



Norges miljø- og biovitenskapelige universitet

NMBU Veterinærhøgskolen  
Institutt for basalfag og akvamedisin  
Seksjon for akvamedisin og ernæring

Fordypningsoppgave 2019, 40 pt

## **T-celleimmunitet og betydning for beskyttelse mot PD-virusinfeksjon**

The importance of T cell immunity for protection against PD virus infection in salmon

Brimsholm, Malin  
Kvigstad, Elise Friis  
Kull 2014

Evensen, Øystein

# Innhold

Sammendrag.....	4
Innledning.....	5
OPPDAGELSE OG UTBREDELSE .....	5
GENUS ALFAVIRUS .....	7
Genomisk struktur .....	8
SMITTE MED SAV.....	9
PATOGENESE .....	10
PD-VAKSINASJON.....	11
Inaktivert vaksine .....	11
DNA-vaksine.....	12
IMMUNOLOGI .....	14
Fiskens immunsystem .....	14
Medfødt immunitet.....	15
Apoptose.....	18
Ervervet immunitet.....	19
ERLOTINIB OG SUNITINIB .....	25
FORMÅL .....	26
Materiale og metoder .....	28
Virus og cellekultur.....	28
Reagenser .....	28
DNA-vaksine.....	28
Inaktivert vaksine .....	29
Erlotinib og sunitinib.....	30
Forsøksdesign.....	30

Smitte .....	32
Prøvetaking.....	32
RNA-isolasjon og cDNA-syntese .....	33
Kvantitativ PCR (real-time PCR).....	33
Histologi .....	34
Statistikk.....	34
Resultater.....	35
Histologisk vurdering.....	35
Hjertescore .....	35
Pankreas score.....	38
Muskelscore .....	41
Real time PCR.....	42
SAV3-nivå.....	42
CD4 ekspresjon .....	44
CD8 ekspresjon .....	45
Diskusjon.....	47
Konklusjon .....	50
Referanser.....	51
Takk til bidragsytere.....	57
Summary .....	58
Vedlegg .....	59
Vedlegg 1: Behandlingsgrupper.....	59
Vedlegg 2: Klassifisering og gradering av histopatologiske forandringer.....	61
Vedlegg 3 .....	62

## **Sammendrag**

*Tittel:* T-celleimmunitet og betydning for beskyttelse mot PD-virusinfeksjon

*Forfattere:* Malin Brimsholm, Elise Friis Kvigstad

*Veileder:* Øystein Evensen, Institutt for basalfag og akvamedisin

Denne oppgaven undersøker T-cellemediert immunitet ved infeksjon med SAV3. I dette eksperimentelle studiet ble presmolt av atlantisk laks vaksinert intramuskulært med DNA-plasmid som koder for de strukturelle polyproteinene C-E3-E2-K6-E1 eller intraperitonealt med en kommersiell inaktivert helvirusvaksine med Salmonid Pancreas Disease Virus-stamme ALV 405. Fisk ble også behandlet med en kombinasjon av to cytostatikum, erlotinib og sunitinib. Vaksinert og cytostatikabehandlet fisk ble deretter smittet med SAV 3 intraeritonealt, og prøveuttak ble gjort 2,4 og 6 uker post infeksjon. I vårt studie ga den inaktiverede vaksinen lavest score på histopatologiske forandringer i hjerte og pankreas. Dette stemmer med funn gjort med real time PCR, hvor Alpha-ject ga lavest virusnivå ved alle uttak. Ved real time PCR-undersøkelse av CD8-cellenivå viser våre resultat at fisk injisert med PBS hadde den største økningen i genuttrykk av disse T-cellene.

# Innledning

## OPPDAGELSE OG UTBREDELSE

Pancreas Disease (PD) er en sykdomstilstand hos atlantisk laks *Salmo salar* forårsaket av salmon pancreas disease virus som tilhører familien Togaviridae (1). PD hos atlantisk laks gir nedsatt appetitt og tilvekst, og patologien karakteriseres av uttalt tap av pankreasvev, samt lesjoner i hjerte- og skjelettmuskulatur. PD ble første gang beskrevet i Skottland i 1976 (2) og sykdommen har i følge Poppe (3) forekommet i Norge siden 1988. Viruset ble første gang påvist i Irland i 1995 og fikk navnet Salmon pancreas disease virus (SPDV). Dette virus ble først identifisert som “toga-like” virus, men ble senere plassert i familien Togaviridae, genus Alphavirus (1, 4). Det er 6 kjente subtyper av viruset, der de deles inn i SAV 1-6 basert på forskjeller i nukleotidsekvenser i genomet (5, 6).

Det er to pågående epidemier langs norskekysten i dag, med subtypene marin SAV2 og SAV3. SAV2 forårsaker det vi kjenner som PD hos sjøsatt atlantisk laks i Norge og i Skottland, og en ferskvannsvariant av samme subtype påfører sykdommen Sleeping Disease hos regnbueørret *Oncorhynchus mykiss* i flere europeiske land (5, 7-13). SAV3 er foreløpig kun påvist i Norge og gir en mer alvorlig form for PD hos atlantisk laks (5).

SAV3 forekommer i den sørlige delen av den såkalte PD-sonen i Norge; i Hordaland og Rogaland, oftest sør for Hustadvika (14), se Figur 1. Isolasjon av virus fra prøver tatt fra fisk med klinisk PD på Vestlandet i 1997 viste serologisk kryss-reaksjon med salmon pancreas disease virus (SPDV) isolert fra Irland (15). Dette tydet på at et virus identisk eller nært beslektet SPDV hadde blitt isolert fra PD-syke smolt i Norge, noe som indikerte at SPDV var den kausative årsaken til PD hos norsk oppdrettslaks. Etter sekvensering av virusisolasjoner

er det fastslått at viruset er 91.6 og 92.9 % genomisk likt med henholdsvis SPDV og Sleeping disease virus (SDV), og basert på histopatologiske forandringer og ulikheter i nukleotidsekvenser har viruset fått navnet SAV3, også benevnt Norwegian salmonid Alphavirus (NSAV) (5).

Marin SAV2 ble i følge Hjortaa og medarbeidere påvist for første gang i Norge våren 2011, nord for daværende PD-sone (16). Det ble påvist små mengder virus hos 12 av 20 fisk som hadde histologiske forandringer forenelig med PD. Tre uker senere ble det detektert relativt høye antistoff-titer av nøytraliserende antistoffer mot SAV. Viruset viste seg å være nært beslektet med SAV subtype 2. September samme år ble det påvist SAV2 ved en ny lokalitet, men da innenfor PD-sonen. I dag strekker SAV2 seg fra Hustadvika i sør til Skjemta, gamle grensen mellom Nord- og Sør-Trøndelag, i nord.



Figur 1. Oversikt over overvåkningssoner (merket lys blå) og PD-sonen (merket mørk blå) i uke 47, november 2019. De gule punktene viser anlegg med påvist pankreassykdom eller mistanke om PD. Av fiskehelse, BarentsWatch, 2019. (<https://www.barentswatch.no/fiskehelse/2019/47>)

PD har i flere år vært den mest alvorlige virussykdommen hos sjøsatt laksefisk i Norge, men nå virker betydningen av Cardiomyopati syndrom (CMS) å være større. De siste årene har vi sett en økning i antall nye tilfeller av PD, fra 138 i 2016 til 176 i 2017 (14). I 2017 kom en ny PD-forskrift med innføring av obligatorisk screening av SAV i alle sjøanlegg, noe som kan

være årsaken til den store økningen i nye påvisninger dette året. Uten obligatorisk screening ville subkliniske infeksjoner trolig ikke blitt rapportert. De rapporterte tallene angir antall *nye* tilfeller, og det reelle antallet infiserte lokaliteter er derfor høyere da det allerede står infisert fisk i sjøen fra før årsskiftet. Tallene angir både påviste og mistenkte tilfeller av PD med histopatologiske forandringer forenelig med PD, med eller uten PD-virus påvist i målorgan fra samme fisk. I 2018 ble det registrert 163 nye tilfeller, som er noe redusert fra det forrige året. Det ble registrert 98 tilfeller med SAV3 på Vestlandet, der ett av disse anleggene også fikk påvist SAV2. På Nord-Vestlandet og i Midt-Norge ble det registrert 63 nye tilfeller med SAV2, der ett av anleggene også fikk påvist SAV3 (14).

## **GENUS ALFAVIRUS**

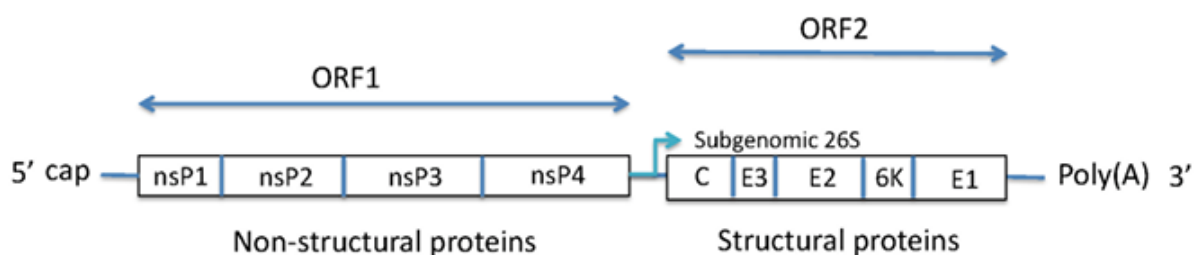
SAV (Salmonid alfavirus) er et virus som tilhører genus Alfavirus, og er et av to genera i familien Togaviridae (17). Genus alfavirus deles også inn i to kategorier basert på området viruset først ble oppdaget; Old World og New World virus (18). Disse kategoriene skilles fra hverandre også basert på hvilke symptomer infeksjonen gir. Et eksempel på en Old World-virusinfeksjon er Chikungunyavirus, som gir utfordringer i Asia, Afrika og Italia. Dette viruset overføres til mennesker via smittede mygg, og gir bl. a kvalme, høy feber og smerter i mukler og ledd (19). New World virus gir ofte encephalitter, som Western og Eastern equine encephalittvirus på hest (20). Slike virus kan gi alvorlige infeksjoner hos både dyr og mennesker.

Generelt er alfavirus vektorbårne virus, og er klassifisert som et arbovirus (arthropode-borne-virus) hvor det er nødvendig med en vektor, ofte et insekt, for å spre smitten videre (17). Det er i dag kjent 24 virusarter i dette genuset (21). Av disse er det to marine virus, Salmonid alfavirus (SAV) og Southern elephant seal virus (SESV) (4, 22). Spesielt for SAV er at dette

viruset ikke smitter via vektorer, men hovedsakelig vannbåren smitte. Noen studier er gjort for å undersøke om SAV kan smittes via lakselus, men det er fremdeles uklart om dette er tilfelle. Det kan likevel ikke utelukkes at lakselus kan bringe smitten, da lusa spiser blod. I en studie gjort av Petterson og medarbeidere fant man at SAV kunne isoleres fra lakselus som hadde oppholdt seg i merder hvor det var utbrudd av PD. Det er derimot ikke vist at viruset kan replikere i lakselusen, da viruset som ble oppdaget kan ha befunnet seg på lusa sine ytre overflater. Dermed er lusen sin rolle som vektor er noe usikker (23).

## Genomisk struktur

Alfavirus er små kappevirus (65-70 nm diameter) med +ssRNA genom på 11,5 kb (24). Genomet består av to ORFs (open reading frames) (17), hvor den ene koder for virale strukturelle proteiner og den andre koder for replikasepolyprotein. Genomet har en 5' cap-ende som utgjør 2/3 av genomet. Her finner man de ikke-strukturelle proteinene (nsP1-nsP4). Den polyadenylaterte (PolyA) 3'enden utgjør 1/3 av genomet, og her kodes det for de strukturelle proteinene, deriblant de to glycoproteinene E1 og E2 (17). (Se Figur 2).



Figur 2. Viser organiseringen av alphavirusgenomet, med plassering av de ikke-strukturelle proteinene og de strukturelle proteinene, inkludert E2 og E1 (Figur hentet fra Gou. 2015) (25).

Genomet ligger i et kapsid i ikosaeder-struktur, og dette beskyttes av en kappe bestående av et lipidlag, hvor de viktigste kappeproteinene/spikeproteinene er glycoproteinene E1 og E2 (E=



enveloped). Disse glykoproteinene er ansvarlige for tilhefting til celleoverflater ved hjelp av reseptorbinding, hvor E2 trolig står for reseptorbindingen, og E1 bidrar til denne prosessen (17). De to glykoproteinene E1 og E2 er viktige for virulensen til viruset (26), og virulensen til SAV er relatert til endringer i aminosyrerene i både E1 og E2 (27-29).

Viruset fraktes til endosomet ved hjelp av clathrinmediert endocytose. Her vil nukleokapsidet slippes ut i cytoplasma etter at syreforholdene i endosomet fører til fusjonering mellom viruskappen og den endosomale membranen. Deretter transporteres viruset til endosomet, hvor det sure miljøet fører til at spikeproteinene fusjonerer med endosomalmembranen, slik at nucleocapsidet kan slippes ut i cytoplasma. I cytoplasma vil viruets +ssRNA fungere som mRNA for proteinsyntese, samt som templat for den –ssRNA (24).

SAV vil, i likhet med andre alfavirus, replikere i cytoplasma. Her skjer det en transkripsjon og translasjon av mRNA, og det dannes virale proteiner. De fire nsP vil da danne et replikasjonskompleks, og dette vil sørge for at det skjer en oppformering av det virale RNAet (30). Det skjer en posttranslasjonell polyproteinprosessering hvor de strukturelle kappeproteinene gjennomgår prosessering og modning i cellenes ER og Golgiapparat, før disse transporteres til plasmamembranen. RNA-genomet pakkes og det dannes en cytoplasmisk kjerne som slippes ut av cellen ved hjelp av budding (24).

## **SMITTE MED SAV**

I en studie utført av Kristoffersen er det konkludert med at omkringliggende PD-infiserte lokaliteter er den største risikoen forbundet med PD-smitte, og at lokaliteter utenfor områder med smitte har mindre risiko for å bli infisert (31). Fisk skiller ut SAV med avføring og slim (32) og smitte mellom fisk skjer horisontalt, sannsynligvis over gjeller eller tarm (33). Viruset kan transporteres mellom ulike lokaliteter med vannstrømmer eller med båter, utstyr,

personell og fisk. Det er funnet SAV i fett som lekker fra død fisk (34), og dette fettene kan sannsynligvis akkumulere ved vannoverflaten og dermed fraktes med vannstrømmen i overflatelaget av vannmassene.

Det er vist av Veterinærinstituttet på oppdrag fra Mattilsynet at rensefisk kan fungere som mekaniske vektorer for SAV-smitte hos oppdrettslaks(35).

## **PATOGENESE**

De første tegnene på PD-infeksjon i en merd er nedsatt appetitt og nedsatt tilvekst. I tillegg vil man finne såkalte ”svimere”, som oppholder seg i vannkanten/vannoverflaten eller trenger seg sammen i hjørner (33).

Patologien til SAV er karakterisert av uttalt tap av pankreasvev, samt etter hvert kraftige inflammasjonsprosesser i hjerte- og skjelettmuskulatur (36). Det er fremdeles ubesvarte spørsmål når det gjelder vevstropisme til dette alfaviruset, men studier har vist at det i tillegg til virus i de nevnte affiserte organene også er funnet virus og lesjoner nyre og hjernestamme (37).

Selv om mortaliteten ved en SAV-virusinfeksjon er svært variabel (3-80 %) (38), vil den nedsatte tilveksten og etterfølgende kvalitetsforringelse ha både store dyrevelferdsmessige og økonomiske konsekvenser for næringen. PD er i dag en av de viktigste tapsbringende sykdommene i norsk lakseoppdrett.

## **PD-VAKSINASJON**

### **Inaktivert vaksine**

En inaktivert vaksine med navnet Norvax compact PD har siden 2007 vært i bruk i Norge. Denne vaksinen og andre markedsførte PD-vaksiner har frem til 2017 har vært basert på inaktivert Salmon pancreas disease virus (SPDV). Inaktiverte vaksiner replikerer ikke i fisken, noe som gjør at den har en dårligere immunogenisitet, og det trengs adjuvanser for å stimulere til en sterkere immunrespons mot vaksinen (39). De inaktiverte PD-vaksinene formuleres som vann-i-olje-formuleringer (W/O), der vannfasen inneholder virus emulgert som dråper inne i en kontinuerlig oljefase. Denne type adjuvans-formulering induserer en sterk og langvarig immunrespons hos fisken. W/O-emulsjoner har en depoteffekt med lav frigjøring av antigener fra injeksjonsstedet, og muliggjør en mindre vaksinedose eller lavere antigen-konsentrasjonen, noe som er kostnadseffektivt (40). Det er vist at antigen-dose har en stimulerende effekt på antistoffproduksjonen (41). Denne typen adjuvans er med andre ord veldig effektive, men kommer som kjent med bivirkninger.

Fra 2008-2010 organiserte Fiskeri- og havbruksnæringens landsforening (FHL) et industrifinansiert prosjekt kalt PD-fri med et mål om å begrense utbredelsen og skadevirkningen av PD. Prosjektet dekket 31 % av PD-utbruddene i den aktuelle perioden, og data ble samlet inn fra lokalitetene gjennom et spørreskjema om drift, helse og slakteresultat. Når det gjaldt PD-vaksinering konkluderte rapporten med følgende: «Det var signifikant færre PD-utbrudd blant de vaksinerte utsettene (prevalens 0.48) enn blant de ikke-vaksinerte (prevalens 0.69; Pearsons chi-square test  $p= 0.005$ )» (42) (Vurdering av effekter av PDfri prosjektet, 2011, s.13). Jensen og medarbeidere (2011, s.22) hevder også at akkumulert dødelighet og andel utkast ved slakt hos fisk vaksinert mot PD var lavere enn fisk som ikke var vaksinert mot PD.

