

Studier af værtsspecificiteten hos *Gyrodactylus* på salmonider

herunder

lektin-carbohydrat interaktioner mellem *Gyrodactylus* parasitter og salmonider

og

statistisk vurdering af *Gyrodactylus*-infektioner på salmonider.



Thesis for the degree Master of Science in Fish Medicine

Steen Jørndrup



Institutt for fiskeri- og marinbiologi

Universitetet i Bergen

2003

Forord

Opgaven er skrevet for at opnå graden "Master of Science in Fish Medicine" ved Universitet i Bergen, Norge. Denne opgave er blevet til med støtte fra EU-projektet QLTR-2000-01631 (The genetic basis of Gyrodactylus salaris resistance in Atlantic salmon (Salmo salar)), som arbejder sammen med forkernetværket SCOFDA (Sustainable Control of Fish Diseases in Aquaculture). Opgaven er udført på Den kgl. Veterinær- og Landbohøjskole KVL, Institut for Veterinær Mikrobiologi, Sektion for fiske sygdomme, Frederiksberg, Danmark.

Jeg vil gerne takke for muligheden for at skrive min afsluttende opgave på KVL og for vejledning af forskningsrådsprofessor Kurt Buchmann på KVL. Desuden vil jeg gerne takke min interne vejleder professor Heidrun Wergeland for hele vejen igennem at arbejde for og støtte mit valg af ekstern uddannelsesinstitution på trods af de vanskeligheder, som det har medført. Tak til Michael Dalgaard, Thomas Bjerre Larsen og Kurt Buchmann for lån af datamateriale til statistiske beregningsforsøg. Tak til lektor Annette Kjær Ersbøll, KVL for vejledning og hjælp ved statistiske problemer.

Tak til min familie og specielt til min kæreste Rikke, som har været en stor støtte og hjælp igennem hele opgavens tilblivelse.

Steen Jørndrup

Forside: Gyrodactylus derjavini med lektinet Con A bundet til overfladen.

STUDIER AF VÆRTSSPECIFICITETEN HOS <i>GYRODACTYLUS</i> PÅ SALMONIDER HERUNDER LEKTIN-CARBOHYDRAT INTERAKTIONER MELLEML <i>GYRODACTYLUS</i> PARASITTER OG SALMONIDER OG STATISTISK VURDERING AF <i>GYRODACTYLUS</i>- INFEKTIONER PÅ SALMONIDER.	5
SAMMENDRAG.....	6
1. KOMMENTARER TIL OPGAENS OPBYGNING.....	7
2. INDLEDNING.....	7
3 LAKS, BÆKØRRED OG REGNBUEØRRED	9
3.1 Atlantisk og baltisk laks (<i>Salmo salar</i> L. 1758).....	9
3.1.1 Østersøens udvikling efter sidste istid.....	9
3.1.2 Østlig eller vestlig kolonisering af Østersøen?	11
3.1.3 Forskelle i modtagelighed over for <i>G. salaris</i> mellem baltiske og atlantiske laks.....	13
3.2 Bækørred <i>Salmo trutta</i> L.	14
3.3 Regnbueørred <i>Oncorhynchus mykiss</i> (Walbaum.).....	16
4. <i>GYRODACTYLUS SALARIS</i> OG <i>GYRODACTYLUS DERJAVINI</i>.	17
4.1 Klassifikation og morfologi.....	17
4.2 Værter	19
4.3 Vært-parasit co-evolution	19
5. LEKTINER OG SUKKERKODEN.....	20
5.1 Hvad er lektiner?.....	20
5.2 Glykoproteiner, glykolipider, sukkerkoden og glykosylering	21
5.3 Lektiners organisering og funktion.....	26
6. KOMPLEMENTAKTIVERING OG DET MEDFØDTE IMMUNFORSVAR HOS FISK 33	
6.1 Lektin komplementaktivering.....	33
6.2 Fiskens immunmekanismer i huden.....	38
6.2.1 Fiskens mulighed for at genkende parasitten og bekæmpe den	38
7. STATISTISK TEORI.....	40

7.1 Fordelinger i parasitforsøg.....	40
7.2.1 Nonparametriske overlevelsesanalyser.....	43
7.2.2 Semiparametriske overlevelsesanalyser.....	44
7.2.3 Parametriske overlevelsesanalyser.....	45
8. MÅLSÆTNING MED FORSØGENE	46
9. MATERIALER OG METODER	47
9.1 Forsøgsoversigt.....	47
9.1.1 Laboratorieforsøg.....	47
9.1.2 Statistiske metoder og beregningsforsøg:	47
9.2 Laboratorieforsøg	48
9.2.1 Kompetitiv hæmning af lektin med plasma- og hudprøver.....	48
9.2.2 Bestemmelse af proteinkoncentration (BCA-metode):	52
9.2.3 Binding af lektin til overfladen af <i>G. derjavini</i> og <i>G. salaris</i>	53
9.3 Statistiske metoder og beregningsforsøg	54
10. RESULTATER	59
10.1 Resultater fra laboratorieforsøg	59
10.1.1 Resultater fra hæmning af lektiner med plasma- og hudprøver	59
10.1.2 Resultater fra lektinbinding til parasitter.....	62
10.2 Resultater fra beregningsforsøg	73
10.2.1 Resultater fra forsøg med nye deskriptive metoder.....	73
10.2.2 Resultater af generelle lineære modeller og GLM.....	75
10.2.3 Resultater af overlevelsesanalyser	76
11. DISKUSSION.....	78
11.1 Diskussion af laboratorieforsøg	78
11.1.1 Diskussion af kompetitiv hæmning af lektin med plasma- og hudprøver.....	78
11.1.2 Diskussion af lektinbinding til parasitter	82
11.2 Diskussion af beregningsforsøg.....	85
11.2.1 Diskussion af nye deskriptive metoder	85
11.2.2 Diskussion af generelle lineære modeller og GLM.....	86
11.2.3 Diskussion af overlevelsesanalyser.....	86
11.3 Sammenfattende diskussion og perspektivering	88
BILAG 1.....	FEJL! BOGMÆRKE ER IKKE DEFINERET.

Studier af værtsspecificiteten hos *Gyrodactylus* på salmonider herunder lektin-carbohydrat interaktioner mellem *Gyrodactylus* parasitter og salmonider og statistisk vurdering af *Gyrodactylus*-infektioner på salmonider.

Sammendrag

Forskellige baltiske og atlantiske stammer af atlantisk laks blev brugt i forsøgene til at belyse om lektin-carbohydrater interaktioner havde betydning for værtsspecificiteten og modtageligheden for specielt parasitten *Gyrodactylus salaris*.

Kommercielle peroxidasekonjugerede lektiner specifikke over for fem carbohydrater blev forsøgt hæmmet med hud og plasmaprøver fra stammer af uinficerede atlantisk laks og *S. trutta*. En enkelt forskel blev observeret ved brug af *Triticum vulgare*-lektinet med primærspecificitet over for β -D-GalNAc. Hudprøverne fra *S. trutta* viste sig at hæmme mere end både de baltiske og atlantiske laksestammer. Resultatet var generelt usikkert, da en del stoffer i de hæmmende hud- og plasmaprøver forventedes at interagere meget med de lektiner, som var undersøgelsens genstand. De kommercielle lektiner blev ydermere brugt til binding direkte på overfladen af *G. salaris* og *G. derjavini*, hvorefter visualisering af deres placering blev muliggjort ved brug af DAB (Diaminobenzidine-tetrahydrochloride D5905, Sigma) og H_2O_2 . En ny ordinal skala blev anvendt til at vurdere farveintensiteterne, og skalaen blev fundet velegnet til formålet. Resultaterne viste, at 3 ud af 4 lektiner bandt sig mest til *G. derjavini*, og at bindingen ved flere lektiner var stærkest til de cephaliske lober.

Disse resultater kunne sammen med resultaterne fra hæmningsforsøget ikke forklare værtsspecificitet og mulige sammenhænge i modtagelighed ud fra en lektin-carbohydrat interaktion.

Beregningsforsøg med data fra et parasitinfektionsforsøg (se bilag 1) blev brugt som datagrundlag. Dette blev gjort for at vise fordelene ved generaliserede lineære modeller GLM over tid med en underliggende negativ binomialfordeling frem for nonparametriske test. Beregningerne viste, at GLM var yderst anvendelige og kunne medtage co-variable i modellen, såsom effekt af flere kar. Beregningsforsøg fra samme datamateriale blev brugt til at vise fordelene ved Cox proportionale risiko model (semiparametrisk) frem for de nonparametriske test såsom X^2 -test og Fishers eksakte test. Beregningerne viste, at det var lettere ved brug af de semiparametriske modeller at få signifikante forskelle mellem overlevelseskurver end ved brugen af Fishers eksakte test. Effekten af kar var mulig at medregne i den semiparametriske model, hvilket ikke var tilfældet ved Fisher eksakte test.

Beregningsforsøgene viste generelt, at de var bedre til at medtage co-variable og øge forklaringsgraden af de biologiske sammenhænge.

1. Kommentarer til opgavens opbygning

Opgaven er efter endt forsøgsbehandling blevet disponeret således, at der er lagt mest vægt på teori om lektiner og carbohydrater samt et stort afsnit om statistisk teori og beregningsforsøg.

Diskussionen er relativ kort, da flere teoretiske aspekter kun vil blive behandlet i baggrundsafsnittene. Dette skyldes en vurdering af at diskussionen i flere tilfælde ville blive yderst spekulativ, hvis teori og forsøgsresultater skulle kædes yderligere sammen og diskuteres.

2. Indledning

Alle laksefisk har parasitter, nogle er mere artspecifikke end andre, men kendetegnet for dem alle er, at vært og parasit i en grad er blevet påvirket af hinanden. Denne vært-parasit co-evolution har foregået mellem *Gyrodactylus* arter og deres værter. I denne hovedfagsrapport er der blevet fokuseret på parasitterne *Gyrodactylus salaris* og *Gyrodactylus derjavini* samt deres værter, som er laksen *Salmo salar* og bækørreden *Salmo trutta*. Undersøgelser er blevet udført for at klarlægge om forskelligheden i modtagelighed skyldes lektin-carbohydrat interaktioner. Lektiner og carbohydrater har i stadig stigende grad vakt forskeres interesse, specielt mht. den diversitet, der findes i carbohydraters konformation og den mulighed, det giver organismer til at skelne mellem egne celler og fremmede celler.

Baggrunden for opgavens emne er, at *G. salaris* har forårsaget en massiv dødelighed af atlantisk laks i mere end 40 elve i Norge. I Norge har man uden det store held forsøgt at bekæmpe denne parasit i elvene, siden den blev indført ved transport af inficerede fisk, som sandsynligvis stammede fra Sverige (Mo *et al.* 1999). For at bekæmpe denne parasit må man derfor søge til nye midler, såsom at forstå hvorfor nogle stammer er mere eller mindre modtagelige overfor parasitten end andre. Det er oplagt at se på sammensætningen og typen af det immunrespons, som fisken responderer med overfor parasitten. En anden mulighed er at se på en nært beslægtet art af *G. salaris* og dens værter. En nært beslægtet art af *G. salaris* er parasitten *G. derjavini*, som bl.a. har bækørred og regnbueørred som vært (Buchmann & Uldal 1997). Bækørred er udover at være vært for en nært beslægtet *Gyrodactylus*, muligvis den nærmest beslægtede med atlantisk laks. Regnbueørred er ikke den naturlige vært, men parasitten overlever og giver problemer i danske dambrug (Mo *et al.* 1999). Regnbueørreden er ikke nært beslægtet med bækørred og atlantisk laks, men megen information foreligger om regnbueørredens association til *G. derjavini* og om dens

immunforsvar. Det er med udgangspunkt i modtageligheder mellem de enkelte parasitarter og værter og værternes immunforsvar, at det vil forsøges i denne opgave at skabe et billede af, hvorvidt lektiner og carbohydrater spiller en rolle i vært-parasit interaktioner.

Rådata, som bliver brugt i beregningseksemplerne, blev venligst udlånt af Michael Back Dalgaard, Thomas Bjerre Larsen og Kurt Buchmann fra Den Kgl. Veterinær- og Landbohøjskole, Frederiksberg, Danmark. Citeringen af denne opgaves behandling og konklusioner baseret på disse data, kan kun foretages efter skriftlig tilladelse fra de tre ovennævnte personer (se bilag 1). Beregningseksemplerne er hovedsageligt blevet brugt til at belyse anvendelse af avancerede analysemetoder indenfor dette forskningsfelt og til at sammenligne dem med nuværende ofte anvendte analysemetoder.

Ved databehandling af parasitinfektion er det vigtigt at forholde sig til fordelingsmønstre, som sjældent er normalfordelte, selvom man har logaritmisk transformerede data (Crofton 1971; Wilson & Grenfell 1997). Den negative binomialfordeling er som oftest mere passende for makroparasit populationer end poissonfordelingen (Shaw *et al.* 1998). Infektionsniveauet i et cohabiteringsforsøg er vanskeligt at forholde sig til. Det skyldes primært de mange interaktioner, som man ikke har mål for. Det kan for eksempel være parasitpopulationens tilvækst på de enkelte fiskearter og -stammer eller migrationsrater og -retning fra såvel døde som levende fisk. Derfor er det kun muligt at se på parasitintensiteten ud fra de empiriske oplysninger, som er noteret ved tællingerne. Generaliserede lineære modeller GLM kan bruges i sådanne tilfælde til bedre at teste hypoteser om forskelle i data, hvor man har en negativ binomialfordeling og flere variable, som med fordel kan behandles i en og samme model (Wilson & Grenfell 1997). Ved dødeligheds- eller overlevelsesdata for de enkelte fiskearter og -stammer kan man med fordel udnytte, at man har gentagne målinger. Med både non- og semiparametriske overlevelsesmodeller kan man lettere vise forskelle over tid end ved at sammenligne værdierne ved forsøgets afslutning, som for eksempel vha. en Fishers eksakte test eller en X^2 -test.

3 Laks, bækørred og regnbueørred

3.1 Atlantisk og baltisk laks (*Salmo salar* L. 1758)

I forsøgene blev der bl.a. anvendt laks *Salmo salar* både af atlantisk og baltisk afstamning. Grunden til, at disse arter er interessante, er forholdet omkring deres modtagelighed overfor parasitten *Gyrodactylus salaris*. Forsøg har vist at den baltiske laks var mindre modtagelig eller måske resistent overfor *G. salaris*, hvorimod atlantiske laks har vist sig mere modtagelig og ude af stand til at nedbringe byrden af parasitter (Cable *et al.* 2000).

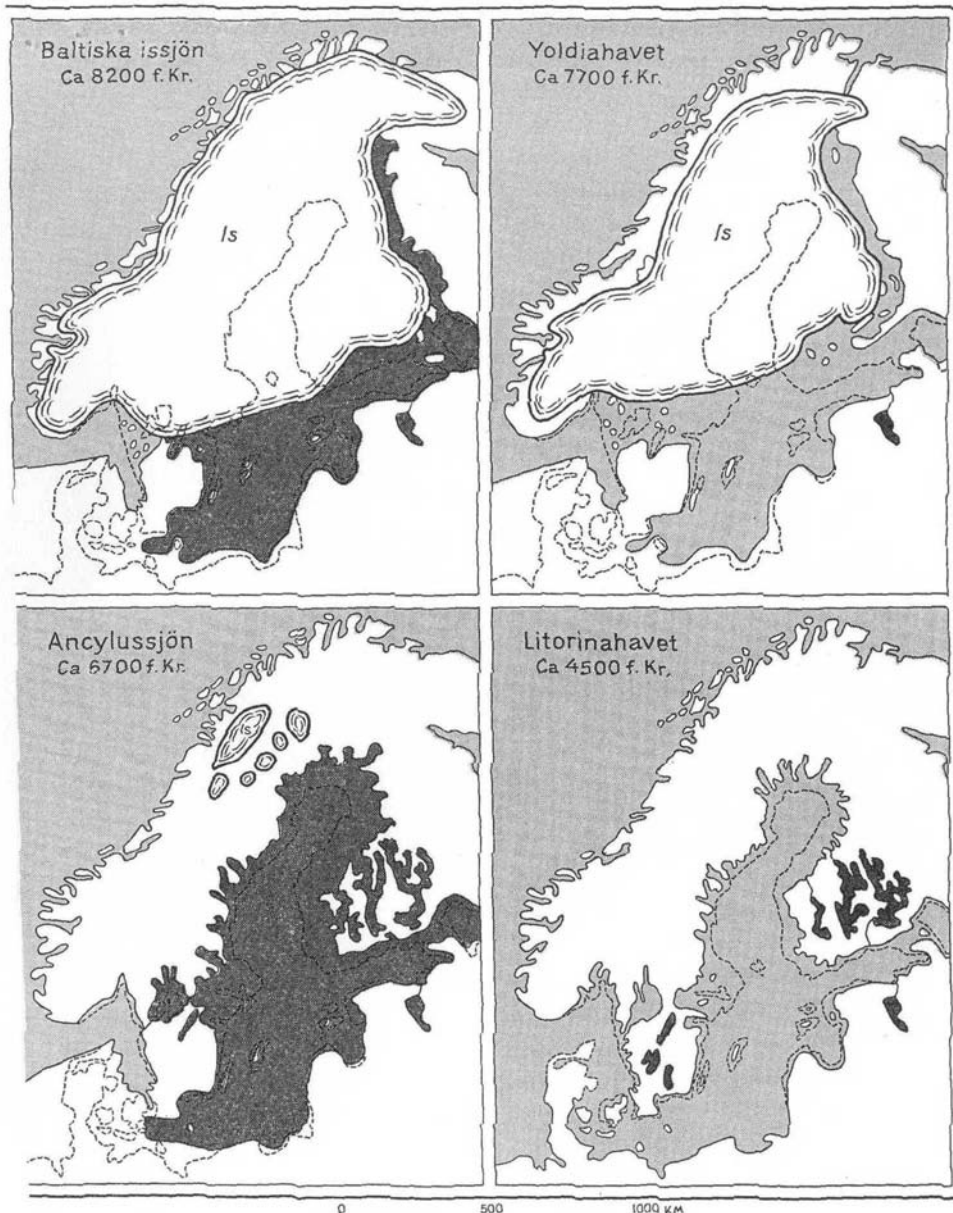
For at kunne forstå eller opstille en model for hvordan denne forskel i modtagelighed er opstået, må man se på udbredelsen af laks og specielt se på, hvordan de efter sidste istid koloniserede henholdsvis atlantiske og baltiske elve.

Laksens nuværende udbredelse strækker sig på den nordlige halvkugle fra Portugal i syd til Barentshavet i nord, fra Østersøen til den vestlige del af Atlanterhavet fra Virginia til Labrador i Nord Amerika (Nilsson *et al.* 2001).

Hvornår laksen kom til Østersøen eller om den levede i glaciale søer under istiden, er stadig til debat, men der er opsat forskellige teorier af henholdsvis Verspoor *et al.* (1999) og Kazakov & Titov (1991) for koloniseringsruter og reservoir for laksen under sidste istid.

3.1.1 Østersøens udvikling efter sidste istid

Efter sidste istid 12.000 til ca. 8.200 f.v.t. var Østersøen en indsø (Den Baltiske Issø) uden kontakt med Atlanterhavet (Lundegårdh *et al.* 1974) (se figur 1). Fra ca. 8.200 til 7.300 f.v.t. fandtes en forbindelse mellem Østersøen og Vesterhavet ved et sund lidt nord for Billingen i Sverige. Ved den lejlighed faldt indsøens vandstand 26 meter og fik herefter navnet Yoldiehavet, opkaldt efter saltvandmuslingen *Yoldia arctica* som indvandrede (Lundegårdh *et al.* 1974). Pga. af den kraftige landhævning efter at isen trak sig tilbage fra Skandinavien, tørrede sundet hurtigt ud, og Østersøen blev igen til en indsø efter blot 1000 år. Indsøens navn Ancylus stammer fra en ferskvandssnegl *Ancylus fluviatilis*, som er fundet i aflejringer fra den tid (Lundegårdh *et al.* 1974).



Figur 1 viser den postglaciale udvikling af Østersøen. Baltiske Issø (ca. 12. 000 til 8.200 f.v.t.), Yoldiahavet (ca. 8.200 til 7.300 f.v.t.), Ancylussøen (ca. 7.300 til 5.600 f.v.t.) og Littorinahavet (ca. 5.600 f.v.t. til i dag). Illustration: (Lundegårdh *et al.* 1974)

Ancylussøen eksisterede fra 7.300 til 5.600 f.v.t.. Undervejs steg vandstanden i indsøen så meget, at Danaelv opstod der, hvor Storebælt er i dag (Lundegårdh *et al.* 1974). Dræningen menes at have varet 1000 år, før havet igen tilførte Østersøen sit salte vand. Fra 4.500 f.v.t. til i dag har der været forbindelse mellem Kattegat og Østersøen gennem de danske stræder. Havet kaldes herefter for Littorinahavet efter strandsneglen *Littorina littorea*.

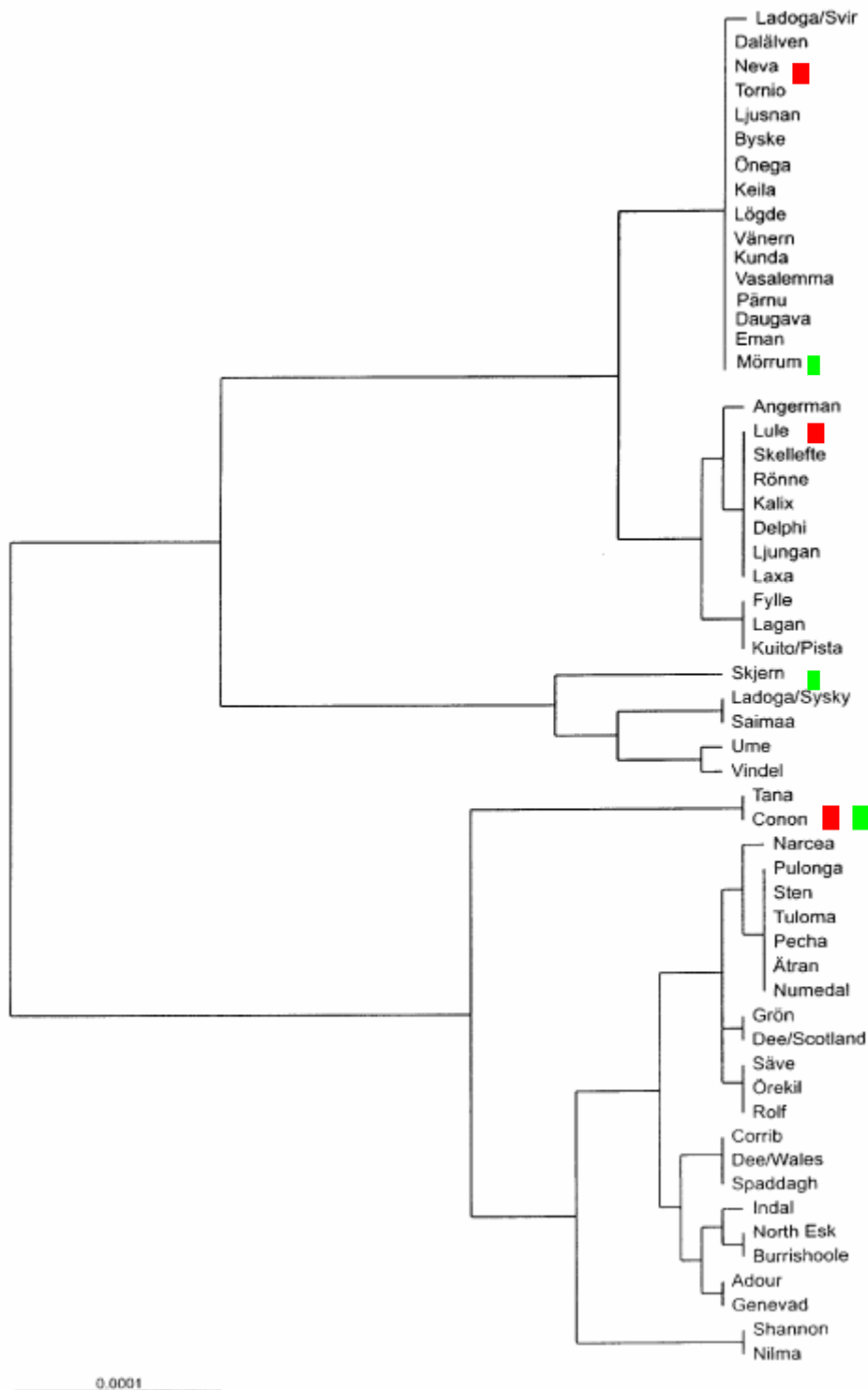
3.1.2 Østlig eller vestlig kolonisering af Østersøen?

For at forklare koloniseringsruter har flere forskere anvendt molekylærbiologiske metoder til at beskrive variationen mellem de forskellige stammer vha. mitocodrielle markører og isoenzymer (Nilsson *et al.* 2001; Kazakov & Titov 1991; Koljonen *et al.* 1999). Der er analyseret 46 stammer af atlantisk laks fra bl.a. atlantisk og baltisk oprindelse og opstillet et fylogenetisk stamtræ (se figur 2). Der er kun fundet 3 haplotyper af markøren i de baltiske stammer mod totalt op mod 15 haplotyper i alt i de europæiske stammer (Nilsson *et al.* 2001).

Der er opstillet en teori om kolonisation fra Atlanterhavet gennem sundet ved Billingen i tiden med Yoldiehavet for ca. 8.000 år f.v.t. (Verspoor *et al.* 1999). Denne teori forklares ud fra, at der kun er observeret tre haplotyper i de baltiske stammer, mens de selv samme haplotyper alle eksisterer i de atlantiske stammer. Årsagen til det lave antal haplotyper i de baltiske stammer forklares ved ”founder effect”, hvor få individer har fundet vej til Yoldiehavet med deres tilfældige udvalg af haplotyper. En anden årsag til lav variation kan være, at populationen har undergået en ”population bottleneck” (nedgang i variation, som er forårsaget af en pludselig nedgang i populationsdensitet) (Nilsson *et al.* 2001). En pludselig nedgang i populationen kunne skyldes de forhold, som var til stede efter at sundet ved Billingen lukkede og Yoldiehavet igen blev til en fersk indsø. Muligheden for at opretholde stammer blev vanskeliggjort af mangel på føde og vandringer, da man må forvente, at flere af stammerne, mens sundet stadig var åbent, vandrede ud i det mere føderige Atlanterhav. Efter Østersøen brød igennem ved Dana elv, er fordelingen af haplotyper blevet forklaret ved, at få eller ingen laks af atlantisk afstamning fandt vej til Østersøen og dermed kunne øge den genetiske variation med deres haplotyper. Der er kun i ringe grad set udvandring af f.eks. laks fra Lule Elv gennem de danske stræder (Christensen & Larsson 1979). Den lave udvandring sættes af Verspoor *et al.* (1999) i forbindelse med vandringsmønstre for laksene fanget i Ancylussøen. Laksene formodes at have bibeholdt deres vandringsmønstre efter åbningen af Danaelv og frem til i dag (Christensen & Larsson 1979).

En østlig kolonisering fra en glacial issø under sidste istid er en mulighed, som Koljonen *et al.* (1999) og Kazakov & Titov (1991) diskuterer. Grunden er, at Koljonen *et al.* (1999) fandt en signifikant genetisk forskel mellem sydlige og nordlige Østersøstammer. Den sydlige stamme skulle oprinde fra en østlig glacial issø, mens den nordlige stamme skulle oprinde fra en blanding mellem østlige glacielle stammer og indvandrede atlantiske stammer. Samme forskel i haplotyper fandt Nilsson *et al.* (2001) i deres studier mellem sydlige og nordlige stammer. Forholdene omkring

koloniseringen af Østersøen er endnu ikke endegyldigt løst, men de skal tages med i betragtning, når man ser på modtageligheden af *G. salaris* for baltiske contra atlantiske stammer af laks.



Figur 2 viser et fylogenetisk træ over slægtskabet mellem stammerne af atlantisk laks. Stammerne, som er brugt i opgavens forsøg, er markeret med rødt, mens stammer brugt i statistisk beregning af modtagelighed er markeret med grønt. Illustration: (Nilsson *et al.* 2001).

Andre fiskearter menes at have koloniseret Østersøen fra glaciære issøer mod øst, før forbindelse til Atlanterhavet blev skabt, deriblandt stalling (*Thymallus thymallus* L. 1758) og aborre *Perca fluviatilis* L. 1758 (Nilsson *et al.* 2001).

3.1.3 Forskelle i modtagelighed over for *G. salaris* mellem baltiske og atlantiske laks

Klassificeringen af fisk i grupper efter modtagelig, responderende og medfødt resistens bliver i opgaven brugt på samme måde som foreslået af Bakke *et al.* (2002).

Modtagelig: Parasitens population vokser indtil fisken dør (afhængig af alder og størrelse) bærende op til tusinder af individer.

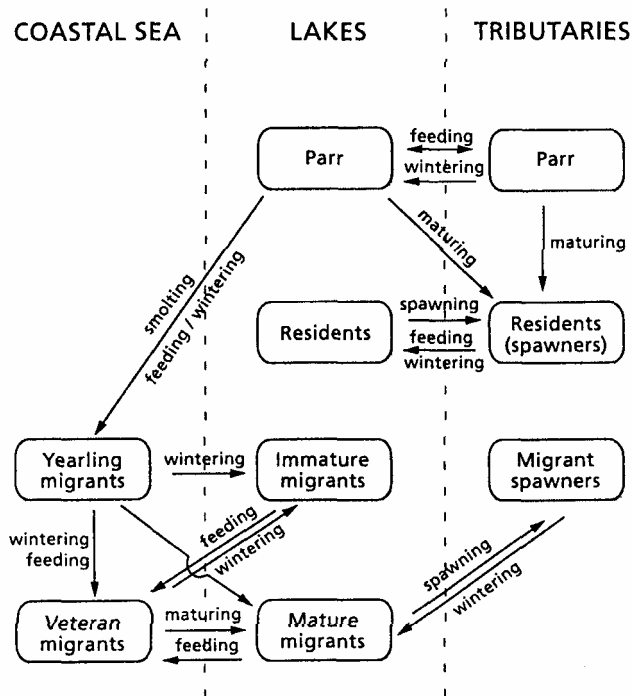
Responderende: Delvis modtagelige, er i stand til at mobilisere et immunrespons. Parasitpopulationen vokser i starten, men væksten falder efter flere måneder, hvorefter infektionen ikke er dødelig og muligvis vil forsvinde helt.

Medfødt resistens: Population af parasitter vokser ikke. Infektionen kan forsvinde eller forsætte i flere måneder, men vil ikke vokse på noget tidspunkt.

Flere forsøg har sammenlignet stammer og arter af laksefisks modtagelighed over for *G. derjavini* og *G. salaris*. Et forsøg med norsk atlantisk laks fra Alta Elven og baltisk laks fra Neva Elven viste, at dødeligheden af parasitter var størst på Nevalaks (Cable *et al.* 2000). I samme forsøg var antallet af parasitfødsler på Nevalaks lavere og perioden til første fødsel var længere i forhold til de to norske laksestammer. Populationsudviklingen af *G. salaris* hos de to norske stammer fulgte en eksponentiel udvikling, mens *G. salaris* ikke kunne opretholde en population på Nevalaksen (Cable *et al.* 2000; Bakke *et al.* 1990). Et forsøg med sammenligning af laks fra Conon- og Lier Elven viste ingen forskel i modtagelighed, men der blev observeret store individuelle forskelle for både Conon og Lierelvelaks (Bakke & Mackenzie 1993). Forsøg med afkom fra en krydsning mellem medfødt resistente bækørreder og modtagelige atlantiske laks viste, at afkommet blev responderende (Bakke *et al.* 1999). Desuden viste de, at resistens/modtagelighed var under genetisk kontrol, og genetisk resistens måske kunne overføres med et eller flere gener. I et co-habiteringsforsøg, er det blevet vist, at regnbueørred har medfødt resistens over for *G. salaris*, mens atlantisk laks var modtagelige (Larsen 2003). Af de atlantiske laks i forsøget var Mørrumlaksen mindst modtagelig i forhold til Conon- og Skjern Ålaksen.

3.2 Bækørred *Salmo trutta* L.

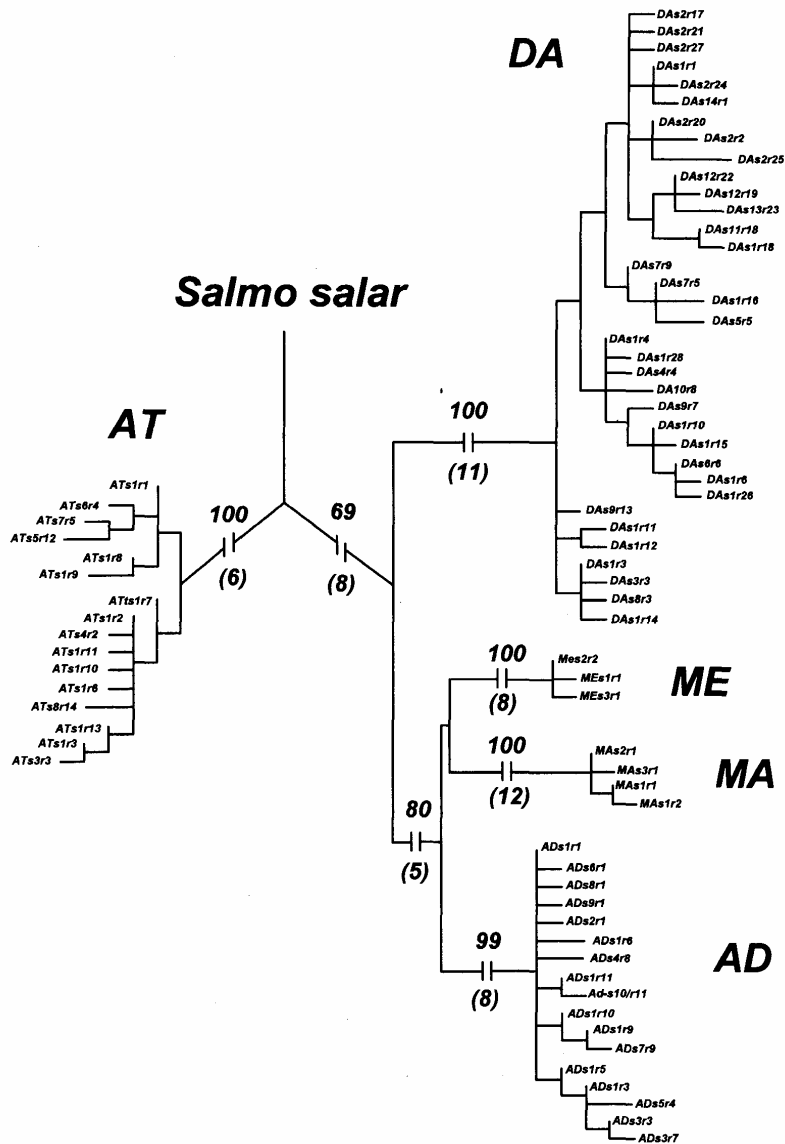
Bækørred stammer fra både Europa, Nordafrika og det vestlige Asien (Klemetsen *et al.* 2003). I Europa har den en nord-syd udbredelse fra Island, Nordskandinavien og Rusland til den nordlige kystlinie i Middelhavet. Øst-vest udbredelse fra Uralbjergene til samtlige vestlige europæiske kyster. *S. trutta* findes både som anadrom og vandrende indenfor ferske vande (Klemetsen *et al.* 2003) (se figur 3).



