

**Molekylær karakterisering og analyse av
uttrykkingsmønsteret til T-cellemarkørene CD4-1 og
CD8-alfa i berggylt (*Labrus bergylta*)**

Aslak Reikvam



UNIVERSITETET I BERGEN

Masteroppgave ved Institutt for biovitenskap

Juni 2021

Forord

Dette arbeidet ble gjort i Fiskesykdomsgruppen ved Instituttet for biovitenskap (Universitetet i Bergen). Jeg vil takke min veileder Dr. Ivar Hordvik for dedikert støtte og veiledning gjennom hele prosessen av oppgaven. Jeg vil også takke Lindsey J. Moore og Christiane Trösse for opplæring og støtte på labben, og generell veiledning gjennom hele prosessen. En takk går også til Ph.d.-student Angela Etayo for samarbeid og hjelp med forsøket mitt. Jeg må også takke MOWI, Havforskningsinstituttet og Kyrre W. Alstadhaug for å ha skaffet fisk til forsøket. Til slutt vil jeg takke alle mine fantastiske medstudenter for samholdet gjennom dette noe spesielle året.

Forkortelser

AMP	Anti Mikrobielle Peptider
APC	Antigen Presenterende Celle
bp	base-par
CD	«Cluster of Differentiation»
CD8a	CD8 alfa
CD8b	CD8 beta
CD3e	CD3 epsilon
cDNA	Komplementær DNA («complementary DNA»)
CT	Terskelverdi («Cycle Threshold»)
DNA	Deoxyribonucleic Acid
dNTP	deoxyribonucleotide triphosphate
gDNA	genomisk DNA
Ig	Immunglobulin
IgC	Konstant Ig domene («Constant Ig domain»)
IgV	Variabelt Ig domene
MHC	«Major Histocompatibility Complex»
MM	«Master Mix»
mRNA	Budbringer-RNA («messenger-RNA»)
nt	nukleotid
ORF	Åpen leseramme («Open Reading Frame»)
PCR	Polymerasekjedereaksjon («Polymerase Chain Reaction»)
qPCR	Kvantitativ PCR («quantitative PCR»)
RNA	Ribonukleinsyre («Ribonucleic Acid»)
T_c	Cytotoksisk T-celle
TCR	T-celle reseptor («T-cell receptor»)
T_h	Hjelpe T-celle
U	Enhet («Unit»)
aa	Aminosyre («amino acid»)

Innhold

1. Introduksjon	1
1.1 Oppdrett av laks i Norge	1
1.2 Lus i norsk akvakultur	1
1.3 Biologisk lusebehandling	1
1.4 Berggylt	2
1.5 Immunforsvaret hos teleoster	3
1.5.1 Primære immunorganer	4
1.5.2 Sekundære immunorganer	6
1.5.3 Immunceller	7
1.5.4 Det medfødte immunforsvaret	9
1.5.5 Det adaptive immunforsvaret	10
1.5.5.1 Ig-domener	11
1.5.5.2 Antistoffer	13
1.5.5.3 T-cellemarkører	13
1.6 Studier av genomet og immunsystemet hos berggylt	15
1.7 Målet med oppgaven	15
2. Metoder	16
2.1 Prøvetaking	16
2.3 RNA-analyse	18
2.3.1 NanoDrop	18
2.3.2 Bioanalyser	18
2.4 cDNA-syntese	19
2.5 PCR	20
2.6 qPCR	21
2.7 Gelelektroforese	22
2.8 TOPO [®] -kloning	23
2.9 Koloni-screening	23
2.10 Plasmid-rensing	24
2.11 DNA-sekvensering	25
2.12 Bioinformatikk	26
3. Resultater	27
3.1 Identifikasjon av CD4-1- og CD8a-gener i berggylt	27
3.1.1 Plassering i forhold til nabogener i genomet	27
3.1.2 Ekson/intron-strukturen til CD4-1 og CD8a	29

3.2 Karakterisering av berggylt CD4-1 og CD8a cDNA.....	29
3.2.1 Kloning i plasmid	29
3.2.2 Berggylt CD4-1 cDNA.....	30
3.2.3 Berggylt CD8a cDNA	33
3.3 Analyse av de translaterede CD4-1 og CD8a polypeptidene fra berggylt	35
3.3.1 Sammenligning med andre arter og beskrivelse av domener i proteinene	35
3.3.2 Glykosylering	39
3.3.3 Predikerte 3D-strukturer av berggylt CD4-1 og CD8a.....	40
3.4 Analyse av CD4-1 og CD8a -uttrykking i ulike vev	42
4. Diskusjon.....	44
5. Kilder.....	51
6. Appendiks.....	56

Sammendrag

Proteinene CD4-1 og CD8-alfa er essensielle ko-reseptorer på T-celler, og nyttige markører for å identifisere bestemte sub-populasjoner av celler i immunforsvaret. Målet med denne oppgaven var å karakterisere disse molekylene hos berggyllt (*Labrus bergylta*) og undersøke genenes uttrykkmønster i ulike vev. Potensielle sekvenser for CD4-1 og CD8-alfa ble identifisert i to ulike regioner av berggyllt-genomet. Nabogenene deres korresponderte med nabogenene som er funnet hos andre teleoster. Ekson/intron-strukturen til genene tilsvarte organiseringen som er beskrevet i andre arter. På basis av sekvensinformasjonen i databasen (GenBank) ble det designet primere for PCR-amplifikasjon av cDNA for CD4-1 og CD8-alfa fra berggyllt. PCR-produktene ble klonet i plasmidvektor og sekvensert. De translaterete polypeptid-sekvensene reflekterte slektskapet til andre teleoster, og aminosyrene som er viktige for dannelsen av de strukturelle domenene i molekylene var konserverte. Predikerte 3D-strukturer og glykosyleringssteder var i overensstemmelse med de karakteristiske trekkene for målproteinene. Den ekstracellulære delen av CD4-1 bestod av 4 Ig-domener, mens CD8-alfa hadde ett Ig-domene og en lengre og sterkt glykosylert hengselregion. Det ble tatt organpakker fra 3 oppdrettede berggyllter og tymus-prøver fra 10 fisker. Både CD4-1 og CD8-alfa var sterkt uttrykt i tymus. Siden organet er lite iøynefallende hos berggyllt var det vanskelig å få rene tymus-prøver. Mengden av CD4-1 og CD8-alfa mRNA i tymus-prøvene viste derfor også hvor vellykket prøvetakingen var. Blodrike organer som milt, hodenyre og gjeller hadde en relativt høy uttrykking i forhold til muskel og lever. I nyreprøvene var det mer CD4-1 enn CD8-alfa mRNA, mens forholdet var motsatt i tymus. Variasjonen i uttrykkingen var imidlertid stor mellom fiskene. For å kunne vurdere resultatene bedre ble andre cellemarkører (CD3e, RAG1 og RAG2) inkludert i RT-qPCR-analysene. Uttrykknivåene til disse cellemarkørene korresponderte godt med CD4-1- og CD8-alfa-resultatene. Karakteriseringen av T-cellemarkørene CD4-1 og CD8-alfa har lagt forholdene til rette for at man nå kan identifisere sentrale populasjoner av immunceller hos berggyllt og måle immunresponser hos denne arten i mer detalj.

1. Introduksjon

1.1 Oppdrett av laks i Norge

Norge har en betydelig produksjon av laks. I 2020 ble det eksportert 886.000 tonn laks til en verdi av 50,6 milliarder kroner (SSB, 2021). Dette er en betydelig økning fra år 2000 da det ble eksportert 297.000 tonn laks for 9,6 milliarder kroner. I tillegg til å være en næring som har vokst sterkt, utgjør den også en betydelig del av norsk økonomi. I 2020 utgjorde laks 7% av norsk eksportverdi. Historisk har Norge tilbudt halvparten av verdens oppdrettslaks. (ASCHE, 1997). Det er derfor viktig å drive næringen på en god og bærekraftig måte.

1.2 Lus i norsk akvakultur

Det største problemet for laksenæringen er i dag knyttet til lakselus (Qviller, Helgesen and Leif, 2021). Lakselus er et ektoparasittisk krepsdyr som i seinere livsfaser sitter på huden og finnene til laksefisk. De spiser hud, blod og slim, og fører til irritasjon hos fisken. I alvorlige tilfeller kan det føre til sår og død. Den norske stat mener at lakselus utgjør en så stor risiko at de pålegger en grense på maks 0,5 kjønnsmoden hunnlus per fisk, (0,2 på sommeren) (Forskrift om lakselusbekjempelse §8, 2012). Mye av problematikken fisken opplever ved luseutbrudd kommer med behandlingen og ikke av selve lusen. I Norge deles behandlingene opp i 3 kategorier: kjemisk behandling, mekanisk behandling og biologisk behandling. De kjemiske og mekaniske behandlingene påfører stort stress og reduserer veksten hos fisken. Biologisk behandling bruker rensefisk som spiser lusen av laksen. Dette er ikke en akutt behandling, men et langvarig tiltak for å holde tallene lave.