Flere studier har påvist gunstige effekter av PD-vaksinasjon. Bang Jensen viste i sin studie at oddsen for PD-utbrudd var 3 ganger lavere for lokaliteter med PD-vaksinerte fisk enn for lokaliteter med fisk som ikke var vaksinert mot PD, og at PD-vaksinasjon reduserte mortaliteten og andel utkast ved slakt ved tilfeller med PD-utbrudd (43). I en annen studie utført av Skjold og medarbeidere ble det demonstrert at PD-vaksinasjon ga en signifikant reduksjon i virusutskillelse fra infiserte fisk (44). De fant at andelen PCR-positive fisk var lavere hos naïve fisk satt i tanker med PD-vaksinerte (AQUAVAC® PD7) fisk enn naïve fisk satt i tanker med ikke-vaksinerte fisk. Det kunne ikke påvises virus i faeces fra PD-vaksisert fisk 10 dager etter smitte, noe det kunne hos fisk i karet som var uvaksinerte.

Til tross for vaksinerings i endemiske områder har antall utbrudd gått fra 88 i 2010 til 163 i 2018, noe som tyder på at de inaktiverede vaksinene ikke gir tilstrekkelig beskyttelse mot PD.

### **DNA-vaksine**

Det er i flere år foregått utvikling av nye vaksiner mot PD, blant annet basert på DNA-teknologi, med ønske om å redusere antall PD-utbrudd i Norge. Vaksiner basert på rekombinant genteknologi må ha sentral godkjenning før bruk, og i 2017 ble Elancos DNA-vaksine mot PD, Clynav, godkjent av EU-kommisjonen (45). DNA-vaksinen inneholder et plasmid som koder for det strukturelle polyprotein C-E3-E2-K6-E1 fra SAV3 (ppSAV). Gjennom EØS-avtalen må norske myndigheter utsende markedsføringstillatelse så lenge Clynav har markedsføringstillatelse i EU. Til tross for godkjennelsen har Statens Legemiddelverk vært imot dette, da de mener vaksinen ikke har tilstrekkelig data fra felt og fraråder derfor alminnelig bruk av vaksinen frem til felldata foreligger (46). Den første fisken vaksinert med Clynav ble sjøsatt sør i Hordaland våren 2018 (47).

Brudeseth og medarbeidere (2002) og Kutzler beskriver hvordan DNA-vaksiner fungerer (48, 49). Vaksinen kan injiseres intramuskulært og DNAet i vaksinen tas opp i muskelceller og i APC, som dendrittiske celler, i vevet. Via proteinsyntesen i vertscellen produseres proteinantigener fra DNAet i plasmidet. Proteinene transporteres til celleoverflaten og presenteres på MHC klasse I og klasse II molekyler, som så gjenkjennes som kroppsfremmed av fiskens immunsystem og gir en immunrespons, slik som ved en naturlig virusinfeksjon. Xu og medarbeidere viste i sin studie fra 2012 at virusproteinene E1 og E2 uttrykkes ved overflaten av fiskens muskelceller 3 uker etter booster vaksine var gitt, noe som tyder på at DNAet fra vaksinen tas opp i muskelcellene og at det skjer en transkripsjon inne i cellen før proteinene så presenteres på celleoverflaten (50). En av fordelene ved å bruke en DNA-vaksine er at antigenet er identisk eller svært likt det opprinnelige virusantigenet man ønsker å utvikle beskyttelse mot.

Vaksinasjon av fisk med plasmid som koder for det strukturelle polyprotein C-E3-E2-K6-E1 (ppSAV) viser seg å ha bedre beskyttelse mot SAV3 enn et plasmid som kun koder for E2-proteinet og en inaktivert SAV1 vaksine, i følge Chang (51). Vaksinasjon med ppSAV før smitte gir nærmest ingen patologi i hjerte, pankreas og skjelettmuskel, i motsetning til de to andre vaksinene. Fisk vaksinert med ppSAV viste seg å ha høye nivåer av antistoffer mot E2 og en betydelig nøytraliseringsreaksjon mot SAV3 i serum. Den inaktiverte vaksinen og ppSAV ga begge en signifikant reduksjon av viruspartikler i serum. Xu og medarbeidere (50) kunne også vise i sin studie at den individuelle virkningen av E1- og E2-proteinene som antigener i en DNA vaksine ikke ga signifikant antistoffrespons eller bedre beskyttelse mot dødelighet enn i en kontrollgruppe som ikke hadde fått vaksine før smitte.

Sobhkhez (52) hadde som mål med sin studie fra 2018 å komme nærmere en konklusjon på hvordan vaksiner med et plasmid som koder ppSAV stimulerer til en ervervet immunrespons hos fisken. De kunne demonstrere at ppSAV oppregulerte IFN-I induerte gener allerede 7 dager etter vaksinasjon, og stiller spørsmål ved om det er APC i det medfødte immunforsvaret som produserer cytokinet. Oppregulering av flere proinflammatoriske cytokiner og chemokiner ser ut til å rekruttere APC, T- og B-celler til injeksjonsstedet, og T-cellerresponsen virker sterkere enn B-cellerresponsen. Studien viste også at muskelcellene ved injeksjonsstedet oppregulerer MHC klasse I, og det er altså ved disse molekylene at virusproteinene presenteres på muskelcelleoverflaten slik som vist i studien hos Xu og medarbeidere (50).

## **IMMUNOLOGI**

### **Fiskens immunsystem**

Beinfisk er det første virveldyret som innehar både medfødt og ervervet immunforsvar (53), og har mange likheter med pattedyrs immunsystem. Det er likevel noen forskjeller, deriblant distribusjonen av de ulike lymfatiske organene. Beinfisk har ikke beinmarg og det er heller ikke funnet lymfeknuter. Det primære lymfoide organet er hodenyret, her foregår antigenpresentasjon og antistoffproduksjon, og det er dessuten her man finner hematopoietisk aktivitet. Et annet primært lymfoid organ er thymus, hvor differensieringen av T-celler skjer (54).

I milten skjer det utvikling og lagring av leukocytter. I tillegg har beinfisk flere områder med mucosa-assosiert lymfatisk vev; i neseslimhinnen (NALT), gjelleslimhinnen (GIALT), hudslimhinnen (SALT) og tarmslimhinnen (GALT)(54). Det er nylig oppdaget en ansamling

intraepitelialt lymfatisk vev i det intrabrankeale rommet. Dette vevet har ukjent funksjon, men har en gunstig posisjon når det kommer til overvåkning av gjellene som inngangsport for infeksjoner. Det skjer trolig en T-celleproliferasjon her "ved behov", selv om dette ikke er fullt kartlagt (55).

Fiskens immunsystem deles, som hos høyerestående vertebrater, inn i et medfødt/iboende og et ervervet immunsystem (56). Det er vist at det finnes T-celler og B-celler som er analoge til de hos pattedyr, og man har funnet T-hjelpeceller (CD4+), cytotoxiske T-celler (CD8+) og antistoffproduksjon med trolig samme funksjon som hos mammalske celler (57).

### **Medfødt immunitet**

Det medfødte immunsystemet består av to hovedmekanismer for å forhindre og fjerne virus: Cellulære og løselige effektorer. Celler bidrar til inflammasjon og frigir cytokiner, noe som bidrar til å fjerne mikrober og reparere ødelagt vev, mens de antivirale mekanismene skal føre til at cellene blir ulevelige for viruset slik at det ikke kan infisere og replikere (58).

Det medfødte immunsystemet innebærer en ikke-spesifikk immunitet, bestående i tillegg til det som allerede er nevnt, av hud, mucus og pH, og denne beskyttelsen spiller en svært viktig rolle i førstelinjeforsvaret mot patogener. Av de cellulære komponentene i det medfødte immunsystemet finner man monocytter og makrofager, nøytrofile granulocytter, NK-celler (natural killer celler) og ikke-spesifikke cytotoxiske celler (56, 59, 60).

Monocytter/makrofager og nøytrofile granulocytter er sirkulerende fagocytter, og rekrutteres fra blodet til infeksjonsstedet. Her fagocytterer de agens, som drepes intracellulært.

Produksjonen av nøytrofile stimuleres av cytokiner skilt ut av celler ved infeksjonsstedet.

Stimulering av makrofager skjer også blant annet ved hjelp av cytokiner. NK-celler er viktige i forsvaret mot intracellulære agens, da disse blant annet dreper virusinfiserte celler. I tillegg vil produksjonen av interferon type I (IFN I) føre til blokkering av virusreplikasjon i vertscellen (61).

Det medfødte immunsystemet er ikke avhengig av tidligere eksponering av det aktuelle agenset. Her benyttes det spesielle reseptorer kalt PRR (pattern recognition receptors) som gjenkjenner fremmede mønster som ikke finnes normalt i eukaryote celler, såkalte PAMPS (pathogen-associated molecular patterns) (56). Eksempler på slike mønster er ssRNA eller lipopolysakkarider (LPS), fra hhv. virus og bakterier. Ved gjenkjennelse av det fremmede mønsteret vil det skje en aktivering av transkripsjonsfaktorer og en nedstrøms signalisering via PRR, hvor viktige gener som spiller en stor rolle i fiskens forsvar mot infeksjonen oppreguleres (62).

Sentrale cytosoliske PRR ved virusinfeksjon hos fisk har vist seg å være toll-like reseptorer (TLR) og retino-acid-inducible I (RIG-I) (63). TLR og RIG-I er involvert i produksjonen av IFN-1, cytokiner og chemokiner. RIG-I finnes i cytosol, og disse reseptorene gjenkjenner RNA produsert av viruset i cytosol (61).

Hos fisk finner man flere ulike TLRs (64), og disse finnes i mange ulike celler, enten som ekstracellulære reseptorer eller i endosomet. TRL 7 og TRL 8 gjenkjenner ssRNA, og finnes i endosomale membraner. Disse uttrykkes hovedsakelig i myeloide og plasmacytoide dendritiske celler (DC). Dette er en type antigenpresenterende celler (APC) som har som oppgave å «fange» antigenet og presentere det til lymfocytter (58).



Ved aktivering av TLR i en APC, vil det skje en videre aktivering av den antigenpresenterende cellen. Det vil da skje en oppregulering av MHC-komplekser (major histocompatibility complex) (65), i tillegg til oppreguleringer av cytokiner som fungerer som proinflammatoriske mediatorer, for eksempel TNF $\alpha$ , IL-1, IL-6 og IL-12. Disse cytokinene fører igjen til en modning av dendrittiske celler, som ved å interagere med de cellulære komponentene i det ervervede immunsystemet, nærmere bestemt T-celler (58). Dette fører til at det ervervede immunsystemet settes i gang. På denne måten er TLRs en viktig link mellom det medfødte og det ervervede immunsystemet (65).

Både TLR og RIG spiller trolig en viktig rolle i induseringen av IFN hos beinfisk (63, 66). Fiskens type I interferoner (IFN I) består av flere subtyper, hvor noen viser seg å ha en større betydning for den antivirale effekten enn andre (67). IFN I skilles ut av mange typer celler som er infiserte av virus, men en viktig kilde er likevel plasmacytoide dendrittiske celler. Disse skiller ut store mengder IFN når de aktiveres av TLR ved virale infeksjoner (68). På grunn av effektene til IFN I spiller disse cytokinene en viktig rolle når det gjelder å aktivere det ervervede immunsystemet (69, 70).

Type I IFN dannes fra dendrittiske celler og makrofager (APCs), hvor alle celler er målceller. Disse fører til en antiviral status i cellen, hvor det vil skje et økt uttrykk av MHC I-komplekser. I tillegg vil IFN I føre til aktivering av NK-celler (69), samt en aktivering og proliferasjon av CD8<sup>+</sup>celler (CTLs) via påvirkning på APC (71). Det vil dessuten skje en økt antistoffrespons (68).

IFN fører til oppregulering av gener som stimuleres av IFN, såkalte Interferon-stimulerte gener (ISG). Det finnes mange slike gener (72), men kun noen av dem har antiviral aktivitet (73, 74). Blant disse finner man Mx-proteiner (75). Dette er GTPaser som ikke uttrykkes konstant i celler, og et uttrykk av disse vil være tegn på IFN-aktivitet, og dermed en mulig virusinfeksjon. Den antivirale effekten til proteinet avhenger av isoformen på proteinet. Mx-genet har blitt klonet fra fisk med SAV-infeksjon (76). Et annet ISG er protein kinase R (PKR) (72). Denne fører til at syntesen av virusproteiner i den infiserte cellen blir inhibert, og bidrar også til reguleringen av mange proinflammatoriske gener (77, 78). PKR er tilstede i mammalske celler konstant, men oppreguleres ved IFN I-signalisering. Hos flere fiskearter er dette genet identifisert (79, 80).

Det er trolig IFN $\alpha$  og IFN $\beta$  som er det første medfødte forsvaret mot alfavirusinfeksjon hos fisk, og det er vist at Mx og PKR-proteiner har en effekt på alfavirusreplikasjon hos menneske (81).

## **Apoptose**

Apoptose, også kalt programmert celledød, er en mekanisme som ofte induseres ved virusinfeksjon (82, 83). IFN I er en viktig mediator for apoptose. Dette er en viktig forsvarsmekanisme hos vertscellen, da viruset dermed blir hindret i å replikere. De fleste virus har derfor utviklet metoder for å unngå/forhindre/forsinke apoptose, noe Xu refererer til i sin doktorgrad (84). Her nevner han tre viktige mekanismer for alphavirus: unngå apoptose av infisert celle, infisere celler som uttrykker lite MHC I (Jackson, referert i Xu, 2015), slik at CTL-celler ikke gjenkjenner dem, og unngå den humorale immuniteten ved å ha det virale RNA i cytosol (Levine, referert i Xu, 2015). Apoptose kan likevel være gunstig for virus, da dette gir økt spredning, og mange virus har genprodukter som induserer apoptose (82, 85).

Når det gjelder SAV-infeksjon hos atlantisk laks har man ved eksperimentelle forsøk funnet apoptose i hjerte og pankreas (38), men det ikke kjent om apoptosen i infisert fisk skyldes viruserts genproduserende proteiner, eller organismens forsvar mot virusinfeksjonen.

### **Ervervet immunitet**

Det ervervede immunsystemet deles i det cellulære og det humorale forsvaret. Det cellulære forsvaret drives av T-lymfocytter, mens de humorale komponentene utgjør bl.a cytokiner, antistoffer og lytiske enzymer (56, 59, 60).

Flere strategier benyttes for å bekjempe infeksjoner ved hjelp av det ervervede immunsystemet: Fagocyttering av mikrober, utskillelse av antistoff som binder seg til ekstracellulære agens slik at disse ikke kan infisere vertens celler, økt fagocytose av agens, rekruttering av leukocytter ved hjelp av T-hjelpeceller (CD4+ celler), og drap av infiserte celler ved hjelp av cytotoxiske T-celler (CD8+ celler/CTL) (58).

T-hjelpecellene (CD4+) kategoriseres i fire klasser hos pattedyr; Th1, Th2, Th17 og Treg. Aktivering av de fleste TLRs induserer IL-12 eller IFN- $\alpha$  produksjon fra dendritiske celler, som dermed vil stimulere til Th1-differensiering (86, 87). Th1-responsene karakteriseres av produksjonen av IL-2 og IFN- $\gamma$ , en IFN type II (IFN II). IL-2 vil stimulere til økt produksjon av de antigenspesifikke T-cellene. IFN- $\gamma$  induserer cytotoxiske T celler, som er effektive mot intracellulære bakterier og virus (69, 70). I motsetning til IFN- $\alpha$  som produseres i de fleste celler ved en virusinfeksjon, er det hovedsakelig NK-celler, CD4-celler og CD8-celler som står for produksjonen av IFN $\gamma$  (69, 70, 88).

Hos fisk er viktige TH1-cytokiner som IL-2 og IFN- $\gamma$  tilstede (89).

I en studie gjort av Xu og medarbeidere hvor man undersøkte betydningen av IFN- $\alpha$  og IFN- $\gamma$  ved SAV3-infeksjon hos salmonide cellelinjer, fant man at det ved SAV3-infeksjon forekommer høye nivå av ISG/Mx-protein i de infiserte cellene (90). Dette tyder på at viruset har utviklet en måte å slippe unna de antivirale prosessene i cellen etter et visst tidspunkt, uten at dette fører til en betydelig reduksjon i IFN-produksjon. I forsøk gjort på TO-cellelinjer (makrofagcellelinje) av Xu et al. I 2010 ble det vist at det i større grad er IFN- $\alpha$  som inhiberer SAV3, og i mindre grad IFN- $\gamma$ . Ved behandling med IFN- $\alpha$  4-24 timer før infeksjon med SAV3 oppstod en antiviral status i cellene, og dette inhiberte replikasjon av SAV, samt at virustiteret gikk ned. Denne beskyttelsen var doseavhengig og tidsavhengig, med oppregulering av Mx-proteiner og andre ISGs. Disse cellene ble beskyttet for den cytopatogene effekten av viruset. Når den samme behandlingen ble gitt ved infeksjonstidspunkt ble det kun en liten reduksjon i virustiter, men ingen beskyttelse for virusindusert CPE. Det samme resultatet fikk man ved behandling av IFN- $\alpha$  24 timer etter smitte. Jo senere behandlingen skjer, desto mindre beskyttelse. Dersom cellene ble behandlet med IFN- $\gamma$  24 timer før smitte, skjedde det kun en liten inhibering av virusreplikasjonen/reduksjon i virustiteret, og ingen forhindring av CPE i infiserte celler.

I 2011 kom derimot en studie som viste det motsatte, at IFN- $\gamma$  har en kraftig antiviral effekt mot SAV3-infeksjon(91). Selv om IFN- $\gamma$  ikke er like potent når det gjelder å indusere Mx-proteiner og PKR, er de effektive i induseringen av guanylatbindende protein (GBP) og flere interferoninduserte regulatorfaktorer(IRFs) enn IFN- $\alpha$ . Her viste de også at den antivirale effekten av IFN- $\gamma$  trolig også kan skyldes aktivering av IFN- $\alpha$ .

