

# Transkripsjonsfaktorer som markør for modning av B-celler i Atlantisk laks (*Salmo salar* L.)

*Effekt av TLR-ligander på uttrykk av Pax5 in vitro og in vivo*

**Håvard Ingulfsvann Hagen**

*Masteroppgave i Fiskehelse (60 stp)*

*Desember 2014*



## Forord

---

*Denne oppgaven ble utført ved fakultetet for biologi, fiskeri og økonomi ved Norges Fiskerihøgskole, Universitetet i Tromsø. Arbeidet ble påbegynt januar 2014 og avsluttet desember 2014.*

Jeg vil først og fremst rette en stor takk til min hovedveileder Ingvill Jensen for strålende faglig veiledning fra start til slutt. På tross av alle utfordringene som oppstod i løpet av arbeidet med oppgaven klarte du alltid å holde orden i kaoset når jeg selv ikke klarte det. Jeg er for øvrig også veldig glad for at du krevde så mye av meg som du gjorde, noe som gjorde at jeg har lært enormt mye på veldig kort tid. Jeg vil også takke min andre hovedveileder Jorunn B. Jørgensen uvurderlig hjelp. Dessuten vil jeg takke Hanna L. Thim, min fantastisk dyktige og tålmodige bi-veileder for alle timen hun har ofret for meg, og alle spørsmålene hun har besvart. Dette gjelder også for Guro Strandskog og Mehrdad Sobhkhez. Tusen takk for hjelpen alle sammen.

Til alle mine medsamensvorne på fiskehelsekontoret, for all hjelp og mentalt påfyll i løpet av alle disse hærlege årene på NFH; Takk. Jeg vil også takke mine venner, mine to brødre, mamma, pappa og min utvidede familie for all hjelp og støtte. Og til min kjære Karen, som jeg er så uendelig glad i, takk for at du er den du er.

Tromsø 7. Desember 2014

Håvard Ingulfsvann Hagen







## Sammendrag

Virussykdommer er en av de største utfordringene innenfor oppdrett av Atlantisk laks (*Salmo salar* L.) og regnbueørret (*Oncorhynchus mykiss* L.) i Norge i dag, og forårsaker store økonomiske og fiskevelferdsmessige problemer. De senere år har spesielt subtypene SAV3 og SAV2 av virussykdommen PD spredt seg til stadig ny deler av landet, hvor den forårsaker dødelighet både på settefiskanlegg og matfiskanlegg. Det er utviklet gode vaksiner mot de bakterielle sykdommen, men fremdeles er ikke gode vaksiner mot virussykdommene utviklet.

Laks innehar i likhet med andre vertebrater et medfødt uspesifikt forsvar mot patogener som virus i tillegg til et spesifikt adaptivt immunforsvar som består av det cellulære og humorale gren. Hos teleoster består det humorale immunforsvaret av B lymfocytter som etter eksponering for antigen differensieres til plasmaceller og initierer utskillelse av IgM (antistoff) og fullstendig karakterisert hos mennesker. Imidlertid er de humorale adaptive immunresponsene hos teleoster generelt, laks og laks spesielt, utilstrekkelig karakterisert hos laks. En viktig årsak til dette er at få markører forbundet med modning og differensiering av B-celler er påvist hos laks, og at de i varierende grad lar seg påvise. Funksjon til transkripsjonsfaktorene Pax5, Xbp1 og Blimp-1 er imidlertid alle påvist og beskrevet i vertebrater. Det er også kjent fra regnbueørret at Pax5 uttrykkes i utviklende B-celle linjer men ikke i plasmaceller, men dette er ikke beskrevet hos laks .

I denne oppgaven ble derfor antistoffer mot de nevnte transkripsjonsfaktorene benyttet ved Western blot, noe som førte til deteksjonen av et protein forenelig med Pax5 full-lengde i leukocytter fra laks. B-celler og plasmaceller fra lakseleukocytter ble derfor forsøkt adskilt ved hjelp av ulike perkoll-gradienter, og undersøkt med henhold på morfologi og Pax5 uttrykk. Leukocyttopulasjoner ble dessuten stimulert *in vitro* med CpG ODN, og endringer av mIgM ble detektert ved RT-qPCR. Sekretorisk IgM og Pax5 ble detektert ved Western blot som indikator på at CpG har klart å initiert differensiering av B-celler. Pax5 ble også benyttet som markør på differensiering av B-celler etter *in vivo* immunisering av laks med SAV Ag, CpG og Poly I:C (C/P) og en kombinasjon av disse. Pax5 uttrykket alene var ikke tilstrekkelig for å kunne avgjøre om en adaptiv immunrespons var initiert, men økning av sekretorisk IgM indikerte en antigenrespons som følge av CpG stimulering, og at CpG dermed har en potensiell betydning som komponent i fremtidige vaksiner mot virussykdommer hos laks.



# Innholdsfortegnelse

<b>1</b>	<b>Innledning</b>	1
1.1	<b>Bakgrunn</b>	1
1.1.1	<i>Pankreassykdom hos laks</i>	2
1.2	<b>Immunsystemet til beinfisk</b>	3
1.2.1	<i>Det medfødte immunsystem</i>	3
1.2.2	<i>Humorale komponenter og effektormekanismer</i>	4
1.2.3	<i>Interferoner</i>	5
1.3	<b>Det adaptive immunsystemet</b>	6
1.3.1	<i>Lymfoide organer hos teleoster</i>	6
1.3.2	<i>Cellulære komponenter i det adaptive immunforsvaret</i>	6
1.3.3	<i>B-celler og immunoglobuliner</i>	8
1.3.4	<i>Immunoglobulin M (IgM) hos laks</i>	10
1.3.5	<i>Funksjonen til IgM hos teleoster</i>	10
1.4	<b>Morfologi til blodceller hos teleoster (laks)</b>	11
1.5	<b>Transkripsjonsfaktorer involvert i differensiering av B-celler</b>	12
1.5.1	<i>Pax5</i>	13
1.5.2	<i>Blimp-1</i>	14
1.5.3	<i>Xbpl</i>	16
1.6	<b>Vaksinering av laks</b>	16
1.7	<b>Problemstilling</b>	18
<b>2</b>	<b>Materiale og metode</b>	19
2.1	<b>Forsøkfisk og organuttak</b>	19
2.1.1	<i>Forsøksfisk</i>	19
2.1.2	<i>Organuttak</i>	19
2.1.3	<i>Isolering av leukocytter</i>	19
2.1.4	<i>Isolering av leukocytter fra multiple gradienter</i>	21
2.2	<b>Stimulering av leukocytter fra hodenyre og milt med CpG ODN</b>	22
2.3	<b>Høsting av leukocytter fra fornyre og milt til Western blot</b>	23
2.3.1	<i>Ikke-adherente celler</i>	23
2.3.2	<i>Adherente celler</i>	23
2.3.3	<i>Sonikering av prøver</i>	23
2.3.4	<i>Oppkonsentrering av supernatanter</i>	24
2.4	<b>RealTime Polymerase Chain reaction (qPCR)</b>	24



2.4.1	<i>Sampling av leukocytter (RNA) fra fornyre og milt til PCR</i> .....	24
2.4.2	<i>RNA Isolering</i> .....	25
2.4.3	<i>cDNA syntese:</i> .....	26
2.4.4	<i>Kvantitativ Real Time Polymerase Chain Reaction (qPCR)</i> .....	27
<b>2.5</b>	<b>Western blotting</b> .....	29
2.5.1	<i>SDS polyacrylamid-gel elektroforese (SDS-PAGE)</i> .....	30
2.5.2	<i>Blotting</i> .....	31
2.5.3	<i>Blokkering og inkubering med primært og sekundært antistoff</i> .....	32
2.5.4	<i>Inkubering med antistoff</i> .....	32
2.5.5	<i>Fremkalling</i> .....	34
2.5.6	<i>Reinkubering og stripping</i> .....	34
<b>2.6</b>	<b>Selektering av IgM<sup>+</sup> leukocyttraksjoner</b> .....	35
<b>2.7</b>	<b>Anrikning av IgM med protein A og G</b> .....	35
<b>2.8</b>	<b>Tillaging av cytopinnpreparater og farging av celler med May Günwald/Giemsas</b> .....	36
<b>2.9</b>	<b>In vivo immuniseringsforsøk</b> .....	37
2.9.1	<i>Forsøksfisk og forsøksgrupper</i> .....	37
2.9.2	<i>Vaksinering og uttak</i> .....	38
<b>3</b>	<b>Resultater</b> .....	39
<b>3.1</b>	<b>Uttesting av antistoffer mot kjente markører involvert i modning av B- celler ved Western Blot</b> .....	39
3.1.1	<i>Uttesting av tre polyklonale antistofflagd mot ulike områder av Pax5 til regnbueørret</i> .....	39
3.1.2	<i>Antistoff mot IgM</i> .....	42
3.1.3	<i>Antistoffer mot blimp-1: Blimp-1/PRDI-BF1 (C14A4) og (H-150): sc-25380</i> ..	43
3.1.4	<i>Antistoff mot Xbp1 tXbp1-S</i> .....	43
<b>3.2</b>	<b>Optimalisering av metode for isolering av B-celler</b> .....	44
3.2.1	<i>Uttrykk av Pax5 og morfologi hos leukocytter isolert med perkoll-gradienter av ulik tetthet</i> .....	44
3.2.2	<i>Isolering av leukocytter med 42% og 54% perkoll-gradienter</i> .....	47
3.2.3	<i>Uttrykk av Pax5 i leukocytter selektert for uttrykk av membranbundet IgM</i> ..	50
<b>3.3</b>	<b>In vitro stimulering av leukocytter fra milt og hodenyre med CpG initierer adaptiv immunrespons</b> .....	53
3.3.1	<i>Real time PCR ga kraftig økning i Mx transkripter fra prøver høstet 24 timer etter stimulering, og en liten økning i mIgM fra prøver høstet 48 timer etter stimulering</i> .....	53
3.3.2	<i>Pax5 uttrykk hos i in vitro stimulerte leukocytter fra milt til laks</i> .....	54



3.3.3	<i>Western blot med antistoffet tPax5-E10 fra CpG stimulerte milt- og hodenyreprøver viste liten endring mellom stimulerte og kontrollprøver</i> .....	55
3.3.4	<i>CpG stimulering av lakseleukocytter fra fornyre og milt fører til økt utskillelse av sekretorisk IgM</i> .....	56
3.4	<b>Uttrykk av Pax5 etter immunisering av laks in vivo</b> .....	58
4	<b>Diskusjon</b> .....	61
4.1	<b>To antistoff mot Pax5 uttrykker trolig full-lengde Pax5 i laks.</b> .....	61
4.1.1	<i>Andre Pax5-isoformer?</i> .....	62
4.1.2	<i>Hvilken funksjon har Blimp-1 og Xbp1 i immunresponser hos laks?</i> .....	63
4.1.3	<i>IgM er en kjent humoral komponent i immunforsvaret til laks</i> .....	64
4.2	<b>Hvilke celler uttrykker Pax5?</b> .....	64
4.2.1	<i>Uttrykk av Pax5 i leukocytffraksjoner isolert ved bruk av ulike tetthetsgradienter</i> .....	65
4.3	<b>Er det mulig å skille B-celler og plasmaceller ved å benytte ulike perkollgradienter?</b> .....	66
4.3.1	<i>Hodenyre</i> .....	67
4.3.2	<i>Milt</i> .....	67
4.3.3	<i>Blod</i> .....	69
4.3.4	<i>Cytospinnpreparater som verktøy for observasjon av leukocyttemorfologi?</i> ....	70
4.4	<b>Uttrykk av Pax5 i IgM<sup>+</sup> og IgM<sup>-</sup> leukocytter</b> .....	71
4.5	<b><i>In vitro</i> stimulering av leukocytter med CpG ODNs evne til å initiere adaptive immunresponser.</b> .....	72
4.5.1	<i>Milt</i> .....	73
4.5.2	<i>Hodenyre</i> .....	73
4.5.3	<i>Begrensinger ved forsøket</i> .....	75
4.6	<b>Pax5 som markør for initiering av en adaptiv immunrespons etter vaksinerings med SAV Ag alene og kombinert med TLR ligander som adjuvant.</b> 76	
5	<b>Konklusjoner</b> .....	79
6	<b>Referanser</b> .....	81
Appendix I	.....	89
Ulike reagenser benyttet til Western blott	.....	89
Appendix II	.....	90
Western Blot av CpG stimulerte og ustimulerte leukocytter fra milt.	.....	90

# 1 Innledning

## 1.1 Bakgrunn

Overfiske og kollaps av en rekke kommersielt beskattede fiskebestander har gjort bidraget fra akvakultur til verdens matproduksjon viktigere. Fisk er en ypperlig kilde til blant annet essensielle aminosyrer og vitamin D, som er helt nødvendige for å vedlikeholde normal metabolisme hos mennesker (Widmaier, Raff & Strang, 2011). Fortrinnet med oppdrett av for eksempel laks er at relativt små mengder vegetabilske råvarer tings for å produsere animalske proteiner (inneholdende essensielle aminosyrer) som er helt nødvendig for å kunne fø en befolkning i stadig vekst (FAO., 2012). I 2013 ble det produsert 1 143 700 tonn Atlantisk laks (*Salmo salar*) i norske akvakulturanlegg (Hjeltnes, 2014).

I akvakulturnæringen eksisterer det imidlertid en rekke utfordringer knyttet til fiskehelse og fiskevelferd, deriblant infeksjose sykdommer. Den akkumulerte dødeligheten hos laks etter utsett i hav har over flere år vært på rundt 15-20%, hvor mye av dette har skyldtes infeksjonssykdommer (Hjeltnes, 2014). Gode vaksiner har redusert antall utbrudd av bakteriesykdommer i norsk lakseoppdrett drastisk, og har ført til bedre fiskehelse, betydelig mindre medikamentbruk og større lønnsomhet (Poppe, Bergh, Espelid & Nygaard, 2002). Det eksisterer derimot ikke tilstrekkelig gode vaksiner for virussykdommene, og disse er et vedvarende problem innenfor norsk akvakultur (Hjeltnes, 2014).

Den eneste virussykdommen det vaksineres mot innenfor norsk lakseoppdrett er Infeksiøs Pankreas Nekrose Virus (IPN) (Hjeltnes, 2014; Robertsen., 2011). Problemet har vært at vaksinene utviklet mot virussykdommer ikke har klart å aktivere det adaptive immunforsvaret hos laks i tilstrekkelig grad (Robertsen, 2011). Alternative tiltak for å bryte den horisontale spredningen av virussykdommer som Infeksiøs Lakse Anemi (ILA) og Pankreassykdom (PD) har gitt positive resultater i bekjempelsen av disse sykdommene. Dette er imidlertid ikke tilstrekkelig, og behovet for gode vaksiner mot de viktigste virussykdommene er nødvendig, og vil trolig kunne gi samme positive effekter som bakterievaksinene ga da disse ble tatt i bruk i akvakulturnæringen.



### 1.1.1 Pankreassykdom hos laks

Pankreassykdom (Pancreas Disease – PD) er en sykdom som har gitt store økonomiske tap og er et velferdsproblem for norsk lakseoppdrett (Hjeltnes, 2014). Sykdommen forårsakes av Salmonid Alfavirus (SAV) fra virusfamilien *Togaviridae*, og er en listeført sykdom på liste 3 (Hjeltnes, 2014). Seks genotyper er påvist, hvorav to SAV2 og SAV3 forårsaker sykdom på laks i Norge (Hodneland *et al.*, 2005; Poppe, Bruno & Noguera, 2013). SAV3 er den smittsomme agenten indikativ for sykdommen pankreas disease (PD), og er hittil kun påvist i Norge. Sykdommen har kjerneområde i Hordaland, hvor den siden 2003 har vært å regne som endemisk. Det ble i 2007 opprettet sonегrense ved Hustadvika for å hindre spredning av viruset videre nord som foreløpig har fungert godt (Hjeltnes, 2014).

I 2010 ble SAV2, også referert til som sleeping disease virus (SDV), for første gang påvist i norsk laks hvor det de seneste årene har forårsaket dødelighet på laks og regnbueørret (Hjortaa *et al.*, 2013; Hjeltnes, 2014). Utbrudd i Norge har foreløpig begrenset seg til Møre og Romsdal og Sør-Trøndelag. En kontrollsoner for bekjempelse av SAV2 med Hustadvika i sør, og fylkesgrensen til Nord-Trøndelag i nord ble opprettet i 2012, og strekker seg lengre nord enn for SAV3 (Hjeltnes, 2014).

Sykdomsforløpet for genotypene SAV3 og SAV2 er veldig lik for laks i områder hvor kun én av disse genotypene eksisterer. Utbrudd av PD forårsaket av genotypen SAV2 gir imidlertid lavere dødelighet og mer moderate kliniske tegn sammenliknet med utbrudd forårsaket av SAV3 (Jansen *et al.*, 2014). Symptomene som har gitt SAV2 sitt navn ("sleeping disease") observeres kun på regnbueørret (Poppe *et al.*, 2013). Tidlige kliniske tegn inkluderer nedsatt appetitt, apati og sterk reduksjon i vekt. Diagnostiske kjennetegn for sykdommen er fullstendig nekrose i eksokrin pankreas ved akutt infeksjon (McVicar, 1987). Det er også normalt å observere epikarditt, myokarditt, og senere nekrose i både det kompakte og spongiøse myocardium. Ved kroniske infeksjoner er det også vanlig å observere degenerering av skjelettmuskulatur. Sykdomsforløpet kan variere kraftig hos fisk i ulike livsstadier. Laks, og hovedsakelig stor fisk, kan være bærere av virus uten å vise kliniske tegn på sykdom. Videre kan utbrudd variere veldig i intensitet. Dødeligheten ved utbrudd hos juvenile/parr er ofte veldig høy (50%), og celler som gjennomgår mitotisk celledeling er en diagnostisk markør for utbrudd på smolt. Den svært varierende graden av kliniske symptomer og

intensitet ved utbrudd på laks indikerer at flere faktorer avgjør hvor alvorlig et sykdomsutbrudd er. Her er miljø og samspill mellom patogen og fisk antatt å være viktige faktorer (Poppe *et al.*, 2013).

## **1.2 Immunsystemet til beinfisk**

For å kunne utvikle effektive vaksiner mot PD og andre virussykdommer hos laks, er det nødvendig med inngående kjennskap til laksens immunsystem. Immunsystemet hos alle vertebrater består av to grener, den medfødte og den adaptive greinen. Medfødt immunitet er et hurtigvirkende og uspesifikt forsvar mot patogene mikrober. Det adaptive forsvaret tar i motsetning til det medfødte immunforsvaret lengre tid å aktivere ved en primærreaksjon. Det har imidlertid "hukommelse", og vil ved gjentatt eksponering av det samme patogenet, gi en hurtig og spesifikk immunrespons (Abbas & Lichtman, 2011).

Organiseringen og funksjon av immunsystemet til kjevede vertebrater deler flere universelle likhetstrekk (Mutoloki, Jørgensen & Evensen, 2014; Poppe, Bergh, Espelid & Nygaard, 2002; Pancer *et al.*, 2004). Det er antatt at det adaptive immunsystemet utviklet seg fra den medfødte greinen for omtrent 450 millioner år siden (Mutoloki *et al.*, 2014). Det eksisterer likevel en rekke viktige forskjeller mellom fisk som ansees som den evolusjonært eldste gruppen med velutviklet immunsystem, og høyerestående vertebrater.

### *1.2.1 Det medfødte immunsystem*

Det medfødte immunforsvaret spiller en viktig rolle hos teleosters førstelinjeforsvar mot mikrober allerede ved tidlige livsstadier. Det har blant annet en avgjørende rolle i det antivirale forsvaret hos laks (Collet, 2014) og i aktiveringen av det adaptive immunsystemet (Uribe *et al.*, 2011). Det medfødte immunsystemet kan grovt deles inn i en sensorisk del, og en effektor del, som hver består av cellulære og humorale komponenter.

Myeloide celler er den viktigste cellulære komponenten, og består hovedsakelig av mononukleære og polymorfonukleære fagocytter. Mononukleære fagocytter er celler som gjenkjenner og tilintetgjør patogener (Jørgensen, 2014) og inkluderer makrofagene

som observeres i perifert vev hos laks (Amin, Mortensen & Poppe, 1991). Melanomakrofager inneholder partikler av melanin, og er en celletype hittil kun identifisert hos fisk (Koppang *et al.*, 2003). Nøytrofile granulocytter er den best beskrevne polymorfonukleære fagocytcelletypen hos fisk (Ellis, 2001). En annen gruppe innenfor myeloide celler er myeloide dendritiske celler (DC), som har en viktig funksjon i den adaptive immunresponsen (Jørgensen, 2014). Dette er "profesjonelle" antigenpresenterende celler med funksjon i både det medfødte og adaptive immunforsvaret, og celletypen er påvist både hos regnbueørret (Bassity & Clark, 2012) og laks (Rønneseth *et al.*, 2013). "Natural killer cells" (NK-celler) er celler som uten å gjenkjenne MHC strukturer dreper virusinfiserte celler (Ellis, 2001). NK-celler har også kjente funksjoner i både det medfødte- og adaptive immunforsvaret hos teleoster (Jørgensen, 2014).

### 1.2.2 Humorale komponenter og effektormekanismer

En viktig komponent i det medfødte immunsystemet er "pathogen recognition receptors" (PRR), som gjenkjenner såkalte "pathogen associated molecular patterns" (PAMPs). PAMPs er konserverte strukturer som finnes hos mikrober men ikke hos eukaryote celler (Uribe *et al.*, 2011; Jørgensen, 2014). En rekke PAMPs er velstuderte molekyler og inkluderer bakterielle peptidoglykaner, lipoproteiner, enkelt- og dobbeltrådig RNA, bakterielt flagellin, og CpG DNA (Jørgensen, 2014). De best beskrevne PRR hos laks er "Toll-like receptors" (TLRs), de intracellulære cytosoliske reseptorfamiliene av "NOD-like receptors" (Liang *et al.*, 2008) og "RIG-1-like receptors" (Chang *et al.*, 2011). I alt 17 ulike TLR-reseptorer fra ulike fiskearter er foreløpig beskrevet hos fisk (Palti, 2011).

CpG oligodeoxynukleotider (ODN) er syntetisk fremstilt umetylert CpG DNA som benyttes som en TLR9 agonist (Jørgensen *et al.*, 2003). Det er også vist at det i teleoster, deriblant laks, er TLR9 reseptoren som binder CpG ODN (Byadgi *et al.*, 2014; Iliev *et al.*, 2013). Stimulering av ulike fiskearter som Japansk flyndre (*Paralichthys olivaceus*) (Takano *et al.*, 2007; Takano *et al.*), Cobia (*Rachycentron canadum*) (Byadgi *et al.*, 2014), og laks (Jørgensen *et al.*, 2003) med CpG ODN induserer både antivirale og antibakterielle immunresponser. Videre øker nivået av type I interferoner (IFN) og Mx transkripter samt inflammatoriske cytokiner som Interleukin-1 (IL-1) i CpG stimulerede

lakseleukocytter (Jørgensen *et al.*, 2001a; Jørgensen *et al.*, 2003; Pedersen *et al.*, 2006). CpG ODN er også vist å være en god vaksine adjuvant hos mennesker (Zhu *et al.*, 2008; Kasturi *et al.*, 2011) og laks (Jørgensen *et al.*, 2003; Pedersen *et al.*, 2006; Strandskog *et al.*, 2007; Iliev *et al.*, 2010; Thim *et al.*, 2012; Thim, 2013). Tidligere forsøk har gitt resultater som indikerer at CpG induserer en tidlig uspesifikk beskyttelse mot virus hos laks (Jørgensen *et al.*, 2003).

### 1.2.3 Interferoner

IFNer er cytokiner som produseres som respons på virale infeksjoner (Ellis, 2001). Type I IFN er de best beskrevne interferonene hos laks, og 4 ulike subtyper er beskrevet. Disse inkluderer IFNa, IFNb, IFNc og IFNd, som uttrykkes i ulike celletyper og ved ulike stimuli (Svingerud *et al.*, 2012). Type I IFN reseptorer transkriberes hos laks fra genklynger på to ulike kromosomer, som også uttrykkes ulikt i forskjellig vev. Dette gir en større diversitet av interferonreseptorer (CRFB1, CRFB2 og CRFB3) hos laks enn andre kjente teleoster og pattedyr (Sun *et al.*, 2014). Binding av type I IFN til den spesifikke CRFB reseptoren på målcellen fører til signaltoverføring via Jak/STAT signalveien (Ellis., 2001; Robertsen, 2006; Sun *et al.*, 2014). Dette resulterer i at antivirale proteiner som 2',5'-oligoadenylat syntetase, protein kinase P1 og Mx uttrykkes, og disse hindrer syntetisering av virus RNA (Ellis., 2001). Gener som koder for Mx proteiner er klonet fra laks (Robertsen, 1997), og disse oppreguleres ved *in vitro* stimulering med ulike PAMPs (Pedersen *et al.*, 2006).



## 1.3 Det adaptive immunsystemet

### 1.3.1 Lymfoide organer hos teleoster

I motsetning til høyerestående vertebrater mangler teleoster både beinmarg og lymfesystem (Mutoloki *et al.*, 2014). Thymus, nyre og milt er de viktigste lymfoide organene hos teleoster (Zapata *et al.*, 2006). De primære lymfoide organene hos fisk er fornyre og thymus, hvor thymus har en sentral rolle i utvikling av T-celler hos teleoster (Koppang *et al.*, 2010; Zwollo *et al.*, 2005; Bowden *et al.*, 2005). Fornyren (hodenyren) er antatt å være homolog til pattedyrs beinmarg, og er det viktigste hematopoetiske organet hos teleoster (Zapata *et al.*, 2006; Koppang *et al.*, 2010). Det er antatt at modningen av B-celler skjer her, før disse migrerer til den bakre del av nyren eller til milten for interaksjoner med antigener (Zwollo *et al.*, 2005). Milten regnes i likhet med nyren som et viktig sekundært lymfoid organ. Den består av ellipsoide kapillærer, melanomakrofag sentre og lymfoid vev, og er involvert i antigenpresentasjon for naive B-celler (Uribe *et al.*, 2011; Zwollo *et al.*, 2005). Det har ved forsøk blitt vist at betydelige mengder T-celler aggregerer Interbrankiale lymfoide vev (ILV) som befinner seg i gjellene til laks. ILV er antatt å representere et sted hvor naive T-celler utsettes for antigen fra det eksterne miljøet (Koppang *et al.*, 2010). Nylig publiserte data antyder at ILV er et sekundært lymfeorgan analogt med "muccosa-associated lymphoid tissue" hos vertebrater (Aas *et al.*, 2014).

I tillegg er det vist at mukus hos fisk inneholder antibakterielle peptider, lectiner, proteaser og lysosymer, i tillegg til at IgT også er påvist der. Dette indikerer at fiskemukus også har funksjoner forbundet med sekundære immunologiske organer (Ellis, 2001; Zhang *et al.*, 2009).

### 1.3.2 Cellulære komponenter i det adaptive immunforsvaret

Adaptiv immunitet er det spesifikke immunforsvaret som kun finnes hos vertebrater. Karakteristisk for dette forsvaret er at det har lang responstid ved førstegangs utsettelse for et patogen, men at det gir et hurtig svar ved gjentatt eksponering for det samme patogenet (memory). Det har også større diversitet enn det medfødte immunsystemet siden B- og T-celler uttrykker et stort repertoar av reseptorer, som teoretisk sett gjør det

mulig å gjenkjenne ett hvert antigen som et individ blir eksponert for. "Memory" celler besitter etter første gangs eksponering for patogener en tilpasset reseptor som spesifikt gjenkjenner det aktuelle patogenet, og som umiddelbart kan initiere en spesifikk respons ved gjentatt eksponering for samme antigen (Abbas & Lichtman, 2011).

Lymfocytene er den cellulære komponenten i den adaptive immunresponsen. Disse består av T lymfocytene (T-celler) og B lymfocytene (B-celler) og representer henholdsvis det cellemedierte og det humorale adaptive immunforsvaret (Mutoloki *et al.*, 2014). Cellemediert immunitet består av ulike T-cellepopulasjoner som uttrykker ulike T-celle reseptorer (TCR). Cytotoksiske T-celler binder til celler som presenterer antigen ved klasse I major histocompatibility complex (MHC) reseptorer, og dreper disse. I pattedyr er alle celler i stand til å presentere antigen gjennom klasse I MHC reseptorer, identifisert ved ko-reseptoren CD8. Hjelper T-celler uttrykker derimot CD4 ko-reseptoren, og denne celletypen gjenkjenner antigener presentert på klasse II MHC reseptorer som finnes hos DC, mononukleære fagocytter og B-celler (Abbas & Lichtman, 2011). Hjelper T-celler skiller ut cytokiner, som forsterker responsen til andre celletyper. Hos fisk gjenstår mye forskning på celle mediert immunitet, men det er i senere år identifisert en rekke markører kjent fra T-celler hos høyerestående vertebrater, deriblant gener som koder for TCR, CD4 og CD8, samt molekylerne CD3 og CD28. I tillegg er CC kjemokin reseptor 7, CD44 og CD45RA som er markører for ulike subpopulasjoner av T-celler identifisert i fisk (Mutoloki *et al.*, 2014).

Dette gir indikasjoner på at både cytotoksiske- og hjelper T-celler finnes hos ulike fiskearter, men fortsatt er det få studier som bekrefter at de har samme funksjon som hos pattedyr (Mutoloki *et al.*, 2014).

Antigen retensjon og presentasjon er antatt å hovedsakelig foregå i hodenyre og milt hos teleoster (Press & Evensen, 1999; Bassity & Clark, 2012). Det er antatt at B-celler her modnes gjennom interaksjon med antigen, og differensieres til plasmaceller (Mutoloki *et al.*, 2014). T-celler antas imidlertid å eksponeres for antigen i ILT (Aas *et al.*, 2014).

Mononukleære fagocyterende celler og DC har funksjoner knyttet til antigen presentasjon hos teleoster også (Sizemore *et al.*, 1984; Bassity & Clark, 2012). Dette er celletyper som presenterer antigen sammen med MHC molekyler i deres membraner for T-celler. Celler som uttrykker MHC II molekyler på membranen (DC, makrofager og B-

celler) har fått betegnelsen "profesjonelle" antigen presenterende celler (APC). I disse celletypene vil ekstracellulære mikrober endocytteres, prosesseres i endosomale vesikler, og framvises på MHC II i cellemembranen (Abbas *et al.*, 2011). Hos laks er tre subpopulasjoner av celler som uttrykker MHC II identifisert i hodenyre. Det at en av disse har en morfologi som likner DCs hos pattedyr, kombinert med at disse cellene aktiveres av TLR ligander indikerer at dette kan være analoger til DC, og er et eksempel på at samspillet mellom det medfødte og adaptive immunforsvaret hos laks har paralleller til hva som er beskrevet hos pattedyr (Iliev *et al.*, 2010).

### 1.3.3 B-celler og immunoglobuliner

Det humorale adaptive immunforsvarets mest betydningsfulle komponent er B lymfocytter (B-celler), som produserer og sekreterer IgM (antistoff). I motsetning til T-celle reseptorer, som kun gjenkjenner korte peptid antigen fremvist på MHC-molekyler, er B-celle reseptoren i stand til å gjenkjenne et vidt spekter av antigener som inkluderer både makromolekyler og små kjemiske forbindelser som lipider, karbohydrater og proteiner (Abbas & Lichtman, 2011). Aktivisering av naive B-celler skjer når de binder antigen til membranbundne Ig-reseptorer. Dette initierer klonal ekspansjon, og produksjon av klonale B-celler med spesifikke reseptorer for det bundne antigenet. En videre differensiering fører til produksjon av effektorceller, eller IgM-sekreterende plasma celler (Abbas & Lichtman, 2011). Disse produserer spesifikke antistoffer for "gitte" antigener som går ut i sirkulasjonen.

Forsøk gjort på regnbueørret antyder at det eksisterer en rekke B-celle subpopulasjoner som kan skilles basert på en rekke cellulære markører i tillegg til morfologi. Utgangspunktet for generering av B-celler er leukocytt stamceller (CLP) som befinner seg i hodenyren. Differensieringen til modne B-celler er antatt å gå via pro-, pre- og umodne B-celle stadier, og gjerne i andre perifere edeler av nyren (baknyre). Modne B-celler er antatt å utsettes for antigen i milt og/eller baknyre, og dermed differensieres til APC (Zwollo *et al.*, 2005).

En beskrevet celletype i teleoster er replikerende plasmablaster, som i tillegg til å være replikerende skiller de seg fra plasmaceller ved at de er mindre, har kortere cellesykluser og uttrykker både mIgM og Pax5 (Zwollo *et al.*, 2005; Ye *et al.*, 2013).

Plasmablaster observeres hovedsakelig i blod, milt og baknyre, og det er antatt at plasmablastene migrerer til hodenyren, hvor de videre differensieres til plasmaceller (Ye *et al.*, 2013).

Lang-livede, ikke-replikerende plasmaceller er den vanligste antistoff sekreterende celle (ASC) hos teleoster, og er i hovedsak lokalisert i hodenyren (Zwollo *et al.*, 2005; Bromages *et al.*, 2004). Ig<sup>+</sup> B-celler er den dominerende leukocytten hos regnbueørret (20-50%), og det er påvist at regnbueørret B-celler har fagocyterende egenskaper (Jansson *et al.*, 2003; Li *et al.*, 2006).

