyre i samme tidsrom, i tillegg til å indusere økt genuttrykk av Mx i indre organer én uke etter injeksjon. Det ble ikke funnet at IFN γ -plasmid hadde en klar innvirkning på adaptive immunresponser.
- Resultatene fra Western blotting og immunhistokjemi samsvarte med og bekreftet resultatene fra kvantitativ RT-PCR. IFN γ -plasmid induserte detekterbare uttrykk av Mx-protein i lever og hjerte i samme tidsrom.
- Resultater fra forsøkene utført i dette mastergradsarbeidet indikerer at IFN γ kan benyttes til å øke medfødt antiviralt forsvar hos laks og følgelig ha potensiale til å benyttes som immunstimulant eller vaksineadjuvant for å forebygge virussykdommer i oppdrett.

Referanser

1. **Abbas, A. K., and A. H. Lichtman.** 2009. Basic Immunology - Functions and Disorders of the Immune System (Third edition). Philadelphia, PA: Elsevier Saunders.
2. **Acosta, F., A. Petrie, K. Lockhart, N. Lorenzen, and A. E. Ellis.** 2005. Kinetics of Mx expression in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) parr in response to VHS-DNA vaccination. *Fish & Shellfish Immunology* **18**:81-89.
3. **Aggad, D., M. Mazel, P. Boudinot, K. E. Mogensen, O. J. Hamming, R. Hartmann, S. Kotenko, P. Herbomel, G. Lutfalla, and J.-P. Levraud.** 2009. The Two Groups of Zebrafish Virus-Induced Interferons Signal via Distinct Receptors with Specific and Shared Chains. *Journal of Immunology* **183**:3924-3931.
4. **Akira, S., S. Uematsu, and O. Takeuchi.** 2006. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* **124**:783-801.
5. **Aquagen.** 2010. Kunnskapsbrev Nr.1: QTL-rogn - dokumentert IPN-beskyttelse fra første dag. Tilgjengelig fra:
<http://aquagen.no/filestore/01-2010QTL-rogn-dokumentertIPN-beskyttelsefrafrstedag.pdf> (Nedlastet 15.03.13).
6. **Aquagen.** 2012. Kunnskapsbrev Nr. 1: Feltresultater av QTL-innOva IPN - fra rogn til slakt. Tilgjengelig fra:
<http://aquagen.no/filestore/01-2012FeltresultateravQTL-innOvaIPN-frarogntilslakt.pdf> (Nedlastet 15.03.2013).
7. **Bang, B. J., A. B. Kristoffersen, C. Myr, and E. Brun.** 2012. Cohort study of effect of vaccination on pancreas disease in Norwegian salmon aquaculture. *Diseases of Aquatic Organisms* **102**:23-31.
8. **Bassity, E., and T. G. Clark.** 2012. Functional identification of dendritic cells in the teleost model, rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Plos One* **7**:14.
9. **Berg, A., Ø. Bergh, P. G. Fjelldal, T. Hansen, J. E. Juell, and A. Nerland.** 2006. Dyrevelferdsmessige konsekvenser av vaksinasjon av fisk - effekter og bivirkninger. Bergen: Havforskningsinstituttet.
10. **Boudinot, P., P. Massin, M. Blanco, S. Riffault, and A. Bensansour.** 1999. vig-1, a new fish gene induced by the rhabdovirus glycoprotein, has a virus-induced homologue in humans and shares conserved motifs with the MoaA family. *Journal of Virology* **73**:1846-1852.
11. **Braun, D., I. Caramalho, and J. Demengeot.** 2002. IFN- α/β enhances BCR-dependent B cell responses. *International Immunology* **14**:411-419.
12. **Castro, R., D. Bernard, M. P. Lefranc, A. Six, A. Benmansour, and P. Boudinot.** 2011. T cell diversity and TcR repertoires in teleost fish. *Fish & Shellfish Immunology* **31**:644-654.
13. **Chan, C. W., E. Crafton, H.-N. Fan, J. Flook, K. Yoshimura, M. Skarica, D. Brockstedt, T. W. Dubensky, M. F. Stins, L. L. Lanier, D. M. Pardoll, and F. Housseau.** 2006. Interferon-producing killer dendritic cells provide a link between innate and adaptive immunity. *Nature Medicine* **12**:207-213.
14. **Chang, M., B. Collet, P. Nie, K. Lester, S. Campbell, C. J. Secombes, and J. Zou.** 2011. Expression and functional characterization of the RIG-I-like receptors MDA5 and LGP2 in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Journal of Virology* **85**:8403-8412.
15. **Chaplin, D. D.** 2010. Overview of the immune response *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **125**:S3-23.
16. **Chelbi-Alix, M. K., and J. Wietzerbin.** 2007. Interferon, a growing cytokine family: 50 years of interferon research. *Biochimie* **89**:713-718.
17. **Cheng, G., X. Zhao, W. Yan, W. Wang, X. Zuo, K. Huang, Y. Liu, J. Chen, J. Wang, W. Cong, M. Liu, H. Gao, J. Chen, Y. Lu, and Z. Zheng.** 2007. Alpha interferon is a