Mange ulike mekanismer er utviklet blant virus for å unngå de antivirale effektene av IFN I, og for alfavirus er en viktig mekanisme å undertrykke vertscellens syntese av makromolekyler, og dermed også IFN og videre ISGs. Dette gjelder derimot ikke for SAV3, da det skjer en kraftig oppregulering av IFN og ISGs (92). Dermed gjenstår det å finne hvilke mekanismer SAV3 bruker for å unngå de antivirale effektene av IFN.

### ***Aktivering av T-celler***

*Informasjon hentet fra Basic Immunology, 5<sup>th</sup> ed. Kap 5 (93).*

For at en T-celle skal aktiveres kreves det gjenkjennelse av antigen som fremvises på dendrittiske celler (APC). Aktiveringen skjer ved hjelp av flere reseptorer på T-cellen og APC. Ved den naive T-cellen vil T-cellerreseptoren (TCR) og co-reseptorene gjenkjenne MHC-komplekspresentasjon på APC. CD8<sup>+</sup>-celler har CD8 co-reseptorer som gjenkjenner antigener fra cytosol, som presenteres på MHC klasse I. CD4<sup>+</sup>-celler har CD4 co-reseptorer som gjenkjenner antigener på MHC klasse II. For å aktivere en CD8-celle kreves det i tillegg til gjenkjennelse av antigen på MHC klasse I, kostimulering fra en CD4(Th1)-celle. Denne CD4-cellen har gjenkjent antigen fra samme virus på MHC klasse II via APC. På den måten vil både CD8<sup>+</sup>- og CD4<sup>+</sup>-celler aktiveres i nærheten av hverandre, og CD4<sup>+</sup>-cellen produserer cytokiner som gir videre aktivering av CD8<sup>+</sup>-cellen.

For å få en full aktivering av T-cellen kreves det gjenkjennelse av co-stimulatorer på APC. De best definerte co-stimulatorene på APC er B7-1 (CD80) og B7-2 (CD86), som befinner seg i økt antall på en APC når den møter på en mikrobe. Disse gjenkjennes av transmembrane signaliseringsmolekyler på T-cellen, CD28 og CD3, som er nødvendige for at TCR-komplekset skal kunne føre signalet videre. Disse interaksjonene vil sammen med adhesjonsmolekyler danne en immunsynapse som stimulerer til aktivering av T-cellen.

Immunsynapsen vil sette i gang en signaleringskaskade i T-cellen, som resulterer i økt gentranskripsjon og proteinsyntese. I den cytoplasmatiske enden av CD28-reseptoren er tyrosin-kinasen Lck festet. Ved aktivering av T-cellen vil Lck fosforylere ITMA, som er den intracellulære delen av CD3. En ny tyrosin-kinase kalt ZAP-70 (Zeta-chain-associated protein kinase 70) rekrutteres til de fosforylerte ITMA, og vil deretter selv fosforyleres av Lck. Fosforylert ZAP-70 er nå klar for å fosforylere det transmembrane proteinet LAT (linker of activated T cells). LAT vil i fosforylert form fungere som et sete for flere signaleringsproteiner.

Hovedsignaliseringsveiene linket til ZAP-70 er hhv. NFAT-signaliseringsvei, Ras- og Rac-MAP-kinase- signaliseringsvei, PKC $\theta$ -NF-KB-signaliseringsvei og PI-3 kinase-signaliseringsvei.

*a) NFAT: Nuclear factor og activated T cells*

NFAT er en transkripsjonsfaktor som aktiveres igjennom calcium-calmodulin pathway, og vil sammen med AP-1 stimulere til transkripsjon av blant annet IL-2-genet.

Calcium-calmodulin pathway: (Dette er en inaktiv fosforylert transkripsjonsfaktor i cytosol hos hvilende T-celler. Det er konsentrasjonen av Ca<sup>2+</sup> i cytosol som er avgjørende for aktiveringen, og dette avhenger av fosforylering av ZAP-70 og påfølgende aktivering av enzymet fosfolipase C $\gamma$ . Dette katalyserer hydrolysen av plasmamembranfosfolipid kalt PIP<sub>2</sub>, og et biprodukt av denne reaksjonen, IP<sub>3</sub>, bindes til ER som da stimuleres til utslipp av Ca<sup>2+</sup>. Dette fører videre til influx av ekstracellulær Ca<sup>2+</sup>, og det blir en økt konsentrasjon av cellulær Ca<sup>2+</sup>. Den økte konsentrasjonen fører til at fosfatasen calcineurin fjerner fosfat fra

NFAT, som gjør at denne kan gå inn i cellekjernen og binde seg til promotorer av flere gener deriblant IL-2.)

*b) Ras/ Rac-MAP kinase signaliseringsvei*

*Informasjon hentet fra Cellular and molecular immunology, 9<sup>th</sup> ed. Kap 7. (94).*

Etter fosforylering av ZAP-70 følger en opphopning av adaptorproteiner i plasmamembranen.

Adaptorproteinet Grb2 (Growth factor receptor-bound protein 2) binder til en av de fosforylerte delene av LAT, samtidig som det rekrutterer og binder guanine nucleotide exchange factor SOS (Son of Sevenless). Dette fører til rekruttering og aktivering av Ras og Rac, som aktiveres vha GDP (guanosine difosfat) → GTP (guanosine trifosfat). SOS fjerner GDP fra Ras (en liten GTPase) som deretter kan binde GTP og blir aktiv. Dette fører til en fosforyleringskaskade der Ras aktiverer Raf-kinase, Raf aktiverer MEK og MEK aktiverer MAPK (mitogen-activated protein kinase), også kjent som ERK (ekstracellulær signal-regulert kinase).. Den siste MAP-kinasen her er ERK (ekstracellulær signalregulert kinase) og JNK (c-jun aminoterminal kinase), som gir økt uttrykk av proteiner c-Fos, samt fosforylering av proteinet c-Jun. Sammen vil disse to proteinene danne transkripsjonsfaktoren AP-1 (activating protein 1), som gir økt transkripsjon av flere T-cellegener.

MEK vil i aktiv form fosforylere proteiner som er involvert i regulering av celleproliferasjon. Noen av disse proteinene vil sette i gang celledyklusen og andre vil inhibere proteiner som ellers vil virke hemmende på celledyklusen. Proteinene Cdk4 og Cdk6 (Cyclin D complex) koordinerer overgangen fra G1- til S-fase ved å fosforylere og fjerne Rb (Retinoblastoma protein) fra transkripsjonsfaktoren E2F som da kan sette i gang transkripsjonen av diverse mitogene gener.

*Informasjon hentet fra Essential cell biology. 4th ed. Kap 18.(95)*

Rb (retinoblastoma) protein binder spesifikke transkripsjonsregulatorer og forhindrer at gener som er essensielle for celleproliferasjon slås på. Når en celle aktiveres av et mitogen (som f.eks. ved T-celleaktivering) vil signalering intracellulært resultere i dannelsen av cyclin-cdk-komplekser. Kompleksene vil fosforylere Rb-proteinet som da frigjøres fra transkripsjonsregulatorene som da er klare for å aktivere genene som kreves for celleproliferasjon.

*c) PKC $\theta$  NF- $\kappa$ B*

*Informasjon hentet fra Basic Immunology, 5<sup>th</sup> ed. Kap 5 (93).*

En aktivering av en  $\theta$  isoform av PKC  $\theta$  (serine-threonine kinase: protein kinase C) fører til aktivering av transkripsjonsfaktoren NF- $\kappa$ B ( Nuclear factor-  $\kappa$ B). NF- $\kappa$ B finnes i en inaktiv form hos hvilende T-celler bundet til en inhibitor kalt I $\kappa$ B. Når en TCR-signaliseringskaskade skjer, vil fosforylering av I $\kappa$ B føre til frislipp av NF- $\kappa$ B og denne går inn i cellekjernen hvor det skjer en økt transkripsjon av flere gener.

*d) PI-3-kinase*

*Informasjon hentet fra Basic Immunology, 5<sup>th</sup> ed. Kap 5 (93).*

En lipidkinase kalt fosfatidylinositol 3-kinase (PI-3) vil ved en TCR-signalering fosforylere membranfosfolipidet fosfatidylinositol bisphosphate 2 (PIP-2) til fosfatidylinositol trisphosphate (PIP3). PIP3 kreves for å aktivere blant annet seronine-threoninekinasen Akt (protein kinase B). Denne kinasen er sentral i blant annet produksjonen av antiapoptotiske proteiner, som dermed fremmer overlevelse av antigenstimulerte T-celler. Her vil også CD28 – og IL2- reseptorer trigge signaliseringsveien, i tillegg til TCR.



### ***B-celler***

Det er funnet B-celler analoge til mammalske celler hos beinfisk. Når en naïv B-celle gjenkjenner et antigen, vil den ved hjelp av blant annet T-hjelpeceller proliferere og danne kloner av en antigenspesifikk cellelinje. Disse cellene kan igjen differensiere til B-hukommelsesceller og plasmaceller, som skiller ut antistoffer (96). B-cellerreseptoren er membranbundne antistoffer. Antistoff finnes altså i to former, som reseptorer og som utskilte proteiner kalt immunoglobuliner. Immunoglobuliner er effektormolekylet til den humorale immuniteten. Disse kan gjenkjenne mange ulike kjemiske strukturer, i motsetning til T-celler som hovedsakelig gjenkjenner proteiner. Her gjenkjennes proteiner, lipider, karbohydrater og nukleinsyrer. Når det gjelder antistoff har beinfisk et begrenset antall isotyper av immunoglobuliner. IgD, IgM og IgT er i dag kjent (97).

### **ERLOTINIB OG SUNITINIB**

Studier gjort på høyerestående vertebrater viser at legemidlene erlotinib og sunitinib hemmer proliferasjon og differensiering av aktiverte T-celler. Erlotinib virker inhiberende på c-Raf/ERK kaskaden og Akt-signaleringsveien, med påfølgende lave konsentrasjoner av IL-2 og IFN- $\gamma$  og suppresjon av uttrykk av CD69 og CD25 ved T-celleoverflaten (98). Sunitinib vil også nedregulere disse overflatemolekylene og redusere produksjonen av flere cytokiner, blant annet IL-2, ved å redusere nivået av fosforylert ZAP-70 (99). Begge medikamentene vil i tillegg sette T-cellene i G1-arrest, og skyldes deres virkning på c-Raf/ERK-kaskaden, som resulterer i redusert mengde CDK4 og fosforylert Rb. Sunitinib reduserer også mengden CDK6 og cyclin D.

## **FORMÅL**

Det overordnede formålet med vår oppgave var å studere betydning av T-celleimmunitet ved PD-infeksjon hos atlantisk laks.

Ved eksperimentelle forsøk er det vist at DNA-vaksine mot PD gir god beskyttelse, men uten betydelige funn av antistoff. Dette kan bety at beskyttelsen trolig er knyttet til cellulær immunitet, og dermed T-celler. I vårt forsøk bruker vi kjemikalier (erlotinib/sunitinib i kombinasjon) som hos høyerestående vertebrater har vist å "slå ned" antall T-celler. I tidligere studier er det vist at atlantisk laks behandlet med E/S gir en tidligere skade og mer uttalte forandringer, men det ble her ikke gjort en måling av T-celler. Det spesifikke formålet med vår oppgave er å benytte E/S i vårt forsøk for å "slå ut" T-cellene, eller redusere antallet av dem, og dermed kunne vise betydningen av T-celler ved infeksjon av PD hos atlantisk laks.

I studien ble fiskene delt inn i 5 ulike grupper (se Vedlegg 1).

Gruppe 1 er kontrollgruppen, denne gruppen er ikke gitt verken vaksine, E/S eller smitte.

I gruppe 2 vaksinerte vi med hhv. DNA-vaksine, inaktivert vaksine (AlphaJect Micro PD) eller injiserte fiskene ved vaksinasjonstidspunktet med PBS, samt smittet med SAV3-virus. En DNA-vaksine forventes å initiere en cellemediert immunitet med høy aktivitet av T-celler, og ved den inaktiverte vaksinen forventer vi humoral immunitet, det vil si beskyttelse basert på antistoffer. Ved å måle virusmengde ved hjelp av mRNA og vurdere histopatologiske forandringer etter smitte, får vi fram forskjeller mellom vaksinene. Vi målte også nivå av mRNA for CD8- og CD4-celler ved hjelp av real-time PCR.

I gruppe 3 var målsettingen å studere effekt av E/S, og eventuelt påvirkning på patologiske forandringer i indre organer, samt virusnivå.

Gruppe 4 er en kombinasjon av gruppe 2 og 3, hvor fisken ble injisert med E/S samtidig som den ble vaksinert med en av de to nevnte vaksinene. Her ønsket vi å måle om E/S eventuelt reduserer eller endrer effekten av DNA-vaksinen gjennom en reduksjon av antall T-celler.

Gruppe 5 ble injisert kun med E/S, dette for å se på effekten cytostatika har på immunsystemet til friske individer av atlantisk laks. Her var målsettingen å se om fisken fikk mer uttalte forandringer, om E/S slår ut T-cellene, og om dette kan påvirke graden av infeksjonsindusert vevsskade.

# Materiale og metoder

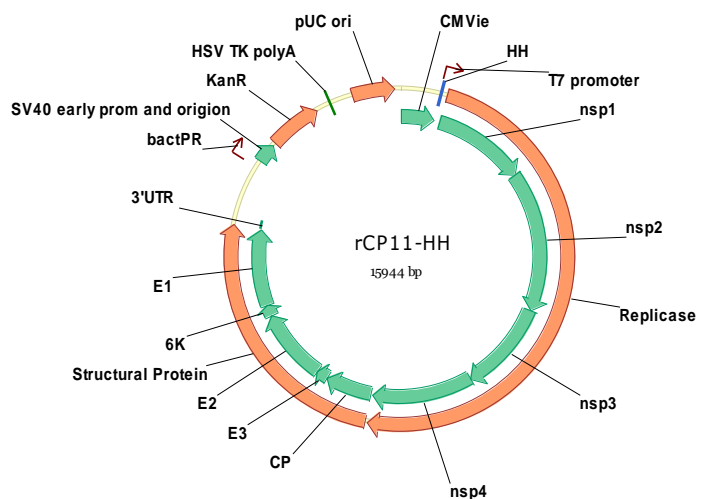
## Virus og cellekultur

Chum salmon heart cell-1 (CHH-1) celler fra hjerte hos juvenile *Onchorhynchus keta* ble inkubert ved 20 °C i 75 cm<sup>2</sup> cellekulturflasker med Leibovitz medium (L-15) supplert med 10 % fetal bovin serum (FBS) og gentamycin. SAV3 isolatet som ble brukt i forsøket er isolert fra hjertet hos en atlantisk laks med klinisk PD, og kalles H10 (90). Viruset ble inokulert på CHH-celler i L-15-medium supplert med 1-2 % FBS og gentamycin, og inkubert ved 15 °C. Viruset ble kvantifisert ved å bestemme 50 % tissue culture infectious dose (TCID<sub>50</sub>), der endepunktstitrering brukes for å måle mengden virus som trengs for å indusere cytopatogen effekt (CPE) i 50 % av brønnene (96-brønner) med inokulert cellekultur. Utregningen av virustiter ble gjort i Excel.

## Reagenser

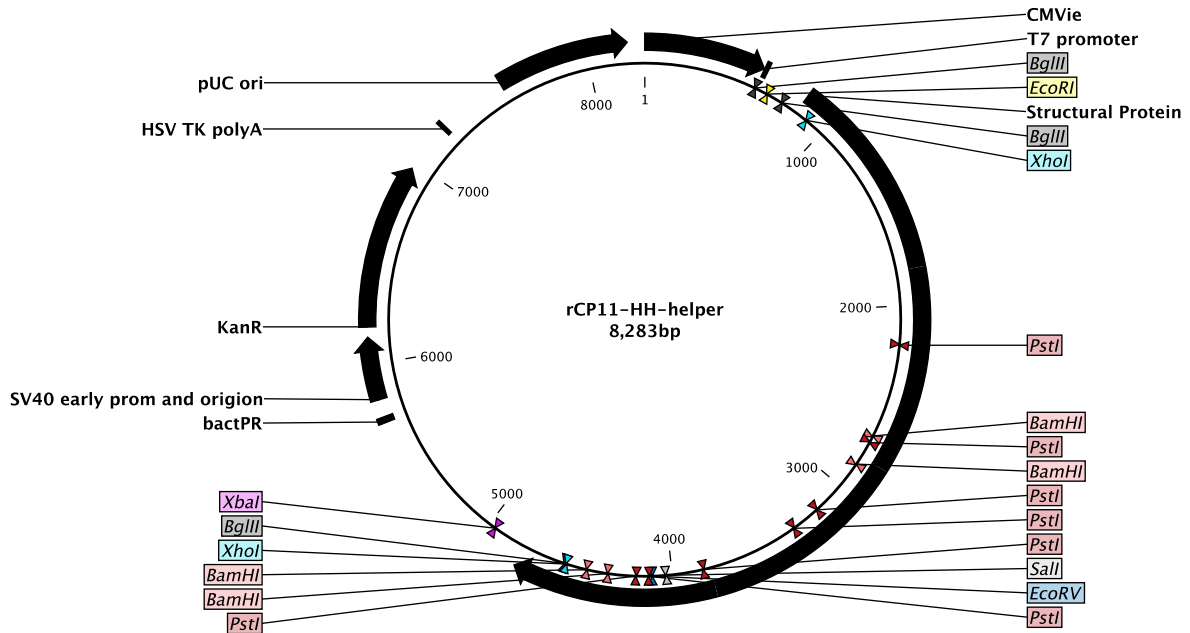
### DNA-vaksine

rSAV3-helper ble konstruert ved hjelp av rSAV3-HHFL-vektor som templat (rSAV3-HHFL ble tidligere kalt rCP11-HH). PCR ble utført med bruk av primere (blå piler til venstre i Figur 3) for å amplifisere sekvensene med unntak av nsp1-nsp2-nsp3-nsp4. Det amplifiserte PCR-produktet ble rensert og re-ligert slik at det ble dannet et sirkulært plasmid; rSAV-helper (Figur 4). Det endelige



Figur 3. Plasmidkart som utgangspunkt for kloning.

konstruktet av rSAV3-helper inneholder følgende elementer: CMV promoter – T7 promoter – 5'UTR – 100nt av nsp4 ved C-terminal – Internal UTR – helstrukturgener (CP-E3-E2-6K-E1).