Immunoglobuliner som er bundet i membranen på B-celler kalles B-celle reseptoren (BcR), og er karakteristisk for modne naive B-celler. Reseptoren består av fire polypeptid kjeder, og konfigurasjonen av disse to lette og to tunge kjedene kalles immunoglobulin (Ig). Etter differensiering av modne B-celler til plasmaceller begynner disse å skille ut sekretorisk IgM, som hos teleoster består av fire Ig-molekyler og dermed har en tetramerisk struktur (Abbas & Lichtman, 2011; Acton *et al.*, 1971). Immunoglobuliner med ulik tung kjede tilhører forskjellige isotyper (Abbas & Lichtman, 2011). Den membranbundne IgM reseptoren var lenge trodd å være den eneste Ig reseptoren hos teleoster intill det i 2005 ble det gjort funn av en ny subtype, IgT/IgZ, fra henholdsvis regnbueørret og zebrafisk (Danilova *et al.*, 2005; Hansen *et al.*, 2005; Ye *et al.*, 2013) I 2010 ble en tredje subtype, IgD, identifisert i regnbueørret (Edholm *et al.*, 2010). IgT/IgZ er en isotype som er unik for teleoster, og har siden den ble oppdaget også blitt påvist i de fleste andre teleoster (Salinas *et al.*, 2011). IgT-reseptoren ser ut til å dominere over IgM i mukosale organer som tarm, hvor den har en sentral rolle i forsvar mot tarmparasitten *Ceratomyxa shasta* (Zhang *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2010). Nylig har IgT<sup>+</sup> B-celler dessuten vist seg å være den dominerende subpopulasjonen i nese og hud (Tacchi *et al.*, 2014).

I perifere organer hos teleoster eksisterer ulike subpopulasjoner av naive B-celler basert på hvilke membranbundne Ig reseptorer de uttrykker. Fire ulike subpopulasjoner av B-celler er beskrevet, og disse inkluderer IgM<sup>+</sup>/IgD<sup>-</sup>, IgM<sup>+</sup>/IgD<sup>+</sup>, IgM<sup>-</sup>/IgD<sup>+</sup> og IgM<sup>+</sup>/IgD<sup>-</sup>/IgT<sup>+</sup> subpopulasjonener (Salinas *et al.*, 2011). Den vanligste subpopulasjonen av B-celler hos teleoster er IgM<sup>+</sup>/IgD<sup>+</sup> (Ye *et al.*, 2013).



#### 1.3.4 Immunoglobulin M (IgM) hos laks

IgM er den eneste isotypen som er påvist hos alle vertebrater. Som omtalt ovenfor eksisterer den både i membranbundet og sekretorisk form (Ye *et al.*, 2013). Genene som koder for IgM, IgD og IgT befinner seg innenfor et område kalt *IgH*, som hos laks er duplisert (Shiina *et al.*, 2005; Yasuike *et al.*, 2010). Dette gjør at laks innehar to *IgH* regioner (IgH-A og IgH-B), to isotyper av genet for tung kjede (CmuA og CmuB), og dermed to unike subpopulasjoner av IgM (Hordvik *et al.*, 2002).

I motsetning til høyerestående vertebrater har sekretorisk IgM hos de fleste teleoster, deriblant laks, en tetramerisk konfigurasjon (Acton *et al.*, 1971), og er den klart vanligste Ig subtypen i lakseserum (Ye *et al.*, 2010). Det er ikke påvist "class-switching" hos teleoster. Det er imidlertid påvist somatisk rekombinasjon av exonene (V-DJ sammenslåing) av tung kjede involvert i antigen binding i zebrafisk (Page *et al.*, 2013). IgM er hos pattedyr et av proteinene med høyest glykosylering. Denne heterogeniteten av O- og N- linkede karbohydrater er påvist også på IgM fra laks hvor tung kjede består av mellom 7,8-11,4 % karbohydrater (Magnadóttir *et al.*, 1997; Magnadóttir, B. 1998). Graden av glykosylering avgjør den molekylære vekten til subenhetene og tung kjede utgjør omtrent 71,5 kDa, mens lett kjede 26,5 kDa (Håvarstein *et al.*, 1988; Magnadóttir, 1998).

#### 1.3.5 Funksjonen til IgM hos teleoster

Boshra *et al.*, 2004 gir klare indikasjoner på at IgM hos regnbueørret har en sentral rolle i aktiveringen av det klassiske komplementsporet som resulterer i lysering av IgM-sensitive erytrocytter. Det konkluderes her med at komplement proteinene C1-C4 involvert i den klassiske komplement kaskaden har funksjoner hos fisk som likner de man finner hos pattedyr (Bashra *et al.*, 2004).

Funn fra malle av "leukocyt immune type reseptorer" (IpLITR) indikerer at IgM også hos teleoster medierer cytotoxicitet med utgangspunkt i homologe reseptor funksjon hos mennesker (Stafford *et al.*, 2006; Merrill *et al.*, 1981). Dens rolle i både det medfødte og adaptive immunforsvaret er dokumentert i alle arter som hittil er undersøkt (Boes, M. 2000). Det er observert korrelasjoner mellom mengden sekretorisk IgM og graden av antiviralt forsvar mot PD (Xu *et al.*, 2012) og IPN (Munang'andu *et al.*, 2013).

#### 1.4 Morfologi til blodceller hos teleoster (laks)

En karakteristikk til erythrocytter (røde blodceller) hos teleoster er at de har cellekjerne. Modne erythrocytter er avlange, og har en avlang cellekjerne som farges purpur rød ved Giemsa farging. De er 13-16  $\mu\text{m}$  lange, og 7-10  $\mu\text{m}$  brede. Umodne erythrocytter har både rundere cellemorfologi og kjernen er mindre kompakt sammenliknet med modne erythrocytter. Cytoplasma hos umodne erythrocytter har en mer blålig fremtoning når de frages med haematoxylin/eosin grunnet fravær av hemoglobin.

Monocytt/makrofager er store celler (9-25 i diameter) med oval kjerne og en stor andel cytoplasma som har en lysere framtoning sammenliknet med lymfocytter farget med haematoxylin/eosin (Amin *et al.*, 1991). Melanomakrofager har en morfologi som likner på andre makrofager, men identifiseres ved tilstedeværelsen av melanin i cytoplasma (Koppang *et al.*, 2003).

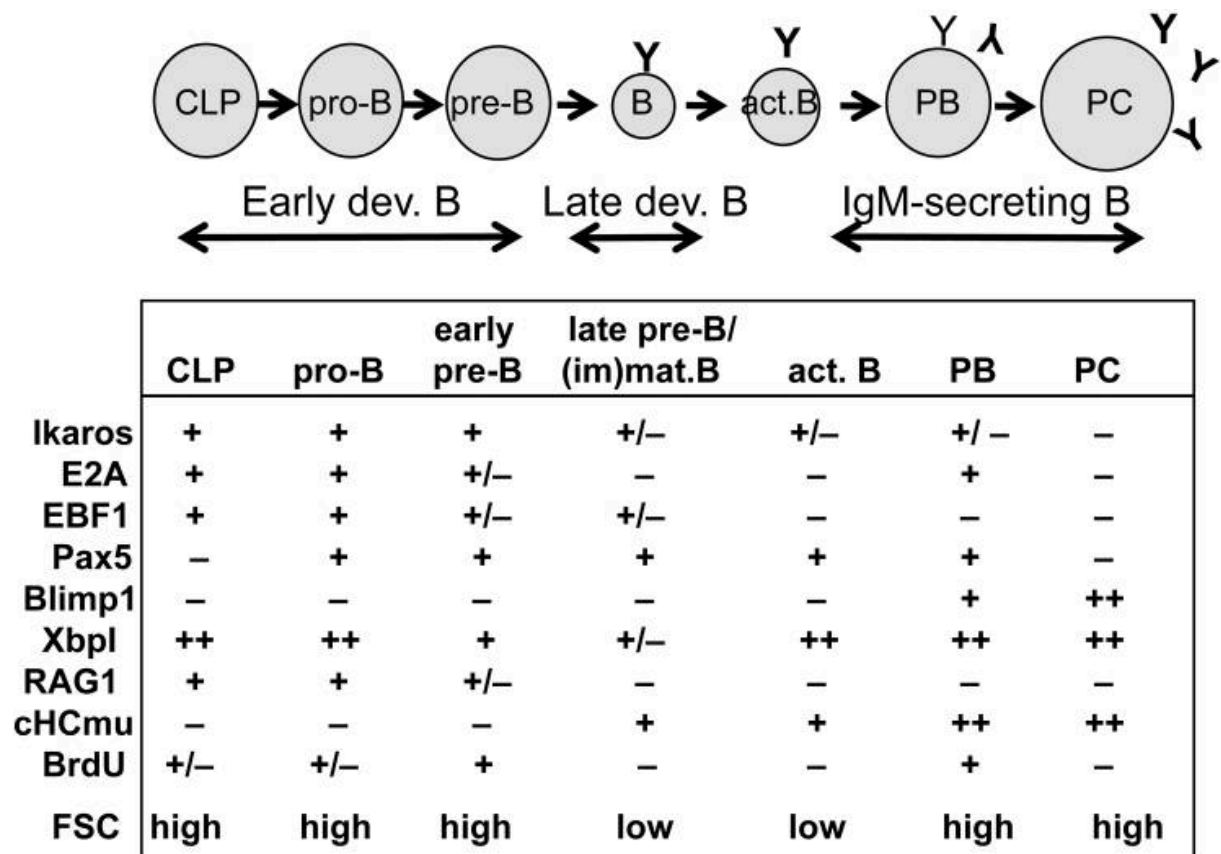
Nøytrofile granulocytter kan skilles fra makrofager ved at de er mindre i størrelse, og har en lappedelt cellekjerne med mellom 2-5 "lapper" av varierende utforming (Lieschke *et al.*, 2001; Amin *et al.*, 1991). Granulocyttene er mellom 4-13  $\mu\text{m}$  i størrelse, og er dermed mindre enn monocytterne (Amin *et al.*, 1991). Dendrittiske celler (DC) kjennetegnes ved foldet cellekjerne og lange utstikkere som gir de et "stjerneformet" utseende (Bassity & Clark, 2012).

Modne lymfocytter inkluderer B-celler og T-celler, og disse er hos laks 7-10  $\mu\text{m}$  i diameter, med en relativt stor og rund cellekjerne som fyller store deler av cellens volum. Kjernen farges purpur rød ved Giemsa-farging. Cellene har en tynt perifer cytoplasma. Det er også beskrevet lymfocyttiliknende celler på mellom 10- til 15  $\mu\text{m}$  i diameter med granulært cytoplasma som antas å representere varianter av lymfocytter i ulike modningsfaser (Amin, 1991).

### **1.5 Transkripsjonsfaktorer involvert i differensiering av B-celler**

En transkripsjonsfaktor er et protein i cellekjernen, som binder til spesifikke områder i nær tilknytning til en promotor på DNA hvor den enten kan aktivere eller hindre transkripsjonen av det aktuelle genet til mRNA (Nelson & Cox., 2008). Den oppnår dette ved å endre kromatinstrukturen rundt målgenet. Transkripsjonsfaktorer innehar et funksjonelt domene (repressoren/aktivatoren) som enten er av typen "homeodomene", "zink finger", "leucine zipper", "helix-løkke-helix" eller "vinge-helix proteiner". Transkripsjonsfaktorene klassifiseres basert på hvilke type funksjonelt domene de besitter (Zwollo, 2011).

Metoden med å benytte transkripsjonsfaktorer som markører for modning av B-celler er tidligere brukt på pattedyr (Northrup & Allman, 2008). Transkripsjonsfaktorene fungerer utmerket i komparative studier da genene som koder for disse er svært konserverte mellom vertebrater, og ofte med det DNA bindende domenet som den mest konserverte delen. De viktigste transkripsjonsfaktorene involvert i B-celle modning hos vertebrater, som også er beskrevet hos teleoster er Ikaros, E2A, Tidlig B celle faktor-1 (E2F1), pax5 (Pax5), B lymfocyt-indusert protein-1 (Blimp1 og X-boks bindende protein (Xbp1) (Zwollo, 2011).



**Figur 1:** Øverst sees de ulike stadiene av B-celler fra stamcelle til plasmacelle og plasmablast. "Y" indikerer tilstedeværelse av IgM, og om den er membranbundet eller ikke. Under foreligger oversikt over tilstedeværelse av de viktigste transkripsjonsfaktorene involvert i modning og effekt gjennom modningsprosessen for B lymfocytter hos vertebrater. De ulike transkripsjonsfaktorene står i venstre marg. Tegnet (-) indikerer fravær, (+) indikerer tilstedeværelse, og (++) indikerer stor tilstedeværelse av transkripsjonsfaktoren. Figur hentet fra Zvollo, 2011

### 1.5.1 Pax5

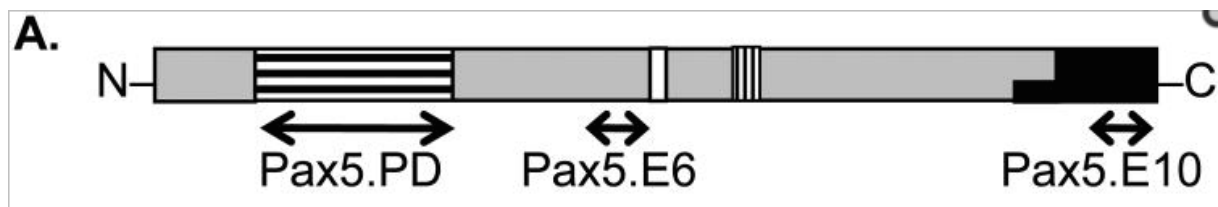
Pax5 er en homodomene type transkripsjonsfaktor med parrete domener (Zwollo, 2011). Det er hos pattedyr påvist at den påvirker reguleringen av 170 gener involvert i modning av, så vel som effektorfunksjoner til pattedyr B-celler (Hagman & Lukin, 2007).

Full-lengde Pax5 gener fra regnbueørret har en 98% homologi sammenliknet med Pax5 gener fra høyerestående vertebrater (Zwollo *et al.*, 2005). Pax5 cDNA sekvensen fra laks er nylig identifisert, og denne sekvensen har 99% aminosyre likhet med Pax5 fra regnbueørret (pers. Med. S. Grove, Veterinærinstituttet). Teoretisk beregnet molekylvekt for Pax5 fra laks er anslått til 41,7 kDa basert på aminosyresekvens (upubl. data I. Jensen). I denne oppgaven ble det benyttet 3 antisera som gjenkjenner ulike funksjonelle domener av regnbueørret proteinet (figur 2) (MacMurray *et al.*, 2013). Det



er også vist at peptidsekvensene i Pax5 proteinet som antistoffene tPax5-E10 og tPax5-E6 er lagd mot er identiske i laks og regnbueørret, og foreligger i figur 2 (pers. med. S. Grove, Veterinærinstituttet).

Proteinets diversitet i ulike cellulære prosesser baserer seg på at Pax5-genets introner og exoner kan settes sammen til ulike isotyper. Hos teleoster er det kjent at Pax5 påvirker "skjebnen" til B-celler, og proteinet er høyt uttrykt i prosessen fra pro B-celler til plasmablaster, før uttrykket forsvinner hos plasmaceller (Zwollo *et al.*, 2005). Nylig er 7 alternative isotyper av Pax5 proteinet i tillegg til full-lengde proteinet påvist i regnbueørret (MacMurray *et al.*, 2013). Pax5 er også vist å kunne inhibere differensiering og utvikling av både T-celler og myeloide celletyper, samtidig som en nedregulering av Pax5 stimulerer differensiering av B lymfoma celler til makrofager (Northrup & Allman, 2008; Hodawadekar *et al.*, 2007). Dette er særlig interessant sett i relasjon til den allerede nevnte fagocytiske egenskapen B-celler hos regnbueørret har (Li *et al.*, 2006). Pax5 opererer også sammen med de tidligere nevnte transkripsjonsfaktorene forbundet med B-celle differensiering (Figur 1). For eksempel vil Pax5 kunne aktivere EBF1, og undertrykke Blimp1 og Xbp1 (Cobaleda & Sitia, 2007).

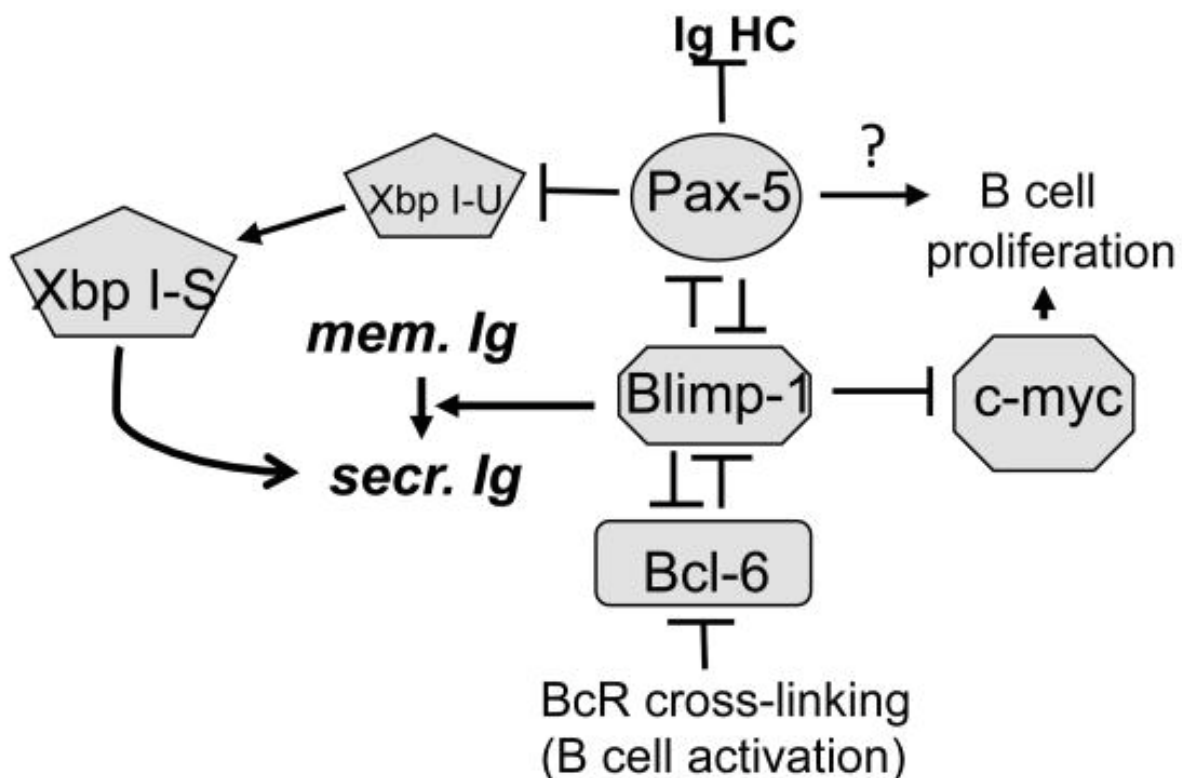


**Figur 2.** Illustrasjon av funksjonelle domener av Pax5 genot hos regnbueørret. Pilene angir hvilke områder av Pax5 de tre antistoffene som er brukt i denne oppgaven gjenkjenner. Ti områder (exoner) er navngitt med utgangspunkt i funksjon, og avgrensning av introner. Til venstre sees parret domene, i midten er exon 6, og til høyre sees C-terminalen. Figur hentet fra (MacMurray *et al.*, 2013).

### 1.5.2 Blimp-1

Blimp-1 er en zink-finger type transkripsjonsfaktor som viser særlig stor grad av konservering mellom arter fra evolusjonært gamle og nye phyla. Det har blitt påvist at det har en homologi på over 93% mellom mus og ulike arter av teleoster (Ohtani *et al.*,

2006). Blimp1 har hos høyerestående vertebrater en avgjørende rolle ved terminal fase av både B-celle differensiering og ved difgferensiering av makrofager. Den fremviser synergistiske egenskaper med transkripsjonsfaktoren XbpI (John & Garrett-Sinha, 2009; Zwollo, 2011). Hovedsakelig utøver Blimp-1 en antagonistisk effekt på transkriberinger av gener, og påvirker en rekke kromatin modifierende enzymer (John & Garrett-Sinha, 2009). Det er kjent fra vertebrater at uttrykk av Blimp-1 og Pax5 utøver en hemmende effekt på hverandre (Figur 3), som dermed er en mulig mekanisme for å regulere terminal differensiering av B-celler (Kallies & Nutt, 2007). Veldig lite er kjent om funksjonen til Blimp-1 hos teleoster ut over at cDNA er isolert fra teleost artene zebrafisk og blåsefisk (Ohtani *et al.*, 2006). Kun kortere cDNA sekvenser er identifisert som er antatt å tilhøre Blimp-1 genot er identifisert hos laks, og foreligger i genbank (EST'er). Det eksisterer ingen ytterligere informasjon om Blimp1 fra laks.



**Figur 3: Stimulatorisk og inhibitorisk effekt ulike transkripsjonsfaktorer utøver på hverandre ved modning og differensiering av B-celler hos vertebrater.** Pilene indikerer stimulatorisk effekt på uttrykkelsen av målproteinet, mens "T" indikerer inhibitoriske effekt. Figuren er hentet fra: Zwollo *et al.*, 2011).

### 1.5.3 *Xbp1*

Dette er en "leucine zipper" transkripsjonsfaktor med avgjørende betydning i terminal B-celle differensiering til plasmaceller i samspill med Blimp1 (John & Garrett-Sinha, 2009; Zwollo, 2011). Ulike varianter av *Xbp1* er kjent, deriblant isotypen *Xbp1-S* (Hu *et al.*, 2007). Det aktiverer "unfolded protein response" (UPR) gener, og bidrar til å vedlikeholde det vegetative stadiet til plasmaceller, samt syntese av antistoff (Cenci & Sitia, 2007). Også *Xbp1* undertrykkes av Pax5, noe som gjør at de uttrykkes ved forskjellige tidspunkt i modning av B lymfocytter (Reimold *et al.*, 1996). Sekvensert *Xbp1* cDNA fra laks er tilgjengelig i Genbank og viser stor homogenitet til *Xbp1* fra regnbueørret, men ytterligere karakteristikker er fraværende (accnr: NM\_001252352; Leong *et al.*, 2010). Den beregnede molekylvekten til *Xbp1* fra laks er på 29,2 kDa.

## 1.6 Vaksinerings av laks

De benyttede metodene for vaksinerings av laks er ved intraperitoneale injeksjoner, oral administrering (gjennom føret) og ved immersjon (badebehandling). Direkte injeksjon av multivalente vaksiner med dødt virus er det foretrukne alternativet, og virker å gi bedre effekt enn andre vaksinasjonsmetoder med samme komponenter (Valdenegro-vega *et al.*, 2013). Interperitoneale vaksiner krever en god adjuvant og de vaksinene som benyttes til laks har alle oljebaserte adjuvantformuleringer, som gir en langvarig immunologisk respons (Press & Evensen, 1999). Den beste egenskapen til en god olje-adjuvant er at den fasiliterer en sakte og jevn frigivelse av antigenet i organismen, som igjen fører til en kraftigere immunrespons (Aucouturier *et al.*, 2011). En av ulempene med olje-adjuvant i kombinasjon med antigen er at det forårsaker lokale og til dels svært kraftige inflammatoriske responser ved injeksjonsstedet, blant annet fibrinøse adhesjoner og granulomer (Poppe *et al.*, 2013). Det eksisterer ingen universal optimal adjuvant som er det beste alternativet i alle sammenhenger, og hvilken adjuvant som er best å benytte avhenger av antigenet, art, injeksjonsrute, type immunrespons som er ønskelig og lengden på immuniteten.

Fra pattedyr er det imidlertid kjent at CpG ODN som aktiverer celler via TLR9 reseptoren påvirker differensieringen av modne naive B-celler til ASC og fremviser gode egenskaper som adjuvant (Vollmer & Krieg, 2009). Tidligere arbeid gjort i vår forskningsgruppe har vist at CpG ODN aktiverer både medfødte- og adaptive

immunresponser i laks (Jørgensen *et al.*, 2001; Jørgensen *et al.*, 2003; Pedersen *et al.*, 2006; Strandskog *et al.*, 2007; Iliev *et al.*, 2010; Thim *et al.*, 2012; Thim, 2013). I kontrollerte immuniseringsforsøk har gruppen videre vist at det å kombinere flere ulike TLR agonister, for eksempel CpG og poly I:C ,gir synergistiske responser sammenliknet med hver agonist alene (Strandskog *et al.*, 2007; Thim *et al.*, 2012). Videre er suboptimale doser SAV Ag og CpG/poly I:C vist å gi en signifikant beskyttelse mot SAV sammenliknet med Ag alene (Thim *et al.*, 2012). Det er vist fra laks at passiv immunisering med serum fra laks smittet med PD gir opp til 100% beskyttelse i immuniserte individ (Houghton & Ellis, 1996). I denne oppgaven undersøkes den adaptive humorale responsen ved CpG stimulering av leukocytter *in vitro*, samt i kombinasjon med SAV Ag ved et større *in vivo* smitteforsøk.

## 1.7 Problemstilling

Modning og differensiering av B-celler er en indikasjon på aktivering av det humorale adaptive immunforsvaret som sees blant annet ved effektiv vaksinerings. Det eksisterer veldig få verktøy for å detektere modningen av B-cellene, og dermed aktivering av det humorale adaptive immunsystemet hos laks. Fra pattedyr og etter hvert fra andre teleoster, er transkripsjonsfaktorer involvert i modningen og differensieringen av B-celler etablert som en egnete markører. Den største fordel med å benytte transkripsjonsfaktorer er at de har en betydelig grad av homogenitet i både sammensetning og funksjon mellom ulike vertebrat phyla. Deteksjon av transkripsjonsfaktorene kan oppnås ved en rekke ulike metoder, deriblant Western blot. Imidlertid er disse metodene avhengig av antistoff som spesifikt gjenkjenner aminosyresekvenser unike for det aktuelle proteinet. Veldig lite er kjent om transkripsjonsfaktorenes betydning i immunologiske prosesser hos fisk, og velfungerende antistoff mot disse transkripsjonsfaktorene er ikke utviklet på laks. Målet med denne oppgavene er å undersøke spesifisiteten til en rekke tilgjengelige antistoff mot disse, samt å forsøke å bekrefte deres eventuelle rolle ved aktivering av immunresponser hos laks.

### **Delmål 1:**

Undersøke om *in vitro* stimulering av leukocytter fra laks med immunstimulanten/TLR-liganden CpG ODN initierer modning og differensiering av B-celler målt ved qPCR og Western blot med ulike Pax5 antisera.

### **Delmål 2:**

Undersøke om kombinasjonen av immunostimulantene/TLR-ligandene CpG ODN og poly I:C har adjuvant effekt ved vaksinerings med antigen fra viruset som forårsaker PD (SAV Ag) målt ved Western blot mot ulike Pax5 antisera

### **Delmål 3:**

Alternative metoder for isolering av leukocytter ved å benytte Percoll-gradienter testes med henblikk på deres evne til å skille naive B-celler og plasmaceller. Metodene evalueres ved applikasjon av ulike morfologiske undersøkelser (cytopinn og mikroskopering) samt Western blot mot kjente markører hos de ulike lymfocyttypene.

## 2 Materiale og metode

### 2.1 Forsøkfisk og organuttak

#### 2.1.1 Forsøksfisk

Forsøksfiskene benyttet i denne masteroppgaven var Atlantisk laks (*Salmo salar L.*) fra Aqua Gen. Fiskene ble hentet fra Havbruksstasjonen i Kårvika på Ringvassøy. Til uttakene ble det benyttet to grupper fisk. Den første gruppen med fisk bestod av uvaksinert laks med en vekt mellom 300 og 900 gram. Denne fisken ble benyttet til celleisolering for videre optimalisering av metode for isolering av leukocytter fra milt, hodenyre og blod, samt til *in vitro* stimulering med CpG.

En annen gruppe fisk ble benyttet til *in vivo* immuniseringsforsøket. Denne fisken veide omtrent 155 g ved forsøksoppstart. Ved de påfølgende uttakene veide fisken i gjennomsnitt henholdsvis 192, 239 og 297g. Fisken ble bedøvd med anbefalt dose benzokain, og avlivet med et slag mot hodet.

#### 2.1.2 Organuttak

Etter avliving ble fisken blodtappet ved bruk av vacutainer stukket inn i *Vena caudalis* i bakkant av gattfinnen. Buken ble åpnet, før milt og hodenyre ble fjernet med skalpell og pinsett uten å få med omkringliggende bindevev og organer. Organene ble overført til 50 ml rør tilsatt 10 ml Leibovitz's L-15 medium (Life Technologies, Gibco®) tilsatt 20 U/ml heparin (LEO pharma AS) og 2% føtalt kalveserum (Biochrom AG)), 60 µl/ml Penicillin, og 100 µl/ml Streptomycin/Penicillin (Gibco®, Life Technologies). Skalpellspiss ble byttet mellom hver fisk, og annet utstyr desinfisert ved avbrenning.

#### 2.1.3 Isolering av leukocytter

Isolering av leukocytter ble gjort som beskrevet av Jørgensen *et al.*, 2001). Perkoll består av colloidale silica partikler som danner diskontinuerlige tetthetsgradienter når ulike konsentrasjoner tilsettes i samme rør. Etter sentrifugering vil den spesifikke tettheten til ulike leukocytter gjøre at de skilles fra hverandre. Den anvendte metoden benyttet 25%

og 54% perkoll-gradienter, hvor leukocytterne ble hentet fra fra 54% gradienten. Som en del av oppgaven ble uttesting av 42%, 50%, 54%, 62% og 70% perkoll-gradienter undersøkt, med utgangspunkt i fremgangsmåten beskrevet av Jørgensen et al., 2001. Røde blodceller har en større tetthet/egenvekt, og vil etter sentrifugering legge seg på bunnen av rørene. Leukocytter vil i teorien da foreligge øverst i 54% perkollgradienten, og kan deretter overføres derfra til nye rør. For å avgjøre celletettheten, og tillage ønskede cellekonsentrasjoner, må cellene telles. Nucleocounter YC-100 (Chemometec) er benyttet i disse forsøkene. En kjent mengde cellesuspensjon (100 µl) ble overført til rør og blandet med en komponent som lyserer cellemembranene, før en buffer tilsettes. Deler av prøvematerialet overføres til tellekassetter som teller antallet frie cellekjerner i prøven.

På laboratoriet ble organene homogenisert ved sprøytetempel og gjennom cellestrainere (Falcon cell strainer 100 µm) til nye 50 ml rør. Sprøytetempelet ble gnidd og presset mot organet under kontinuerlig tilførsel av resterende L-15 medium. Cellesuspensjonene ble deretter overført Perkoll-gradienter (Pharmacia) for isolering av leukocytter fra cellesuspensjonen. Ut fra en 90% Perkoll (GE healthcare) utgangsløsning og 0,4 ml L-15 ble de ulike tetthetsgradientene tillaget (tabell 1).

Cellesuspensjon tilsatt til rør med perkoll-gradienter ble sentrifugert på 400g (1800 rpm) ved 4°C i 40 minutter. Den hvite leukocytffasen ble anrikt mellom de to fasene og deretter overført i nye sentrifugerør. Cellene ble vasket to ganger i kaldt L-15 uten heparin ved sentrifugering på 300g (1400 rpm) i 10 minutter. Cellepelleten ble deretter resuspendert i 5 ml L-15 tilsatt antibiotika (beskrevet ovenfor) og 0,1% FCS.

Hundre µl resuspendert cellesuspensjon ble blandet med 100 µl Cell counting lysis buffer (Chemometec) og 100 µl Cell counting stabilizing buffer, og overført på merkede eppendorfrør. Etter vortex og applikasjon til tellekassetter vil NukleoCounter telle antall cellekjerner som dermed vil være et mål på antall celler i prøven. Konsentrasjonen av celler ble justert til ønsket celletall og sådd ut i celletellingsbrett, eller lysert direkte for videre analyse med Western Blotting (se nedenfor). Brettene ble deretter oppbevart i inkubasjonsskap ved 14°C.

#### *2.1.4 Isolering av leukocytter fra multiple gradienter*

Det ble gjennomført to forsøk med celleisolering hvor formålet var å teste ulike gradienter. Første forsøk ble de gjennomført med 5 ulike tettheter (25%, 50%, 54%, 62% og 70%) med 4 ml av hver tetthet i 50 ml Falconrør. I det andre forsøket ble gradienter med tetthet 25%, 42% og 54% benyttet, hvor leukocytene anrikes over 42% og 54% gradienten. Det ble i dette forsøket også tatt prøver fra blod, i tillegg til hodenyre og milt.

Første steg i denne prosedyren var høsting av organer fra hodenyre og milt med samme metode som tidligere beskrevet. Organene ble høstet fra laks på omtrentlig 400 gram.

I første forsøk (tabell 1) ble 4 ml av hver løsning tilsatt til 50 ml rør. Løsningen med høyest tetthet (70%) ble tilsatt først, deretter den med nest høyest tetthet (62%) osv, slik at det ble dannet tydelige tetthetsfaser. Rørene ble satt til side i 30 min, slik at gradientene ble ordentlig stabilisert. Deretter ble 10 ml med de ulike homogeniserte celledensjonene (6 fra hodenyre og 3 fra milt) tilsatt i sine respektive gradientrør. Cellene ble spunnet ned ved 400g i 40 minutter. Etter dette ble cellene som lå på toppen av 50%, 54%, 62% og 70% gradienten overført til 10 ml falconrør i plast. De ble sentrifugert ved 500g i 5 minutter. Celletallet ble bestemt ved avlesning i NucleoCounter. Prøvene ble resuspendert i 1,5 ml L-15 medium, sådd ut på et 24 brønners brett, og satt i inkuberingskap på 14°C. Disse ble benyttet til Western blot og Cytospinn.