Figur 3 viser vandringmønstre for *S. trutta*. *S. trutta* findes både som anadrom og vandrende mellem søer og bifloder. Illustration: (Klemetsen *et al.* 2003).

Mange forskellige underarter af *S. trutta* er beskrevet, men overordnet stammer de alle fra 5 store grupper, som er opstået efter geografisk adskillelse (Bernatchez 2001). Desuden er re-kolonisering af den skandinaviske halvø efter den sidste istid uvis. Undersøgelser viser dog, at alle stammer i Nordeuropa falder ind under den samme undergruppe af *S. trutta* (den atlantiske stamme, AT) (Bernatchez 2001). Om den stamme af *S. trutta*, som benyttes til forsøg i denne opgave, er af AT oprindelse vides ikke, men da ingen anden stamme er udbredt i og omkring Danmark, antages det, at den tilhører AT. AT-stammen kunne være den af de fem undergrupper af *S. trutta*, som har størst slægtskab med den atlantiske laks. Antagelsen bygger på udskillelse fra en fælles stamfader med den atlantiske laks (Giuffra *et al.* 1994) (figur 4). Derudover har AT-stammen af *S. trutta* og

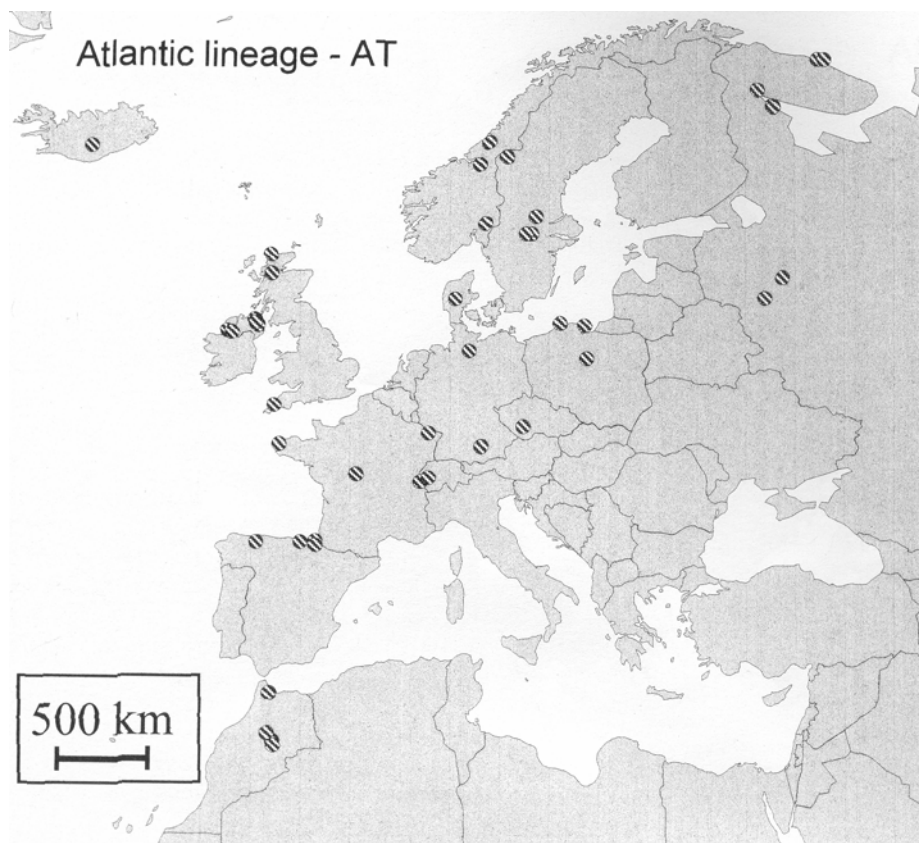
atlantisk laks meget overlappende udbredelse. Årsagen til udskillelsen har været en anden faktor end geografisk adskillelse.



Figur 4 viser et konsensustræ baseret på maksimum-sparsommeligheds-analyse (eng. maximum parsimony) af mitochondrial DNAs evolution af 5 større linier hos *S. trutta*. Roden er sat til at være *S. salar*. Boottrap-værdierne er i procent og i parentes er angivet antallet af unikke apomorphies for hver linie af *S. trutta*. Illustration: (Bernatchez 2001).

På figur 5 ses, at AT-stammen har en udbredelse, der er meget lig med den, som blev beskrevet for Atlantisk laks i afsnit 3.1. Dette styrker en hypotese om, at undersøgelser af *S. truttas* modtagelighed overfor *Gyrodactylus* kan forklare forskellen i modtagelig hos baltiske og atlantiske stammer af atlantisk laks, hvis baltiske laks har lektiner, carbohydratstrukturer og modtagelighed overfor *G. salaris* sammenfaldende med *S. trutta* og de baltiske laks.

S. trutta er modtagelig overfor *G. derjavini*, som er fundet både i Norge, Sverige og Danmark i opdræt og på vildfisk (Mo *et al.* 1999).



Figur 5 viser udbredelsen af den atlantiske stamme (AT) af *S. trutta*.

Det har det vist sig, at *G. salaris* ikke er i stand til at reproducere sig på *S. trutta* (Bakke *et al.* 1999). Den er ikke blevet fundet på *S. trutta*, selvom disse gik i opdræt sammen med lettere inficerede baltiske laks i Finland (RintamakiKinnunen & Valtonen 1996).

3.3 Regnbueørred *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum.)

Regnbueørred er oprindelig af nordamerikansk oprindelse. Flytning af regnbueørred pga. dens potentiale som opdrætsart har spredt den til store dele af verden deriblandt Europa. Regnbueørred har formeret sig naturligt i Norge (Holm 1999), men ses oftest som fisk rømt fra opdrætsanlæg i både ferskvand og hav. Regnbueørred hører til slægten *Oncorhynchus*, og slægten ligger under familien *Salmonidae*, hvor under slægten *Salmo* også hører.

Regnbueørred er, som tidligere nævnt, taget med i opgaven pga. den viden man har om dens immunforsvar og modtagelighed overfor både *G. salaris* og *G. derjavini*.

4. *Gyrodactylus salaris* og *Gyrodactylus derjavini*.

4.1 Klassifikation og morfologi

Følgende klassifikation af *Gyrodactylus*-arterne er foreslået af Lebedev (1988).

Phylum – Plathyhelminthes

Klasse – Monogenea Carus, 1863

Underklasse – Monopisthocotylea Odhner, 1912

Orden – Gyrodactylidea Bykowsky, 1937

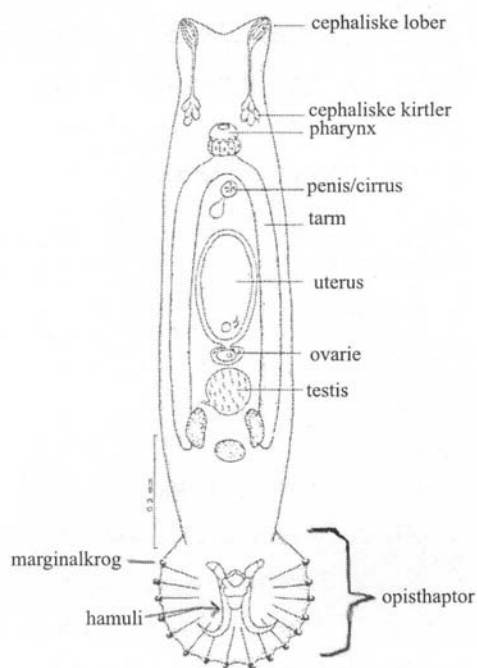
Familie – Gyrodactylidae Van Beneden & Hesse, 1863

Slægt – *Gyrodactylus* Von Nordman, 1932

Art – *Gyrodactylus salaris* Malmberg, 1957

– *Gyrodactylus derjavini* Mikalow, 1975

G. salaris og *G. derjavini* er begge små ekto-parasitter på 0.5 til 1.0 mm. De lever begge på huden af fisk, og har et dertil indrettet opisthaptor til at hæfte sig med (Malmberg 1993) (se figur 6). Når parasitterne sidder på fiskens hud er opisthaptoren med to hamuli og 16 marginalkroge i kontakt med fiskens overflade. Desuden kommer cephaliske loper samt pharynx i forbindelse med fiskens overflade ved vandring, fødesøgning og fødeoptag. Overfladen af parasitten (tegumentet) må ved sine bevægelser også komme i berøring med fiskens overflade. Det antages, at disse kontaktflader umiddelbart har mulighed for at blive genkendt af fiskens immunforsvar.



Figur 6 viser en *Gyrodactylus* sp. med hamuli og cephaliske lober, som sammen med tegumentet bliver vurderet i forsøgene med binding af lektiner til parasitter. Illustration efter Malmberg.

I forsøgene med binding af lektin til overfladerne på henholdsvis *G. salaris* og *G. derjavini* senere i opgaven er disse områder blevet observeret med undtagelse af pharynx, som ikke var muligt at observere. Hamuli blev ydermere inddelt og observeret i øvre og nedre del, da den nedre del ville være mest i kontakt med fiskens overflade. Hamuli ligger i en skede, og det er den lektinerne binder sig til i forsøgene.

Til at skelne arterne bruges morfologiske forskelligheder ved hamuli og marginalkroge (Malmberg 1993) eller molekylærbiologiske teknikker, som genetisk kan skelne arterne (Cunningham *et al.* 1995). Ingen af de morfologiske forskelle hos *G. salaris* og *G. derjavini* kan umiddelbart sættes i forbindelse med forskelle i modtagelighed hos atlantisk laks og *S. trutta*.

Studier af Buchmann (1998a) om binding af lektin til *G. derjavini* viste, at et mannose specifikt lektin bandt sig kraftigt til de cephaliske lober og svagt til tegumentet. I samme forsøg fandt man, at komplementproteinet C3 hos regnbueørred bandt sig til selv samme strukturer og menes derfor at have betydning for den alternative komplementaktivering hos regnbueørred. Plasma og mucus fra laks og *S. trutta* er i forsøg blevet brugt til at dræbe *G. salaris*. Disse forsøg viste det samme som Buchmann (1998a); at alternativ komplementaktivering sandsynligvis var årsag til drabene frem for

en klassisk komplementaktivering (Harris *et al.* 1998). Hvorvidt det er lektiner, der initierer denne aktivering, er stadig uvist.

4.2 Værter

Begge *Gyrodactylus*-arter har en direkte livscyklus, hvilket betyder at den kun indbefatter en vært. *G. salaris* kan reproducere sig på laks, og atlantiske laks er primær vært. Under laboratorieforhold er det blevet påvist, at *G. salaris* blevet påvist infektion for flere andre laksefisk, heriblandt bækørred, regnbueørred, rødding *Salvelinus alpinus*, canadarødding *S. namaycush*, kildeørred *S. fontinalis* og stalling *Thymallus thymallus* (Malmberg 1993; Bakke *et al.* 2002). Skaller *Rutilus rutilus* og aborre *Perca fluviatilis* er hyppigt fundet i samme ferskvand som laksen, men på disse fisk kan *G. salaris* ikke reproducere sig (Malmberg 1993).

På basis af laboratorieforsøg konkluderede Bakke *et al.* (1991) at regnbueørred i naturen kunne være med til at overføre og sprede parasitten til andre fisk.

G. derjavini har primært *S. trutta* som vært, men er fundet i danske dambrug på regnbueørred, hvor den har forårsaget tab af fisk pga. gyrodactylosis. Desuden er den i opdræt fundet på laks, rødding og kildeørred i Sverige (Malmberg 1993; Malmberg & Malmberg 1993).

Forsøg med baltiske og atlantiske stammer af laks viste, at begge var mindre modtagelige overfor *G. derjavini* end regnbueørreden, samt at regnbueørred var mere modtagelig end *S. trutta* (Buchmann & Uldal 1997).

4.3 Vært-parasit co-evolution

Co-evolution er med til at give den værtsspecificitet vi ser i dag hos *G. salaris* og *G. derjavini* overfor deres primærværter laks og bækørred. Ved co-evolution menes, som foreslået af Overstreet (1998), ændringer i genotyper af to eller flere arter som en direkte konsekvens af arternes økologiske interaktion med hinanden. Denne definition giver god mening med hensyn til *Gyrodactylus*, da flere arter højst sandsynlig har været med til at udforme de variationer i modtagelighed/resistens, som vi ser i dag blandt laksefisk. Hvor hurtig den co-evolution foregår og hvorvidt den har været med til at danne resistente stammer af laks i Østersøen, ved man ikke. Hvis laks fra før sidste istid (110 000 år f.v.t.) og under sidste istid var isoleret sammen med parasitten, kunne resistensen være opstået der, hvilket i lyset af mutationsrater og selektionspres lyder rimeligt. En anden forklaring kan være, at det baltiske hav blev koloniseret vestfra af laks, mens Yoldiehavet eksisterede 8000 år f.v.t.. I det tilfælde vil co-evolutionen kun have virket på interaktionen mellem

arterne i 10 000 år, hvilket må betragtes som en relativ kort tid til at udvikle resistens. Der kan i dette tilfælde dog være tale om en ”founder-effekt”, hvor de laks, som fandt vej igennem til det baltiske hav tilfældigt havde en medfødt resistens. Denne forklaring halter lidt, da der ikke er fundet resistente stammer fra det atlantiske hav nu til dags, men ikke alle stammer fra den østlige del af det atlantiske hav er blevet undersøgt. Det faktum, at hverken *G. salaris* eller *G. derjavini* er 100 % artspecifikke, og at flere af laksefiskene har mere eller mindre modtagelige stammer, samt tvivlen om hvorfra den baltiske laks har koloniseret Østersøen, gør det svært at udrede forløbet af co-evolutionen. Krydsningsforsøg mellem laks og *S. trutta* tyder på, at resistensen ikke sidder på et enkelt gen, men at det sidder på få gener (Bakke *et al.* 1999). Disse gener kan være koblet til lektin-carbohydrat interaktioner.

Gyrodactylus-arterne har måske udviklet mekanismer for at undgå værternes immunforsvar. Sådanne mekanismer er blevet vist ved flere humanpatogene bakterier og parasitter, hvor de patogene organismer udnytter og efterligner humane cellers receptorer for lettere at inficere kroppen, og de undgår værternes immunforsvar ved at efterligne overfladen af disse celler (Cooper 1991). Dette kunne være tilfældet for *Gyrodactylus*, som ved at efterligne sin vært kunne skjule eller undgå dennes forsvar.

Ydermere kunne co-evolutionen have bidraget til at udvikle en form for afhængighed hos parasitter af bestemte værter og deres stofsammensætning i mucus og epitel, som *Gyrodactylus* lever af. Afhængigheden kunne for eksempel være, at parasitternes reproduktion først starter, når de rette stoffer er til stede i føden. Dette er blevet foreslået af Buchmann (1999).

Relativt få *Gyrodactylus sp*-stammer er indtil i dag blevet undersøgt, og variationen inden for *Gyrodactylus* arter kan måske variere betydeligt i virulens og patogenitet.

5. Lektiner og sukkerkoden

5.1 Hvad er lektiner?

Tidligere definerede man lektiner som proteiner, der kan binde sig til specifikke carbohydrater, men undtaget var antistoffer og proteiner med enzymatisk aktivitet. Efter den gamle definition ville en af verdens først opdagede lektiner, ricin ikke være noget lektin, da lektinet har RNA-N-glycosidaseaktivitet. Derfor blev man efterhånden nød til at ændre definitionen til et bredere begreb. I nutiden er definitionen, at lektiner er proteiner, som har evnen til at binde til specifikke

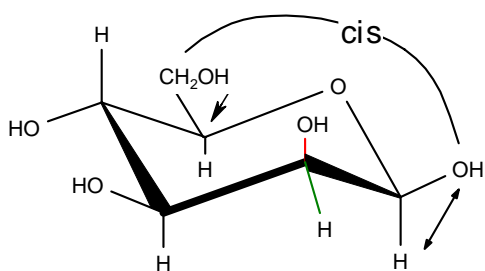
carbohydrater. Denne definition bliver generelt brugt i omtalen af lektiner (Teizo Fujita 2002; Ewart *et al.* 2001).

Forskningen brugte i starten primært lektiner til at agglutinere røde blodceller fra mennesker, og derved fik man mulighed for at bestemme, hvilken blodtype en person havde ud fra en ganske simpel test med oprensede lektiner fra planter. Systemet, som er kendt under ABO-blodtypesystemet, bruges stadig i dag til hurtig bestemmelse af blodtype hos mennesker.

I immunforsvaret er det mannosebindende-lektin MBL det mest undersøgte, og MBL er fundet hos mennesker, fugle, fisk og sækdyr (Teizo Fujita 2002).

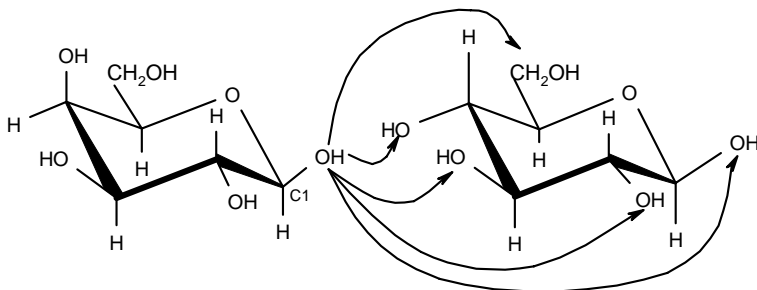
5.2 Glykoproteiner, glykolipider, sukkerkoden og glykosylering

Mono-, oligo- og polymere former af sakkarider kan gemme på en biologisk information, som med lethed kan overgå den information, der ligger i DNA. For at forstå hvordan denne diversitet kan opstå ud fra en gentaget relativ simpel grundstruktur (se figur 7), må man se på variationen i strukturens sidegrupper og forgreningsmuligheder. De mere komplicerede strukturer kan opstå, når flere ens eller forskellige monosakkarider bliver sat efter hinanden på et protein, derved navnet glykoprotein. Dette kaldes i celler for glykosyleringen og foregår bl.a. i endoplasmatisk reticulum ER (Janik *et al.* 2003). Strukturene, som kan dannes, kan være forgrenede, da bindinger mellem sakkarider kan finde sted mellem alle C atomer undtagen C₅ i sakkariders pyranoseform, som er vist ved en enkelt pil på figur 1.



Figur 7 viser stolkonformationen af mannose (α -D-mannopyranose). Sidegrupperne med henholdsvis grøn og rød linie er byttet om ved glukose (α -D-glucose). Vertikale sidegrupper i stolkonformationen repræsenterer aksiale sidegrupper, mens de resterende er ækvatoriale. Dobbelt-pilen viser, at hvis OH og H byttes fås β -D-mannopyranose, som er konformationel isomer af α -D-mannopyranose. α/β nomenklaturen kommer fra det *cis/trans* forhold, der er mellem de største sidegrupper, som sidder på henholdsvis C1 og C5. Hvis de største sidegrupper sidder på samme side af planen kaldes det *cis* (α), som tilfældet er på figur 1. D/L nomenklaturen henviser til det asymmetriske C₅ (enkelt-pilen), der følger nomenklaturreglerne for glyceraldehyd.

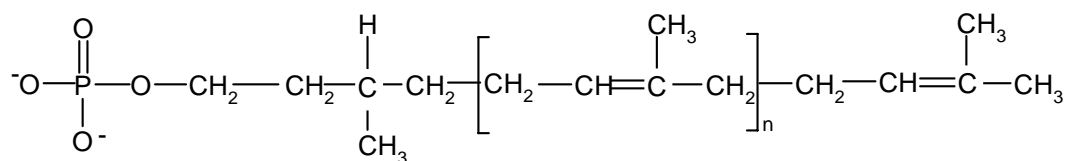
Et eksempel på binding mellem to monosakkarider, er vist på figur 8, som viser at D-galactose ved C₁ kan danne fem forskellige bindinger til β-D-glucose, hvorved H₂O bliver spaltet fra (Gabijs H.J. 2001).



Figur 8 viser, hvordan en del af diversiteten i oligosakkarider opstår. Her eksemplificeret ved at D-galactose ved C₁ kan danne fem forskellige bindinger til β-D-glucose. I dette eksempel dannes en β-binding mellem de to sakkarider. Illustration efter (Gabijs H.J. 2001).

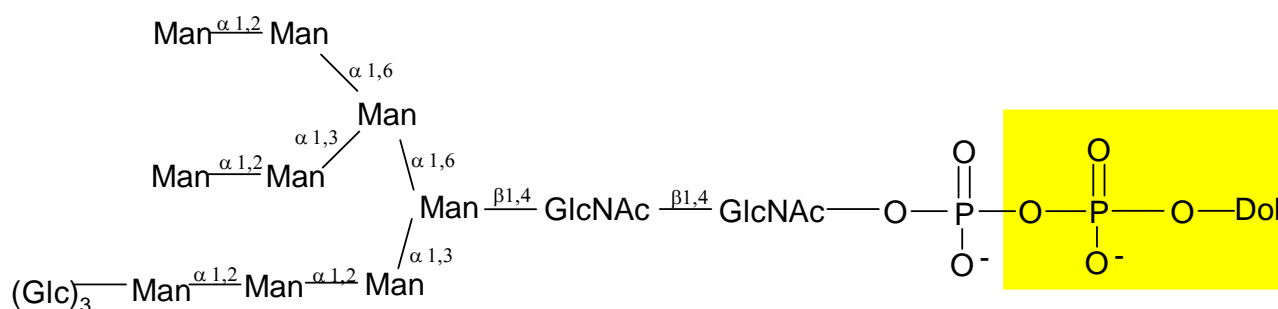
Mere end 35 000 tetrasakkarider kan blive dannet ud fra fire forskellige monosakkarider pga. variationen i bindingssteder, forgrening og udskiftning af sidegrupper (eks. sulfat og hydroxy) (Arason 1996). Til sammenligning danner de 4 nukleotider kun 24 forskellige codons, som derefter selvfølgelig kan danne mangfoldige proteiner, men de er låst af deres lineærstruktur. En forgrenet lille sukkerstruktur kan måske indeholde den samme signalværdi, som et langt større polypeptid. Carbohydraters unikke evne til at have biologiske funktioner er altid afhængig af, at mere komplekse proteiner kan genkende dem, og at de enzymer kan danne dem. Samlet vil proteiner og carbohydrater sikkert være med til at forklare mange biologiske mekanismer, som starter ved genkendelse af carbohydrater på overflader af celler.

Ved glykosylering bliver monosakkarider sat på ved hjælp fra f.eks. dolicholfosfat i ER. Dolicholfosfat er bærer af oligosakkarider til påsætning på voksende polypeptider i ER. Dolicholfosfat er et lipid, som består af 16-20 isoprene enheder (se figur 9).



Figur 9 viser lipidet dolicholfosfat som sætter carbohydrater på asparagin i glykosyleringen i ER. Klamme er sat omkring den isoprene enhed. Illustration efter (Stryer 1995b).

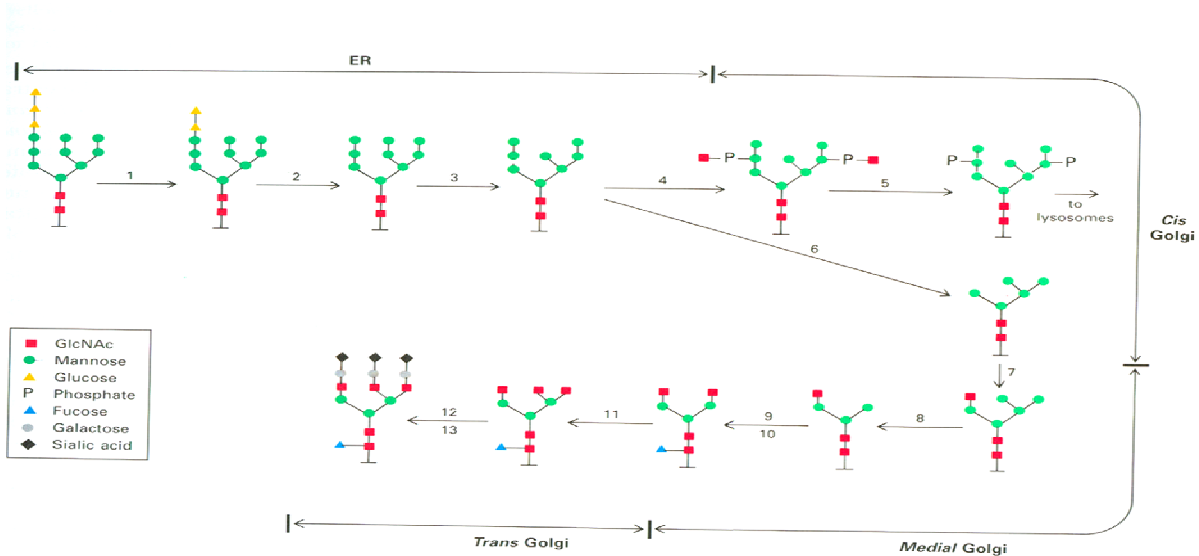
Den fulde sidekæde af oligosakkarider med dolicholfosfat (figur 10) bliver overført til et asparagin.



Figur 10 viser det aktiverede oligosakkarid med dolicholfosfatbæreren (gul). β 1,4 mellem de 2 GlcNAc tættest på dolicholfosfat angiver hvilken forbindelse, der er mellem de to sakkarider. I dette tilfælde er det en forbindelse mellem de to aksiale hydroxygrupper på henholdsvis C1 og C4 på de respektive GlcNAc. Illustration efter (Stryer 1995b).

Asparagin kan kun modtage oligosakkariderne, hvis den sidder i en Asp-X-Ser eller A-X-Thr sekvens, og hvis der sterisk er plads til transferasen (Stryer 1995b). Bindingen til asparagin er en N-glykosidbinding. N-glykosid binding forekommer ikke hos prokaryoter, de er udelukkende fundet hos deuterostomer (dyr med ægte coelom, radial kløvning af ægget og en blastopore, som bliver til anus) (Arason 1996). Efterfølgende bliver proteiner overført til golgi vha. transportvesikler. I golgi bliver proteinernes N-bundne oligosakkarider ændret og forarbejdet, og O-bundne sakkarider bliver sat på serin og threonin. For eksempel binder GalNAc til serins hydroxygruppe, deraf navnet O-bundne, hvorimod N-bundne binder sig til et N i asparagin.

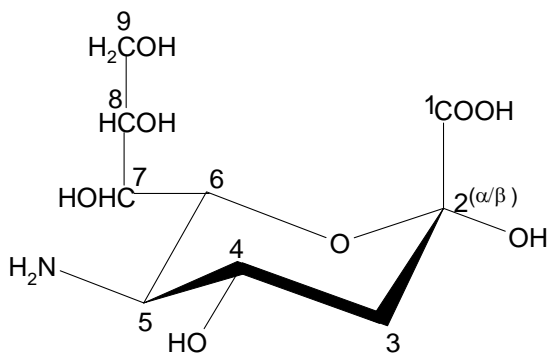
Sialinsyre bliver sat på i golgi, og sialinsyre sidder oftest uden på galactose (se figur 11). Figur 11 viser, at sammensætningen af enzymer i golgi er bestemmende for, hvorhen glykoproteinet bliver eksporteret. Forskelligheden af sammensætningen af enzymer i golgi i røde blodceller er årsagen til de forskellige blodtyper, man ser hos mennesker (Arason 1996).



Figur 11 viser hvordan et asparagin N-bundet oligosakkarid bliver ændret gennem ER og 3 afdelinger af golgi (*cis*, *medial* og *trans*). Destination af glycoproteinet afhænger af enzymer udtrykt i de forskellige celler. Tallene 1-13 angiver forskellige transferaser og glucosidaser, som styrer ændringen af oligosakkaridet (Goldberg & Kornfeld 1983).

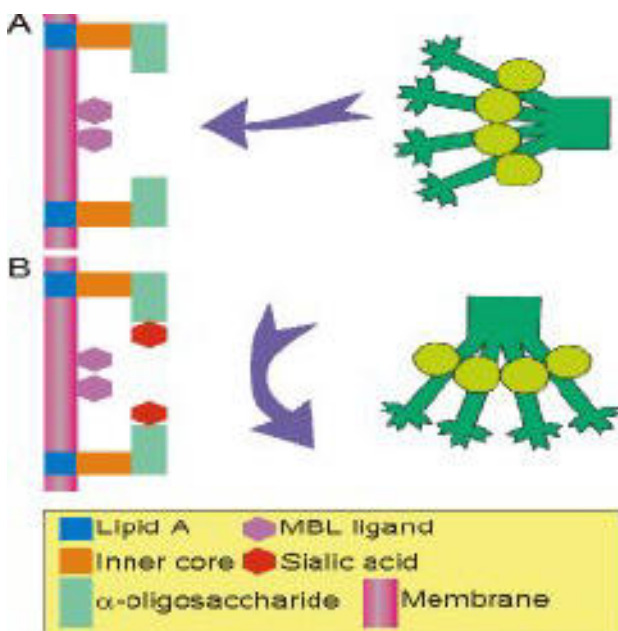
I højere vertebrater bliver glukose Glc, galactose Gal, mannose Man, fucose Fuc, N-acetylglucosamin GlcNAc, N-acetylgalactosamin GalNAc og N-acetylneuramin NeuNAc brugt som primære byggesten i glykosyleringen (Sharon 1984), mens lavere eukaryoter bruger zylose samt Fuc, GlcNAc, Man og Glc (Kornfeld & Kornfeld 1985).

Meget lidt forskning i glykosyleringen hos fisk er foretaget, det skyldes sandsynligvis det forhold, at det er yderst vanskeligt at dechifre sukkerkoden og de mange enzymer, som er med til at bestemme det endelige oligosakkarids form og dens destination som vist på figur 11. Der er opdaget flere forskelle mellem pattedyrs glykosylering og fisks. Bl.a. er albumin et glykoprotein hos *S. trutta*, mens det ikke er glykosyleret hos pattedyr (Metcalf *et al.* 1998). Betydningen af glykosyleringen af albumin er uvis.



Figur 12 viser et eksempel på sialinsyre også forkortet Sia eller Neu5Ac. Illustration efter www.glycores.ncifcrf.gov/mono/sialic.html.

Der er opdaget en høj andel af O-acetylering på N-bundne glykaner hos atlantisk laks, hvis andel af carbohydrater ikke er set højere andre steder i dyreriget (Ylonen *et al.* 2001). Disse forfattere fandt O-acetyleringer på to cystein proteinasehæmmere i hud fra atlantisk laks. O-acetylering bliver sat i forbindelse med forsvar mod mikroorganismer (Varki 1997). O-acetylering er kendt for at give delvis eller total beskyttelse mod sialidaser og for at maskere mulige fæstesteder på celler brugt af adskillige bakterier og vira (Varki 1992; Varki 1997).



Figur 13 viser hvordan en acetylering kan skjule mulig MBL ligand. Hvorvidt *Gyrodactylus* har MBL vides ikke. Illustration fra www.shef.ac.uk/dgm/fg/auii/people/dj.htm.

Om denne acetylering også kan beskytte helt eller delvis mod *Gyrodactylus* og dermed være en forklaring på værtspecificitet er ukendt (se figur 13). Figur 13 viser et tilfælde som kunne foregå

begge veje, parasitten kunne være acetyleret ligesom fisken kunne være det. Hvorvidt *Gyrodactylus* har MBL vides ikke, og det vides heller ikke i hvilken grad carbohydrater på *Gyrodactylus* er acetyleret. Eksemplet på figur 13 viser et MBL, som pga. acetyleringen sterisk forhindrer binding til mannose på overfladen. Derved vil en eventuel lektinaktivering af komplementsystemet ikke blive initieret. Hele denne problemstilling er ikke undersøgt, ej heller i forsøgene senere i rapporten. Det vil blive gennemgået i diskussion og fortolkning af resultaterne i denne opgave.

Nomenklaturen for sialinsyre (se figur 12) i organismer varierer meget, hvilket skyldes varierende struktur af sialinsyrer. I denne opgave vil sialinsyre hos både fisk, højere vertebrater end fisk og parasitter blive omtalt enten som N-acetyl-neuramin syre forkortet Neu5Ac eller sialinsyre forkortet Sia efter inddeling foreslået af Varki (1992).

Glykoproteiner danner sammen med glykolipider glykocalyx på overfladen af celler (Stryer 1995a). Der er hos regnbueørred påvist forskel i ultrastrukturer i glykocalyx ved forskellige celletyper i gælleepitelet (Powell *et al.* 1994). Disse strukturforskelle kan måske forklare noget af forskellen i smitteveje for både vira, bakterier og parasitter. Der vil ikke yderligere blive diskuteret specifikke relationer angående glykolipider i denne opgave, men blot gøres der opmærksom på deres tilstedeværelse og medvirken til dannelse af celleoverfladers glykocalyx.