Figur 4. Plasmidkart for konstrukt benyttet som DNA vaksine.

### Inaktivert vaksine

I vårt forsøk benyttet vi oss av ALPHA JECT micro 1 PD(PHARMAQ®). ALPHA JECT micro 1 PD er en monovalent vaksine som inneholder formaldehyd-inaktivert kultur av Salmonid Pancreas Disease Virus stamme ALV 405. Flytende parafin (mineralolje) er brukt som adjuvans. En dose på 0.05 ml ble administrert ved intraperitoneal injeksjon, i fiskens midtlinje en bukfinnes avstand foran bukfinnen. Immunitet skal oppnås innen 516 døgngrader etter vaksinerings (Felleskatalogen 19.11.19)

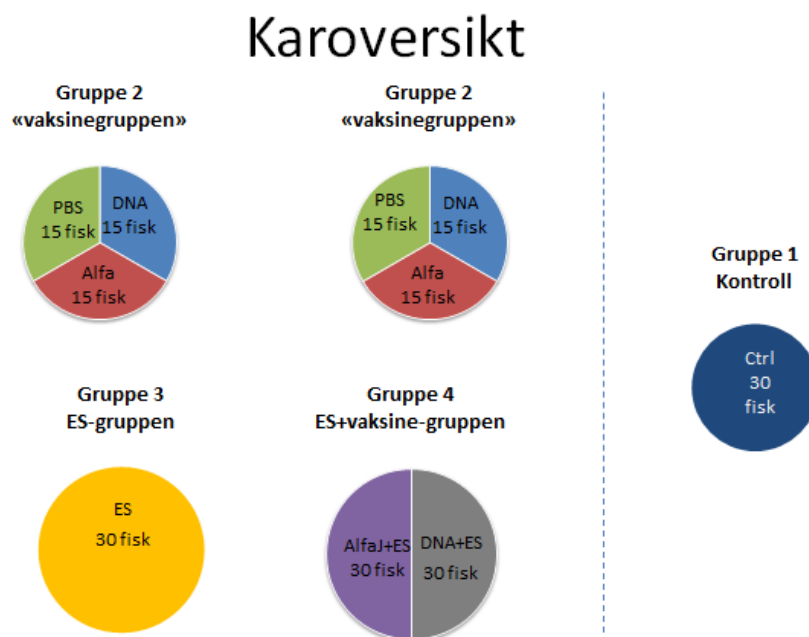
## Erlotinib og sunitinib

Erlotinib hydrochloride (SML2156-50mg) ble bestilt i pulverform fra Sigma-Aldrich/ Merck. Pulveret løses i dimetylsulfoksid (DMSO) 2 mg/ml like før bruk, og blir deretter oppbevart på -20 °C.

Sunitinib malate PZ0012-5mg ble også bestilt fra Sigma-Aldrich/ Merck, og er utviklet av Pfizer. Dette kom også i pulverform, og løses opp i >10 mg/ml DMSO. Løsningen oppbevares i romtemperatur.

## Forsøksdesign

210 presmolt atlantisk laks med gjennomsnittsvekt 105 g og gjennomsnittslengde 15 cm ble brukt i forsøket. Fisken ble delt inn i 5 ulike grupper, der gruppe 2 ble delt inn i 3 undergrupper. Fisken i de ulike gruppene ble merket med Pit-tags (Se vedlegg 1: Tabell over grupper og Figur 5).



Figur 5. Oversikt over kar og fordeling av grupper på våtlaboratoriet, NMBU Adamstuen.

Gruppe 1 var behandlet som kontroll. Denne gruppen ble holdt atskilt fra de andre gruppene i et eget kar (NMBU Veterinærhøgskolen Campus Adamstuen, fysiologisk våtlab). Denne gruppen har verken fått vaksine, Erlotinib/Sunitinib eller blitt smittet. De resterende gruppene ble holdt på NMBU Veterinærhøgskolen Campus Adamstuen, smitterom våtlab.

Gruppe 2, som vi har kalt Vaksinegruppen, ble fordelt på to kar med 45 fisk i hvert kar. Hvert av disse karene ble delt i tre undergrupper à 15 fisk, hvor fisken i hver av gruppene ble injisert med hhv. DNA-plasmid (DNA), AlphaJ micro 1 PD(AlphaJ) eller PBS. Fiskene i de ulike gruppene ble identifisert ved hjelp av ID-chip, og registrert. DNA-plasmid ble injisert intramuskulært med 10 µg plasmid DNA per fisk (0.05 ml/fisk). AlphaJ-gruppen ble injisert intraperitonealt med 0.05 ml/fisk. PBS-gruppen ble injisert intraperitonealt med 0.1 ml PBS og ble brukt som negative kontroller. Fisken ble oppbevart i tanker med en vanntemperatur på ca. 14 °C. Fisken ble sultet ved vaksineringsstidspunktet.

Gruppe 3 injisert med 1.5 mg Erlotinib og 4.5 mg Sunitinib per fisk (10µ E og 30 µg S per gram levendevekt) intraperitonealt samme dag som gruppe 2 ble vaksinert. Denne gruppen ble holdt i et eget kar i smitterommet.

Gruppe 4 ble injisert med E/S (1,5 mg Erlotinib og 4,5 mg Sunitinib per fisk (10µ E og 30 µg S per gram levendevekt) intraperitonealt, og ble deretter fordelt på to grupper à 30 fisk, hvor den ene gruppen ble injisert med 10 µg plasmid DNA, og den andre gruppen injisert intraperitonealt med 0.1 ml av en mineralolje-basert vaksine med inaktivert SAV3 fra PHARMAQ AS. Disse to gruppene ble holdt i en felles tank gjennom hele forsøket.

Gruppe 5 ble injisert med Erlotinib/Sunitinib intraperitonealt og ble holdt i en egen tank hele forsøket.

## **Smitte**

Fiskene i gruppe 2 ble smittet med 0.1 ml PD-virus ( $10^{5.5}$ TCID<sub>50</sub>) ved intraperitoneal injeksjon 600 døgngader etter vaksinasjon. Fiskene i gruppe 3 ble injisert med Erlotinib/Sunitinib 3 dager før smitte. Fiskene i gruppe 4 ble smittet 30 døgngader etter vaksinasjon og behandling med Erlotinib/Sunitinib. Det har oppstod dermed et avvik fra den opprinnelige forsøksplanen, der det opprinnelig var planlagt å smitte gruppe 4 omtrent 450-600 døgngader etter vaksinasjon og/eller behandling med Erlotinib/Sunitinib.

## **Prøvetaking**

2, 4 og 6 uker etter smitte (heretter forkortet som wpc) ble det tatt ut prøver fra 10 fisk fra hver av gruppene, og i tillegg ble fisken målt og veid. Fisken ble bedøvet ved å bruke 7,5-10 ml benzocaine/L (Benzoak Vet., ACD Pharmaceuticals, Norge). Blodprøver ble tatt fra den caudale venen med heparinrør, sentrifugert ved 3200 rpm i 10 min ved 4 °C, og plasma ble overført til egne rør før det ble fryst ved -20 °C. Vevsprøver fra hjertemuskel og hodenyre ble lagret i RNA-later ved 4 °C i 3 døgn før det ble overført til -20 °C. Hjertemuskel ble overført til L-15-medium med 0,1 % gentamycin og fryst ved -20 °C. Vevsprøver fra hjertemuskel, skjelettmuskel og pankreas ble lagt i 10 % fosfat-bufret formalin i minst 48 timer før de ble støpt inn og preparert for snitting.



## **RNA-isolasjon og cDNA-syntese**

Til RNA-ekstraksjon ble RNeasy Fibrous tissue Mini kit (Qiagen) etter fabrikantens prosedyre. RNA-konsentrasjonen i prøvene ble målt med spektrofotometri (Nanodrop ND 1000). For hver prøve ble det brukt 500 ng RNA til hver cDNA-syntese, som ble produsert ved hjelp av SuperScript®III reverse transcriptase kit (Invitrogen). cDNAet ble lagret i kjøleskap frem til det skulle brukes.

## **Kvantitativ PCR (real-time PCR)**

Kvantitativ PCR ble utført ved hjelp av Platinum™ SYBR™ Green qPCR SuperMix-UDG og LightCycler 96 (Roche). 2 µl 1:2 fortynnet cDNA ble brukt som templat for hvert gen sammen med 10 µl Platinum™ SYBR™ Green qPCR SuperMix-UDG og 1 µl av forward og reverse primerne (10 µM) for SAV, CD8 og CD4. Primersekvensene er gitt i Tabell 1 og 2. Det ble fylt opp med vann (6 µl) til et totalt volum på 20 µl som deretter ble inkubert ved 50 °C i 120 sekunder og 95 °C i 120 sekunder, etterfulgt av 45 amplifikasjonssykluser med temperatur på 95 °C i 15 sekunder og 60 °C i 60 sekunder. Spesifisiteten på PCR-produktene ble målt ved hjelp av smeltepunkt-kurver. 5 µl cDNA fra tre fisk som hadde fått DNA-vaksine, og fra tre fisk vaksinert med inaktivert vaksine (AlfaJ) ble satt sammen til en pool, og brukt som positiv kontroll or henholdsvis CD8 og CD4. Som positiv kontroll ble det for SAV brukt et plasmid med SAV full-lengde genom tilgjengelig i laben. Vann ble brukt som negativ kontroll i alle primersett.

Tabell 1. Referansepunkter for SAV-primere

SAV E2 gen- F	CAGTGAAATTCGATAAGAAGTGCAA	Petterson et al 2016/Hodneland et al 2006
SAV E2 gen- R	TGGGAGTCGCTGGTAAAGGT	Petterson et al 2016/Hodneland et al 2006

Tabell 2. Referansepunkter for CD4- og CD8-primere

CD4 – real- F	GAGTACACCTGCGCTGTGGAAT	Mikaelsen et al. 2012
CD4 – real- R	GGTTGACCTCCTGACCTACAAAGG	Mikaelsen et al. 2012
CD8 – real- F	CGTCTACAGCTGTGCATCAATCAA	Braden et al 2018
CD8 – real-R	GGCTGTGGTCATTGGTGTAGTC	Braden et al 2018

## Histologi

Formalin-fiksert vev fra pankreas, skjelettmuskel og hjertemuskel ble behandlet og farget med hematoxylin og eosin (H&E) etter standard prosedyre (hos Veterinærinstituttet).

Histopatologiske forandringer ble scoret fra 0 (ingen forandringer) til 3.0 (mest forandringer).

(Se Vedlegg 2: Klassifisering og gradering av histopatologiske forandringer).

## Statistikk

Kruskal-Wallis test ble brukt for å sammenligne de ulike gruppene, og forskjellene ble anslått å være statistisk signifikant ved  $p < 0.05$ .

## **Resultater**

I forsøket var målsetningen å undersøke betydningen av T-celleimmunitet ved SAV3-infeksjon hos atlantisk laks. Ved hvert prøveuttak ble det tatt ut et stort antall prøver for å utføre flere ulike undersøkelser. På grunn av tidspress har vi ikke hatt mulighet til å utføre alle de testene vi ønsket. Vi har derfor valgt å fokusere på 2 grupper i dette forsøket; gruppe 2 og 3. I disse gruppene fokuserte vi på de histopatologiske endringene ved hvert uttak.

Konsentrasjon av SAV, CD4-celler og CD8-celler i hjertemuskulatur ble målt ved hjelp av real time PCR mot SAV-spesifikt RNA og mRNA mot CD4 og CD8. Dette ble også gjort på prøver tatt fra gruppe 2 og 3.

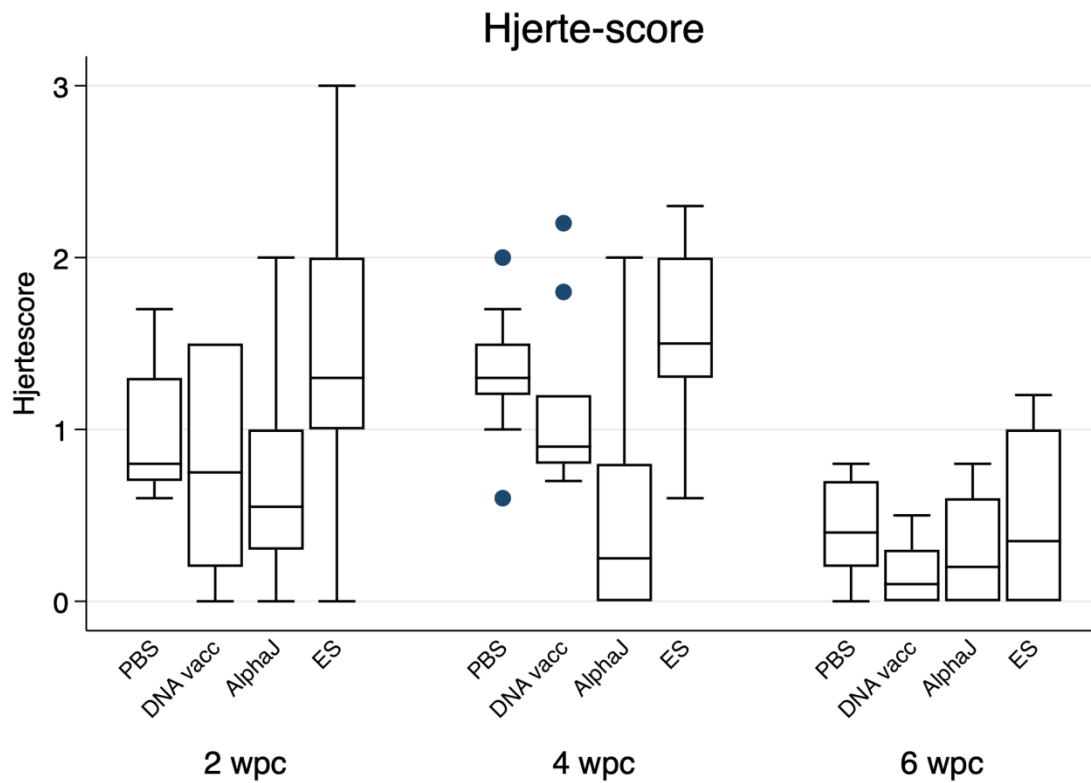
### **Histologisk vurdering**

Ved vurdering av de histologiske snittene ble det benyttet et skjema for klassifisering og gradering av patologiske forandringer i pankreas, hjertemuskulatur og skjelettmuskulatur (Vedlegg 2). Histopatologiske forandringer ble vurdert på en kontinuerlig skala fra 0-3, hvorav 3 har de mest uttalte forandringene. Vi vurderte snittene fra alle uttakene, og benyttet kontrollgruppen (ubehandlet fisk) som referansegruppe.

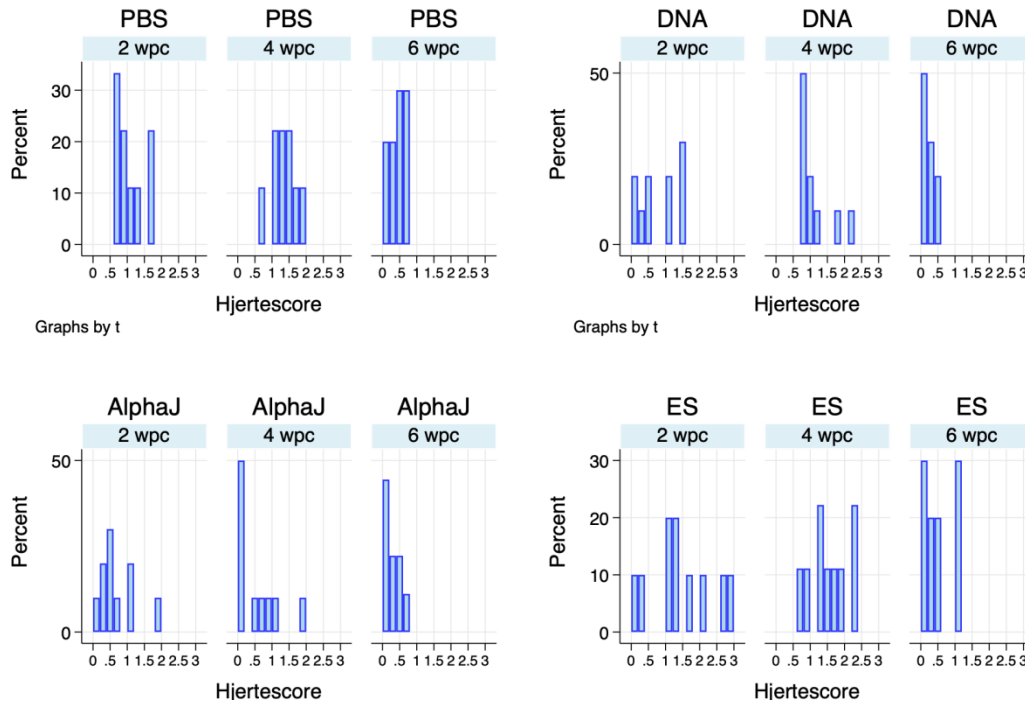
### **Hjertescore**

Fisk i gruppe 2 og 3 hadde histopatologiske forandringer i hjerte og pankreas forenelig med PD ved alle uttak etter smitte, og i tillegg i muskel 6 wpc (Figur 6). Det var ingen signifikant forskjell mellom uvaksinerte fisk (PBS) og de andre gruppene 2 wpc, men gruppen vaksinert med inaktivert vaksine (AlphaJ) hadde en hjertescore som var lavere enn gruppen behandlet med E/S, og i grenseland for signifikant forskjellig ( $p=0.063$ , Figur 6). 6 wpc smitte var det

små forandringer i hjertet karakterisert ved sene inflammatoriske forandringer og noe regenerasjon, tidligere observert ved PD-infeksjoner.