**Tabell 1: Oversikt over mengdeforholdet mellom 90% perkoll utgangsløsning, L-15 medium/PBS og Heparin som ble tilsatt for å danne de ulike tetthetene i gradientforsøket**

Volum (ml)	Tetthet (%)	90% Perkoll (ml)	L-15 eller PBS (ml)	Heparin (ml)
75	25	20,6	54,4	0,3
50	42	25,3	24,7	0,2
50	50	27,5	22,5	0,2
50	54	29,7	20,3	0,2
50	62	34,1	15,9	0,2
50	70	38,5	11,5	0,2

I det andre forsøket ble 25%, 42% og 54% perkoll-gradienter benyttet til isolering av leukocytter fra blod, milt og hodenyre. Prøvene fra blod ble sådd ut  $2 \times 10^6$  celler/ml for 42% gradienten, og  $7 \times 10^6$  celler/ml for 54% gradienten. Fra milt ble det sådd ut  $2 \times 10^6$  celler/ml på brettene for alle prøvene, mens det fra hodenyre ble justert til  $7 \times 10^6$  celler/ml. Det ble sådd ut 1 ml celsuspensjon med nevnte konsentrasjoner i 24 brønners brett (Nunc). Disse cellene ble benyttet til Western blot og Cytospinn.

## **2.2 Stimulering av leukocytter fra hodenyre og milt med CpG ODN.**

Til disse forsøkene ble  $1 \times 10^7$  celler/ml sådd ut i 24 brønners brett (Nunc), fortynnet i L-15 medium tilsatt 0,1 % FCS. Cellen ble stimulert med syntetiske CpG oligonukleotider klasse B ( $2 \mu\text{M}$ ). Kontrollbrønner ble kun tilsatt medium. Platene ble inkubert ved  $14^\circ\text{C}$  etter stimulering.

## 2.3 Høsting av leukocytter fra fornyre og milt til Western blot

### 2.3.1 Ikke-adherente celler

Celler og cellemedium fra ikke-adherente milt og hodenyre leukocytter ble høstet 1, 3-4, 7, og 12 dager etter CpG-stimulering. Prøvene ble deretter sentrifugert på 400x g i 5 minutter ved 4°C og oppbevart i isoporbokser på is under det videre arbeidet. Supernatantene ble tatt vare på og overført til nye rør. Cellepelleten ble resuspendert i 500 µl kald PBS og sentrifugert på nytt ved 400g i 5 min ved 4°C. Deretter ble cellepelleten tilsatt ferdigstilt sample-buffer slik at cellekonsentrasjonen ble omtrent 1 million celler/10 µl.

Samplebufferen bestod av 1000 µl 4x NuPAGE™ litium dodecyl sulfat (LDS) sample buffer (Novex®, Life technologies), 200 µl 10x NuPAGE™ Sample Reducing agent (Novex® Life technologies), 400 µl 10% SDS og 400 µl MilliQ H<sub>2</sub>O. Pelleten ble resuspenderet og prøvene ble inkubert ved 90°C i 5 minutter, og sentrifugert på 12 000x g ved 4°C i 5 minutter. Frem til anvendelse ble de lagret ved -80°C

Cellesupernatantene (50 µl) ble overført til nye eppendorfrør, og tilsatt 50 µl samplebuffer. Resten av prosedyren var identisk med den for cellepelleten, inntil videre oppkonsentrering.

### 2.3.2 Adherente celler

For prøvetaking av adherente celler fra fornyre ble mediet først fjernet. Deretter ble brønnene tilsatt 0,5 ml PBS midt i brønnen for å vaske bort resterende non-adherente celler. Dette ble sugd bort ved å holde pipettespissen nede ved kanten av brønnene. Vaskingen ble gjentatt ytterligere en gang. Deretter ble 50 µl samplebuffer tilsatt direkte i de tomme brønnene. Pipettering opp og ned 5-6 ganger, og skraping i brønnen med pipettespissen sørget for at mest mulig av de adherente cellene ble løst opp i samplebufferen. Prøvene ble deretter kokt i 5 minutter på 90°C, sentrifugert på 12 000x g ved 4°C i 5 minutter. Alle prøvene ble videre oppbevart ved -80°C.

### 2.3.3 Sonikering av prøver

Prøvene som ble benyttet til western blot ble sonikert før blotting. Dette kunne gjøres før prøvene ble fryst, eller før blottingen. Alle prøvene som skulle sonikeres ble

oppbevart på is under arbeidet, og sonikeringen foregikk direkte i eppendorfrørene. Sonikeringstuppen ble først vasket i 70% etanol, før den ble skylt i MilliQ (destillert H<sub>2</sub>O). Deretter ble den ført godt ned i prøvene for å hindre spruting. Det ble pulsert sammenhengende i omtrent 10 sekunder for hver prøve, som deretter ble satt tilbake på is. Tuppen ble igjen vasket i etanol og skylt i MilliQ før sonikering av neste prøve.

#### 2.3.4 Oppkonsentrering av supernatanter

Cellesuspensjoner sådd ut på cellebrett og inkubert ved 14°C vil ved tilførsel av medium (L-15) kunne vedlikeholde det vegetative stadiet i flere dager. Cellene vil skille ut ekstracellulære proteiner direkte til det omkringliggende miljø. Etter sentrifugering kan cellene skilles fra denne supernatanten, og supernatanten kan undersøkes videre. Et problem er at konsentrasjonen av disse ekstracellulære proteinene nå er så lav at de vanskelig lar seg påvise direkte i western blot. Metode for oppkonsentrering av proteiner i supernatanter med "Amicon® Ultra-0.5 centrifugal Filter Device" ble dermed uttestet.

Nedfryste supernatanter ble tint på is, og 500 µl prøvemateriale ble applisert til Ultra-05 kammer (Amicon®) stående i mikrosentrifugerør. Prøvene ble sentrifugert ved 4°C og 14 000x g i 20 minutter. Kamrene ble plassert opp-ned i nye mikrosentrifugerør, og sentrifugert ved 4°C og 1000x g i 2 minutter. Prøvene ble deretter tilsatt samplebuffer med blandingsforhold 1:1, kokt og oppbevart ved -80°C inntil bruk.

## 2.4 RealTime Polymerase Chain reaction (qPCR)

### 2.4.1 Sampling av leukocytter (RNA) fra fornyre og milt til PCR

Prosedyre for organuttak, celleisolering og CpG stimulering var lik prosedyren beskrevet tidligere for proteiner. Tre stimulerte og 3 ustimulerte kontrollbrønner fra milt og hodenyre ble samlet 24 og 48 timer etter stimulering med CpG.

Cellene ble spunnet ned på 400 rcf i 5 minutter. Supernatanten ble fjernet, og brønnene vasket i 400 µl kald PBS. PBS ble deretter fjernet og kastet. 350 µl TRIzol® reagens ble tilsatt direkte i brønnene. Det ble skrapet godt under applisering av lysisbuffer, og

løsningen ble blandet med pipette 5-6 ganger. Cellelysatsen ble overført til merkede eppendorfrør og frosset på  $-70^{\circ}\text{C}$ .

#### 2.4.2 RNA Isolering

Genuttrykket kan kvantifiseres fra den detekterbar mengde av genets spesifikke mRNA produkt i cellen. Disse mRNA-molekylene må dermed isoleres intakt fra celle-lysatsen. Den anvendte metoden er basert på en metode utarbeidet av Chomzynski o& Sacchi, 1987. En løsning av fenol og guanidin isotiocyanat lyserer cellene, uten at mRNA denatureres. mRNA ble isolert med RNase<sup>®</sup>Mini Kitt (Qiagen) etter instruksjoner fra produsent. Det ble også benyttet RNase fritt vann og etanol for å hindre degradering ved ribonukleaser (RNaser).

PCR-strips ble brukt til alikotering og fortyninger av RNA. 12 prøver med både CpG stimulerte celler, samt kontrollceller fra milt og hodenyre ble benyttet.

Prøvene som hadde blitt samlet ble tint i isoporbokser med is, og oppbevart her mens arbeidet pågikk. Det ble tilsatt 350  $\mu\text{l}$  70% RNase fritt etanol til alle prøvene, og blandet godt. Hele volumet fra hvert rør (700  $\mu\text{l}$ ) ble tilsatt på hver sin merkede RNA spinn kolonne, og spunnet ned i 30 sekunder ved 11 000 rcf. Det ble deretter tilsatt 350  $\mu\text{l}$  RW1-buffer, og spunnet ned i 30 sekunder ved 8000 rcf. DNase løsningen ble tillaget ved å blande 10  $\mu\text{l}$  DNase til 70  $\mu\text{l}$  DNase buffer. Disse 80  $\mu\text{l}$  ble tilsatt til sine respektive kolonner, og ble inkubert 15 minutter ved romtemperatur. Innholdet fra elueringsrørene ble tømt ut, og nye 350  $\mu\text{l}$  RW1 buffer ble tilsatt og spunnet ned ved samme hastighet i 30 sekunder. Deretter ble elueringsrørene skiftet og 500  $\mu\text{l}$  RPE ble tilsatt hver kolonne. Rørene ble vendt noen ganger før de ble spunnet ned ved 11 000 rcf i 30 sekunder. Væsken som hadde gått gjennom kolonnen ble tømt ut. Deretter ble nye 500  $\mu\text{l}$  tilsatt på kolonnen, blandet, og spunnet ned i 2 minutter ved 11 000 rcf. Elueringsrøret ble igjen byttet. Det ble spunnet ned ett ekstra minutt på 20 000 rcf for å sørge for at all væske hadde passert gjennom kolonnen. Kolonnene ble deretter overført til eppendorfrør, merket RNA eluering, og tilsatt 35  $\mu\text{l}$  dH<sub>2</sub>O forsiktig midt på membranen i kolonnen. Dette ble spunnet ned i 1 minutt ved 11 000 rcf. Konsentrasjonen ble deretter målt ved Nanodrop<sup>®</sup> ND-1000 spektrofotometer. RNA løsningen ble videre overført og fortynt til 200 ng/  $\mu\text{l}$  i tidligere merkede PCR-strips

(8 rørs) med utgangspunkt i de ulike konsentrasjonene målt ved hjelp av NanoDrop spectrophotometer (ND-1000, Thermo Fisher Scientific). Prøvene ble avslutningsvis frosset og oppbevart på -80°C inntil videre bruk.

#### 2.4.3 cDNA syntese:

Ved å utnytte egenskapene til enzymet revers transkriptase kan en komplementær DNA tråd (cDNA) dannes fra et mRNA molekyl. Revers transkriptase binder til mRNA molekylet ved å gjenkjenne spesifikke primere (oligonukleotider), i dette tilfellet random hexamers. I dette forsøket ble Taqman Reverse Transkriptase kit (Life Technologies) med random hexamers benyttet. DNA syntesen er en tre stegs prosess som inkluderer tilhefting av nukleotider, elongering av DNA tråden, og degradering av mRNA tråden i 2720 Thermal Cycler (Applied biosystems). Prøvene gikk 10 min ved 25°C, 30 min ved 48°C og 5 min ved 95°C, før temperaturen ble senket til 4°C. En ssDNA tråd ble syntetisert fra hvert mRNA molekyl i løsningen. Korte gjenværende mRNA sekvenser i 5' enden fungerte som primer ved syntetisering av det dobbeltrådige cDNA molekylet utført av enzymet DNA polymerase.

Før start ble det tillaget 2 sett med PCR-strips; èn for 1:1 cDNA, og en annen for 1:10 fortynnet cDNA. Alle reagensene ble oppbevart på is under arbeidet, og Multiscribe RT ble oppbevart i fryseren inntil den ble benyttet. Under cDNA syntesen ble 90 µl vann og 10 µl RNA tilsatt PCR-strips merket 1:10 cDNA. Løsningen ble blandet, og oppbevart på -20°C. Konsentrasjon og mengde av de ulike reagensene som ble benyttet foreligger i tabell 2.

**Tabell 2: Konsentrasjon av reagenser benyttet i cDNA syntesen**

20 µl reaksjoner	1x (µl)	42x (µl)
10x buffer	2.0	84.0
MgCl <sub>2</sub>	4.4	185.0
dNTPs	4.0	168.0
Random hexamers	1.0	42.0
RNase inhibitorer	0.4	16.8
Multiscribe RT	0.5	21.0
dH <sub>2</sub> O	5.7	240.0
RNA	2.0	-

Alle reagensene (unntatt RNA) ble blandet i eppendorfrør, hvor multiscribe RT ble tilsatt til slutt. 18 µl av av blandingen (minus RNA) fra tabellen over ble tilsatt til PCR-strips merket 1:1 cDNA. Deretter ble 2 µl RNA tilsatt, og den resterende mengden ble oppbevart på is under arbeidet. Til slutt ble cDNA syntesen utført i Thermal Cycler med 25°C i 10 minutter, 48 °C i 30 minutter, og 95 °C i 5 minutter. Etter siste trinn ble temperaturen senket til 4 °C.

#### 2.4.4 Kvantitativ Real Time Polymerase Chain Reaction (qPCR)

"Polymerase Chain Reaction" er en enkel og billig metode for å oppkonsentrere spesifikke DNA sekvenser fra kun et fåtall templatet utviklet av nobelprisvinner i kjemi, Karry Mullis. qPCR er en kvantitativ variant av PCR utviklet for eksponentiell amplifisering av kortere (100-600 bp) sekvenser fra lengre DNA eller cDNA segmenter. Det fluoriserende fargestoffet som binder til alt dsDNA avgir lys i en kjent bølgelengde som måles ved et lyssensitivt kamera i qPCR maskinen. Mengden fluoresens indikerer mengden av gentranskriptet i sann tid (realtime). Når amplifiseringen er i den eksponentielle fasen, vil fluorescensen overstige en forhåndsbestemt "threshold"-fluoresens styrke. Det antallet sykluser prøven ved dette tidspunktet har gjennomgått defineres som thresholdsyklusen ( $C_q$ ). Denne verdien vil derfor kunne inverst relateres

til mengden cDNA. En høy  $C_q$  verdi vil dermed indikere en lav utgangskonsentrasjon av cDNA, og omvendt (Hunt M – Real Time PCR).

Det er enzymet DNA polymerase som syntetiserer en komplementær basesekvens fra enkeltrådig DNA molekyler (ssDNA). Korte komplementære sekvenser av det genet en ønsker å amplifisere, kalt primere, kan tilsettes. Primere binder til disse spesifikke sekvensene på DNA molekylet, og gjør at DNA polymerase kan binde og starte syntetiseringen. En PCR reaksjon skjer ved ulike temperaturer. Først økes temperaturen i prøven til 95°C. Dette skiller dsDNA til to ssDNA-molekyler. Deretter senkes temperaturen til 50°C, som stimulerer primerene til å binde DNAet. Siste trinn er å øke temperaturen til 72°C den optimale temperaturen for polymerasen. Disse syklusene kan gjentas, og føre til en eksponentiell amplifisering av det ønskede genet (Amrita, 2014).

I dette forsøket ble assayet TaqMan® kittet benyttet. Dette kittet består av en fluoriserende "probe" koblet til to fluoriserende fargestoff. Det ene er "reporter" fargestoffet med høy fluoresens, mens det andre er en "quencher" med lavere fluoresens. Når disse to komponentene foreligger i nær tilknytning til hverandre vil quencheren som avgir rød fluoresens absorbere lys fra "reporter"domenet, som avgir grønn fluoresens. Denne effekten kalles "Flouescence Resonance Energy Transfer", eller FRET. Når "proben" gjenkjenner den spesifikke målsekvensen, vil 5' nuklease aktiviteten til proben kløyve av quencheren, slik at "reporteren" avgir fluoresens med høyere intensitet. En økende intensitet indikerer flere bundne prober, og dermed flere cDNA molekyler med den spesifikke målsekvensen (Life Technologies, 2012).

En potensiell feilkilde er tilstedeværelsen av homologe målsekvenser proben kan binde til. Det er dermed viktig at proben er unik for målsekvensen, og binder den med høy spesifisitet.

Det ble her kjørt qPCR for å måle uttrykket av Mx, membranbundet IgM og elongeringsfaktor (EF1aB).. Prøvene ble oppbevart på isoporbokser med is, dekket med aluminiumsfolie. Det ble jobbet i avtrekkskap på en egen Real Time PCR lab. Det ble tillaget tripletter av prøvene, altså tre RT-PCR reaksjoner for hver prøve. Det ble kjørt 24x3 prøver, samt 2 kontrollprøver, og 2 prøver med kun vann. Til hver prøve ble det tilsatt følgende konsentrasjon med reagenser

**Tabell 3: Konsentrasjon av komponenter benyttet til qPCR**

Reagens	Elongeringsfaktor 1A ( $\mu$ l)	Membranbundet IgM ( $\mu$ l)	MX ( $\mu$ l)
Mastermix	10	10	10
Forward primer	0.18	0.08	0.08
Reverse primer	0.18	0.08	0.08
Probe	0.5	0.4	0.4
Rnasefritt H <sub>2</sub> O	6.6	6.94	6.94
cDNA	2.5	2.5	2.5

Mastermix (FW, RW, probe og vann) ble tilsatt i nevnte rekkefølge med riktige konsentrasjoner (tabell 3) til PCR-strips, som ble vortekset og sentrifugert. 17.5  $\mu$ l mastermix ble pipetert til hver sin brønn i 96 brønners fast optical brett, og 2,5  $\mu$ l cDNA ble deretter tilsatt. Brettene ble sentrifugert, og qPCR sykluser på til sammen 40 minutter ble kjørt.

## 2.5 Western blotting

Western blotting er en teknikk for å påvise spesifikke proteiner ved hjelp av antistoffer. Proteiner i en prøve, som kan være et lysat av celler eller vev, separeres etter størrelse ved gel elektroforese. Deretter overføres proteinene til en membran av polyvinyliden flouride (PVDF). Membranen eksponeres deretter for et antistoff rettet mot det proteinet en ønsker å detektere. Et sekundært antistoff konjugert til en kjemisk/fluoriserende komponent inkluderes. Sekundært antistoff binder til primære antistoff som igjen er bundet til proteinet. Ved deretter å vaske bort alle ubundne antistoff og eksponere membranen, vil bundne antistoff avgi et kjemoluminerende eller fluoriserende lys, alt avhengig av hvilke metode som benyttes. Westernblott består av en rekke ulike steg som inkluderer:



1. Preparering av prøvematerialet med proteinene (høsting av cellelysat, koking, sonikèring, sentrifugering osv) som beskrevet tidligere.
2. Separering av proteinene ved gel-elektroforese (SDS-PAGE).
3. Overførsel av proteinene til membran (blotting).
4. Blokkering av uspesifikke bindingssteder på membranen.
5. Eksponering av membranen for et primært antistoff rettet mot proteinet en ønsker å detektere og videre for et sekundært antistoff konjugert til en markør.
6. Fremkalling av membranen.
7. Eventuell stripping av membranen ved gjenbruk.

### 2.5.1 SDS polyakrylamid-gel elektroforese (SDS-PAGE)

SDS-PAGE er en metode hvor ufoldede proteiner med negativ ladning kjøres gjennom en gel mot en anode. Gelen består av porer som gjør at store proteiner vandrer fortere enn små proteiner gjennom gelen. Proteinene skilles dermed fra hverandre grunnet elektrokjemisk og størrelsesrelaterte egenskaper

Proteinprøvene appliseres i individuelle brønner på en gel av polyakrylamid. Aggregerte monomerer av polyakrylamid lager porer med en ønskelig diameter som selekterer proteinene etter størrelse. En kraftig negativ detergent i form av Natrium Dodecyl Sulfat (SDS) må også tilsettes. SDS binder til hydrofobe regioner på proteinene, bryter foldingene, og omgjør de til utstrakte polypeptidkjeder. I tillegg tilsettes en reduserende komponent som bryter disulfid-broene, enten direkte i prøvematerialet eller i brønnene. Disse komponentene er nødvendig for å bryte ned komplekser og sørge for at selv subenheter av proteiner skal kunne vandre gjennom porene.

Proteinene foreligger nå som enkle polypeptidtråder med bundne SDS molekyler. Polypeptidkjedenes egentlige ladning maskeres av den negative ladningen til SDS, og netto ladning til molekylene avhenger nå kun av størrelsen til peptidtråden. Alle proteinene vil vandre mot en positiv ladning tilført i motsatt ende av gelen. Størrelsen til kortere peptidtråder vil imidlertid gjøre at de vandrer fortere gjennom gelen enn lengre peptidtråder. Etter endt kjøring av gel vil dermed mange isolerte proteinbånd ha dannet seg langs gelens lengderetning (Alberts *et al.*, 2008).

I mine forsøk ble det benyttet 12, 15 og 17 brønners Nu PAGE 4-12% Bis-Tris geler (Novex®). Disse ble vasket med en 1x running buffer (50 ml NuPAGE™ MOPS SDS Running Buffer (Novex®). Størrelsesmarkøren Magic Mark® XP Western Protein Standard (Novex® ) ble tilsatt i en eller to av brønnene. Applikasjonsvolumet av prøvemateriale var avhengig av antall brønner på gelen som ble benyttet (tabell 4). Rett før kjøring ble også 500 µl NuPAGE™ Antioksidant (Novex®) tilsatt direkte til det indre kammeret. Gelene ble kjørt på 200V i 35-45 minutter, til fronten var ½ cm fra bunnen av gelen.

**Tabell 4: Applisert volum prøvemateriale i forskjellige geler**

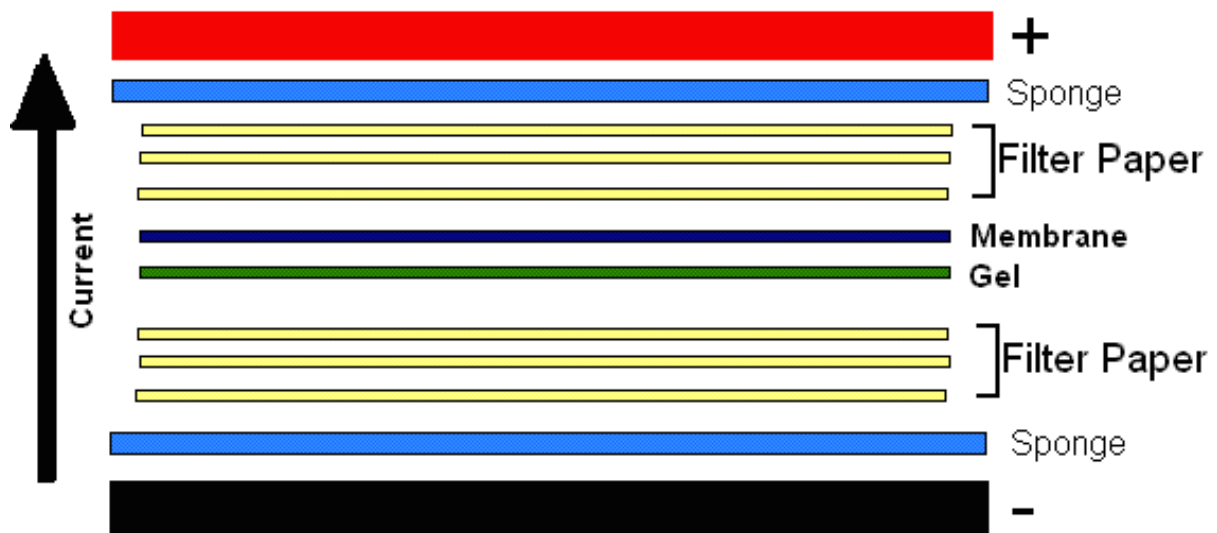
	12 brønners gel	15 brønners gel	17 brønners gel
Applisert prøvemateriale i hver brønn (µl)	18-20	16	12

### 2.5.2 Blotting

Proteinoverførsel fra gel til membranen skjer vanligvis ved en "våt" elektroforese teknikk. Her ligger blottemembran og gel i nær tilknytning til hverandre i lukkede kassetter med svamper, og omgitt av en buffer som leder elektrisitet. Organisering i blottekassetten illustreres i figur 4 .

I mine forsøk ble to ulike fremkallingsmetoder benyttet; kjemoluminesens og infrarød fluorescens. Til kjemoluminesens ble blottemembranen Immobilon (Millipore) I PVDF benyttet, mens Immobilon-FL (millipore) i PVDF ble brukt ved infrarød fluorescens. Membranen ble aktivert 5 minutter før SDS-PAGE var ferdigkjørt. Aktiveringen foregikk 1 minutt i 99,8% metanol, deretter 1 minutt i dH<sub>2</sub>O, før den ble overført til inkuberingsbrett med 1x blottebuffer frem til bruk. Blottekassetten ble fuktet i dH<sub>2</sub>O, og filterpapir og svamper ble fuktet i 1x blottebuffer før bruk. Blottekassetten ble satt sammen som vist i figur 1. Luftbobler ble fjernet mellom membran og gel og

blottekasseten plassert i beholderen. Indre kar ble fylt opp med blottebuffer, mens det ytre karet ble fylt opp med dH<sub>2</sub>O. Blotting ble gjennomført over 60 min på 30V.



**Figur 4: Sammensetning av svamper, filterpapir, gel og filtermembran i et blottekammer.** Figur hentet fra nettadressen: <http://en.wikipedia.org/wiki/Electroblotting>

### 2.5.3 Blokkering og inkubering med primært og sekundært antistoff

Et viktig trinn i prosedyren er behandling av membranen med blokkeringsbuffer. Blokkeringsbufferen består som regel av proteiner som vil binde til membranen. Dette hindrer uspesifikk binding av antistoffene som brukes til påvisning av proteinet en ønsker å studere. Ulike blokkeringbuffer benyttes ved ulike deteksjonssystemer. Ved kjemoluminescens deteksjon brukes 5% tørrmelk uten fett blandet i TTBS, eller bovin serum albumin (BSA) (Sigma Aldrich). Ved fluoresens deteksjon benyttes blokkeringbuffer (Odyssey).

Etter blotting ble blottekasseten demontert og membranen ble vasket 3x 5 min i TTBS og deretter blokkert i egnet blokkeringbuffer i 30 min med risting i romtemperatur.

### 2.5.4 Inkubering med antistoff

Visualisering av det primære antistoffet oppnås ved binding av et sekundært antistoff med en av to deteksjonsmetoder. Den ene måten er består av sekundært antistoff koblet

til enzymet "horseradish peroxidase" (HRP). Kjemoillumensens med HRP er svært sensitiv

Deteksjon av bundne primære antistoff med sekundære antistoff med et påbundet fluorokrom er en ny metode innenfor Western Blotting. Ved å benytte antistoff fra ulike arter med fluorokromer som avgir lys i ulike bølgelengder, er muligheten for å detektere flere antigen på samme blot tilstede. En annen fordel med immunofluoriserende western blot er at de bundne sekundære antistoffene vil avgi en konstant mengde lys, som vil være tilstede i flere måneder. Denne metoden er mindre sensitiv enn kjemoilluminesens. Uspesifikk binding fører til autofluorisens som kan gi mye bakgrunn (Greenfield, 2014).

Etter blokkeringen ble membranen overført til et 50 ml rør (Falcon) og inkubert med primært antistoff ved 4°C over natten med rotering. De primære antistoffene var fortynnet i blokkeringsbuffer, og fortynningen av disse var avhengig av hvilke antistoff som ble benyttet. Membranen ble vasket 3x 5 min i TTBS med risting (VIBRAX VXR Basic (IKA®)). For fluoriserende western blot ble membranen inkubert med sekundært antistoff fortynnet 1:10 000 i blokkingsbuffer (odyssey)/TTBS 1:1 i en lystett boks i 60 min ved romtemperatur. Det sekundære antistoffet var enten geit anti-kanin IRDye 680/800 nm (Li-Core), eller geit anti mus IRDye 680/800 nm (Li-Core).

For kjemoluminiserende Western blot ble membranen inkubert i 1:10 000 fortynning av det sekundære antistoffet fortynnet i 5% tørrmelk/TTBS ved 60 minutter. Deretter ble primært antistoff tilsatt (Beskrevet senere). Etter inkubering med sekundært antistoff ble membranen vasket 3x 5 min i TTBS ved risting. Til denne metoden ble 1:10 000 fortynning av sekundært geit anti kanin IgG-HRP (Lot:E1313)(Santa Cruz Biotechnologies) eller Geit anti mus IgG-HRP (Lot: E3113)(Santa Cruz Biotechnologies) benyttet. Membranen vaskes i 3x5 min (minimum 2 utskiftninger) i TTBS på bordshaker i den samme boksen. For immunofluoriserende membraner måtte vasken fremdels foregå i lystette fremkallingsbokser, og siste vask før fremkalling ble utført med TBS uten tilsatt Tween-20 for å hindre unødvendig bakgrunn. Etter dette kunne membranen fremkalles.

### 2.5.5 Fremkalling

Ved deteksjon med infrarød fluorescens ble fremkallingen av membranene gjort i Odyssey CLx fremkallingsmaskin (Li-Core). Fremkallingsoverflaten i maskinen ble vasket i 70% etanol (Sigma Aldrich) og dH<sub>2</sub>O og deretter tørket. Membranen ble lagt i maskinen og luftbobler som kunne redusere kvaliteten ved fremkallingen ble fjernet. Membranene ble eksponert i mellom 15-20 min.

Etter fremkallingen kunne membranene lagres eller stripes for antistoff. Ved lagring ble blottemembranen vasket 1 minutt i metanol, og noen minutter på TTBS. Den ble deretter forseglet i fremkallingsmapper (Novagen), og pakket inn i sølvfolie. De ble oppbevart i kjøleskapet på 4°C.

Kjemoluminerende deteksjon av membranene ble gjort ved å tilsette 700 µl peroxide løsning (fremkallingsløsning A, prodnr: 1856135) blandet med 700 µl forsterker (Fremkallingsløsning B, prodnr: 1856136) fra SuperSignal West Pico Chemoluminescent (prodnr: 34080) (Thermo Scientific). Membranen ble lagt i en plastboks med proteinsiden opp, dekt med fremkallingsløsning, og deretter lagt i fremkallingsmappe. Fremkallingen ble gjort i Molecular Imaging System (Carestream Health).

Etter fremkallingen kunne membranene lagres eller stripes for antistoff. Ved lagring ble membranene vasket noen minutter på TTBS, før den ble forseglet i plastmembraner, og pakket inn i sølvfolie. De ble oppbevart i kjøleskapet på 4°C.

### 2.5.6 Reinkubering og stripping

Membranene kunne direkte reinkuberes med loadingkontroll. Benyttet loadingkontroll var enten aktin anti mus/kanin (sigma-Aldrich), eller elongeringsfaktor2 anti kanin (Cell Signaling) ved fluorescens. Membranene ble vasket 3x5 minutter med TTBS etter endt kjøring, og inkubert over natten med et nytt primært antistoff. Neste dag ble det vasket på nytt i 3x5 minutter med TTBS, før det ble inkubert med sekundært antistoff.

Stripping av membran ved kjemoluminerende deteksjon ble gjort i 0,2M NaOH i 10 minutter. Membranene ble deretter vasket i 3x5 min i dH<sub>2</sub>O først, og deretter 3x 5 min i TTBS. Membranene kunne nå reinkuberes med primært antistoff. For fluorescens ble det benyttet odyssey Newblot™ PVDF stripping buffer (Li-Core).

## 2.6 Selekttering av IgM<sup>+</sup> leukocytfraksjoner

Dette er en metode for å skille leukocytter som fremviser membranbundet IgM (Naive B-celler og plasmablaste) fra leukocytter som ikke gjør det. Magnetiske PAN Mouse, CELLlection Dynabeads (Invitrogen) er dekket med bindingssteder for antistoff. I dette tilfellet benyttes et antistoff spesifikt for membranbundet IgM (*IgF1-18*) fremvist av leukocytter. Etter en viss tid vil antistoff binde til IgM, som deretter overføres til Dynabeads. Antistoffet binder dermed til bindingssetene på Dynabeads. Ved å benytte en magnet kan kulene midlertidig fikseres, som tillater at ubundne celler fjernes fra prøvene.

Høstede celler ble spunnet ned på 600x g i eppendorfrør, og 0,5 ml av antistoffet fortynnet 1:300 i L-15 5% FBS, ble tilsatt pr.  $7 \times 10^6$  celler, og satt på is i 30 min. Samtidig ble 30  $\mu$ l dynabeads/ $7 \times 10^6$  leukocytter klargjort. Dynabeads ble vasket 3 ganger i 1 ml PBS. Cellene tilsatt 1 ml PBS + 2% FBS ble spunnet ned i 5 minutter ved 600 x g. Supernatant ble fjernet, og 0,5 ml PBS + 2% FBS ble tilsatt til hver prøve. Dynabeads (30  $\mu$ l dynabeads/ $7 \times 10^6$  i 1 ml PBS + 2% FBS) ble deretter tilsatt på eppendorfrør, resuspendert, og satt på motor i 30 min ved 4°C. Deretter ble rørene plassert på magneten i 2 minutter og vasket 2 ganger. Ved første vask ble Ig<sup>-</sup> fraksjonen samlet og oppbevart på is. Deretter ble 200  $\mu$ l L-15 10% FBS med 4  $\mu$ l DNase/prøve tilsatt til hvert eppendorfrør, og inkubert ved romtemperatur i 15 min under kontinuerlig blanding. Neste trinn var vigorøs pippetering av prøvene (5-10 ganger), før de ble plassert på magneten i 2 min. Ig<sup>+</sup> fraksjonen var nå fri i prøven, og ble overført til rør med 2 ml L15 + 10% FBS. Dette trinnet ble gjentatt 3 ganger. Prøvene ble så samlet som beskrevet i pkt. 2.3.1.