- powerful adjuvant for a recombinant protein vaccine against foot-and-mouth disease virus in swine, and an effective stimulus of in vivo immune response. *Vaccine* **25**:5199-5208.
18. **Chin, K.-C., and P. Cresswell.** 2001. Viperin (cig5), an IFN-inducible antiviral protein directly induced by human cytomegalovirus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**:15125-15130.
 19. **Cottet, L., A. Rivas-Aravena, M. Cortez-San Martin, A. M. Sandino, and E. Spencer.** 2011. Infectious salmon anemia virus -genetics and pathogenesis. *Virus Research* **155**:10-19.
 20. **Das, B. K., A. E. Ellis, and B. Collet.** 2009. Induction and persistence of Mx protein in tissues, blood and plasma of Atlantic salmon parr, *Salmo salar*, injected with poly I:C. *Fish & Shellfish Immunology* **26**:40-48.
 21. **Das, B. K., K. K. Nayak, M. Fourrier, B. Collet, M. Snow, and A. E. Ellis.** 2007. Expression of Mx protein in tissues of Atlantic salmon post-smolts--an immunohistochemical study. *Fish & Shellfish Immunology* **23**:1209-1217.
 22. **Diamond, M. S., and M. Farzan.** 2013. The broad-spectrum antiviral functions of IFIT and IFITM proteins. *Nature Reviews Immunology* **13**:46-57.
 23. **Dobos, P.** 1995. The molecular biology of infectious pancreatic necrosis virus (IPNV). *Annual Review of Fish Diseases* **5**:25-54.
 24. **Dreiding, P., P. Staeheli, and O. Haller.** 1985. Interferon-induced protein Mx accumulates in nuclei of mouse cells expressing resistance to influenza viruses. *Virology* **140**:192-196.
 25. **Falk, K., E. Namork, E. Rimstad, S. Mjaaland, and B. H. Dannevig.** 1997. Characterization of infectious salmon anemia virus, an orthomyxo-like virus isolated from Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Journal of Virology* **71**:9016-9023.
 26. **Farrell, P. J., R. J. Broeze, and P. Lengyel.** 1979. Accumulation of an mRNA and protein in interferon-treated Ehrlich ascites tumour cells. *Nature* **279**:523-525.
 27. **Feeley, E. M., J. S. Sims, S. P. John, C. R. Chin, T. Pertel, L.-M. Chen, G. D. Gaiha, B. J. Ryan, R. O. Donis, S. J. Elledge, and A. Bras.** 2011. IFITM3 inhibits influenza A virus infection by preventing cytosolic entry. *Plos Pathogens* **7**:17.
 28. **Fillatreau, S., A. Six, S. Magadan, R. Castro, J. O. Sunyer, and P. Boudinot.** 2013. The astonishing diversity of Ig classes and B cell repertoires in teleost fish. *Frontiers in immunology* **4**:14.
 29. **Finstad, Ø. W., K. Falk, M. Løvoll, Ø. Evensen, and E. Rimstad.** 2012. Immunohistochemical detection of piscine reovirus (PRV) in hearts of Atlantic salmon coincide with the course of heart and skeletal muscle inflammation (HSMI). *Veterinary Research* **43**:27-38.
 30. **Fiskeri- og kystdepartementet.** FOR 2008-06-17-819: Forskrift om omsetning av akvakulturdyr og produkter av akvakulturdyr, forebygging og bekjempelse av smittsomme sykdommer hos akvatiske dyr. Tilgjengelig fra: <http://www.lovdato.no/cgi-wift/ldles?doc=/sf/sf/sf-20080617-0819.html> (Nedlastet 01.04.2013).
 31. **Fiskeri- og kystdepartementet.** FOR 2008-06-17-822: Forskrift om drift av akvakulturanlegg (akvakulturdriftsforskriften) Tilgjengelig fra: <http://www.lovdato.no/cgi-wift/ldles?doc=/sf/sf/sf-20080617-0822.html> (Nedlastet 15.03.2013).
 32. **Fiskeri- og kystdepartementet.** FOR-1996-01-15-23: Forskrift om forsøk med dyr. Tilgjengelig fra: <http://www.lovdato.no/cgi-wift/ldles?doc=/sf/sf/sf-19960115-0023.html> (Nedlastet 01.05.2013).
 33. **Fiskeri- og kystdepartementet.** LOV 2009-06-19 nr 97: Lov om dyrevelferd (Dyrevelferdsloven). Tilgjengelig fra: <http://www.lovdato.no/all/hl-20090619-097.html#map001> (Nedlastet 01.05.2013).