Figur 6. Boxplot for hjertescore for de ulike gruppene ved 2, 4 og 6 wpc. Tverrstreken innen boksen angir median.



Figur 7. Fordelingen av hjertescore framstilt for de ulike gruppene ved hvert uttakstidspunkt. X-aksen angir hjertescore og y-aksen fordelingen(%) over skalaen 0-3.

Figur 7 viser at det var gruppen vaksinert med inaktivert vaksine (AlphaJ) hadde minst histopatologiske forandringer i hjertet(lavest score). 2 wpc hadde 8 av 10 fisk forandringer i kategorien 0.0-1.0 og to fisk en score mellom 1.1-2.0. 4 wpc hadde alle fiskene en score på 0.0-1.0, der man ikke kunne finne patologiske forandringer hos 6 av disse fiskene.

Fra 2 til 4 wpc var det en reduksjon i score for DNA-vaksine-gruppen fra 3 til 2 fisk med en score mellom 1.1-2.0 og fra 6 til 8 fisk med histopatologiske forandringer i kategorien 0.0-1.0 (Figur 7). Antall fisk som var 9 og 10 fisk ved henholdsvis uttak 2 og 4 wpc.

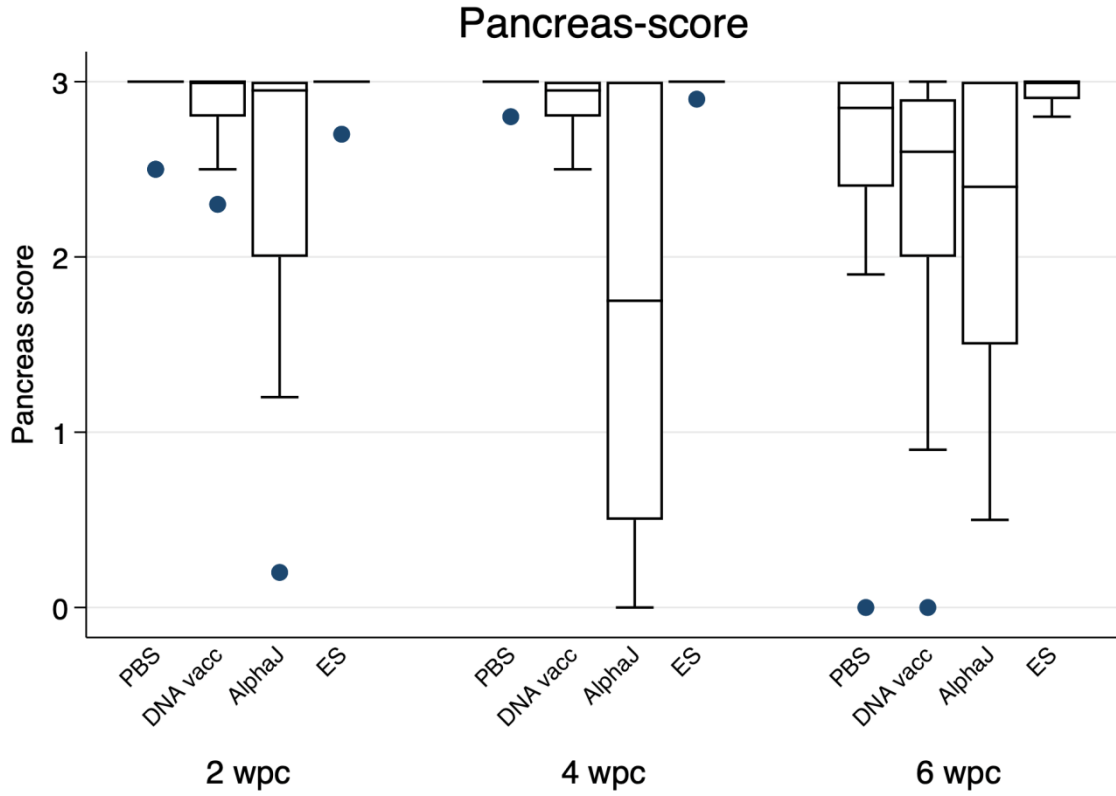
For PBS-gruppen hadde over halvparten av fisken 2 wpc histopatologiske forandringer i kategorien 1.1-2.0 og de resterende en score mellom 0.0-1.0 (Figur 7). 4 wpc hadde 80 % en score i området 0.0-1.5. 6 wpc hadde alle en score under 1.0.

Fisk behandlet med E/S var den eneste gruppen som hadde de mest uttalte histopatologiske forandringene i hjertet. 30 % av fiskene hadde en score >2 ved 2 wpc (Figur 7). 4 wpc hadde 9 fisk en score >1.5, mens 6 wpc hadde 3/10 en score >1 og de resterende en lavere score (Figur 7).

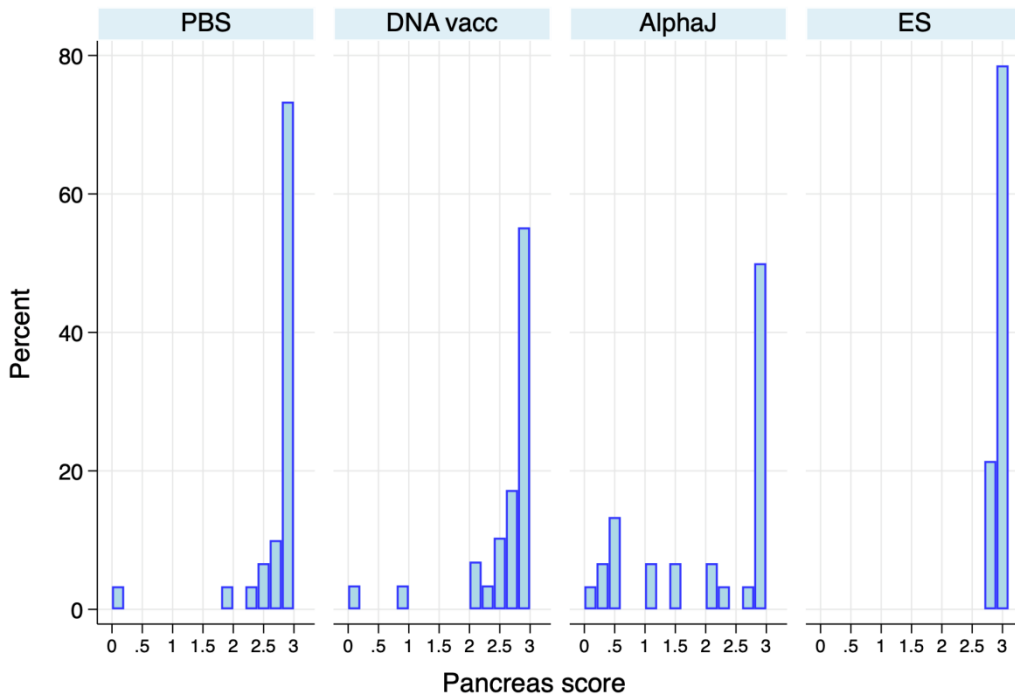
### **Pankreas score**

For pankreas ser vi at den mesteparten av fisken har uttalte forandringer i alle gruppene (Figur 8 og 9) gjennom hele forsøket. 2 wpc hadde alle gruppene en score over 2.5. Fire wpc hadde AlphaJ lavere histopatologisk score enn alle de andre gruppene, og signifikant lavere enn PBS-gruppen ( $p=0.007$ ), men ikke lavere score enn fisk vaksinert med DNA-vaksine ( $p=0.13$ ).

6 wpc var det ikke signifikante forskjeller mellom noen av gruppene, men vaksinerte grupper hadde noe lavere pankreasscore. Vi kunne se regenerasjon i pankreas hos flere av fiskene som hadde fått AlphaJ og DNA-vaksine. Fisk vaksinert med AlphaJ hadde i tillegg noe lavere score i muskel enn E/S-gruppen.

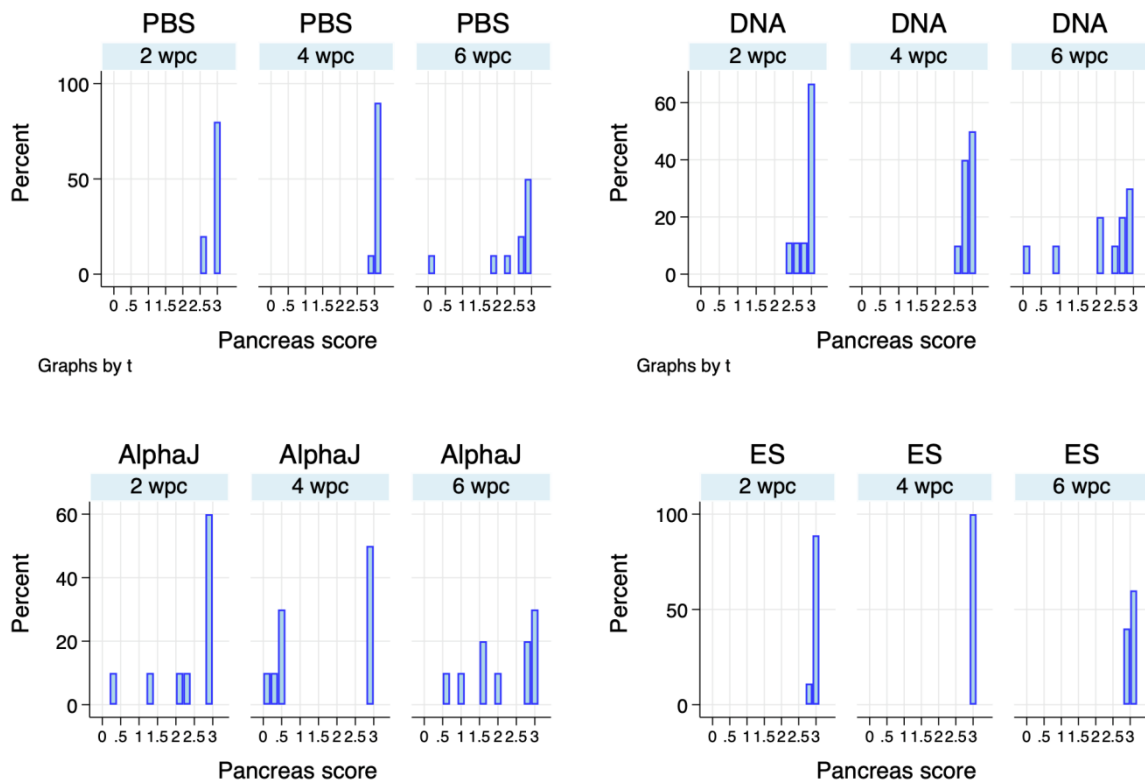


Figur 8. Boxplot for pankreasscore for de ulike gruppene ved 2, 4 og 6 wpc. Tverrstreken innen boksen angir median.



Figur 9. Pankreasscore framstilt for de ulike gruppene, samlet for alle uttakstidspunkt etter smitte. X-aksen angir pankreasscore og y-aksen fordelingen (%) over skalaen 0-3.

I DNA-gruppen gikk alle fiskene fra å ha en pankreasscore mellom 2.1-3.0 (Figur 9) med uttalt tap av pankreasvev ved både uttak 2 og 4 wpc, til å ha flere områder med regenerasjon hos 5 av 10 fisk 6 wpc. Antall fisk med score i området 2.1-3.0 gikk ned etter første uttak for fisk som hadde fått inaktivert vaksine AlphaJ. Her så vi også øyer med regenerasjon 6 wpc. Vi ser fra Figur 8 og 9 at AlphaJ-gruppen hadde minst vevsskade i pankreas samlet over alle uttakene.



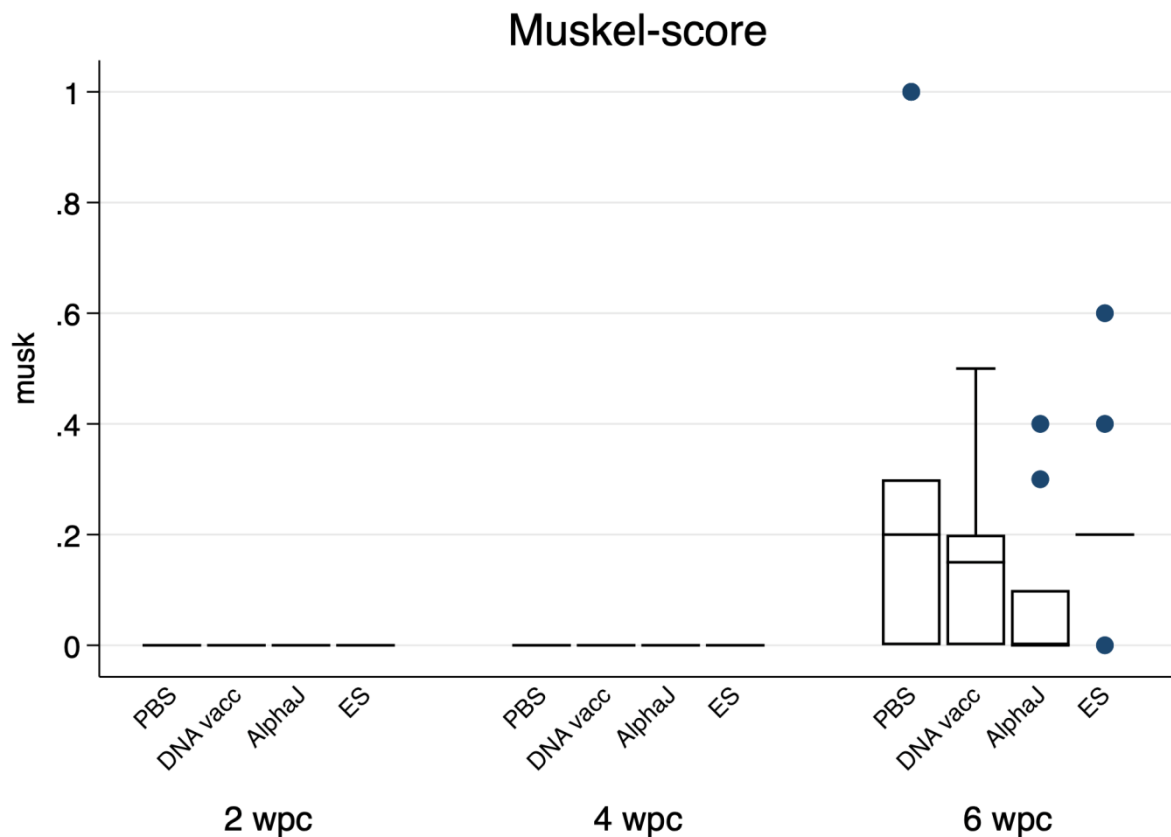
Figur 10. Pankreasscore framstilt for de ulike gruppene ved hvert uttakstidspunkt. X-aksen angir pankreasscore og y-aksen fordelingen (%) over skalaen 0-3.

For både den uvaksinerte gruppen og E/S-behandlet gruppe hadde nærmest alle fiskene en score på 3.0 ved første og andre uttak. E/S-gruppen hadde fortsatt tilnærmet like uttalte forandringer 6 wpc, mens den uvaksinerte gruppen hadde til sammen 2 fisk med lavere score i kategoriene 0.0-1.0 og 1.1-2.0 (Figur 10).

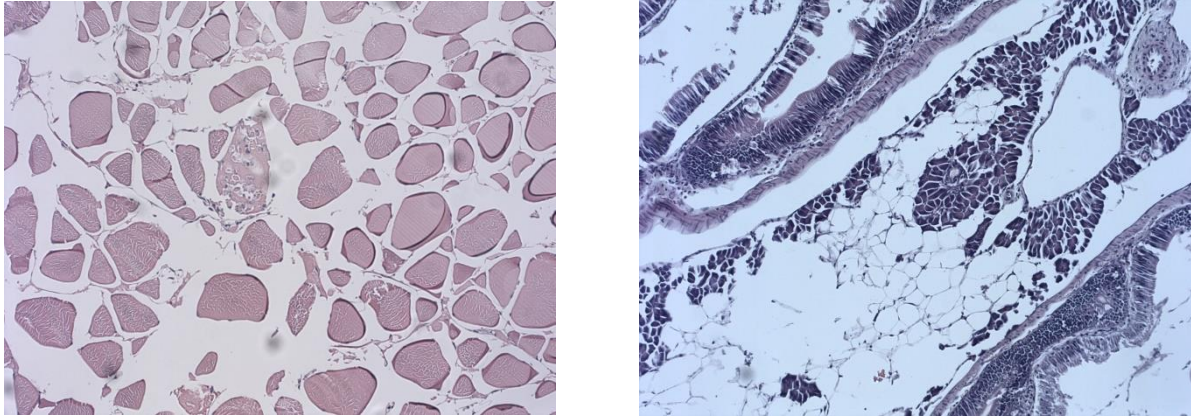


## Muskelscore

Det var først ved siste uttak (6 wpc) det var histopatologiske forandringer forenelig med PD-infeksjon skjelettmuskulatur (se Figur 11 og 12). Det var fokal til multifokal nekrose av hvit muskulatur, men ingen forandringer i rød muskulatur og med lite betennelsesreaksjoner. Det var gruppen som var vaksinert med AlphaJ som kom best ut, der 3 av 10 fisk hadde nekrotiske myocytter, og med en score som ikke gikk høyere enn 0.4. Både fisken i DNA-gruppen og den uvaksinerte gruppen (PBS) hadde 6 av 10 fisk med histopatologiske forandringer forenelig med PD-infeksjon i kategorien 0.0-1.0, men den uvaksinerte fisken hadde sammenlagt høyere score enn fisken som hadde fått DNA-vaksine. I E/S-gruppen hadde 8 av 9 fisk histopatologiske forandringer med score opp til 0.6 (Figur 7), og den siste fisken hadde ingen nekrotiske myocytter i hvit muskulatur.