1.3 Biologisk lusebehandling

Forskjellige fiskearter benyttes til biologisk lusebehandling. Disse fiskene er enten rognkjeks eller leppefisker som berggylt. Tidligere var all rensefisken villfanget, men i seinere år har det blitt satt i gang oppdrett på berggylt og rognkjeks. Det er usikkert hvilke sykdommer rensefisk kan bære, og eventuelt smitter oppdrettslaksen med. Siden oppdrett av berggylt er relativt nytt, er det også lite kunnskap om kompetansen til immunforsvaret deres og mulighetene for utvikling av gode vaksiner mot problematiske sykdommer.

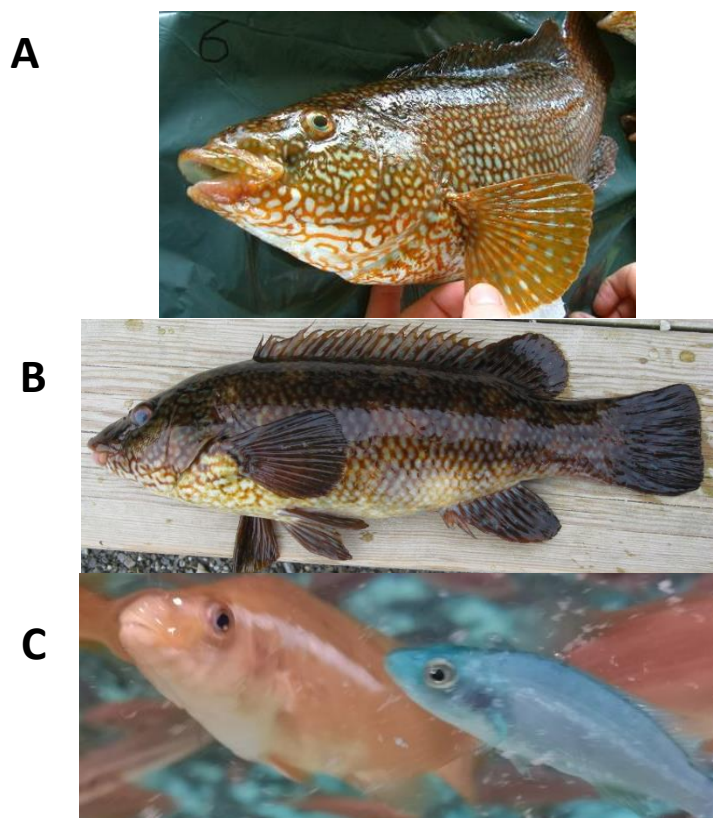
1.4 Berggylt

Labrus bergylta er en marin fisk i familien leppefisk (*Labridae*). Dette er en av de største teleost-familiene med 557 arter og 82 genus. Leppefisk er omnivorer (altetende), men mesteparten av dietten er invertebrater som skalldyr og skjell. Mange av dem er rensefisker som spiser parasitter festet på andre fisker (Arcy, 2013). Denne levemåten er de tilpasset til gjennom evolusjonen, med utstående tenner for å plukke invertebratene av verten. Normalt er de territorielle bunnlevende fisker som liker seg relativt grunt. Familien har flere spesielle trekk som protogynøs hermafroditisme og tilbakedannet magesekk. Berggylt er den største leppefisken i Europa og lever i øst-Atlanterhavet fra Norge til Spania (68°N - 20°N, 32°W - 30°E). De finnes i den litorale sonen (10-20m) og liker å ligge i skjul blant steiner og tang nær kysten. Berggylt er metabolsk aktive ved temperaturer over 10°C. De er derfor mest aktive om sommeren, er inaktive store deler av vinteren og holder til i de øvre vannlagene. Reproduksjonssyklusen for berggylt er typisk for marine fisker som lever i denne sonen. De legger relativt små egg som er ca 1mm i diameter. Eggene fester seg til steiner. Etter en relativt kort periode på 62,5 til 72 døgngrader (litt ulike tider, avhengig av kilde) klekkes eggene (Arcy *et al.*, 2012; Ottesen, Dunaevskaya and Arcy, 2012). Videre utvikling fra plommesekk-larve til yngel tar 49 dager. Alle fiskene utvikles først som hunner og utvikler seg videre til hanner basert på kroppsstørrelse og revirdannelse. Utseendemessig er det ingen forskjeller på kjønnene bortsett fra hannens vesentlige større lengde og vekt. Hannene danner harem av mindre hunner og utgjør kun 10% av den totale populasjonen.

Berggylt blir normalt 50 cm lang, men det er publisert lengder opp til 65,9 cm og alder opp til 29 år (www.fishbase.in). Berggylt har kraftige ryggpigge og en liten munn med kraftige tenner og en kjeve som kan skytes frem. Tarmen er rundt 2/3 av kroppslengden, noe som er relativt kort (tarmen til omnivorer er normalt 1-3 ganger kroppslengden). Berggylden mangler også magesekk og pylorus blindsekker. Genomiske undersøkelser har vist at gener knyttet til utviklingen av magen er slettet fra berggylt-genomet (Lie *et al.*, 2018). Mangel på magesekk er en tilpasning som har oppstått sporadisk i teleoster ved konvergent evolusjon.

Fargene til berggylt kan variere. De er som regel mørk grønn og brun (Fig. 1 B), men kan ha et spekter av rødfarger og lysegrønne felt. Oppdrettet berggylt har oftest helt andre mønstre og farger enn villfanget berggylt (Fig. 1 C). Det er funnet 2 morfologiske fenotyper (Fig. 1 A-

B) som har signifikante genetiske forskjeller i 20 forskjellige markører, og det har blitt foreslått å revurdere artens taksonomiske status (Quintela *et al.*, 2016). Den flekkete varianten (Fig. 1 A) er ikke vanlig i norske områder. Berggylt beholder sine egenskaper som rensefisk i fangenskap og brukes av oppdrettere til å fjerne parasittisk lus fra laks.



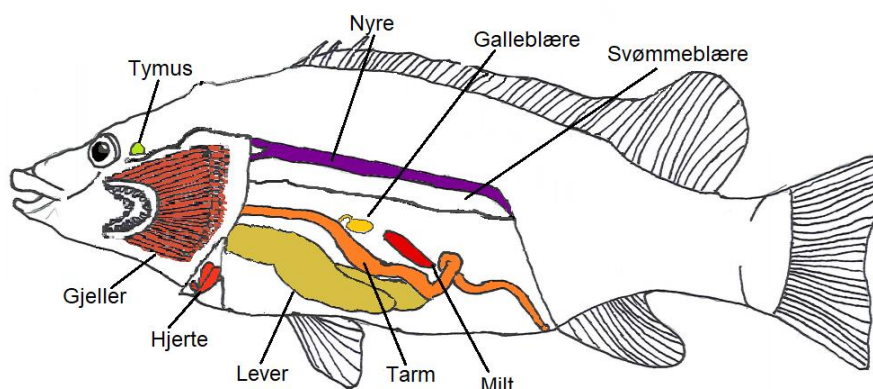
Figur 1. Berggylt av de ulike morfologiene. A) Berggylt av den flekkete fenotypen (Foto: Stein H. Mortensen), B) Villfanget berggylt av umønstret fenotype (Foto: Ivar Hordvik), C) Oppdrettet berggylt av umønstret fenotype fra MOWI sitt oppdrettsanlegg i Øygarden (Foto: Ivar Hordvik). Den oppdrettede fisken kan endre farge når den blir eldre, og ser da mer ut som berggylten på bilde B.

1.5 Immunforsvaret hos teleoster

Immunorganer skilles normalt i 2 kategorier avhengig av hvilke funksjoner organet har i immunforsvaret. Primære immunorganer står for produksjonen av immunceller mens cellene involveres i immunresponsen er i de sekundære immunorganene (Bjørngen and Koppang, 2021). Hos teleoster er de primære immunorganene tymus og hodenyre.

1.5.1 Primære immunorganer

Hodenyren er både et endokrint- og et immun-organ. Nyren ligger helt dorsalt i bukhulen (Fig. 2) (Press and Evensen, 1999). Den har forskjellige funksjoner i den fremre og bakre delen av organet. Den fremste delen av nyren kalles hodenyren og er primært et lymfocyttilager, men har også lymfoide og endokrine funksjoner (Bjørngen and Koppang, 2021). Den inneholder et stort antall hematopoietiske celler som produserer forstadier av lymfocytter («precursor lymphocytes»), tilsvarende beinmargen hos mennesker. Noen av disse migrerer til tymus for å bli T-celler, mens resten forblir i hodenyren og utvikles til B-celler (Fig. 3 seinere). Hodenyren produserer også monocytter og andre blodceller. Den fungerer også som et sekundært immunorgan ved lagringen av store mengder ferdigutviklede B-celler, modne plasmaceller og hukommelsesceller. De bakre delene av nyren kan også defineres som et sekundært immunorgan. Utseendet av hodenyren kan variere mye mellom teleoster. Berggyllt har 2 tydelige utstikkere som går fremover på hver side av hodet (Fig. 2).