Referanser

34. **Fiskeri- og kystdepartementet.** LOV-1993-04-02-38: Lov om framstilling og bruk av genmodifiserte organismer m.m. (Genteknologiloven). Tilgjengelig fra: <http://www.lovdata.no/all/hl-19930402-038.html> (Nedlastet 01.04.2013).
35. **Fried, M. W.** 2002. Side effects of therapy of hepatitis C and their management. *Hepatology* **36**:S237-S244.
36. **Haller, O., and G. Kochs.** 2011. Human MxA protein: an interferon-induced dynamin-like GTPase with broad antiviral activity. *Journal of Interferon & Cytokine Research* **31**:79-87.
37. **Haller, O., and G. Kochs.** 2002. Interferon-induced mx proteins: dynamin-like GTPases with antiviral activity. *Traffic* **3**:710-717.
38. **Haller, O., G. Kochs, and F. Weber.** 2006. The interferon response circuit: induction and suppression by pathogenic viruses. *Virology* **344**:119-130.
39. **Haller, O., P. Staeheli, and G. Kochs.** 2007. Interferon-induced Mx proteins in antiviral host defense. *Biochimie* **89**:812-818.
40. **Harty, R. N., P. M. Pitha, and A. Okumura.** 2009. Antiviral Activity of Innate Immune Protein ISG15. *Journal of Innate Immunity* **1**:397-404.
41. **Haugland, Ø., A. B. Mikalsen, P. Nilsen, K. Lindmo, B. J. Thu, T. M. Eliassen, N. Roos, M. Rode, and Ø. Evensen.** 2011. Cardiomyopathy Syndrome of Atlantic Salmon (*Salmo salar* L.) Is Caused by a Double-Stranded RNA Virus of the *Totiviridae* Family. *Journal of Virology* **85**:5275-5286.
42. **Holzinger, D., C. Jorns, S. Stertz, S. Boisson-Duplis, R. Thimme, M. Weidmann, J.-L. Casanova, O. Haller, and G. Kochs.** 2007. Induction of MxA gene expression by influenza A virus requires type I or type III interferon signaling. *Journal of Virology* **81**:7776-7785.
43. **Horisberger, M. A., P. Staeheli, and O. Haller.** 1983. Interferon induces a unique protein in mouse cells bearing a gene for resistance to influenza virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **80**:1910-1914.
44. **Horisberger, M. A., and K. D. Staritzky.** 1989. Expression and stability of the Mx protein in different tissues of mice, in response to interferon inducers or to influenza virus infection. *Journal of Interferon Research* **9**:583-590.
45. **Houston, R. D., C. S. Haley, A. Hamilton, D. R. Guy, A. E. Tinch, J. B. Taggart, B. J. McAndrew, and S. C. Bishop.** 2008. Major quantitative trait loci affect resistance to infectious pancreatic necrosis in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Genetics* **178**:1109-1115.
46. **Iliev, D. B., I. Skjæveland, and J. B. Jørgensen.** 2013. CpG oligonucleotides bind TLR9 and RRM-Containing proteins in Atlantic Salmon (*Salmo salar*). *BMC Immunology* **14**:12.
47. **Jensen, I., A. Albuquerque, A.-I. Sommer, and B. Robertsen.** 2002. Effect of poly I:C on the expression of Mx proteins and resistance against infection by infectious salmon anaemia virus in Atlantic salmon. *Fish & Shellfish Immunology* **13**.
48. **Jensen, I., and B. Robertsen.** 2002. 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 & Shellfish Immunology* **13**:221-241.
49. **Jimenez, N., J. Coll, F. J. Salguero, and C. Tafalla.** 2006. Co-injection of interleukin 8 with the glycoprotein gene from viral haemorrhagic septicemia virus (VHSV) modulates the cytokine response in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Vaccine* **24**:5615-5626.
50. **Jørgensen, J., L.-H. Johansen, K. Steiro, and A. Johansen.** 2003. CpG DNA Induces Protective Antiviral Immune Responses in Atlantic Salmon (*Salmo salar* L.). *Journal of Virology* **77**:11471-11479.
51. **Karlsen, M., T. Tingbø, I.-T. Solbakk, Ø. Evensen, A. Furevik, and A. Aas-Eng.** 2012. Efficacy and safety of an inactivated vaccine against Salmonid alphavirus (family Togaviridae). *Vaccine* **30**:5688-5694.

52. **Kileng, Ø., M. I. Brundtland, and B. Robertsen.** 2007. Infectious salmon anemia virus is a powerful inducer of key genes of the type I interferon system of Atlantic salmon, but is not inhibited by interferon. *Fish & Shellfish Immunology* **23**:378-389.
53. **Kim, C. H., M. C. Johnson, J. D. Drennan, B. E. Simon, E. Thomann, and J.-A. Leong.** 2000. DNA vaccines encoding viral glycoproteins induce nonspecific immunity and Mx protein synthesis in fish. *Journal of Virology* **74**:7048-7054.
54. **Kumar, H., T. Kawai, and S. Akira.** 2011. Pathogen Recognition by the innate Immune system. *International Reviews of Immunology* **30**:16-34.
55. **Larsen, R., T. P. Rokenes, and B. Robertsen.** 2004. Inhibition of infectious pancreatic necrosis virus replication by atlantic salmon Mx1 protein. *Journal of Virology* **78**:7938-7944.
56. **Lauksund, S., T. Svingerud, V. Bergan, and B. Robertsen.** 2009. Atlantic salmon IPS-1 mediates induction of IFN α 1 and activation of NF- κ B and localizes to mitochondria. *Developmental & Comparative Immunology* **33**:1196-1204.
57. **Lauscher, A., B. Krossøy, P. Frost, S. Grove, M. König, J. Bohlin, K. Falk, L. Austbø, and E. Rimstad.** 2011. Immune responses in Atlantic salmon (*Salmo salar*) following protective vaccination against infectious salmon anemia (ISA) and subsequent ISA virus infection. *Vaccine* **29**:6392-6401.
58. **Le Bon, A., G. Schiavoni, G. D'Agostino, I. Gresser, F. Belardelli, and D. F. Tough.** 2001. Type I interferons potently enhance humoral immunity and can promote isotype switching by stimulating dendritic cells in vivo. *Immunity* **14**:461-470.
59. **Le Bon, A., and D. F. Tough.** 2002. Links between innate and adaptive immunity via type I interferon. *Current Opinion in Immunology* **14**:432-436.
60. **Leong, J.-A. C., G. D. Trobridge, C. H. Y. Kim, M. Johnson, and B. Simon.** 1998. Interferon-inducible Mx proteins in fish. *Immunological Reviews* **166**:349-363.
61. **Lester, R. T., X.-D. Yao, T. B. Ball, L. R. McKinnon, R. Kaul, C. Wachihi, W. Jaoko, F. A. Plummer, and K. L. Rosenthal.** 2008. Toll-like receptor expression and responsiveness are increased in viraemic HIV-1 infection. *AIDS* **22**:685-694.
62. **Li, J., D. R. Barreda, Y.-A. Zhang, H. Boshra, A. E. Gelman, S. LaPatra, L. Tort, and J. O. Sunyer.** 2006. B lymphocytes from early vertebrates have potent phagocytic and microbicidal abilities. *Nature Immunology* **7**:1116-1124.
63. **Li, Z., X. Xu, L. Huang, J. Wu, Q. Lu, Z. Xiang, J. Liao, S. Weng, X. Yu, and J. He.** 2010. Administration of recombinant IFN1 protects zebrafish (*Danio rerio*) from ISKNV infection. *Fish & Shellfish Immunology* **29**:399-406.
64. **LifeTechnologies.** Real-time PCR handbook. Basics of real-time PCR. Tilgjengelig fra: http://find.lifetechnologies.com/Global/FileLib/qPCR/RealTimePCR_Handbook_Update_LR.pdf (Nedlastet 04.03.2013)
65. **Liu, M. A.** 1998. Vaccine developments. *Nature Medicine* **4**:515-519.
66. **Lorenzen, E., N. Lorenzen, K. Einer-Jensen, B. Brudeseth, and Ø. Evensen.** 2005. Time course study of in situ expression of antigens following DNA-vaccination against VHS in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum) fry. *Fish & Shellfish Immunology* **19**:27-41.
67. **Lorenzen, N., and S. E. LaPatra.** 2005. DNA vaccines for aquacultured fish. *Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics)* **24**:201-213.
68. **Lugo-Villarino, G., K. M. Balla, D. L. Stachura, K. Bañuelos, M. B. WErneck, and D. Traver.** 2010. Identification of dendritic antigen-presenting cells in the zebrafish. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **107**:15850-15855.
69. **Matsumiya, T., and D. M. Stafforini.** 2010. Function and regulation of retinoic acid-inducible gene-I. *Critical Reviews in Immunology* **30**:489-513.
70. **Matsumoto, M., and T. Seya.** 2008. TLR3: interferon induction by double-stranded RNA including poly(I:C). *Advanced Drug Delivery Reviews* **60**:805-812.