## 2.7 Anrikning av IgM med protein A og G.

Det har vist seg vanskelig å detektere proteiner ved Western blot fra serum som er et velkjent problem ved Western blot av serum. Tidligere er metode for å oppkonsentrere supernatanter beskrevet. Her er metode for anrikning av proteinet (IgM) fra en serumprøve beskrevet.

Først ble 50  $\mu$ l Protein A og 50  $\mu$ l protein G tilsatt i samme elueringsrør. Deretter ble 400  $\mu$ l PBS tilsatt i elueringsrørene før det ble spunnet ned på bordspinner, og væske ble

tømt ut. Dette ble gjentatt 5 ganger. Hundre µl Serum fra laks og 600 µl PBS ble deretter tilsatt i elueringsrøret med proteinkulene og inkubert i 2 timer. Etter to timer ble innholdet i elueringsrøret overført til eppendorfrør, som deretter ble spunnet ned og væsken kastet. Deretter ble 400 µl PBS tilsatt, spunnet ned, og væsken kastet på nytt. Dette ble gjentatt 3 ganger. Deretter ble kulene overført til et nytt eppendorfrør ved hjelp av 1000 µl pipetter med avklipt tupp, noe som gjorde at kulene fikk plass. Eppendorfrøret ble deretter tilsatt 200 µl kald PBS, og 200 µl LDS sample buffer. Prøven ble kokt på 90°C i 5 minutter, sentrifugert på 12 000 rcf i 5 minutter før de ble nedkjølt/fryst.

## **2.8 Tillaging av cytopinnpreparater og farging av celler med May Grünwald/Giemsa**

Cytopinn er en metode som brukes for å feste og immobilisere celler som vokser i løsning/non adherente til et underlag (objektglass). Dette gjør at morfologien til cellene i prøven kan undersøkes direkte, eller inkuberes med antistoff (immunostaining) for å undersøke tilstedeværelse/plassering til spesifikke markører inne i celler. I dette forsøket er det fokus på morfologi for å eventuelt identifisere tilstedeværelsen til B-celler og plasmaceller fra prøvene (pkt 3.2). For å kunne se cellene må de farges, og ved disse forsøkene ble May Grünwald- og Giemsa-farger benyttet. Dette er en fargemetode som kombinerer metylen blått (basisk), azures (Basisk) og eosin (Syre) farge. Den positive ladningen til de basiske fargene gjør at de farger cellekjerne, granuler til basofile granulocytter og RNA til hvite blodceller. Eosin er negativt ladet og gjør at cellekjerne til røde blodceller og granuler til eosinofile granulocytter farges. Altså farges cellekjerne til røde blodceller rød mens hvite blodcellers cellekjerne farges blå (Koh, 2013).

Applikasjonsvolumet i cytopinnkassetene var 250 µl, og medførte at prøvematerialet måtte fortynnes med L-15 i eppendorfrør for å gi det optimale celleantallet. Eppendorfrørene ble vortekset og applisert til tellekassetter. Tellekassetene av plast ble utstyrt med merkede objektglass, og uthulede filterpapir tillaget fra en eksisterende mal. Kassetene ble plassert i Cyto-Tek® (Sakura). Celleprøvene ble fortynnet i L-15 slik at omtrentlig 80 000 celler ble applisert til kassetene. Cytospinneren ble kjørt på 2000 rpm i 5 minutter

Etter cytospinn ble cellene fiksert i metanol i 10 minutter ved romtemperatur. Deretter ble de farget med May-Grünwald (Accustain, Sigma Aldrich) fargestoff i 5 minutter. Neste trinn var tilfarging med Giemsa-farge (Sigma Aldrich) fortynnet 1:10 i dH<sub>2</sub>O i 25 min. Deretter ble de hurtig skylt med dH<sub>2</sub>O, og tørket. Preparatene ble så mikroskopert. Det ble tatt representative bilder ved bruk av 10x og 40x ganger objektivene.

## 2.9 In vivo immuniseringsforsøk

Hensikten med forsøket som involverte 430 laks var å utprøve nye metoder som kan forbedre og forenkle arbeidet med B-celler fra fisk. I tillegg ønsket vi å undersøke markører forbundet med lokalisering og modning av B-celler og Antigen Sekreterende Celler (ASC). *In vivo* er et ypperlig virkemiddel for best å kunne observere effekten av vaksiner i en levende organisme. Det gir også et mer nyansert bilde av endringene av cellulære markører, samt et korrekt tidsperspektiv. Fisken benyttet i dette forsøk ble delt i fire ulike grupper, som hver ble vaksinert med ulike kombinasjoner av immunostimulanter.

### 2.9.1 Forsøksfisk og forsøksgrupper

All fisken gikk med 24 timer lys i kar på universitetets havbruksstasjon i Kårvika. Temperaturen i karene ble økt fra (4°C) til 12°C en uke før immunisering. Føring foregikk etter fiskens egen appetitt, men ble stoppet dagen før uttakene.

Et 2x konsentrert SAV antigen (PD) blandes med "dilution buffer". Viruset som antigenet er basert på ble konstruert fra F93-125 (SAV1) virus stammen, og dyrket frem i CHSE-214 Cellelinjen, før det ble aktivert. Formuleringen benyttet tilhører MSD Animal Health (Bergen, Norge), og ingen ytterligere informasjon om bufferen ble vedlagt. SAV antigen formuleringen ble enten brukt alene, eller i kombinasjon med immunstimulantene CpG/polyIC. Phosphorithioate-modifisert CpG ODN fra Thermo Scientific, Ulm, Tyskland med sekvensen; (T\*C\*G\*T\*C\*G\*T\*T\*T\*T\*G\*T\*C\*G\*T\*T\*G\*T\*C\*G\*T\*T ,) ble fortynnet i 10 med mer Tris, 1 nM EDTa ved pH 8. Videre ble konsentrasjon (5 mg/ml) ytterligere fortynnet 10x ved vaksinerings. Forsøksgruppene og antigen foreligger i tabell 5:



**Tabell 5. Utforming av oppsettet av gruppene fra *in vivo* forsøket.** Tabellen inkluderer gruppenummer, hvilket antigen som ble benyttet innenfor hver gruppe, dosen, antall laks vaksinert innenfor hver gruppe, og hvilke organ som ble høstet

<b>Gruppe</b>	<b>Antigen</b>	<b>Dose (µl)</b>	<b>Antall laks injisert med antigenet</b>	<b>Organ høstet ved hvert uttakstidspunkt</b>
<b>1</b>	PBS (kontroll)	100	70	Milt og hodenyre (4 fisk
<b>2</b>	<i>CpG/polyIC</i>	50 µg CpG + 50 µg poly I:C	70	Milt og hodenyre (4 fisk
<b>3</b>	<i>SAV antigen</i>	50 µl SAV antigen + 50 µl vaksinebuffer	70	Milt og hodenyre (4 fisk
<b>4</b>	<i>SAV + CpG/polyIC</i>	50 µl SAV antigen + 50 µg CpG + 50 µg poly I:C	70	Milt og hodenyre (4 fisk

### 2.9.2 Vaksinerings og uttak

Før start ble også 10 laks avlivet i benzokain, tappet for blod og veid. Fisken ble delt inn i fire grupper, som både ble merket med panjet fargekoder for hver gruppe på buken, og med Pit-tag intraperitonalt. Fisken ble samtidig vaksinert med riktige kombinasjon antigen og immunostimulanter. Vaksinerings ble gjort med en intraperitoneal dose injisert med vaksinesprøyte.

Fisken ble hentet ved 4 uttak sommer og høst 2014. Det ble gjort uttak fra hodenyre og milt til Western blot analyse fra alle gruppene ved hvert uttakstidspunkt. Uttakstidspunktene var 5 dager, 2 uker, 6 uker og 9 uker etter vaksinerings. Organhøstingen og sampling ble gjort som beskrevet i pkt 2.1, og prøvene ble undersøkt ved Western blot analyse.

## 3 Resultater

### 3.1 Uttesting av antistoffer mot kjente markører involvert i modning av B-celler ved Western Blot.

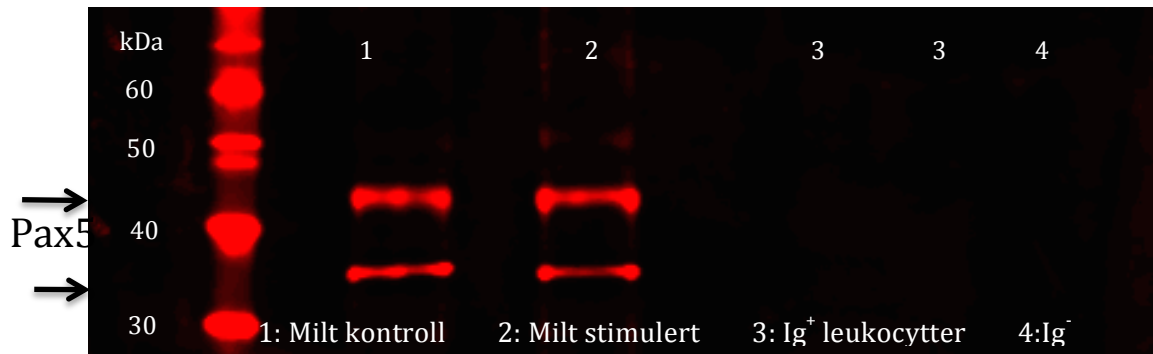
Hovedproblemstillingen i denne masteroppgaven er å beskrive potensielle indikatorer på B-celle modning hos atlantisk laks. For å oppnå dette er funksjonelle markører spesifikke for laks essensielt. Derfor er transkripsjonsfaktorer som har en kjent rolle i modning og differensiering av B-celler til plasmaceller fra andre vertebrater, og som er konservert mellom vertebrat-phyla, benyttet som et utgangspunkt. Reaktiviteten til tilgjengelige antistoffer mot disse markørene er undersøkt ved Western blot på leukocytter fra atlantisk laks.

#### 3.1.1 Uttesting av tre polyklonale antistofflagd mot ulike områder av Pax5 til regnbueørret

Det har blitt laget tre ulike antistoffer mot Pax5 fra regnbueørret som gjenkjenner ulike deler av Pax5 proteinet (Zwollo *et al.*, 2008; MacMurray *et al.*, 2013).

##### 3.1.1.1 Antistoff tPax5-PD

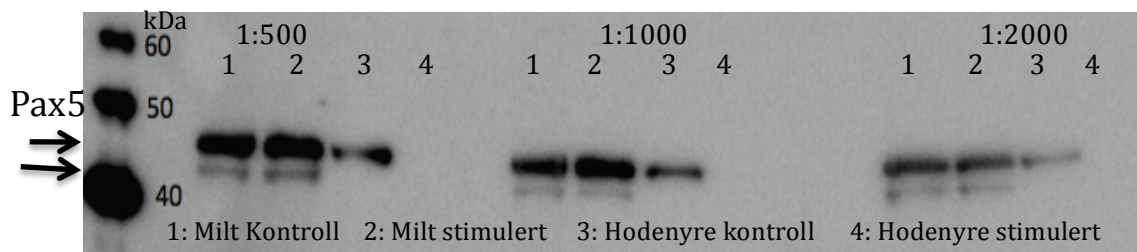
tPax5-PD er et polyklonalt antistoff laget mot komplett paret domene av Pax5 fra regnbueørret (Zwollo *et al.*, 1998). Western blot med dette antistoffet på lysat fra leukocytter isolert fra milt ga to bånd på omtrent 35 kDa og omtrent 45 kDa (Figur 5). Figuren viser også prøver av Ig<sup>+</sup> og Ig<sup>-</sup> fraksjoner av leukocytter fra laks. Her er ingen bånd synlige. Forsøket ble gjentatt en gang, og bånd med samme molekylvekt som de presentert i figur 5 kunne også da observeres. Dette viser at resultatene med tPax5-PD antistoffet lar seg reproducere



**Figur 5: Western blot med antistoffet tPax5-PD på leukocytter isolert laksemilt.** Leukocytter fra tre individer høstet 1 dag etter stimulering *in vitro* med  $2 \mu\text{M}$  CpG er sammenslått. Ustimulerte kontrollprøver fra 3 individer høstet ved samme tidspunkt, og er sammenslått i figuren. Leukocytter fra 2  $\text{Ig}^+$  leukocyttfraksjoner, og 2  $\text{Ig}^-$  leukocyttfraksjoner (høyre) er inkludert. Her er prøvemateriale fra 2 individer sammenslått. Størrelsesmarkøren MagicMark er inkludert. Membranen er eksponert i 15 min.

### 3.1.1.2 Antistoff tPax5-E10

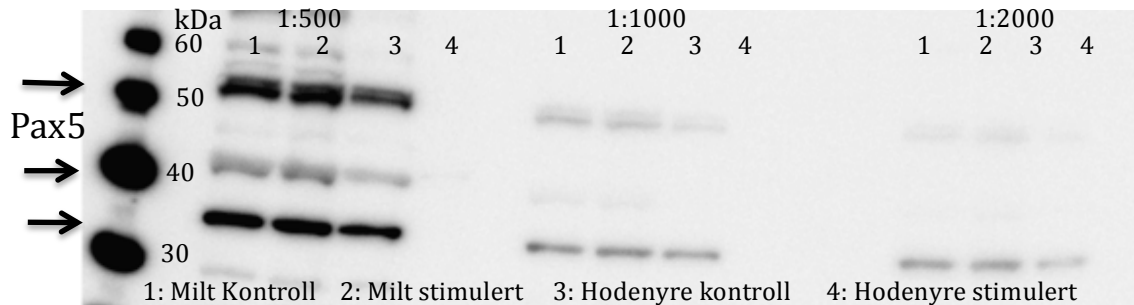
tPax5-E10 er et polyklonalt antistoff lagd mot et peptid kodet av C-terminal ende til transkripsjonsfaktoren Pax5 hos regnbueørret (MacMurray *et al.*, 2013). Tre ulike fortyninger av antistoffet ble testet ved Western blot på leukocytter isolert fra milt og hodenyre (figur 6). Leukocytterne ble stimulert med CpG *in vitro*, og høstet 1 dag etter stimulering. Kontrollprøver høstet ved samme tidspunkt er inkludert. To bånd mellom 40-50 kDa ble påvist i stimulererte og ustimulererte leukocytter fra milt og i ustimulererte leukocytter fra hodenyre. Ved økende fortyning av antistoffet ble båndene mindre kraftige.



**Figur 6: Western blot med antistoffet tPax5-E10 på leukocytter fra milt og hodenyre fra laks.** Leukocytter fra ett individ ble stimulert *in vitro* med  $2 \mu\text{M}$  CpG, og høstet 1 dag etter stimulering. Ustimulerte leukocytter ble høstet ved samme tidspunkt. Størrelsesmarkøren MagicMark er inkludert. De samme prøvene ble applisert tre ganger og analysert med tre ulike fortyninger av antistoffet. Membranen ble eksponert i 15 minutter.

### 3.1.1.3 Antistoffet tPax5-E6

tPax5-E6 er et polyklonalt antistoff lagd mot et peptid på 18 aminosyrer kodet av exon 6 fra genet for Pax5 hos regnbueørret (MacMurray *et al.*, 2013). Prøvene ble testet mot en fortynningsrekke (1:500, 1:1000 og 1:2000) av antistoffet ved Western blot. På det samme prøvematerialet fra leukocytter som beskrevet i 3.1.1.2. Ved 1:500 fortykning av tPax5-E6 ble det påvist en rekke bånd av ulik størrelse (Figur 7). Ved høyere konsentrasjon av antistoffet ble det påvist tre bånd, ett på 35 kDa, et i overkant av 40 kDa og ett i overkant av 50 kDa. Båndene var betydelig kraftigere ved 1:500 fortykning av antistoffet, men i likhet med figur 6 uttrykkes ikke 35 kDa båndet i stimulerede prøver fra hodenyre, og alle båndene forsvinner ved høyere fortykning av antistoffet.



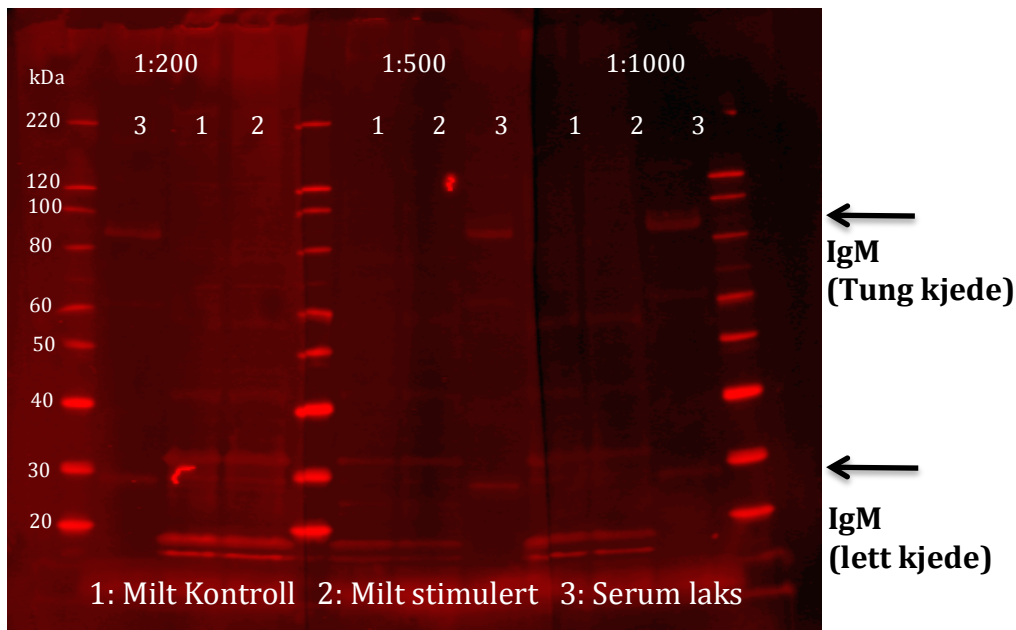
**Figur 7: Western blot med antistoffet tPax5-E6 på leukocytter fra milt og hodenyre fra laks.** Leukocytter fra ett individ ble stimulert *in vitro* med 2  $\mu$ M CpG, og høstet 1 dag etter stimulering. Ustimulerte leukocytter ble høstet ved samme tidspunkt. Størrelsesmarkøren MagicMark er inkludert. De samme prøvene ble applisert tre ganger og analysert med tre ulike fortyninger av antistoffet. Membranen ble eksponert i 15 minutter

### 3.1.1.4 Oppsummering Pax5 antistoffer

Resultatene fra de innledende forsøkene viste at Pax5PD gjenkjente bånd på omtrentlig 35 kDa og 45 kDa, mens tPax5-E10 gjenkjente to bånd mellom 40-50 kDa. Båndene på omtrentlig 35 kDa (tPax5-PD) blir derfor omtalt som Pax5 35 kDa, mens båndene på mellom 40-50 kDa (tPax5-PD, tPax5-E10) blir referert til som Pax5 45 kDa i de videre forsøkene. Basert på full-lengde cDNA sekvens for Pax5 fra laks er molekylvekten beregnet til 41,7 kDa (upubl.data). I de videre forsøkene valgte vi å bruke antistoffene tPax5-PD og tPax5-E10 som gjenkjenner bånd i denne størrelsesorden. Tidligere publiserte resultater fra regnbueørret (Zwollo *et al.*, 1998; MacMurray *et al.*, 2013) gir indikasjoner på at Pax 35 kDa og Pax5 45 kDa båndene representerer ulike lakse-Pax5 varianter, men for å kunne bekrefte at disse båndene representerer Pax5 fra laks er videre karakterisering nødvendig (se diskusjon).

### 3.1.2 Antistoff mot IgM

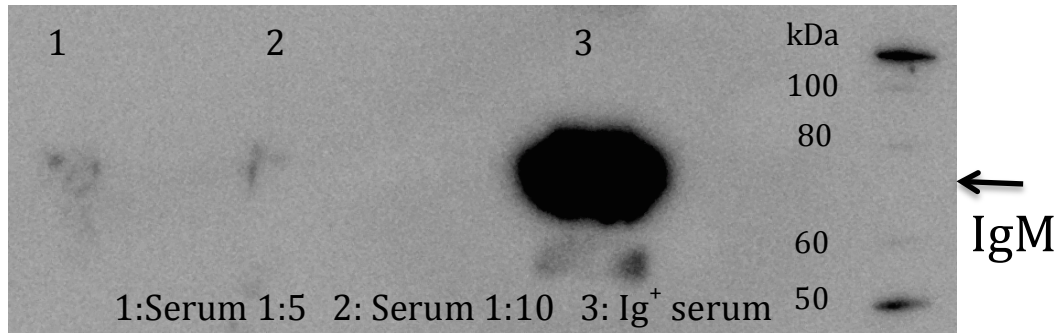
Antistoffet IgF1-18 er et monoklonalt antistoff som er lagd mot rensset IgM fra plasma til regnbueørret. Det har blitt vist at dette antistoffet kryssreagerer med IgM fra laks og at det gjenkjenner begge isotypene av IgM (Hedfors *et al.*, 2012). Antistoffet ble først testet ved Western blot på CpG stimulerede leukocytter isolert fra milt og på lakseserum. Tre fortyndninger av antistoffet IgF1-18 ble undersøkt (Figur 8) ved Western blot. Fra serumprøvene kan et bånd i overkant av 80 kDa observeres. Fra de samme prøvene kan også et bånd i underkant av 30 kDa sees. Molekylvekten er sammenfallende med henholdsvis tung og lett kjede fra IgM hos laks (Magnadóttir, 1998). Båndene er like kraftige ved 1:200, 1:500 og 1:1000 fortyndning av antistoffet. Ingen bånd med molekylvekt forenelig med verken lett eller tung kjede kan observeres i prøvene fra leukocytene.



**Figur 8: Western blot med antistoffet IgF1-18 på serum og leukocytter isolert fra laksemilt.** Leukocytter fra tre individer er stimulert med 2  $\mu$ M CpG *in vitro*, og høstet 1 dag etter stimuleringen. Ustimulerte kontrollprøver er høstet ved samme tidspunkt. Størrelsesmarkøren MagicMark er inkludert. Antistoffet er fortennet 1:200, 1:500 og 1:1000. Membranen er eksponert i 20 minutter.

På grunn av de svake båndene som ble detektert i det første blottet med antistoffet IgF1-18 ønsket vi også å teste det på en serumprøve som ble anriket for Ig. Ig fra lakseserum ble anriket på en protein A/G kolonne og analysert ved Western blot med antistoffet IgF1-18. Fra serumprøvene (figur 9) sees utydelige bånd mellom 60 og 80 kDa. Fra serum anriket mot protein A og G ble et kraftig bånd mellom 60 og 80 kDa observeres.

Dette er i overensstemmelse med molekylvekten for IgM tung kjede (71,5) (Magnadóttir, 1998).



**Figur 9: Western blot med antistoffet IgF1-18 på fortynnet serum, og serum anrikt mot protein A og protein G, fra laks.** Serumprøver fra ett individ er fortynnet 1:5, 1:10 og serumprøver anrikt mot protein A og protein G er undersøkt. Størrelsesmarkøren MagicMark er inkludert. Antistoffet er fortynnet 1:200, og membranen er eksponert i 15 minutter.

### 3.1.3 Antistoffer mot blimp-1: Blimp-1/PRDI-BF1 (C14A4) og (H-150): sc-25380

Blimp1 er en transkripsjonsfaktor med kjent funksjon i terminal differensiering av B-celler til plasmaceller fra høyerestående vertebrater, og kan være en mulig markør for dette også hos teleoster (John & Garrett-Sinha, 2009; Zwollo, 2011). To kommersielle polyklonale antistoff fra henholdsvis Cell signaling ((H-150): sc-25380) og Santa Cruz (PRDI-BF1 (C14A4)) ble testet ved Western blot på leukocytter fra milt og hodenyre til laks høstet 3 og 7 dager etter stimulering med 2  $\mu$ M CpG *in vitro*. Flere fortynninger av antistoffene ble forsøkt, men ingen bånd med forventet størrelse (90 kDa) ble detektert (resultater ikke vist).

### 3.1.4 Antistoff mot Xbp1 tXbp1-S

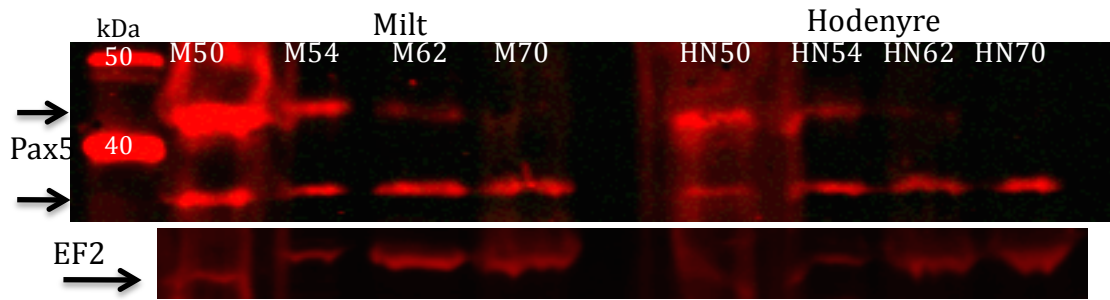
Antistoffet tXbp1-S er laget mot en peptidsekvens ved C-terminalen til transkripsjonsfaktoren Xbp1 fra regnbueørret, og er tidligere testet ved Western blot på leukocytter fra regnbueørret (Barr *et al.*, 2011). Vi testet i denne oppgaven ulike fortynninger av antistoffet på leukocytter isolert fra milt og hodenyre. Ingen bånd kunne detekteres fra noen av disse forsøkene (resultater ikke vist).

## 3.2 Optimalisering av metode for isolering av B-celler.

### 3.2.1 Uttrykk av Pax5 og morfologi hos leukocytter isolert med perkoll-gradienten av ulik tetthet

lymfoide organer fra fisk inkluderer milt og hodenyre. Disse har en heterogen populasjon av celler, som inkluderer strukturelle celler, røde blodceller og leukocytter. For isolering av hele leukocyttopopulasjonen fra milt og hodenyre i laks benyttes vanligvis gradientsentrifugering med perkoll-gradienten på 25% og 54% (Jørgensen *et al.*, 2001). I regnbueørret er det derimot vist at B-celler i hovedsak isoleres i perkoll-gradienten med høyere tetthet, hhv. 60% og 70% (Zwollo *et al.*, 2005). Det var derfor viktig å undersøke om dette også var tilfellet i laks og om vi mistet B-celler ved å benytte 25%/54% perkoll-gradienten under isoleringsprosedyren.

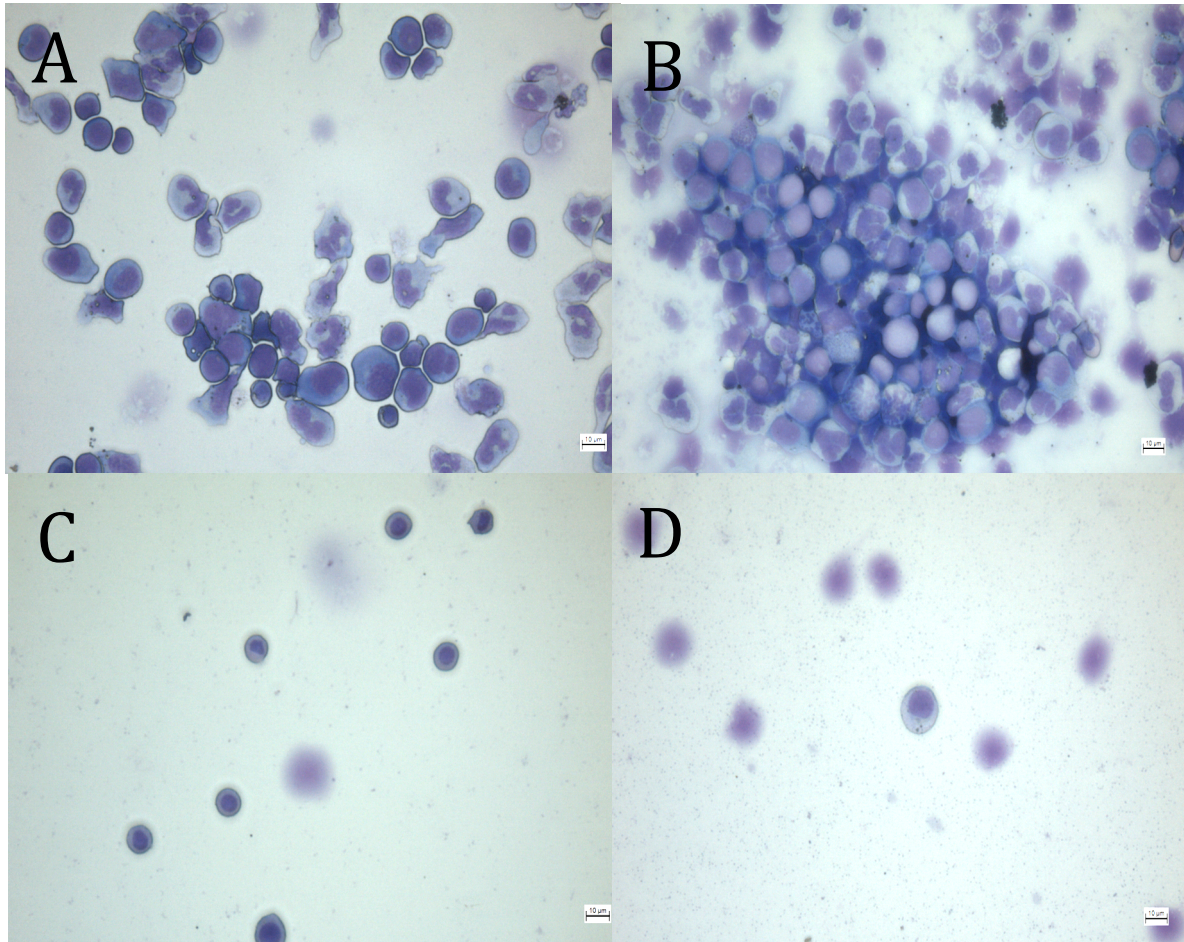
Leukocytter ble isolert fra milt og hodenyre ved å applisere vevshomogenatene på diskontinuerlige gradienten med 70%, 62%, 54% og 50% perkoll som beskrevet i punkt 2.1.4. Etter sentrifugering ble cellepopulasjonene i hver interfase på gradientene analysert ved Western blotting og spunnet ned på objektglass med cytopinnsentrifuge, fiksert, farget og mikroskopert. Western Blot med antistoffet tPax5-PD fra prøver isolert fra 50%, 54%, 62% og 70% perkollgradienten fra milt og hodenyre ga to bånd (Figur 10). Pax5 35 kDa er like kraftig uttrykt i prøvene fra begge organene, og dette proteinet følger i stor grad loadingkontrollen EF2. Det er her uttrykt i celler fra alle gradienten. Pax5 45 kDa er imidlertid kraftigst uttrykt i cellene fra 50% og 54% gradientene. Dette gjelder både for milt og hodenyre.



**Figur 10: Western blot analyse med antistoffet tPax5-PD på celler fra milt og hodenyre isolert med perkollgradienter av ulik tetthet.** Celler fra henholdsvis milt (M) og hodenyre (HN) ble isolert ved sentrifugering på diskontinuerlige gradienter med 50%, 54%, 62% og 70% perkoll. Celler fra hver interfase i gradientene ble analysert ved Western blotting med antistoffet tPax5-PD, og antistoffet EF2 som loadingkontroll. Tilsammen ble omtrent 600 000 celler fra 3 individer slått sammen i hver prøve.