5.3 Lektiners organisering og funktion

Tidligere blev lektiner organiseret efter deres monosakkarid-specificitet, men det betød at flere lektiner, som strukturelt intet havde med hinanden at gøre, blev sidestillet. I dag bliver lektiner karakteriseret efter deres strukturelle tilhørsforhold og dernæst efter deres specificitet over for en bestemt mono-, di- eller oligosakkarid (Arason 1996). Lektiner kan inddeles i mindst seks familier ved at sammenligne sekvenser af carbohydrat-genkendelsesdomænet (CRD, eng.: carbohydrate recognition domain); 1) bælgplantelektiner, 2) kornlektiner, 3) P-type lektiner, 4) S-type lektiner, 5) C-type lektiner og 6) pentraxiner (Arason 1996; Ewart *et al.* 2001; Ni & Tizard 1996). Kun de 4 sidste er fundet i metazoer indtil videre (Arason 1996). CRD er det område på lektinet, der bestemmer hvilken carbohydrat, lektinet har specificitet over for. Specificiteten er normalt bestemt af få aminosyrer i en sekvens, f.eks. giver sekvensen Glu-Pro-Asn indsat et specifikt sted i C-type lektiner specificitet over for mannose (Vitved *et al.* 2000).

Lektiner fra bælgplanter har ikke direkte betydning for interaktion mellem lektiner i fisk og carbohydrater på parasitter og omvendt, men de er værdifulde i forsøg, da det er muligt at oprense proteiner fra bælgplanter med kendt affinitet til en overkommelig pris.

Tabel 1 viser nogle af de vigtigste lektingrupper, antallet af CRD, Ca²⁺-afhængighed, disulfidbindinger og gruppernes specificitet over for carbohydrater. * og † har ingen betydning her. Illustration (Arason 1996).

	Subunits	Subunit MW (kDa)	CRDs per subunit*	Ca ²⁺ dependent	Disulphide bonds	Specificity
Legume lectins	2 or 4	25–30	1	+	–	diverse
Cereal lectins	2	18	2	–	++	GlcNAc, NeuAc
P-type lectins	1–4*	46 or 275	1 or 15	–	+	Man-6-P
S-type lectins	1 or 2	14–35	1 or 2	–	–	Gal
C-type lectins	variable	14–165†	1 or 8	+	+	diverse
Pentraxins	5 or 6	20–25	1	+	+	diverse

I forsøgene, som beskrives senere i denne hovedfagsopgave, er der blevet anvendt lektinerne concanavalin A Con A og ricin fra henholdsvis bælgplanterne *Canavalia ensiformes* og *Ricinus communis*. Con A er et udmærket eksempel på et lektin fra en bælgplante. Lektinet har fire underenheder, som tilsammen vejer 102 MW, og som har én CRD pr underenhed (produktinformation, Sigma L6397). Aktivitet af Con A er desuden Ca²⁺ afhængig og har affinitet overfor α -D-mannosyl og α -D-glucosyl (produktinformation, Sigma L6397). Endelsen -yl indikerer, at der er tale om endestillede carbohydrater på en sidekæde af et glykoprotein eller et glykolipid. Con A genkender carbohydrater på sidekæder. Con A's binding er afhængig af pH og danner en dimer ved pH under 5.6, tetramer ved pH mellem 5.6 og 7.0 og danner større aggregater ved pH over 7.0. Herved formindskes evnen til at binde carbohydrater (produktinformation, Sigma L6397) (egne ikke publicerede data).

Triticum vulgare, Tri er et eksempel på et kornlektin (brugt i forsøgene). Tri følger de i tabel 1 givne data ved at have 2 undergrupper, som tilsammen vejer 36 MW. Lektinet er ikke afhængig af Ca²⁺, men har affinitet over for GlcNAc (N-acetyl- β -D-glucosaminy), (GlcNAc)₂ (N-acetyl- β -D-glucosamin) og (GlcNAc)₃ (produktinformation, Sigma L3892). Det er blevet vist at (GlcNAc)₃, et vil sige tre på hinanden følgende GlcNAc, hæmmer *Triticum vulgare* 3000 gange mere end (GlcNAc)₁ (Allen *et al.* 1973). Dette er selvfølgelig forventeligt, da lektiner med udelukkende affinitet over for ét monosakkarid vil binde sig til et utal af proteiner. Derimod vil lektiner, der

danner mere komplicerede bindinger med flere sakkarider i forgrenede strukturer egne sig bedre, hvis lektinet skal virke som signaleringsmolekyle, og hvis diversiteten i lektin-carbohydrat interaktionen skal have en biologisk funktion. Ydermere kunne lektinet virke som opsonin.

P-type lektiner består af to undertyper; a) kation afhængig mannose 6-fosfat receptor er CD-MPR og b) insulin vækst faktor II/mannose 6-fosfat IGF-II/MPR (se figur 13) (Arason 1996). Disse lektiner er forskellige fra alle andre lektiner ved deres evne til at genkende fosforyleret mannosederivater (Dahms & Hancock 2002). Vejen, hvorved de to proteiner bliver fosforyleret skematiseret i figur 11 trin 4 og 5. P-type lektiner spiller en essentiel rolle i guidningen af nydannede lysosomale enzymer til endosomer, som derved bliver funktionelle lysosomer (Dahms & Hancock 2002). Dysfunktion i lysosomer fører ofte til funktionssvigt i nedbrydningen af materiale, som derved kan være årsag til sygdomme såsom I-cell disease (eng.), hvor ophobning af ikke-nedbrudt materiale fører til død (Dahms & Hancock 2002).

S-type lektiner bliver ofte kaldt galectiner pga. deres affinitet over for β -galactosid (Kishore *et al.* 1997; Arason 1996; Kilpatrick 2002). Tre grupper af S-type lektiner er kendte; a) galectin-1, b) galectin-3 og c) galectin-4 (Arason 1996). Galectin-3 findes og menes at have funktion i cytosolen som transportmolekyle af mRNA fra nucleus til ER, mens galectin-1 og 3 også forekommer ekstracellulært (Arason 1996). Specielt for disse lektiner menes det, at de ikke bliver eksporteret via golgi fra ER til overfladen (Nakamura *et al.* 2001).

C-type lektiner blev tidligere sat i gruppe med S-type lektiner, da de begge har et konserveret stykke af deres CRD på 120 aminosyrer (Kilpatrick 2002). Nyere forskning har dog vist, at eneste sammenhæng mellem disse er længden på det konserverede CRD. C-type lektiner består af en række undergrupper (se tabel 2).

Tabel 2 viser underinddelingen af C-type lektiner (Kilpatrick 2002; Kishore *et al.* 1997).

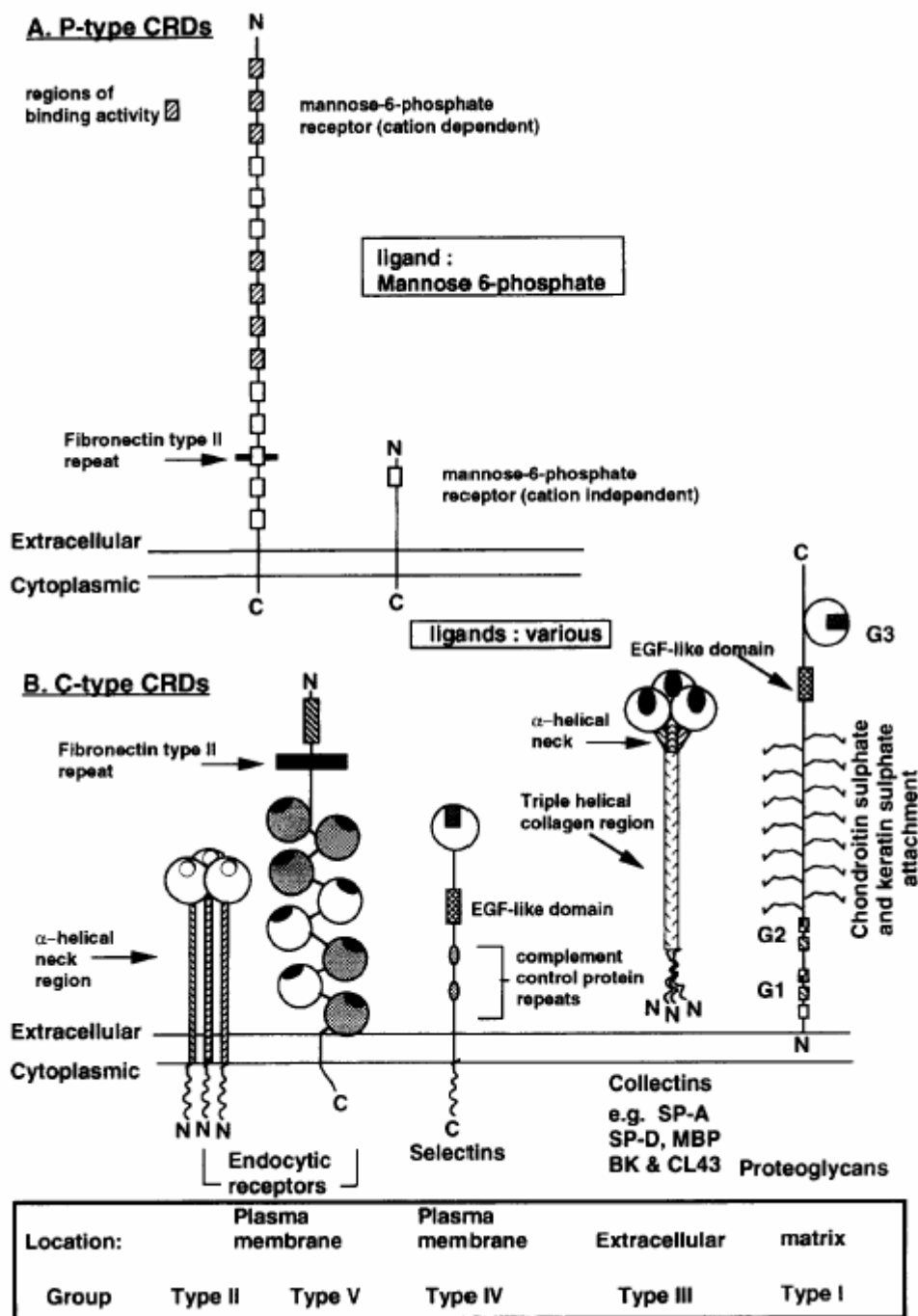
Undergrupper af C-type lektiner	
I	Proteoglykaner
II	Asialoglycoprotein-receptorer
III	Collektiner
IV	Selektiner
V	NK gruppe transmembrane receptorer

Undergrupperingen er dannet ud fra C-type lektiner i kombination med andre strukturelle proteinsegmenter (se figur 13) (Kishore *et al.* 1997).

- I) Proteoglykaner er små transmembrane proteiner. Specielt hos fisk, er disse dårligt beskrevet i litteraturen, derfor er det svært at finde relevante aspekter. De er nævnt her pga. dens epidermale vækstlignende domæne EGF (se figur 13), da epidermal vækst af slimceller er interessant i sammenhæng med immunforsvaret mod *Gyrodactylus*.

- II) Asialoglycoprotein receptorer er sammensat af et transmembrant protein, en α -helix og et C-type domæne (se figur 13). Gruppen indeholder specificitet over for flere forskellige carbohydrater og binder sig stærkt til gentagelser af ens carbohydrater. Affiniteten og specificiteten er afhængig af hvor mange CRD, der er bundet sammen. Et eksempel er, at 2 CRD binder sig til mannosyleret serum albumin med som affinitet, som 4 eller flere CRD binder sig til svampemannose (Kishore *et al.* 1997). Blandt gruppe II findes lektiner på makrofager med affinitet over for galactose. På Kupffer celler findes receptorer med affinitet over for galactose og fucose. Disse receptorer er med til at genkende tumorceller (Arason 1996). Gruppen kaldes sammen med gruppe V også for endocytiske receptorer.

- III) Bedst kendte collektin er det mannosebindende-lektin MBL, som er kendt fra immunforsvaret, hvor det er en vigtig aktør i binding til patogener ekstracellulært (Ni & Tizard 1996). Det er opbygget af 4 dele; en N-terminal region involveret i disulfidbinding med andre interne kæder, en collagen region, en α -helix og et C-type CRD (se figur 13). Flere forskellige typer af mannosebindende-receptorer på overfladen findes også i denne gruppe, og de har vist sig at indgå både i fagocytose og endocytose. De bliver genbrugt og eksporteret til overfladen igen efter brug (East & Isacke 2002). MBLs funktion hos karpfisk og regnbueørred er tidligere nævnt og sættes i forbindelse med den alternative komplementaktivering (Vitved *et al.* 2000; Buchmann 1998a; Ewart *et al.* 1999; Turner 1996).
- IV) Selektiner er ligesom undergruppe I transmembrane proteiner. De består af et C-terminalt anker med et cytoplasmisk domæne i plasmamembranen (Kishore *et al.* 1997). På den ekstracellulære side består selektiner af en N-terminal del, som indeholder CRD, et EGF-lignende domæne og et antal komplement kontrollerende proteindomæner (se figur 13) (Kishore *et al.* 1997). Adhæsionsproteiner under selektiner består af tre yderlige undergrupper; L-selektiner, udtrykt i forskellige leukocytter, E-selektiner udtrykt i aktiveret endotel af inflammatoriske proteiner, og P-selektiner ligeledes udtrykt på epithelceller og trombocytter efter aktivering fra inflammatoriske proteiner (Vasta *et al.* 1999). De har alle evnen til at binde sig til endestillet sialisyl-Le^x (α -N—acetylneuraminsyre-[2,3]- β -D-Gal-[1,4]-[α -L-fucose-[1,3]]D-N-acetylglucosamine), som er et kompleks, hvor både endestillet sialisylsyre og fucose er til stede (Kishore *et al.* 1997; Vasta *et al.* 1999).
- V) NK transmembrane receptorer har et C-terminalt anker og er tilstede på naturlige dræber celler NK-celler (Hikami *et al.* 2003) (se figur 13). Hos fisk kaldes de naturlige cytotoxiske celler NCC. NK transmembrane receptorer kan i mennesker genkende major histcompability complex I MHC I (Hikami *et al.* 2003). Dette er formodentlig også tilfældet for NCC i fisk.



Figur 13. (A) strukturel organisering af CRD i de to P-type lektiner (kation afhængig og uafhængig). De skraverede bokse viser bindingssted for carbohydrater. (B) strukturelle organisering af C-type lektiner, de runde strukturer indikerer bindingssted for carbohydrater. Forkortelser: EGF = epidermal vækstfaktor lignende domæne, G1 og G2 = rundt proteindomæne uden carbohydrat genkendelsesevner, G3 = CRD. Illustration: (Kishore *et al.* 1997)

Yderligere undergrupper såsom makrofag mannose receptorer, enkelt domæne lektiner, og ficoliner er blevet foreslået af Lu *et al.* (2002) og Kilpatrick (2002), men i de fem ovenstående undergrupper er der mest enighed om struktur og dermed klassificering. Der er hele tiden eksempler på lektiner,

som er svære at få klassificerede. Et eksempel på det er et fucolektin *Anguilla anguilla* agglutinin (AAA) fundet i serum i ål *Anguilla anguilla*, hvor ligheden er størst med C-type lektiner, men en fold i den tredimensionelle struktur i CRD er yderst forskellig fra C-type lektiner (Tasumi *et al.* 2002).

Pentraxiner er normalt inddelt i 3 hovedgrupper; pentraxin, serum amyloid P-komponent SAP og C-reaktive protein CRP (Cook *et al.* 2003). Disse proteiner er alle multifunktionelle proteiner, er Ca^{2+} -afhængige, har pentamerisk struktur, og de er alle involverede i akutfasereaktioner (Cook *et al.* 2003; Yano 1996; Jensen *et al.* 1995; Gabius *et al.* 2002). Både SAP og CRP homologe til humane menes at være fundet hos regnbueørred (Jensen *et al.* 1995). SAP binder sig hovedsageligt til fosforethanolamin (Cook *et al.* 2003; Kilpatrick 2002), mens CRP er kendt for at binde til fosforylcholin som er en del af C-polysakkarider og fosforlipider (Kilpatrick 2002; Yano 1996; Jensen *et al.* 1995). CRP er kendt for at kunne binde sig til forskellige galactoser (Kilpatrick 2002). CRP er i stand til at aktivere den klassiske vej i komplement aktivering (Yano 1996).

Serumniveauet af CRP er kendt for at stige efter infektion, beskadigelse af huden og ved inflammation til adskillige gange over basisniveauet (Yano 1996).

CRP har længe været kendt som et akutfaseprotein tilhørende sin helt egen gruppe af proteiner. CRP står derfor i nogle lærebøger for sig selv (Yano 1996). En mere tidssvarende inddeling vil være den ovenstående, som ud fra en proteinstruktur inddeler i grupper, og dermed placerer CRP i en undergruppe af pentraxiner

Lektiner findes stort set overalt på og i celler. De har uhyre mange funktioner, som ovenfor beskrevet. Det er næsten uoverskueligt at redegøre for alle deres mulige sammenhænge i immunforsvaret. Det skyldes at mange lektiner ikke kendes, og at de, som er undersøgt, hovedsageligt er kendt fra det humane og ikke fisks immunforsvar. Dertil kommer den store variation i lektiners ligander, der varierer meget i sukkerkoden. Der er ingen tvivl om, at lektiner spiller en stor rolle i immunforsvarets medfødte del hos fisk.

6. Komplementaktivering og det medfødte immunforsvar hos fisk

Dette afsnit handler om lektiner i sammenhæng med komplementaktivering og ser på, hvor lektiner ellers kan have en rolle i immunforsvaret hos laksefisk mod hudassocierede ektoparasitter såsom *Gyrodactylus*.

Huden hos fisk er en fysisk barriere, som på mange måder adskiller sig fra andre højere vertebrater ved at epitelet består af levende celler. Det giver mulighed for større transport af aktive stoffer til overfladen og mulighed for receptorer på overfladen til opdagelse og signalering af antigener.

Huden inddeles i epidermis og dermis.

Epidermis er kendetegnet ved pladeepitel, ingen blodårer og større eller mindre indhold af mucusceller. Mucuscellerne producerer slimen til mucus, som epitelet er dækket af (Buchmann & Bresciani 1998; Kryvi & Totland 1997). Epidermis er nedadtil afgrænset af basalmembranen.

Dermis ligger under epidermis og basalmembranen og består hovedsageligt af løst og fast bindevæv. Den indeholder blodårer, kromatoforer, skæl og nerver (Kryvi & Totland 1997).

Karakteristika såsom levende epitelceller, mucus, mucusceller i epidermis og blodårer i dermis, gør fiskens hud immunologisk interessant.

Mucus indeholder en lang række af aktive stoffer, som kan sættes i forbindelse med forsvar mod patogener. Blandt de aktive stoffer er lektiner, som er blevet fundet i bl.a. japansk ål *Anguilla japonica* og havål *Conger myriaster* (Nakamura *et al.* 2001; Shirai *et al.* 1999; Tasumi *et al.* 2002).

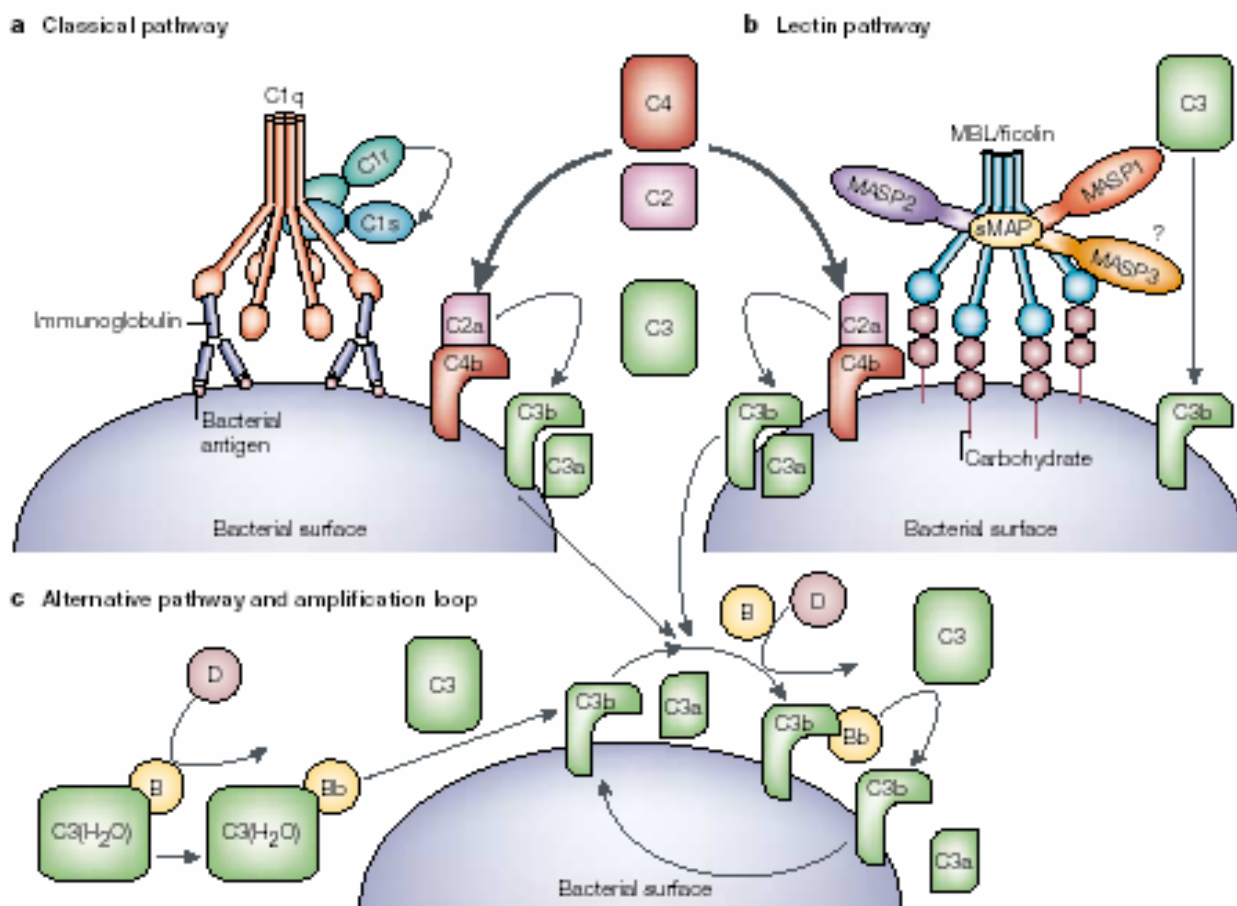
6.1 Lektin komplementaktivering.

Gennemgang af lektiners komplementaktivering er baseret på Holmskov *et al.* (1994) og Teizo Fujita (2002)

Lektin komplementaktivering starter med, at lektinet, som kan være MBL eller ficoliner (begge Ca^{2+} afhængige) genkender strukturelle carbohydrater på patogenet. Lektinet er muligvis ved binding associeret med MBL-associeret serin proteaser 1-3 MASP1-3 og et lille MBL-associeret protein sMAP. MASP 1 er ansvarlig for kløvningen af komplementfaktor 3 C3 (C står for komplementfaktor) direkte til C3b. MASP 2 er ansvarlig for kløvningen af C2 og C4 til C3 konvertase C4bC2a på samme måde, som C1s er i den klassiske komplementaktivering (se figur 14). Den videre dannelse af det lytiske slutprodukt membran-angrebskomplekset MAC er ens for

både den klassiske, alternative og lektin komplementaktivering. Ud over Ca^{2+} er lektin og alternativ komplementaktivering afhængig af Mg^{2+} .

Lektinet bliver af stadig flere tilskrevet en større betydning i forbindelse med det medfødte immunforsvar specielt hos de lavere vertebrater. Disse har ikke udviklet antistoffer, som anvendes ved den klassiske aktivering af komplement i pattedyr. Antistoffer ses første gang ved vertebrater med kæber (Chondrichthyes). Hos teleoster findes relative simple antistoffer uden isotype skift. Disse generes langsomt. Affinitetsmodning finder sted hos ørred, men forekommer relativt sent i antistofsvaret (Kaattari *et al.* 2002). For at teleoster kan forsvare sig imod patogener fra omgivelserne, må de derfor have mulighed for flere former for effektiv forsvar i tillæg til klassiske Ig-antistoffer. Her kommer lektiner ind i billedet, da de kan skelne egne overflader fra fremmede overflader.

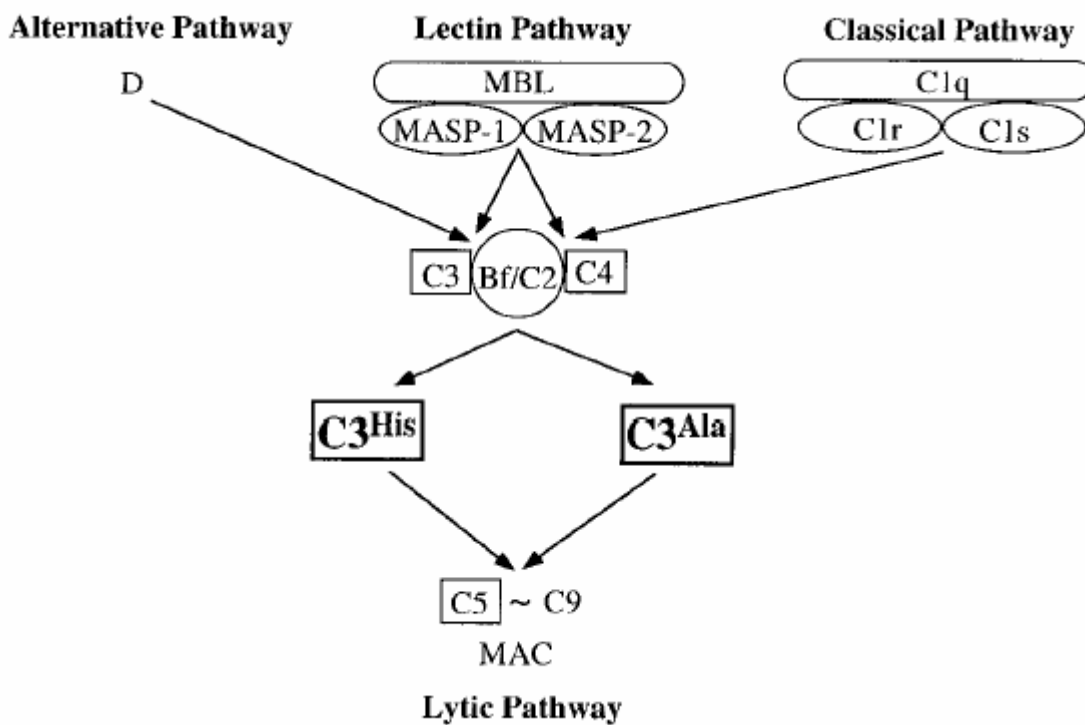


Figur 14 (a) viser den klassiske komplementaktivering som indbefatter binding af antistof. Mekanismen er ikke yderligere beskrevet her. (b) viser lektin komplementaktivering, MBL/ficolin binder sig til den fremmede overflades carbohydratstrukturer i association med MBL-associeret serin protease 1-3 og lille MBL-associeret protein. MASP 2 kløver C4 og C2 til et C4bC2a-kompleks, som er en C3-konvertase. MASP 1 kløver direkte C3 til C3b. (c) viser den alternative komplementaktivering og C3 amplifikationcirkel, som er initieret af et overskud af membranbundne C3-molekyler fra klassisk- og lektin komplementaktivering. Illustration: (Teizo Fujita 2002).

Hos pattedyr findes der kun ét mannosebindende lektin MBL med affinitet overfor mannose, og et par ficoliner med affinitet overfor GlcNAc, GalNAc og Glc udtrykt bl.a. i epitelceller og monocytter (Lu *et al.* 2002).

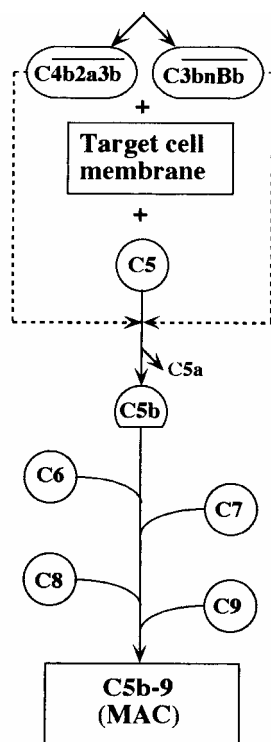
Hos fisk derimod har man fundet flere MBL-lignende proteiner, der har forskellige motiver i CRD og specificitet overfor andet end mannose. Specificiteten er normalt bestemt af få aminosyrer i en sekvens, f.eks. giver sekvensen Glu-Pro-Asn i den variable del af CRD i C-type lektiner specificitet over for mannose (Vitved *et al.* 2000). Disse forfattere fandt ved undersøgelser af MBL hos karpefamilien *Cyprinidae* et homologt lektin, som havde sekvensen Gln-Pro-Asp. Denne sekvens formodes at have affinitet over for galactose. Ikkepubliceret data fra regnbueørred tyder på, at den ikke har et MBL med affinitet for mannose, men i stedet har minimum to MBL homologe lektiner, hvor en af sekvenserne er Gln-Pro-Lys (Skjodt 2002). Dette giver en mulighed for at kompensere for den manglende effekt af specifikke antistoffer, ved at lektiner kan binde sig til flere og andre sukkerderivater end mannose.

C3 er hos regnbueørred blevet relateret til viral hemoragisk septikemi VHS (Slierendrecht *et al.* 1993). Den findes i tre allelogene former med fem fænotyper, som ikke direkte kunne relateres til sygdomsresistens over for VHS (Slierendrecht *et al.* 1993). Flere forskere har fundet samme antal fænotyper i regnbueørred og guldbrasen, men har indtil videre ikke kunnet bevise deres funktion (Sunyer *et al.* 1997; Zarkadis *et al.* 2001). Det kunne tænkes, at flere forskellige C3-molekyler vil være en klar fordel for fisk, da deres kløvningsprodukt muligvis vil kunne binde sig kovalent til flere forskellige strukturer på fremmede celler. Der er desuden blevet foreslået en forsimplet udgave af komplementaktivering hos fisk, hvor faktor B og C2 er dele af samme protein (Nonaka & Smith 2000) (se figur 15). Figur 16 viser også, at den sidste del af komplementaktiveringen er ens for de tre typer af aktiverings veje.



Figur 15 viser en teoretisk foreslået model af komplementaktivering hos teleoster (Nonaka & Smith 2000), hvor C2 og faktor B er del af samme protein. Figuren viser desuden at det lytiske slutprodukt MAC bliver dannet på samme måde for alle aktiveringsveje. Illustration (Nonaka & Smith 2000).

Den sidste del af dannelsen af MAC indbefatter komplement proteinerne C5- C9. De danner det ringformede kompleks MAC, som lyserer cellen, hvorpå komplekset binder (se figur 16). Flere af de peptider, som er involveret i komplementaktivering, har i sig selv en signalværdi. F.eks. har C3a den effekt, at den øger kapilarpermeabiliteten, og C5a er en potent kemotaktisk faktor for neutrofile celler og makrofager (Yano 1996).



Figur 16 viser den sidste del af komplement aktiveringen, som involverer C5 til C9. Slutproduktet er membranangrebskomplekset MAC, som lyserer cellen hvorpå MAC binder. Illustration: (Yano 1996).

C3's evne til at binde til flere strukturer sammen med lektiners tilsvarende større variation i carbohydrategenkendelse kan måske kompensere for den manglende effekt fra antistoffer. Hos salmonider er komplementaktiveringen i mucus sandsynligvis ikke afhængig af et cellulært respons, da alle komponenter indirekte er fundet tilstede i mucus (Buchmann 1998a; Harris *et al.* 1998). Sidstnævnte forfattere viste, at alternativ komplement aktivering i mucus taget fra hud fra atlantisk laks og *S. trutta* dræbte *G. salaris*, men det tog længere tid end ved forsøg med plasma fra samme arter. Sidstnævnte forsøg med drab af *G. salaris* skete bl.a. ved, at man hæmmede den klassiske komplementaktivering med EGTA (ethylenglycol bis(β -aminoethylether)). Herved hævder man også lektin komplementaktiveringen, mens man ved hæmning af den alternative komplementaktivering ikke kunne være sikker på, om udtrykket for lysning af celler eller *G. salaris* drab var initieret af antistof eller lektin.

Hæmningen af den alternative komplement aktivering sker ved ødelæggelse af komplementfaktorer ved opvarmning af serum eller mucus.

Det er vist, at C3 fra regnbueørred bandt sig direkte til cephaliske kirtelåbninger, tegumentet og hamuliskederne på *G. derjavini*. Det er områder på parasitten, som kan komme i direkte kontakt

med mucus på overfladen af fisk (Buchmann 1998a). Da ikke alle proteiner i komplement aktivering hos fisk er fundet endnu, kan der ligge yderligere variationer og forskelle i forhold til pattedyrs system, som oftest bruges til forklaring af mekanismerne i komplementaktivering.

6.2 Fiskens immunmekanismer i huden.

Immunmekanismer i huden bliver beskrevet ud fra hvad der sker, når en *Gyrodactylus* sætter sig på huden af en laksefisk. Mekanismer relateret til lektin-carbohydrat interaktioner vil være i fokus.

Det første, som parasitten kommer i kontakt med ved fasthæftningen, er mucuslaget og epitelceller, som parasitten penetrerer med sine marginalkroge (Buchmann 1999). Den mekaniske skade af epitelceller på fiskens hud menes at føre til et immunrespons (Buchmann & Lindenstrom 2002). På overfladen af parasitten findes opløste stoffer, som menes at have en effekt, som kan føre til et immunrespons hos fisken (Buchmann & Lindenstrom 2002).

Flere studier har vist, at parasitten er selektiv, når det kommer til placering på fisken. Selektionen er sandsynligvis styret af immunresponsen fra fisken. Det er set, at *Gyrodactylus*-arter foretrækker cornea frem for huden (Buchmann & Bresciani 1998; Buchmann & Uldal 1997). Cornea er meget immunologisk inaktiv, men er samtidig ikke særlig nærende føde for *Gyrodactylus* og flere andre patogener. Hvis cornea havde en høj næringsværdi, ville man langt oftere se infektioner her. Desuden har flere forsøg vist at *Gyrodactylus* har en præference for bug- og brystfinner samt analfinnen i starten af et infektionsforløb (Buchmann & Uldal 1997).