71. **Matsuo, A., H. Oshiumi, T. Tsujita, H. Mitani, H. Kasai, M. Yoshimizu, M. Matsumoto, and T. Seya.** 2008. Teleost TLR22 Recognizes RNA Duplex to Induce IFN and Protect Cells from Birnaviruses. *Journal of Immunology* **181**:3474-3485.
72. **Mattijssen, S., and G. J. M. Pruijn.** 2012. Viperin, a key player in the antiviral response. *Microbes and Infection* **14**:419-426.
73. **McLauchlan, P. E., B. Collet, E. Ingerslev, S. C. J., N. Lorenzen, and A. E. Ellis.** 2003. DNA vaccination against viral haemorrhagic septicaemia (VHS) in rainbow trout: size, dose, route of injection and duration of protection—early protection correlates with Mx expression. *Fish & Shellfish Immunology* **15**:39-50.
74. **Miettinen, M., T. Sareneva, I. Julkunen, and S. Matikainen.** 2001. IFNs activate toll-like receptor gene expression in viral infections. *Genes and Immunity* **2**:349-355.
75. **Mikalsen, A. B., H. Sindre, J. Torgersen, and E. Rimstad.** 2005. Protective effects of a DNA vaccine expressing the infectious salmon anemia hemagglutinin-esterase in Atlantic salmon. *Vaccine* **23**:4895-4905.
76. **Mikalsen, A. B., J. Torgersen, P. Aleström, A.-L. Hellemann, E.-O. Koppang, and E. Rimstad.** 2004. Protection of Atlantic salmon *Salmo salar* against infectious pancreatic necrosis after DNA vaccination. *Diseases of Aquatic Organisms* **60**:11-20.
77. **Mitchell, H.** 1995. Choosing a furunculosis vaccine: points to consider. *Bulletin of Aquaculture Association of Canada* **95**:30-37.
78. **Miyanari, Y., K. Atsuzuwa, N. Usuda, K. Watashi, T. Hishiki, M. Zayas, R. Bartenschlager, T. Wakita, M. Hijikata, and K. Shimotohno.** 2007. The lipid droplet is an important organelle for hepatitis C virus production. *Nature Cell Biology* **9**:1089-1097.
79. **Moen, T., A. Sonesson, B. Hayes, S. Lien, H. Munck, and T. H. E. Meuwissen.** 2007. Mapping of a quantitative trait locus for resistance against infectious salmon anaemia in Atlantic salmon (*Salmo Salar*): comparing survival analysis with analysis on affected/resistant data. *BMC Genetics* **8**:13.
80. **Munang'andu, H. M., B. F. Fredriksen, S. Mutoloki, R. A. Dalmo, and Ø. Evensen.** 2013. Antigen dose and humoral immune response correspond with protection for inactivated infectious pancreatic necrosis virus vaccines in Atlantic salmon (*Salmo salar* L). *Veterinary Research* **44**:1-23.
81. **Nygaard, R., S. Husgard, A.-I. Sommer, J.-A. Leong, and B. Robertsen.** 2000. Induction of Mx protein by interferon and double-stranded RNA in salmonid cells. *Fish & Shellfish Immunology* **10**:435-450.
82. **Okanoue, T., S. Sakamoto, Y. Ithoh, M. Minami, K. Yasui, M. Sakamoto, K. Nishioji, T. Katagishi, Y. Nakagawa, H. Tada, Y. Sawa, M. Mizuno, K. Kagawa, and K. Kashima.** 1996. Side effects of high-dose interferon therapy for chronic hepatitis C. *Journal of Hepatology* **25**:283-291.
83. **Olsen, A. B., A. Nilsen, A. Moen, A. Lillehaug, B. Hjeltnes, C. Fritsvold, C. Meidel, D. Coloqoun, E. Biering, E. Thoen, G. Bornø, H. Hansen, H. Nilsen, H. Hellberg, H. Høgåsen, and I. Ørpetveit.** 2013. Fiskehelse rapporten 2012, Veterinærinstituttet.
84. **Ooi, E. L., N. Verjan, I. Haraguchi, T. Oshima, H. Kondo, I. Hirono, T. Aoki, H. Kiyono, and Y. Yuki.** 2008. Innate immunomodulation with recombinant interferon- α engances resistance of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) to infectious hematopoietic necrosis virus. *Developmental and Comparative Immunology* **32**:1211-1220.
85. **Palti, Y.** 2011. Toll-like receptors in bony fish: from genomics to function. *Developmental and Comparative Immunology* **35**:1263-1272.
86. **Pembroke, T., I. Rees, K. Gallagher, E. Jones, P. Mizen, T. Navruzov, A. Freedman, C. Fielding, I. R. Humphreys, E. C. Y. Wang, A. M. Gallimore, and A. Godkin.** 2012. Rapid early innate control of hepatitis C virus during IFN- α treatment compromises adaptive CD4+ T-cell immunity. *European Journal of Immunology* **42**:2383-2394.