Figur 11. Boxplot for skjelettmuskelscore for de ulike gruppene ved 2, 4 og 6 wpc. Tverrstreken innen boksen angir median.



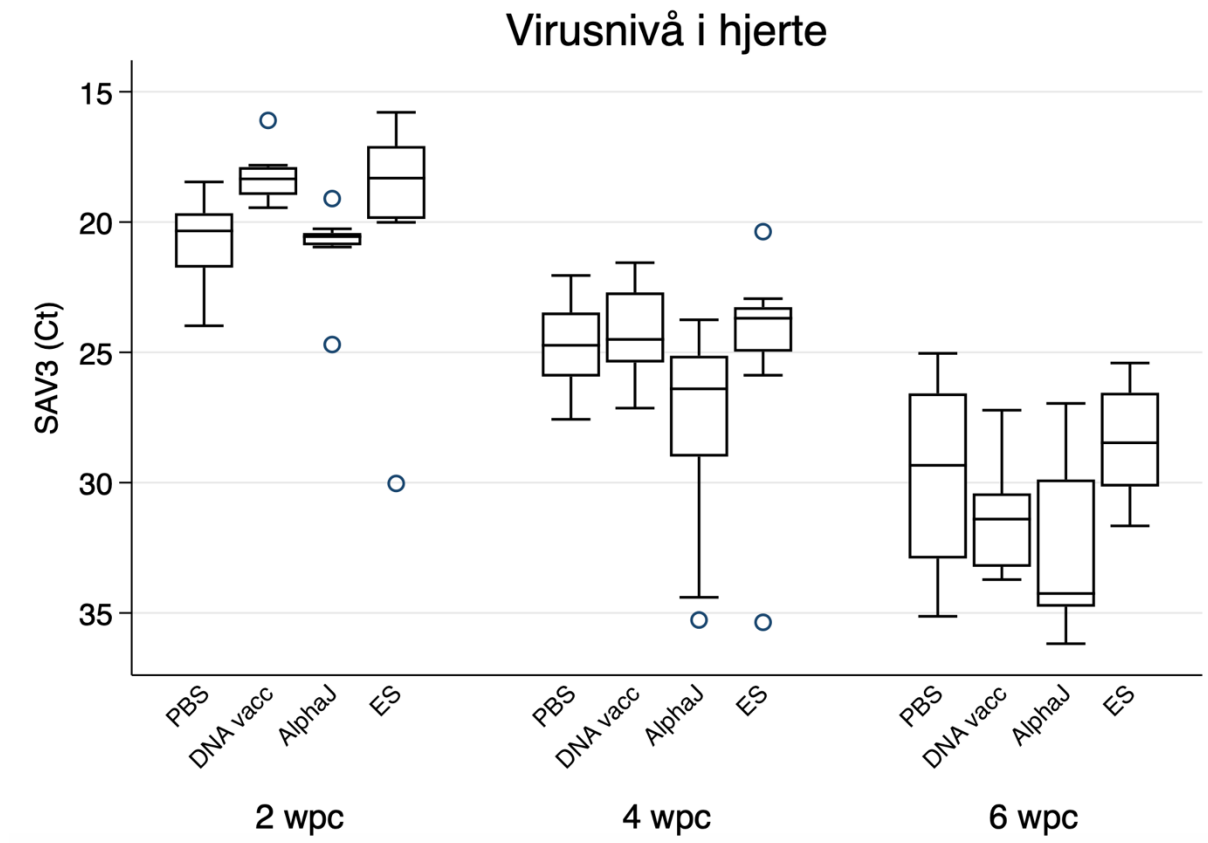
Figur 12. Histopatologiske forandringer i a) Hvit skjelettmuskulatur 6 wpi hos fisk injisert med E/S og smittet med SAV3, og b) Eksokrin pankreas 6 wpi hos fisk vaksinert med inaktivert vaksine og smittet med SAV3.

## Real time PCR

Det ble gjort real time PCR-undersøkelser på SAV-virus, samt CD4 og CD8-celler for vevsprøver fra hjertermuskulatur.

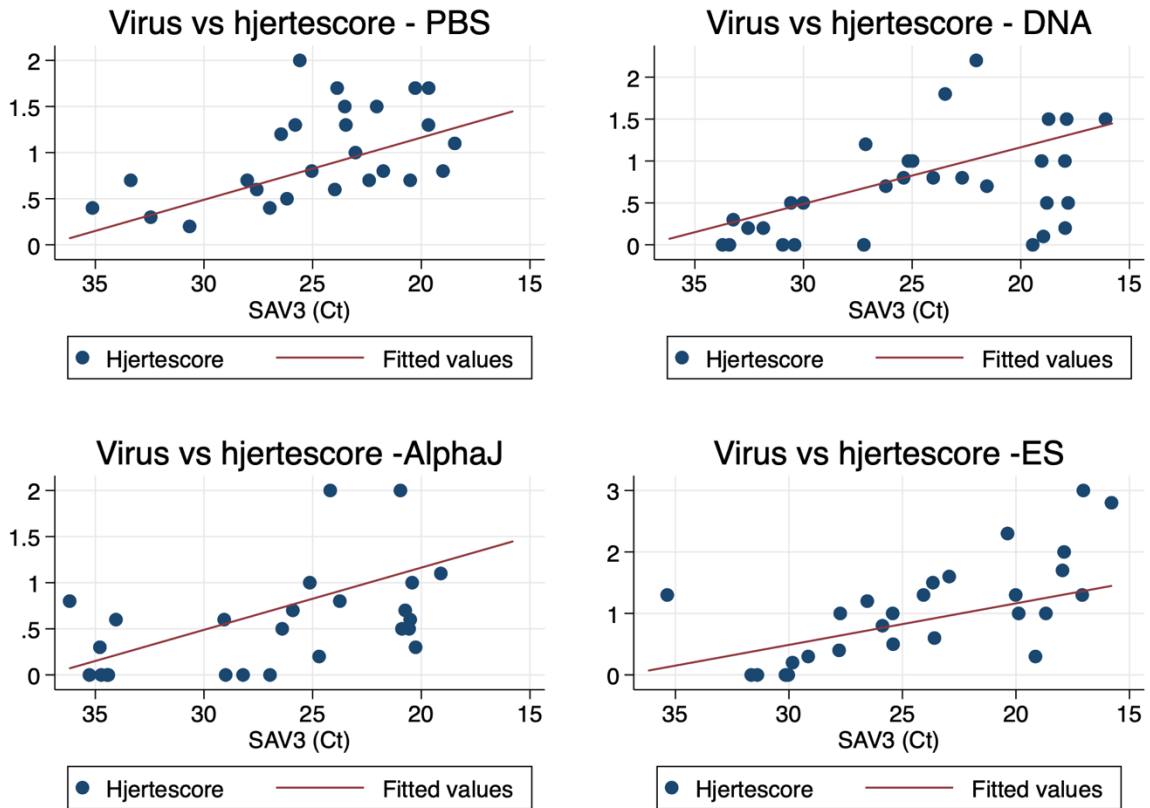
### SAV3-nivå

I Figur 13 er det en samlet oversikt over virusmengde i hjerte (real-time PCR) ved alle tidspunkt, 2, 4 og 6 wpc. Ved 2 wpc hadde fisk i DNA ( $p=0.0012$ ) og E/S (0.03) gruppene signifikante høyere nivåer av virus i hjertet enn PBS-gruppen, mens AlphaJ-gruppen var numerisk noe lavere, men ikke signifikant forskjellig ( $p>0.05$ ). 4 wpc hadde virusnivå falt, sammenlignet med 2 wpc, og ved 6 wpc falt det ytterligere. Ved 4 wpc er virus-nivået i AlphaJ-gruppen signifikant lavere enn PBS-gruppen ( $p=0.037$ ), mens DNA vaksinert fisk ikke er forskjellig fra PBS. Nivået i E/S-injisert fisk er høyere, men ikke signifikant forskjellig fra PBS (Figur 13). 6 wpc er det ikke signifikant forskjell mellom PBS og noen av de andre gruppene ( $p>0.05$ ).



Figur 13. SAV3-nivå for alle tidspunkt for de ulike gruppene. Y-aksen er invertert.

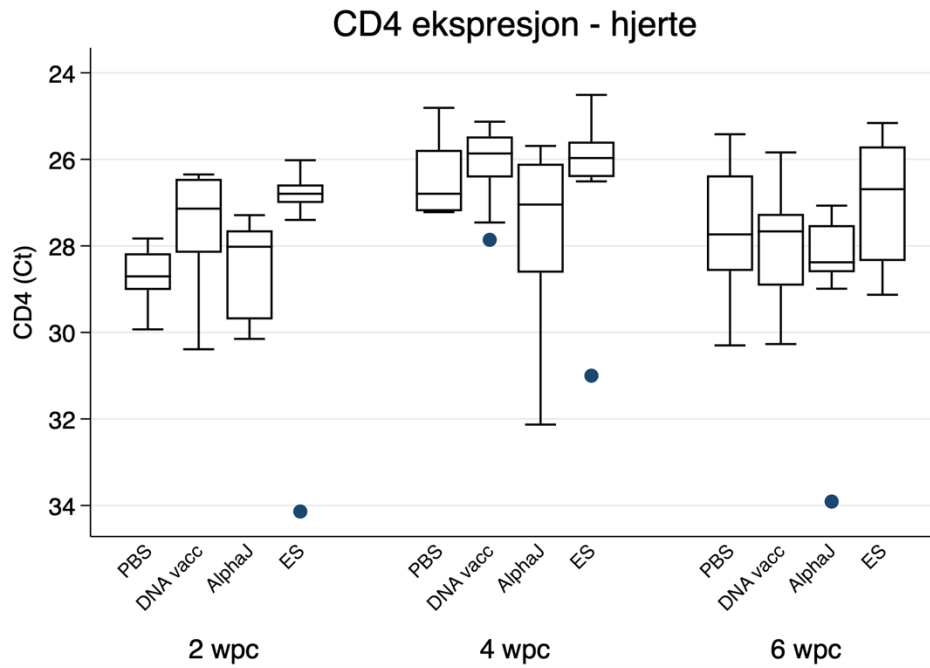
I Figur 14 har vi sett på sammenhengen mellom virusnivå i hjertet og hjertescore samlet for alle tidspunktene etter smitte. Her fant vi en klar sammenheng mellom virusmengde uttrykt som virus-genom med real-time PCR og score uttrykt på en kontinuerlig skala. For alle gruppene er det en  $r^2$  på mellom 0.5 (DNA) og 0.7 (ES), alle verdiene signifikant (PBS,  $p=0.005$ ; DNA,  $p=0.0069$ ; AlphaJ,  $p=0.014$  og ES,  $p=0.0001$ ).



Figur 14. Hjertescore plottet mot virusnivå (SAV3) i hjertemuskelatur for de ulike vaksinene. Alle tidspunktene etter smitte (2, 4 og 6 wpc) er her samlet i ett oppsett.

### CD4 ekspresjon

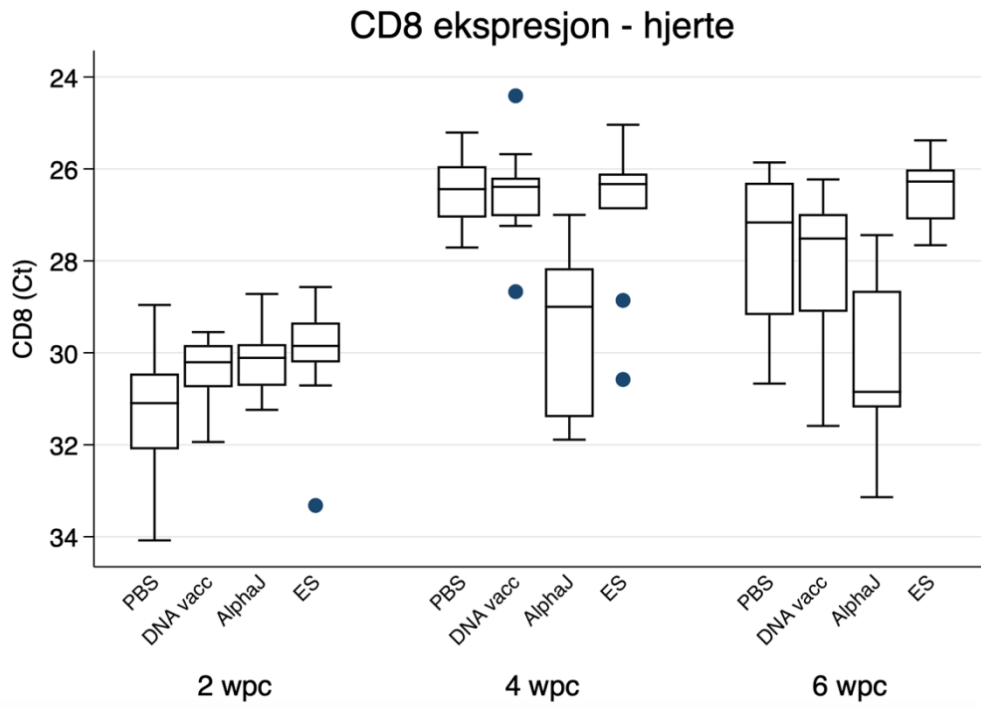
2 wpc hadde E/S-behandlet ( $p=0.002$ ) og DNA vaksinert fisk ( $p=0.02$ ) et høyere uttrykk av CD4 enn de andre gruppene (Figur 14), mens AlphaJ-vaksinert fisk ikke var signifikant forskjellig fra PBS gruppen. 4 og 6 wpc var det ikke forskjell mellom gruppen.



Figur 15. CD4 mRNA ekspresjon for de ulike gruppene 2, 4 og 6 wpc. Y-aksen er invertert.

### CD8 ekspresjon

For CD8, var ekspresjonen høyere i ES gruppen enn de andre gruppene 2 wpc, dog marginalt ( $p=0.046$ ). Det var ingen forskjell mellom de andre gruppene. Ved 4 wpc hadde AlphaJ vaksinert signifikant lavere uttrykk av CD8 ( $p=0.002$ ) sammenlignet med alle andre grupper, mens det ikke var forskjell mellom de øvrige gruppene. Det samme gjaldt for 6 wpc, AlphaJ signifikant lavere enn de andre gruppene ( $p=0.0004$ ).



Figur 16. CD8 mRNA ekspresjon for de ulike gruppene 2, 4 og 6 wpc. Y-aksen er invertert.

## **Diskusjon**

I dette forsøket vår målsettingen å benytte en cytostatika for å «slå ut» CD8- og CD4-celler som har en betydning både for det cellulære og det humorale immunsystemet. Vi benyttet E/S, da det er vist ved tidligere studier at denne kombinasjonen av cytostatikum kan inhibere den T-cellemedierte immunresponsen ved å inhibere T-celleproliferasjon og aktivering (98). Ved å nedregulere aktiviteten til T-celler ville vi undersøke hvilken effekt dette hadde på immunresponsen etter SAV3-infeksjonen og dermed beskyttelse mot utvikling av patologiske forandringer i målorganer, hjerte og pankreas, både med og uten vaksinasjon. I forsøket ble flere parallelle grupper med fisk tatt med og de fikk ulik behandling og/eller vaksiner. Vi håpet med dette å kunne undersøke effekten av E/S alene, samt effekten av E/S gitt sammen med vaksine og smitte.

På grunn av en feilvurdering ble det i gruppe 4 gitt E/S og vaksine etterfulgt av smitte med kun 3 dagers mellomrom. I planen skulle disse ha blitt smittet etter 450-600 døgngrader, ca. 40 dager. Dette vil si at vaksinene ikke fikk nok tid til å stimulere ervervet immunitet før smitte ble gitt. Det vil derimot trolig skje en uspesifikk immunstimulering like etter vaksinasjonen, noe som kan medføre at de medfødte responsene motvirker effekten av smitte. E/S-behandlingen kunne potensielt hindre noen av disse effektene. Dette er derimot vanskelig å vurdere uten kontroller. På grunn av dette ble behandlingen for gruppe 4 gjort på nytt, med ny fisk, men det betyr for vår del at resultatene fra denne delstudien ikke kommer med grunnet mangel for å gjennomføre forsøkene før innlevering av oppgaven.

I et pilotprosjekt gjort før igangsetting av denne studien ble det vist en signifikant reduksjon i CD8 mRNA i nyre 10 dager etter injeksjon med E/S på friske individ (Se vedlegg 3). CD4 ble ikke signifikant endret. I vårt forsøk ønsket vi å gjenskape denne effekten for deretter å

vurdere effekt på immunitet og sykdomsutvikling. I gruppen som ble injisert med E/S og deretter smittet med SAV3 fikk vi ikke signifikant reduksjon av CD8 i hjertemuskulatur, heller omvendt. Dette kan skyldes at infeksjonen fører til aktivering av nye CD8-celler, og dermed blir effekten av E/S kamuflert. Et annet forhold kan være avstanden i tid mellom injeksjonen av E/S og smitte, da det ikke er kjent for lenge effekt av E/S-behandling varer. Dette bør undersøkes nærmere i framtidige studier.

I dette forsøket er det den inaktiverede vaksinen ALPHA JECT micro 1 PD(PHARMAQ®) som ga best resultat ved at den beskyttet best mot utvikling av patologiske forandringer i målorganer samt at den ga lavest påvist virusmengde i smittet fisk. Dette er i samsvar med tidligere studier (50). Her kom også den inaktiverede vaksinen best ut, både med tanke på sirkulerende antistoffer, beskyttelse mot patologi i indre organer og oppregulering av IFN $\gamma$  og IL2-mRNA-ekspressjon, noe som indikerer at det er andre mekanismer enn humoral immunitet som spiller en rolle ved infeksjon av SAV.

Ifølge studier gjort av Chang med medarbeidere (51) ga DNA-vaksinen inneholdende de strukturelle polyproteinene C-E3-E2-6K-E1 god beskyttelse mot en SAV3-infeksjon, noe som ifølge denne studien kan skyldes virusnøytraliserende antistoffer. I denne studien ble det dessuten vist at den inaktiverede vaksinen gir økt beskyttelse mot SAV3, men beskytter ikke mot patologiske forandringer i hjertemuskulatur og pankreas.