6.2.1 Fiskens mulighed for at genkende parasitten og bekæmpe den

Fisken har i mucus et forsvar og et muligt genkendelsesapparat imod *Gyrodactylus*. Som tidligere beskrevet af Buchmann (1998a) har C3 bundet direkte til *Gyrodactylus* muligvis forårsaget parasitdød. Hvorvidt bindingen er initieret af lektin med MASP 1 eller ved spontan kløvning af C3 er uvist.

Antistoffer mod *Gyrodactylus* er endnu ikke blevet rapporteret, men i forsøg på at finde antistoffer i regnbueørred mod *G. derjavini* fandt man ingen (Buchmann 1998a). Forskere fandt i et forsøg med afskåret hud fra elvmalle *Ictalurus punctatus* antistoffer specifikke imod *Ichthyophthirius multifiliis*. Ich udskilt til det omliggende vækstmedie fra immuniseret fisk (Xu *et al.* 2002). Dette kunne muligvis også være tilfældet ved *Gyrodactylus* infektion hos salmonider, men det mangler at blive afprøvet på lignende vis.

Den fysiske skade fremkaldt af *G. derjavini* forårsager ekspresion af interleukin-1 β IL-1 β i huden på regnbueørred (Lindenstrom *et al.* 2003). Det er blevet diskuteret i et ”review”, om der findes CRD på cytokiner (Cebo *et al.* 2002). Disse bifunktionelle proteiner kan måske ved hjælp af variation i deres CRD have forskellige målceller i immunresponset. Derved bliver lektiner og cytokiner blandet ind i hinanden, hvilket også er foreslået af Kilpatrick (2002) i sit historiske ”review” om lektiner.

Lysozymer er fundet i mucus på fisk og er med til at lysere bakteriecellevægge, fordi peptidoglykanlaget er blevet spaltet (Yano 1996). Et forsøg med lysozymaktivitet hos fire forskellige salmonider med forskellig modtagelighed overfor *G. derjavini* viste ingen korrelation mellem modtagelighed og lysozymaktivitet (Buchmann & Uldal 1997). Hvorvidt denne korrelation er anderledes for *G. salaris* eller for andre sygdomme, står uvist hen, men kan ikke udelukkes. Desuden er der uvished om hvilke strukturer lysozymaktivitet hos salmonider eventuelt vil reagere imod på *Gyrodactylus*-arter.

Antimikrobielle peptider er blevet isoleret fra mucus fra regnbueørred (Smith *et al.* 2000) og kunne have en effekt på *Gyrodactylus*.

Lektiner er fundet oprenset fra mucus og hud på adskillige fiskearter (Muramoto *et al.* 1999; Tasumi *et al.* 2002). De er fundet ved indirekte essays, hvor man hæmmer kommercielle lektiner med et homogenat fra mucus eller plasma fra fisk indeholdende lektiner med samme specificitet (Buchmann 2001). CRP i mucus menes at have stor betydning som akutfase protein i en række immunmekanismer (Yano 1996). CRP aktivitet sættes specielt i forbindelse med bakterier, da CRP, når Ca²⁺ er til stede binder til C-polysakkarid CPS på cellevæggen i *Streptococcus pneumoniae* (Yano 1996). Hvorvidt CRP kan binde sig til *Gyrodactylus* er ukendt, men CRP er hos pattedyr kendt for flere funktioner inklusiv klassisk komplementaktivering, øgning af NK-celler og makrofaginitieret cytotoxisk aktivitet (Yano 1996). Et forsøg har vist, at funktioner af CRP fra *Labeo rohita* blev hæmmet af en række carbohydrater (Mandal *et al.* 1999). Mest hæmmet blev CRP's detoxificerende evne over for bly. D-galactose viste sig at hæmme denne metalbinding mest (Mandal *et al.* 1999). Dette passer fint CRP's D-galactose affinitet. Andre lektiner deriblandt galectiner er primært blevet fundet og karakteriseret i forskellige arter af ål. Forskere fandt, at congerin I, som er et galectin fundet i mucus på havål, kunne adaptere til omgivelserne ved at

udskifte forskellige strukturelle undergrupper ved forskellige ydre abiotiske og biotiske forhold (Shirai *et al.* 1999). Hvis der her igen er mulighed for variation i lektiner (galectiner), som kan binde patogener og aktivere komplement, øges yderligere de muligheder, fisk har for at beskytte sig vha. et ikke-antistof initieret immunrespons.

Fra atlantisk laks er MBL-lignende lektiner fundet i serum og sat i forbindelse med øgning af anti-*Aeromonas salmonicida* aktivitet i makrofager samt binding til mannosestrukturer på overfladen af *A. salmonicida* og *Vibrio anguillarum* (Ottinger *et al.* 1999; Ewart *et al.* 1999).

De lektiner, som menes at findes membranbundne på huden, har forskningen ikke koncentreret sig om endnu. Hvor stor betydning for genkendelse de har, er derfor uvist, men det må antages at være det sekundære, som parasitter og andre patogener møder efter mucus på fiskens overflade.

Det er sandsynligt, at lektiner spiller en rolle i genkendelse af arter af *Gyrodactylus* i mucus.

Hvordan mekanismerne hænger sammen med forskelle i modtagelighed for forskellige arter, er nogle af de problemstillinger, denne opgave forsøger at belyse.

7. Statistisk teori

Normalt vil statistiske metoder kun beskrives under materialer og metoder, men pga. af omfattende statistisk arbejde og anvendelse af avancerede metoder for at vurdere parasitinfektioner er et teoriafsnit taget med i denne opgave.

7.1 Fordelinger i parasitforsøg

Ofte er det vanskeligt at behandle tælledata fra forsøg, hvor man tæller antal parasitter og bruger dette som mål for modtagelighed eller hvor man ser på ændringen af antal parasitter over tid.

Tælledata for parasitter har oftest vist sig ikke at være normalfordelte (Crofton 1971). De fordeler sig i stedet på værterne enten ved at aggregere på få værter eller ved at fordele sig på alle værter med få individer. For at kompensere for den manglende normalfordeling bruges ofte en logaritmisk transformation af data, eller en nonparametrisk test tages i brug (Wilson & Grenfell 1997). Hvis de transformerede data er normalfordelte, kan man fortsætte med parametriske test, såsom t-test, variansanalyse og generelle lineære modeller. Disse parametriske test er dog ikke uden problemer, idet der ofte vil forekomme Type I fejl (Wilson & Grenfell 1997). En Type I fejl opstår, når man forkaster H_0 -hypotesen, selvom den er sand. H_0 -hypotesen er, at der ikke er signifikant forskel, mens forkastelse af H_0 -hypotesen er, at der er signifikant forskel. Der kan desuden opstå problemer

med manglende varianshomogenitet, hvilket er et kriterium for parametriske test. Dette er forsøgt løst ved diverse transformationsligninger.

Eksempler på transformationer til parametriske test brugt ved forskellige underliggende fordelinger:

$$f(y) = \sqrt{y} \quad \text{Poissonfordeling}$$

$$f(y) = \log(y+1) \quad \text{Negativ binomialfordeling med ukendt } k$$

$$f(y) = \log(y+0.5k) \quad \text{Negativ binomialfordeling, hvor } k \text{ er kendt}$$

$$\hat{k} = \frac{\bar{x}^2}{s^2 - \bar{x}} \quad \text{Estimering af } k, \text{ hvor } \bar{x} \text{ er middelværdi, og } s^2 \text{ er varians}$$

På trods af anstrengelser med at transformere data er det ikke altid tilstrækkelig til at få residualer normalfordelte (Young *et al.* 1999). Derfor har man udviklet generaliserede lineære modeller GLM. Ved GLM behøver residualfordelingen ikke være normalfordelt, men residualerne kan bl.a. antage poissonfordeling eller negativ binomialfordeling. Der beregnes et deviansparameter, som afgør hvilken model, der passer bedst på de observerede data. Deviansparameteret er analog med middelværdien i anden / variansen \bar{x}^2 / s^2 ved lineære modeller. Deviansparameteret vurderes i en X^2 -fordeling med frihedsgrader svarende til forskellen mellem slutmodellen og den mest reducerede model (Wilson & Grenfell 1997). Slutmodellen er defineret som værende den model, som kun indeholder de co-variable, som har signifikant betydning på udfaldet. Co-variable kunne for eksempel være en effekt af kar, mens udfaldet kunne være antal parasitter per fisk.

I et forsøg har man sammenlignet GLM med henholdsvis poisson- og negativ binomialfordeling (Shaw *et al.* 1998). De undersøgte 49 makroparasitpopulationer på en række vildtlevende værter. 45 af populationerne passede statistisk tilfredsstillende til en negativ binomialfordeling, mens en enkelt af disse 45 populationer passede bedre til en poissonfordeling. Af de fire sidste passede alle bedre til negativ binomial- end poissonfordeling. Ydermere har Wilson *et al.* (1996) vist, at ved sammenligning af logaritmisk transformeret data og GLM med henholdsvis poisson- og negativ binomialfordeling producerer logaritmisk transformeret data langt flere Type 1 fejl og Type 2 fejl end begge GLM fordelinger. Type 2 fejl opstår, når man accepterer H_0 -hypotesen, selv om den er falsk.

Et andet udtryk for spredningen af parasitter er variansen divideret med middelværdien, hvilket giver indikation om, hvorvidt data er aggregeret eller ej (Anderson & Gordon 1982).

Indikationer på spredning ud fra variansen divideret med middelværdien:

$s^2/\bar{x} < 1$ underspredt, positiv binomial- eller normalfordeling

$s^2/\bar{x} = 1$ poissonfordeling

$s^2/\bar{x} > 1$ overspredt, negativ binomialfordeling

Denne metode kan ikke bruges statistisk til at vurdere fordelinger, men kan give en indikation om hvordan fordelingen er, og om den ændrer sig pga. f.eks. demografiske parametre i populationen. Laboratorieforsøg har demografiske parametre såsom død, fødsel og migration af parasitter og værtsdødelighed. Hvis en vært har et immunrespons mod parasitten, vil det give sig udslag i enten parasitdød eller emigration af parasitter fra værten.

I et beregningsforsøg i afsnit 9.3 anvendes GLM til at vurdere modtageligheden af *G. salaris* (antal parasitter per fisk) i et co-habiteringsforsøg med én parasitart og fem mulige værter. Forsøget indeholdt variable art (værter), kar og parasit udviklingen over tid fra start af infektion. Rådata blev udlånt og stammer fra et forsøg udført af bl.a. Michael Dalgaard ved Den Kongelige Veterinære og Lanbohøjskole KVL, Institut for Veterinær Mikrobiologi IVM, sektion for fiskesygdomme (se bilag 1).

Flere forskere anvender stadig i deres statistiske beregninger en nonparametrisk test såsom Mann-Whitney U-test eller Kruskal-Wallis Test), som ikke tager højde for parasit udviklingen over tid eller giver et mål for kareffekten (Harris *et al.* 2000; Lindenstrom & Buchmann 2000). Det, som testes, er antallet af parasitter per vært til et givet tidspunkt for et givet kar. Det giver problemer, når man skal fortolke data, da to værter kan variere i deres antal af parasitter over tid, og de vil derfor til den ene tid kunne være signifikant forskellige, mens de til en anden tid ikke er det og så fremdeles.

Derimod giver GLM eller en generel lineær model med transformeret data et mål for antallet af parasitter over tid eller et udtryk for forskelle i to kurveforløb. Arternes modtagelighed vurderes med co-variable såsom kareffekt over tid, hvis kareffekten i modellen er signifikant. Hvis kareffekten over tid ikke er signifikant, udelades den af modellen. Det antal parasitter som tælles, er den samlede effekt af de demografiske parametre, som i et co-habiteringsforsøg må være migration, død og fødsel af parasitter. Co-habiteringsforsøget kan derfor udelukkende klargøre, om der er en forskel mellem antallet af parasitter på de forskellige arter og stammer af laksfisk, og dermed er det den relative forskel i modtagelighed/resistens, der testes.

7.2 Overlevelsesanalyser

Overlevelsesanalyser blev opfundet til brug for undersøgelser, hvor man ønskede et mål for hvor mange individer, som overlevede en given behandling eller sygdom til et givet tidspunkt.

Overlevelsesanalyser kan også finde anvendelse ved mange andre former for hændelser, som er knyttet sammen med et bestemt tidspunkt. F.eks. kan de bruges til at bestemme, om der er forskel i tiden til symptomer på sygdom indtræffer.

I laboratorieforsøg, hvor død af individer er hændelsen, indfører man et begreb og variabel kaldet censurering. Censurering bruges i statistiske computerprogrammer og fortæller i en dikotom variabel om en hændelse er sket eller ej til et givet tidspunkt: ”Censureret ”når hændelsen ikke er sket. Når hændelsen er sket, er den dikotome variabel ”ikke censureret”. Dette udnytter man i smitteforsøg, hvor man er interesseret i at kunne tage fisk ud til destruktiv undersøgelse. Tager man til samme tid selvdøde fisk og levende fisk til destruktive undersøgelser ud af forsøget, noteres de forskelligt i den dikotome variabel. Herved opfattes de forskelligt i overlevelsesanalysen. Denne type censurering kaldes tilfældig censurering. Højrecensurering er derimod, hvis ingen individer tages ud af forsøget inden forsøgets afslutning, med mindre hændelsen død forekommer. I laboratorieforsøg vil højrecensurering ofte være den eneste form for censurering. Højrecensurering giver normalt ikke problemer i senere statistiske test, mens tilfældig censurering kan forskyde resultaterne kraftigt. Årsagen kan være, at bias opstår, fordi det ikke er tilfældigt hvilke individer man udtager af undersøgelsen. Et eksempel kan være, at de fisk, som udtages til destruktive prøver, er lettere at fange enten pga. deres raske eller syge tilstand. Derved vil den destruktive udtagelse ikke være stokastisk uafhængig.

7.2.1 Nonparametriske overlevelsesanalyser.

De mest anvendte metoder i overlevelsesanalyser er de to nonparametriske test Wilcoxon og log-rank test (sidste også kendt som Mantel Haenszel test) (Allison 1995a). Log-rank testen vægter alle tidspunkter i forsøget ens. Wilcoxon test lægger mere vægt på tidlige hændelser og vil ofte i smitteforsøg være anvendelig. Ved forsøg med interperitoneal smitte med *Yersinia ruckeri* eller *Flavobacterium psychrophilum* døde regnbueørred inden for henholdsvis de første 10 og 20 dage. Derefter ophørte dødeligheden næsten indtil forsøget afsluttedes (Madsen & Dalsgaard 1999; Olesen 1991). Hvorvidt, det er tilfældet for parasitter, er tvivlsomt, men begge test vil være mere anvendelige end en X^2 -test, hvor antallet af overlevende på dagen for forsøgets afslutning anvendes. En tilsvarende test (Fishers eksakte test) blev udført for parasitter af Larsen(2003) og ved

smittemodeller for bakterier blev X^2 -test benyttet (Madsen & Dalsgaard 1999). En X^2 -test eller Fishers eksakte test udtrykker forskellen mellem antal overlevende i de forskellige grupper, mens en nonparametrisk overlevelsesanalyse, er en test af to overlevelsesfunktioner eller -kurver, hvor alle målinger mellem start og slut er med. Chancen er derfor, at Type 2 fejl vil fremkomme ved en X^2 -test eller en Fishers eksakte test, da disse kræver større forskelle eller store antal individer i grupperne for at vise en signifikant forskel.

Det er ikke meningen, at man skal gennemføre sin overlevelsesanalyse uden at kikke kritisk på kurveforløbet, da krydsende kurver sagtens kan falde ud signifikant. Dette er også tilfældet for X^2 -test og Fishers eksakte test. Nonparametriske overlevelsesanalyser kan sammenlignes med en envejs variansanalyse, men kan ikke bruges til at teste flere typer variable, interaktioner imellem flere variable eller kontrollere for variable (f.eks. kareffekt). For at teste for co-variable må man anvende semiparametriske modeller såsom Cox proportionale risiko model.

7.2.2 Semiparametriske overlevelsesanalyser

Da Sir David Cox i 1972 skrev sin artikel om "Regression Models and Life Tables" (*Journal of the Royal Statistical Society, Series B*) tog det statistikere flere år at forstå og værdsætte de nye metoder, som han præsenterede (Allison 1995b).

Hans model kaldes semiparametrisk, fordi man ikke behøver vælge en speciel fordeling til at repræsentere overlevelsesfunktionen, hvilket er nødvendigt for parametriske modeller (se afsnit 7.2.3). Modellen kaldes også for Cox proportionale risiko model, hvorved der menes, at risikoen for en gruppe er proportional med risikoen for en anden gruppe over tid. Cox proportionale risiko model kan udvides til også at dække forhold, hvor kravet om proportionalitet ikke er opfyldt (Allison 1995b). Modellen kan anvende både kvantitative og kvalitative variable, selv om de skulle være tidsafhængige. Derfor kan overlevelsesmodeller udvides og kommer på mange måder til i opbygning at ligne lineære modeller eller GLM, hvori det er muligt at tage signifikante risikofaktorer ind i modellen såsom køn, alder, størrelse, vægt, fodertype og temperatur. Med risikofaktorer menes variable, der har betydning for udfaldsparameteren, som ved fisk kunne være tid til død eller tid til smoltificering. Det eneste, som de semiparametriske modeller ikke kan, er at teste risikofunktioner mod hinanden. Det kræver parametriske modeller.

7.2.3 Parametriske overlevelsesanalyser

Parametriske modeller estimerer en form af risikofunktionen. Dvs. at man bruger en matematisk model med parametre. Der er mulighed for at bruge forskellige matematiske modeller, hvor de mest kendte er Weibull og de eksponentielle modeller (Allison 1995c). Få har indenfor forskning af *Gyrodactylus* og laks anvendt parametriske modeller til at beskrive forskelle i overlevelse, men Harris *et al.* (1994) forsøgte at estimere en aldersspecifik dødsrate for *G. salaris*. Disse forskere fandt, at dødsraten passede på en eksponentiel model af formen; $dødsraten(t) = x * \exp^{(y(t))}$ hvor t er tiden, og x og y konstanter som estimeres. Den model, som Harris *et al.* (1994) fandt, gælder kun for de forhold, som den er fremkommet under. Hvis forhold under nye forsøg ændrer sig, skal modeller med nye parametre estimeres. Hvis den nye model er sammenfaldende med den gamle, kan man muligvis konkludere, at de forhold, som er ændret ikke havde betydning for udfaldet. Problemet med parametriske modeller er, at de ofte kræver et stort antal individer, fordi man ved et lille antal individer vil estimere parametre, som får store standardafvigelser. Parametriske modeller kan ikke medtage tidsafhængige co-variable, hvilket den semiparametriske kan. Der er i denne opgave ikke anvendt parametriske modeller pga. for få data og for få gentagne målinger i datasættet.

8. Målsætning med forsøgene

Undersøgelserne i den eksperimentelle del havde to formål med hver to delformål.

- 1)
 - a) Undersøge om der var forskel på sammensætningen af lektiner i forskellige arter og stammer af uinficerede laksefisk

 - b) Undersøge om forskellen i sammensætningen af lektiner var korreleret med henholdsvis vært specificitet og modtagelighed over for *G. derjavini* og *G. salaris* hos laksefisk.

- 2)
 - a) Undersøge om der var forskel på sammensætningen og fordeling af carbohydrater på overfladen af *G. derjavini* og *G. salaris*,

 - b) Undersøge om forskellen i sammensætningen af carbohydrater var korreleret med henholdsvis vært specificitet og modtagelighed over for *G. derjavini* og *G. salaris* hos laksefisk.

For at understøtte de to formålene var det nødvendigt at se kritisk på de statistiske metoder, hvorved man sammenligner fordelingsmønstre, infektionsniveauet og dødelighed i et cohabiteringsforsøg med parasitter med gentagne målinger over tid.

9. Materialer og metoder

9.1 Forsøgsoversigt

Den eksperimentelle del blev udført både med forsøg i laboratorium og med beregningsforsøg på allerede eksisterende data vha. statistikprogrammet SAS[®] System.

9.1.1 Laboratorieforsøg

Kompetitativ hæmning af lektin med plasma- og hudprøver:

Undersøgelsens formål var at hæmme et kommercielt peroxidasekonjugeret lektin med kendt affinitet over for sukkerderivater med plasma- og hudprøver fra *S. trutta* og tre atlantiske laksestammer. Dertil kom et forsøg til bestemmelse af proteinkoncentration vha. BCA-metoden (Buchmann & Nielsen 1999). Proteinkoncentrationen blev brugt til korrektion af lektinhæmning og gav dermed et udtryk for procentvis hæmning af lektin pr mikrogram protein i prøverne.

Binding af lektin til overfladen af *G. derjavini* og *G. salaris*:

Undersøgelsens formål var at observere forskelle i farveintensitet mellem *G. derjavini* og *G. salaris* ved brug af kommercielt peroxidasekonjugeret lektin og DAB (Diamino-benzidine-tetrahydrochloride D5905, Sigma) ved tilstedeværelsen af H₂O₂. Desuden blev forskellige bindingssteder på de respektive parasitter (tegument, cephaliske lober, øvre og nedre hamuli) undersøgt for forskellig farveintensitet.

9.1.2 Statistiske metoder og beregningsforsøg:

Deskriptive metoder til visning af forskelle mellem parasitinfektion hos laksefisk i co-habiteringsforsøg:

Årsagen til denne nye behandling af den deskriptive del af databehandlingen var at synliggøre de forskelle mellem arter, som ved en ubehandlet præsentation er svært gennemskuelige.

Statistiske metoder til test af forskelle mellem parasitinfektion hos laksefisk i co-habiteringsforsøg:

Ved gentagne målinger kommer man som ofte ud i det problem, at det er svært at finde en passende test, som både tager hensyn til den ofte forekommende negative binomialfordeling af tælledata og de gentagne målinger.

Analyser af overlevelseshdata vha. semiparametriske metoder:

Ved at teste overlevelseshdata vha. overlevelseshanalyser kan man beskrive data over et tidsforløb i stedet for at teste hvert enkelt tidspunkt for sig vha. nonparametriske test såsom Mann-Whitneys U-test.

9.2 Laboratorieforsøg

9.2.1 Kompetitiv hæmning af lektin med plasma- og hudprøver.

Fisk:

Der blev brugt tre forskellige stammer af atlantehavslaks fra Conon Elven i Skotland, Neva Elven i Rusland og Lule Elven i Sverige. Desuden blev anvendt *S. trutta* fra Esrum Å fra Danmark. Neva og Conon 1+ smolt blev importeret direkte til KVL fra Skotland og akklimatiseret inden prøvetagning. Lulelaks blev importeret til Bornholm Lakseklækkeri og opdrættet der. *S. trutta* fra Esrum Ålaug blev opdrættet på Esrum Møllegård.

De fysiske forhold for fiskene før prøvetagning:

Neva og Conon laks blev før prøvetagning holdt i samme 120 liter akvarium. Halvdelen af vandet blev skiftet 2 gange om ugen. Vandet blev rensat af Eheim filter. Fiskene på KVL blev fodret med kommercielt foder passende til deres størrelse (1 mm Ecostart + 15, Biomax A/S, Danmark).

Fiskene på KVL blev holdt ved 13°C og med et lysregime på 12 timers lys/mørke.

Lulelaksen blev holdt i akvarier med recirkulerende vand ved 10°C. De blev holdt ved et naturligt lysregime og tidspunktet for prøvetagning var den 15. maj, hvilket var svarende til en dagslængde på 16 t og 2 min. De blev fodret med kommercielt foder (Biomax A/S, Danmark).

S. trutta blev holdt i netbure i Esrum Å og var udsat for svingninger i vandkvalitet. Fiskene var underlagt naturligt lysregime og prøvetagning var den 1. maj, hvilket var svarende til en dagslængde på 15 t 22 min. Fodertype er ukendt, og de havde mulighed for at spise frit af forbipasserende fødeemner.

Prøvetagning af plasma:

Fiskene blev bedøvet med 50 mg/l MS 222 (Sigma). Blodprøve blev umiddelbart efter taget fra caudalvenen med en sprøjte med en kanylestørrelse på 25G (Terano[®]), som var behandlet med heparin (5000 EI/ml, Løvens kemiske Fabrik). Blodprøven blev overført til et 1.5 ml Eppendorfrør. Blodprøver fra Conon- og Nevalaks blev centrifugeret med 13 000 omdrejninger pr minut (rpm) (Biofuge 13, Heraeus SEPATECH) i fem minutter.

Blodprøver fra *S. trutta* og Lulelaks blev overført til i et 1.5 ml Eppendorfrør og centrifugeret med ukendt maksimum hastighed med en SIGMA 112 (Stuers) i 5 min. Prøver fra 10 Lulelaks blev samlet i ét Eppendorfrør.

Plasma fra de centrifugerede rør med Conon og Nevalaks blev overført til 2 ml cryorør og nedfrosset ved -18°C med det samme. Lulelaks- og bækørredprøverne blev også overført til 2 ml cryorør, og de blev holdt på is i ca. 5 timer, indtil de blev frosset ved -18°C efter ankomst til KVL. Prøver af laksestammerne Conon og Neva blev taget på KVL. Prøver af Lulelaks og *S. trutta* blev taget ved henholdsvis Bornholm Lakseklækkeri og Esrum Møllegård.

Længden af fiskene varierede fra 10 cm til 15 cm, med Lulelaksen som de mindste.

Prøvetagning af hud:

Efter udtagelse af blodprøve blev alle fisk lagt på højre side, og et stykke af huden på venstre side ved sidelinien blev skåret af vha. skalpel, pincet og saks (størrelse op til et par cm²). Prøverne fra de forskellige arter og stammer blev efter følgende behandlet på samme vis som blodprøver mht. frynsning. Fiskene blev efterfølgende aflivet ved at knække nakken på dem.

Fortynding af prøver:

Plasmaprøver blev optøet og fortyndet 1/200 med en saltopløsning bufferet med fosfat PBS (pH 7.2, 0.15 M Na⁺; 24.0 g NaCl, 0.6 g KCl, 3.46 g Na₂HPO₄*7H₂O, 0.6 g KH₂PO₄, 3 l H₂O) og genfrosset ved -18°C indtil brug.

Hudprøverne blev optøet og huden blev vejet i gram med tre decimalers præcision.

Huden blev efterfølgende klippet i små stykker og fortyndet 1/10 med PBS (fortynding i forhold til vægt 1 g = 1 ml PBS). De fortyndede prøver blev sonikeret i 2 min ved niveau 2 (ca. 130W) (Sonicator[®] ultrasonic proccesor XL 2020, Heat System, USA) i intervaller af 5 sekunders sonikering og 5 sekunders pause. Prøverne blev holdt på is under sonikeringen og sammen med

pauserne var det med til at prøverne ikke blev varme. Efter sonikering blev prøverne centrifugeret i 5 min (Biofuge 13, Heraeus SEPATECH) og supernatanten overført til et nyt eppendorfrør. Prøverne blev yderligere fortyndet med PBS til i alt 1/400 af den originale vægt af huden. Efterfølgende blev prøverne genfrosset ved -18°C indtil brug.

Tabel 3 viser de forskellige fortyndinger og antal prøver i hver gruppe. * angiver samme prøve fra 10 fisk

Art:	Oprindelig elv/å og land	Antal plasmaprøver / fortynding	Antal hudprøver / fortynding
<i>Salmo trutta</i>	Esrum Å, Danmark	5 / 1:400	5/ 1:200
<i>Salmo salar</i>	Lule Elv, Sverige	1*/ 1:400	5/ 1:200
<i>Salmo salar</i>	Neva Elv, Rusland	5 / 1:400	5/ 1:200
<i>Salmo salar</i>	Conon Elv, Skotland	4 / 1:400	4/ 1:200

GlycoWell-assay:

Peroxidasekonjugeret lektin blev tilsat pladen med immobiliserede sukkerderivater. Bindingerne blev hæmmet med plasma- eller hudprøver fra de fire salmonider (tabel 1) for at kvantificere størrelsen af lektinaktiviteten i plasma og hudprøver. Mikrotiter GlycoWell™ (Lundonia Biotech™, Lund i Sverige) 96 hulplader med kovalent bundne sukkerderivater blev brugt sammen med kommercielle peroxidasekonjugeret lektiner (se tabel 4).

Systemet udtrykker lektinaktiviteten i prøven ved at kvantificere dens kompetitive hæmning af peroxidasekonjugerede lektiner til de bundne sukkerderivater i brøndene på GlycoWell™ pladerne. En kraftig farvning af brøndene signalerer høj binding til brøndene og lav eller ingen hæmning fra prøverne. Svag farvning derimod indikerer at prøven, som er tilsat hæmmer bindingen af det kommercielle lektin til brøndene.

Tabel 4 Peroxidasekonjugerede lektin blev brugt i både lektinhæmning og lektinbinding til parasitter. Primær specificitet af lektin samt sukkerderivater på mikrotiter plader er vist. *Ricinus communis* blev ikke anvendt i lektinbinding til parasitter.

Lektin, peroxidase konjugeret	Sigma nr.	Primær specificitet	GlycoWell™ nr.	Sukkerderivater på GlycoWell™
<i>Canavalia ensiformis</i> (Con A)	L6375	Terminal α -D-mannosyl and α -D-glucosyl residues	SW-01-009	α -D-mannoside
<i>Triticum vulgare</i> (Tri)	L3892	N-acetyl- β -D-glucosaminyl residues and N-acetyl- β -D-glucosamine oligomers	SW-01-002	β -D-GalNac (2-acetamido-2-deoxy- β -D-galactopyranoside)
<i>Maclura pomifera</i> (Mac)	L4401	Terminal α -D-galactosyl and N-acetyl-D-galactosaminyl residues	SW-01-007	α -D-galactose
<i>Ulex europaeus</i> (Ulex)	L8146	L-fucose (6-deoxygalactose)	SW-01-005	L-fucose (6-deoxygalactose)
<i>Ricinus communis</i> (Ric)	L2758	Terminal β -D-galactosyl residues	SW-02-001	β -lactose (O- β -D-galactopyranosyl-(1-4) β -D-glycopyranose)

50 μ l kommercielt lektin i PBS/TWEEN (10 μ g/ml lektin i PBS med 0.5% TWEEN 20 (v/v), filtreret gennem 0.22 μ m filter) blev inkuberet sammen med 50 μ l plasma- og hudprøver ved pH 7.2. pH blev ændret ved forsøgene med Con A, da Con A aggregerer ved pH højere end 7.0 (data ikke vist).

Efter 45 minutters inkubation blev hver brønd vasket tre gange med 150 μ l Cova-buffer (pH 7.2 (Con A pH 6.6): 116.9 g NaCl, 10.0 g MgSO₄*7H₂O, 0.5 ml TWEEN 20 opløst i PBS til total 1000 ml). Den sidste vask blev efterladt i 15 min, hvorefter der blev vasket en gang med Citrat/fosfatbuffer (pH 5.0: 7.30 g citronsyre, 11.86 g Na₂HPO₄*2H₂O, opløst i destilleret H₂O til total 1000 ml).

100 µl Substratopløsning (6.0 mg o-phenylenediamine (Sigma, P8806), 10.0 mL Citrat/fosfatbuffer, 5 µl H₂O₂) blev tilført. Substratopløsningen var altid frisklavet før brug og anvendt ved rumtemperatur (20°C).

Reaktionen blev stoppet med 3.0 volumen % H₂SO₄, og aflæst i en ELISA-læser (Multiscan RC, type 351, Labsystems) ved 492 nm.

Maksimal- og baggrundsmålinger blev udført ved at ændre det første punkt i proceduren. Maksimal binding blev opnået ved at tilføre 50 µl kommercielt lektin og 50 µl PBS/TWEEN (pH 6.6 for Con A). Baggrund blev målt ved at tilføre 100 µl PBS/TWEEN (pH 6.6 for Con A). Maksimal- og baggrundsmålinger blev efterfølgende behandlet på samme måde som resten af prøverne.

9.2.2 Bestemmelse af proteinkoncentration (BCA-metode):

Proteinkoncentrationen blev bestemt for plasma- og hudprøver. Koncentrationen blev målt som et gennemsnit af duplikater af hver prøve. Den anvendte metoden var en kombination af den udgave, som blev brugt af Buchmann & Nielsen (1999) og (Pierce Biotechnologys nr. 23 227).

10 µl prøver blev inkuberet med 200 µl BCA-reagens (1:50 kobber sulfat (Pierce Biotechnologys nr. 23 228); 4 % Bicinchoninic syre opløsning (Pierce Biotechnologys nr. 23 224)) i 96 hulsmikrotiterplader.

En ampul med bovin serum albumin (BSA) (Pierce Biotechnology, nr. 23209) blev anvendt ud fra anbefalingerne fra producenten til bestemmelse af en standardrække, hvorfra koncentrationen i prøverne kunne beregnes (se tabel 3). To standardrækker blev benyttet på hver 96 hulsmikrotiterplade. Baggrund blev målt ved at tilføre 210 µl BCA-reagens til 12-16 brønde. Pladerne blev aflæst i ELISA-læser (Multiscan RC, type 351, Labsystems) ved 560 nm efter inkubation ved 37 °C i 45 min.

Tabel 5: Anden kolonne viser slut BSA koncentration i µg/ml. Tredje kolonne viser den mængden af BSA i µg, hvis hver brønd fik tilsat 25 µl. Fjerde kolonne viser blandingsforholdet mellem destilleret vand (dest.v.) og mængde af BSA taget direkte fra ampulen til de første tre rækker (Pierce Biotechnology, nr. 23209). Derefter viser bogstaverne, som referer til første kolonne, hvilken række af forud blandende prøver man tager BSA fra.