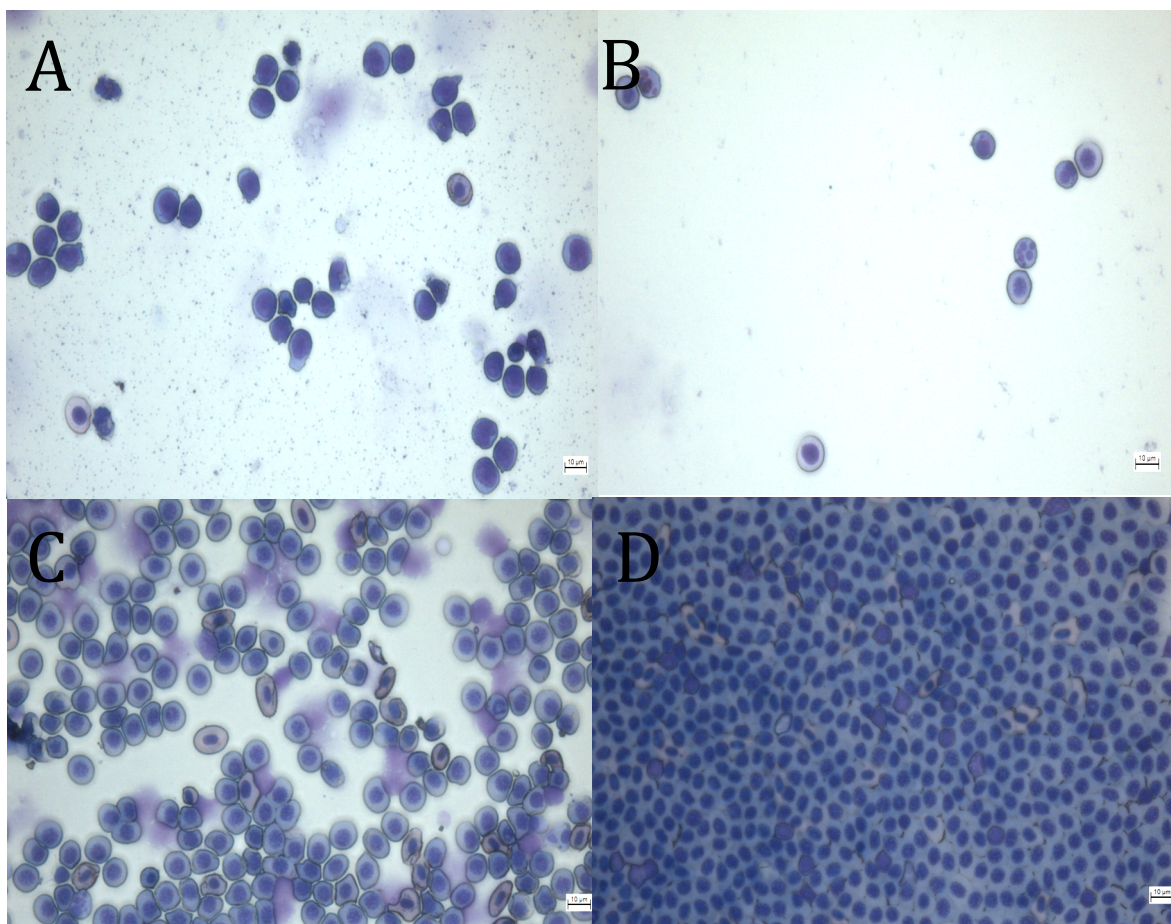
Figur 11 viser bilder fra fikserte og fargede celler fra hodenyre fra dette gradientforsøket. Alle bildene er tatt med 40x med Leica 6000 B mikroskop, og identiske innstillinger. Cellepopulasjonene isolert fra 50% og 54% gradientene var svært heterogene. Fra 50% gradientene (A) ble hovedsakelig celler med bønneformede kjerner (makrofager), polymorfonukleære celler og små rund kompakte celler observert. Fra 54% gradientene (B) fra hodenyre ble det observert et flertall store celler med store cellekjerner. Imidlertid var cellene i stor grad aggregerte, noe som gjorde at gode morfologiske observasjoner var vanskelig, dette i motsetning til 50% gradienten hvor det hovedsakelig var enkeltceller som ble observert. Fra 62% og 70% fraksjonen (C og D) ble få celler observert. Disse var imidlertid små celler med lite cytoplasma, men minnet ikke om typiske modne lymfocytter.





**Fig 11. Hodenyceller fra laks isolert fra 50%, 54%, 62% og 70% perkoll-gradientier.** Cytospinnpreparater av celler fra hver gradient ble fiksert og farget med May-Grünwald/Giemsa. Preparatene ble mikroskopert med Leica 6000 B med 40x objektiv. Representative bilder for hver gradient er vist her. En 10 µm størrelsesmarkør er inkludert nede i høyre hjørne. A) 50% perkoll-gradient. B) 54% perkoll-gradient. C) 62% perkoll-gradient. D) 70% perkoll-gradient.

Cellene fra milt (figur 12) var betydelig mer homogene en cellene isolert fra hodenyre. I 50% gradienten dominerte lymfocyttiliknende celler med stor cellekjerne og lite cytoplasma, mens det i 54% gradienten var enkelte umodne erythrocytter i tillegg til lymfocyttiliknende celler. Andelen umodne erythrocytter økte ved høyere perkollkonsentrasjon i gradientene, og var i prøvene høstet fra 70% perkoll-gradienten fullstendig dominerende (D).



**Fig 12. Miltceller fra laks isolert fra 50%, 54%, 62% og 70% perkoll-gradientier.** Cytospinnpreparater av celler fra hver gradient ble fiksert og farget med May-Grünwald/Giemsa. Preparatene ble mikroskopert med Leica 6000 B med 40x objektiv. Representative bilder for hver gradient foreligger. En 10 µm størrelsesmarkør er inkludert nede i høyre hjørne. A) 50% perkoll-gradient. B) 54% perkoll-gradient. C) 62% perkoll-gradient. D) 70% perkoll-gradient.

### 3.2.2 Isolering av leukocytter med 42% og 54% perkoll-gradientier

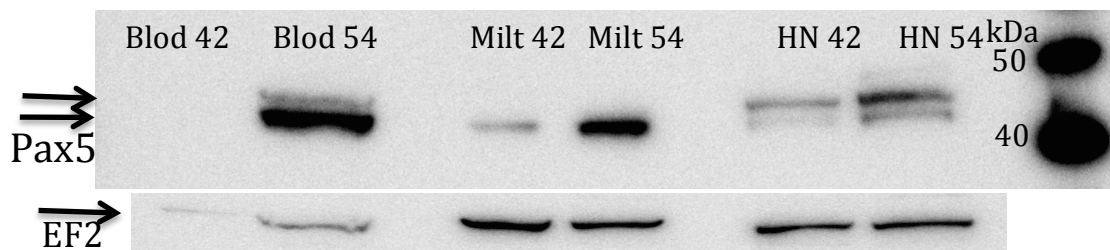
Resultatene fra det første gradientforsøket (pkt 3.2.1) antydte at hovedandelen celler som uttrykker Pax5 er lokalisert i gradientene med 50% og 54% perkoll, og at celler lokalisert i gradientene med høyere tetthet ikke uttrykker Pax5 og heller ikke har typisk lymfocyt eller plasmacelle-morfologi. På bakgrunn av dette ble et nytt gradientforsøk utført hvor en gradient med lavere tetthet (42%), ble benyttet sammen med 54% gradienten benyttet tidligere. Ved dette forsøket ble også prøver fra blod til laks undersøkt. Vi ønsket å undersøke om det ved denne metoden var mulig å skille B-celler fra plasmacellene.

Western blot med anti tPax5-E10 på leukocytter isolert med 42% og 54% perkoll-gradienten sees i figur 13. For milt og hodenyre var det et kraftigere uttrykk av Pax5 45



kDa i prøvene fra 54% gradienten sammenliknet med 42% gradienten. I blod var det også høyt uttrykk av Pax5 45 kDa i cellene fra 54% gradienten, til tross for at lavere proteinmengde ble applisert her sammenliknet med milt og hodenyre.

Til tross for at EF2 uttrykk viser at mindre protein er applisert fra blod 54% er uttrykket av Pax5 45kDa høyest her. Fra hodenyre kan to distinkte bånd observeres, men det fra milt ble detektert ett bånd.

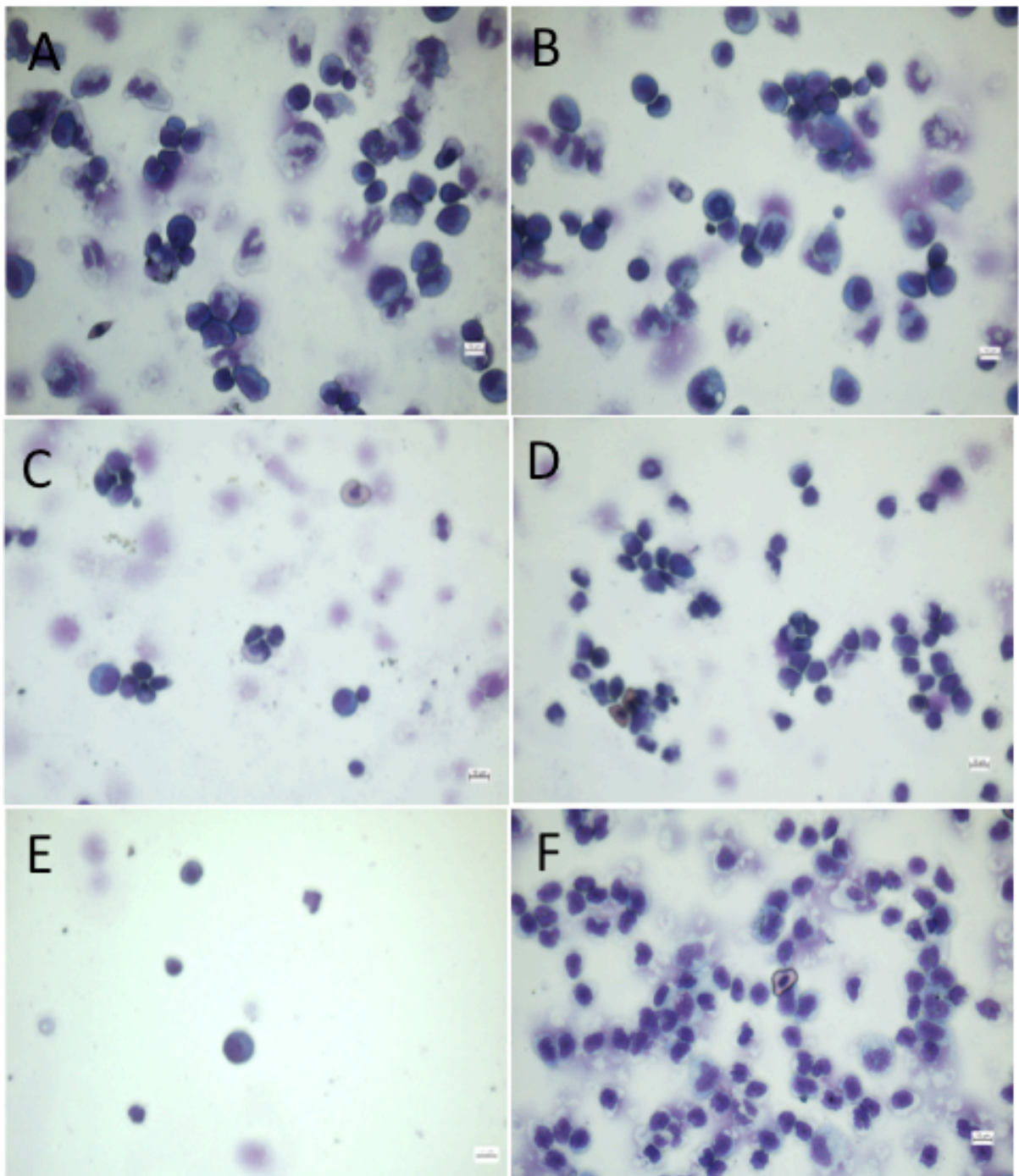


**Figur 13: Western blot analyse med antistoffet tPax5-E10 på celler fra milt, hodenyre og blod isolert med gradienter med 42% og 54% perkoll.** Celler fra henholdsvis blod, milt og hodenyre ble isolert ved sentrifugering på diskontinuerlige gradienter med 42% og 54% perkoll. Celler fra hver interfase i gradientene ble analysert ved Western blotting med antistoffet tPax5-10, og antistoffet EF2 som loadingkontroll. Omtrentlig 600 000 celler fra 3 individer er slått sammen i hver prøve.

Figur 14 viser fikserte og fargede celler etter isolering på 42% og 54% perkollgradienter. I hodenyre var det ingen fremtredende morfologiske forskjeller mellom cellene fra henholdsvis 42% og 54% gradientene (A og B). Begge cellepopulasjonene inneholdt polymorfonukleære celler, makrofager og celler som likner plasmaceller.

Fra milt var det færre celler i 42% gradienten (C) sammenliknet med cellene isolert fra 54% gradienten (D). Det var imidlertid en større andel store celler med mye cytoplasma i prøvene fra 42% gradienten. I 54% gradienten ble små kompakte celler med lite cytoplasma, som kan være lymfocytter, observert.

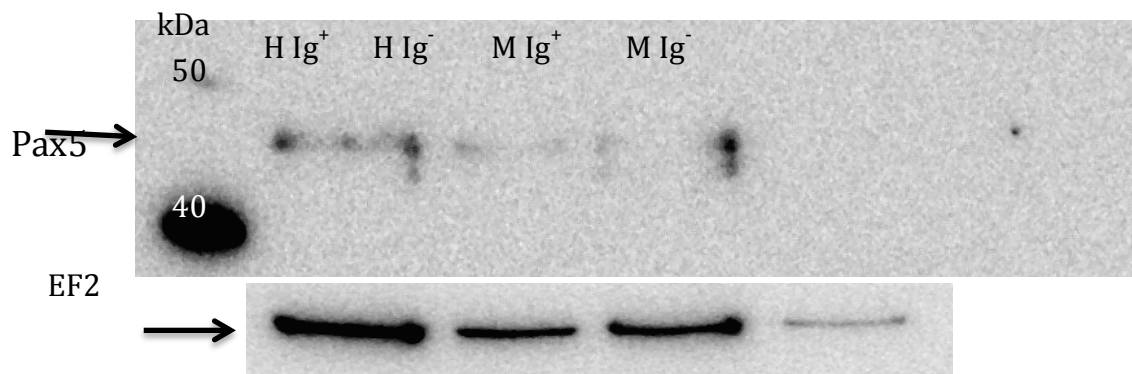
Fra blod ble få celler spunnet ut ved cytopinn fra 42% gradienten. De cellene som observeres her er store celler med mye cytoplasma. Cellesammensetningen fra 54% gradienten var svært homogen. De aller fleste er celler med store, ruglete cellekjerner, men enkelte mononukleære celler med fargestoff i cytoplasma observeres. Disse er forenelige med melanomakrofage celler beskrevet i Koppang *et al.*, 2003.



**Fig 14. Milt- og hodenyreceller fra laks isolert fra 42% og 54% perkoll-gradienter.** Cytospinnpreparater av celler fra hver gradient ble fiksert og farget med May-Grünwald/Giemsa. Preparatene ble mikroskopert med Leica 6000 B med 40x objektiv. Representative bilder for hver gradient foreligger. En 10 µm størrelsesmarkør er inkludert nede i høyre hjørne. A) 42% perkoll-gradient fra Hodenyre. B) 54% perkoll-gradient fra hodenyre. C) 42% perkoll-gradient fra milt D) 54% perkoll-gradient fra milt. E) 42% perkoll-gradient fra blod. F) 54% perkollgradient fra blod.

### 3.2.3 Uttrykk av Pax5 i leukocytter selektert for uttrykk av membranbundet IgM

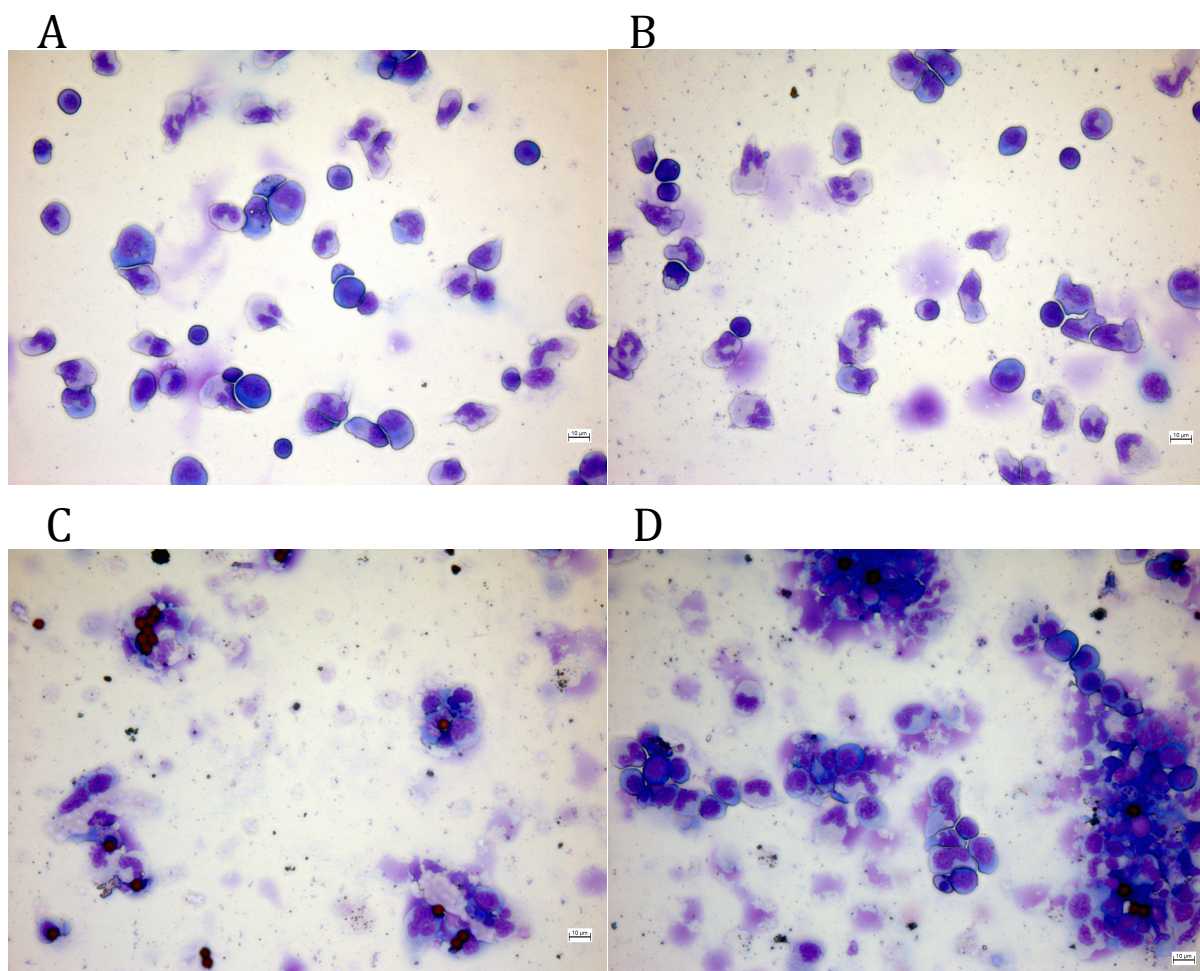
For å kunne antyde hvilke celler fra laks som uttrykker Pax5 ble det gjort et forsøk hvor leukocytter ble selektert for uttrykk av membranbundet IgM. Dette ble gjort med magnetiske kulert belagt med antistoffet IgF1-18. Cellene ble analysert for uttrykk av Pax5 med Western blotting før de ble fiksert, farget og mikroskopert. Hos cellene fra Ig<sup>+</sup> fraksjonen fra både milt og hodenyre ble det kraftigste Pax5 45 kDa båndet observert (Figur 15). I tillegg ble også et svakt bånd (45kDa) i Ig<sup>-</sup> fraksjonen fra hodenyre observert. Ingen uttrykk ble observert ved de Ig<sup>-</sup> prøvene fra milt. Loadingkontrollen EF2 indikerte at det var noe mindre proteinmengden i Ig<sup>-</sup> prøvene.



**Figur 15: Pax5 45kDa uttrykk i leukocytter selektert for membranbundet IgM.** Isolerte celler selekteres mot membranbundet IgM ved hjelp av magnetiske kuler kledd med IgG og geit anti kanin IgM antistoff. Det er applisert 10  $\mu$ l prøvemateriale fra negativt selekterte prøver, og 20  $\mu$ l prøvemateriale fra positivt-selekterte prøver. Membranen er undersøkt mot anti-Regnbueørret tPax5-E10 (1:500) og anti EF2 (1:1000). Membranen er eksponert i 15 minutter.

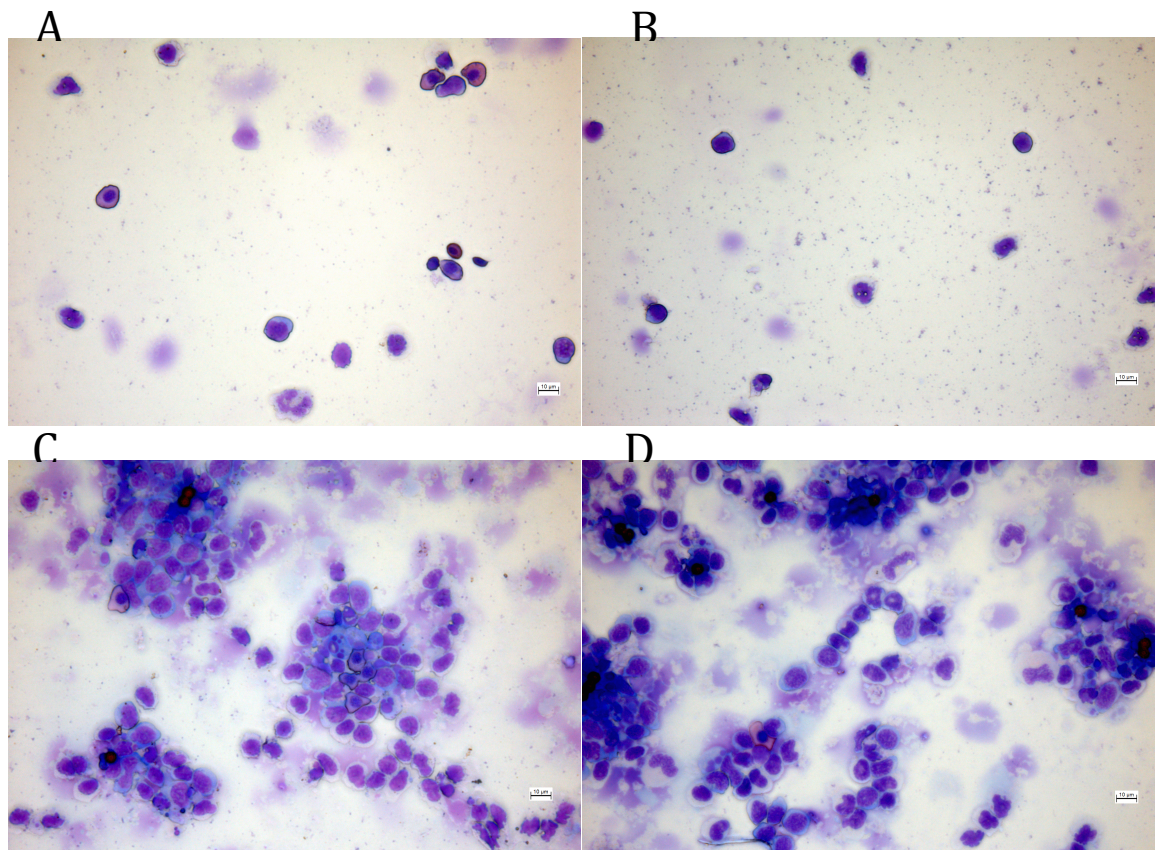
Heterogeniteten på celledannelsingen var stor for begge de to Ig<sup>+</sup> prøvene fra hodenyre (figur 16). Den Ig<sup>+</sup> fraksjonen fremviser en større homogenitet i celledannelsingen. Cellene har en asymmetrisk og stor cellekjerne, samt mye cytoplasma. Her sees imidlertid enkelte artefakter i preparatene.





**Figur 16: Prøver fra hodenyre til laks isolert fra 54% perkollgradient, og selektert for membranbundet IgM. Cellene er selektert for IgM med magnetiske Ig kuler med antistoff mot (IgF1-18). Prøvene er fiksert i metanol, og farget med may grünwald/giemsas. Bildene er tatt ved 40 x objektivtg (A) Ig-celler fra fisk 1 (B) Ig- celler fra fisk 2 (C) Ig<sup>+</sup> Celler fra fisk 1 (D) Ig<sup>+</sup> celler fra fisk 2.**

For milt (figur 17) var den Ig-negative fraksjonen fortynnet litt for mye, og med varierende cellesammensetningen. Det var en stor andel umodne erythrocytter, samt små celler kompakte celler uten cytoplasma, polymorfonukleære celler, samt celler med mye cytoplasma. Fra den Ig-positive fraksjonen var cellepopulasjonen heterogen og viste 10-12 µl store celler med store ruglete cellekjerner og middels cytoplasma.



**Figur 17: Prøver fra milt til laks isolert fra 54% perkollgradient, og selektert for membranbundet IgM. Cellene er selektert for IgM med magnetiske Ig kuler med antistoff mot (IgF1-18). Prøvene er fiksert i metanol, og farget med may grünwald/giemså. Bildene er tatt ved 40 ganger forstørning (A) Ig-celler fra fisk 1 (B) Ig-celler fra fisk 2 (C) Ig<sup>+</sup> Celler fra fisk 1 (D) Ig<sup>+</sup> celler fra fisk 2.**

### 3.3 *In vitro* stimulering av leukocytter fra milt og hodenyre med CpG initierer adaptiv immunrespons.

I disse forsøkene ønsket vi å undersøke dynamikken i Pax5 uttrykket i leukocytter isolert fra fornyre og milt etter CpG stimulering *in vitro*. Antistoffene tPax5-PD og tPax5-E10 ble benyttet for deteksjon av Pax5 ved Western blot, for å undersøke CpGs evne til å inducere terminal differensiering av B-celler *in vitro* og påfølgende produksjon av sekretorisk IgM fra plasmaceller/plasmablaster, ble supernatanter fra CpG stimulerte leukocytter og kontrollceller oppkonsentrert, og analysert for tilstedeværelsen av IgM ved Western blot. Endringer i genuttrykk av membranbundet IgM ble også analysert ved RT-qPCR. Genuttrykk av Mx ble her inkludert som en positiv kontroll for CpG stimulering.

For å undersøke CpGs evne til inducere terminal differensiering av B-celler *in vitro*, og påfølgende produksjon av sekretorisk IgM fra plasmaceller/plasmablaster ble antistoffet IgF1-18 undersøkt. Her ble supernatanter fra CpG stimulerte hodenyreceller og kontrollceller oppkonsentrert, og benyttet ved Western blot.

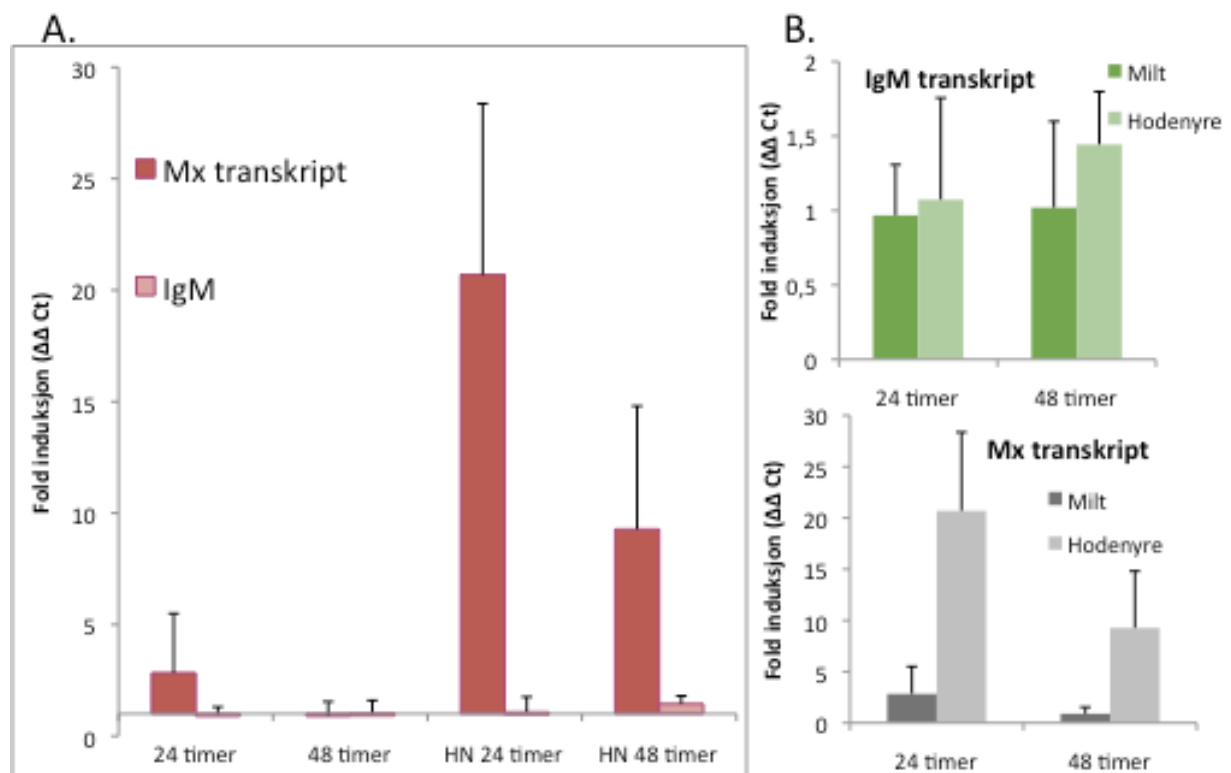
#### 3.3.1 *Real time PCR ga kraftig økning i Mx transkripter fra prøver høstet 24 timer etter stimulering, og en liten økning i mIgM fra prøver høstet 48 timer etter stimulering.*

En av arbeidshypotesene til forskningsgruppen er at uttrykket av IgM i CpG stimulerte leukocytter vil øke, og at B-cellene vil modne til IgM sekreterende plasmaceller/plasmablaster. Vi ønsket derfor å teste uttrykket av membranbundne IgM-transkripter i disse cellene etter CpG-stimulering. Siden tidligere forsøk har vist at Mx-uttrykket øker i CpG-stimulerte leukocytter (Strandskog *et al.*, 2007), ble også Mx-mRNA nivået målt i cellene som en positiv kontroll. I disse forsøkene ble prøvene (n=3) høstet 24 og 48 timer etter stimulering med CpG, og Mx og mIgM ble målt ved RT-qPCR i forhold til ubehandlede kontrollceller (Figur 18). Elongeringsfaktor 1aB ble benyttet som referansegen.

Ingen endring i fold induksjon av transkripter av membranbundet IgM ble observert, hverken 24 timer eller 48 timer etter stimulering med CpG i milt (B). En økning i fold induksjon for mIgM kunne observeres 48 timer etter stimulering med CpG i hodenyre. Imidlertid var fold induksjon gjennomgående over 1, og var for hodenyre fremdeles stigende.



Som forventet ble det i hodenyre detektert en kraftig økning i uttrykket Mx-transkripter (positiv kontroll) 24 timer etter stimulering. Her var fold induksjon på 20,69 sammenliknet med kontrollgruppen. Etter 48 timer hadde denne verdien falt mye, men var fremdeles merkbart høyere enn for kontrollgruppen. Deteksjonen av Mx-transkripter i milt viste en svak økning i fold induksjon 24 timer etter stimulering sammenliknet med kontrollprøvene fra samme tidspunkt, men var borte 48 timer etter stimulering.

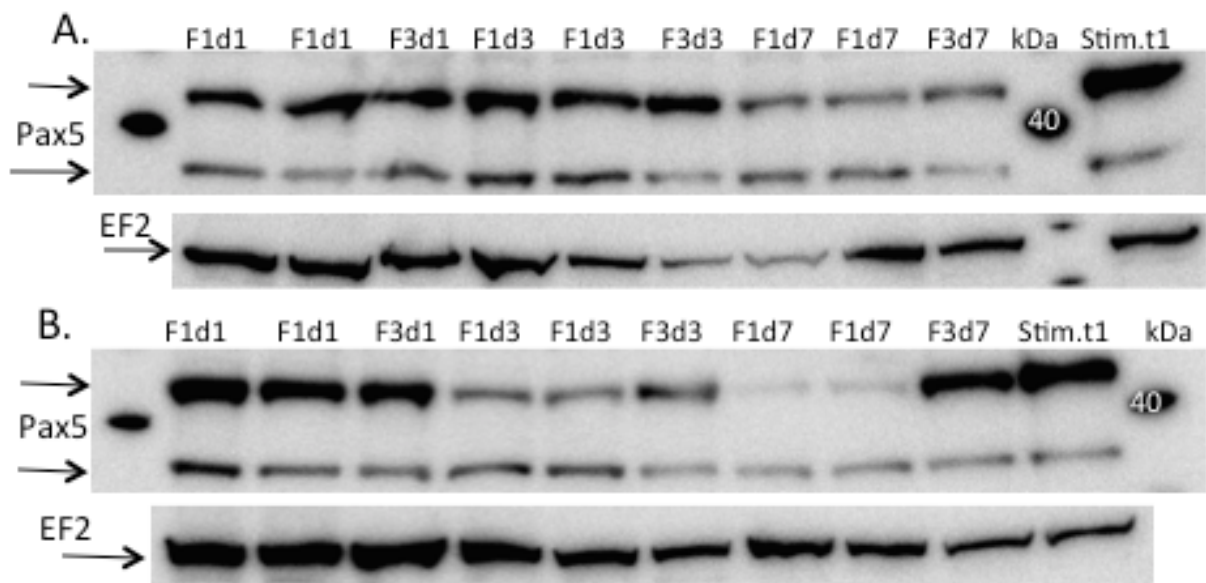


**Figur 18: RT-qPCR som viser fold induksjon av membranbundet IgM og Mx transkripter fra CpG stimulerde milt og hodenyreceller fra laks.** Celler fra milt og hodenyre til tre individer er stimulert in vitro med CpG, og høstet 24 og 28 timer etter stimulering. Forandring i genuttrykk er målt ved RT-qPCR i forhold til ubehandlede kontrollceller høstet ved samme tidspunkt. Det ble kjørt triplerter fra hver prøve. Elongeringsfaktor 1aB er benyttet som referansegen. Søyler viser gjennomsnittsverdier og standardavvik. (A) Resultater fra både milt og hodenyre. (B) Resultater av henholdsvis IgM- og Mx transkripter fra både milt og hodenyre individuelt.