Figur 2. Skjematisk illustrasjon av organer i berggyllt. Magesekken er tilbakedannet hos berggyllt, og den har en kort tarm i forhold til andre teleoster. Illustrasjon av *Aslak Reikvam*.

Tymus er organet for produksjon og modning av T-celler (Ronza *et al.*, 2020; Barraza *et al.*, 2021). Tymus er funnet hos alle vertebrater og har en stor grad av konservert morfologi og funksjon. Organets strukturer er tilpasset utvikling av lymfocytterne, interaksjoner med andre celler og modning til funksjonelle T-celler. Til tross for organets viktige rolle for immunresponser er kunnskapen om tymus hos teleoster ufullstendig. Tymus er plassert dorsalt for gjellebuene som et eller flere symmetriske par (Fig. 2). Strukturene er oftest

tydelige på utsiden av fisken ved larvestadiet, men blir vanskeligere å finne i voksen fisk når de migrerer inn i muskelvevet. Utviklingen av organet er minimalt etter larvestadiet, noe som gjør at tymus blir relativt mindre jo eldre fisken blir. I enkelte tilfeller kan hele organet skrumpe inn hos voksen fisk. Denne involusjonen kan skje i løpet av 1-10 år avhengig av arten. Tilbakedannelsen av tymus skjer hos alle vertebrater, noe som tyder på at det er et evolusjonært bevart trekk.

Tymus består av 2 deler innkapslet i et lag epitel-celler (Bjørngen and Koppang, 2021). Cortex er lokalisert opp mot hodenyren og står for celledeling og positiv selektering av lymfocytforstadiene som migrerer fra hodenyren til cortex. Her finnes de umodne T-cellene infiltrert i bindevev og epitelceller kalt «nursing cells». Medulla er lokalisert ut mot basen av gjellebuene. Her skjer en videre deling av de modne T-cellene. I cortex/medulla grensen er det mange makrofager og dendrittiske celler. Disse cellene fagocytterer døende celler og fører til negativ selektering av T-cellene når de passerer gjennom fra cortex til medulla. Cortex kan være lett å skille fra medulla med en mye tettere cellestruktur, men hos mange fiskearter har en ikke kunnet påvise dette skillet. Skillet blir også mindre tydelig med aldring av fisken og er oftest umulig i voksen fisk.

Mesteparten av T-cellene i tymus er dobbeltpositive for CD4 og CD8 («Cluster of Differentiation» 4/8) reseptorene (CD4+/CD8+) (Barraza *et al.*, 2021), ettersom de utgjør de umodne cellene i cortex, mens de enkeltpositive modne cellene er i medulla, (se kapittel 1.5.7: T-cellemarkører for nærmere forklaring av CD4 og CD8). Tymusens størrelse og evne til å produsere T-celler er sterkt avhengig av fiskens miljø. Forsøk på flere fiskearter har vist at tymus blir relativt mindre ved korte døgnlengder og holder seg relativt større ved døgnlengder tilsvarende sommerdager (Zapata, Varas and Torroba, 1992; Álvarez *et al.*, 1994, 1998; Barraza *et al.*, 2021). Det er også vist at ufordelaktig varmt vann senker størrelsen og produksjonen i tymus. Endringer i disse parameterne, samt ernæring i tidligere livsstadier har permanente påvirkninger på tymus sin størrelse og evne til å produsere T-celler.

1.5.2 Sekundære immunorganer

Hos teleoster renses milten blodet ved å fjerne gamle blodceller (Press and Evensen, 1999). Hos vertebrater gjøres deler av denne funksjonen i lymfeknutene, men lymfeknutene mangler hos teleoster. Milten har også et lager av leukocytter, hovedsakelig makrofager, B-celler og plasmaceller, som reagerer på infeksjoner (Bjørngen and Koppang, 2021). Milten har få visuelle forskjeller mellom ulike teleoster og er plassert i nær tilknytning til magesekken. I fisker som mangler magesekk er den lokalisert nær tarmen (Fig. 2).

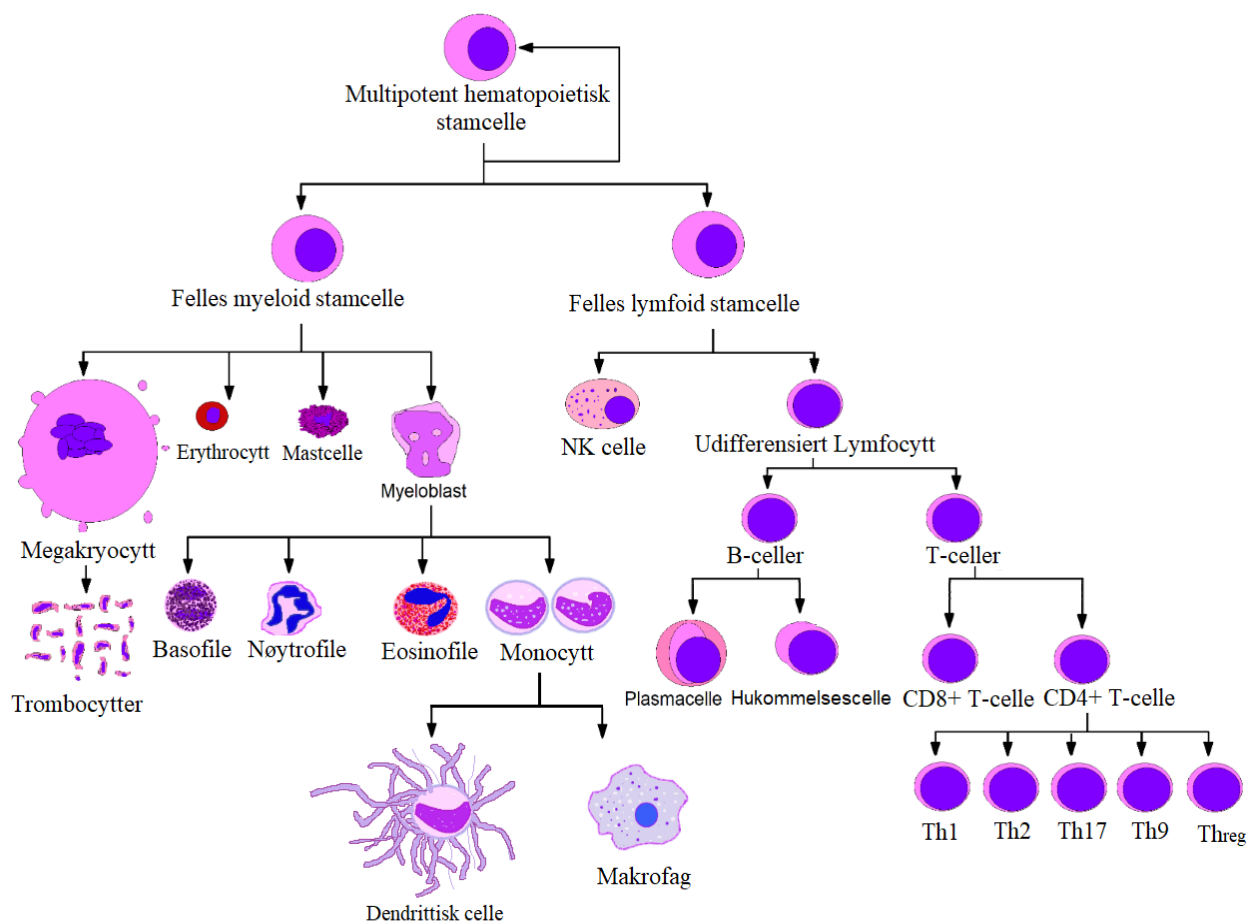
Mellom primærlamellene i gjellene på laksefisk er det funnet en ansamling av T-celler kalt det interbrankiale lymfoide vev (ILT). Lignende vev er funnet i andre fisker også, men er ikke studert i alle relevante familier av teleoster (Bjørngen and Koppang, 2021).

Det er også immunvev tilknyttet de forskjellige mukus-lagene i fisken («mucosa-associated lymphoid tissues»; MALT) (Salinas, 2015). Vevet har forskjellige navn avhengig om det er tilknyttet hud (SALT), tarm (GALT), nesegropen (NALT) eller gjeller (GIALT). Nesten all kunnskapen vi har omkring MALT er fra laks og karpfisk. MALT er i stor grad et diffust nettverk av T-celler og andre leukocytter innvevd i epitelcellene. Vevene inneholder som regel 4-5% B-celler, men NALT kan ha opptil 40% B-celler. Forsøk gjort på atlantehavslaks viser at mesteparten av T-cellene i MALT er CD8+ celler.