Prøve	Slut BSA-konc. µg/ml	Mængde BSA ved i 25 µl standard i hver brønd (µg)	Standard opløsningsrækken (µl)
A	2000	250	Dest.v. 0, BSA 300
B	1500	187,5	Dest.v. 125, BSA 375
C	1000	125	Dest.v. 325, BSA 325
D	750	93,75	Dest.v. 175, B 175
E	500	62,5	Dest.v. 325, C 325
F	250	31,25	Dest.v. 325, E 325
G	125	15,625	Dest.v. 325, F 325
H	25	3,125	Dest.v. 400, G 100

9.2.3 Binding af lektin til overfladen af *G. derjavini* og *G. salaris*

Parasitter:

G. salaris stammer fra Lærdalselven i Norge og blev importeret til Danmark forår 2001 med levende fisk. Parasitstammen blev herefter holdt i laboratorium på modtagelige atlantiske laks af skotsk oprindelse (KVL, IVM, Sektion for Fiskesygdomme). Alt afløbsvand fra akvarier blev desinficeret med Virkon S[®].

G. derjavini stammer fra et dambrug (Pælebro) i Jylland, og parasitterne blev indbragt til KVL maj 1995. Stammen blev herefter holdt i laboratorium på modtagelige regnbueørreder. Både laks og regnbueørred med parasitter blev dræbt med MS222 (A-5040, Sigma), og hele fisk med parasitter blev fikseret i 3.7 % formaldehyd i PBS. Parasitter blev efter en dag i formaldehyd isoleret fra fiskene. Parasitterne, som blev isoleret ved hjælp af pincet, saks og nåle under stereolup, blev frigjort fra afklippede finner og overført til frisk 3.7 % formaldehyd i PBS med en 1000 ml pipette og opbevaret ved 5 °C. Parasitter som blev beskadiget ved isolationen blev ikke brugt videre i forsøgene.

Binding af lektiner til parasitter:

Formaldehydfikserede individer af *G. derjavini* og *G. salaris* blev skyllet med destilleret vand i 2 x 15 min i et saltkar med ca. 10 individer i hver. Der blev anvendt to kontrolkar og to lektininkuberede kar for hver parasitart og for hver af de fire typer lektiner. Alle inkuberinger skete ved ca. 20 °C. Tømming af kar skete mellem alle inkuberinger med en 1 ml pipette under stereolup. Inkubering af parasitter i 1 time i 500 µl blokeringsbuffer (PBS med 2 % bovin serum albumin, pH 6.6). Inkubering i 1 time med 200 µl peroxidasekonjugerede lektiner (10 µg ml⁻¹) i blokeringsbuffer, mens kontrolkar blev inkuberet med 200 µl PBS. Tabel 4 viser de lektiner, som blev anvendt. Undtagelse var *Ricinus communis*, som ikke blev anvendt pga. giftighed, og som derfor var vanskelig at håndtere i saltkar under stereolup uden risiko for kontaminering. Parasitter blev vasket 3 x 10 min med 500 µl vaskebuffer (PBS med 0.05 % TWEEN 20). Binding af lektiner blev visualiseret med 200 µl fremkalder (10 mg Diamino-benzidine-tetrahydrochlorid (D5905, Sigma) 12 µl 30 % H₂O₂ v/v opløst i 15 ml PBS). Fremkalderreaktionen blev stoppet ved at fortynde med vaskebuffer 2 x 1 ml og efterfølgende 2 x 1 ml destilleret vand. Parasitter blev sat på objektglas og indstøbt i glycerin-gelatine med 1-5 individer på hvert objektglas. Farveintensitet på parasitterne blev vurderet i et konfokalt lysmikroskop ved 200 eller 400 gange forstørrelse (Leica DMLB, Leica Microsystems, Tyskland). Farveintensitet blev vurderet på en ordinal skala fra 0-5, hvor 0 var ingen farvning, og 5 var kraftig rødbrun farvning. Der blev ikke brugt eller lavet referenceindivider til vurdering af farveintensiteter. Farveintensiteten blev undersøgt for tegument, cephaliske loper samt øvre og nedre hamuli. Øvre hamuli var den del af hamuli, som kommer i berøring med fisken, mens nedre hamuli ikke kommer i berøring med fisken.

9.3 Statistiske metoder og beregningsforsøg

Der blev anvendt en lang række af forskellige statistiske test under arbejdet med denne opgave. De statistiske test som blev brugt, er dem, som blev fundet mest anvendelige i forhold til forsøgsmodellerne. Til udregning af alle statistiske test blev anvendt statistikprogrammet SAS[®] System version 8.2. Til at illustrere de deskriptive data blev anvendt både SAS[®] System og Microsoft Excel[®] 2002. I alle test var signifikantniveauet $\alpha = 0.05$.

Laboratorieforsøg:

Data fra hæmning af lektiner i fiskehud (procentvis hæmning) blev korrigeret for proteinindhold i de enkelte prøver. Hæmningen blev herefter udtrykt som den procentvise hæmning af lektin per μg protein.

Variansanalyse blev brugt til at teste den procentvise hæmning af lektin pr μg protein mellem de forskellige arter og stammer af laksefisk. Variansanalysen i proceduren PROC-MIXED i SAS[®] System blev anvendt. Variansanalysen blev testet med variablerne længde af fisk som variabel og interaktion mellem længde og arter/stammer af laksefisk. Til parvis sammenligning af arter/stammer af laksefisk blev anvendt t-test. Residualer blev testet for normalitet med Shapiro-Wilks test, og ens varians blev vurderet i et residualplot.

Fishers eksakte test blev anvendt til at teste, om der var forskelle i forsøgene med binding af lektin til parasitter. Den ordinale skala, som blev anvendt, var en videreudvikling af den 1-3 skala, som Buchmann (1998b) anvendte til at vurdere lignede binding af lektin til mucusceller på fiskehud. Fordelen ved 0-5 skalaen er muligheden for at teste mindre forskelle i intensitet. Ved vurdering af farveintensiteter blev der vurderet subjektivt uden brug af referenceeksempler for de forskellige farveintensiteter. Skalaen blev efterfølgende vurderet for ensartethed på tværs af lektiner, som blev brugt i forsøget, ved at sammenligne intensiteter, som blev vurderet ens. Skalaen var yderst subjektiv genereret og valideret. Svagheder og styrker ved skalaen vil blive taget op under diskussion af resultater.

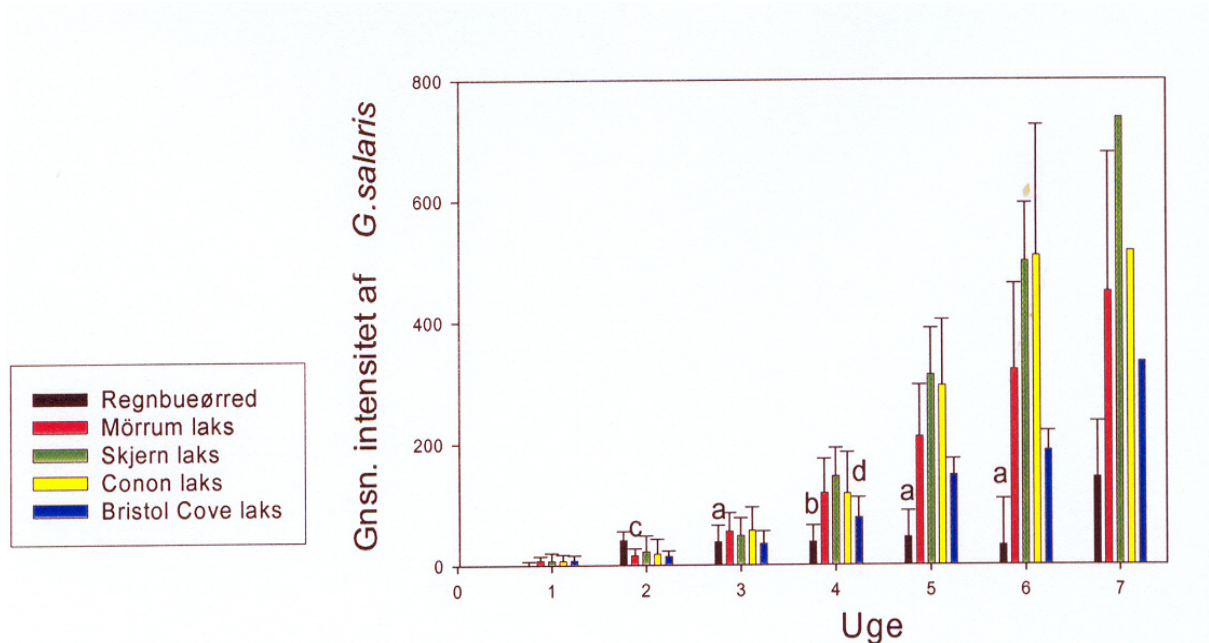
Statistiske beregningsforsøg:

Deskriptive statistiske metoder anvendtes til at visualisere forskelle og give en ide om, hvordan data fordelte sig. Data til beregningerne blev lånt af forskere ved KVL (se bilag 1), og deres data blev brugt af Larsen (2003) i en specialerapport. Forsøgsdesignet var som følger: Der var 4 kar, hvor et var kontrolkar uden parasitter. Alle karrene havde 15 fisk af fire forskellige stammer af atlantiske laks fra; Conon Elven i Skotland, Bristol Cove Elven i Canada, Mörrum Elven i Sydsverige og Skjern Åen i Danmark. Desuden indgik der i forsøget 15 regnbueørred i hvert kar fra Fårup Mølle dambrug i Danmark. Hvert kar havde en kapacitet på 120 liter, og vandet bestod af 50 liter ionbyttet vand og 50 liter hanevand. Halvdele af vandvolumen blev skiftet to gange om ugen. Vandet blev rensat vha. et Eheim biofilter. Fiskene blev fodret med yngelfoder (1 mm Ecostart + 15, Biomar a/s, Danmark) svarende til 1-2 % af deres kropsvægt 5 gange om ugen. Forsøget blev holdt ved et 12

timers dag/nat lysregime og vandtemperatur mellem 11 og 13 °C. Fiskenes størrelse varierede i gennemsnit fra 3.2 cm og 0.35 g for Bristol Cove-laksen til 4.2 cm og 0.78 g for Mörrumlaksen. Infektion med *G. salaris* skete ved at inficeret Cononlaks fik en overdosis MS 222, hvorefter parasitter på afklippede finner blev talt, og en et antal svarende til 400 parasitter blev tilsat hvert kar med de afklippede finner. Finnerne blev fjernet efter to dage. Parasitterne blev talt under sterolup hver uge herefter i 7 uger, ved at bedømme samtlige fisk enkeltvis (50 mg/l MS 222). Beskrivelsen af forsøget (co-habiteringsforsøget) er i store træk taget fra Larsen (2003). Dødeligheder blev registreret ugentligt, og kontrolkarrets dødelighed blev kun noteret ved forsøgsafslutning.

I rapporten af Larsen (2003) blev data sat op i et histogram, hvor der på x-aksen ses uger efter forsøgets start og underinddeling af enkelte fiskearter til hvert tidspunkt (se figur 17).

Op ad y-aksen ses middelintensiteten af parasitter på de enkelte parasitter med standardafvigelser. Med udgangspunkt i disse data kunne man beregne en gennemsnitlig intensitet eller mean abundance til hvert af de syv tidspunkter på tværs af arter. Mean abundance er ikke oversat, da dækkende ord ikke findes på dansk. Definitioner på gennemsnitlig intensitet og mean abundance følger dem, som blev foreslået af Bush *et al.* (1997). Middelintensitet er antallet af parasitter på inficerede fisk divideret med antal inficerede fisk. Mean abundance er antallet af parasitter på inficerede fisk divideret med totalt antal fisk (også uinficeret). I beregningseksemplerne blev alle tal omregnet til mean abundance.



Figur 17 viser infektions udviklingen præsenteret med middelinintensitet med standardafvigelser for regnbueørred og fire stammer af atlantisk laks. Bogstaverne henviser til signifikante sammenhænge til enkelte tidspunkter i forløbet. Illustration: (Larsen 2003).

En præsentation af data, som ville være mere passende, når GLM anvendes som statistisk metode, ville være en graf for hver art og stamme af laksefisk. x-aksen skulle vise tiden, og y-aksen skulle vise mean abundance for hele karret divideret med mean abundance for hver art og stamme af laksefisk. Graferne kunne være for alle individuelle kar, men mere passende til GLM kunne være en samlet graf, hvor data fra alle karrene blev taget med. Fordelen ved at dividere med mean abundance for karret eller alle karrene ville være, at man tog populationsudviklingen ud af forsøget og kun så på relative sammenhænge mellem arter og stammer af laksefisks modtagelighed for *G. salaris*. Der ville ikke kunne sættes standardafvigelser på denne transformerende graf. For at få standardafvigelser på en præsentation, kunne man i en graf meget lig histogrammet i figur 17 præsentere standardafvigelserne. Standardafvigelserne blev taget ud af beregninger fra GLM i proceduren PROC GENMOD i SAS[®] Systemet, som automatisk generer dem, men standardafvigelser skulle eksponentielt transformeres tilbage fra programudskriften. Grafen ville vise det samlede resultat for alle kar, da kareffekten blev indregnet i GLM. Til udregning af generelle lineære modeller for rådata, som blev udlånt af bla. Michael Dalgaard (se bilag 1), anvendtes proceduren PROC MIXED til udregning af modellerne med og uden logaritmisk transformeret data. Til udregning af GLM for samme data anvendtes PROC GENMOD til udregning af modellerne med poisson og negativ binomial fordeling. Til parvis sammenligning af

arter og kar blev anvendt t-test. Alle modellernes residualer blev testet for normalitet med Shapiro-Wilks test, og ens varians blev vurderet i et residualplot. $-2 \times \log$ likelihood (deviansparameter) i en X^2 -fordeling blev brugt til at vurdere "Goodness of fit" for GLM og deviansparametret \bar{x}^2 / s^2 blev analogt brugt til at vurderer de generelle lineære modeller med og uden transformering af data.

Mortalitetsgrafer anvendes ofte ved smitteforsøg ved fisk (Madsen & Dalsgaard 1999; Larsen 2003). Overlevelsesgrafer derimod generer lettere tal til brug for dannelse af risikofunktioner til vurdering af proportionelle risici, og SAS[®] Systemet generer automatisk overlevelsesgrafer. I denne opgave vil der blive anvendt overlevelsesgrafer.

Til udregning af overlevelsesmodeller anvendtes proceduren PROC LIFETEST til at generere overlevelses- og risikografer. Proceduren PROC PHREG blev anvendt til beregning af Cox proportionale risiko model med kareffekt som co-variabel. Det var lidt vanskelig at teste, hvorvidt der var kareffekt, da man skulle sammenligne forskellen i $-2 \times \log$ likelihood estimater i en X^2 -fordeling i model med og uden co-variable (kareffekt). $-2 \times \log$ likelihood blev generet af PROC PHREG. Antallet af frihedsgrader var i dette tilfælde antallet af kar taget ind i den nye model minus en. Proceduren PROC PHREG generede også parvise sammenligninger mellem arter og kar vha. et "maksimum likelihood estimate".

10. Resultater

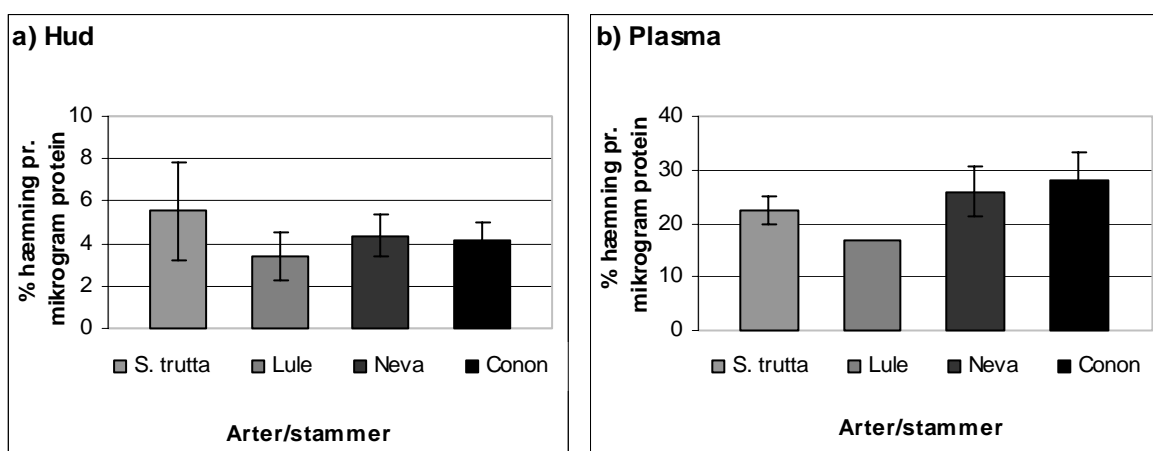
Resultater er analogt med materialer og metoder opdelt i resultater fra henholdsvis laboratorieforsøg og beregningsforsøg.

10.1 Resultater fra laboratorieforsøg

10.1.1 Resultater fra hæmning af lektiner med plasma- og hudprøver

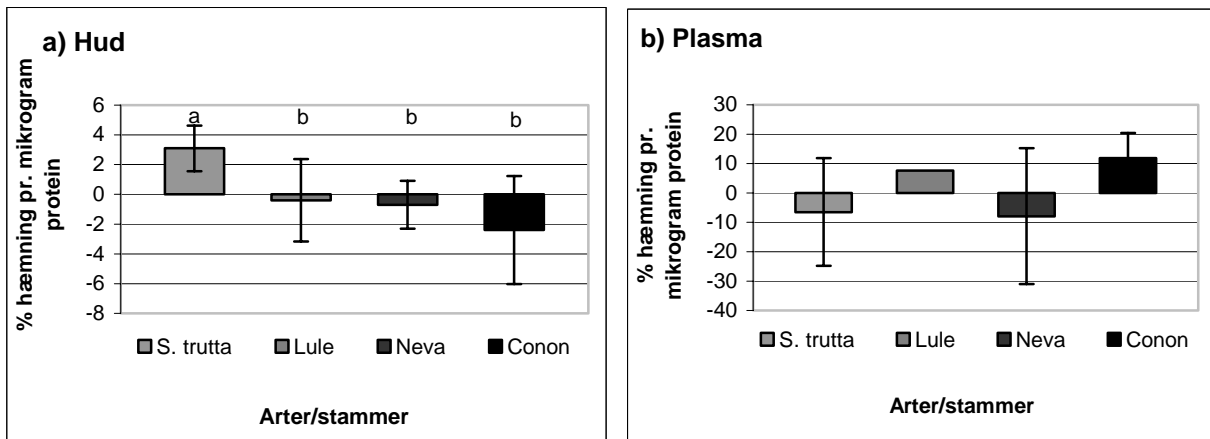
Ved alle test var residualer normalfordelte. Varianshomogeniteten blev vurderet i et residualplot, hvor højere hæmning gav mindre varians. Dette blev vurderet til at være uundgåeligt, og det vil diskuteres senere. Test blev ikke forkastet pga. mangel på varianshomogenitet. Standardafvigelser manglede på prøver fra Lulelaksene, det skyldtes at prøven bestod af en samlet prøve fra 10 fisk.

Hæmning af mannose vha. Con A viste ingen signifikante forskelle, men *S. trutta* hæmning lå over alle tre atlantiske laks ved hudprøverne (se figur 18).



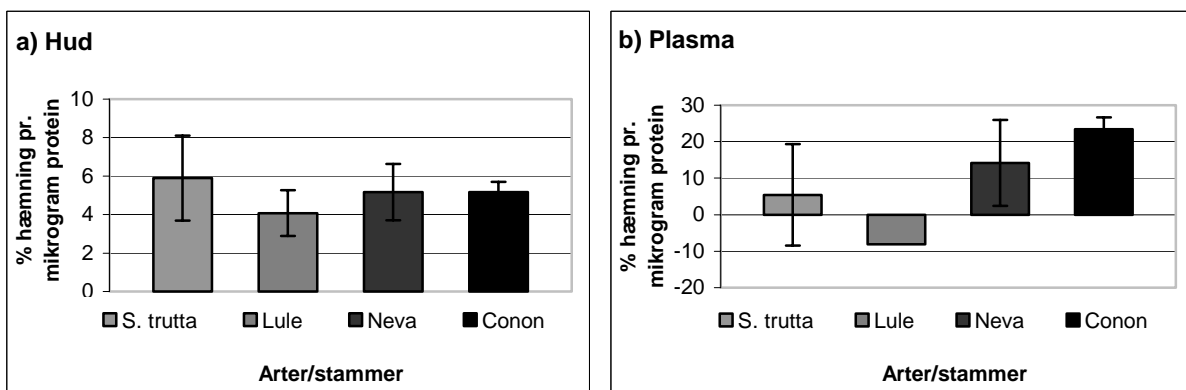
Figur 18 viser den procentvise hæmning pr. μg protein af Con A i a) hud og b) plasma med standardafvigelse i fire arter og stammer af laksefisk. Der var ingen signifikante forskelle mellem *S. trutta* og stammer af laksefisk.

Ved hæmning af β -D-GalNAc vha. *Triticum vulgare*-lektinet viste forsøget med hud en signifikant forskel, og de parvise sammenligninger viste signifikant forskel mellem *S. trutta* og de tre stammer af laks ($\alpha < 0.05$). Forsøg med plasma gav ingen signifikante forskelle (se figur 19).



Figur 19 viser den procentvise hæmning pr. μg protein af *Triticum vulgare*-lektinet i a) hud og b) plasma med standardafvigelse i fire arter og stammer af laksefisk. a) viser at der var signifikant forskel mellem *S. trutta* og stammer af laksefisk. Søjler markeret med samme bogstav var ikke signifikant forskellige, mens søjler med forskellige bogstaver var forskellige $p < 0.05$.

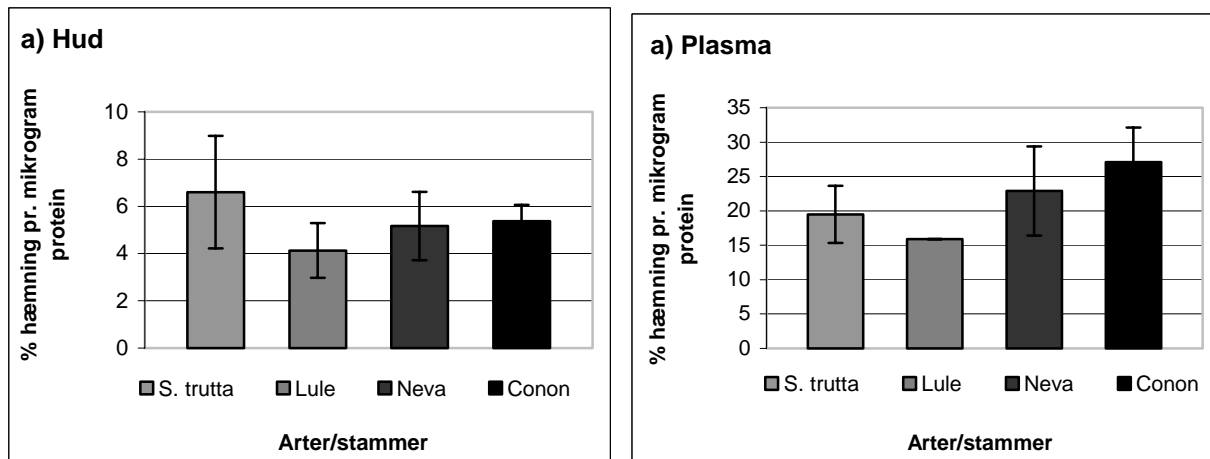
Ved hæmning af α -D-galactose vha. *Maclura pomifera*-lektinet viste forsøget ingen signifikante forskelle mellem *S. trutta* og stammer af laksefisk. Der blev observeret store forskelle i plasmaprøver med både positiv og negativ hæmning hos *S. trutta* (se figur 20). Der var en svag tendens til at *S. trutta* lå højere i hudprøverne.



Figur 20 viser den procentvise hæmning pr. μg protein af *Maclura pomifera*-lektinet i a) hud og b) plasma med standardafvigelse i fire arter og stammer af laksefisk. Der var ingen signifikante forskelle mellem *S. trutta* og stammer af laksefisk.

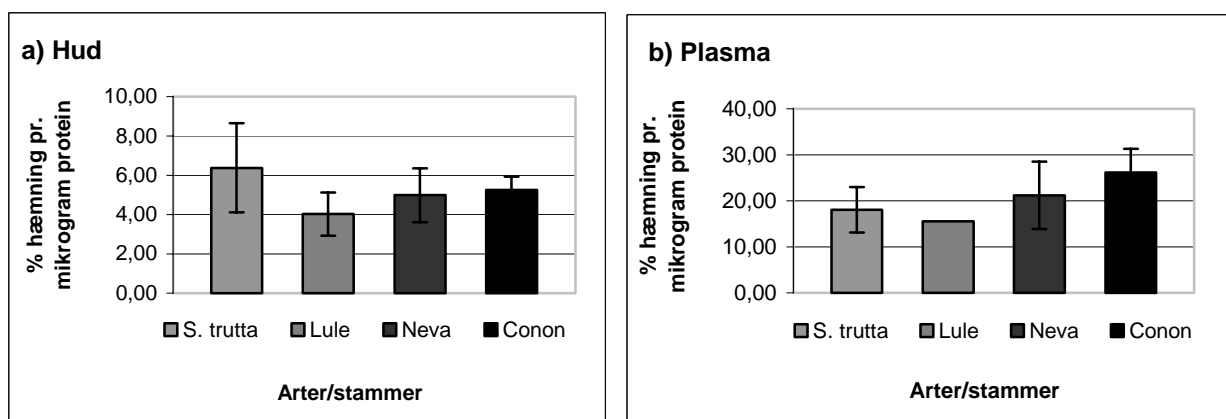
Ved hæmning af L-fucose (6-deoxygalactose) vha. *Ulex europaeus*-lektinet viste forøget ingen signifikant forskel mellem *S. trutta* og arter af laksefisk. Både ved hud- og plasmaprøver lå Lulelaksen på et lavere niveau end de tre andre (se figur 21). Interaktionen mellem længde af fisk og hæmning resulterede ikke i et signifikant udfald, selvom Lulelaksene var de mindste. Der blev ikke fundet nogen interaktion eller sammenhæng med størrelse af fisk og procentvis hæmning af

lektiner i nogle af forsøgene. Derfor præsenteres data om fiskenes størrelse ikke i opgaven. Der var en svag tendens til at *S. trutta* lå højere i hudprøverne.



Figur 21 viser den procentvise hæmning pr. μg protein af *Ulex europaeus*-lektinet i a) hud og b) plasma med standardafvigelse i fire arter og stammer af laksefisk. Der var ingen signifikante forskelle mellem *S. trutta* og stammer af laksefisk.

Ved hæmning af β -lactose vha. *Ricinus communis*-lektinet viste forsøget ingen signifikante forskelle mellem *S. trutta* og stammer af laksefisk (se figur 22). Der var en svag tendens til at *S. trutta* lå højere i hudprøverne.



Figur 22 viser den procentvise hæmning pr. μg protein af *Ricinus communis*-lektinet i a) hud og b) plasma i med standardafvigelse fire arter og stammer af laksefisk. Der var ingen signifikante forskelle mellem *S. trutta* og stammer af laksefisk.

10.1.2 Resultater fra lektinbinding til parasitter

Et stort antal af Fishers eksakte test blev gennemført for at sammenligne data. For hvert lektin vil resultater blive præsenteret i følgende rækkefølge.

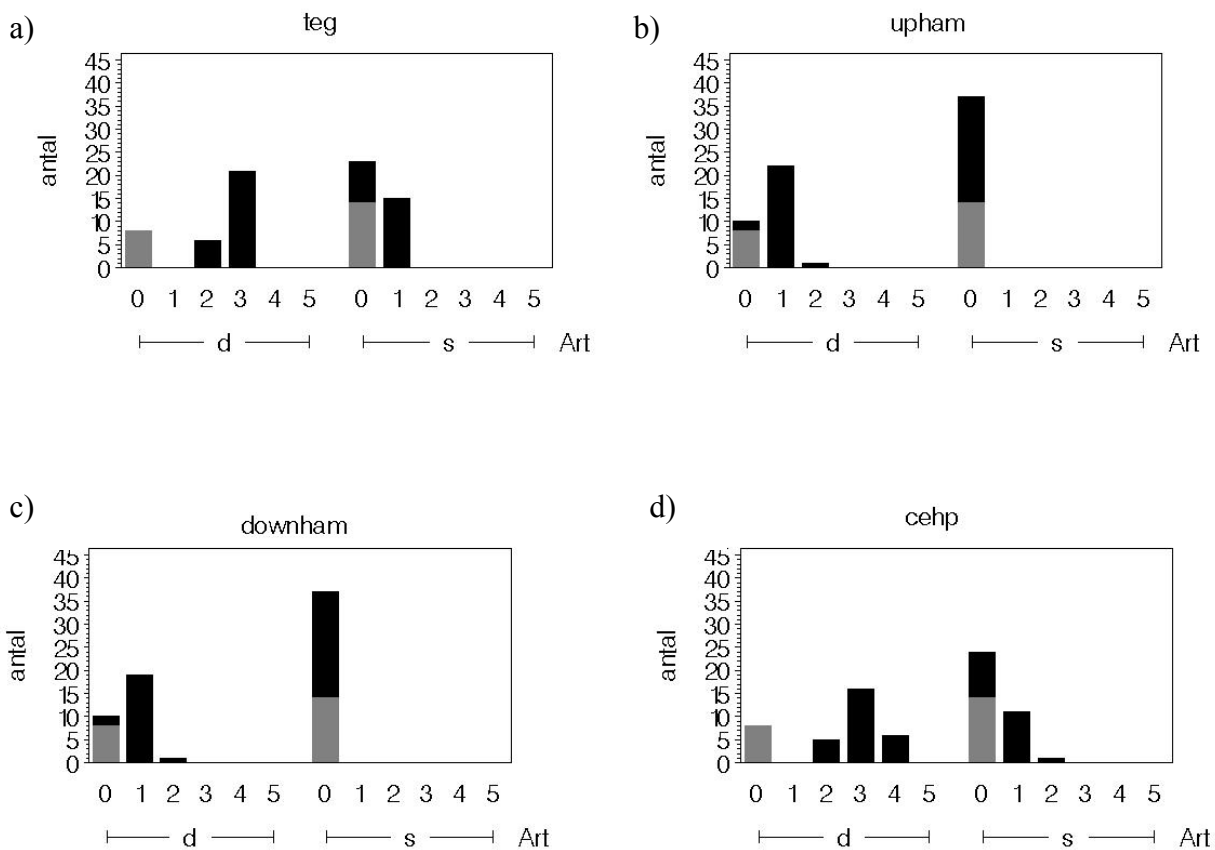
1. Test for om kontaktflader er signifikant farvede i forhold til deres negative kontrol.
2. Sammenligning af *G. derjavini* og *G. salaris* for hver af de fire kontaktflader (tegument, øvre og nedre hamuli og cephaliske lober).
3. Sammenligning af arternes negative kontroller, for at kontrollere for eventuelle forskelle i baggrundsfarvning.
4. Sammenligning mellem de forskellige kontaktfladers farveintensitet på henholdsvis *G. derjavini* og *G. salaris*.
5. Sammenligning mellem de forskellige negative kontrollers kontaktfladers farveintensitet på henholdsvis *G. derjavini* og *G. salaris*.

Ved alle test var det statistiske signifikantniveau $\alpha = 0.05$. På histogrammerne bliver negative kontroller repræsenteret ved grå søjler, mens lektinbehandlede dyr er sorte. Det er ikke meningen at histogrammerne skal aflæses i konkrete talværdier, men visuelt give en fornemmelse om fordelingen af individer mellem de forskellige farveintensiteter og mellem lektinbehandlede og deres negative kontroller. Det var ikke muligt i programmeringen af SAS-programmet, at lave parallelle grå og sorte søjler til de enkelte trin på den ordinale skala. Det er dog ikke vanskeligere at forstå histogrammet, end at søjler som er i forlængelse af hinanden, er et udtryk for ingen forskel i farveintensitet mellem kontrol dyr og lektinbehandlede dyr. Forkortelserne i figurene er; teg = tegument, upham = øvre hamuli, downham = nedre hamuli og ceph = cephaliske lober. Den ordinale skala er gentaget på x-aksen for *G. derjavini* og *G. salaris*, som er noteret med henholdsvis d og s under den ordinale skala. Det er grafernes overordnede mål, at præsenterer rådata mest kompakt for at reducerer mængden af grafer i opgaven.

I figurteksterne under billeder af parasitter kan ses eksempler på vurderinger af farveintensiteter fra 0 til 4. Farveintensiteten 5 blev kun observeret to steder på øvre hamuli, og var ikke mulig at visualisere på et billede.

α -D-mannose:

1. Der blev ikke fundet signifikant farvning af øvre og nedre hamuli for *G. salaris*. De resterende kontaktflader blev farvet signifikant i forhold til deres negative kontroller med en maksimum p-værdi på 7.1×10^{-4} (figur 22a-d).
2. Der blev fundet signifikant forskel mellem *G. derjavini* og *G. salaris* ved sammenligning af alle kontaktflader med en maksimum p-værdi på 7.3×10^{-11} (figur 22a-d).
3. Der blev ikke fundet nogen signifikant forskel mellem arternes negative kontroller



Figur 22a – d viser farveintensiteten ved brug af lektinet Con A, som er specifik overfor α -D-mannose. x-aksen viser farveintensiteten på en ordinal skala fra 0 til 5. y-aksen viser antallet af parasitter med pågældende farveintensitet. Histogrammerne er underinddelt i art ved henholdsvis d = *G. derjavini* og s = *G. salaris*. Der er statistisk signifikante forskelle mellem alle *G. derjavini* og *G. salaris* kontaktflader med maksimum p-værdi på 7.3×10^{-11} .

4. Ved *G. derjavini* blev cephaliske loper signifikant mest farvet, og tegumentet signifikant mere farvet en både øvre og nedre hamuli. Øvre og nedre hamuli blev ikke farvet signifikant forskelligt.

Ved *G. salaris* blev de cephaliske lober og tegumentet signifikant mere farvet end øvre og nedre hamuli.