87. **Pestka, S., C. D. Krause, and M. R. Walter.** 2004. Interferons, interferon-like cytokines, and their receptors. *Immunological Reviews* **202**:8-32.
88. **Phaffl, M. W.** 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acid Research* **29**:2002-2007.
89. **Plant, K. P., and S. E. LaPatra.** 2011. Advances in fish vaccine delivery. *Developmental and Comparative Immunology* **35**:1256–1262.
90. **Poovassery, J. S., and G. A. Bishop.** 2012. Type I IFN receptor and the B cell antigen receptor regulate TLR7 responses via distinct molecular mechanisms. *Journal of Immunology* **189**:1757-1764.
91. **Proietti, E., L. Bracci, S. Puzelli, T. Di Pucchio, P. Sestili, E. De Vincenzi, I. Venditti, I. Capone, I. Seif, E. De Mayer, D. Tough, I. Donatelli, and F. Belardelli.** 2002. Type I IFN as a natural adjuvant for a protective immune response: Lessons from the influenza vaccine model. *Journal of Immunology* **169**:375-383.
92. **Purcell, M. K., K. M. Nichols, J. R. Winton, G. Kurath, G. H. Thorgaard, P. Wheeler, J. D. Hansen, R. P. Herwig, and L. K. Park.** 2006. Comprehensive gene expression profiling following DNA vaccination of rainbow trout against infectious hematopoietic necrosis virus. *Molecular Immunology* **43**:2089-2106.
93. **Purcell, M. K., K. D. Smith, A. Adrem, L. Hood, J. R. Winton, and J. C. Roach.** 2006. Conservation of Toll-like receptor signaling pathways in teleost fish. *Comparative Biochemistry and Physiology Part D: Genomics and Proteomics* **1**:77-88.
94. **Ramos-Vara, J. A.** 2005. Technical Aspects of Immunohistochemistry. *Veterinart Pathology* **42**:405–426.
95. **Rebl, A., T. Goldammer, and H.-M. Seyfert.** 2010. Toll-like receptor signaling in bony fish. *Veterinary Immunology and Immunopathology* **134**:139-150.
96. **Ritchie K. J., and Z. D-E.** 2004. ISG15: the immunological kin of ubiquitin. *Seminars in Cell & Developmental Biology* **15**:237-246.
97. **Roberts, R. J., and M. D. Pearson.** 2005. Infectious pancreatic necrosis in Atlantic salmon, *Salmo salar* L. *Journal of Fish Diseases* **28**:383-390.
98. **Robertsen, B.** 2011. Can we get the upper hand on viral diseases in aquaculture of Atlantic salmon? *Aquaculture Research* **42**:125-131.
99. **Robertsen, B.** 2008. Expression of interferon and interferon-induced genes in salmonids in response to virus infection, interferon-inducing compounds and vaccination. *Fish & Shellfish Immunology* **25**:351-357.
100. **Robertsen, B.** 2006. The interferon system of teleost fish. *Fish & Shellfish Immunology* **20**:172-191.
101. **Robertsen, B., V. Bergan, T. Røkenes, R. Larsen, and A. Alberquerque.** 2003. Atlantic salmon interferon genes: Cloning, sequence analysis, expression, and biological activity. *Journal of Interferon & Cytokine Research* **23**:601-612.
102. **Rodriguez, M. F., G. D. Wiens, M. K. Purcell, and Y. Palti.** 2005. Characterization of Toll-like receptor 3 gene in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Immunogenetics* **57**:510-519.
103. **Røkenes, T. P., R. Larsen, and B. Robertsen.** 2007. Atlantic salmon ISG15: Expression and conjugation to cellular proteins in response to interferon, double-stranded RNA and virus infections. *Molecular Immunology* **44**:950-959.
104. **SalmoBreed.** 2011. Årgang 7, nr. 3. SalmoBreed AS har identifisert genetisk markør for sykdommen pancrease disease (PD) Tilgjengelig fra: http://www.salmobreed.no/newsletters/no/2011_3_nyhetsbrev_SalmoBreed.pdf (Nedlastet 15.03.2013).
105. **Salonius, K., N. Simard, R. Harland, and J. B. Ulmer.** 2007. The road to licensure of a DNA vaccine. *Current Opinion in Investigational Drugs* **8**:635-641.