### 3.3.2 Pax5 uttrykk hos i in vitro stimulerde leukocytter fra milt til laks

Figur 19 viser at et 35 kDa protein, og et 45 kDa protein kan påvises i både CpG stimulerde leukocytter og kontrollceller fra milt ved bruk av tPax5-PD antistoffet. I disse forsøkene ble leukocytter isolert fra to individer testet. Prøver fra fisk 1 (F1) er applisert

to ganger fra hvert tidspunkt (t). Båndet på 35 kDa viser et tilnærmet likt uttrykk i alle prøvene, både CpG stimulerte- og kontrollceller, og uttrykket varierer lite mellom individene. Pax på 45 kDa har tilnærmet likt uttrykk i prøvene fra kontrollgruppen, mens i de stimulerede cellene er uttrykket noe høyere ved de tidlige tidspunktene (dag 1). Båndet for "loadingkontrollen" er for øvrig noe kraftigere uttrykt ved tidlige tidspunkt. Dette forsøket er gjentatt en gang med tilsvarende resultat.

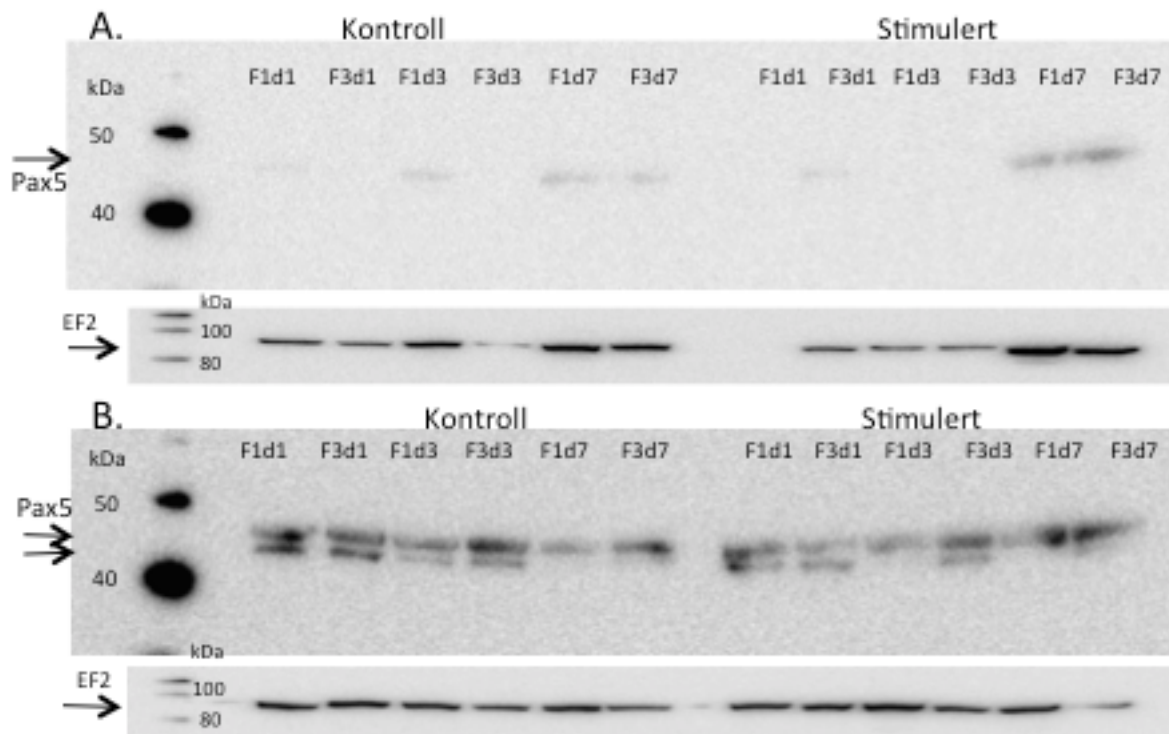


**Figur 19. Western blot analyse med tPax-PD av lakseleukocytter fra milt stimulert in vitro med CpG.** Leukocytter fra to individer er stimulert med CpG, og høstet 1, 3 og 7 dager (d) etter stimuleringen. Prøven er navngitt på følgende måte; Fisk 1 høstet 3 dager etter stimulering = (F1d3). Ustimulerte kontrollprøver er høstet ved samme tidspunkt. Størrelsesmarkøren MagicMark er benyttet, og EF2 er inkludert som loadingkontroll. Membranene er eksponert i 15 minutter (A) Ustimulerte kontrollprøver prøver (B) CpG stimulerede prøver.

### 3.3.3 Western blot med antistoffet tPax5-E10 fra CpG stimulerede milt- og hodenyreprøver viste liten endring mellom stimulerede og kontrollprøver

Et nytt forsøk ble satt opp hvor leukocytter fra milt og hodenyre ble stimulert med CpG og høstet ved ulike tidspunkt. I dette forsøket benyttet vi tPax5-E10 antistoffet for Western blot deteksjon og resultatene er presentert i figur 20. For leukocytter fra hodenyre varierte Pax5 uttrykket mellom prøvene, og proteinet var kun detekterbart i de prøvene som inneholdt mest protein (jmf. loadingkontroll). I prøvene fra milt detekterer vi to bånd både fra kontrollgruppen og de CpG stimulerede cellene. Her var

båndene like tydelige i begge gruppene, som indikerer at stimulering med CpG ikke har endret uttrykket av de proteinene dette antistoffet detekterer.



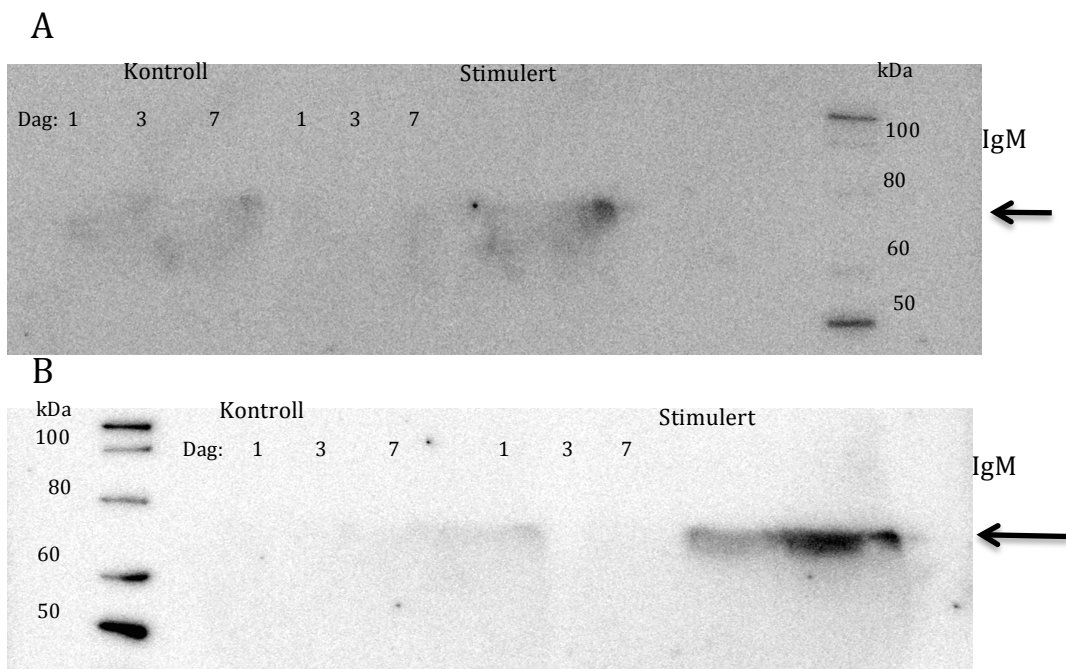
**Figur 20: Western blot analyse med tPax5-E10 av lakseleukocytter fra hodnyre og milt stimulert *in vitro* med CpG.** Leukocytter fra to individer er stimulert med CpG, og høstet 1, 3 og 7 dager (d) etter stimuleringen.. Ustimulerte kontrollprøver er høstet ved samme tidspunkt. Størrelsesmarkøren MagicMark er benyttet, og EF2 er inkludert som loadingkontroll. Membranene er eksponert i 15 minutter (A) kontroll- og stimulert cellelysat fra hodnyre (B) kontroll- og stimulert cellelysat fra milt

### 3.3.4 CpG stimulering av lakseleukocytter fra fornyre og milt fører til økt utskillelse av sekretorisk IgM

Formålet med dette forsøket var undersøke om B-celler fra fornyre og milt ved *in vitro* stimulering med CpG modner til plasmaceller. For å undersøke dette ble tilstedeværelsen av sekret IgM i supernatanter fra CpG stimulte og ustimulerte leukocytter analysert ved Western blotting. I innledende forsøk ble disse supernatantene oppkonsentrert ved vakumsentrifugering, men vi kunne ikke detektere IgM i disse prøvene ved Western blotting. En ny metode for oppkonsentrering av supernatanter ved bruk av en Amicon® Ultra-0.5 centrifugal Filter Device ble derfor uttestet. Cellesupernatanten fra enkeltbrønner (500 µl) ble oppkonsentrert omtrent 10

ganger til 50 µl, og disse ble undersøkt for uttrykk av lakse-IgM ved Western blot (figur 21). I figuren er to individer fra hver behandling og tidspunkt slått sammen, og prøver fra tre ulike tidspunkt etter stimulering (1, 3 og 7 dager) er presentert. I milt kan et svakt bånd <80 kDa detekteres i både stimulerede og ikke-stimulerede celler. Lakse IgM tungkjede er 71,5 kDa, som stemmer med størrelsen på det båndet vi observerer på blottet. I de CpG stimulerede prøvene fra de senere tidspunktene (3 og 7 dager), er dette båndet høyere uttrykt enn ved det tidligste tidspunktet.

I kontrollprøvene fra hodenyre er ingen tydelige bånd synlige. Imidlertid kan det i de stimulerede prøvene fra hodenyre detekteres et bånd i forventet størrelse (omtrent 70 kDa). Styrken på dette båndet øker over tid, og viser høyest uttrykk 7 dager etter stimulering.



**Figur 21: IgM sekresjon fra CpG stimulerede milt- og hodenyreleukocytter fra laks.** Supernatanter fra celler stimuleret *in vitro* med CpG og kontrollprøver er høstet 1, 3 og 7 dager etter stimulering. Supernatanter fra 2 individ er slått sammen og oppkonsentrert (x8). Det er applisert 2,5 µl av størrelsesmarkøren MagicMark. Membranene er eksponert i 20 minutter. (A) Prøver fra milt (B) Prøver fra hodenyre.

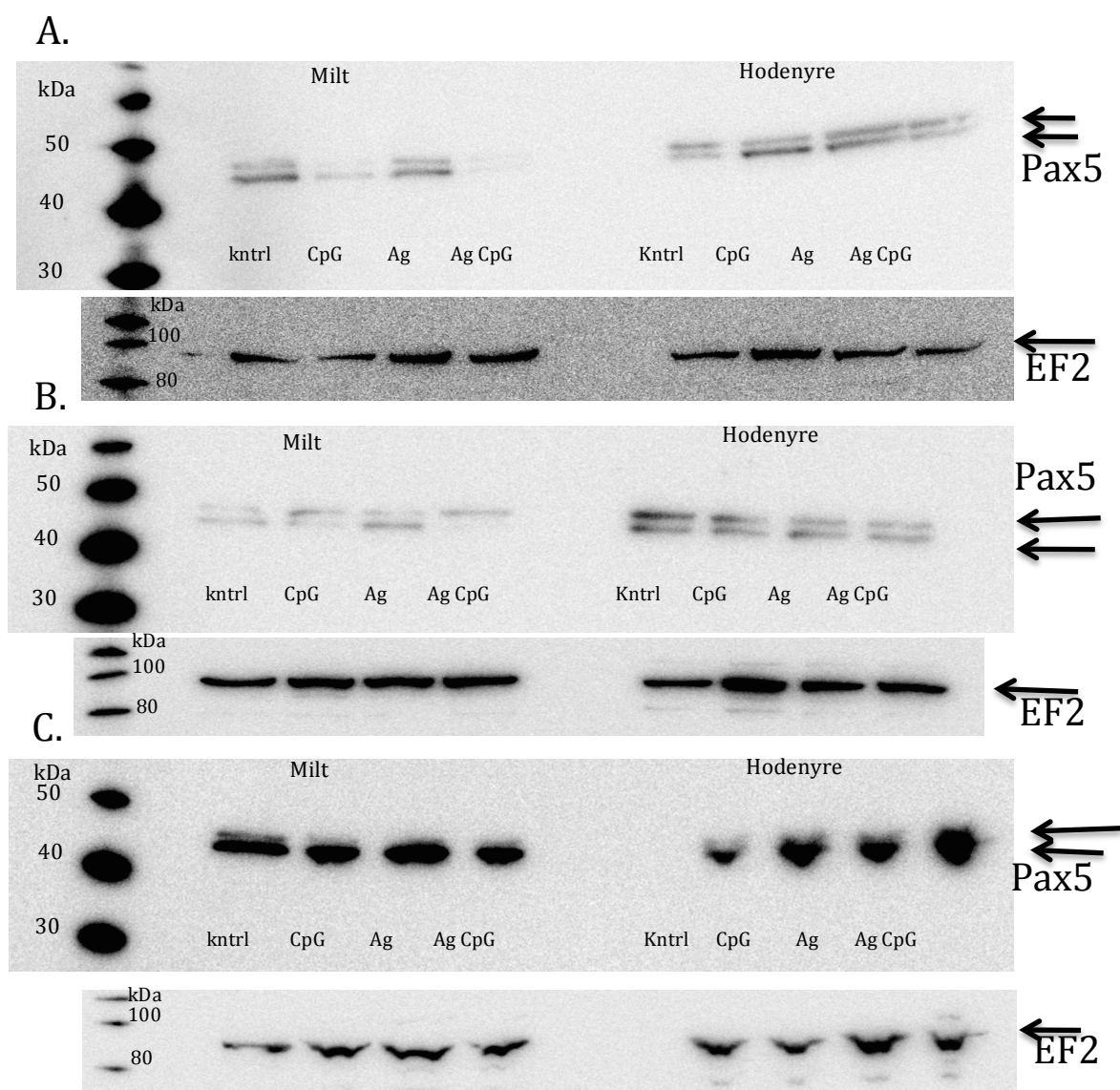
### 3.4 Uttrykk av Pax5 etter immunisering av laks in vivo

Tidligere forsøk fra vår forskningsgruppe har vist at immunisering av laks med SAV antigen i kombinasjon med CpG/polyI:C induserer en høyere nøytraliserende antistoffrespons enn ved immunisering med SAV antigen alene (Thim *et al.*, 2012; Thim, H, 2013). Vår hypotese er at CpG kan påvirke differensiering av B-celler til plasmaceller og dermed bidra til økt antistoff produksjon. Vi ønsket å undersøke dette videre ved å se om en i et tilsvarende *in vivo* forsøk ville se endring i uttrykk av Pax5 i leukocytter etter immunisering.

I dette forsøket ble 3 ulike grupper laks immunisert med henholdsvis CpG/polyI:C (adjuvant), SAV antigen, SAV antigen + CpG/polyI:C, samt en kontrollgruppe injisert med saltløsning. Organuttak ble gjort 5 dager, 2 uker, og 6 uker etter immunisering, og det ble isolert leukocytter fra milt og hodenyre fra 4 fisk fra hver gruppe. Til celleisolering ble det brukt 25% og 54% perkollgradienter.

Figur 22 viser deteksjon av Pax5 ved Western blot med antistoffet tPax5-E10 i prøver fra milt- og hodenyreceller fra immunisert laks høstet ved nevnte tidspunkt etter immunisering. Antistoffet detekterer doble bånd på omtrent 45 kDa i de fleste prøvene. Fra det første uttaket (A) er uttrykket kraftigere i prøvene fra hodenyre. Uttrykket av loadingkontrollen indikerer en lavere proteinmengde, særlig i milt. Liknende resultat ble observert fra prøvene høstet etter andre uttak (B), og uttrykket er også her kraftigst i hodenyre. Det er vanskelig å skille de ulike gruppene internt i hvert organ. Her viser uttrykket av EF2 at proteinmengden er rimelig lik i hver prøve, med CpG prøvene fra hodenyre som et mulig unntak. Uttrykket av Pax5 er kraftigst i prøvene høstet 6 uker etter immunisering (C). Her er de doble båndene vanskelig å skille fra hverandre, og de fremstår som ett. Fra hodenyre er båndet fra kontrollprøven svakere enn båndene fra de tre andre gruppene. Uttrykket av EF2 varierer lite mellom gruppene.

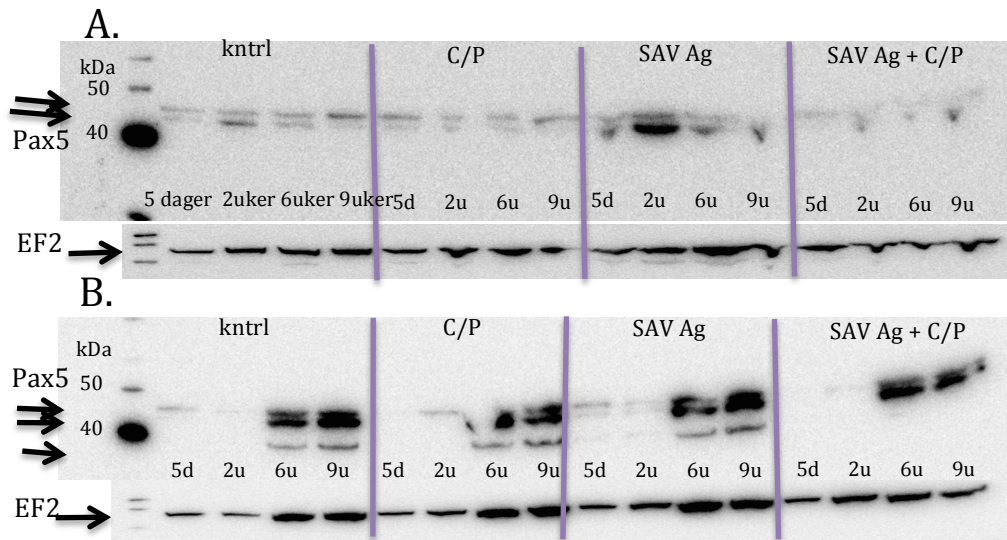




**Figur 22: Pax5 uttrykk i milt og hodenyre leukocytter fra laks immunisert med CpG/polyI:C (adjuvant), SAV antigen, SAV antigen + CpG/polyI:C og kontrollgruppe, fra tre uttak.** Fire individer fra hver gruppe (1-4) er sammenslått til en prøve per behandling, og i figuren er resultatet fra 3 ulike prøvetakningstidspunkter presentert. Størrelsesmarkøren MagicMark er applisert og antistoff mot EF2 er benyttet som "loadingkontroll". Membranene er eksponert i 15 minutter. (A) er prøver fra 5 dager etter immunisering. (B) 2 uker etter immunisering. (C) 6 uker etter immunisering.

Resultatene presentert i figur 23 viser deteksjon av Pax5 ved Western blot analyse med antistoffet tPax5-E10. Prøver fra hvert organ er samlet på ett blot slik at de ulike prøvetakningstidspunktene og forsøksgruppene kan sammenliknes. I leukocytter fra hodenyre detekterer antistoffet doble bånd på omtrent 45 kDa i de fleste prøvene (A). Ved sammenlikning av forsøksgruppene var uttrykket av Pax5 relativt likt i CpG +

PolyI:C, SAV antigen og kontrollgruppen. Også innenfor hver forsøksgruppe var det ikke store endringer over tid. I gruppen immunisert med SAV antigen + CpG/polyI:C var derimot Pax5 uttrykket i hodenyre leukocytter svært lavt. I milt (A) var resultatene annerledes. I alle forsøksgruppene var Pax5 uttrykket svært lavt 5 dager og 2 uker etter immunisering.



**Figur 23: Pax5 uttrykk i milt og hodenyre leukocytter fra laks etter in vivo immunisering.** Laks ble immunisert intraperitonealt med CpG/polyI:C (adjuvans), SAV antigen, SAV antigen + CpG/polyI:C, samt kontrollgruppe og leukocytter ble isolert fra hodenyre og milt 5 dager, 2 uker, 6 uker og 9 uker etter immunisering.  $3 \times 10^5$  leukocytter fra fire individer (til sammen  $1,2 \times 10^7$ ) fra hvert prøvetakningstidspunkt er sammenslått til en prøve pr. behandling. Prøvene er undersøkt mot antistoffet tPax5-E10. Størrelsesmarkøren MagicMark er applisert og antistoff mot EF2 er benyttet som "loadingkontroll". Membranene er eksponert i 15 minutter. (A) Hodenyre (B) Milt.

## 4 Diskusjon

### 4.1 To antistoff mot Pax5 uttrykker trolig full-lengde Pax5 i laks.

Som nevnt i introduksjonen er Blimp-1, Xbp1 og Pax5 ulike transkripsjonsfaktorer involvert i modning og differensieringen av B-celler hos pattedyr. Hensikten med denne oppgaven var å undersøke om ulike antistoffer mot disse transkripsjonsfaktorene kunne benyttes til å detektere ulike modningstrinn hos leukocytter fra laks. Funksjonelle antistoffer mot ett eller flere av proteinene ville vært verdifulle verktøy for å øke forståelsen av prosessene involvert ved en adaptiv immunrespons hos laks. Siden antistoffene testet for Blimp-1 og Xbp1 ikke detekterte noen lakseproteiner, ble fokuset i oppgaven å karakterisere ulike regnbueørret Pax5 antistoffer for bruk i laks.

Pax5 er som tidligere nevnt et komplekst gen, og dets RNA kan spleises til en rekke ulike isotyper med forskjellige funksjoner knyttet til modning og differensiering av B-celler hos vertebrater og teleoster (Zwollo, 2011; MacMurray *et al.*, 2013). Disse isotypene uttrykkes i pattedyr og teleoster gjennom flere stadier av B-celle utviklingen, og hos regnbueørret deltar for eksempel Pax5 i modningen fra pre B-celler, naive B-celler og til plasmablaste (Zwollo, 2011). I regnbueørret er det identifisert sju forskjellige isotyper som mangler ett eller flere av de funksjonelle domenene i tillegg til ett full-lengde Pax5 (MacMurray *et al.*, 2013).

I våre forsøk har vi benyttet eksisterende antistoffer mot Pax5 fra regnbueørret som gjenkjenner ulike deler av Pax5 proteinet (Zwollo *et al.*, 2005; MacMurray *et al.*, 2013) og undersøkt reaktiviteten til disse mot leukocytter fra laks ved Western blotting. cDNA som koder for Pax5 fra laks viser 99% likhet på aminosyrenivå med Pax5 fra regnbueørret, og peptidsekvensene som to av antistoffene er lagd mot er identiske i laks og regnbueørret. Vi anså derfor sjansene som store for at disse antistoffene ville kryss reagere med Pax5 fra laks. I lakseleukocytter fra milt og hodenyre detekterte antistoffet tPax5-E10 to proteiner med svært lik størrelse på omtrent 45 kDa (dobbeltbånd), mens tPax5-PD detekterte ett protein med molekylvekt på omtrent 45kDa og ett protein med molekylvekt på omtrent 35 kDa. Molekylvekten til Pax5 fra laks er beregnet til å være 41,7 kDa (upubl.data). Vi antok derfor at proteinene på omtrent 45 kDa representerte full lengde Pax5 fra laks. For tPax5-E10 er det mest sannsynlig at det er det største proteinet som er full lengde Pax5. Dette siden alternative



spleisevarianter vil ha en lavere molekylvekt enn full lengde Pax5. Dette er også i overensstemmelse med resultater fra regnbueørret (Zwollo *et al.*, 2005; MacMurray *et al.*, 2013).

I våre Western blot analyser mangler imidlertid en god positiv kontroll. Et arbeid med å generere en positiv kontroll for Pax5 fra laks ble påbegynt, men ikke fullført. cDNA for Pax5 skulle klones inn i en eukaryot ekspresjonsvektor med og uten tag for deretter transfekteres inn i celler og uttrykkes der. Disse cellelysatsene ville vært positive kontroller for å undersøke reaktiviteten til antistoffer mot Pax5 på lakseleukocytter

Det er imidlertid ikke mulig å definitivt konkludere med at 45 kDa proteinene som er gjenkjent her faktisk er Pax5. Western blot er ikke et tilstrekkelig godt verktøy til dette alene, og en god positiv kontroll mangler. Imidlertid kan Pax5 sekvensen fra laks isoleres, for deretter å klones inn i ekspresjonsplasmider til en egnet vektor, for eksempel *E. coli*. Deretter kan antistoffene benyttes i Western blot med cellelysats fra vektorene. Det vil her kunne fungere som en positiv kontroll sammen med cellelysats fra laks. Dette arbeidet ble påbegynt, men skrinlagt grunnet tidsmangel.

#### 4.1.1 Andre Pax5-isoformer?

Både tPax5-PD og tPax5-E6 detekterte et protein ved Western blot på omtrentlig 35 kDa som kan være en Pax5 isoform. Det kan ikke utelukkes at det er den samme isoformen som gjenkjennes av begge antistoffene, og at denne mangler C-terminal ende siden antistoffet tPax5-E10 ikke gjenkjenner et protein på denne størrelsen. Med utgangspunkt i molekylvekt er det mulig at dette er isoformen Pax5 $\Delta$ 2 som er anslått å være 35kDa i regnbueørret. Imidlertid burde Pax5 $\Delta$ 2 kun uttrykkes ved tPax5-E6 som det gjør i figur 7, men ikke i for tPax5-Pd, som er laget mot exon 2 (MacMurray *et al.*, 2013).

Imidlertid detekterer tPax5-E10 enda et protein på omtrent 45kDa med litt lavere molekylvekt enn det andre proteinet. Ingen isoformer med denne størrelsen er blitt påvist i regnbueørret, og videre karakterisering av denne isoformen i laks er nødvendig for å kunne indikere dets opprinnelse og funksjon i laks.

#### 4.1.2 Hvilken funksjon har Blimp-1 og XbpI i immunresponser hos laks?

Pax5 er antatt å inneha funksjoner på et tidlig stadium av B-celle differensiering. Det er imidlertid ønskelig å samtidig kunne identifisere markører for terminale stadier i differensieringen av B-cellene, som for eksempel transkripsjonsfaktorene Blimp-1 og XbpI (se 1.4.2 og 1.4.3). Siden det er kjent fra pattedyr at disse transkripsjonsfaktorene i liten grad uttrykkes i Pax5<sup>+</sup> celler og omvendt, kunne det med samtidig deteksjon av Pax5 og XbpI/Blimp-1 vært mulig å undersøke om en differensiering av modne B-celler til plasmaceller hadde funnet sted.

Det har ved tidligere forsøk gjort på regnbueørret blitt benyttet et antistoff mot Blimp-1 som har gjenkjent et protein på 90 kDa i leukocytter isolert fra ulike perkoll-gradienter i hodenyre (Zwollo *et al.*, 2005). Imidlertid er ikke dette antistoffet benyttet ved senere anledninger. Fraværet av tilgjengelige antistoffer laget mot fisk/laks gjorde at vi valgte å undersøke kommersielle antistoffer som er framstilt ved at peptidsekvenser fra Blimp-1 fra menneske er brukt som antigen. Fra laks er det tilgjengelig kun kortere cDNA sekvenser som viser likhet med Blimp-1, og sekvensulikheter mellom laks og menneske kan være grunnen til at de kommersielle Blimp-1 antistoffene ikke gjenkjente samme molekyl fra laks. Selv om Blimp-1 cDNA er identifisert hos andre teleoster er det ikke sikkert at Blimp-1 utøver liknende funksjon i differensieringen av B-celler til plasmaceller som hos høyerestående vertebrater (Ohtani *et al.*, 2006). I en ny artikkel av Castro *et al.*, 2013 er det vist at langlivede plasmaceller hos bruskfisk (hai) ikke uttrykker Blimp-1. Dessuten ble funn av Blimp-1 i bruskfisk, samt i Zwollo *et al.*, 2005 gjort i milt, et organ som ikke er foreslått å i mindre grad inneholde langlivede plasmaceller. Dette belyser det faktumet at veldig lite er kjent vedrørende funksjonen til Blimp-1 hos fisk, og hos laks spesielt

Antistoffet tXbpI-S ga heller ingen bånd ved Western blot på milt- og hodenyreceller fra laks. Forsøk fra regnbueørret (Barr *et al.*, 2011) viste økende uttrykk av XbpI ved Western blot på leukocytter fra milt frem til 10 dager etter *in vitro* stimulering med LPS, samtidig som uttrykket av mIgM tung kjede økte. Dette indikerer at XbpI her har en funksjon under aktiveringen og den videre differensieringen av modne B-celler til ASC.

XbpI gensekvensen fra laks viser stor homologi med XbpI fra regnbueørret, og peptidsekvensen som er brukt for å lage regnbueørret tXbpI-S antistoffet burde gjenkjent samme protein fra laks.

Et aspekt som også kan ha bidratt til at vi ikke var i stand til å detektere hverken Blimp-1 og Xbp1 var at vi ikke undersøkte celletyper som uttrykker disse. Cellelysate fra hodenyre og Ig-selekterte celler fra milt ble undersøkt, men det kunne vært interessant å undersøke leukocytter fra milt grundigere. Basert på observasjoner gjort i Barr *et al.*, 2011 kunne det vært interessant å undersøke cellelysate fra milt høstet senere enn 7 dager etter stimulering med CpG.

#### 4.1.3 IgM er en kjent humoral komponent i immunforsvaret til laks

Ut fra den kjente størrelsen til tung og lett kjede av sekretorisk IgM til laks, er det i (figur 8) muligens uttrykk av begge (Magnadóttir, 1998). Western blot metoden (Immunfluoriserende deteksjon) som ble benyttet viste seg å gi jevnt over mer bakgrunn, og medvirket til at båndene fremstod som utydelige. Dette antistoffet binder til to bånd forenelig med IgM lett kjede med molekylvekt (mv) i underkant av 30 kDa, og tung kjede med mv i overkant av 70 kDa. Det er mulig at spesifisiteten til antistoffet er dårlig, men det er mer sannsynlig at grunnen til at båndene fremstår utydelige er at det her arbeides med serum. Det er kjent at andre proteiner, og spesielt albumin påvirker transporten gjennom gelen ved SDS-PAGE, samt at de kan hindre binding av primært antistoff.

Antistoffet (IgF1-18) er laget mot IgM fra regnbueørret, men har ved tidligere forsøk vist seg å binde til begge IgM isotypene (A og B) hos laks (Hedfors *et al.*, 2013). På bakgrunn av dette var det forventet at spesifisiteten skulle være høy, noe resultatene (figur 9) også antyder. I denne prøven er imidlertid også andre proteiner som potensielt kunne interferer med resultatet fjernet, noe som trolig også har betydning for hva som detekteres ved Western blot.

## 4.2 Hvilke celler uttrykker Pax5?

Basert på en rekke forsøk gjort på regnbueørret er det vist at transkripsjonsfaktoren Pax5 uttrykkes i alle leukocytter som er "programmert" til B-celle differensiering, fra pro B-celler til plasmablaste (Zwollo *et al.*, 2005; Zwollo *et al.*, 2008; MacMurray *et al.*, 2013). Som nevnt tidligere er den etablert metoden for isolering av leukocytter i vår lab (Jørgensen *et al.*, 2001) å benytte en 25% og 54% diskontinuerlig gradient. Imidlertid

har B-celler i forsøk gjort på regnbueørret blitt isolert fra gradienter med høyere tetthet (60 og 70%) (Zwollo *et al.*, 2005). Vi ønsket derfor å undersøke om metoden beskrevet i Jørgensen *et al.* 2001 i tilstrekkelig grad anriker B-celler, eller om enkelte av disse går tapt i gradienter med høyere tetthet. Med dette som utgangspunkt ble det satt opp forsøk med 50, 54, 62, og 70% perkoll-gradienter.

#### 4.2.1 Uttrykk av Pax5 i leukocyttfraksjoner isolert ved bruk av ulike tetthetsgradienter

Cellene i figur 11 (A og B) var morfologisk svært heterogene og var sammensatt av både monocytt/makrofagliknende celler, polymorfonukleære celler og i tillegg var små, runde kompakte celler som morfologisk minner om modne B-celler tilstede. Fra milt var det imidlertid en markant høyere andel celler med morfologi forenelig med modne B-celler i 50% og 54% gradientene (figur 12, A og B). Morfologien til cellene minner om modne lymfocytter, og skiller seg tydelig fra umodne erythrocytter synlig i samme bilde nede i venstre hjørne (figur 12, A) (Amin *et al.*, 1991). Analyse av Pax5 uttrykk i celler isolert fra de ulike gradientene viste at Pax5 45kDa hovedsakelig var uttrykt i celler fra 50 og 54% gradientene. Dette gjaldt både gradienter isolert fra hodenyre og milt.