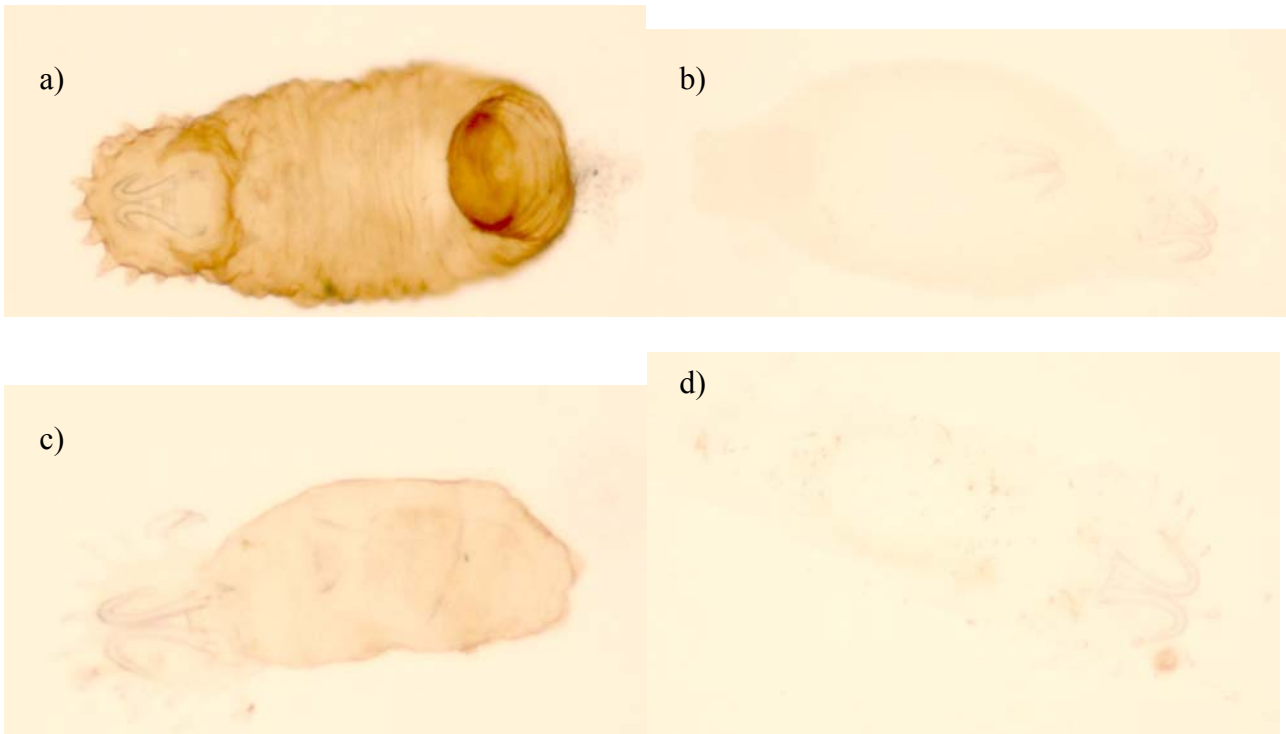
- Ingen signifikant forskel blev fundet ved sammenligning af kontaktfladernes negative kontroller.

Tabel 5a-b viser de parvise sammenligninger af forskellige kontaktflader ved brug af lektinet Con A, som er specifikt overfor α -D-mannose. P-værdien er givet i den nedre venstre del af tabellerne, og i den højre øverste del af tabellerne angives signifikant forskel med (*) og ingen signifikant forskel med (-).

a) <i>G. derjavini</i>	Tegument	Øvre hamuli	Nedre hamuli	Cephaliske lober
Tegument		*	*	*
Øvre hamuli	<0.0001		-	*
Nedre hamuli	<0.0001	0.8435		*
Cephaliske lober	<0.0395	<0.0001	<0.0001	

b) <i>G. salaris</i>	Tegument	Øvre hamuli	Nedre hamuli	Cephaliske lober
Tegument		*	*	-
Øvre hamuli	<0.0001		-	*
Nedre hamuli	<0.0001	1		*
Cephaliske lober	0.46	<0.0001	<0.0001	

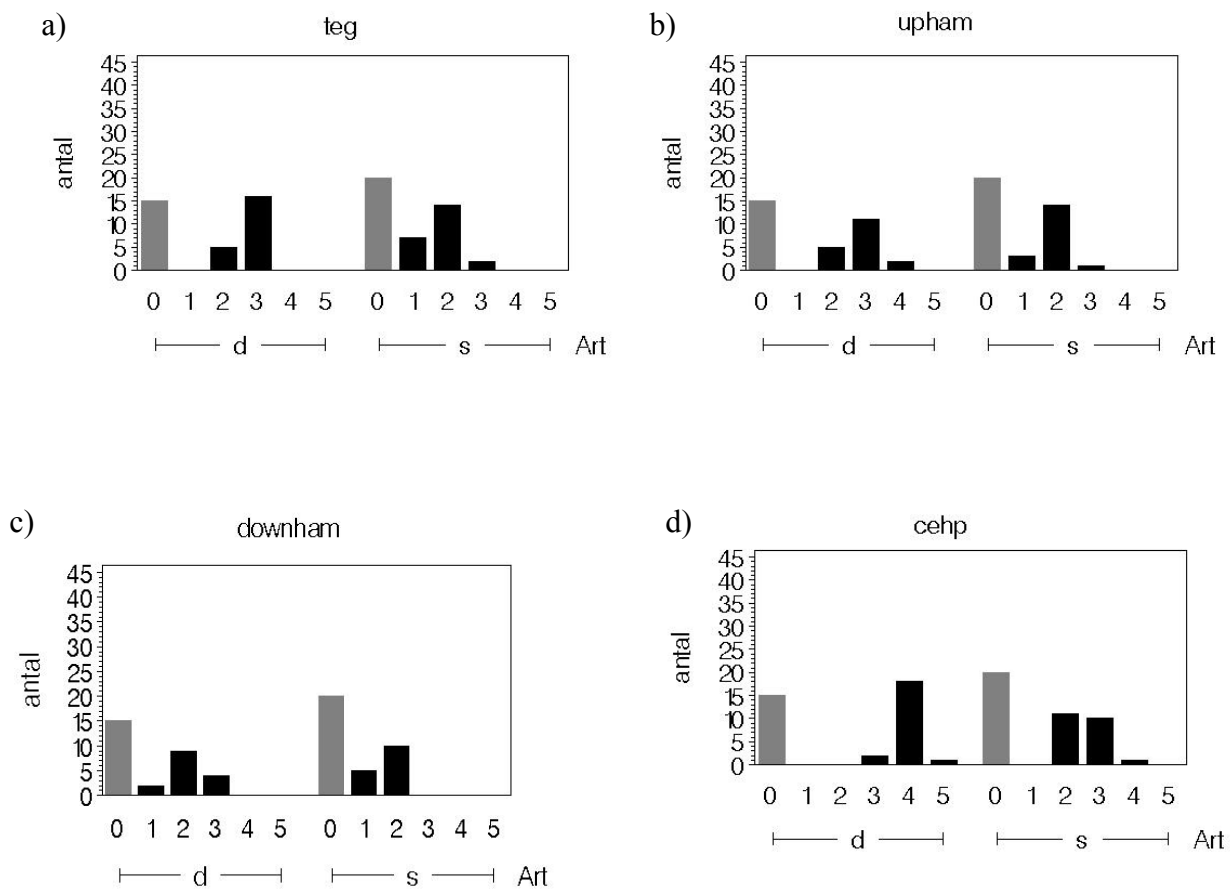
Billeder på figur 23 a-d viser eksempler på farveintensiteten ved brug af lektinet Con A, som er specifik overfor α -D-mannose. Gengivelsen af billederne er dårligere end, hvad der kan opnås ved at se direkte på præparatet gennem mikroskop. Billederne her kan kun gengive tegumentets og til dels cephaliske lobers farveintensitet. Skeden omkring hamuli er kun mulig at se ved at justere fokus frem og tilbage ved 400 gange forstørrelse. Billederne præsenteret i denne opgave blev taget ved 100 gange forstørrelse. Figur 23a-d visualiserer fint det, som er fundet signifikant i de parvise sammenligninger; at *G. derjavini* farves kraftigere end *G. salaris* og de negative kontroller ikke farves. Konturerne af kontrollerne anes pga. af lysbrydningen gennem dem.



Figur 23a-d viser a og b) *G. derjavini*, c og d) *G. salaris*. a og c) blev inkuberet med lektinet Con A specifikt overfor α -D-mannose, b og d) uden lektin. Farveintensiteten blev vurderet på en ordinal skale 0-5. Farveintensiteterne vurderes som følger: a) teg = 3, ceph = 4, øvre og nedre hamuli = 1. b) Teg, ceph, øvre og nedre hamuli = 0. c) Teg og ceph = 1, øvre og nedre hamuli = 0. d) Teg, ceph, øvre og nedre hamuli = 0.

α -D-GalNAc:

1. Der blev fundet signifikant forskel mellem samtlige kontaktflader og deres negative kontrol (figur 24a-d).
2. Der blev fundet signifikant forskel mellem alle kontaktflader på *G. derjavini* og *G. salaris* undtagen nedre hamuli, som havde en p-værdi på 0.0806 (figur 24a-d).
3. Der blev ikke fundet nogen signifikant forskel mellem arternes negative kontroller.



Figur 24 viser farveintensiteten ved brug af *Triticum vulgaris*-lektinet, som er specifikt overfor α -D-GalNAc. x-aksen viser farveintensiteten på en ordinal skala fra 0 til 5. y-aksen viser antallet af parasitter med pågældende farveintensitet. Histogrammet er underinddelt i art ved henholdsvis d = *G. derjavini* og s = *G. salaris*. Der er statistisk signifikant forskelle mellem alle *G. derjavini* og *G. salaris* kontaktflader med maksimum p-værdi på 1.3×10^{-8} .

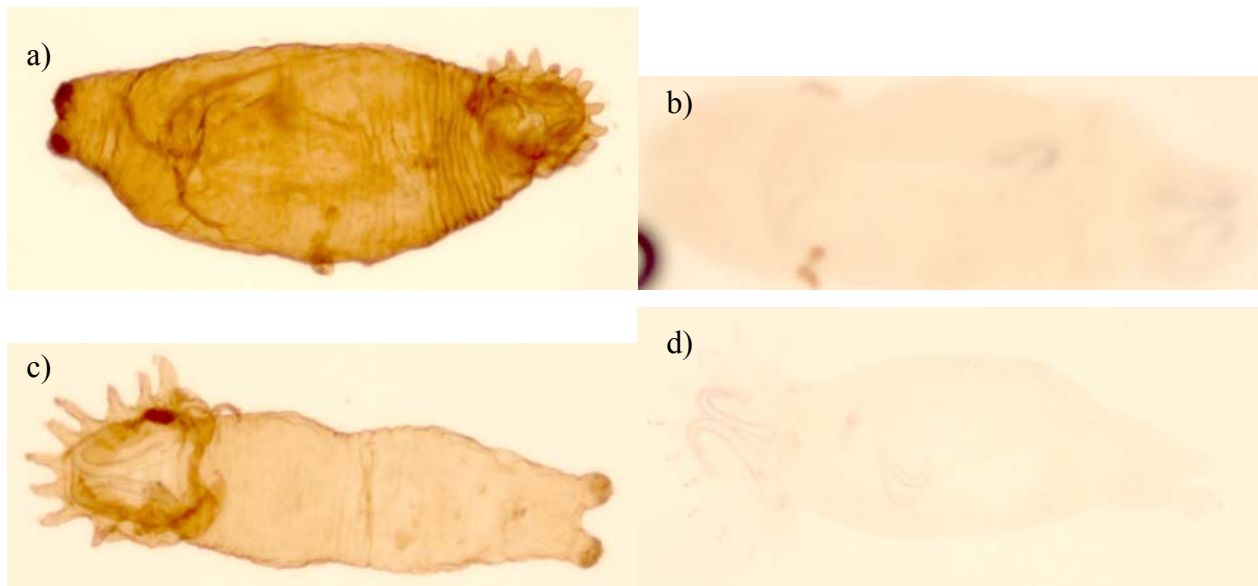
4. Ved *G. derjavini* blev de cephaliske lobarer signifikant mest farvet, mens tegumentet blev signifikant mere farvet end nedre hamuli.
Ved *G. salaris* blev kun de cephaliske lobarer signifikant mere farvet end de øvrige kontaktflader.
5. Ingen signifikant forskel blev fundet ved sammenligning af kontaktfladernes negative kontroller.

Tabel 6a-b viser de parvise sammenligninger af forskellige kontaktflader ved brug af *Triticum vulgare*-lektinet, som er specifikt overfor α -D-GalNAc. P-værdien er givet i den nedre venstre del af tabellerne, og i den højre øverste del af tabellerne angives signifikant forskel med (*) og ingen signifikant forskel med (-).

a) <i>G. derjavini</i>	Tegument	Øvre hamuli	Nedre hamuli	Cephaliske lober
Tegument		-	*	*
Øvre hamuli	0.2937		-	*
Nedre hamuli	0.0042	0.0304		*
Cephaliske lober	<0.0001	<0.0001	<0.0001	

b) <i>G. salaris</i>	Tegument	Øvre hamuli	Nedre hamuli	Cephaliske lober
Tegument		-	-	*
Øvre hamuli	0.59		-	*
Nedre hamuli	0.74	0.4184		*
Cephaliske lober	0.0011	0.0021	0.0002	

Billeder på figur 25 a-d viser eksempler på farveintensiteten ved brug af *Triticum vulgare*-lektinet, som er specifikt overfor α -D-GalNAc. De ses tydeligt, at de cephaliske lober farves kraftigere hos begge arter end de andre kontaktflader, og at *G. derjavini* farves generelt kraftigere en *G. salaris*. Dette blev testet statistisk signifikant.

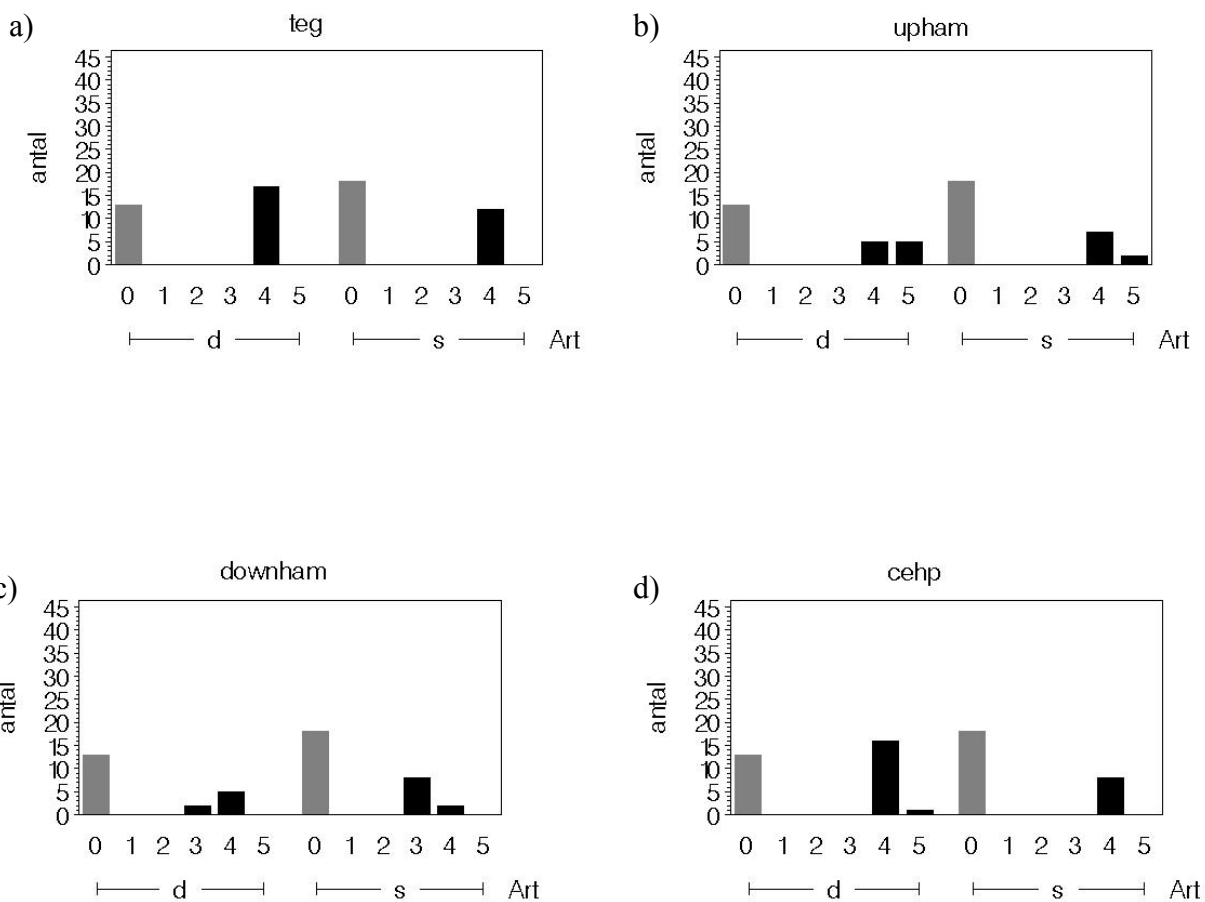


Figur 25a-d viser a og b) *G. derjavini* c og d) *G. salaris*. a og c) blev inkuberet med *Triticum vulgare*-lektinet specifikt overfor α -D-GalNAc, b og d) uden lektin. Farveintensiteten blev vurderet på en ordinal skale 0-5. Farveintensiteterne vurderes som følger: a) teg, øvre og nedre hamuli = 3, ceph = 4. b) Teg, ceph, øvre og nedre hamuli = 0 (dårlig billedkvalitet). c) Teg, øvre og nedre hamuli = 1, ceph = 2. d) Teg, ceph, øvre og nedre hamuli = 0.

c)

α -D-galactose:

1. Der blev fundet signifikant forskel mellem samtlige kontaktflader og deres negative kontrol (figur 26a-d).
2. Der blev ikke fundet signifikant forskel på kontaktfladerne mellem på *G. derjavini* og *G. salaris*
3. Der blev ikke fundet nogen signifikant forskel mellem arternes negative kontroller (figur 26a-d).



Figur 26a-d viser farveintensiteten ved brug af *Maclura pomifera*-lektinet, som er specifikt overfor α -D-Gal. x-aksen viser farveintensiteten på en ordinal skala fra 0 til 5. y-aksen viser antallet af parasitter med pågældende farveintensitet. Histogrammet er underinddelt i art ved henholdsvis d = *G. derjavini* og s = *G. salaris*. Der er ikke statistisk signifikante forskelle mellem alle *G. derjavini* og *G. salaris* kontaktflader.

4. Ved *G. derjavini* blev kun øvre hamuli signifikant mest farvet med P-værdier fra 0.0096 til 0.0251.

Ved *G. salaris* blev nedre hamuli signifikant mindre farvet end de andre kontaktflader.

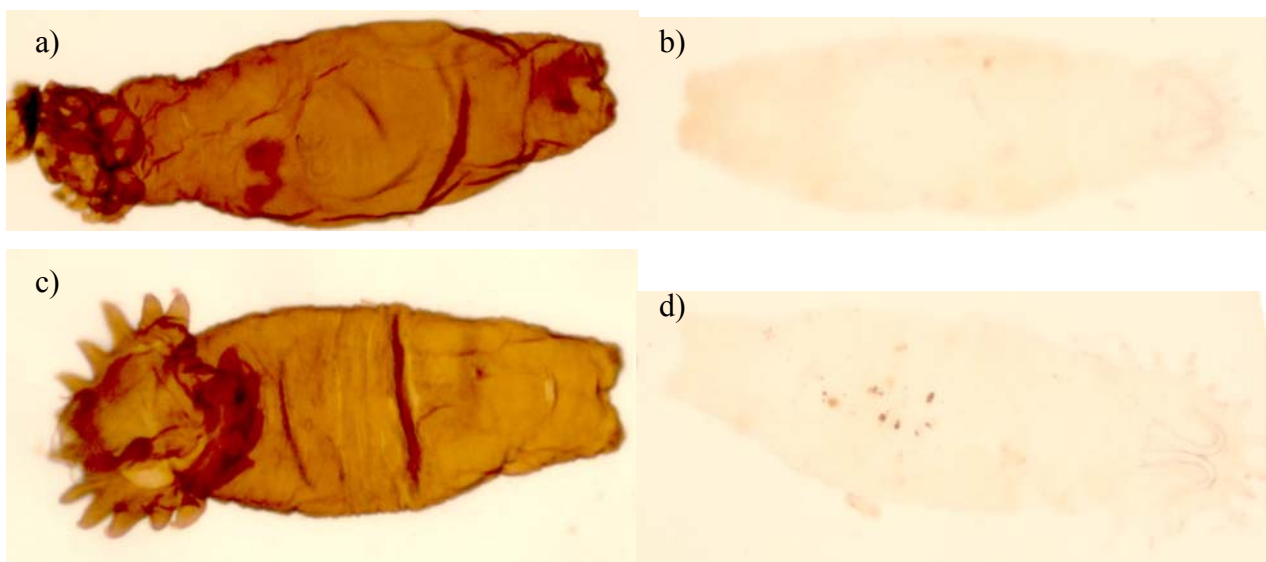
5. Ingen signifikante forskelle blev fundet ved sammenligning af kontaktfladernes negative kontroller.

Tabel 6a-b viser de parvise sammenligninger af forskellige kontaktflader ved brug af *Maclura pormifera*-lektinet, som er specifikt overfor α -D-Gal. P-værdien er givet i den nedre venstre del af tabellerne, og i den højre øverste del af tabellerne angives signifikant forskel med (*) og ingen signifikant forskel med (-).

a) <i>G. derjavini</i>	Tegument	Øvre hamuli	Nedre hamuli	Cephaliske lober
Tegument		*	-	-
Øvre hamuli	0.0096		*	*
Nedre hamuli	0.1228	0.0251		-
Cephaliske lober	1	0.0152	0.0761	

b) <i>G. salaris</i>	Tegument	Øvre hamuli	Nedre hamuli	Cephaliske lober
Tegument		-	*	-
Øvre hamuli	0.1718		*	-
Nedre hamuli	0.0001	0.0008		*
Cephaliske lober	1	0.4706	0.0011	

Billeder på figur 27a-d viser eksempler på farveintensiteten ved brug af *Maclura pormifera*-lektinet, som er specifikt overfor α -D-Gal. Der blev ikke fundet signifikante forskelle mellem arter. Få og ikke meget signifikante forskelle blev fundet mellem forskellige kontaktflader på *G. derjavini* og *G. salaris*.

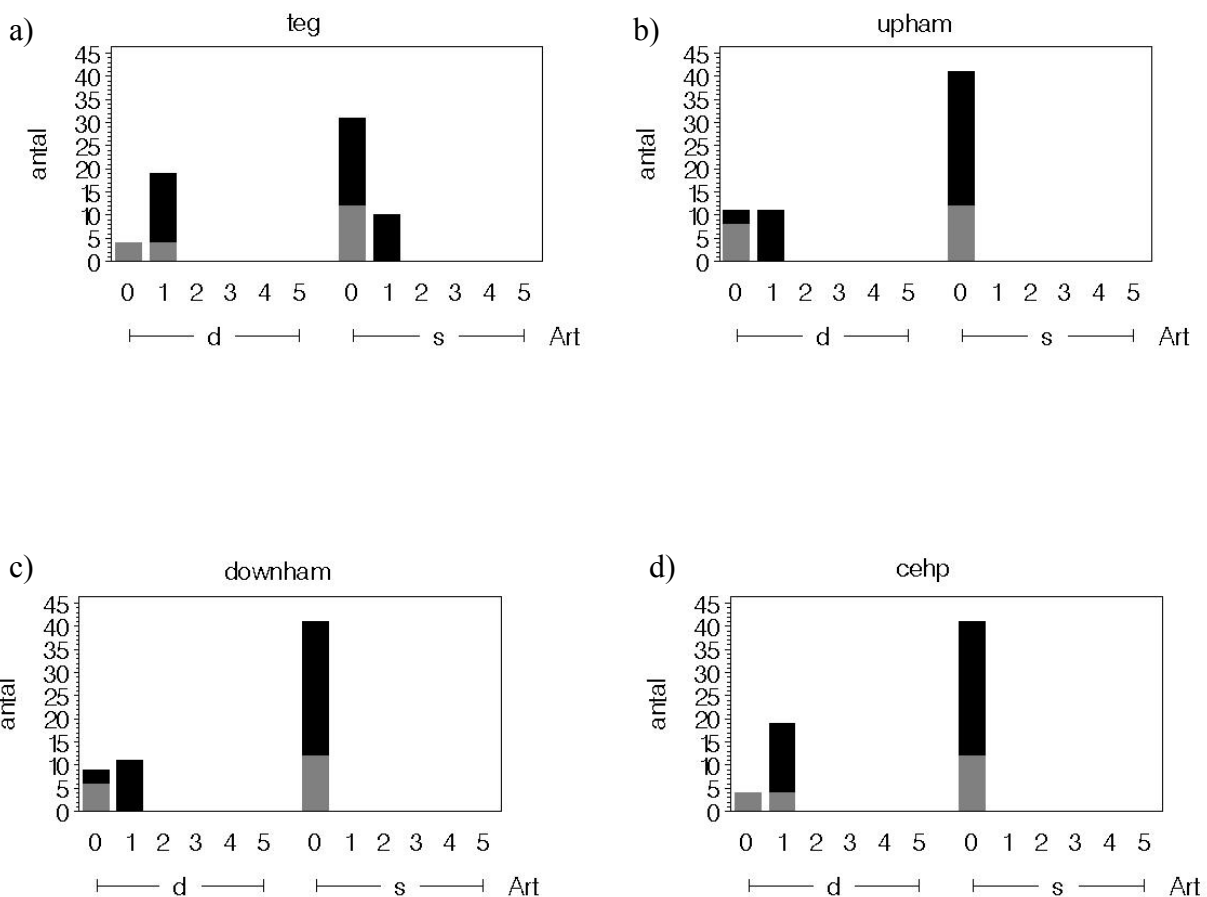


Figur 27a-d viser a og b) *G. derjavini* c og d) *G. salaris*. a og c) blev inkuberet med *Maclura pormifera*-lektinet specifikt overfor α -D-Gal, b og d) uden lektin. Farveintensiteten blev vurderet på en ordinal skala 0-5.

Farveintensiteterne vurderes som følger: a) teg og ceph = 4, øvre og nedre hamuli = (kunne ikke bedømmes), b) Teg, ceph, øvre og nedre hamuli = 0, c) Teg, øvre og nedre hamuli = 3, ceph = 4. d) Teg, ceph, øvre og nedre hamuli = 0.

L-fucose:

1. Der blev fundet signifikant forskel mellem samtlige kontaktflader hos *G. derjavini* og dens negative kontroller. Hos *G. salaris* blev kun tegumentet farvet signifikant forskelligt fra kontrollen med en p-værdi på 0.0206 (figur 28a-d).
2. Der blev fundet signifikant forskel mellem *G. derjavini* og *G. salaris* ved sammenligning af alle kontaktflader med en maksimum p-værdi på 1.6×10^{-5} (figur 28a-d).
3. Der blev ikke fundet nogen signifikant forskel mellem arternes negative kontroller med undtagelse af tegument og cephaliske lober, hvor forskellen med en p-værdi på 0.0144 måske var en artefakt (figur 28a-d).



Figur 28a-d viser farveintensiteten ved brug af *Ulex europaeus*-lektinet, som er specifikt overfor L-fucose. x-aksen viser farveintensiteten på en ordinal skala fra 0 til 5. y-aksen viser antallet af parasitter med pågældende farveintensitet. Histogrammet er underinddelt i art ved henholdsvis d = *G. derjavini* og s = *G. salaris*. Der er ikke statistisk signifikante forskelle mellem alle *G. derjavini* og *G. salaris* kontaktflader.

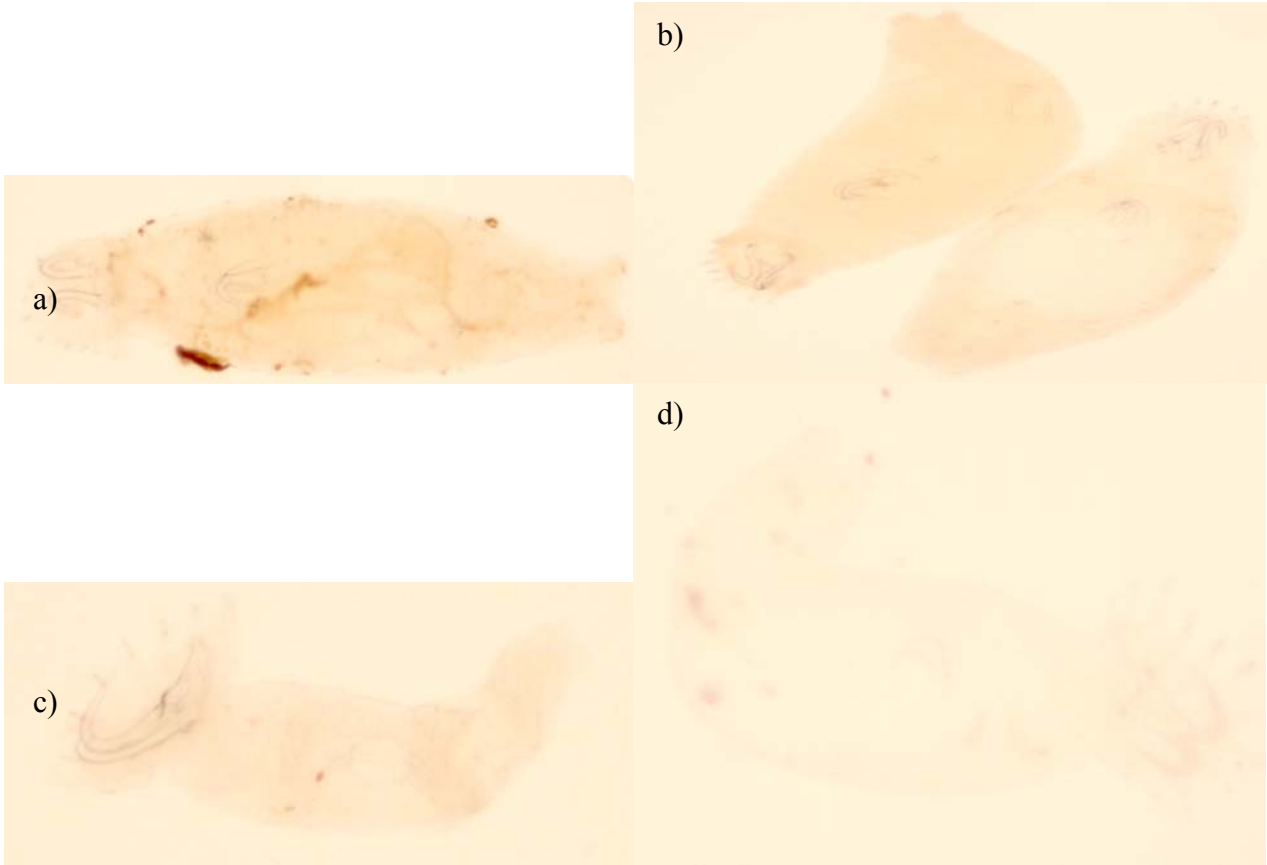
4. Der blev ikke fundet nogen signifikant forskel mellem kontaktflader hos *G. derjavini* og *G. salaris*.
5. Ingen signifikante forskelle blev fundet ved sammenligning af kontaktfladernes negative kontroller.

Tabel 7a-b viser de parvise sammenligninger af forskellige kontaktflader ved brug af *Ulex europaeus*-lektinet, som er specifikt overfor L-fucose. P-værdien er givet i den nedre venstre del af tabellerne, og i den højre øverste del af tabellerne angives signifikant forskel med (*) og ingen signifikant forskel med (-).

a) <i>G. derjavini</i>	Tegument	Øvre hamuli	Nedre hamuli	Cephaliske lober
Tegument		-	-	-
Øvre hamuli	0.0996		-	-
Nedre hamuli	0.0996	1		-
Cephaliske lober	1	0.0996	0.0996	

b) <i>G. salaris</i>	Tegument	Øvre hamuli	Nedre hamuli	Cephaliske lober
Tegument		-	-	-
Øvre hamuli	0.0769		-	-
Nedre hamuli	0.0769	1		-
Cephaliske lober	0.0769	1	1	

Billeder på figur 29a-d viser eksempler på farveintensiteten ved brug af *Ulex europaeus*-lektinet, som er specifikt overfor L-fucose. Resultatet er meget diffust. Dette ses på figur 29a, som er en *G. derjavini* positiv for lektinet Ulex. Den er ikke meget mere farvet end den kontrol *G. derjavini*, som ligger øverst på figur 29b. Det samme gør sig gældende for *G. salaris* figur 29c og d, hvor få individer havde let farvet tegument blandt de positive. På figur 29a ses flere mørke pletter ved parasitterne. Disse anses for artefakter og ikke som en del af parasitterne.



Figur 29a-d viser a og b) *G. derjavini*, c og d) *G. salaris*. a og c) blev inkuberet med *Ulex europaeus*-lektinet specifikt overfor L-fucose, b og d) uden lektin. Farveintensiteten blev vurderet på en ordinal skale 0-5. Farveintensiteterne vurderes som følger: a) teg og ceph, øvre og nedre hamuli = 1 (mørke pletter er artefakter). b) Teg og ceph på den øverste parasit = 1 og nederste parasit = 0, øvre og nedre hamuli for begge = 0, c) Teg, ceph, øvre og nedre hamuli = 0. d) Teg, ceph, øvre og nedre hamuli = 0.

Tabel 8 viser i en mere overskuelig form resultaterne fra forsøget, hvor de signifikante forskelle, som kan være relevante for lektin-carbohydrat interaktionen mellem laksefisk og *Gyrodactylus*, er taget med.

Tabel 8 viser en opsummering af de mest interessante resultater fra forsøgene med lektinbinding til parasitter. Den øverste række viser lektiner, og hvilken primærspecificitet de har over for carbohydrater.