Teleoster har et velutviklet immunsystem med en medfødt og en adaptiv del, ikke veldig ulikt det som er beskrevet i pattedyr. Mye av kunnskapen vi har om fiskens immunforsvar er basert på sammenligning med pattedyr, spesielt mus (Monica, 2016). Det er imidlertid store evolusjonære forskjeller innad i gruppen av teleoster sammenlignet med andre dyregrupper som pattedyr. Teleoster er følgelig en heterogen gruppe med hensyn til immunsystemet og ulike tilpasninger til levevis, økologiske nisjer og temperaturer. Som vekselvarme dyr er fisk generelt mer avhengig av omgivelsene for å kunne fungere optimalt.

1.5.3 Immunceller

Immunresponsen består av en cellulær og en humoral del. Den cellulære responsen utføres av immunceller som kan deles i 2 hovedgrupper, lymfocytter og myeloide celler (Fig. 3).



Figur 3. Den teleostiske hematopoietiske cellelinjen. Oversikten viser et forenklet bilde av utseende og slektskapet til immunceller i teleoster. De skiller seg fra pattedyr ved at trombocytterne og erythrocyttene har kjerner. Utseende og tilstedeværelsen av NK-celler og mastceller er omdiskutert i teleoster. Oversikten mangler også NCC. Illustrasjon av *Aslak Reikvam*

De myeloide cellene omfatter de polymorfonukleære leukocytene; nøytrofiler, eosinofiler og basofiler (Fig. 3). Nøytrofiler er en fagociterende cytotoxisk celle som effektivt kan drepe patogener ved «respiratory burst» og NET («Neutrophil extracellular traps») (Havixbeck and Barreda, 2015). «Respiratory burst» er en kjemisk prosess som produserer reaktivt oksygen, et ekstremt effektivt stoff for nedbryting av celler. NET er et nettverk av ekstracellulære fibre som binder patogener. Nøytrofiler er som regel de første cellene som rekrutteres til en betennelse. Eosinofiler og basofiler er ikke fagociterende, men har cytotoxiske egenskaper. De er sannsynligvis viktige for å bekjempe parasitter som er for store for å fagocytteres.

Makrofager er antigenpresenterende celler (APC) og er de primære fagocyterende cellene i immunforsvaret. APC er immunceller som presenterer antigener for å aktivere T-celler. Makrofagene finnes i sirkulasjonssystemet i form av små monocytter og modner til store makrofager når de rekrutteres ut i vevet. Den siste fagocyterende APC er dendrittiske celler. De er vesentlig mindre enn de store makrofagene og derfor mindre effektive til fagocytose, men kompenserer med en mer effektiv evne til å presentere antigener på MHC klasse I og II «major histocompatibility complex» (Granja *et al.*, 2015). MHC-molekylene binder peptider i cytoplasma og presenterer dem på utsiden av cellemembranen. Der kan T-celler binde til dem og identifisere peptider fra patogener. MHC klasse I presenteres av alle celler med kjerne, mens MHC klasse II kun presenteres av APC.

Lymfocytene representerer den cellulære responsen av det adaptive immunforsvaret, i form av T-celler og B-celler. En gruppe B-celler produserer naturlige antistoffer (polyreaktive antistoffer) i det medfødte immunforsvaret, men B-cellene er mest kjent for sin viktige rolle i å produsere spesifikke antistoffer i det adaptive immunforsvaret. En B-celle har mange kopier av et bestemt immunoglobulin festet på overflaten. Under en immunrespons stimuleres de relevante B-cellene til å dele seg og gi opphav til kloner (såkalt klonal ekspansjon).

T-celler kan skilles i undergrupper basert på tilstedeværelsen av enkelte ko-reseptorer på cellemembranen. Sentrale reseptorer er CD4 for T-hjelpeceller (Th-celler) og CD8 for cytotoksiske T-celler (Tc-celler). Disse ko-reseptorene sitter like ved T-cellerreseptoren (TCR) og interagerer med henholdsvis MHC klasse I og MHC klasse II (dypere forklaring i kapittel 1.5.5). Naive Th-celler binder APC og kan utvikle seg til en av flere undergrupper, avhengig av hvilket patogen antigenet stammer fra. Ved bakterielle infeksjoner vil dannelsen av Th2-celler føre til aktivering av B-celler, mens ved en virusinfeksjon vil Th1-celler signalisere for proliferasjon av Tc-celler. Tc-celler binder celler infisert med intracellulære patogener og injiserer et cytotoksin som får cellen til å gå i lysis (Nakanishi *et al.*, 2011). Gruppen av lymfoide celler omfatter i teleoster også «nonspecific cytotoxic cells» (NCC). NCC fører også til lysis av infiserte celler, men sorterer som navnet antyder ikke under det adaptive immunforsvaret. NCC var regnet for å være forgjengeren til NK-cellene i pattedyr, men oppdagelsen av en separat cytotoksisk celle (kalt NK-like celle) i karpe tyder på noe annet (Fischer *et al.*, 2006).

1.5.4 Det medfødte immunforsvaret

Det medfødte immunsystemet er det første som aktiveres og reagerer generelt på fremmedlegemer. Forsvarssystemet består av fysiske barrierer som huden, antibakterielle komponenter i mukus, magesekken (for arter som har magesekk) og en flora av ufarlige mikroorganismer (probiotika) som opptar plass og dermed fortrenger potensielle patogener. Mukus inneholder naturlige antistoffer som istedenfor å gjenkjenne en unik struktur, binder seg til proteiner fra større patogengrupper. Et eksempel på et slikt uspesifikt antigen er flagellen til *Vibrio*-bakterier, eller cellevegg-komponenter til grupper av bakterier. Cellevegger og flageller er begge ekstracellulære cellestrukturer som ikke finnes naturlig i fisk, og er derfor gode mål for naturlige antistoffer. De naturlige antistoffene produseres av B-celler og er i stor grad i form av IgM. Mukus hos fisk inneholder også IgT og denne isotypen av immunglobuliner antas å ha en spesiell rolle i mukuslag (Zhang, Salinas and Oriol Sunyer, 2011). Mukus inneholder en stor gruppe antimikrobielle peptider (AMP). AMP er en gruppe med små peptider som har anti-mikrobielle egenskaper i mukus og cytoplasma. De er evolusjonært konserverte fra prokaryoter til mennesker og finnes i alle grupper av liv. Totalt er det identifisert over 2000 AMP. I laks er det funnet ca 90 AMP, blant annet lysozym, defensiner, cathelicidiner og hepcidin (Monica, 2016). Den konstante utskiftingen av mukuslaget minimerer også muligheten for at patogener skal kunne vokse og etablere seg.

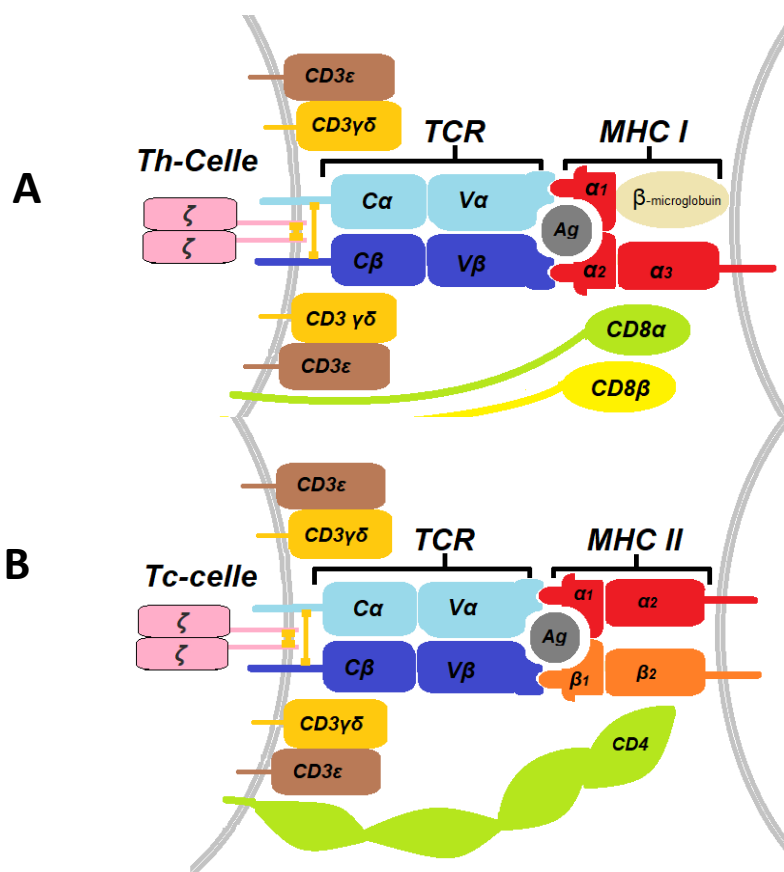
Komplement-kaskaden er et annet viktig middel i immunresponsen, både i mukus og vevsvæsker i fisken. Komplement-kaskaden består i pattedyr av 9 proteinkomplekser C1-C9 (mer enn 30 proteiner inngår i systemet) og har 3 løp. Deler av kaskaden er studert i fisk og funnet å tilsvare systemet i pattedyr (Boshra, Li and Sunyer, 2006). Den klassiske veien og lektin-veien aktiveres når henholdsvis antistoffer eller lektin binder til et patogen. Dette fører til en kaskadereaksjon hvor C1 spalter C2, C3 og C4 for å danne en C3/C5-transformase. De 2 kaskadereaksjonene har noen forskjeller, men ender begge to i dannelsen av en C3/C5-transformase. Splittingen av C5 med C3/C5-transformasen aktiverer det alternative løpet som ender i nøytralisering av patogener. Nøytraliseringen skjer i form av agglutineringsmerking for andre immunceller (opsonisering) og dannelse av membran-angrep-komplekser (MAC). I høyere vertebrater fører komplement-systemet også til dannelse av signalmolekylet histamin i mastceller. Histamin rekrutterer immunceller til det infiserte området og starter inflammasjons-responsen. I teleoster er det funnet histamin med tilsvarende virkning som har utviklet seg separat fra landlevende vertebrater (Mulero *et al.*, 2007).