106. **Samsa, M. M., J. A. Mondotte, N. G. Iglesias, I. Assunção-Miranda, G. Barbosa-Lima, A. T. Da Poian, P. T. Bozza, and A. V. Garmarnik.** 2009. Dengue virus capsid protein usurps lipid droplets for viral particle formation *Plos Pathogens* **5**:1-14.
107. **Samuel, C. E.** 2001. Antiviral actions of interferons. *Clinical Microbiology Reviewa* **14**:778-809.
108. **Schütze, H., E. Mundt, and T. C. Mettenleiter.** 1999. Complete genomic sequence of viral hemorrhagic septicemia virus, a fish rhabdovirus. *Virus Genes* **19**:59-66.
109. **Sen, G. C., and S. N. Sarkar.** 2007. The interferon-stimulated genes: targets of direct signaling by interferons, double-stranded RNA, and viruses. *Current Topics in Microbiology and Immunology* **316**:233-250.
110. **Seo, J.-Y., R. Yaneva, and P. Cresswell.** 2011. Viperin: a multifunctional, interferon-inducible protein that regulates virus replication. *Cell & Host Microbe* **10**:534-539.
111. **Seo, J.-Y., R. Yaneva, E. R. Hinson, and P. Cresswell.** 2011. Human cytomegalovirus directly induces the antiviral protein viperin to enhance infectivity. *Science* **332**:1193-1097.
112. **Seth, R. B., L. Sun, and J. Chen.** 2006. Antiviral innate immunity pathways. *Cell Research* **16**:141-147.
113. **Shoggins, J. W., and C. M. Rice.** 2011. Interferon-stimulated genes and their antiviral effector functions. *Current Opinion in Virology* **1**:519-525.
114. **Sirén, J., T. Imaizumi, D. Sarkar, T. Pietilä, D. L. Noah, R. Lin, J. Hiscott, R. M. Krug, P. B. Fisher, I. Julkunen, and S. Matikainen.** 2006. Retinoic acid inducible gene-I and mda-5 are involved in influenza A virus-induced expression of antiviral cytokines. *Microbes and Infection* **8**:2013-2020.
115. **Skjesol, A., T. Hansen, C.-Y. Shi, H. L. Thim, and J. B. Jørgensen.** 2010. Structural and functional studies of STAT1 from Atlantic salmon (*Salmo salar*). *BMC Immunology* **11**:17.
116. **Sommereyns, C., S. Paul, P. Staeheli, and T. Michiels.** 2008. IFN-lambda (IFN λ) is expressed in a tissue-dependent fashion and primarily act on epithelial cells in vivo. *Plos Pathogens* **4**:1-11.
117. **Sommerset, I., B. Krossøy, E. Biering, and P. Frost.** 2005. Vaccines for fish in aquaculture. *Expert Review of Vaccines* **4**:89-101.
118. **Staeheli, P., and O. Haller.** 1985. Interferon-induced human protein with homology to protein Mx of influenza virus-resistant mice. *Molecular and Cellular Biology* **5**:2150-2153.
119. **Sun, B., B. Robertsen, Z. Wang, and B. Liu.** 2009. Identification of an Atlantic salmon IFN multigene cluster encoding three IFN subtypes with very different expression properties. *Developmental and Comparative Immunology* **33**:547-558.
120. **Sun, B., I. Skjæveland, T. Svingerud, J. Zou, J. B. Jørgensen, and B. Robertsen.** 2011. Antiviral activity of salmonid gamma interferon against infectious pancreatic necrosis virus and salmonid alphavirus and its dependency on type I interferon. *Journal of Virology* **85**:9188-9198.
121. **Svingerud, T., S. Solstad, B. Sun, M. L. J. Nyrud, Ø. Kileng, L. Greiner-Tollersrud, and B. Robertsen.** 2012. Atlantic salmon type I IFN subtypes show differences in antiviral activity and cell-dependent expression: evidence for high IFN β /IFN γ -producing cells in fish lymphoid tissues. *Journal of Immunology* **189**:5912-5923.
122. **Tafalla, C., J. Bøgwald, and R. A. Dalmo.** 2013. Adjuvants and immunostimulants in fish vaccines: Current knowledge and future perspectives. *Fish & Shellfish Immunology*:1-11.
123. **Takeuchi, O., and S. Akira.** 2008. MDA5/RIG-I and virus recognition. *Current Opinion in Immunology* **20**:17-22.
124. **Takeuchi, O., and S. Akira.** 2007. Recognition of viruses by innate immunity. *Immunological Reviews* **220**:214-224.
125. **Toennesen, R., A. Lauscher, and E. Rimstad.** 2009. Comparative aspects of infectious salmon anemia virus, an orthomyxovirus of fish, to influenza viruses. *Indian Journal of Microbiology* **49**:308-314.