	Con A-lektinet / α -D-man		<i>Triticum vulgare</i> -lektinet / α -D-GalNAc		<i>Maclura pormifera</i> -lektinet / α -D-gal		<i>Ulex europaeus</i> -lektinet / L-fucose	
Forskel i bindingen af lektin mellem <i>G. derjavini</i> og <i>G. salaris</i>	Mest bundet til <i>G. derjavini</i> .		Mest bundet til <i>G. derjavini</i> .		Ingen forskelle mellem arterne		Mest bundet til <i>G. derjavini</i> .	
	<i>G. derjavini</i>	<i>G. salaris</i>	<i>G. derjavini</i>	<i>G. salaris</i>	<i>G. derjavini</i>	<i>G. salaris</i>	<i>G. derjavini</i>	<i>G. salaris</i>
Forskel mellem bindinger af lektin mellem kontaktflader på de respektive parasitter	Mest bundet til cephaliske loper	Mest bundet til cephaliske loper og tegument	Mest bundet til cephaliske loper	Mest bundet til cephaliske loper	Mest bundet til øvre hamuli	Mindst bundet til nedre hamuli	Ingen forskelle mellem kontaktflader	Ingen forskelle mellem kontaktflader

10.2 Resultater fra beregningsforsøg

10.2.1 Resultater fra forsøg med nye deskriptive metoder

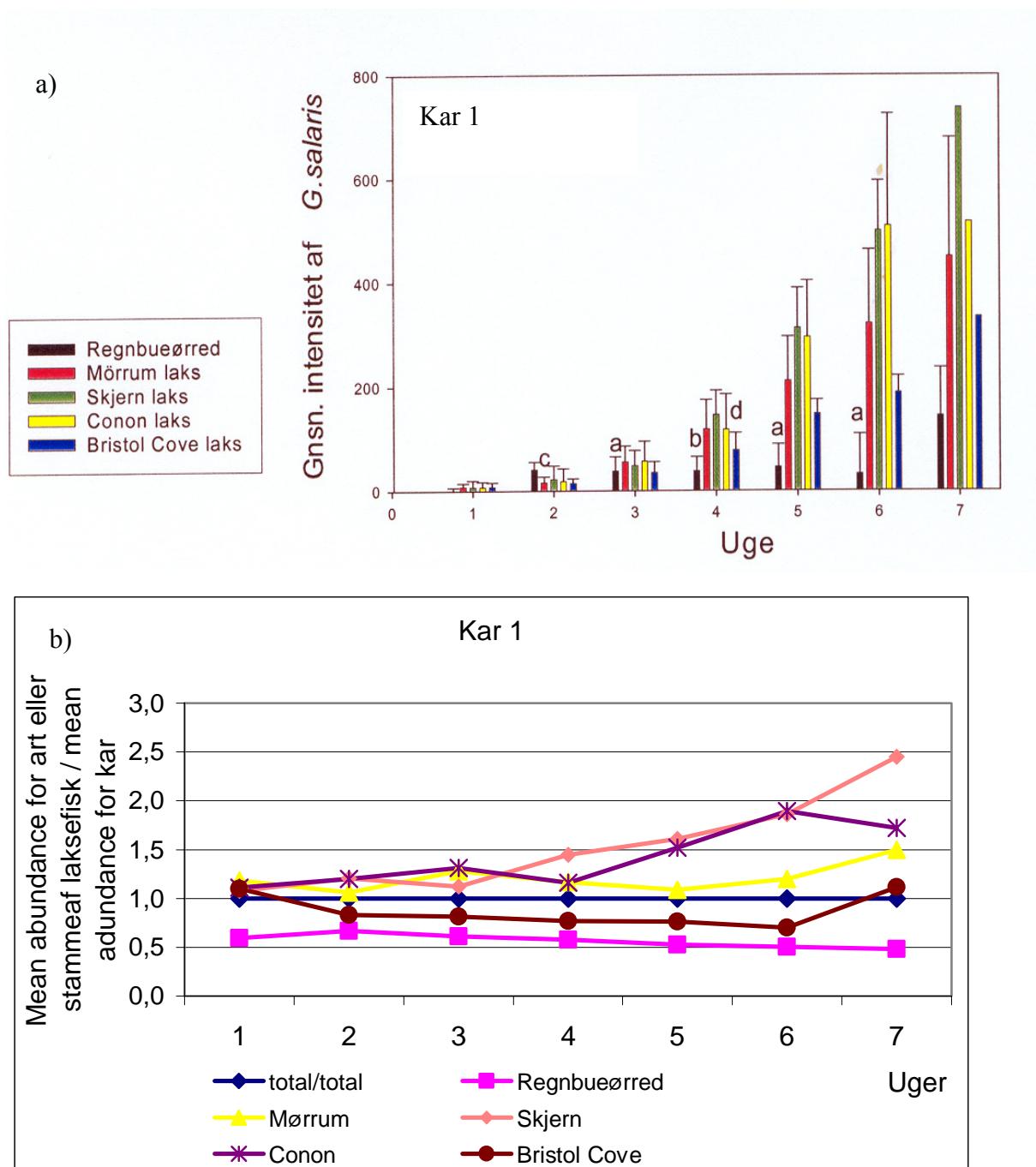
Figur 30a er Larsens (2003) præsentation af data i histogrammer med middelintensiteten af parasitter med standardafvigelser på y-aksen og tid i uger på x-aksen. Hver skraveret søjle repræsenterer en art eller stamme af laksefisk, og bogstaver indikerer at søjlen er signifikant fra en eller flere andre søjler i den enkelte uge.

Rådata er som tidligere nævnt lånt af bl.a. Michael Dalgaard KVL (se bilag 1). Rådata blev ændret i forhold til Larsens (2003) således, som det fremgår af figur 30b.

Figur 30b viser det samme som 30a, men data er ændret således, at mean abundance er beregnet i stedet for middelintensiteten. Middelintensitet og mean abundance var sammenfaldende i forsøget efter 3 uger, da prevalensen derfra og frem var 100 %. Desuden blev værdier på y-aksen ændret til et relativ begreb, hvor mean abundance for den enkelte art blev divideret med mean abundance for hele karret. Øgningen i den totale mængde af parasitter i karret blev derved sat til 1 ved alle uger.

Værdier over 1 repræsenterer arter og stammer, som havde en større belastning end gennemsnittet,

og værdier under 1 repræsenterer lavere belastninger end gennemsnittet. Kurveforløbene kan bruges til at vurdere, hvorvidt arter eller stammer af laksefisk responderer mod parasitten over tid relativt til de andre arter og stammer i co-habiteringsforsøget. Grafen i figur 30b kan ikke tilføjes standardafvigelser, da værdierne på y-aksen er relative.



Figur 30a viser data præsenteret ved middelintensitet med standardafvigelser på y-aksen, bogstaver indikerer signifikante forskelle mellem søjler den enkelte uge. Illustration af 30a (Larsen 2003). Figur 30b viser den relative værdi af mean abundance for hver art og stamme af laksefisk divideret med den totale mean abundance i karret beregnet ud fra de samme data som i figur 30a.

10.2.2 Resultater af generelle lineære modeller og GLM

Modellen, som er blevet anvendt, er af formlen:

$$(\text{antal parasitter}_{ij} = \mu + \text{kar}_i + \text{uge}_j + \text{arter/stammer}_{ij} + \varepsilon_{ij}).$$

Modellens parametre er; μ = overordnet middelværdi, kar_i = kar 1-3, uge_j = uge 1-7, $\text{arter/stammer}_{ij}$ = art/stamme i i' de kar i j' de uge og ε_{ij} = residualer.

Generel lineær model med utransformeret data blev forkastet, da residualer ikke var normalfordelte efter Shapiro-Wilks test (data ikke vist). Samme model med logaritmisk transformeret data viste det samme (data ikke vist). GLM med poissonfordeling havde et deviansparameter på 19.07 (tal tæt på 1 indikerer, at modellens estimering passer overens med observerede data). GLM med negativ binomialfordeling havde et deviansparameter på 1.20, hvilket indikerer, at denne model passer bedre til de observerede data. Resultatet af GLM blev, at både kar, art og stammer af laksefisk samt uge var signifikante for antallet af parasitter (se tabel 8). Hvis man vil kontrollere estimerne i forhold til de observerede værdier, skal estimerne for antal parasitter i tabel 8 omregnes vha. e^x . x er estimatet for middelværdien, som bliver lagt sammen med estimerne fra et af kar, en art/stamme og en uge. F.eks. 5.9236 (middelværdi) + 0.2506 (kar 1) + (-1.0307) (regnbueørred) + -4.0039 (uge 1) = 1.1396 , hvilket opløftet til $e^{1.1396} = 3.12$ parasitter pr regnbueørred i uge 1 i kar 1. De observerede data for regnbueørred i uge 1 kar 1 havde en mean abundance på 3.6. Alle de parvise sammenligninger er ikke taget med i tabel 8. Alle uger var signifikant forskellige fra hinanden. Kar 1 var signifikant forskellig fra kar 2 og kar 3. Alle arter og stammer af laksefisk var signifikant forskellige fra hinanden med undtagelse af Cononlaksen, som ikke var signifikant forskellig fra Mørrum- og Skjern Å-laksen. Variansen blev vurderet i et residualplot til at være ens.

Tabel 8 viser estimater af parametre, som er logaritmisk transformerede. Kar, art/stamme og uge blev testet for, om de var signifikante eller ej. Underinddelingen viser parvise sammenligninger med det niveau, hvis estimat er sat til 0. Overordnet middelværdi er angivet i første række.

Variabel	Niveau	Estimat	X ² -værdi	P-værdi
Middelværdi		5.9236		<0.0001
Kar			57.79	<0.0001
	1	0.2506	14.26	<0.0001
	2	-0.1117	2.96	0.0852
	3	0		
Art/stamme			311.49	<0.0001
	Regnbueørred	-1.0307	265.99	<0.0001
	Bristol (S. salar)	-0.5555	29.97	<0.0001
	Mørrum (S. salar)	-0.1279	4.55	0.0329
	Conon (S. salar)	-0.0076	0.01	0.9140
	Skjern (S. salar)	0		
Uge			1522,62	<0.0001
	1	-4.0039	2332.38	<0.0001
	2	-3.0376	1420.79	<0.0001
	3	-2.0037	621.26	<0.0001
	4	-1.2296	227.49	<0.0001
	5	-0.6534	62.18	<0.0001
	6	-0.3293	14.90	0.0001
	7	0		

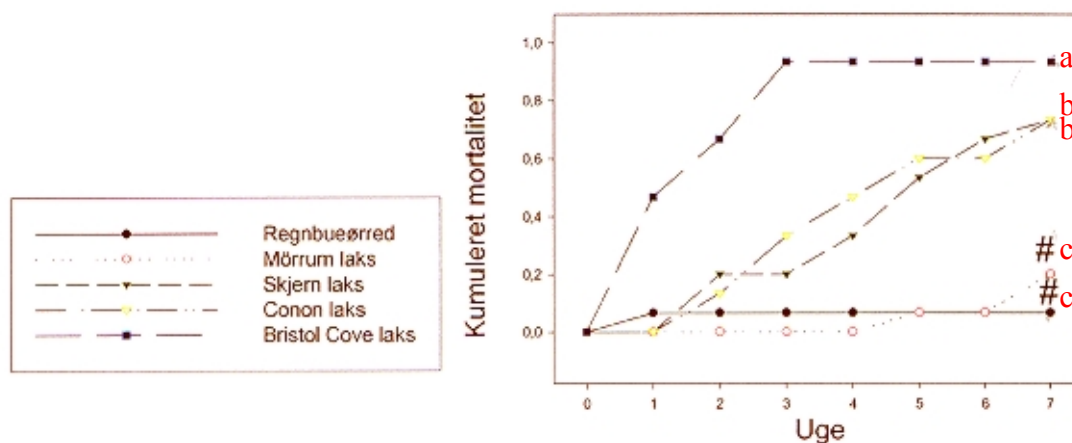
10.2.3 Resultater af overlevelsesanalyser

Rådata udlånt af bl.a. Michael Dalgaard KVL (se bilag 1) blev brugt til beregninger af overlevelsesanalyser. Figur 31 viser dødelighed for et enkelt kar (kar 3) og den nonparametriske test (Fishers eksakte test), som blev brugt til sammenligning ved sluttidspunktet (Larsen 2003). Et # i figur 31 indikerer signifikant forskel fra grafer uden notering.

Vha. Cox proportionale risiko model var det muligt at lave en model (beregninger kun foretaget i denne opgave), hvori kareffekten blev medregnet. Der blev ikke fundet signifikant kareffekt.

Testværdien, som blev testet i X²-fordeling med to frihedsgrader gav p-værdi > 0.10. I modellen

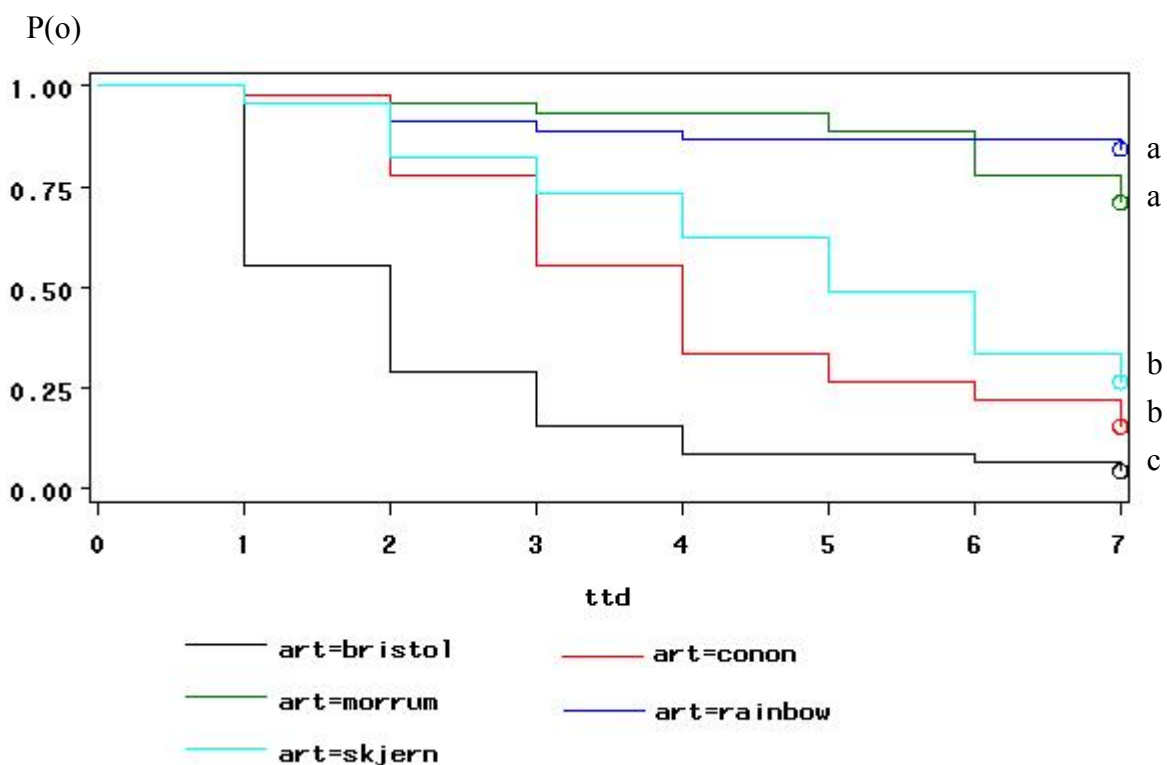
uden kareffekt var arter og stammers dødelighed signifikant forskellige med en p-værdi < 0.0001. Et **a**, **b** eller **c** i figur 31 indikerer signifikant forskel mellem parvise sammenligninger, hvis de ikke er noteret med samme bogstav. Noteringen for **a**, **b** og **c** i figur 31 gælder kun for kar 3.



Figur 31 viser dødelighedskurver for regnbueørred og atlantiske laks af stammerne Mørrum, Skjern Å, Conon og Bristol Cove Laks. Illustration efter (Larsen 2003).

Parvise sammenligninger på tværs af alle karrene viste, at regnbueørred og Mørrumlaksen ikke døde signifikant forskelligt, men at de døde signifikant mindre end de andre arter og stammer af laksefisk.

Skjern Å- og Cononlaksen døde ikke signifikant forskelligt, men de døde mindre end Bristol Covelaksen (se figur 32). Der blev ikke testet for, hvorvidt størrelsen af fisk havde betydning. Noteringen a, b og c betyder det samme i figur 32 som i figur 31, og cirkelsymbolet viser, hvornår der blev foretaget censurering. Der blev kun foretaget højrecensurering.



Figur 32 viser sandsynligheden for overlevelse $P(o)$ som funktion af tid til død (ttd) i uger for fire atlantiske laks og regnbueørred. Censurering udelukkende ved forsøgets afslutning, som er vist ved en cirkel. Parvise signifikante forskelle indikeres ved forskellige bogstaver ud for kurverne. Art skal ikke tages bogstaveligt i teksten, men er blot navnet for den variabel, som er blevet brugt for at adskille de fire atlantiske laks og regnbueørred (rainbow).

11. Diskussion

Diskussionen er opdelt i henholdsvis diskussion af laboratorieforsøg og beregningsforsøg. Derefter følger en samlet diskussion og perspektivering af lektin-carbohydrat interaktioner og statistiske analysemetoder.

11.1 Diskussion af laboratorieforsøg

11.1.1 Diskussion af kompetitiv hæmning af lektin med plasma- og hudprøver

Generelt viste ingen af forsøgene signifikante forskelle. Den eneste undtagelse var hæmning af *Triticum vulgare*-lektinet, som hæmmer β -D-GalNAc, hvor bækørreders hudprøver hæmmede signifikant mere end de tre stammer af atlantisk laks. Ved dette tilfælde havde alle atlantiske laks en negativ hæmning. Med negativ hæmning menes, at prøverne slet ikke hæmmede i forsøget, men

derimod øgede signalet i forhold til det signal, som kom fra de positive kontrolprøver. Hvordan kan det forklares? Der kan være to måder, hvorved man kan forestille sig signalet kan forstærkes.

1) Hudprøverne indeholdt stoffer, som bandt sig til de immobiliserede carbohydrater på bunden af mikrotiterpladen, og de havde selv flere epitoper med affinitet over for det kommercielle lektin. Desuden var antallet af epitoper, som de ukendte stoffer anvendte på mikrotiterpladen, lavere end det antal, de kommercielle lektiner udnyttede.

2) Hudprøverne indeholdt stoffer, som bandt sig til epitoper på det kommercielle lektin, hvorpå der fandtes yderligere epitoper, som havde affinitet over for det kommercielle lektin.

Hvorvidt der var indflydelse fra den ene eller den anden interaktion eller begge, var umuligt at vurdere. Derfor var det yderst vanskeligt at tolke disse resultater.

En del systematiske fejl (bias) findes i forsøgsopsættet, derfor mener jeg, det ville være yderst spekulativt at udtale sig om relationerne med carbohydratgenkendende stoffer i hud- og plasmaprøver.

En af de systematiske fejl ligger i, at hæmningsdynamikken i forsøget ikke blev klarlagt.

Hæmningen fulgte sandsynligvis ikke en lineær udvikling, som er forudsat i udregningerne. Der kunne ikke ud fra forsøgsdata regnes med andet end en lineær sammenhæng, da hver prøve kun blev testet i en fortynding én enkelt gang. Der var en tydelig tendens til, at data, som ikke var korrigeret for proteinindholdet i hver prøve, havde en større standardafvigelse end, hvis de havde en hæmning mindre end 90-100 % (data ikke vist). Variationen udlignede sig en del ved transformation af data, således at varianshomogenitet blev opnået.

Alle prøver burde testes vha. en række fortyndinger, hvorved hæmningen som funktion af proteinmængden kunne fastslås og sammenlignes. Et muligt godt estimat for sammenligning ville være proteinkoncentrationen ved 50 % hæmning. I forsøgene i denne opgave lå hudprøverne alle over 50 % med undtagelse af β -D-GalNAc (data ikke vist). Ved nogle plasmaprøver lå β -D-GalNAc og α -D-gal under 50 % (data ikke vist). For α -D-gal's vedkommende var det udelukkende prøven fra Lulelaksen, som havde et negativt hæmningsniveau.

Plasmaprøverne fra Lulelaksen var en blandet prøve med plasma fra 10 fisk, hvor en del af de røde blodlegemer blev lyseret ved prøvetagning. Dette gav sig udslag i en rødfarvning af prøven. Derfor er resultater fra plasmaprøver fra Lulelaks generelt tvivlsomme, da effekten af hæmolyseringen tilsyneladende har megen betydning for hæmningen af α -D-gal.

En mulig forbedring af forsøget ville være at oprense prøverne vha. sukkerderivat kromatografi. Med det menes, at der bruges en søjle med sukkerderivaten, som ønskes undersøgt, hvorigennem hud eller plasmaprøve køres. Efterfølgende kunne fraktionen, som er bundet i søjlen, udvaskes og køres på en gelfiltration kromatografi efter størrelse. Herved kunne man måske komme nærmere en hæmning forårsaget af et stof eller stoffer, som er aktive i fiskens hud.

En bias, som til stadighed ville være at finde var, at proteiner indeholdt i den nu oprensede prøve kunne være glykosylerede. Derved kunne sidekæderne have affinitet overfor det kommercielle lektin. Dette problem var også tilstede i opgavens laboratorieforsøg. Prøverne i laboratorieforsøgene indeholdt ydermere alle hudens lektiner og sukkerderivater, som måtte findes i form af opløste glykoproteiner og –lipider. Disse kunne hæmme de kommercielle lektiner i prøven ved at forhindre dem i at binde til sukkerderivater på bunden af mikrotitterpladen.

Fiskene i forsøget blev ikke opdrættet under samme vilkår. Specielt skiller *S. trutta* sig ud ved at gå i netbure i en Å. Hvilken betydning det havde for huden er uvis, men *S. truttas* hæmning af lektiner i huden lå ved alle tilfælde højere end ved de tre atlantiske laks, selvom kun en af de fem lektiner faldt ud signifikant. Årsagen til at forskelle ikke blev statistiske signifikante, skyldes måske hovedsageligt det lille antal forsøgsdyr (se tabel 9).

Tabel 9 viser antallet af forsøgsfisk for bækørred og de tre atlantisk laks ved henholdsvis hud- og plasmaprøver.

Art/stamme	Antal hudprøver	Antal plasmaprøver
Bækørred	5	5
Lulelaks	5	1
Nevalaks	5	5
Cononlaks	4	4

Antallet af forsøgsdyr i forsøgene blev begrænset af tilgangen til dyr på tidspunktet for forsøget udførsel. Mængden af forsøgsmateriale fra hver enkelt fisk var ikke tilstrækkelig til at lave fortyndingsrækker.

Lysregimet for *S. trutta* og Lulelaksen havde begge en længere dagslængde på 15 og 16 timers dagslængde. Hvilken betydning det havde, er også uvis.

Et noget anderledes opsæt ville være at genere prøver til hæmning af lektin ved at skære hud af fisk og inkubere det i et vækstmedie. Derefter kunne vækstmediet med mellemrum skiftes, og det udtagne vækstmedie kunne bruges som indikator på, hvad huden udskilte af aktive stoffer. Dette er forsøgt gjort af Xu *et al.* (2002), som undersøgte vækstmediet fra hud afskåret fra u- og inficeret amerikansk elvmalle med Ich. De fandt i et Western-blot et bånd på 70-kDa i vækstmediet. Dette bånd tilsvarede den tunge kæde i immunoglobulin hos maller. I det samme forsøg blev det vist, at immune mallers afskårne hud i vækstmediet kunne immobilisere Ich og forhindre inficering af theronter, hvorimod hud fra uinficerede maller blev inficeret og ikke kunne immobilisere theronter.

Opsummering af resultater uden hensyntagen til bias.

Der var i forsøgene en signifikant forskel mellem *S. trutta* og stammer af atlantisk laks ved brug af *Triticum vulgare*-lektinet med primærspecificitet over for β -D-GalNAc i hudprøver. Desuden var der en svag tendens til den samme sammenhæng ved alle de andre hudprøver. Det synes usandsynligt, at *S. trutta* generelt var bedre til at hæmme alle de testede lektiner end de andre, medmindre den store forskel mellem *S. trutta* og stammer af atlantisk laks var andelen af O-acetylering på N-bundne glykaner. Dette er beskrevet som værende meget høj for atlantisk laks (Ylonen *et al.* 2001). En høj andel sialinsyre hos atlantisk laks kunne måske forklare den observerede forskel mellem arterne. Desværre blev der ikke forsøgt hæmning med et lektin specifikt overfor sialinsyre, hvilket kunne have belyst dette aspekt. Dette var specielt interessant, hvis sialinsyre som foreslået af Varki (1997) havde betydning for genkendelse af invasionssteder for mikroorganismer. Dette kunne bytte om på fortolkningen af forsøgsopstillingen, da formålet ikke længere var at finde mulige immunologisk aktive lektiner hos fisken, men derimod var formålet at finde forsvarsmekanismer i form af acetylering hos fisken. Denne omvendte fortolkning er måske mere korrekt, da lektiner, som binder sialinsyre, primært er udtrykt i hæmatopoetiske celler (Crocker & Varki 2001). Lektiner som binder sig til sialinsyrer kaldes siglecs (Sia-bindende-Ig-lignedelektiner) og findes som transmembrane molekyler i mennesker (Crocker & Varki 2001).

Forsøgsopsæt og metode i denne del af opgaven er ikke særlig anvendelig, i sin nuværende form, da den kun kan vise eventuelle forskelle mellem diffuse niveauer af lektinhæmning. At korrelere

forskelle mellem modtageligheder for parasitter opnået her, ville være at antage årsagssammenhængen, som må anses for umulige ud fra de interaktioner og systematiske fejl beskrevet ovenfor.

Resultaterne for plasma var ikke signifikante og havde store udsving med både positiv og negativ hæmning. Generelt lå Cononlaks højere end *S. trutta* og de andre stammer af atlantisk laks, men det antages ikke for direkte at kunne relateres til modtagelighed overfor *G. derjavini* og *G. salaris* i disse forsøg. Det skyldes at begge arter på overfladen primært lever af epidermis, hvori der ikke findes blodårer. Der kunne dog være en sammenhæng mellem basisniveau af lektiner i blodet og andre sygdomme hos laksefisk, som for eksempel bakterielle-, virale- eller blodbårne parasitsygdomme. Det betragtes uden for denne opgaves formål, at redegøre for disse andre sygdomsrelationer.

Det ville med et forbedret forsøgsdesign være interessant at måle på niveauet af lektinhæmning under et infektionsforløb. Dette ville måske belyse om laksefisk er medfødt resistente eller responderer mod *Gyrodactylus*-arter ved hjælp af en øgning i bestemte lektiner i hud og plasma.

11.1.2 Diskussion af lektinbinding til parasitter

Resultater ved direkte binding af lektiner til parasitter var ikke behæftet med samme omfang af bias. En alvorlig bias var, at flere af de anvendte lektiner havde affinitet over for forskellige carbohydrater. *Triticum vulgare*-lektinet binder sig for eksempel med forskellig affinitet overfor GlcNAc i oligomerformer, hvilket gjorde det vanskeligt at bestemme, hvilket sukkerderivat og -konformation det kommercielle lektin bandt til. Con A, som i lektinhæmning blev brugt sammen med mannose bundet på mikrotitterplader, har udover mannose også affinitet overfor α -D-glucosyl. Derfor var det ikke nødvendigvis det stof, som lektinet angives at have primærspecificitet over for, som lektinet faktisk bandt sig til. Denne diffuse specificitet gav også forsøget med lektinhæmning en yderligere bias i kraft af at hæmmende stoffer i prøverne ikke kun behøvede at være én type carbohydrat. Fortolkningen af resultaterne var derfor igen diffuse, men at lektiner bandt sig til noget var givet. Mangel på monospecifikke lektiner gav derfor et fortolkningsproblem, da der ikke kunne redegøres for diverse krydsbindinger til andre sukkerderivater. Forsøget gav stadig mulighed for at vurdere og sammenligne forskelle, men ikke for at præcisere hvilke carbohydrater, som var tilstede på parasiternes overflader.

Resultaterne viste, at der generelt var forskel på sammensætningen af carbohydrater på kontaktfladerne mellem *G. derjavini* og *G. salaris*. Dette var gældende for alle lektiner med undtagelse *Triticum vulgare*-lektinet med specificitet overfor α -D-galactose. Her blev alle parasitter kraftigt farvet, og små forskelle var svære at skelne. For at opnå et resultat som måske lettere kunne skelnes, kunne lektinkoncentrationen på 10 μ g/ml sættes ned eller man kunne forkorte inkubationstiden af fremkaldelsen, som i forsøget var på 5 min.

For Con A-lektinet primært specifikt over for α -D-mannose blev *G. derjavini* signifikant mere farvet end *G. salaris* ved alle kontaktflader. Størst farvning sås ved de cephaliske lober hos *G. derjavini*, som tidligere blev vist i lignende forsøg af Buchmann (1998a).

G. salaris er ikke tidligere blevet testet for carbohydrater på dens overflade. Resultaterne viste, at dens cephaliske lober ikke farvedes mere end dens tegument eller hamuli, som var tilfældet hos *G. derjavini*. Det kunne tyde på, at dette mannose-rige område på de cephaliske kirtler hos *G. derjavini* måske kunne genkendes af fiskens MBL.

Hvis regnbueørred ikke har MBL, som foreslået af Skjoldt (2002), men i stedet har lektiner med affinitet overfor galactose, er det måske forklaringen på, hvorfor regnbueørred er modtagelig overfor *G. derjavini*. Dette er rent spekulativt, da man endnu ikke ved, hvilke MBL-lignende lektiner, der findes i *S. trutta* og atlantisk laks, og om dette måske kan korreleres med modtagelighed.

For *Triticum vulgare*-lektinet primært specifikt over for α -D-GalNAc blev *G. derjavini* signifikant mere farvet end *G. salaris* ved alle kontaktflader. Cephaliske lober blev på begge arter mest farvet. Det var vanskeligt at præcisere forskellene, da specificiteten over for *Triticum vulgare*-lektinet var diffus. Det kunne derfor ikke udelukkes, at lektinet bandt sig til to vidt forskellige sukkerderivater på de to arter. Ficoliner, som er en undergruppe af collektiner, er kendt for at aktivere komplement i det humane immunforsvar og at have affinitet overfor GalNAc (Lu *et al.* 2002). Ficoliner er nært beslægtet med klassisk MBL og det var derfor interessant om fisk havde tilsvarende lektiner. En mulig forklaring på værtspecificiteten kunne være, at modtagelige stammer af laksfisk ikke havde et GalNAc-bindende lektin, mens resistente eller responderende stammer ikke havde lektinet. Jeg har ikke fundet meget relevant litteratur til at underbygge en diskussion om modtagelighed, da det kendskab til α -D-GalNAc, som er beskrevet i litteraturen, hovedsageligt omhandler GalNAc i

association med human kræftforskning. Forsøg udført af Buchmann (1998a) viste ved brug af andre lektiner med specificitet over for GalNAc-derivater en generel ensartet binding til *G. derjavini*.

For *Maclura pormifera*-lektinet primært specifikt over for α -D-galactose blev alle områder på begge parasitter kraftigt farvet. Ingen forskelle blev observeret mellem arterne og kun få forskelle mellem kontaktflader på de enkelte arter. En ændring af forsøgsopstillingen, hvor farvningen blev knap så kraftig, kunne måske afsløre forskelle i binding af lektinet mellem de to arter. Lektiner med specificitet overfor galactose er indtil videre fundet i flere fiskearter og kunne måske bidrage væsentligt til en del af forklaringen for værtspecificitet eller modtagelighed.

Tilsvarende forsøg udført af Buchmann (1998a) viste ved brug af andre lektiner med specificitet over for galaktosederivater en general ensartet binding til *G. derjavini*.

For *Ulex europeus*-lektinet primært specifikt over for L-fucose blev *G. derjavini* signifikant mere farvet end *G. salaris* ved alle kontaktflader. *G. salaris* blev ikke farvet mere end dens egen kontrol. Ingen har tidligere undersøgt dette carbohydrat på *Gyrodactylus*-arter, men et lektin i ål er fundet med specificitet over for L-fucose (Bianchet *et al.* 2002). Lektinet bliver af disse forfattere sat i forbindelse med binding lipopolysakkarid-laget på bakterier og andre organismer. På trods af at bindingen kun gav en svag signifikant farvning af *G. derjavini*, kunne dette måske forklaringen på forskellen i værtspecificiteten eller modtagelighed. L-fucose er specielt interessant, da den er mest udbredt blandt lavere eukaryoter (Kornfeld & Kornfeld 1985).

Den generelle tendens var, at lektiner bandt sig mest til *G. derjavini*, og flere af lektinerne bandt mest til cephaliske lobe. Sialinsyrer kunne måske igen være årsagen til denne forskel i kraft af højere andel af acetylering hos *G. salaris*. Sialinsyre burde testes før der drages for mange konklusioner ud fra dette forsøg.

Der blev generelt ikke fundet sammenhænge mellem binding af lektiner til hamuli, som kunne hjælpe med at forklare værtspecificiteten.

Den ordinale skala, som blev brugt, er ikke tidligere set anvendt i lignende forsøg. Præcis beskrivelse af hver enkelt farveintensitet eksisterede ikke, da observationerne blev foretaget. Der

blev undervejs i forsøget brugt tidligere observationer som referencer, og ens intensiteter blev krydstjekket ved stikprøvekontrol. Der blev ved stikprøvekontrol ikke fundet, at ens-vurderet intensiteter var vurderet forkert i forhold til andre med samme intensitet. Observationerne blev ikke udført som en blindtest, men det antages ikke for at være et problem, da ingen hypotese om resultatet var sat op på forhånd.

Ved en gentagelse af forsøget ville det være muligt at opstille en række referenceindivider, som kunne bruges til at give ensarte vurderingerne. Desuden ville blindtest og brug af to eller flere personer til at vurdere farveintensiteten formindske subjektiviteten i vurderingen.

En anden tilgang ville være at lade en computer vurdere farveintensiteten på et defineret område og dermed give et kvantitativt kontinuert udtryk, som med en variansanalyse let kunne sammenlignes. Dette udtryk ville stadig være underlagt subjektivitet i udvælgelsen af det valgte området. Det ville være vanskeligt at teste andre områder end tegumentet, da foldninger i både hamuliskeder, cephaliske lober og bagvedliggende områder på parasitten ikke ville være mulige at få et mål for. Derfor ville den subjektive vurdering af disse områder bedre kunne bruges end computerprogrammer, da parasitter ofte ikke ville blive fikseret ens mht. foldninger.