I vår studie fant vi ikke denne effekten av DNA-vaksinen. Årsaken til dette er ikke kjent. Det samme konstruktet har vært benyttet for vaksinasjon av laks i tidligere studier (Evensen, personlig meddelelse). Det kan skyldes ulike forhold som variasjon i tillaging av vaksinen, knyttet til temperatur benyttet ved ekspressjon, oppbevaring av plasmider, samt forhold knyttet



til uttrykk av selve vaksinen *in vivo*, særlig kapsidprotein, inkluderte strukturelle kodete proteiner og lignende. En måte å undersøke dette på vil være å dokumentere uttrykk av mRNA og eventuelle proteiner lokalt på injeksjonsstedet, eller i cellekultur. Dette ble ikke gjort i denne studien siden det samme konstruktet tidligere har vist å gi god beskyttelse mot smitte.

Videre arbeid med dette forsøket ville innebære å fullføre prøvetaking og undersøkelser av den nye delstudien, ekvivalent med gruppe 4 i vårt forsøk. Her ville vi hatt mulighet til å se på effekten av E/S på immunsystemet etter injiserte vaksiner har oppnådd sine fulle effekter.

Tilleggsundersøkelser som kan gjøres videre på de høstede prøvene kunne vært å undersøke for SAV3-genom, CD4- og CD8-mRNA i hodenyre ved hjelp av real time PCR. En real time PCR-undersøkelse for B-celler kunne også vært aktuelt for å kunne sammenligne forskjeller i nivå mellom T- og B-celler. En undersøkelse for tilstedeværelse av interferoner, som IFN $\gamma$  ville også kunne gi nyttig informasjon, og videre undersøkelser rundt nivå av IL-2 og dermed Th-1 ville vært nyttig.

Ved undersøkelse av serum kunne det blitt utført serologiske tester for å undersøke nivået av sirkulerende antistoffer. Enklere tester som ELISA-test for antistoffer mot SAV3 kunne også vært aktuelt her.

## **Konklusjon**

I denne studien viser vi at den inaktiverede vaksinen kommer best ut hva gjelder beskyttelse mot patologiske forandringer i pankreas og hjertemuskulatur. Vi kunne ikke vise en sammenheng mellom gitt cytostatikabehandling og reduserte nivåer av CD8-celler, noe som kan skyldes at infeksjonen med SAV3 har induisert rekruttering av nye CD8-celler som dermed vil kamuflere en eventuell reduksjon som følge av E/S-behandlingen eller at smitte kom for sent i forhold til injeksjonen av E/S. Vi kan dermed ikke med vårt eksperiment vise om T-celler spiller en sentral rolle ved en infeksjon med salmonid alphavirus subtype 3. Ytterligere forsøk og studier kreves for å undersøke denne hypotesen videre.

## Referanser

1. Nelson R, McLoughlin M, Rowley HM, Platten MA, McCormick J. Isolation of a toga-like virus from farmed Atlantic salmon *Salmo salar* with pancreas disease. *Diseases of Aquatic Organisms*. 1995;22:25-32.
2. Munro A, Ellis A, McVicar A, McLay HA, Needham E. An exocrine pancreas disease of farmed Atlantic salmon in Scotland. *Helgolander Meeresuntersuchungen*. 1984;37(1-4):571-86.
3. Poppe T, Rimstad E, Hyllseth B. Pancreas disease in atlantic salmon (*Salmo salar*) postsmolts infected with infectious pancreatic necrosis virus (IPNV). *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists*. 1989;9(4):83-5.
4. Weston JH, Welsh MD, McLoughlin MF, Todd D. Salmon Pancreas Disease Virus, an Alphavirus Infecting Farmed Atlantic Salmon, *Salmo salar* L. *Virology*. 1999;256(2):188-95.
5. Hodneland K, Bratland A, Christie KE, Endresen C, Nylund A. New subtype of salmonid alphavirus (SAV), *Togaviridae*, from Atlantic salmon *Salmo salar* and rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* in Norway. *Diseases of aquatic organisms*. 2005;66(2):113-20.
6. Fringuelli E, Rowley HM, Wilson JC, Hunter R, Rodger H, Graham DA. Phylogenetic analyses and molecular epidemiology of European salmonid alphaviruses (SAV) based on partial E2 and nsP3 gene nucleotide sequences. *Journal of Fish Diseases*. 2008;31(11):811-23.
7. Graham DA, Rowley HM, Walker IW, Weston JH, Branson EJ, Todd D. First isolation of sleeping disease virus from rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), in the United Kingdom. *Journal of Fish Diseases*. 2003;26(11-12):691-4.
8. Bergmann S, Fichtner D, Riebe R, Castric J. First isolation and identification of Sleeping Disease Virus (SDV) in Germany. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists*. 2008;28(4):148-56.
9. Graham DA, Rowley HM, Fringuelli E, Bovo G, Manfrin A, McLoughlin MF, et al. First laboratory confirmation of salmonid alphavirus infection in Italy and Spain. *Journal of Fish Diseases*. 2007;30(9):569-72.
10. Smrzlić IV, Kapetanović D, Valić D, Teskeredžić E, McLoughlin M, Fringuelli E. First laboratory confirmation of sleeping disease virus (SDV) in Croatia. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists*. 2013;33(3):78-83.
11. Schmidt-Posthaus H, Diserens N, Jankowska Hjortaas M, Knüsel R, Hirschi R, Taksdal T. First outbreak of sleeping disease in Switzerland: disease signs and virus characterization. *Diseases of aquatic organisms*. 2014;111(2):165-71.
12. Borzym E, Maj-Paluch J, Stachnik M, Matras M, Reichert M. First Laboratory Confirmation of Salmonid Alphavirus Type 2 (SAV2) Infection in Poland. *Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy*. 2014;58(3):341-5.
13. Villoing S, Béarzotti M, Chilmonczyk S, Castric J, Brémont M. Rainbow Trout Sleeping Disease Virus Is an Atypical Alphavirus. *Journal of Virology*. 2000;74(1):173-83.
14. Hjeltnes B, Jensen BB, Bomø G, Haukaas A, Walde CS. *Fiskehelserapporten 2018*. Oslo; 2019. Report No.: 6a/2019.
15. Christie KE, Fyrand K, Holtet L, Rowley HM. Isolation of pancreas disease virus from farmed Atlantic salmon, *Salmo salar* L., in Norway. *Journal of Fish Diseases*. 1998;21(5):391-4.
16. Hjortaas MJ, Skjelstad HR, Taksdal T, Olsen AB, Johansen R, Bang-Jensen B, et al. The first detections of subtype 2-related salmonid alphavirus (SAV 2) in Atlantic salmon, *Salmo salar* L., in Norway. *Journal of Fish Diseases*. 2013;36(1):71-4.
17. Strauss JH, Strauss EG. The alphaviruses: gene expression, replication, and evolution. *Microbiological Reviews*. 1994;58(3):491-562.

18. Garmashova N, Gorchakov R, Volkova E, Paessler S, Frolova E, Frolov I. The Old World and New World Alphaviruses Use Different Virus-Specific Proteins for Induction of Transcriptional Shutoff. *The Journal of Virology*. 2007;81(5):2472-84.
19. World Health Organization. Chikungunya. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/chikungunya> (24.02.2019) [
20. Nolen-Walston R, Bedenice D, Rodriguez C, Rushton S, Bright A, Fecteau ME, et al. Eastern Equine Encephalitis in 9 South American Camelids. *Journal of Veterinary Internal Medicine*. 2007;21(4):846-52.
21. Powers AM, Brault AC, Shirako Y, Strauss EG, Kang W, Strauss JH, et al. Evolutionary relationships and systematics of the alphaviruses. *Journal of Virology*. 2001;75(21):10118–31.
22. La Linn M, Gardner J, Warrilow D, Darnell GA, McMahon CR, Field I, et al. Arbovirus of Marine Mammals: a New Alphavirus Isolated from the Elephant Seal Louse, *Lepidophthirus macrorhini*. *The Journal of Virology*. 2001;75(9):4103–9.
23. Petterson E, Sandberg M, Santi N. Salmonid alphavirus associated with *Lepeophtheirus salmonis* (Copepoda: Caligidae) from Atlantic salmon, *Salmo salar* L. *Journal of Fish Diseases*. 2009;32(5):477-9.
24. Jose J, Snyder JE, Kuhn RJ. A structural and functional perspective of alphavirus replication and assembly. *Future Microbiology*. 2009;4(7):837-56.
25. Guo T-C. Salmonid alphavirus infection in Atlantic salmon : viral properties and host responses to infection. Oslo 2015. Dr.philos.-avh - Norges Miljø- og Biovitenskapelige Universitet.
26. Davis NL, Fuller FJ, Dougherty WG, Olmsted RA, Johnston RE. A single nucleotide change in the E2 glycoprotein gene of Sindbis virus affects penetration rate in cell culture and virulence in neonatal mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1986;83(18):6771-5.
27. Lustig S, Jackson AC, Hahn CS, Griffin DE, Strauss EG, Strauss JH. Molecular basis of Sindbis virus neurovirulence in mice. *The Journal of Virology*. 1988;62(7):2329-36.
28. Polo JM, Johnston RE. Attenuating mutations in glycoproteins E1 and E2 of Sindbis virus produce a highly attenuated strain when combined in vitro. *Journal of virology*. 1990;64(9):4438-44.
29. Merour E, Lamoureux A, Bernard J, Biacchesi S, Bremont M. A Fully Attenuated Recombinant Salmonid Alphavirus Becomes Pathogenic through a Single Amino Acid Change in the E2 Glycoprotein. *Journal of Virology*. 2013;87(10):6027-30.
30. Shirako Y, Strauss JH. Regulation of Sindbis virus RNA replication: uncleaved P123 and nsP4 function in minus-strand RNA synthesis, whereas cleaved products from P123 are required for efficient plus-strand RNA synthesis. *The Journal of Virology*. 1994;68(3):1874-85.
31. Kristoffersen AB, Viljugrein H, Kongtorp RT, Brun E, Jansen PA. Risk factors for pancreas disease (PD) outbreaks in farmed Atlantic salmon and rainbow trout in Norway during 2003–2007. *Preventive Veterinary Medicine*. 2009;90(1):127-36.
32. Graham DA, Brown A, Savage P, Frost P. Detection of salmon pancreas disease virus in the faeces and mucus of Atlantic salmon, *Salmo salar* L., by real-time RT-PCR and cell culture following experimental challenge. *Journal of Fish Diseases*. 2012;35(12):949-51.
33. Jansen MD, Bang Jensen B, Taksdal T, Sindre H, Lillehaug A. Pankreassykdom hos laksefisk - en review med fokus på forebygging, kontroll og bekjempelse. Oslo; 2015. Report No.: 5/2015.
34. Stene A, Hellebø A, Viljugrein H, Solevåg SE, Devold M, Aspehaug V. Liquid fat, a potential abiotic vector for horizontal transmission of salmonid alphavirus? *Journal of Fish Diseases*. 2016;39(5):531-7.

35. Olsen AB, Bang Jensen B, Nilsen H, Grøntvedt RN, Gjerset B, Taksdal T, et al. Risikovurdering for spredning av pankreas disease virus(PD-virus) ved bruk av leppefisk i norsk lakseoppdrett. Oslo; 2011. Report No.: 7/2011.
36. Herath TK, Ferguson HW, Weidmann MW, Bron JE, Thompson KD, Adams A, et al. Pathogenesis of experimental salmonid alphavirus infection in vivo: an ultrastructural insight. *Veterinary Research*. 2016;47:7.
37. Christie KE, Graham DA, McLoughlin MF, Villoing S, Todd D, Knappskog D. Experimental infection of Atlantic salmon *Salmo salar* pre-smolts by i.p. injection with new Irish and Norwegian salmonid alphavirus (SAV) isolates: a comparative study. *Diseases of aquatic organisms*. 2007;75(1):13-22.
38. Taksdal T, Olsen AB, Bjerås I, Hjortaas MJ, Dannevig BH, Graham DA, et al. Pancreas disease in farmed Atlantic salmon, *Salmo salar* L., and rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), in Norway. *Journal of Fish Diseases*. 2007;30(9):545-58.
39. Thim HL, Villoing S, McLoughlin MF, Christie KE, Grove S, Frost P, et al. Vaccine adjuvants in fish vaccines make a difference: comparing the effects of three adjuvants (Montanide ISA763A oil, CpG/poly I:C combo and VHSV glycoprotein) used alone or in combination to formulate an inactivated salmonid alphavirus whole virus. *Vaccines*. 2014;2(2):228-51.
40. Aucouturier J, Dupuis L, Ganne V. Adjuvants designed for veterinary and human vaccines. *Vaccine*. 2001;19:2666-72.
41. Munang'andu HM, Fredriksen BN, Mutoloki S, Dalmo RA, Evensen O. Antigen dose and humoral immune response correspond with protection for inactivated infectious pancreatic necrosis virus vaccines in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Veterinary Research*. 2013;44:7.
42. Bang Jensen B, Kristoffersen AB, Brun E. Vurdering av effekter av PDfri prosjektet 2008-2010. Oslo; 2011. Report No.: 14/2011.
43. Bang Jensen B, Kristoffersen AB, Myr C, Brun E. Cohort study of effect of vaccination on pancreas disease in Norwegian salmon aquaculture. *Diseases of aquatic organisms*. 2012;102(1):23-31.
44. Skjold P, Sommerset I, Frost P, Villoing S. Vaccination against pancreas disease in Atlantic salmon, *Salmo salar* L., reduces shedding of salmonid alphavirus. *Veterinary Research*. 2016;47:78.
45. Legemiddelindustrien. Lanserte DNA-vaksine. <https://www.lmi.no/2018/03/20/lanserte-dna-vaksine/> (10.03.2019).
46. Legemiddelverket. Legemiddelverket anbefaler ikke alminnelig bruk av ny laksevaksine. <https://legemiddelverket.no/nyheter/legemiddelverket-anbefaler-ikke-alminnelig-bruk-av-ny-laksevaksine> (10.03.2019).
47. Fiskehelse og Miljø AS. DNA-vaksine. <https://fom-as.no/dna-vaksine/> (10.03.2019).
48. Kutzler M, Weiner D. DNA vaccines: ready for prime time? *Nature Reviews Genetics*. 2008;9:776-88.
49. Brudeseth BE. Bruk av DNA-vaksiner mot virussykdommer hos fisk. *GENialt*. 2002;1:20-1.
50. Xu C, Mutoloki S, Evensen Ø. Superior protection conferred by inactivated whole virus vaccine over subunit and DNA vaccines against salmonid alphavirus infection in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Vaccine*. 2012;30(26):3918-28.
51. Chang CJ, Gu J, Robertsen B. Protective effect and antibody response of DNA vaccine against salmonid alphavirus 3 (SAV3) in Atlantic salmon. *Journal of Fish Diseases*. 2017;40:1775-81.

52. Sobhkhez M, Krasnov A, Robertsen B. Transcriptome analyses of Atlantic salmon muscle genes induced by a DNA vaccine against salmonid alphavirus, the causative agent of salmon pancreas disease (PD). *PLoS ONE*. 2018;13:e0204024.
53. Whyte SK. The innate immune response of finfish – A review of current knowledge. *Fish and Shellfish Immunology*. 2007;23(6):1127-51.
54. Press CM, Evensen Ø. The morphology of the immune system in teleost fishes. *Fish and Shellfish Immunology*. 1999;9(4):309-18.
55. Dalum AS, Austbø L, Bjørgen H, Skjødt K, Hordvik I, Hansen T, et al. The interbranchial lymphoid tissue of Atlantic Salmon (*Salmo salar* L) extends as a diffuse mucosal lymphoid tissue throughout the trailing edge of the gill filament. *Journal of Morphology*. 2015;276(9):1075-88.
56. Magnadóttir B. Innate immunity of fish (overview). *Fish and Shellfish Immunology*. 2006;20(2):137-51.
57. Miller N, Wilson M, Bengtén E, Stuge T, Warr G, Clem W. Functional and molecular characterization of teleost leukocytes. *Immunological reviews*. 1998;166:187-97.
58. Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. Introduction to the immune system. I: Basic immunology. 5th ed. St. Louis, Missouri: Elsevier, 2016: 1-26.
59. Ellis AE. Innate host defense mechanisms of fish against viruses and bacteria. *Developmental and Comparative Immunology*. 2001;25(8):827-39.
60. Secombes CJ, Wang T, Hong S, Peddie S, Crampe M, Laing KJ, et al. Cytokines and innate immunity of fish. *Developmental and Comparative Immunology*. 2001;25(8):713-23.
61. Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. Innate immunity. I: Basic immunology. 5th ed. St. Louis, Missouri: Elsevier, 2016: 27-54.
62. Takeda K, Akira S. Toll-like receptors in innate immunity. *International immunology*. 2005;17(1):1-14.
63. Chang M, Collet B, Nie P, Lester K, Campbell S, Secombes CJ, et al. Expression and Functional Characterization of the RIG-I-Like Receptors MDA5 and LGP2 in Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Journal of Virology*. 2011;85(16):8403-12.
64. Sun B, Robertsen B, Wang Z, Liu B. Identification of an Atlantic salmon IFN multigene cluster encoding three IFN subtypes with very different expression properties. *Developmental and Comparative Immunology*. 2009;33(4):547-58.
65. Barton GM, Medzhitov R. Control of adaptive immune responses by Toll-like receptors. *Current Opinion in Immunology*. 2002;14(3):380-3.
66. Biacchesi S, LeBerge M, Lamoureux A, Louise Y, Lauret E, Boudinot P, et al. Mitochondrial Antiviral Signaling Protein Plays a Major Role in Induction of the Fish Innate Immune Response against RNA and DNA Viruses. *The Journal of Virology*. 2009;83(16):7815-27.
67. Svingerud T. Atlantic salmon type I interferons : induction and antiviral activity. Tromsø 2013. Dr.philos.-avh - Universitetet i Tromsø.
68. Jego G, Palucka AK, Blanck J-P, Chalouni C, Pascual V, Banchereau J. Plasmacytoid Dendritic Cells Induce Plasma Cell Differentiation through Type I Interferon and Interleukin 6. *Immunity*. 2003;19(2):225-34.
69. Biron CA, Nguyen KB, Pien GC, Cousens LP, Salazar-Mather TP. Natural killer cells in antiviral defense: function and regulation by innate cytokines. *Annual review of immunology*. 1999;17:189-220.
70. Boehm U, Klamp T, Groot M, Howard JC. Cellular responses to interferon-gamma. *Annual review of immunology*. 1997;15:749-95.
71. Welsh RM, Bahl K, Marshall HD, Urban SL, Rall GF. Type 1 Interferons and Antiviral CD8 T-Cell Responses. *PLoS Pathogens*. 2012;8(1):e1002352.