126. **Tonheim, T. C., J. Bøgwald, and R. A. Dalmo.** 2008. What happens to the DNA vaccine in fish? A review of current knowledge. *Fish & Shellfish Immunology* **25**:1-18.
127. **Tonheim, T. C., J. Leirvik, M. Løvoll, A. I. Myhr, J. Bøgwald, and R. A. Dalmo.** 2007. Detection of supercoiled plasmid DNA and luciferase expression in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) 535 days after injection. *Fish & Shellfish Immunology* **23**:867-876.
128. **Toporovski, R., M. P. Morrow, and D. B. Weiner.** 2010. Interferons as potential adjuvants in prophylactic vaccines. *Expert Opinion on Biological Therapy* **10**:1489-1500.
129. **van Duin, D., R. Medzhitov, and A. C. Shaw.** 2006. Triggering TLR signaling in vaccination. *Trends in Immunology* **27**:49-55.
130. **Verrier, E. R., C. Langevin, A. Benmansour, and P. Boudinot.** 2011. Early antiviral response and virus-induced genes in fish. *Developmental and Comparative Immunology* **35**:1204-1214.
131. **Wang, L., L. Wang, H.-X. Zhang, J.-H. Zhang, W.-H. Chen, X.-F. Ruan, and C. Xia.** 2006. In vitro effects of recombinant zebrafish IFN on spring viremia of carp virus and infectious hematopoietic necrosis virus. *Journal of Interferon & Cytokine Research* **26**:256-259.
132. **Wang, X., E. R. Hinson, and P. Cresswell.** 2007. The interferon-inducible protein viperin inhibits influenza virus release by perturbing lipid rafts. *Cell & Host Microbe* **2**:96-105.
133. **Workenhe, S. T., T. S. Hori, M. L. Rise, M. J. Kibenge, and F. S. Kibenge.** 2009. Infectious salmon anaemia 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* **46**:2955-2974.
134. **Workenhe, S. T., M. L. Rise, M. J. Kibenge, and F. S. Kibenge.** 2010. The fight between the teleost fish immune response and aquatic viruses. *Molecular Immunology* **47**:2525-2536.
135. **Xu, C., T.-C. Guo, S. Mutoloki, Ø. Haugland, I. S. Marjara, and Ø. Evensen.** 2010. Alpha interferon and not gamma interferon inhibits salmonid alphavirus subtype 3 replication *in vitro*. *Journal of Virology* **84**:8903-8912.
136. **Yamamoto, M., S. Sato, H. Hemmi, K. Hoshino, T. Kaisho, H. Sanjo, O. Takeuchi, M. Sugiyama, M. Okabe, K. Takeda, and S. Akira.** 2003. Role of adaptor TRIF in the MyD88-independent toll-like receptor signaling pathway. *Science* **301**:640-643.
137. **Yin, Z., and J. Kwang.** 2000. Carp interleukin-1 beta in the role of an immuno-adjuvant. *Fish & Shellfish Immunology* **10**:375-378.
138. **Yu, F.-F., Y.-B. Zhang, T.-K. Liu, Y. Liu, F. Sun, J. Jiang, and J.-F. Gui.** 2010. Fish virus-induced interferon exerts antiviral function through Stat1 pathway. *Molecular Immunology* **47**:2330-2341.
139. **Zhang, Y.-B., and J.-F. Gui.** 2012. Molecular regulation of interferon antiviral response in fish. *Developmental and Comparative Immunology* **38**:193-202.
140. **Zhang, Z., and F.-S. Wang.** 2005. Plasmacytoid dendritic cells act as the most competent cell type in linking antiviral innate and adaptive immune responses. *Cellular & Molecular Immunology* **2**:411-417.
141. **Zhou, X., J. J. Michal, L. Zhang, B. Ding, J. K. Lunney, B. Liu, and Z. Jiang.** 2013. Interferon induced IFIT family genes in host antiviral defense. *International Journal of Biological Sciences* **9**:200-208.
142. **Zhu, L.-Y., L. Nie, G. Zhu, L. X. Xiang, and J.-Z. Shao.** 2013. Advances in research of fish immune-relevant genes: a comparative overview of innate and adaptive immunity in teleosts. *Developmental and Comparative Immunology* **39**:39-62.
143. **Zou, J., and C. J. Secombes.** 2011. Teleost fish interferons and their role in immunity. *Developmental and Comparative Immunology* **35**:1376-1387.

Referanser

144. **Zou, J., C. Tafalla, J. Truckle, and S. C. J.** 2007. Identification of a second group of type I IFNs in fish sheds light on IFN evolution in vertebrates. *Journal of Immunology* **179**:3859-3871.

Appendiks I

Reagenser

Reagenser	Produsent
Agarose	Sigma-Aldrich
Albumin, fra kalveserum	Sigma-Aldrich
Aminoetylcarbazon (Target Retrieval Solution)	Dako
BCA Protein Reagent Assay	Pierce Ltd
Benzoak (vet. 200 mg benzokain/ml, 20 %)	A.C.D SA, Belgia
Etanol, Absolutt (99,8%)	Sigma-Aldrich
Ethidium Bromid	Sigma-Aldrich
Eukitt	Fluka analytical
Fast SYBR®Green Master Mix	Applied Biosystems
Fetal bovine serum, FBS	Zenbio
Goat Anti Rabbit IgG-HRP	St Cruz Biotechnology
Haematoxylin	Sigma-Aldrich
Heparin	LEO Pharma AS
Histoclear	National Diagnostics
Hydrogenperoxid	Sigma-Aldrich
Loading dye	Invitrogen
L-15-medium	Life Technologies Gibco®
MagicMark™ XP	Invitrogen
Metanol 99,8 %	Sigma-Aldrich
NuPAGE MOPS SDS Running Buffer	Invitrogen
NuPAGE Transfer Buffer	Invitrogen
Parafin	Sigma-Aldrich
Para-formaldehyd	Sigma-Aldrich
PBS Phosphate-Buffered Saline	NFH
Percoll	GE Healthcare
Pico Chemiluminescent Substrate SuperSignal® West	Thermo Scientific

Reagenser**Produsent**

Primere	Sigma-Aldrich
Protease Inhibitor cocktail	Sigma-Aldrich
Proteinase K	New England Biolabs
Rabbit anti Aktin	Sigma-Aldrich
Rabbit anti Mx	Dr. Hilde Hansen, UiT
Reverse Transcription Kit	Qiagen
RNAlater® Solution	Ambion
RNaseZAP™	Sigma-Aldrich
RNeasy ®Mini Kit	Qiagen
SimplyBlue™ SafeStain	Invitrogen
Target Retrieval Solution Citrate pH 6 (x10)	Dako
TBS, Tris-Buffered Saline	NFH
Tissue Extraction Reagent	Invitrogen
Tris base, Acetic acid, EDTA (TAE) buffer, 10 x	NFH
Tris EDTA-buffer (TE)	Qiagen
Trizol	Invitrogen
Tween® 20	Sigma-Aldrich
Tørrmelk (fettfri)	Normilk
Ultra Pure Water	Biochrom AG
Xylen	Sigma-Aldrich
1 kb Plus DNA Ladder	Invitrogen
2-Mercaptoetanol	Sigma-Aldrich