Den siste delen av det medfødte immunsystemet er de fagocyterende cellene (Dalmo, Ingebrigtsen and Bogwald, 1997). Disse cellene er i stor grad makrofager, men hos fisk involverer dette også granulocytter. Disse cellene tar opp og ødelegger patogener, og kan videre aktivere det adaptive immunsystemet. Makrofagene, nøytrofiler og dendrittiske celler bruker reseptorer for enkle generelle molekyler til å gjenkjenne patogener og skadet vev. Disse generelle reseptorene kalles «pattern recognition receptors» (PRRs) og gjenkjenner molekylgrupper kjent som «pathogen associated molecular patterns» (PAMPs).

Det medfødte immunforsvaret kan variere med hensyn på tilstedeværelsen av magesekk. Berggylt er en av artene som har tilbakedannet magesekken og her er det funnet en særlig høy uttrykkning av IgM i tarmen. Det antas at en stor fraksjon av disse antistoffene er naturlige antistoffer (Bilal *et al.*, 2019).

1.5.5 Det adaptive immunforsvaret

Det adaptive immunforsvaret deles ofte inn i den cellulære responsen med T-celler og B-celler, og den humorale responsen med antistoffer. Det adaptive systemet aktiveres som oftest av makrofager eller en annen APC fra det medfødte systemet. MHC klasse II som presenterer et antigen bindes til TCR ved hjelp av CD4-proteinet på en Th0-celle (Fig. 4 B). Ved en bakterieinfeksjon vil Th0-cellen transformeres til Th2-celler som er viktige for å aktivere B-celler. Når B-cellen blir aktivert vil den begynne med klonal ekspansjon og utvikling til to forskjellige celletyper. Plasma-celler produserer store mengder antistoffer identisk til de på den aktiverte cellen. Den andre undergruppen av B-celler er hukommelsesceller. De er viktige for langvarig immunitet ved at de kan aktiveres fort ved en reinfeksjon. B-celler hos teleoster er også fagocyterende, og til en viss grad mindre spesialisert enn tilsvarende celler hos pattedyr (Li *et al.*, 2006). Ved en virusinfeksjon blir Th0-cellene til Th1-celler som oppregulerer Tc-celleaktivitet. Det finnes flere andre Th-celler som oppregulerer andre deler av immunsystemet. Alle celler med kjerne produserer MHC klasse I. MHC klasse I kan binde antigener fra virusinfeksjoner og andre intracellulære infeksjoner. Ved en virusinfeksjon vil MHC I binde til TCR ved hjelp av CD8 på Tc-celler og starte lysis av cellen (Fig. 4 A).



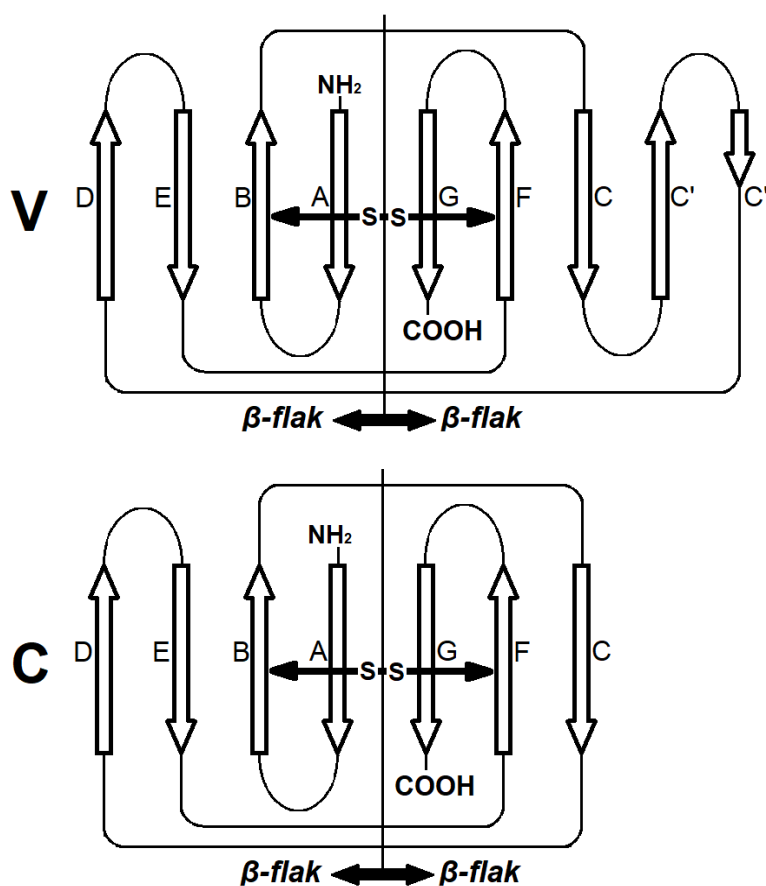
Figur 4. Sentrale reseptorer og ko-reseptorer som inngår i interaksjoner mellom T-celler og andre celler. A) Reseptorbindingen mellom CD8⁺ T-celle og MHC I, og B) Reseptorbindingen mellom CD4⁺ T-celle og MHC II. Illustrasjon av *Aslak Reikvam*, modifisert etter (Murphy, K. & Weaver, C.T., 2017 s.266).

TCR består av 2 proteinkjeder og finnes i 2 varianter. Den mest vanlige varianten er $\alpha\beta$ -TCR (Fig. 4), men alle vertebrater med kjeve har også $\gamma\delta$ -TCR. $\gamma\delta$ -TCR er antatt å ha en viktig rolle i fiskens mukus-vev. $\gamma\delta$ -T-celler er fagocytterende for løste og partikulære antigener. Det er mulig at de også kan presentere lipid-antigener (Wan *et al.*, 2017). TCR sitt antigenbindende sete dannes på samme måte som antistoffene på B-cellene. Dette skjer ved en rekombinasjonsprosess av variable gen-segmenter, der de rekombinatoriske enzymene kodet av RAG-1 og RAG-2 genene har en sentral plass. TCR er en del av et større TCR-kompleks bestående av CD3 og ko-reseptorene CD4 eller CD8.

1.5.5.1 Ig-domener

Ig-domenet er et av de mest vanlige strukturelle motivene i proteiner funnet hos flercellede organismer (Zaccai, 2010). Domenet har ofte en protein/protein-reaktiv funksjon og finnes

derfor ofte i reseptorer, spesielt i immunforsvaret. I mennesker er det mer enn 750 Ig-domener i Ig-superfamilien. Domenet er 70-110 aa langt og består av 2 anti-parallele β -flak (Williams and Barclay, 1988). Flakene er typisk bundet sammen med en svovelbro mellom to konserverte cysteiner (C) (Fig. 5 og 6). Cysteinene ligger 55-75 aminosyrer fra hverandre og har en konservert Tryptofan (W) imellom dem. De to flakene består til sammen av 7-9 β -tråder (Fig. 5)(Alzari, 1998). Ig-domener klassifiseres som to typer etter hvor mange β -tråder de består av. Konstante Ig-domener (IgC) består av 7 β -tråder (A, B, C, D, E, F, G), mens variable Ig-domener (IgV) består av 9 β -tråder (A, B, C, C', C'', D, E, F, G) og er større enn IgC. IgV er oftest rundt 100-110 aa og har 65-75 aa mellom cysteinene, mens IgC er oftest rundt 70-90 aa og har 55-60 aa mellom cysteinene.



Figur 5. Sekundærstrukturen til to grupper av Ig-domener i super-Ig-familien. V = IgV-domenet og C = IgC-domenet. De store pilene med S-S representerer svovelbroen mellom de to flakene. Den vertikale streken mellom tråd A og G viser brettet som danner 2 forskjellige flak. Illustrasjon av *Aslak Reikvam*: modifisert etter (Murphy, K. & Weaver, C.T., 2017 s.174).