Tidligere morfologiske undersøkelser av hodenyren til laks har beskrevet liknende heterogenitet i cellepopulasjonen (Haugland *et al.*, 2010). Vi observerte i våre preparater celler forenelig med plasmaceller (Amin *et al.*, 1991) og celler med liknende morfologi var også observerbare i 42% og 54% gradienten (figur 14, A og B). Ingen celler med antatt B-celle/plasmacelle morfologi ble observert i celler isolert fra gradienter med høyere tetthet enn 54%, noe som indikerer at lymfocytter ikke ble isolert fra disse gradientene. Uttrykket av Pax5 i hodenyre (figur 10; figur 13) underbygger dette, og antyder at Pax5 ble kraftigst uttrykt i celler fra 50% og 54% sjiktene.

for øvrig var uttrykket av Pax5 35 kDa (figur 10) så likt mellom prøvene at det nesten kunne fungere som en ytterligere loadingkontroll. Siden Pax5 35 kDa er like kraftig uttrykt i prøvene fra 70% perkollgradient fra milt (som nesten utelukkende inneholdt umodne erythrocytter), som i 50% gradienten (Figur 10, bilde D), er dette en indikasjon på at denne isoformen også har en funksjon i andre celletyper enn modne B-celler og plasmaceller.

Resultatene fra gradientforsøket er ikke i overensstemmelse med liknende forsøk gjort på leukocytter fra regnbueørret (Zwollo *et al.*, 2005; Bromage *et al.*, 2004; MacMurray *et al.*, 2013). Basert på både morfologiske undersøkelser og Western blot med tPax5-PD fra 50, 54, 62 og 70% gradienten konkluderes det med at våre resultater viser at B-cellene hovedsakelig befinner seg i 50 og 54% sjiktet på perkoll-gradientene etter sentrifugering. Det er lite sannsynlig at B-cellene hos laks avviker med henhold på tetthet og størrelse sammenliknet med regnbueørret, og at det derfor er andre årsaker til den observerte forskjellen.

Det er viktig å nevne at cellesuspensjonen i perkoll-gradientene i Zwollo *et al.*, 2005 ble spunnet ned på 1900 x g, mens vi til sammenlikning, etter anbefaling fra produsent, sentrifugerte ved 400 x g i våre forsøk. Det er grunn til å tro at sentrifugering ved høyere hastighet vil utøve en høyere kraft på cellene som har gjort at gradienter med større tetthet har vært nødvendig for å stoppe cellene. Det er heller ikke usannsynlig at dannelsen av celleaggregater som vist i figur 11, (B) er av betydning for hvor cellene plasserer seg i gradienten.

#### **4.3 Er det mulig å skille B-celler og plasmaceller ved å benytte ulike perkoll-gradienter?**

I gjeldende protokoll for isolering av leukocytter fra cellehomogenat benyttes en diskontinuerlig 25%/54% gradient (Jørgensen *et al.*, 2001). Dette er imidlertid en metode for å isolere hele leukocyttopulasjonen. Plasmaceller og B-celler hos laks har svært ulik morfologi (Amin *et al.*, 1991; Haugland *et al.*, 2010), og det ble derfor i dette forsøket undersøkt om det ved å benytte en 42% og 54% diskontinuerlig perkoll-gradient lot seg gjøre å adskille disse to lymfocyttypene. For å undersøke dette ble morfologiske undersøkelser av cytopinn-preparater av leukocytter fra hodenyre, milt og blod undersøkt etter isolering av leukocytter anriket ved 42% og 54% sjiktet. Deteksjon av Pax5 ved Western blot hos de isolerte leukocytterne ble foretatt, og tPax5 antistoffet ble benyttet til dette.

#### 4.3.1 Hodenyre

Det ble i hodenyre observert stor heterogenitet i cellepopulasjonene fra begge gradientsjiktene samtidig som Pax5 ved Western blot ble detektert i begge sjiktene (figur 13). Som tidligere diskutert antas nyren å inneholde Pax5<sup>+</sup> B lymfocytter i varierende utviklingsstadier, og uttrykk av Pax5 vil derfor ikke være en egnet markør for å skille plasmaceller og B-celler fra hverandre. Imidlertid antar man at Pax5 ikke uttrykkes i plasmaceller, noe som gjør dette proteinet til en uegnet markør for å påvise denne celletypen. Dessuten er det fra fra pattedyr kjert at B-celler i tidlige utviklingsstadier (stamceller og pro B-celler) er celler som i størrelse likner betraktelig mer på Pax<sup>-</sup> plasmaceller (Zwollo *et al.*, 2008). Derfor er det umulig å konkludere med om de aktuelle perkoll-gradientene har klart å skille plasmaceller og B-celler uten en egnet markør for disse. Et fungerende antistoff mot XbpI sammen med antistoff mot IgM hadde vært betraktelig bedre.

Det er verdt å merke seg at det ved inkubering med tPax5-E10 (figur 13) ble detektert to bånd i hodenyre, mens ett ble detektert i milt. Det "ekstra" båndet kan være en tidligere diskutert isoform av Pax5, og dette båndet viste også høyere uttrykk enn 45kDa båndet. Den/de celletypene som uttrykker denne isoformen er ikke tilstede i milt, og dette kan illustre at cellepopulasjonene i hodenyre er mer heterogene sammenliknet med milt. Det kan også vise forskjellen mellom intensitet og uttrykk mellom to i utgangspunktet identiske Western blot. Det kan være interessant å spekulere i om det andre båndet som observeres særlig i hodenyre (figur 13) uttrykkes av en celletype spesifikk for dette organet. Som nevnt i introduksjonen er Pax5 vist å ha en negativ effekt på differensiering av myeloide celletyper til granulocytter i teleoster (Hodawadekar *et al.*, 2007). Andelen myeloide celler er høyere i hodenyre sammenliknet med milt, og det er ikke umulig at dette andre båndet kan forklares ved at myeloide celler fra ulike utviklingsstadier finnes her, og at enkelte av disse uttrykker denne pax5 isoformen.

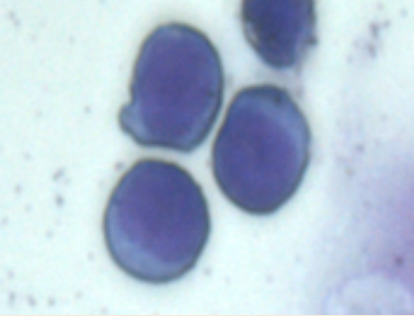
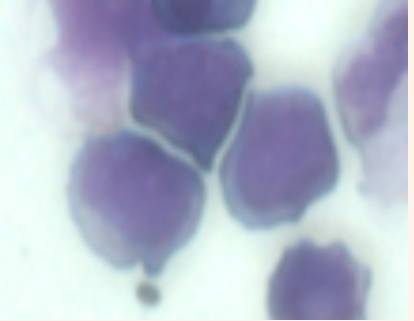
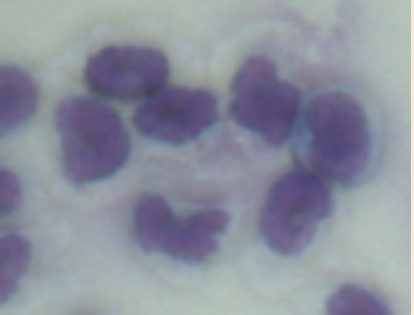
#### 4.3.2 Milt

Fra milt (figur 12, C og D) ble flere plasmacelleliknende lymfocytter observert i prøver høstet fra 42% gradientsjiktet enn i prøver fra 54%. Siden pax5 i regnbueørret antas å uttrykkes i alle B-cellestadier med unntak av pro B-celler og plasmaceller, vil ikke plasmacellepopulasjonen kunne detekteres med dette antistoffet (Zwollo *et al.* 2008).

Samtidig vil en plasmablast likne veldig på en plasmacelle, noe som gjør det enda vanskeligere å differensiere mellom Pax5<sup>+</sup> og Pax5<sup>-</sup> leukocytter. Dette illustrerer det kanskje største problemet med å bruke antistoff mot Pax5 som skille på plasmaceller og modne B-celler i milt.

Både morfologien til cellene og Pax5 uttrykket var ulikt i 42% gradientsjiktet sammenliknet med 54% gradienten (3.2.2.). I 54% sjiktet ble en betydelig større andel celler med morfologi som er karakteristisk for modne B-celler observert (Amin *et al.*, 1991). Forsøk gjort på regnbueørret (Zwollo *et al.*, 2008) viste at B-celle populasjonen i milten nesten utelukkende bestod av naive B-celler. Derfor er det svært interessant at det ved Western blot ble detektert kraftigst uttrykk av Pax5 45kDa i 54% sjiktet fra milt (figur 13), og basert på den mer homogene cellesammensetningen enn i 42% sjiktet er det sannsynlig at dette er naive B-celler som er celler med høyt nivå av Pax5. Uttrykket av EF2 viser at det var en jevn proteinloading i prøvene fra både milt og fornyre slik at resultatene kan sammenliknes. Leukocytter fra Cytospinn-preparater fra sjikt som også viste høyt uttrykk av Pax5 foreligger i tabell 6. Tabellen viser at morfologien til leukocytene som trolig har ført til det kraftige Pax5 uttrykket i disse prøvene er svært lik.

**Tabell 6: En illustrering av leukocytter fra sjikt antatt å være ansvarlig for det høye Pax5 uttrykket detektert ved Western blot på cellelysat fra samme sjikt.**

Vev	Morfolgi	Sjikt %	Pax 5 uttrykk	Bilde
<b>Milt</b>	Små nesten runde celler med radius (8-10 µm). Stor kjerne, lite cytoplasma. Trolig en moden lymfocyt (B-celle)	50	+	
<b>Milt</b>	Likner på modne lymfocytter, men er mer utflytende, og virker derfor noe større. Trolig delvis lyserte modene B-celler	54	+	
<b>Blod, milt</b>	Kjerne i større grad ruglete, og antydning til mer cytoplasma sammenliknet med celletypen over.	54	++	

#### 4.3.3 Blod

Noe overraskende var det at leukocytter fra blod anriket i 54% gradientsjiktet (figur 13) som hadde det kraftigste observerte Pax5 uttrykket av alle sjikt og organ undersøkt. Det var i tillegg en betraktelig lavere proteinloading i disse prøvene sammenliknet med prøver fra de andre organene fra samme oppsett. Da fisk mangler lymfeknuter, argumenteres det med at blodet har en større betydning ved eksponering av modne B-celler for antigen (Ye *et al.*, 2013). Dette er celletyper hvor Pax5 uttrykket forventes å være høyt. Det kan argumenteres med at dette indikerer betydningen blod hos laks har



ved sirkulering av naive B-celler og transport til sekundære lymfoide organ, hvor de kan eksponeres for antigen.

Morfologien til cellene isolert fra 54% sjiktet i blod (figur 14, bilde F) viste hovedsakelig mononukleære celler med middels mye cytoplasma og en ruglete cellekjerne. Morfologisk er disse cellene en mellomting mellom små kompakte lymfocytter og store plasmaceller. Til sammenlikning skiller disse cellene seg fra makrofager og melanomakrofager som kan sees midt i bildet (F). Haugland *et al.*, 2010 beskriver liknende celletyper i blod hos laks og de framsetter en hypotese om at dette kan være granulocytter i et tidlig utviklingsstadium (granulopoese). Denne teorien kan underbygges av observasjoner gjort i regnbueørret hvor perifere blod leukocytter (PBL) ikke differensierte til Ig sekreterende celler etter stimulering med LPS (Zwollo *et al.*, 2008). I hvilken grad andre celletyper hos laks uttrykker Pax5 i sine stadier av utvikling er usikkert, og ut fra det vi kjenner til eksisterer ingen tilgjengelig informasjon om dette fra laks.

#### 4.3.4 Cytospinnpreparater som verktøy for observasjon av leukocyttemorfologi?

Ulike forhold ved tillaging av cytopinn-preparatene har trolig påvirket resultatet observert ved mikroskoperingen. Selv om det ble tatt utgangspunkt i løsninger med kjent celletall, ble det observert svært varierende celletall på preparatene, og her ligger trolig feilen hos undertegnede. I preparatene ble det observert en viss andel diffuse fargede områder uten klar avgrensning av cellemembranen som trolig er lyserte celler (figur 11, D). Erfaringsmessig vet man at celler vil kunne lysere hvis det tar for lang tid mellom cytopinn og fiksering.

Immunofarging av cytopinn-preparater med det monoklonale anti-C7G7 (anti-IgM) har vist seg å detektere IgM fra cytoplasma (sekretorisk) hos laks (Pettersen *et al.*, 1995; Haugland *et al.*, 2010). Dette ville vært en ypperlig metode for å påvise plasmaceller i våre preparater. Immunofarging ble utprøvd, men antistoffet viste ingen spesifisitet. Videre karakteristikk basert på morfologi er vanskelig uten gode markører, og det kan konkluderes med at vi her ikke klarte å skille lymfocyttene fra plasmablaste/modne plasmaceller.

#### 4.4 Uttrykk av Pax5 i IgM<sup>+</sup> og IgM<sup>-</sup> leukocytter

Resultatene fra Western blot av Ig selekterte celler (Figur 15) antyder at Pax5 er kraftigst uttrykt i leukocytterne som er positivt selektert for membranbundet IgM, og dette stemmer godt overens med funn gjort fra regnbueørret (Zwollo *et al.*, 2008; Barr *et al.*, 2011). I mangel på flere markører er det ikke mulig å avgjøre hvilke modningstrinn disse B lymfocytterne er i. Naive B-celler, aktiverte B-celler og plasmablaste er alle definert som Pax5<sup>+</sup>/mIgM<sup>+</sup> populasjoner i nevnte artikler.

I leukocytter fra hodenyre ble Pax5 uttrykt i både Ig<sup>+</sup> og Ig<sup>-</sup> fraksjoner, men kraftigst i de Ig<sup>+</sup> selekterte cellene. Uttrykket hadde trolig vært mer jevnt mellom Ig<sup>+</sup> og Ig<sup>-</sup> celler om proteinloadingen mellom disse prøvene også hadde vært det. Data fra regnbueørret har vist at hodenyren har en svært heterogen celledannelse som inneholder Pax5<sup>+</sup>/mIgM<sup>-</sup> (pro B-celler og pre B-celler) samt Pax5<sup>+</sup>/mIgM<sup>+</sup> (aktiverte B-celler og plasmablaste) lymfocytter (Zwollo *et al.*, 2008). På bakgrunn av dette er det ikke overaskende at Pax5 detekteres i begge fraksjonene, og kan indikere tilstedeværelse av flere utviklingsstadier av B-celler. Cytospinn-preparatene gjenspeiler også den store heterogeniteten i hodenyre innehar. Leukocytter med en morfologi forenelig med plasmaceller observeres hovedsakelig i den Ig<sup>-</sup> fraksjonen, og indikerer at disse er negativt selektert. Dette er forventet siden de ikke er antatt å uttrykke mIgM (Zwollo *et al.*, 2008). I likhet med 3.2.1 og 3.2.2 er det vanskelig å trekke klare konklusjoner basert på morfologien til cellene fra hodenyre uten ytterligere markører.

Når det gjelder milt med funksjon som sekundært lymfoid organ er det antatt at hovedandelen av B-cellene her vil være mIgM<sup>+</sup> positive. Forenelig med nevnte funn på regnbueørret er det forventet at alle Pax5<sup>+</sup> lymfocytter her uttrykker mIgM (Barr *et al.*, 2011). Dermed er resultatene fra Western blot hvor Pax5 kun er uttrykt i den Ig<sup>+</sup> fraksjonen, og ikke i den Ig<sup>-</sup> fraksjonen, en indikasjon på at metoden med selektering av populasjoner med mIgM har vært vellykket. Cytospinnpreparatet fra den Ig<sup>+</sup> fraksjonen fra samme organ inneholdt hovedsakelig celler som liknet de cellene som ble observert fra 54% sjiktet i blod (pkt 3.2.2). Western ga også her et kraftig Pax5 45kDa uttrykk. Her er det vanskelig å trekke konklusjoner, men cellene har en morfologi som er forenelig med lymfocytter, og mer spesifikt kan dette være lymfocytter i ulike utviklingsfaser, for eksempel aktiverte umodne B-celler, lymfocytter eller plasmablaste. Få celler i cytopinn-preparatene kombinert med lite protein applisert på gelen fra begge Ig<sup>-</sup>

fraksjoner bidrar til at prøveoppsettet ikke er optimalt for miltprøvene. Disse forsøkene bør gjentas før sikre konklusjoner kan tas.

#### **4.5 *In vitro* stimulering av leukocytter med CpG ODNs evne til å initiere adaptive immunresponser.**

Flere ulike studier gjort på ulike fiskearter, inklusive laks, har dokumentert at syntetiske CpG nukleotider gir en sterk immunologisk respons (Jørgensen *et al.*, 2003; Meng *et al.*, 2003; Pedersen *et al.*, 2006). Fra pattedyr er det dessuten kjent at CpG aktiverer det adaptive immunsystemet ved blant annet å modne DC (Vollmer & Krieg, 2009). Derfor ble det i denne delen undersøkt om det i leukocytter fra laks var mulig å påvise endringer i dynamikken av forskjellige markører forbundet med aktiveringen av adaptive immunresponser etter stimulering med CpG ODN *in vitro* hos laks. Pax5 ble detektert ved Western blot av CpG stimulerte og ustimulerte leukocytter fra milt og hodenyre, mens Western blot mot sekretorisk IgM ble foretatt fra superntantene til disse leukocytene. Dessuten ble transkripter av mIgM, med Mx som positiv kontroll, detektert ved RT-qPCR av stimulerte og ustimulerte leukocytter fra milt og hodenyre.

Uttrykket av Pax5 i leukocytter isolert fra hodenyre og milt ble analysert ved Western blotting med antistoffene tPax5-PD og tPax5-E10 (Figur 19 og 20), og Pax5 45kDa ble detektert i milt ved bruk av begge antistoffene, mens uttrykket i hodenyre var svakt eller ikke detekterbart. Både når antistoffene tPax5-PD og tPax5-E10 ble benyttet, var det uttrykket av Pax5 45kDa som var interessant siden dette er antatt å være Pax5 full-lengde (pkt. 4.1). Både i figur 19 og appendix II er det indikasjoner på at uttrykket av Pax5 45kDa minsker ved de senere tidspunktene etter CpG stimulering, men imidlertid gjør tilsvarende nedgang i uttrykket av EF2 at det er stor usikkerhet rundt disse resultatene. I figur 20 er imidlertid ingen endring i deteksjon av Pax5 45kDa observerbar mellom stimulerte og ustimulerte leukocytter. Det var ikke basert på Western blot med antistoffer mot Pax5 (tPax5-PD og tPax5-E10) mulig å konkludere med om Pax5 45kDa uttrykket hadde endret seg over tid etter stimulering med CpG *in vitro*.

#### 4.5.1 Milt

Pax5 45kDa uttrykkes likevel i milt som vist i begge figurene (figur 19 og 20). Som tidligere nevnt er innslaget av naive B-celler svært høyt i milt. Ved å benytte Pax5 som markør i Western blot observeres en reduksjon i uttrykk av Pax5 45kDa etter stimulering med (CpG ODN) som antyder at B-celler differensieres til plasmaceller. Resultatene presentert i figur 19 indikerer at uttrykket av Pax5 45 kDa reduseres etter *in vitro* stimulering med CpG ODN, noe som også ble observert ved repetisjon av forsøket fra ulike individer (Appendix II). EF2 er imidlertid ujevnt uttrykt i disse blottene som dermed gjør at resultatene i disse forsøkene er usikre. Positiv kontroll (helt til høyre i figur 19) har likevel både lavere proteinloading og et kraftigere uttrykk av Pax5 45 kDa sammenliknet med alle prøvene høstet 3 og 7 dager etter CpG ODN stimulering. Dette er en indikasjon på at uttrykket av Pax5 45kDa har sunket, som igjen kan bety at differensiering fra Pax5<sup>+</sup> B-celler til lymfocytter med lavere Pax5 uttrykk, for eksempel plasmaceller eller plasmablaste, har funnet sted.

Basert på analyser gjort på oppkonsentrerte supernatanter fra stimulerede og ustimulerede leukocytter fra milt (figur 21, A), ble et kraftigere uttrykk av sekretorisk IgM detektert i stimulerede leukocytter sammenliknet med kontrollgruppen etter 7 dager. Dette er ekstra interessant basert på kunnskapen om at plasmablaste kan gjennomgå mitotisk celledeling ved stimulering samtidig som de har en celledyklus som ikke er lengre enn 18 timer (Bromage *et al.*, 2004). Plasmaceller observeres i liten grad i milten hos teleoster (Ye *et al.*, 2013), og dette er også rapportert i laks (Hedfors, 2012). Likevel kan kortlivede plasmablaste være ansvarlig for det sekreterte IgM som ble observert etter 1 og 3 dager i kontrollprøvene. Etter 7 dager kan det tenkes at disse plasmablastene, som uten "insentiv" for celledeling i form av CpG, har gjennomgått apoptose, og at de har lysert/denaturert sammen med IgM som hos teleoster har en halveringstid på 1-3 dager (Ye *et al.*, 2010).

#### 4.5.2 Hodenyre

At Pax5 45kDa ikke uttrykkes i hodenyre ved Western blot er tilnærmet identisk med observasjoner i MacMurray *et al.*, 2013 hvor Pax5 45kDa uttrykk ved bruk av de to samme antistoffene var tilnærmet fraværende i leukocytter fra hodenyre. Resultat fra samme artikkel viste også at Pax5 i lymfocytt-stamceller og pro B-celler hverken

inneholdt paret domene (PD) eller C-terminal (exon 10), som henholdsvis tPax5-PD og tPax5-E10 gjenkjenner. Videre er det også vist fra regnbueørret at plasmaceller i hodenyre ikke uttrykker Pax5, samtidig som modne og aktiverte B-celler hovedsakelig observeres i milt (Zwollo *et al.*, 2005; Zwollo *et al.*, 2010). Det er dermed potensielt få gjenværende lymfocytter som vil uttrykke Pax5 i hodenyre, noe som kan gi en indikasjon på hvorfor Pax5 i svært liten grad påvises her i våre forsøk. Et forbehold som må tas i betraktning er at Pax5-uttrykk i milt og hodenyre leukocytter ble analysert på to ulike membraner, og er dermed ikke direkte sammenliknbare. For å verifisere forskjell i uttrykk bør prøvene analyseres på samme membran.

Den slående forskjellen mellom stimulert- og kontrollprøve (figurer 21, B) indikerer at *in vitro* stimuleringen med CpG ODN gir økt sekresjonen av IgM. Det er viktig å huske at alle sekreterte proteiner vil forbli i supernatanten, og basert på dette er et kraftigere uttrykk av IgM fra dag 7 sammenliknet med dag 1 et forventet resultat gitt at det er antistoff sekreterende celler (ASC) tilstede. Et viktig poeng her er at halveringstiden til serum IgM i regnbueørret er vist å være så kort som 1-3 dager (Ye *et al.*, 2010). Dette kan dermed være indikasjon på at IgM i liten grad akkumuleres i supernatantene utover i forsøksperioden. Den viktigste implikasjonen av dette er derfor at IgM titer kan relateres til antall/andel APC i cellepopulasjonen. Når det har økt så kraftig som det har gjort (figur 21, B) er det en observasjon som peker i retning av at CpG har påvirket utskillelsen av sekretorisk IgM fra plasmaceller.

Plasmaceller mangler i stor grad membranbundne IgM reseptorer (Angelin-Duclos *et al.*, 2000; Zwollo *et al.*, 2008). Det er derfor svært interessant at det i APC fra laks er påvist utskillelse av MHCII molekyler og ko-stimulatoriske faktorer i exosomer (Iliev *et al.*, 2010). Denne sekresjonen ble kun påvist i hodenyre etter *in vitro* stimulering med CpG ODN, og ikke i milt. Det ble også vist at det var en subpopulasjon av adherente celler (trolig makrofager) i hodenyre som gjorde dette. Det er kjent at CpG ODN er en ligand for TLR9 reseptoren i laks (Iliev *et al.*, 2010). CpG har som tidligere nevnt vist seg å inducere medfødte immunresponser blant annet type I IFN sekresjon i laks (Jørgensen *et al.*, 2003; Pedersen *et al.*, 2006). Binding av ligand til TLR9 er hos mennesker vist å påvirke adaptive immunresponser gjennom blant annet modning av DC (Guducci *et al.*, 2006). Det er derfor mulig at spesifikke makrofag subpopulasjoner i hodenyre stimuleres av CpG og bidrar til å aktivere B-celler til økt sekresjonen av IgM, og at dette

skjer i hodenyre, men ikke i milt. Figur 18 støtter denne hypotesen, og viser at økning av mIgM transkripter kun skjedde i hodenyren. Likevel er det viktig å påpeke at Western blot ikke er et kvantitativt verktøy for å observere enkeltcellenes respons, og at metoden kun gir indikasjoner på endringer innenfor den samlede leukocyttopulasjonen for hvert organ.

#### 4.5.3 Begrensinger ved forsøket

Det er mulig at vi i dette forsøket ikke har inkubert leukocytterne over en tilstrekkelig lang tidsperiode til å kunne påvise de endringene vi ønsker å studere. Både med hensyn på IgM sekresjon og endring i morfologi ble det ved *in vitro* LPS stimulering av regnbueørret leukocytter observert et relativt høyere antall ASC tidligst ved dag 5 etter stimulering for både milt og hodenyre. Høyeste andel ASC ble observert 8 dager etter stimulering i milt, og 12 dager etter stimulering i hodenyre (Bromage *et al.*, 2013). Derfor hadde det vært interessant å måle både Pax5 uttrykket i leukocytter og IgM fra supernatanter ved senere tidspunkt enn vi har gjort i disse forsøkene. Ett av problemene er at det har vist seg vanskelig å holde leukocytter fra laks i kultur ut over 7 dager. Samtidig er leukocyttkulturene benyttet på regnbueørret (Bromage *et al.*, 2013; Zwollo *et al.*, 2005; Barr *et al.*, 2011) inkubert ved 18°C, mens kulturene i våre forsøk ble inkubert ved 14°C. Cellulære prosesser skjer hurtigere ved høyere temperaturer, og dette kan ha medført at leukocytterne i denne oppgaven ikke har rukket å utvikle endringer av de markørene som er benyttet, og som lar seg detektere ved de tidspunktene valgt her. Selvfølgelig er det hos eksoterme organismer som teleoster betydelige artsforskjeller i hvilket temperaturoptimum cellene har, og dette må også tas i betraktning. Laks har temperaturoptimum på mellom 4°C og 12°C (Reddin & Shearer, 1987). Ved å inkubere cellene på høyere temperaturer enn dette kan cellene påvirkes negativt, samtidig som det kan gi et "feil bilde" på effekten CpG har på organismen. For eksempel vil det ikke kunne sammenliknes med *in vivo* responser (som vaksinerings) siden temperaturen da helt sikkert er lavere.

Resultatene fra disse forsøkene gir imidlertid indikasjoner på at *in vitro* stimulering av leukocytter fra milt og hodenyre med CpG ODN har initiert en adaptiv immunrespons selv om dette ikke kom frem ved deteksjon av Pax5. Pax5 alene er ikke en optimal markør for å påvise differensiering av B-celler, og ville fungert vesentlig bedre i

kombinasjon med markører, som for eksempel Blimp-1 eller Xbp1, for å påvise de terminale stadiene i differensieringen av lakse B-celler til plasmaceller/plasmablaste hos laks, for eksempel Blimp-1 eller Xbp1. Deteksjon ved Western blot er dessuten ikke et tilstrekkelig sensitiv verktøy, og andre metoder som Flow Cytometri eller "Fluorescence-activated cell sorting" FACS hadde trolig vært mer egnede metoder.

#### **4.6 Pax5 som markør for initiering av en adaptiv immunrespons etter vaksinerings med SAV Ag alene og kombinert med TLR ligander som adjuvant.**

Det er vist at CpG og poly I:C kan stimulere immunresponser hos laks, men også at de kan være effektive adjuvanter i en eksperimentell PD vaksine hvor disse nukleinsyrene er blandet med inaktivert SAV helvirus Ag (Strandskog *et al.*, 2011; Thim *et al.*, 2012; Thim *et al.*, 2013). Det er fra pattedyr kjent at TLR-ligander kan påvirke lengden av og styrken i en antistoffrespons (Kasturi *et al.*, 2011; Zhu *et al.*, 2008). I denne delen av oppgaven ble det undersøkt om Pax5-nivået i viktige immunorganer hos laks immunisert med SAV Ag og CpG/poly I:C alene, og SAV Ag/CpG i kombinasjon ville endre seg over tid og dermed kunne bidra til å beskrive dynamikken i den adaptive immunresponsen i de ulike gruppene sammenliknet med kontrollgruppen.

Pax5 45 kDa viste et jevnt lavt uttrykt i alle gruppene frem til 6 uker etter forsøksstart. På dette tidspunktet var det en markant økning i uttrykket av Pax5 45kDa hos alle gruppene, inklusive kontrollgruppen (figur 22 og 23). Det er derfor ikke mulig å konkludere om SAV Ag eller CpG og Poly I:C, hverken alene eller i kombinasjon, har klart å initiere en adaptiv immunrespons kun ved å detektere Pax5 nivået ved Western blot.

Det som skjer ved initiering av en immunrespons i ett individ er forskjellig fra det som skjer i et annet. Det er viktig å kjenne til forskjellene fra stimulering av leukocytter *in vitro*. Den viktigste forskjellen er at det hos *in vitro* leukocytter i kultur vil være færre cellyper og molekyler som skilles ut av disse er kun være en del av den totale cellepopulasjonen som er tilstede i det aktuelle organet ved det tidspunktet cellene isoleres. I tillegg involverer en humoral adaptiv immunrespons, slik det er antatt å fungere hos teleoster, et samspill mellom primære og sekundære lymfoide organer, og det vil finnes vesvsspesifikke populasjoner av B-celler som varierer i dets uttrykk av Pax5, membranbundet IgM og sekretorisk IgM (Zapata *et al.*, 2006; Zwollo *et al.*, 2008). En optimal primær og sekundær immunrespons, slik den foregår i organismen er

avhengig av produksjon av naive modne B-celler i hodenyren. Modne B-celler fra hodenyren sendes gjennom blodet til baknyre og milt, hvor de gjennom interaksjoner med antigen aktiveres, og deretter differensierer til plasmaceller/plasmablaste. Enkelte "memory" B-celler migrerer tilbake til hodenyren hvor de ved interaksjoner med APC og/eller andre signaler kan stimuleres til videre celleproliferasjon av B-celler. Dette er celletyper (Pro- pre- og umodne B-celler) som antas å være Pax5<sup>+</sup> (figur 1).

Figur 23 kan gi indikasjoner på svakere Pax5 45kDa uttrykk i hodenyre for SAV Ag + C/P sammenliknet med de andre gruppene, selv om forskjellene er relativt beskjedne. Det er fra regnbueørret framsatt en teori om at en modningsgradient av B-celler fra "anterior" nyre til "posterior" nyre eksisterer (Zwollo *et al.*, 2005; Zwollo *et al.*, 2010). Denne modellen vil kunne gi en god forklaring hvorfor uttrykket av Pax5 i er såpass stabilt i hodenyre gjennom forsøksperioden. Hvis Pax5<sup>+</sup> B-celler kontinuerlig migrerer til andre deler av nyren som en del av modningsprosessen, ville uttrykket av Pax5 i hodenyre forbli stabilt ved tidlige stadier av adaptive immunresponser. Når Pax5 uttrykket øker så kraftig 6 uker etter immunisering, kan det skyldes at Pax5<sup>+</sup> lymfocytter (umodne-, modne, plasmablaste og plasmaceller) har migrert til milten. En relativ høyere andel plasmaceller vil forventes å observeres i hodenyren etter immunisering. Dette er som tidligere nevnt en Pax5<sup>-</sup> celletype, og en relativ økning av denne celletypen vil dermed ytterligere bidra til at Pax5 45 kDa uttrykket forblir lavt i leukocyttopulasjonen sett under ett.

I leukocyttopulasjonen fra milt ble det dessuten detektert et tredje bånd i underkant av 40kDa i milt. Dette båndet ble da detektert for alle gruppene med unntak av SAV Ag + C/P gruppen. Det er mulig at dette er den tidligere omtalte isoformen Pax5Δ2 som dette antistoffet kan gjenkjenne, og som ser ut til å være mest uttrykt i milten hos laks.

Det er både fra laks og regnbueørret vist at konsentrasjonen sekretorisk antistoff vil være forhøyet etter 6 uker, og nå en topp 8 uker etter intraperitoneal vaksinerings (Valdenegro-Vega *et al.*, 2013; Bromage *et al.*, 2004). Det er spesifikk antistoffrespons som er det vanligste målet på om en vaksine har vært i stand til å initiere en adaptiv immunresponns hos fisken. Prøver høstet 6 uker etter forsøksstart er imidlertid nå analysert ved ELISA, og antyder en betydelig spesifikk antistoffrespons i de vaksinerte gruppene. Foreløpige resultater antyder noe overraskende at CpG og poly I:C i kombinasjon ga den kraftigste responsen. Det er selvfølgelig for tidlig å konkludere med



noe enda men dette er interessante resultater. Selv om markøren (Pax5) i denne sammenheng har vist seg å være uegnet ved Western blot deteksjon , kunne det vært interessant å detektere Pax5 med samme antistoff ved for eksempel FACS. Arbeidet i denne oppgaven har lagt grunnlag for dette, og det blir spennende å følge det videre arbeidet på dette området.