Hvis der var bedre tid til laboratoriearbejdet, ville en efterfølgende blindtest og defineret af referenceindivider kunne gennemføres og sammenlignes med den oprindelige vurdering af resultaterne. Dette ville give et mål for denne eventuelle bias.

En samlet vurdering af modtagelighed og lektin-carbohydrat interaktioner vil komme i afsluttende samlet diskussion af laboratorie- og beregningsforsøg.

11.2 Diskussion af beregningsforsøg

11.2.1 Diskussion af nye deskriptive metoder

Den nye deskriptive metode, som blev vist på figur 30b, viste at en relativ tilgang til parasitantal var velegnet til at vurdere relative sammenhænge mellem fiskearter. Den umiddelbare fordel var, at populationstilvæksten i hele karret, var taget ud af forsøget og sat til 1 ved alle tællinger. Derved kunne det anskueliggøres, hvorvidt parasit udviklingen forløb på de forskellige værter som et nettoresultat af samtlige demografiske parametre i karret såsom død, fødsel og migration af parasitter. Nettomigration af parasitter var et samlet udtryk for migration forårsaget af intraspecifik konkurrence, immunrepons fra værten, migration fra døde værter og tilfældig migration. Figur 30b viste tydeligt, at regnbueørred var mindre modtagelig, mens Conon-, Skjern Å- og Mørrumslaksen mean abundance lå højere end karrets mean abundance. Hvorvidt Mørrumslaksen derved var

modtagelig eller ej var svært at redegøre for, da forholdet var et relativt begreb i forhold til de andre arter. Bristol Covelaksen bliver ikke kommenteret nærmere her, da de var udsat for en høj dødelighed, som ikke kun kunne tilskrives parasitinfektionen, da høj dødelighed blandt Bristol Covelaks også forekom i kontrolkarret. En ulempe ved de relative mål for parasitinfektioner var, at det ikke var muligt at angive standardafvigelser på grafen.

11.2.2 Diskussion af generelle lineære modeller og GLM

De generelle lineære modeller, som blev undersøgt med og uden transformerede data viste, at det ikke var muligt at opnå en normalfordeling af residualer. Dette lå helt på linie med, hvad Wilson & Grenfell (1997) fandt i et omfattende forsøg med sammenligning af parasitdata og statistiske metoder. De viste yderligere, at brug af logaritmisk transformerede data i en generel lineær model gav mange flere Type 1 fejl i forhold til en GLM med Poissonfordeling eller negativ binomialfordeling.

I denne opgaves beregningsforsøg viste det sig, at den bedste model blev opnået med en negativ binomialfordeling, hvilket ofte er tilfældet med makroparasitpopulationer (Shaw *et al.* 1998). Forsøgene viste en signifikant effekt af kar, vært og uger efter starttidspunktet for infektion. Den sidste effekt var ikke overraskende signifikant. Effekten fra kar var ikke ønskelig, men den gav ikke videre problemer, da deviansparameter på 1.20 ikke var bekymrende langt fra 1.

Resultaterne viste klart, at regnbueørreden var mindst modtagelig, og Mørrumslaksen var delvis modtagelig, mens både Skjern Å- og Cononlaksen var mest modtagelige. Bristol Covelaksen bliver heller ikke her kommenteret yderligere, da der var høj dødelighed i kontrolkarret.

GLM med negativ binomialfordeling kunne yderligere udbygges til at teste for effekt af fiskenes størrelse eller andre parametre, som kunne forklare årsagssammenhænge.

11.2.3 Diskussion af overlevelsesanalyser

De nonparametriske metoder til at vurdere dødeligheder manglede åbenlyst brugen af de gentagne målinger, som alligevel blev registreret i de fleste forsøg. Derimod gav den semiparametriske model, der blev anvendt, en sammenligning af kurveforløb over tid, hvor der var mulighed for at medtage co-variable til at øge forklaringsgraden. I den semiparametriske model kunne der ud over kareffekten også medtages effekten af fiskens størrelse eller mean abundance af parasitter for hver art og stamme af laksefisk. Det blev ikke gjort, men ville være oplagt, specielt mht. den høje

dødelighed, som blev observeret for Bristol Covelaksen. Bristol Covelaksen vejede mindre end det halve af Mørrumslaksen.

Mean abundance blev tidligere i opgaven vist at være afhængig af art og stamme af laksefisk, hvilket ville være den mest oplagte forklarende variabel ud over størrelse. Den semiparametriske model kunne ydermere teste for tidsafhængige variable og derved teste for, hvorvidt variable ændrede sig over tid. Det kunne være mean abundance, hvorimod art og stamme af laksefisk ikke ville være tidsafhængig.

Overlevelsen i kontrolkarret blev ikke registreret ugentligt, men kun ved forsøgets afslutning (se tabel 10). Dette gav et problem, når der skulle fortolkes på de observerede forskelle i overlevelse af fiskene i kontrolkar og de tre infektionskar. Dødeligheden var ved forsøgets afslutning ikke stabiliseret, hvilket begrænsede fortolkningen af data til kun at omfatte det tidsrum, som blev testet. Hvis dødeligheden var ophørt, kunne mere generaliserede fortolkninger om arters chancer for at overleve en infektion bedre bedømmes. Overlevelsesanalyserne blev i dette tilfælde yderst handicappet af mangel på observationer i kontrolkarrene og mangel på test af betydningen af fiskenes størrelse og infektionsniveau. Test for fiskenes størrelser og infektionsniveau blev ikke gennemført i denne opgave pga. mangel på tid.

Tabel 10 viser overlevelsen af de forskellige laksefisk i co-habiteringsforsøget i henholdsvis 3 infektions kar og et kontrolkar. Data fra (Larsen 2003)*.

Art/stamme	Samlet overlevelses i de 3 infektionskar i %	*Overlevelses i kontrolkar i %
Regnbueørred	84	87
Mørrum	71	60
Skjern	26	60
Conon	15	60
Bristol Cove	4	0

11.3 Sammenfattende diskussion og perspektivering

Hvorvidt der var en sammenhæng i værtsspecificitet mellem lektiner, som var til stede i og på fiskens hud og carbohydrater på overfladen af *Gyrodactylus*-arter blev ud fra dette forsøg ikke klarlagt. Dette skyldtes hovedsageligt de problemer med bias, som hele forsøget var behæftet med som beskrevet tidligere i opgaven. Det er dog ikke usandsynligt at nogle af de forskelle, som blev fundet havde betydning for værtsspecificiteten. De mest sikre resultater var i forsøget med lektinbinding til parasitter. De viste på trods af stor usikkerhed i lektinernes specificitet, at flere sukkerderivater fandtes eksponeret i større antal på *G. derjavini* end på *G. salaris*. Hvis man forsøgte at korrelere denne forskel med at *S. trutta* er modtagelig overfor *G. derjavini*, og at *S. trutta* samtidig hæmmede alle lektiner mest, ville man få et resultat noget, som modsagde sig selv. Den modsigelse kommer i kraft af, at teorien om lektiners aktive rolle i immunforsvaret skyldes deres tilstedeværelse, deres evne til at genkende og diskriminere mellem fremmede og egne celler og at de initierer et immunrespons.

Resultaterne fra lektinhæmning hos de atlantiske laks kunne ikke forklare forskellen mellem de baltiske og den atlantiske stamme, idet ingen forskelle blev registreret.

En anden forklaring på modtagelighed kunne være sammensætningen i mucus og epitelet hos fisken. Disse kunne indeholde stoffer, som var essentielle for parasiternes reproduktion. Derved var den mulige medfødte resistens hos baltiske stammer af laks et spørgsmål om stofsammensætning. Laks, som efterfølgende responderede mod parasitten, ændrede måske deres stofsammensætning, således at parasitterne ikke længere kunne reproducere sig.

Laksen kunne sandsynligvis også respondere immunologisk, hvilket ville have den samme effekt på populationen af parasitter.

Mekanismer bag evnen til at respondere mod parasitten er endnu ikke klarlagt, men en fortsat fokusering på immunologiske forskelle mellem stammer af atlantisk laks med forskellige modtageligheder ville måske løse gåden. En bedre forståelse af, hvordan den baltiske laks rekoloniserede Østersøen, ville måske kunne bidrage til løsningen, hvis en immunologisk forskel var nedarvet igennem en lang tids isolation og sameksistens med *G. salaris*.

Metoder, som blev anvendt i beregningsforsøgene, viste sig yderst anvendelige til at detektere signifikante årsagssammenhænge og burde anvendes fremover ved både parasitinfektionsstudier og overlevelsesanalyser. Deres åbenbare fordele ved langt sjældnere at producere både Type 1 fejl og Type 2 fejl, kunne forhindre fejlkonklusioner, og mere komplekse årsagssammenhænge kunne sammensættes i én model. Hvis man skulle løse gåden: Hvorfor der er forskel på stammer af

atlantisk laks's modtagelighed over for *G. salaris*, og ligger denne forskel gemt i lektinsammensætningen hos fisken, er det nødvendigt at benytte en mere kompliceret model, da der højest sandsynlig er et utal af lektiner i mucus og på overfladen af laksene. Ud fra de fund, som er gjort på andre fiskearter, kunne man forvente at finde C-type lektiner med flere forskellige specificiteter end mannose. Derudover kunne man forvente at finde en eller flere af følgende lektin-grupper; fucolektiner, CRP, S-type lektiner (galectiner) og siclecs.

Siclecs er måske de mest interessante i forbindelse med disse forsøg, da de måske kan forklare både den mindre binding af alle lektiner til *G. salaris* og den relativt lavere lektinhæmning hos de atlantiske laks.

Carbohydratkonformationer, som er initierende for et immunrespons forårsaget af lektiner, vil sandsynligvis enten være konformationer, der er generelle for én dyregruppe, eller som er skabt i et "våbentkapløb" i en co-evolution mellem parasit og værten.

I kraft af at *G. salaris* overlever og formerer sig bedst på stammer af laks fra Atlanten, tyder det på, at forklaringen skal findes i det immunrespons, som de baltiske stammer er i stand til at respondere med.

Bilag 1

København d. 29 august 2003

Tilladelse til specifik brug af lånt rådata.

Hermed gives tilladelse til at Steen Jørndrup kan bruge det af Michael Dalgaard, Thomas Bjerre Larsen og Kurt Buchmann genererede rådatamateriale i sit afsluttende speciale ved Biologi, Bergen, Norge.


Datamaterialet omfatter rådata genereret i forbindelse med forskning på Den Kongelige Veterinær og Landbohøjskole, Frederiksberg, i salmoniders respons og modtagelighed overfor hudparasitten *Gyrodactylus salaris*. Denne forskning er del af EU-projektet "The Genetic Basis of *Gyrodactylus salaris* Resistance in Atlantic Salmon, *Salmo salar*" (QLRT 2000-01631). Rådata består af parasitællinger på individuelle fisk fra triplikater foretaget over syv uger. Inkluderede salmonider var laks fra floderne Bristol Cove (Canada), Mörrum (Sverige), Connon (Skotland), Lule (Sverige) og regnbueørred (Danmark). Et manuskript baseret på dette materiale er fremsendt til publicering.

Tilladelsen gives udelukkende til Steen Jørndrups brug af rådata til anskueliggørelse af forskellige statistiske metoders eventuelle anvendelighed på dette rådatasæt. Tilladelsen til brug af rådata inkluderer således ikke brug eller citering af det til rådatasættet hørende manuskript, inklusiv dets indhold af udregninger, statistisk udregninger og konklusioner.

Det skal af Steen Jørndrups speciale tydeligt fremgå at al citering af det udlånte rådatamateriale og al citering af Steen Jørndrups behandling og konklusioner baseret på disse rådata, kun kan foretages efter specifik skriftlig tilladelse fra Michael Back Dalgaard, Thomas Bjerre Larsen og Kurt Buchmann.

Anden brug af rådata eller dele af manuskriptet kan kun ske efter specifik skriftlig forhåndsaftale.

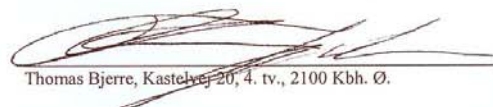
Accept af ovenstående :


Steen Jørndrup, Højdevej 4, 3. th., 2300 København S

Tilladelse til ovenstående :


Kurt Buchmann, Department of Veterinary Microbiology, Section of Fish Diseases,
Royal Veterinary and Agricultural University, Stigbøjlen 4, 1870 Frederiksberg C.,
Denmark


Michael Dalgaard, Department of Veterinary Microbiology, Section of Fish Diseases,
Royal Veterinary and Agricultural University, Stigbøjlen 4, 1870 Frederiksberg C.,
Denmark


Thomas Bjerre, Kastelvej 20, 4. tv., 2100 Kbh. Ø.

Denne aftale er underskrevet i to enslydende eksemplarer.

Referencer

Allen A. K., Neuberger A., & Sharon N. (1973) Purification, Composition and Specificity of Wheat-Germ Agglutinin. *Biochemical Journal* 131: 155-162.

Allison P. D. (1995a) Estimating and Comparing Survival Curves with PROC LIFETEST. In: *Survival Analysis Using the SAS System - a Practical Guide* pp. 29-60. SAS Publishing, Cary, North Carolina.

Allison P. D. (1995b) Estimating Cox Regression Models with PROC PHREG. In: *Survival Analysis Using the SAS system* pp. 111-184. SAS publishing, Cary, North Carolina.

Allison P. D. (1995c) Estimating Parametric regression models with PROC LIFEREG. In: *Survival analysis Using the SAS System* pp. 61-110. SAS Publishing, Cary, North Carolina.

Anderson R. M. & Gordon D. M. (1982) Processes Influencing the Distribution of Parasite Numbers Within Host Populations with Special Emphasis on Parasite- Induced Host Mortalities. *Parasitology* 85: 373-398.

Arason G. J. (1996) Lectins as defence molecules in vertebrates and invertebrates. *Fish & Shellfish Immunology* 6: 277-289.

Bakke T. A., Harris P. D., & Cable J. (2002) Host specificity dynamics: observations on gyrodactylid monogeneans. *International Journal for Parasitology* 32: 281-308.

Bakke T. A., Jansen P. A., & Hansen L. P. (1990) Differences in the Host-Resistance of Atlantic Salmon, *Salmo-Salar* L, Stocks to the Monogenean Gyrodactylus-Salaris Malmberg, 1957. *Journal of Fish Biology* 37: 577-587.

Bakke T. A., Jansen P. A., & Kennedy C. R. (1991) The Host Specificity of Gyrodactylus-Salaris Malmberg (Platyhelminthes, Monogenea) - Susceptibility of Oncorhynchus-Mykiss (Walbaum) Under Experimental Conditions. *Journal of Fish Biology* 39: 45-57.

Bakke T. A. & Mackenzie K. (1993) Comparative Susceptibility of Native Scottish and Norwegian Stocks of Atlantic Salmon, *Salmo-Salar* L, to Gyrodactylus-Salaris Malmberg - Laboratory Experiments. *Fisheries Research* 17: 69-85.

Bakke T. A., Soleng A., & Harris P. D. (1999) The susceptibility of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) x brown trout (*Salmo trutta* L.) hybrids to *Gyrodactylus salaris* Malmberg and *Gyrodactylus derjavini* Mikailov. *Parasitology* 119: 467-481.

Bernatchez L. (2001) The evolutionary history of brown trout (*Salmo trutta* L.) inferred from phylogeographic, nested clade, and mismatch analyses of mitochondrial DNA variation. *Evolution* 55: 351-379.

Bianchet M. A., Odom E. W., Vasta G. R., & Amzel L. M. (2002) A novel fucose recognition fold involved in innate immunity. *Nature Structural Biology* 9: 628-634.

Buchmann K. (1998a) Binding and lethal effect of complement from *Oncorhynchus mykiss* on *Gyrodactylus derjavini* (Platyhelminthes : Monogenea). *Diseases of Aquatic Organisms* 32: 195-200.

Buchmann K. (1998b) Some histochemical characteristics of the mucous microenvironment in four salmonids with different susceptibilities to gyrodactylid infections. *Journal of Helminthology* 72: 101-107.

Buchmann K. (1999) Immune mechanisms in fish skin against monogeneans - a model. *Folia Parasitologica* 46: 1-9.

Buchmann K. (2001) Lectins in fish skin: do they play a role in host-monogenean interactions? *Journal of Helminthology* 75: 227-231.

Buchmann K. & Bresciani J. (1998) Mikroenviroment of *Gyrodactylus derjavini* on rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*: association between mucous cell density in skin and site selection. *Parasitology Research* 84: 17-84.

Buchmann K. & Lindenstrom T. (2002) Interactions between monogenean parasites and their fish hosts. *International Journal for Parasitology* 32: 309-319.

Buchmann K. & Nielsen M. E. (1999) Chemoattraction of *Ichthyophthirius multifiliis* (Ciliophora) theronts to host molecules. *International Journal for Parasitology* 29: 1415-1423.

- Buchmann K. & Uldal A. (1997) *Gyrodactylus derjavini* infections in four salmonids: Comparative host susceptibility and site selection of parasites. *Diseases of Aquatic Organisms* 28: 201-209.
- Bush A. O., Lafferty K. D., Lotz J. M., & Shostak A. W. (1997) Parasitology meets ecology on its own terms: Margolis et al revisited. *Journal of Parasitology* 83: 575-583.
- Cable J., Harris P. D., & Bakke T. A. (2000) Population growth of *Gyrodactylus salaris* (Monogenea) on Norwegian and Baltic Atlantic salmon (*Salmo salar*) stocks. *Parasitology* 121: 621-629.
- Cebo C., Vergoten G., & Zanetta J. P. (2002) Lectin activities of cytokines: functions and putative carbohydrate-recognition domains. *Biochimica et Biophysica Acta-General Subjects* 1572: 422-434.
- Christensen O. & Larsson P. O. (1979) Review of Baltic Salmon Research. *Cooperative Research Report, ICES* 89.
- Cook M. T., Hayball P. J., Birdseye L., Bagley C., Nowak B. F., & Hayball J. D. (2003) Isolation and partial characterization of a pentraxin-like protein with complement-fixing activity from snapper (*Pagrus auratus*, Sparidae) serum. *Developmental and Comparative Immunology* 27: 579-588.
- Cooper N. R. (1991) Complement Evasion Strategies of Microorganisms. *Immunology Today* 12: 327-331.
- Crocker P. R. & Varki A. (2001) Siglecs, sialic acids and innate immunity. *Trends in Immunology* 22: 337-342.
- Crofton H. D. (1971) Model of Host-Parasite Relationships. *Parasitology* 63: 343-&.
- Cunningham C. O., Mcgillivray D. M., Mackenzie K., & Melvin W. T. (1995) Discrimination Between *Gyrodactylus-Salaris*, *G-Derjavini* and *G-Truttae* (Platyhelminthes, Monogenea) Using Restriction- Fragment-Length-Polymorphisms and An Oligonucleotide Probe Within the Small-Subunit Ribosomal-Rna Gene. *Parasitology* 111: 87-94.
- Dahms N. M. & Hancock M. K. (2002) P-type lectins. *Biochimica et Biophysica Acta-General Subjects* 1572: 317-340.

East L. & Isacke C. M. (2002) The mannose receptor family. *Biochimica et Biophysica Acta-General Subjects* 1572: 364-386.

Ewart K. V., Johnson S. C., & Ross N. W. (1999) Identification of a pathogen-binding lectin in salmon serum. *Comparative Biochemistry and Physiology C-Pharmacology Toxicology & Endocrinology* 123: 9-15.

Ewart K. V., Johnson S. C., & Ross N. W. (2001) Lectins of the innate immune system and their relevance to fish health. *Ices Journal of Marine Science* 58: 380-385.

Gabius H.J. (2001) Glycohistchemistry: The Why and How of Detection and localization of Endogenous Lectins. *Anatomia, Histologia, Embryologia* 30: 3-31.

Gabius H. J., Andre S., Kaltner H., & Siebert H. C. (2002) The sugar code: functional lectinomics. *Biochimica et Biophysica Acta-General Subjects* 1572: 165-177.

Giuffra E., Bernatchez L., & Guyomard R. (1994) Mitochondrial Control Region and Protein-Coding Genes Sequence Variation Among Phenotypic Forms of Brown Trout *Salmo-Trutta* from Northern Italy. *Molecular Ecology* 3: 161-171.

Goldberg D. E. & Kornfeld S. (1983) Evidence for Extensive Subcellular Organization of Asparagine- Linked Oligosaccharide Processing and Lysosomal-Enzyme Phosphorylation. *Journal of Biological Chemistry* 258: 3159-3165.

Harris P. D., Jansen P. A., & Bakke T. A. (1994) The Population Age Structure and Reproductive-Biology of *Gyrodactylus-Salaris* Malmberg (Monogenea). *Parasitology* 108: 167-173.

Harris P. D., Soleng A., & Bakke T. A. (1998) Killing of *Gyrodactylus salaris* (Platyhelminthes, Monogenea) mediated by host complement. *Parasitology* 117: 137-143.

Harris P. D., Soleng A., & Bakke T. A. (2000) Increased susceptibility of salmonids to the monogenean *Gyrodactylus salaris* following administration of hydrocortisone acetate. *Parasitology* 120: 57-64.

- Hikami K., Tsuchiya N., Yabe T., & Tokunaga K. (2003) Variations of human killer cell lectin-like receptors: common occurrence of NKG2-C deletion in the general population. *Genes and Immunity* 4: 160-167.
- Holm J. C. (1999) Aktuelle fiskearter i oppdrett. In: *Fiskehelse og fiskesykdommer* (eds Ø. Bergh, S. Espelid, S. Nygaard, and T. Poppe) pp. 49-60. Universitetsforlaget, Oslo.
- Holmskov U., Malhotra R., Sim R. B., & Jensenius J. C. (1994) Collectins - Collagenous C-Type Lectins of the Innate Immune Defense System. *Immunology Today* 15: 67-74.
- Janik A., Sosnowska M., Kruszewska J., Krotkiewski H., Lehle L., & Palamarczyk G. (2003) Overexpression of GDP-mannose pyrophosphorylase in *Saccharomyces cerevisiae* corrects defects in dolichol-linked saccharide formation and protein glycosylation. *Biochimica et Biophysica Acta-General Subjects* 1621: 22-30.
- Jensen L. E., Petersen T. E., Thiel S., & Jensenius J. C. (1995) Isolation of A Pentraxin-Like Protein from Rainbow-Trout Serum. *Developmental and Comparative Immunology* 19: 305-314.
- Kaattari S. L., Zhang H. L. L., Khor I. W., Kaattari I. M., & Shapiro D. A. (2002) Affinity maturation in trout: clonal dominance of high affinity antibodies late in the immune response. *Developmental and Comparative Immunology* 26: 191-200.
- Kazakov R. V. & Titov S. F. (1991) Geographical Patterns in the Population-Genetics of Atlantic Salmon, *Salmo salar* L, on USSR Territory, As Evidence for Colonization Routes. *Journal of Fish Biology* 39: 1-6.
- Kilpatrick D. C. (2002) Animal lectins: a historical introduction and overview. *Biochimica et Biophysica Acta-General Subjects* 1572: 187-197.
- Kishore U., Eggleton P., & Reid K. B. M. (1997) Modular organization of carbohydrate recognition domains in animal lectins. *Matrix Biology* 15: 583-592.
- Klemetsen A., Amundsen P. A., Dempson J. B., Jonsson B., Jonsson N., O'Connell M. F., & Mortensen E. (2003) Atlantic salmon *Salmo salar* L., brown trout *Salmo trutta* L. and Arctic charr *Salvelinus alpinus* (L.): a review of aspects of their life histories. *Ecology of Freshwater Fish* 12: 1-59.

- Koljonen M. L., Jansson H., Paaver T., Vasin O., & Koskiniemi J. (1999) Phylogeographic lineages and differentiation pattern of Atlantic salmon (*Salmo salar*) in the Baltic Sea with management implications. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 56: 1766-1780.
- Kornfeld R. & Kornfeld S. (1985) Assembly of Asparagine-Linked Oligosaccharides. *Annual Review of Biochemistry* 54: 631-664.
- Kryvi H. & Totland G. K. (1997) Huden. In: *Fiskeanatomi* pp. 37-50. Høyskoleforlaget AS - Norwegian Academic Press, Kristiansand.
- Larsen T. B. Modtagelighed hos laksefisk overfor Gyrodactylus parasitter. 2003. København Universitet, Master-thesis in Biology.
Ref Type: Thesis/Dissertation
- Lebedev B. I. (1988) Monogenea in the light of new evidence and their position among platyhelminths. *Angewandte Parasitologie* 29: 149-172.
- Lindenstrom T. & Buchmann K. (2000) Acquired resistance in rainbow trout against Gyrodactylus derjavini. *Journal of Helminthology* 74: 155-160.
- Lindenstrom T., Buchmann K., & Secombes C. (2003) Gyrodactylus derjavini infection elicits IL-1 β expression in rainbow trout skin. *Fish & Shellfish Immunology* 15: 107-115.
- Lu J. H., Teh C., Kishore U., & Reid K. B. M. (2002) Collectins and ficolins: sugar pattern recognition molecules of the mammalian innate immune system. *Biochimica et Biophysica Acta-General Subjects* 1572: 387-400.
- Lundegårdh P. H., Lundqvist J., & Lindström M. (1974) Østersøens udviklingshistorie. In: *Berg og jord i Sverige* pp. 239-245. Almqvist & Wiksell, Uppsala.
- Madsen L. & Dalsgaard I. (1999) Reproducible methods for experimental infection with *Flavobacterium psychrophilum* in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Diseases of Aquatic Organisms* 36: 169-176.
- Malmberg G. (1993) Gyrodactylidae and Gyrodactylosis of Salmonidae. *Bulletin Francais de la Peche et de la Pisciculture* 5-46.

- Malmberg G. & Malmberg M. (1993) Species of *Gyrodactylus* (Platyhelminthes, Monogenea) on Salmonids in Sweden. *Fisheries Research* 17: 59-68.
- Mandal C., Sinha S., & Mandal C. (1999) Lectin like properties and differential sugar binding characteristics of C-reactive proteins purified from sera of normal and pollutant induced *Labeo rohita*. *Glycoconjugate Journal* 16: 741-750.
- Metcalf V. J., Brennan S. O., Chambers G. K., & George P. M. (1998) The albumin of the brown trout (*Salmo trutta*) is a glycoprotein. *Biochimica et Biophysica Acta-Protein Structure and Molecular Enzymology* 1386: 90-96.
- Mo T. A., Appleby C., & Berland B. (1999) Parasittsykdommer. In: *Fiskehelse og fiske sykdommer* (eds Ø. Bergh, S. Espelid, S. Nygaard, and T. Poppe) pp. 181-228. Universitetsforlaget, Oslo.
- Muramoto K., Kagawa D., Sato T., Ogawa T., Nishida Y., & Kamiya H. (1999) Functional and structural characterization of multiple galectins from the skin mucus of conger eel, *Conger myriaster*. *Comparative Biochemistry and Physiology B-Biochemistry & Molecular Biology* 123: 33-45.
- Nakamura O., Watanabe T., Kamiya H., & Muramoto K. (2001) Galectin containing cells in the skin and mucosal tissues in Japanese conger eel, *Conger myriaster*: an immunohistochemical study. *Developmental and Comparative Immunology* 25: 431-437.
- Ni Y. & Tizard I. (1996) Lectin-carbohydrate interaction in the immune system. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 55: 205-223.
- Nilsson J., Gross R., Asplund T., Dove O., Jansson H., Kelloniemi J., Kohlmann K., Loytynoja A., Nielsen E. E., Paaver T., Primmer C. R., Titov S., Vasemagi A., Veselov A., Ost T., & Lumme J. (2001) Matrilinial phylogeography of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) in Europe and postglacial colonization of the Baltic Sea area. *Molecular Ecology* 10: 89-102.
- Nonaka M. & Smith S. L. (2000) Complement system of bony and cartilaginous fish. *Fish & Shellfish Immunology* 10: 215-228.

- Olesen N. J. (1991) Detection of the Antibody-Response in Rainbow-Trout Following Immersion Vaccination with *Yersinia-Ruckeri* Bacterins by Elisa and Passive-Immunization. *Journal of Applied Ichthyology-Zeitschrift fur Angewandte Ichthyologie* 7: 36-43.
- Ottinger C. A., Johnson S. C., Ewart K. V., Brown L. L., & Ross N. W. (1999) Enhancement of anti-*Aeromonas salmonicida* activity in Atlantic salmon (*Salmo sellar*) macrophages by a mannose-binding lectin. *Comparative Biochemistry and Physiology C-Pharmacology Toxicology & Endocrinology* 123: 53-59.
- Overstreet R. Introduction to co-evolution of fish and their parasites and diseases. 9, 21-28. 1998. International Congress of Parasitology.
Ref Type: Conference Proceeding
- Powell M. D., Speare D. J., & Wright G. M. (1994) Comparative Ultrastructural Morphology of Lamellar Epithelial, Chloride and Mucous Cell Glycocalyx of the Rainbow-Trout (*Oncorhynchus-Mykiss*) Gill. *Journal of Fish Biology* 44: 725-730.
- RintamakiKinnunen P. & Valtonen E. T. (1996) Finnish salmon resistant to *Gyrodactylus salaris*: A long-term study at fish farms. *International Journal for Parasitology* 26: 723-732.
- Sharon N. (1984) Surface Carbohydrates and Surface Lectins Are Recognition Determinants in Phagocytosis. *Immunology Today* 5: 143-147.
- Shaw D. J., Grenfell B. T., & Dobson A. P. (1998) Patterns of macroparasite aggregation in wildlife host populations. *Parasitology* 117: 597-610.
- Shirai T., Mitsuyama C., Niwa Y., Matsui Y., Hotta H., Yamane T., Kamiya H., Ishii C., Ogawa T., & Muramoto K. (1999) High-resolution structure of the conger eel galectin, congerin I, in lactose-liganded and ligand-free forms: emergence of a new structure class by accelerated evolution. *Structure with Folding & Design* 7: 1223-1233.
- Skjodt K. Department of Immunology and Microbiology, Institute of Medical Biology, University of Odense. 2002.
Ref Type: Personal Communication

- Slierendrecht W. J., Jensen L. B., Horlyck V., & Koch C. (1993) Genetic-Polymorphism of Complement Component C3 in Rainbow- Trout (*Oncorhynchus-Mykiss*) and Resistance to Viral Hemorrhagic Septicemia. *Fish & Shellfish Immunology* 3: 199-206.
- Smith V. J., Fernandes J. M. O., Jones S. J., Kemp G. D., & Tatner M. F. (2000) Antibacterial proteins in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Fish & Shellfish Immunology* 10: 243-260.
- Stryer L. (1995a) Membrane Structure and Dynamics. In: *Biochemistry* pp. 263-290. W. H. Freeman and Company, New York.
- Stryer L. (1995b) Protein Targeting. In: *Biochemistry* pp. 911-948. W. H. Freeman and Company, New York.
- Sunyer J. O., Tort L., & Lambris J. D. (1997) Structural C3 diversity in fish - Characterization of five forms of C3 in the diploid fish *Spans aurata*. *Journal of Immunology* 158: 2813-2821.
- Tasumi S., Ohira T., Kawazoe I., Suetake H., Suzuki Y., & Aida K. (2002) Primary structure and characteristics of a lectin from skin mucus of the Japanese eel *Anguilla japonica*. *Journal of Biological Chemistry* 277: 27305-27311.
- Teizo Fujita (2002) Evolution of the lectin-complement pathway and its role in innate immunity. *Nature Reviews Immunology* 2: 346-353.
- Turner M. W. (1996) Mannose-binding lectin: The pluripotent molecule of the innate immune system. *Immunology Today* 17: 532-540.
- Varki A. (1992) Diversity in the Sialic Acids. *Glycobiology* 2: 25-40.
- Varki A. (1997) Sialic acids as ligands in recognition phenomena. *Faseb Journal* 11: 248-255.
- Vasta G. R., Quesenberry M., Ahmed H., & O'Leary N. (1999) C-type lectins and galectins mediate innate and adaptive immune functions: their roles in the complement activation pathway. *Developmental and Comparative Immunology* 23: 401-420.
- Verspoor E., McCarthy E. M., & Knox D. (1999) The phylogeography of European Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) based on RFLP analysis of the ND1/16sRNA region of the mtDNA. *Biological Journal of the Linnean Society* 68: 129-146.

Vitved L., Holmskov U., Koch C., Teisner B., Hansen S., & Skjodt K. (2000) The homologue of mannose-binding lectin in the carp family Cyprinidae is expressed at high level in spleen, and the deduced primary structure predicts affinity for galactose. *Immunogenetics* 51: 955-964.

Wilson K. & Grenfell B. T. (1997) Generalized linear modelling for parasitologists. *Parasitology Today* 13: 33-38.

Wilson K., Grenfell B. T., & Shaw D. J. (1996) Analysis of aggregated parasite distributions: A comparison of methods. *Functional Ecology* 10: 592-601.

Xu D. H., Klesius P. H., & Shelby R. A. (2002) Cutaneous antibodies in excised skin from channel catfish, *Ictalurus punctatus* Rafinesque, immune to *Ichthyophthirius multifiliis*. *Journal of Fish Diseases* 25: 45-52.

Yano T. (1996) The nonspecific immune system: Humoral defense. In: *The Fish Immune System* (eds G. Iwama and Y. Nakanishi) pp. 105-157. Academic Press.

Ylonen A., Kalkkinen N., Saarinen J., Bogwald J., & Helin J. (2001) Glycosylation analysis of two cysteine proteinase inhibitors from Atlantic salmon skin: di-O acetylated sialic acids are the major sialic acid species on N-glycans. *Glycobiology* 11: 523-531.

Young L. J., Campbell N. L., & Capuano G. A. (1999) Analysis of overdispersed count data from single-factor experiments: a comparative study. *Journal of Agricultural Biological and Environmental Statistics* 4: 258-275.

Zarkadis I. K., Sarrias M. R., Sfyroera G., Sunyer J. O., & Lambris J. D. (2001) Cloning and structure of three rainbow trout C3 molecules: a plausible explanation for their functional diversity. *Developmental and Comparative Immunology* 25: 11-24.