72. Barber GN. The dsRNA-dependent protein kinase, PKR and cell death. *Cell Death and Differentiation*. 2005;12(6):563-70.
73. Der SD, Zhou A, Silverman RH. Identification of Genes Differentially Regulated by Interferon  $\alpha$ ,  $\beta$ , or  $\gamma$  Using Oligonucleotide Arrays. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1998;95(26):15623-8.
74. Chen Y-M, Su Y-L, Shie P-S, Huang S-L, Yang H-L, Chen T-Y. Grouper Mx confers resistance to nodavirus and interacts with coat protein. *Developmental and Comparative Immunology*. 2008;32(7):825-36.
75. Haller O, Staeheli P, Kochs G. Interferon-induced Mx proteins in antiviral host defense. *Biochimie*. 2007;89(6):812-8.
76. Lester K, Hall M, Urquhart K, Gahlawat S, Collet B. Development of an in vitro system to measure the sensitivity to the antiviral Mx protein of fish viruses. *Journal of Virological Methods*. 2012;182(1-2):1-8.
77. Scheuner D, Patel R, Wang F, Lee K, Kumar K, Wu J, et al. Double-stranded RNA-dependent protein kinase phosphorylation of the alpha-subunit of eukaryotic translation initiation factor 2 mediates apoptosis. *The Journal of biological chemistry*. 2006;281(30):21458-68.
78. Kumar A, Haque J, Lacoste J, Hiscott J, Williams BR. Double-stranded RNA-dependent protein kinase activates transcription factor NF-kappa B by phosphorylating I kappa B. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1994;91(14):6288-92.
79. Liu TK, Zhang YB, Liu Y, Sun F, Gui JF. Cooperative Roles of Fish Protein Kinase Containing Z-DNA Binding Domains and Double-Stranded RNA-Dependent Protein Kinase in Interferon-Mediated Antiviral Response. *Journal of Virology*. 2011;85(23):12769-80.
80. Zhu R, Zhang Y-B, Zhang Q-Y, Gui J-F. Functional Domains and the Antiviral Effect of the Double-Stranded RNA-Dependent Protein Kinase PKR from *Paralichthys olivaceus*. *The Journal of Virology*. 2008;82(14):6889-901.
81. Landis H, Simon-Jodicke A, Kloti A, Di Paolo C, Schnorr J-J, Schneider-Schaulies S, et al. Human MxA Protein Confers Resistance to Semliki Forest Virus and Inhibits the Amplification of a Semliki Forest Virus-Based Replicon in the Absence of Viral Structural Proteins. *The Journal of Virology*. 1998;72(2):1516-22.
82. Everett H, McFadden G. Apoptosis: an innate immune response to virus infection. *Trends in microbiology*. 1999;7(4):160-5.
83. Hardwick JM. Viral interference with apoptosis. *Seminars in Cell and Developmental Biology*. 1998;9(3):339-49.
84. Xu C. Immune response of Atlantic salmon against SAV-3 infection with emphasis on type I IFN responses. Ås 2015. Dr.philos.-avh - Norges Miljø- og Biovitenskapelige Universitet.
85. Shen Y, Shenk TE. Viruses and apoptosis. *Current Opinion in Genetics & Development*. 1995;5(1):105-11.
86. Brightbill HD, Libraty DH, Krutzik SR, Yang R-B, Belisle JT, Bleharski JR, et al. Host Defense Mechanisms Triggered by Microbial Lipoproteins Through Toll-Like Receptors. *Science*. 1999;285(5428):732-6.
87. Yoshiura Y, Kiryu I, Fujiwara A, Suetake H, Suzuki Y, Nakanishi T, et al. Identification and characterization of Fugu orthologues of mammalian interleukin-12 subunits. *Immunogenetics*. 2003;55(5):296-306.
88. Schoenborn JR, Wilson CB. Regulation of Interferon-gamma During Innate and Adaptive Immune Responses. *Advances in Immunology*. 2007;96:41-101.

89. Díaz-Rosales P, Bird S, Wang TH, Fujiki K, Davidson WS, Zou J, et al. Rainbow trout interleukin-2: Cloning, expression and bioactivity analysis. *Fish and Shellfish Immunology*. 2009;27(3):414-22.
90. Xu C, Guo T-C, Mutoloki S, Haugland O, Marjara IS, Evensen O. Alpha Interferon and Not Gamma Interferon Inhibits Salmonid Alphavirus Subtype 3 Replication In Vitro. *The Journal of Virology*. 2010;84(17):8903-12.
91. Sun B, Skjæveland I, Svingerud T, Zou J, Jørgensen J, Robertsen B. Antiviral activity of salmonid gamma interferon against infectious pancreatic necrosis virus and salmonid alphavirus and its dependency on type I interferon. *Journal of virology*. 2011;85(17):9188-98.
92. Gahlawat SK, Ellis AE, Collet B. Expression of interferon and interferon--induced genes in Atlantic salmon *Salmo salar* cell lines SHK-1 and TO following infection with Salmon AlphaVirus SAV. *Fish & shellfish immunology*. 2009;26(4):672-5.
93. Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. T cell-mediated immunity. I: Basic immunology. 5th ed. St. Louis, Missouri: Elsevier, 2016: 103-28.
94. Abbas AK, Lichtman AH, Pillai, S. Immune receptors and signal transduction. I: Cellular and molecular Immunology. 9th ed. Philadelphia: Elsevier, 2018. 145-78.
95. Alberts B, Bray D, Hopkin K, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. The cell division cycle. I: Essential cell biology. 4th ed. New York: Garland Science, 2014. 603-23.
96. Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. Humoral immune responses. I: Basic immunology. 5th ed. St. Louis, Missouri: Elsevier, 2016: 147-68.
97. Hikima J-I, Jung T-S, Aoki T. Immunoglobulin genes and their transcriptional control in teleosts. *Developmental and Comparative Immunology*. 2011;35(9):924-36.
98. Luo Q, Gu Y, Zheng W, Wu X, Gong F, Gu L, et al. Erlotinib inhibits T-cell-mediated immune response via down-regulation of the c-Raf/ERK cascade and Akt signaling pathway. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 2011;251:130-6.
99. Gu Y, Zhao W, Meng F, Qu B, Zhu X, Sun Y, et al. Sunitinib impairs the proliferation and function of human peripheral T cell and prevents T-cell-mediated immune response in mice. *Clinical Immunology*. 2010;135:55-62.



## **Takk til bidragsytere**

Vi ønsker å takke Amr Gamil, forsker ved Institutt ved basalfag og akvamedisin, for god opplæring på laboratoriet, og ikke minst for tålmodighet og humor.

Vi vil også takke Aase Mikalsen, førsteamanuensis ved Institutt ved basalfag og akvamedisin, for god opplæring på PCR-laboratoriet og oppfølging av oppgaven.

I tillegg ønsker vi å rette en takk mot Koestan Gadan, forsker ved Institutt ved basalfag og akvamedisin, og Florin Christian Asavei, forskningstekniker ved ved Institutt ved basalfag og akvamedisin, for god opplæring og hjelp ved behandling av fisk og prøveuttak.

Til slutt vil vi takke vår veileder Øystein Evensen for god oppfølging, god dialog og utømmelig kunnskap.

## **Summary**

*Tittel:* The importance of T-cell immunity for protection against PD virus infection in salmon

*Forfattere:* Malin Brimsholm, Elise Friis Kvigstad

*Veileder:* Øystein Evensen, Institutt for basalfag og akvamedisin

In this study we investigate the importance of T-cell immunity for protection against SAV 3 virus infection in Atlantic salmon.

Pre smolt of Atlantic salmon was given an intramuscular injection with a DNA plasmid vaccine coding for the structural polyproteins C-E23-E2-K6-E1, or an intraperitoneal injection with a commercial inactivated whole virus vaccine (AlphaJ) with Salmonid Pancreas Disease Virus ALV 405. A group of pre smolt was injected with a combination of two types of cytostatic drugs, erlotinib and sunitinib. The different pre smolt groups were infected with SAV 3 with intraperitoneal injection, and samples were harvested at 2 , 4 and 6 wpc.

In this study the inactivated whole virus vaccine gave the lowest score in terms of histopathologic changes of the heart and pancreas. This result is consistent with the real-time PCR results, in which the AlphaJ gave the lowest virus load at all sampling points of time. The real time PCR results also showed that the pre smolt injected with PBS (control group) had the highest elevation of gene expression of CD8 cells.

# Vedlegg

## Vedlegg 1: Behandlingsgrupper

Gruppenr./ Gruppenavn	Antall fisk	Dato for behandling	Behandling	Dato for uttak/ Antall fisk	Vevsprøver
1: Kontrollgruppe	30	-	-	Prøveuttak 1: 09.09.19  Prøveuttak 2: 23.09.19  Prøveuttak 3: 07.10.19	<i>10 fisk per uttak:</i>  <b>Formalin:</b> -Hjerte -Skjelett- muskel - Pankreas  <b>RNA-later:</b> -Hodenyre -Hjerte  <b>Medium:</b> - Hjerte  <b>Plasma</b>
2: Vaksinegruppe  Undegruppe:  a) DNA- plasmid b) Alpha Ject c) PBS  15 fisk i hver undergruppe	90 (2 kar á 45 fisk)	18. 06.19           26.08.19	<u>Vaksine:</u> 30 fisk: 10 microgram plasmid DNA intramuskulært   30 fisk: 0.1 ml Alpha Ject micro PD intraperitonealt   30 fisk: PBS (mengde) intraperitonealt  <u>Smitte:</u> SAV3 virus 105.5 TCID50 intraperitonealt	Prøveuttak 1: 09.09.19  Prøveuttak 2: 23.09.19  Prøveuttak 3: 07.10.19	<i>15 fisk per gang. (5 fisk fra hver under- gruppe):</i>  <b>Formalin:</b> -Hjerte -Skjelett- muskel - Pankreas  <b>RNA-later:</b> -Hodenyre -Hjerte  <b>Medium:</b> - Hjerte  <b>Plasma</b>
3: E/S + smitte-gruppe	30	23.08.19	<u>Cytostatika:</u> E/S i kombinasjon (10/30 µg/g levendevekt) intraperitonealt	Prøveuttak 1: 09.09.19  Prøveuttak 2: 23.09.19	<i>10 fisk per gang:</i>  <b>Formalin:</b> -Hjerte -Skjelett-



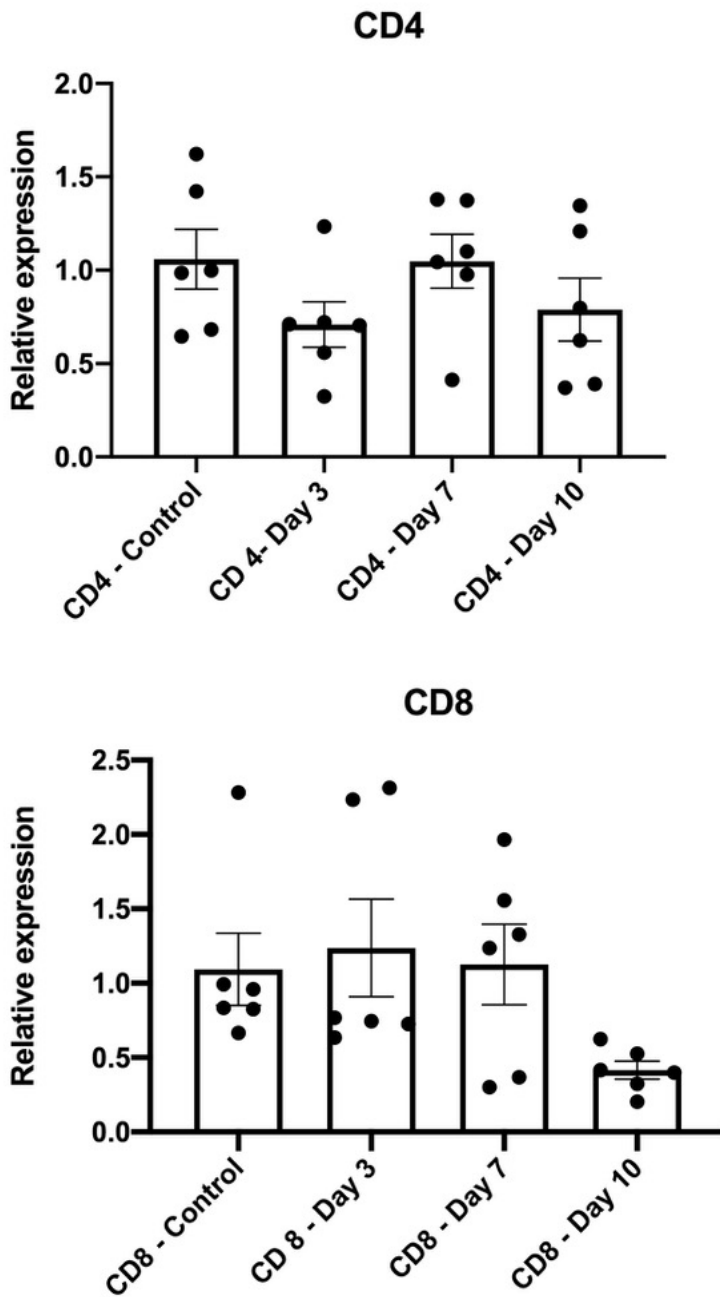
## Vedlegg 2: Klassifisering og gradering av histopatologiske forandringer

Scores	Heart – atrium	Heart ventricle	Epicard	Pancreas	Skeletal muscle
0-1.0	Focal infiltration of inflammatory cells; 1-2 foci. Higher scores with larger areas involved (>0.5).	Acute: Focal necrosis/apoptosis of myocytes (individual cells), up to 5 cells in each field (20x original mag.) Subacute/chronic: Focal/multifocal inflammatory changes (1-2 foci per field) including a few inflammatory cells (<5 per focus) with or without necrosis.	No obvious changes observed to multifocal to diffuse infiltration of inflammatory cells lifting the epicardial layer from the surface of the heart (few cell layers thick)	Necrosis / apoptosis of individual cells with/without focal infiltration of inflammatory cells around vascular structures and pancreatic ducts. Few (1-5) foci with necrosis (per field; x20). Regeneration: Regenerating exocrine pancreas with normal bridging between clusters.	Focal (<3 foci) necrosis of white muscle tissue and/or red muscle. Usually no inflammation
1.1-2.0	Focal infiltration of inflammatory cells; 2-5 foci. Higher scores with larger areas per foci (>1.5).	Acute: Multifocal necrosis, >5 and up to 10 per field at 20x magnification. Necrosis may be accompanied by infiltration of inflammatory cells, but usually mild and with few cells. Subacute to chronic: Multifocal inflammatory changes (>3 and <10 foci per field) with/without necrosis, with >5 inflammatory cells per focus, areas with diffuse inflammation.	Diffuse infiltration of inflammatory cells (mononuclear) 5-10 cell layers thick in most of the epicard present.	<u>Focal to diffuse</u> infiltration of inflammatory cells around vascular structures and pancreatic ducts/exocrine pancreas. Exocrine tissue present but with focal to diffuse necrosis and areas of loss of structure/cellular integrity. Regeneration: Small regenerating foci, 5-10 in the entire pancreas, with bridging between foci/clusters.	Multifocal necrosis (>3) of white muscle tissue and/or involvement of red muscle with focal to multifocal distribution of necrosis and/or inflammation.
2.1-3.0	Focal infiltration of inflammatory cells; >5 foci developing into diffuse changes (inflammation and/or necrosis). Diffuse changes (score>2.5).	Acute: Multifocal necrosis >10 per field at 20x magnification to diffuse changes, accompanied by moderate to strong infiltration of inflammatory cells. Distinct endothelial hyperplasia. Subacute to chronic: Diffuse inflammatory changes with/without necrosis (score>2.5).	Diffuse infiltration of inflammatory cells (mononuclear) >10 cell layers thick in most of the epicard present. Increasing thickness and area involved gives higher scores.	Infiltration of lymphocytic cells varies, typically multifocal, scattered to diffuse. Diffuse loss of exocrine pancreas can go without inflammation. Lesser exocrine pancreas present gives higher scores. Remnants (islets) of exocrine pancreatic tissue still with bridging between islets (score 2.0-2.5). Remnants (islets) of exocrine pancreatic tissue around vascular structures (score >2.5). No intact exocrine tissue with/without inflammation (score =3). Regeneration: Small regenerating foci around vascular structures, 2-5 in the entire pancreas.	Multifocal necrosis (>5) of white muscle tissue and/or red muscle. Multifocal to diffuse inflammatory pattern. Diffuse pattern score>2.5.

### Vedlegg 3

Uttrykk av CD4 og CD8 i nyre ved ulike tidspunkt etter injeksjon av E/S hos atlantisk laks.

Det er ingen forskjell for CD4, men for CD8 er det en signifikant reduksjon 10 dager etter injeksjon.





Norges miljø- og  
biovitenskapelige  
universitet

Postboks 5003  
NO-1432 Ås  
67 23 00 00  
[www.nmbu.no](http://www.nmbu.no)