## 5 Konklusjoner

- Polyklonale antistoffer som gjenkjenner transkripsjonsfaktoren Pax5 fra regnbueørret kryssreagerte med proteiner fra lakseleukocytter isolert fra hodenyre, milt og blod. Ved Western blot detekterte disse antistoffene et protein rundt 45kDa som er forenelig med full-lengde Pax5 fra laks (mw er 41.7 kDa).
- Det kunne ikke detekteres bånd i leukocyttylsat fra laks ved bruk av antistoff mot Blimp-1 og Xbp1 ved Western blot deteksjon.
- Ulike perkoll-gradienter ble testet med formål å finne varianter som kunne skille naive B-celler og plasmaceller. Ved morfologiske undersøkelser og Western blot ble Pax<sup>+</sup> leukocytter anriket hovedsakelig fra 50% sjiktet og 54% sjiktet fra diskontinuerlige perkoll-gradienter. Spesielt i milten var innslaget av celler med morfologi karakteristisk for naive B-celler høyt i dette sjiktet. Det ble derfor basert på morfologi og uttrykk av Pax5 konkludert med at naive B-celler trolig ble isolert fra disse sjiktene. I sjiktet med lavere tetthet (42%) fant vi særlig i hodenyre anrikning av celler som hadde morfologiske kjennetegn som er karakteristiske for plasmaceller, og i kombinasjon med at Pax5 uttrykket var lavt uttrykt i cellelysatet fra dette sjiktet for alle organ, konkluderer vi med at plasmaceller trolig ble isolert i 42% sjiktet.
- Separering mellom naive B-celler og plasmaceller med antistoff for membranbundet IgM viste at både positivt og negativt selekterte leukocytter i hodenyre uttrykte Pax5, som er forventet basert på at det finnes både mIgM<sup>+</sup>/Pax5<sup>+</sup> (naive, aktiverte og plasmablaster) og mIgM<sup>-</sup>/Pax5<sup>+</sup> (pre-, umodne B-celler) i dette organet. I milt virket Pax5<sup>+</sup> med morfologi forenelig med naive B-celler å isoleres basert på antistoff mot mIgM.

- Målinger av mIgM transkripter ved RT-qPCR og Pax5 uttrykk ved Western blot deteksjon med tPax5-PD og tPax5-E10 fra cellelysat fra milt- og hodenyreleukocytter ga indikasjoner på at *in vitro* stimulering med CpG ODN induerte modning av B-celler hos laks. Forhøyet nivå av sekretorisk IgM i supernatanter fra milt- og hodenyreleukocytter viser at CpG stimulering bidrar til økt modning av B-celler til plasmaceller
- Påvisning av Pax5 alene er ved Western blot ikke egnet som markør for å måle effekten vaksinerings har knyttet til initiering av B-celle responser i levende laks.

## 6 Referanser

- Aas, I. B., Austbø, L., König, M., Syed, M., Falk, K., Hordvik, I. & Koppang E. O. (2014). Transcriptional characterization of the T cell population within the salmonid interbranchial lymphoid tissue. *Journal of Immunology*. **(193 (7))**, 3463-9
- Abbas, A. K. & Lichtman, A. H. (2011) Basic immunology – Functions and disorders of the immune system (3. Utg.). Philadelphia: Saunders Elsevier
- Acton, R. T., Weinheimer, P. D., Hall, S. J., Niedermeier, W., Shelton, E. & Bennet, J. C. (1971). Tetrameric immune macroglobulin in three orders of bony fishes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **68 (1)**, 107-11
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. & Walter, P. (2008). Molecular Biology of the Cell (5. Utg.). New York: *Garland Science, Taylor & Francis group*.
- Amin, A. B., Mortensen, L. & Poppe, T. (1991). Histologisk atlas – Normalstruktur hos laksefisk. Bodø: *Akvapatologisk Laboratorium AS*.
- Amrita (2014) – Polymerase Chain Reaction . Tilgjengelig fra nettadressen : (<http://amrita.vlab.co.in/?sub=3&brch=186&sim=321&cnt=1>)
- Angelin-Duclos, C., Cattoretti, G., Lin, K. I. & Calame, K. (2000) Commitment of B lymphocytes to a plasma cell fate is associated with Blimp-1 expression in vivo. *Journal of immunology*. **165 (10)**, 5462-71
- Aucounturier, J., Dupuis & Ganne, V. (2001). Adjuvants designed for veterinary and human vaccines. *Elseviervaccine*. **19**, 2666-2672
- Barr, M., Mott, K. & Zwollo, P. (2011). Defining terminally differentiating B cell populations in rainbow trout immune tissue using the transcription factor Xbp1. *Fish & Shellfish Immunology*. **31 (6)**, 727-735
- Bassity, E. & Clark, T. G. (2012). Functional identification of dendritic cells in the teleost model, rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **7 (3)**: e33196
- Boes, M. (2000) Role of natural and immune IgM antibodies in immune responses. *Molecular Immunology*. **37 (18)**, 1141-9
- Boshra, H., Gelman, A. E. & Sunyer, J. O. (2004). Structural and functional characterization of complement C4 and C1s-like molecules in teleost fish: insight into the evolution of classical and alternative pathways. *Journal of immunology*. **173 (3)**, 349-59
- Bowden, T. J., Cook, P. & Rombout J. H. W. M. (2005). Development and function of the thymus in teleosts. *Fish & Shellfish immunology*. **19**, 413-427
- Bromages, E. S., Kaattari, I. M., Zwollo, P. & Kaattari, S. L. (2004). Plasmablast and plasma cell production and distribution in trout immune tissues. *Journal of Immunology*. **173 (12)**, 7317-23
- Byadgi, O., Puteri, D., Lee, J. W., Chang, T. C., Lee, Y. H., Chu, C. Y & Cheng, T. C (2014). The effect of TRL agonist CpG oligodeoxynucleotides on the intestinal immune respons of *Cobia (Rachycentron canadum)*. *Journal of Immunology Research*. 2014: 273284
- Castro, C. D., Ohta, Y., Dooley, H. & Flajnik, M. F. (2013) Noncoordinate expression of J-chain and Blimp-1 define nurse shark plasma cell populations during ontogeny. *European Journal of Immunology*. **43 (11)**, 3061-75
- Cenci, S. & Sitia, R. (2007). Managing and exploiting stress in the antibody factory. *FEBS letter*. **581 (19)**, 3652-7

- Chang, M., Collet, B., Nie, P., Lester, K., Campbell, S., Secombes, C. J & Zou, J. (2011). Expression and functional characterization of the RIG-I-Like receptors MDA5 and LGP2 in Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Journal of Virology*. **85** (16), 8403-8412
- Cobaleda, C. & Sitia, R. (2007). Managing and exploiting stress in the antibody factory. *FEBS Lett.* **581**, 3652-3657
- Collet, B. (2014). Innate immune responses of salmonid fish to viral infections. *Developmental Comparative Immunology*. **43**(2), 160-173.
- Danilova, N., Bussmann, J., Jekosch, K. & Steiner, L. A. (2005). The immunoglobulin heavy-chain locus in zebrafish: identification and expression of a previously unknown isotype, immunoglobulin Z. *Nature immunology*. **6** (3), 295-302
- Edholm, E. S., Bengten, E., Stafford J. L., Sahoo, M., Taylor, E. B., Miller, N. W. & Wilson, M. (2010). Identification of two IgD+ B cell populations in channel catfish, *Ictalurus punctatus*. *Journal of Immunology*. **185** 4082-4094.
- Ellis, A. E. (2001) Innate host defense mechanisms of fish against viruses and bacteria. *Developmental & comparative immunology*, **25**, 827-839
- FAO (2012). The state of world fisheries and aquaculture 2012. Rome: FAO, Tilgjengelig fra <http://www.fao.org/docrep/016/i2727e/i2727e.pdf> (09.10.2014)
- Greenfield, E. A. (2014). Antibodies: A Laboratory Manual, Second edition. *Medicine & Health Science Books*.
- Guducci, C., Ott, G., Chan, J. H., Damon, E., Calacsan, C. & Matray, T. (2006) Properties regulating cell response to Toll-like receptor 9 activation. *Journal of Experimental Medicine*, **203** (8), 1999-2008
- Hagman, J. & Lukin, K. (2007) "Hands-on" regulation of B cell development by the transcription factor Pax5. *Immunity*. **27** (1), 8-10
- Hansen, J. D., Landis, E. D. & Phillips, R. B. (2005). Discovery of a unique Ig heavy-chain isotype (IgT) in rainbow trout: Implications for a distinctive B cell developmental pathway in teleost fish. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **102** (19), 6919-6924
- Haugeland, G. T., Pettersen, E. F., Sviland, C., Rønneseth, A. & Wergeland, H. I. (2010). Immunostaining of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) leucocytes. *Journal of immunological Methods*. **362** (1-2), 10-21
- Hedfors, I. A., Bakke, H., Skjødt, K. & Grimholt, U. (2012). Antibodies recognizing both IgM isotypes in Atlantic salmon. *Fish & shellfish immunology*. **33**, 1199-1206
- Hjeltnes, B. 2014. Fiskehelsesrapporten 2013. In: HJELTNES, B. (ed)
- Hjortaas, M. J., Skjelstad, H. R., Taksdal, T., Olsen, A. B., Johansen, R., Bang-Jensen, B., Ørpetveit, I. & Sindre, H. (2013). The first detection of subtype 2-related salmonid alphavirus (SAV2) in Atlantic salmon *Salmo salar* L., in Norway. *Journal of Fish Diseases*. **36** (1), 71-4
- Hodawadekar, S., Yu, D., Cozma, D., Freedman, B., Sunyer, O., Atchison, M. & Thomas-Tikhonenko, A., (2007). B-lymphoma cell with epigenic silencing of Pax5 transdifferentiate into macrophages, but do not other hematopoietic lineages. *Experimental Cell Research*. **313** (2), 331-340
- Hodneland, K., Bratland, K. E., Chritie, C., Endresen, A. & Nylund, A. (2005) New subtype of salmonid alphavirus (SAV), Togaviridae, from Atlantic salmon (*Salmo salar*) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in Norway. *Diseases of Aquatic Organisms*. **66**, 113-120
- Hordvik, I., Beveren, F. S., Solem, S. T., Hatten, F. & Endresen, C. (2002) Analysis of two

- IgM isotypes in Atlantic salmon and brown trout. *Molecular Immunology*. **39** (5-6), 313-21
- Houghton, G. & Ellis, A. E. (1996) pancreas disease in Atlantic salmon: serum neutralisation and passive immunisation. *Fish & Shellfish Immunology*. **6**, 465-472
- Hu, M. -C., Gong, H. -Y., Lin, G. -H., Hu, S. -Y., Chen, M., Huang, S. -J., Liao, C. -F. & Wu, J. -L. (2007). Xbp1, a key regulator of unfolded protein response, activates transcription of IGF1 and Akt phosphorylation in zebrafish embryonic cell line. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. **359** (3), 778-783
- Hunt, M. - Real Time PCR. Tilgjengelig fra nettadressen: <http://pathmicro.med.sc.edu/pcr/realtime-home.htm>
- Håvarstein, L. S., Aasjord, P. M., Ness, s. & Endresen, C. (1988). Purification and partial characterization of an IgM-like immunoglobulin from Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Developmental & Comparative Immunology*. **12** (4). 773-85
- Iliev, D. B., Jorgensen, S. M., Rode, M., Krasnov, A., Harneshaug, I., Jorgensen, J. B. (2010). CpG-induced secretion of MHCIIbeta and exosomes from salmon (*Salmo salar*) APCs. *Developmental and comparative immunology*. **34** (1), 29-41
- Iliev, D. B., Skjæveland, I & Jørgensen, J. B. (2013). CpG oligonucleotides bind TLR9 and RRM-containing proteins in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *BMC immunology* **14**, (12).
- Jansen, M. D., Bang Jensen, B. & Brun, E. (2014) Clinical manifestations of pancreas disease outbreaks in Norwegian marine salmon farming – Variations due to salmonid alphavirus subtype. *Journal of Fish diseases*. doi: 10.1111/jfd. 12238. [Epub ahead of print]
- Jansson, E., Gronvik, K. -O., Johannisson, A., Naslund, K., Westergren, E. & Pilstrom, L. (2003). Monoclonal antibodies to lymphocytes of rainbow trout. (*Oncorhynchus mykiss*). *Fish & Shellfish Immunology*. **14**, 239-257
- Jensen, I., Albuquerque, A., Sommer, A. I & Robertsen, B. (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** (4), 311-26
- John, S. A. & Garrett-Sinha, L. A. (2009) Blimp1: a conserved transcriptional repressor critical for differentiation of many tissues. *Exp Cell Res*. **315** (7), 1077-84
- Jørgensen, J. B., Zou, J., Johansen, A., Secombes C. J. (2001). Immunostimulatory CpG oligodeoxynucleotides stimulate expression of IL-1Beta and interferon-like cytokines in rainbow trout macrophages via a chloroquine-sensitive mechanism. *Fish & Shellfish immunology*. **11**, (8). 673-82
- Jørgensen, J. B., Johansen, Stenersen, B. & Sommer, A. I. (2001a) CpG oligodeoxynucleotides and plasmid DNA stimulate Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) leucocytes to produce supernatants with antiviral activity
- Jørgensen J. B., Johansen, L. H., Steiro, K., & Johansen, A. (2003) CpG DNA induces protective antiviral immune responses in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) *Journal of Virology*. **77**, (21) 11471-11479
- Jørgensen, J. B. (2013). *Fish vaccination*. (s. 85-103). Chichester: John Wiley & Sons.
- Kaattari, S., Bromage, E. & Kaattari, I. (2005) Analysis of long-lived plasma cell production and regulation: Implications for vaccine design for aquaculture. *Aquaculture*. **246**, 1-9
- Kallies, A. & Nutt, S. L. (2007) Terminal differentiation of lymphocytes depends on Blimp-1. *Current opinion in immunology*. **19** (2), 156-62
- Kasturi, S. P., Skountzou, I., Albrecht, R. A., Koutsonanos, D., Hua, T. & Nakaya, H. I. (2011) Programming magnitude and persistence of antibody responses with

- innate immunity. *Nature*, **470**, 543-547
- Koh, C. M. (2014). Preparation of Cells for Microscopy using cytopspin. *Methods in Enzymology*. **533**, 235-40
- Koppang, E. O., Hordvik, I., Bjerkås, I., Torvund, J., Aune, L., Thevarajan, J., Endresen, C. (2003). Production of rabbit antisera against recombinant MHC class II beta chain and identification of immunoreactive cells in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Fish & Shellfish Immunology*. **14**, (2). 115-132
- Koppang, E. O., Fischer, U., Moore, L., Tranulis, M. A., Dijkstra, J. M., Knoller, B., Aune, L., Jirillo, E & Hordvik, I. (2010). Salmonid T-cells assemble in the thymus, spleen and in novel interbranchial lymphoid tissue. *Journal of Anatomy*, **217** (6), 728-739
- Laing, K. J., Purcell, M. K., Winton, J. R & Hansen, J. D. (2008). A genomic view of the NOD-like receptor family in teleost fish: identification of a novel NLR subfamily in zebrafish. *BMC Evolutionary Biology*. **8**, (42)
- Leong, J. S., Jantzen, S. G. & von Schalburg, K. R. (2010) *Salmo salar* and *esox lucius* full-length cDNA sequences reveal changes in evolutionary pressures on a post-tetraploidization. *BMC Genomics*, **11**, 279
- Li, J., Barreda, D., Zhang, Y. -A., Boshra, H., Gelman, A. E., LaPatra, S., Tort, L. & Sunyer, J. O. (2006) B lymphocytes from early vertebrates have potent phagocytic and microbicidal abilities. *Nature immunology*. **7**, 1116-24
- Lieschke, G. J., Oates, A. C., Crowhurst, M. O., Ward, A. C., & Layton, J. E. (2001) Morphologic and functional characterization of granulocytes and macrophages in embryonic and adult zebrafish. *Blood*. **98**,(10): 3087-3096
- Life technologies. (2008). Real Time PCR handbook . Tilgjengelig fra nettadressen: ([http://find.lifetechnologies.com/Global/Filelib/qPCR/RealTimePCR\\_Handbook\\_Update\\_FLR.pdf](http://find.lifetechnologies.com/Global/Filelib/qPCR/RealTimePCR_Handbook_Update_FLR.pdf))
- MacMurray, E., Barr, M., Bruce, A., Epp, L. & Zwollo, P. (2013). Alternative splicing of the trout Pax5 gene and identification of novel B cell populations using Pax5 signatures. *Developmental & Comparative Immunology*. **41** (2). 270-281
- Magnadóttir, B., Gudmundsdóttir, B. K. & Gudmundsdóttir, S. (1997) The carbohydrate moiety of IgM from Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) *Comparative Biochemistry & Physiology*. **116** (4), 423-430
- Magnadóttir, B. (1998). Comparison of immunoglobulin (IgM) from four fish species. *Icelandic Agricultural Science*. **12**, 47-59
- McVicar, A. H. (1987) Pancreas disease of farmed Atlantic salmon, *Salmo-salar*, in Scotland – epidemiology and early pathology. *Aquaculture*. **67**, 71-78
- Meng, Z., Shao, J. & Xiang, J. (2003) CpG oligodeoxynucleotides activate grass carp (*ctenopharyngodon idellus*). *Developmental & Comparative Immunology*. **27**. 313-321
- Merrill J. E., Ullberg, M. & Jondal. (1981) Influence of IgG and IgM receptor triggering on humane natural killer cell cytotoxicity measured on the level of the single effector cell. *European Journal of Immunology*. **11** (7), 536-41
- Munang'andu, H. M., Fredriksen, B. N., Mutoloki, S., Dalmo, R. A. & Evensen O. (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** (7)
- Mutoloki, S, Jørgensen, J. B. & Evensen, Ø. (2014) *Fish vaccination*. (s. 104-115). Chichester: John Wiley & Sons.
- Nelson, D. L. & Cox, M. M. (2008). Lehninger – Principles of Biochemistry. *W. H. Freeman*

- and Company.*
- Northrup, D. & Allman, D. (2008) Transcriptional regulation of early B cell development. *Immunologic research*. **42** (1-3) 106-117
- Othani, M., Miyada, T. & Hiroishi, S. (2006). Identification of gene encoding critical factors regulating B-cell terminal differentiation in torafugu (*Takifugu rubripes*). *Comparative Biochemistry & Physiology*. Part D: Genomics Proteomics **1**, 109-114
- Page, D. M., Wittamer, V., Bertrand, J. Y., Lewis, K. L., Pratt, D. N. & Delgado N., (2013). An evolutionarily conserved program of B-cell development and activation in zebrafish. *Blood*. **122**(8), e1-11
- Palti, Y. (2011). Toll-like receptors in bony fish: From genomics to function. *Developmental and Comparative Immunology*. **35**, 1263-1272
- Pancer, Z., Mayer, W. E., Klein, J. & Cooper, M. D. (2004). Prototypic T cell receptor and CD4-like coreceptor are expressed by lymphocytes in the agnathan sea lamprey. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **101** (36), 13273-8
- Pedersen, G. M., Johansen, A., Olsen, R. L & Jørgensen, J. B (2006). Stimulation of type I IFN activity in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) leukocytes: Synergistic effects of cationic proteins and CpG ODN. *Fish & Shellfish immunology*. **20** (4), 503-518
- Pettersen, F. E., Fyllingen, I., Kavlie, A., Maaseide, N. P., Glette, J., Endresen, C. & Wergeland, H. I. (1995) Monoclonal antibodies reactive with serum IgM and Leukocytes fra Atlantic Salmon (*Salmo salar* L.) *Fish & Shellfish Immunology*. **5** (4), 275-287
- Poppe, T., Bergh, Ø., Espelid, S. & Nygaard, S. (2002) Fiskehelse og Fiskesykdommer (3. Utg.). Oslo: Universitetsforlaget.
- Poppe, T., Bruno, D. W & Noguera, P. A. (2013) A Colour Atlas og Salmonid Diseases (2. utg.). New York/london: Springer Dordrecht Heidelberg
- Press, C. M., Evensen, O. (1999). The morphology of the immune system in teleost fishes. *Fish and shellfish immunology*, **9**, 309-318
- Reddin, D. G. & Shearer, W. H. (1987) Sea-surface temperature and distribution of Atlantic salmon in the northwest Atlantic Ocean. *American Fisheries Society Symposium*. **1**, 162-275
- Reimold, A., Ponath, P. D., Li, Y. S., Hardy, R. R., Davis, C. S., Strominger, J. L. & Glimcher, L. H. (1996). Transcription factor B cell lineage-specific activator protein regulates the gene for human X-box binding protein 1. *Journal of experimental medicine*. **183**, 393-401.
- Robertsen, B., Trobridge, G & Leong, J. A. (1997). Molecular cloning of double-stranded RNA inducible Mx genes from Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Developmental Comparative Immunology*. **21**, (5). 397-412
- Robertsen, B. (2006). The interferon system of teleost fish. *Fish & Shellfish Immunology*. **20** (2), 172-191
- Robertsen, B. (2011). Can we get the upper hand on viral diseases in aquaculture of Atlantic salmon? *Aquaculture Research*, **42**, 125-131
- Rønneseth, A., Haugland, G. T. & Wergeland, H. I. (2013) Flow cytometry detection of infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) within subpopulations of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) leukocytes after vaccination and during the time course of experimental infection. *Fish & Shellfish Immunology*, **34** (5), 1294-305
- Salinas I, Zhang, Y. A. & Sunyer J. O. (2011) Mucosal immunoglobulins and B cells of teleost fish. *Developmental & Comparative Immunology*. **35** (12), 1346-65
- Shiina, T., Dijkstra, J. M., Shimizu, S., Watanabe, A., Yanagiya, K., Kiryu, I., Fujiwara, A.,



- Nishida-Umerhara, C., Kaba, Y., Hirono, I., Yoshiura, Y., Aoki, T., Inoko, H., Kulaski, J. K. & Ototake, M. (2005). Interchromosomal duplication of major histocompatibility complex class I regions in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), a species with a presumably recent tetraploid ancestry. *Immunogenetics*. **56** (12), 878-93
- Sizemore, R. C., Miller, N. W., Cuchens, M. A., Lobb, C. J. & Clem L. W. (1984) Phylogeny of lymphocyte heterogeneity: the cellular requirements for in vitro mitogenic responses of channel catfish leukocytes. *Journal of immunology*. **133**(6), 2920-4.
- Stafford, J. L., Bengtèn, E., Du Pasquier, L., McIntosh, R. D., Quiniou, S. M., Clem, L. W., Miller, N. W. & Wilson, M. (2006). A novel family of diversified immunoregulatory receptors in teleost is homologous to both mammalian Fc receptors and molecules encoded within the leukocyte receptor complex. *Immunogenetics*. **58** (9), 758-773
- Strandskog, G., Villoing, S., Iliav, D. B., Thim, H. L., Christie, K. E & Jørgensen, J. B (2011). Formulations combining CpG containing oligonucleotides and poly I:C enhance the magnitude of immune responses and protection against pancreas disease in Atlantic salmon. *Developmental Comparative Immunology*. **35** (11), 1116-27
- Sun, B., Greiner-Tollersrud, L., Koop, B. F. & Robertsen, B. (2014). Atlantic salmon possesses two clusters of type I interferon receptor genes on different chromosomes, which allows for a larger repertoire of interferon receptors than in zebrafish and mammal. *Developmental & Comparative Immunology*. **47** (2), 275-286
- Svingerud, T., Solstad, T., Sun, B., Nyrud, M. L. J., Kileng, Ø., Greiner-Tollersrud, L. & Robertsen, B. (2012). Atlantic salmon type I IFN subtypes show differences in antiviral activity and cell-dependent expression: evidence for high IFN $\beta$ /IFN $\gamma$ -producing cells in fish lymphoid tissues. *Journal of Immunology*, **189** (12), 5912-23
- Tacchi, K., Musharrafieh, R., Larragoite, E. T., Crossey, K., Erhardt, E. B., Martin, S. A., LaPatra, S. E. & Salinas, I. (2014) Nasal immunity is an ancient arm of the mucosal immune system of vertebrates. *Nature Publishing Group*. 5:5205. Doi: 10
- Takano, T., Kondo, H., Hirono, I., Endo, M., Saito-Taki & Aoki, T. (2007). Molecular cloning and characterization of Toll-like receptor 9 in Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*. *Molecular immunology*. **44** (8), 1845-53
- Takano, T., Kondo, H., Hirono, I., Endo, M., Saito-Taki & Aoki, T. (2011) Toll-like receptors in teleosts. *Diseases in Asian Aquaculture VII*, 197-208
- Thim, L. H., Iliav, D. B., Christie, K. E., Villoing, S., McLoughlin, M. F., Strandskog, G. & Jørgensen, J. (2012). Immunoprotective activity of Salmonid Alphavirus Vaccine: Comparison of the immune responses induced by inactivated whole virus antigen formulations based on CpG class B oligonucleotides and poly I:C alone or combined with an oil adjuvant. *Vaccine*. **30**, (32), 4828-4834
- Thim, L. H. (2013). SAV Ag CpG/polyI:C formulated vaccination potentiate protective immune responses in Atlantic salmon. (Masteroppgave, Universitetet i Tromsø), H. L Thim, Tromsø.
- United Nations 2013. World Population Prospect: The 2012 Revision, Key findings and Advance tables. Working paper No. ESA/P/WP.227. Department of Economic and social affairs, Population Division
- Uribe, C., Folch, H., Enriquez, R. & Moran, G. (2011). Innate and adaptive immunity in teleost fish: a review. *Veterinarni Medicina*, **56**, 486-503
- Valdenegro-Vega V. A., Crosbie, P., Vincent, B., Cain, K. D. & Nowak, B. F. (2013) Effect of

- immunization route on mucosal and systemic immune response in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Veterinaru Immunology and Immunopathology*. **151** (1-2), 113-123
- Vernino, L., McAnally, L. M, Ramberg, J. & Lipsky, P. E. (1992) Generation of nondividing high rate Ig-secreting plasma cells in cultures of human B cells stimulated with anti-CD3-activated T cells. *Journal of Immunology*. **148** (2), 404-10
- Vollmer, J & Krieg, A. M. (2009). Immunotherapeutic applications of CpG oligodeoxynucleotide TLR9 agonist. *Advanced Drug Delivery Reviews*. **61** (3), 195-204
- Widmaier, E. P., Raff, H & Strang, K. T. (2011) *Vander's Human Physiology* (12. Utg.) New York: McGraw Hill
- Xu, C., Mutoloki, S. & Evensen, O. (2012). Superior protection conferred by inactivated whole virus vaccine over subunit and DNA vaccines against salmonid alphavirus infection in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Vaccine*. **30**(26), 3918-28.
- Yasuike, M., de Boer, J., von Schalburg, K. R., Cooper, G. A. McKinnel, L., Messemer, A., So, S., Davidson, W. S. & Koop B. F. (2010) Evolution of duplicated IgH loci in Atlantic salmon, *Salmo salar*. *Bio Med Central Genomics*. **11**, 486
- Ye, J., Bromage, E. S. & Kaattari, S. L. (2010). The strength of B cell interaction with antigen determines the degree of IgM polymerization. *Journal of Immunology*. **184**, 844-850
- Ye, J., Kaattari, I. M., Ma, C & Kaattari, S. (2013) Teleost Humoral Immune Responses. *Fish & Shellfish immunology*. **35** (6), 1719-28
- Zapata, A., Diez, B., Cejalvo, T., Gutiérrez-de Frias & Cortès, A. (2006) Ontogeny of the immune system of fish. *Fish & Shellfish Immunology*, **20**, (2) 126-136
- Zhang, Y. A., Hikima, J., Li, J., LaPatra, S. E., Lou, Y. P. & Sunyer, J. O. (2009) Conservation of structural and functional features in a primordial CD80/86 molecule from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), a primitive teleost fish. *Journal of immunology*. **183** (1), 83-96
- Zhang, Y. A., Salinas, I., Li, J., Parra, D., Bjork, S. & Xu, Z. (2010) IgT, a primitive immunoglobulin class specialized in mucosal immunity. *Nature immunology*. **11** (9), 827-35
- Zhu, Q., Egelston, C., Vivekanandhan, A., Uematsu, S., Akira, S., Klinman, D. M., Belyakov, I. M. & Berzofsky, J. A. (2008) Toll like receptor ligands synergize through distinct dendritic cell pathways to induce T cell responses: implications for vaccines. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **105** (42), 16260-16265
- Zwollo, P., Arrieta, H., Ede, K., Molinder, K., Desiderio, S. & Pollock R. (1997) The Pax5 gene alternatively spliced during B-cell development. *The Journal of Biological Chemistry*. **272** (15), 10160-8
- Zwollo, P., Rao, S., Wallin, J. J., Gacstetter, E. R. & Koshland, M. E. (1998). The transcription factor NF-kappaB/p50 interacts with the *blk* gene during B cell activation. *The journal of Biological Chemistry*. **273** (29), 18647-55
- Zwollo, P., Cole, S., Bromage, E. & Kaattari, S. (2005). B cell heterogeneity in the teleost kidney: Evidence for a maturation gradient from anterior to posterior kidney. *The Journal of Immunology*. **174** (11), 6608-16
- Zwollo, P., Haines, A., Rosato, P. & Gumlak-Smith, J. (2008). Molecular and cellular analysis of B-cell populations in the rainbow trout using Pax5 and immunoglobulin markers. *Developmental and Comparative Immunology*. **32** (12), 1482-96
- Zwollo, P., Mott, K. & Barr, M. (2010) Comparative analysis of B cell populations in trout

kidney and mouse bone marrow. *Developmental & Comparative Immunology*. **34**, (12). 1291-1299

Zwollo, P. (2011). Dissectin teleost B cell differentiation using transcription factors. *Developmental and Comparative Immunology*. **35**, 898-905

## Appendix I

### Ulike reagenser benyttet til Western blott

Blottebuffer x5 (1 liter)	gram
Trisbase trizme-OH	15
Glysin	72
SDS	5

Blottebuffer x1: (0,5 liter)	ml
5x blottebuffer	100
99,8% metanol (Sigma Aldrich)	70-100
MilliQ (destillert vann uten Mg <sup>2+</sup> og Ca <sup>2+</sup> )	300-330

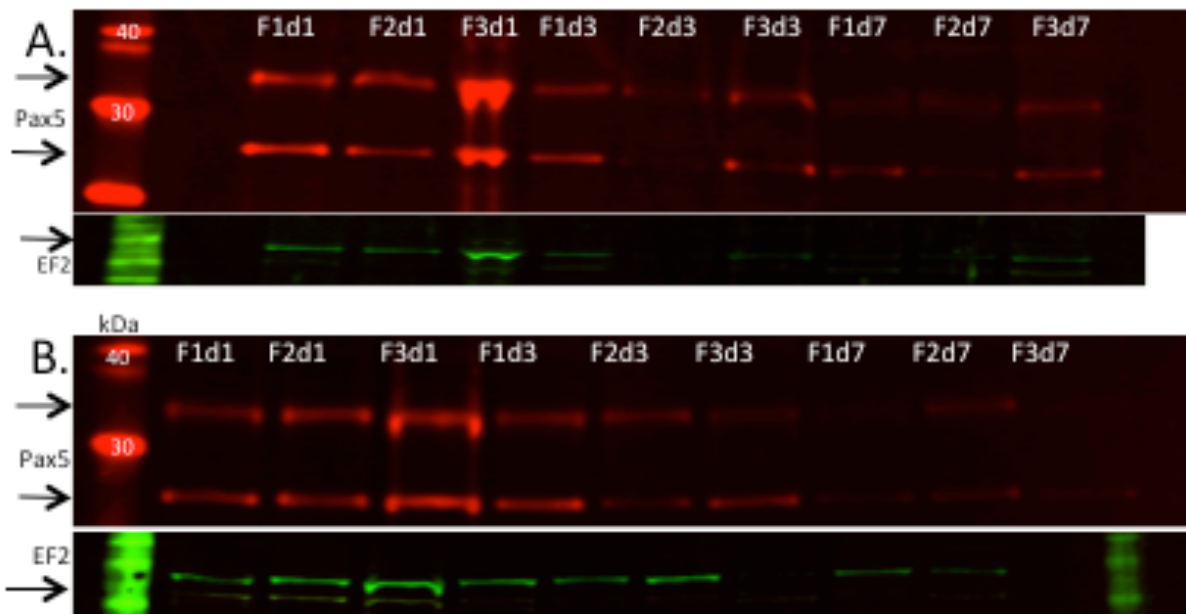
TTBS x10 (1 liter)	ml
Destillert H <sub>2</sub> O	880
5 M NaCl	100
1 M tris (pH 7,5)	20

TTBS x1 (1 liter)	ml
Destillert H <sub>2</sub> O	899
TBS	100
Tween 20	1

90% Perkoll utgangsløsning (100 ml)	ml
Perkoll (GE Healthcare)	90
NaCl (5 mol)	3,08
MilliQ (destillert vann uten Mg <sup>2+</sup> og Ca <sup>2+</sup> )	6,92

## Appendix II

### Western Blot av CpG stimulerte og ustimulerte leukocytter fra milt.



**Figur.** Western blot analyse med tPax-PD av lakseleukocytter fra milt stimulert *in vitro* med CpG. Leukocytter fra tre individer er stimulert med CpG, og høstet 1, 3 og 7 dager (d) etter stimuleringen. Prøven er navngitt på følgende måte; Fisk 1 høstet 3 dager etter stimulering = (F1d3). Ustimulerte kontrollprøver er høstet ved samme tidspunkt. Størrelsesmarkøren MagicMark er benyttet, og EF2 er inkludert som loadingkontroll. Membranene er eksponert i 15 minutter (A) Ustimulerte kontrollprøver (B) CpG stimulerte prøver.