1.5.5.2 Antistoffer

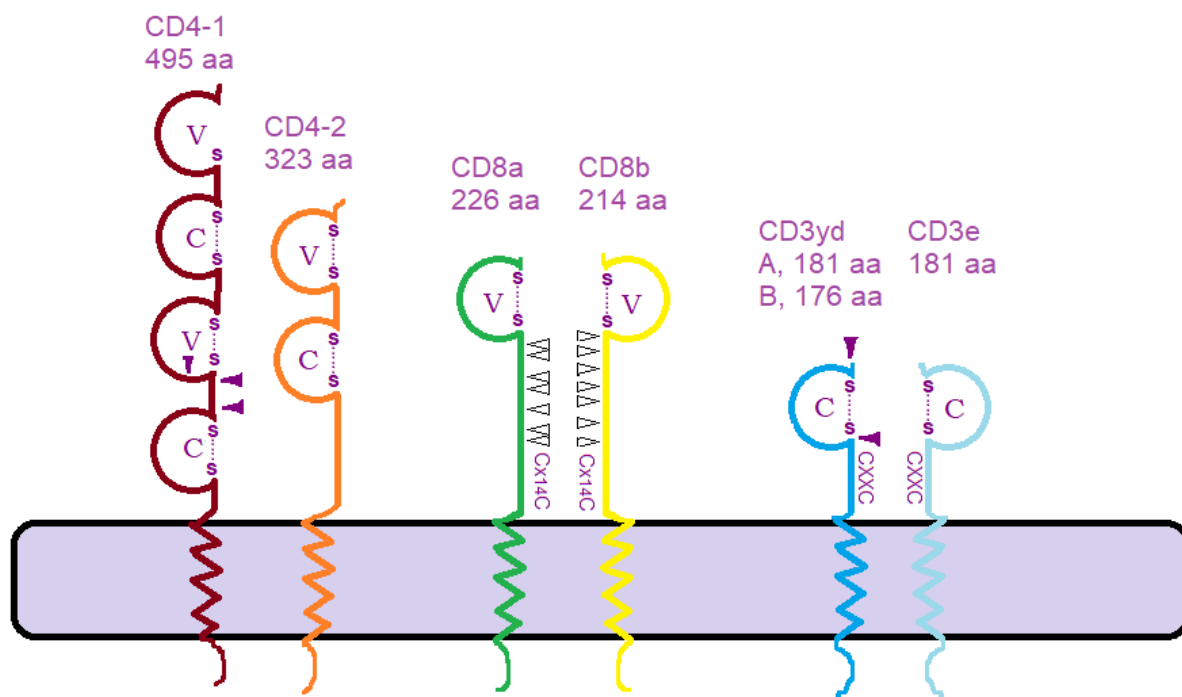
Immunglobuliner er antigen-bindende glykoproteiner (Bilal, Etayo and Hordvik, 2021). De produseres av B-celler og er den humorale delen av det adaptive immunforsvaret. De kan enten være membranbundet eller frittflytende. Immunglobulinet består av 2 identiske tunge kjeder og 2 identiske lette kjeder. De lette kjedene består av et IgV-domene og et IgC-domene. Den tunge kjeden består av et IgV-domene og et variabelt antall IgC-domener avhengig av hvilken isotype det er. I teleoster er det funnet 3 isotyper: IgM, IgD og IgT. IgV-domenene på den lette og tunge kjeden ligger side om side og utgjør det antigen-bindende setet. Hvert IgV-domene har 3 hypervariable regioner. De seks hypervariable regionene står for variasjonen i immunglobulinene og hva de kan binde. De forskjellige tunge kjedene kodes av et stort gen-kompleks. Uttrykkingen av de forskjellige Ig-isotypene styres av rekombinasjon og spleisingen av gen-segmentene. IgM er regnet for å være det primære antistoffet i teleoster. Den frittflytende formen av IgM er oftest tetramerer. IgT antas å ha en spesiell rolle i mukus. IgT i sirkulasjonssystemet finnes som monomerer og danner tetramerer når de diffunderer ut i mukus. IgD er regnet for å være beslektet med IgW funnet i haier, og oppsto tidlig i evolusjonen. Antistoffer er viktige deler av immunresponsen både for aktivering av komplement-systemet, ved inaktivering av virus og merking av patogener.

1.5.5.3 T-cellemarkører

CD8 og CD4 er ko-reseptorer og binder MHC I og MHC II som presenterer antigenet til TCR (Fig. 4). I starten av utviklingen er de naive T-cellene dobbelt negative for CD8 og CD4. Deretter går T-cellene gjennom et dobbelt positivt stadium hvor de er CD4⁺/CD8⁺. Ved dette stadiet vil det skje en positiv og negativ selektering av T-celler for interaksjoner med egne og fremmede strukturer. Etter seleksjonen blir T-cellene enten CD4⁺/CD8⁻ Th-celler eller CD4⁻/CD8⁺ Tc-celler. CD4 og CD8 er derfor viktige biologiske markører for å skille mellom de forskjellige typene av T-celler.

Både CD4 og CD8 er glykoproteiner funnet i 2 varianter hos teleoster (Fig. 6). På CD4⁺celler finnes de to variantene CD4-1 og CD4-2. De fleste CD4⁺celler har både CD4-1 og CD4-2, men det antas at CD4-2 i større grad er viktig for Th1 immunresponsen mot virus enn CD4-1 (Jung *et al.*, 2020). CD4-1 er strukturelt lik CD4 i pattedyr, med 4 Ig-domener, et transmembran-domene og et cytoplasmisk-domene. De 4 Ig-domenene består av 2 IgV-

domener (Ig domene 1 og 3), og 2 IgC-domener (Ig domene 2 og 4). CD4-2 har enten 2 eller 3 Ig-domener (Laing *et al.*, 2001; Suetake, Araki and Suzuki, 2004; Sun *et al.*, 2007; Maisey *et al.*, 2016).



Figur 6. Membranproteiner på T-celler fra teleoster. Hver halvsirkel er et Ig-domene hvor C står for IgC og V for IgV. O-glykosyleringssteder og N-glykosyleringssteder er markert med henholdsvis hvite og svarte piler. Svovelbroen mellom cysteinene er markert med (s...s). Sikksakk mønsteret og den lille boksen representerer henholdsvis transmembran regionene og cellemembranen. Lengden på polypeptidene er fra laks, og vil variere noe mellom ulike arter av teleoster. Illustrasjon av *Aslak Reikvam*: modifisert etter ((Moore J. Lindsey, 2009).

CD8 finnes hovedsakelig som heterodimerer (CD8 alfa-beta som vist i Fig. 6), men finnes også som homodimerer (CD8 alfa-alfa). CD8 alfa (CD8a) består av et IgV domene i enden av en avstivet hengselregion (Fig. 6) (Patel, Øvergård and Nerland, 2008). Hengselregionen er kraftig O-glykosylert, dette er nødvendig for den korrekte foldingen av proteinet

Det medfødte immunsystemet hos fisk er antatt å være særlig viktig. Det finnes fisker hvor sentrale komponenter i det adaptive immunsystemet mangler. Torsk mangler MHC II og CD4, noe som antas å ha sammenheng med manglende evne til å danne spesifikke antistoffer (Pilström, Warr and Strömberg, 2005). Dette gjør det vanskeligere å vaksinere torsken.

1.6 Studier av genomet og immunsystemet hos berggylt

Sammenlignet med andre fisker som sebrafisk, laks og regnbueørret er berggylden en relativt ny forsknings-art. Første versjon av berggylt-genomet ble publisert i 2018 (Lie *et al.*, 2018). Denne artikkelen omtaler genetiske endringer som har fulgt bortfallet av magesekk. Når det gjelder immunsystemet er det skrevet en doktoravhandling om det adaptive immunsystemet i berggylt (Bilal, 2019). Avhandlingen består av 3 artikler som dekker karakterisering av IgM (Bilal *et al.*, 2016), analyse av immunoglobulin- og TCR-uttrykking (Bilal *et al.*, 2019) og analyse av somatiske hypermutasjoner i Tcr-alfa-genene (Bilal *et al.*, 2018). Ellers er det publisert en «flow cytometry» analyse av fagocyterende celler og cytokjemisk karakterisering og måling av «respiratory burst» aktivitet i celler isolert fra berggylt (Haugland, Rønneseth and Wergeland, 2014). Det finnes videre artikler på sykdommer hos berggylt, blant annet AGD (Karlsbakk *et al.*, 2013) og SAV6 (Ruane *et al.*, 2018).

1.7 Målet med oppgaven

Hovedmålet med denne hovedfagsoppgaven var å karakterisere CD4-1 og CD8a hos berggylt og undersøke genes uttrykkingsmønster i ulike vev.