Appendiks II

Løsninger til kvantitativ RT-PCR

Genomisk DNA-eliminering

gDNA Wipeout Buffer, 7x	2 µl x antall prøver
RNasefritt vann	10 µl x antall prøver
Templat RNA	2 µl x antall prøver

Totalt reaksjonsvolum	14 µl
-----------------------	-------

Reverse-transcription master mix

Quantiscript Reverse Transcriptase	1 µl x antall prøver
Quantiscript RT Buffer,	5x4 µl x antall prøver
RT Primer Mix	1 µl x antall prøver
Templat RNA	14 µl

Totalt reaksjonsvolum	20 µl
-----------------------	-------

1 % Agarose-gel

Agarosepulver	1 g
TAE 10x buffer	100 ml
Ethidium Bromid	2 µl

Master mix for kvantitativ RT-PCR

SYBR green	7,5 µl x antall prøver
Primer FW	0,7 µl x antall prøver
Primer RW	0,7 µl x antall prøver
cDNA templat	6 µl x antall prøver

Totalt reaksjonsvolum	15 µl
-----------------------	-------

Appendiks III

Løsninger til Western Blotting

Tris-Buffered Saline Tween, TBST

Tris-Buffered Saline, TBS 10x	100	ml
dH ₂ O	900	ml
Tween 20	1	ml

NuPAGE® SDS running buffer (MOPS)

NuPAGE® SDS running buffer (MOPS)	100	ml
dH ₂ O	899	ml
NuPAGE® Antioxiadant	1	ml

Blottebuffer

NuPAGE® Transfer Buffer (20 x)	50	ml
Metanol	200	ml
NuPAGE® Antioxiadant	1	ml
dH ₂ O	849	ml

Blokkebuffer

Tørrmelk (fettfri)	2,5	g
Tris-Buffered Saline Tween, TBST	50	ml

NuPAGE® Bis-Tris Mini Gel Master mix

Proteinprøve	x	µl
NuPAGE® LDS Sample Buffer (4x)	5,0	µl
NuPAGE® Reducing Agent (10x)	2,0	µl
dH ₂ O	inntil 20µl	

Appendiks IV

Effekt av IFN-plasmid alene eller i kombinasjon med HE på genekspressjonen hos laks

Forsøksdyr

Forsøket ble utført ved Havbruksstasjonen i Tromsøs landanlegg, avdeling C i perioden 10.06.12-12.08.12. Det ble benyttet atlantisk laks presmolt av stammen "standard Atlantic QTL-innOva™ IPN" fra Aquagen og gjennomsnittsvekt ved forsøksstart var 32 gram. Fisken ble holdt i 10 °C ferskvann ved kontinuerlig lys og fôret med Skretting Nutra Parr 2,0 og Skretting Nutra Olympic. Fôrfaktor ble beregnet til 1,0 av personell ved Havbruksstasjonen.

Ekspresjonsplasmid for IFN

Ekspresjonsplasmid for IFNa1, IFNb, IFNc alene eller i kombinasjon med HE er beskrevet av Svingerud og medarbeidere (121) og består av åpen leseramme for IFNc innsatt bak CMV promoteren i plasmidene pcDNA3.3 og pEGFP (Invitrogen). pcDNA3.3 og pEGFP uten innsatt IFN-gen ble benyttet som kontrollplasmid. Oppformering av plasmidene ble foretatt av stipendiat Chia Jung Chang.

Forsøksoppsett og prøveuttak

Tabell 6 gir en oversikt over antall og behandlinger av fisk, hvilke analyser som ble gjort, samt tidspunkter for uttak av prøver. Presmolt ble ved forsøksstart bedøvd i 2 ml Benzoak i 10 L vann og injisert i.m. med kontrollplasmid eller plasmid med innsatt IFN-gen som beskrevet i tabell 6.

Tabell 7. Forsøksoppsett

GR.	VAKSINE (I.M.)	MENGDE	PRØVER TIL KVANTITATIV RT-PCR
1	Kontrollplasmider (pDNA3.3 og pEGFP)	30 µg/100 µl PBS	
2	IFNa1	30 µg/100 µl PBS	
3	IFNa1 + HE	30 µg/100 µl PBS	vevsprøver fra fornyre og muskel ble tatt ut fra seks fisk ved uke 1, 2, 7 og 9.
4	IFNb	30 µg/100 µl PBS	
5	IFNb + HE	30 µg/100 µl PBS	
6	IFNc	30 µg/100 µl PBS	
7	IFNc + HE	30 µg/100 µl PBS	
8	HE	30 µg/100 µl PBS	

Fisk ble sultet i ett døgn før prøveuttak. All fisk ble avlivet med en overdose Benzoak, samt et slag mot hodet før blod ble tappet fra *Vena caudalis*. Det ble tatt ut vevsprøver fra fem fisk til kvantitativ RT-PCR ved uke 1, 2, 7 og 9. Det ble tatt ut prøver av injeksjonssted i muskel og hodenyre ved samtlige uttak. Alle vevsprøver ble oppbevart på RNA-later (Ambion) ved 4 °C over natt og videre ved -20 °C inntil RNA-isolering.

Analyser

RNA ble ekstrahert og cDNA syntetisert som beskrevet i henholdsvis kapittel 2.3.2 og 2.3.4. Kvantitativ RT-PCR, gjennomført som beskrevet i kapittel 2.3.5, ble benyttet til å bestemme relativ økning i transkripter av IFN α 1, IFN β og IFN γ i muskel, samt antivirale gener (Mx, viperin, ISG15) i fornyre.