Delmål:

1. Identifisere CD4-1- og CD8a-gensekvenser i berggylt-genomet
2. Designe PCR- og qPCR-primere for CD4-1 og CD8a
3. Lokalisere tymus i berggylt
4. Klone og sekvensere cDNA av CD4-1 og CD8a fra berggylt
5. Analysere translaterede polypeptidsekvenser, domener og glykosyleringssteder
6. Analysere uttrykkingsmønsteret til CD4-1, CD8a og andre cellemarkører i ulike vev (celler)

2. Metoder

2.1 Prøvetaking

Fisken ble avlivet på stedet rett før hver enkelt disseksjon begynte. Prøver fra 5 fisk ble tatt fra MOWI sitt berggylt-oppdrettsanlegg i Øygarden utenfor Bergen (Tab. 1). Fisken fra MOWI sitt anlegg ble dissekert på disseksjonslaboratoriet til Fiskesykdomsgruppen på Høyteknologisenteret ved UIB. Fisken var rundt 100 g og hadde en totallengde på mellom 15 og 17,5 cm. Gjellene ble fjernet først og deretter ble gjellelokket fjernet i et forsøk på å lokalisere tymus. Potensielle tymus-prøver ble tatt og lagret på RNAlater[®]. Det ble også tatt en full vevsserie fra 1 fisk (Ø5) bestående av vevene: tymus, gjelle, milt, lever, baktarm, hodenyre og muskel. Alle vevene ble lagret i 1,5ml rør med RNAlater[®] og lagt i et kjøleskap på 4°C. Vevsbitene som ble skåret ut var på størrelse med et fyrstikkhode. I noen rør ble det tilsatt flere vevsbitene fra samme organ. Den nøyaktige størrelsen varierte noe med vevet og prøvene. Det ble også tatt en villfanget berggylt på stang ved Troldhaugen utenfor Bergen (Tab. 1). Denne fisken ble avlivet på stedet og tilsvarende prøver ble tatt på samme måte som de fra Øygarden. Den ville fisken var 423 g med en totallengde på 28,5 cm. Det ble tatt 5 oppdrettsfisk fra Havforskningsinstituttet sitt forskningsanlegg på Austevoll (Tab. 1). Disse fiskene ble avlivet med 10x overdose med bedøvelse. Tre av fiskene ble det tatt tymus-prøver av ved å fjerne gjellelokket og forsiktig skjære vekk beinet som ligger under huden dorsalt for gjellene. Vevet det ble tatt prøver fra var et mykt, hvitt, kjertellignende område som lå under beinet (Fig. 7). På de 2 resterende fiskene ble det tatt fulle organsett utenom tymus. Disse settene besto av vevsprøver fra hodenyre, tarm, milt, lever, muskel, gjelle og hud. Fiskene fra Austevoll var 17-22 g og hadde en totallengde på 9,5-10,5 cm. Gjelle var alltid den første prøven som ble tatt. På fisken fra Troldhaugen ble det kun tatt filamenter fra gjellene mens fra de andre fiskene ble gjellebuen tatt med.

Tabell 1. Vekt og lengde for fiskene brukt i oppgaven

Individer	vekt (g)	total lengde (cm)
Øygarden		
Ø1	≈100	17,5
Ø2	≈100	15
Ø3	≈100	16,5
Ø4	≈100	16,5
Ø5	≈100	17,5
Troidhaugen		
F1	423	28,5
Austevoll		
A2	17	9,6
A3	Na	Na
A4	22	10,5
A5	17	10,5
A6	17	9,5



Figur 7. Uttak av tymus-prøve fra 1 år gammel berggylt. Pilen indikerer hvor tymus er plassert. Foto: Aslak Reikvam

2.2 RNA-rensing

RNA ble rensert med TRIzol™. Alt arbeid med TRIzol™, kloroform og isopropanol ble gjort i avtrekkskap. Vevet ble flyttet fra RNA-later til et 2ml eppendorf microrør med 1ml TRIzol™ ved hjelp av en ren pipettespiss sammen med en stålkule desinfisert med 75% etanol og avbrenning. Rørene ble homogenisert med en QIAGEN TissueLyser II maskin på 30 Hz i 3 min. Deretter ble rørene inkubert på romtemperatur i 5 min og sentrifugert for å unngå kontaminering før de ble tilsatt 0,2ml kloroform og ristet godt i 15-20 sec. Dette startet separering av vannfasen fra de organiske løsemidlene og proteinene. Prøvene ble inkubert i 5 min på romtemperatur før de ble sentrifugert i en kjølesentrifuge på 12000g, ved 4°C i 15 min. Nye 1,5ml microrør ble gjort klare med 0,5ml isopropanol for hver prøve. Den gjennomsiktige øvre vannfasen ble deretter pipettert over til de nye rørene med isopropanolen

uten å berøre den underliggende rosa løsemiddelfasen med TRIzol™ eller det hvite båndet av protein imellom. Feil gjort på dette steget ville blitt sett på NanoDrop-analysen. Rørene ble blandet lett og deretter inkubert i 10 min før de ble sentrifugert på 12000g, ved 4°C i 15 min. Væsken ble helt ut av rørene og etterlot RNA-et som en hvit pellet festet til bunnen. Pelleten ble vasket 2 ganger ved å tilsette 1ml 75% etanol og vortexet lett for å løsne pelleten fra røret, vortexingen ble utelatt hvis pelleten var spesielt liten. Deretter ble den sentrifugert på 12000g, ved 4°C i 5 min. Etanolen ble helt ut og hele vaskeprosessen ble repetert. RNA-et ble løst i 20-100 µl 70°C RNase-fritt vann avhengig av pelleten sin størrelse. 2-3 µl ble tatt ut til NanoDrop-analyse. RNA ble oppbevart på -80°C.

2.3 RNA-analyse

2.3.1 NanoDrop

RNA-analyser ble gjennomført med et Nanodrop-1000 spektrometer (Thermo Scientific). Fotosensoren på maskinen ble vasket med 1,5 µl vann som ble tørket vekk. Deretter ble 1,5 µl vann brukt for kalibrering og 1,5 µl vann for blanking. Vannet som ble brukt var RNase-fritt vann, og dråpen ble tørket vekk med et lofritt papir for hver dråpe. Etter blanking ble 1,5 µl prøve tilsatt. Prøven ble tørket av fra maskinen med lofritt papir før neste prøve ble tilsatt. Det viktigste resultatet var konsentrasjonen oppgitt i ng/µl. Forholdene 260/230 og 260/280 ble også notert for å indikere henholdsvis løsemiddel- og protein-forurensing i prøvene. 260/230 er mindre nøyaktig ved lave konsentrasjoner.

2.3.2 Bioanalyser

Bioanalyser-systemet som ble brukt var «Agilent Bioanalyser 2100» med «RNA 6000 Nano Assay» reagenser. Først ble gelen klargjort ved at 550 µl nano-gel-matriks (rødt merke) ble plassert i et spinnfilter og sentrifugert i en mikrosentrifuge ved 4000 rpm i 10 min. 65 µl gel ble tilsatt 1 µl «Nano dye concentrate» (markert blått). Fargen ble blandet og spunnet ned før bruk. Gel-blandingen ble sentrifugert ved 13000 g i 10 min og lagret til neste dag. En ny «RNA nano chip» ble tatt ut av innpakningen og plassert i «priming» stasjonen. Sprøyten på stasjonen ble nullstilt til 1 ml, før brønnen på rad 3 kolonne 4 (markert **G**) ble fylt med 9 µl «gel dye» blanding. Stasjonen ble lukket og sprøyten komprimert til baksiden av stempelet ble låst. Etter 30 sek ble stempelet løsnet og sprøyten dekomprimert i 5 sek før den sakte ble

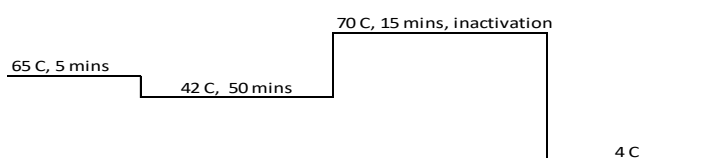
dratt tilbake til 1 ml. Deretter ble ytterligere 9 μl «gel-dye» blanding tilsatt bunnen av de to øverste brønnene i fjerde kolonne (markert G). 5 μl «RNA 6000 Nano Marker» (markert grønn) ble tilsatt de resterende brønnene, 12 prøvebrønner og 1 «Ladder». 1 μl prøve ble tilsatt de 12 prøve-brønnene mens 1 μl av «ladder» ble tilsatt brønner markert «ladder». Maskinen ble rensert med en «dummy chip» tilsatt 350 μl Milli-Q vann.

2.4 cDNA-syntese

For cDNA-syntesen ble det brukt Superscript II revers transkriptase. Det ble blandet 2 «master-mixer» (MM) (Tab. 2). Den første MM (primer MM) inneholdt 1 μl primer (final 5 μM) og 1 μl dNTP (0,5 μM) for hver reaksjon. Den andre MM (buffer MM) inneholdt 4 μl buffer (x1) og 2 μl DTT (0,01 M). Det ble blandet MM for 7 reaksjoner per 6 reaksjoner som skulle settes opp. Primeren som ble brukt var en oligo-dT₁₂ 100 μM . dNTP-blandingen inneholdt 10mM av hvert nukleotid (A, T, C, G). Vann ble tilsatt et 0,2ml rør for hver reaksjon. RNA og vannet utgjorde til sammen 11 μl og det ble på det meste tilsatt 5 μg RNA. Hvis det var mindre en 5 μg RNA i 1 μl ble det brukt 11 μl ufortynnet RNA. Det ble tilsatt 2 μl primer MM til hvert rør. Deretter ble RNA tilsatt. Rørene ble inkubert på 65°C i 5 min i en PCR-maskin og plassert direkte i en beholder med is. Det ble tilsatt 6 μl buffer MM og rørene ble satt i PCR-maskinen i 2 min på 42°C. Til slutt ble det tilsatt 1 μl revers transkriptase og reaksjonsblandingen ble inkubert på 42°C i 50 min og inaktivert på 70°C i 15 min. cDNA ble oppbevart på -20C.

Tabell 2. Reagensliste med inkuberingsstid og temperatur for cDNA-syntesereaksjonen.

20 μl rxn Superscript II				
reagent	[stock]	volume (μl) for 1 rxn	μl for master mix	Slutt konsentrasjon
primer, Oligo dT(12-18)	100 μM	1	7	5 μM
template, RNA max 11 μl /5 μg	x μl		0	
dNTPs	10mM of each, mixed	1	7	0,5 μM
water	11-x		0	
65 C, 5 mins, ice				
buffer	x 5	4	28	X1
DTT	0.1 M	2	14	10mM
42 C, 2 mins				
RT enzyme	5U/ μl	1	6	0,25U/ μl
final volume		20	120	

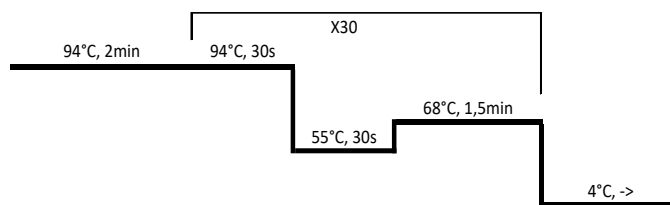


2.5 PCR

cDNA-fragmenter ble oppkopierte ved hjelp av PCR. PCR ble gjort med AccuPrime™ *Taq* DNA Polymerase systemet fra Invitrogen. «Kittet» bruker en «hot start» versjon av *Taq* polymerase med henholdsvis: I) buffer optimalisert for korte cDNA og korte gDNA-fragmenter under 1500 bp, og II) buffer for lange gDNA-fragmenter. Reaksjonen på 20µl ble gjort i 0,2ml rør. Templatene var cDNA fortynnet 1:10. Rørene ble tilsatt 2µl 10x (1x) AccuPrime™ PCR buffer I, 0,4 µl (0,02x) AccuPrime™ *Taq* DNA polymerase, 0,4µl forward primer, 0,4µl «reverse primer» (Tab. 4) (0,2µM), 1µl templat og 15,8µl nukleasefritt vann (Tab. 3). Programmet som ble brukt på PCR-maskinen var denaturering: 94°C ved 30 sek, annealing: 55°C ved 30 sek og forlenging: 68°C ved 90 sek (1 min/kb). Det ble kjørt 30 sykluser. Primerene som ble brukt er vist i Tab. 4.

Tabell 3. Reagensliste med inkuberingsstid og temperatur for PCR reaksjonen.

	volum µ	Slutt konsentrasjon
10x accuprime pcr buffer I	2	1x
forward primer 10µM	0,4	0,2µM
reverse primer 10µM	0,4	0,2µM
accuprime Taq DNA polymerase	0,4	0,02X
vann	15,8	
Templat cDNA 1:10	1	1:200
Total	20	



Primerene ble designet av Ph.d.-student Angela Etayo basert på de predikerte berggylt sekvensene for CD4-1 (XM_020649071) og CD8a (XM_020647964.2). 4 primerpar ble testet (Appendiks 1) og de mest effektive ble plukket ut til forsøket (Tab 4).

Tabell 4. Primere som ble brukt i PCR

Primer navn *	På ekson	T_m°C	Sekvens 5' → 3'
CD4 10F	3	69.1	CACCTTCCTTTGCCCTTCCC
CD4 10R	4/5	65.3	ATCACCTCCTCTGCCTTCGTA
CD4 1R	11/12	68.6	AGAATCCTTTGGGCTTCGGG
CD8 1F	2/3	67.8	CGACTGGGCGGAGAAAAAGT
CD8 1R	3	67.5	TATGGTCACAGACGCATGGC
CD8 4R	4	67.6	TGCCAACAAGTGGACCCAATA
CD8 5F	1	67.0	TATCCCCCGTCAGTCTCAA
CD3e F3	4/5	67	ATGAGCCACTCAACCCTCAC
CD3e R1	5	68	CCGATGTGTGCACAGTCCTT
RAG1 F	1	68,8	AGATGATGGTGCAAGTCCAGG
RAG1 R	1/2	66	AGAGACGACACAAGCACCTGAG
RAG2 F	2	68,2	GCCGCACACCAAATAACGAG
RAG2 R	2	66	CCGTGGCTCTGAACTATGCT

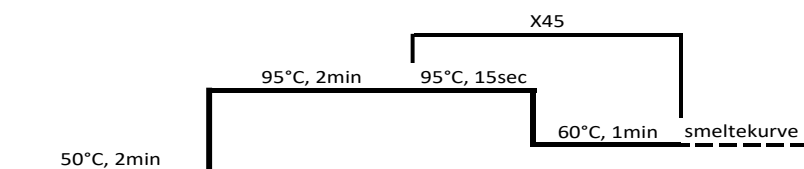
*CD4, CD8, CD3, RAG1 og RAG2 representerer målgenene CD4-1, CD8a, CD3e, RAG1 og RAG2. Retning er markert med F (forward) og R (reverse) i enden av navnet. Kolonnene i midten forteller hvilke ekson (ekson/ekson-grenser) primerene er hentet fra og smeltetemperaturen til de enkelte primerene (T_m).

2.6 qPCR

Den relative mengden av mRNA for bestemte gener i en serie av vev ble estimert ved hjelp av qPCR. Økningen av PCR-produkt etter hver syklus ble basert på SYBR™ Green deteksjon. Først ble det laget en master-mix (Tab. 5) med 2 µl nukleasefritt vann, 5µl SYBR™ Green mix, 0.5 µl «forward primer» (0,5 µM) og 0.5 µl «reverse primer» (0,5 µM) for hver brønn. SYBR™ Green mix var ferdigblandet og inneholdt buffer, *Taq* polymerase, Mg, dNTP og SYBR Green. Det ble blandet mix til flere brønner enn det som skulle brukes. 8µl MM ble tilsatt til hver brønn. Deretter ble det tilsatt 2 µl templat til brønnene. Templater var cDNA fortynnet 1:10. Det ble kjørt 2 paralleller per mål-gen og for hver vevsprøve ble mengden av mRNA fra et referanse-gen undersøkt i tillegg. Programmet på maskinen hadde en oppvarmingssyklus på 2 min, 50°C og 2 min, 95°C. Deretter ble det brukt en amplifikasjonssyklus med 95°C i 15 sek og 60°C i 1 min. Det ble kjørt 45 amplifikasjonssykluser. Det ble også laget en smeltekurve for å se etter primer-dimer, forurensinger og reaksjonsspesifisitet.

Tabell 5. Reagensliste med inkuberingstid og temperatur for qPCR

	Stock	volum μ	konsentrasjon
SYBRGreen mix		5	1:2
forward primer	10 μ M	0,5	0,5 μ M
forward primer	10 μ M	0,5	0,5 μ M
vann		2	
Templat	1:10 cDNA	2	1:50
Total		10	



2.7 Gelelektroforese

Gelelektroforese ble gjennomført med 1% agarose-gel i TAE buffer. Agarosen danner en nettformet struktur som senker hastigheten til DNA-molekylene gjennom gelen basert på fragmentenes størrelse, der lengre DNA-fragmenter går saktere. TAE (Tris-Acetate-EDTA) bufferen ble brukt som både kjørebuffer og til å blande gelen. Den leder strømmen som fører til at de negative DNA-molekylene vandrer mot den positive polen. Gelen ble tilsatt 1 μ l gelRed for å visualisere DNA-båndene under UV-lys. Hver brønn ble tilsatt 5 μ l fra en blanding laget av 5 μ l PCR-produkt og 1 μ l «loading dye». Den første brønnen inneholdt 4 μ l DNA-markør («Smart Ladder») fortynnet 1:4. Prøvene ble separert med DC strøm på 90V i 30 min. Gelene ble fotografert under UV-lys med en Carestream Gel Logic 212 PRO.

2.8 TOPO[®]-kloning

PCR-amplifiserte fragmenter av henholdsvis CD4-1 og CD8a cDNA ble klonet i pCR[™]4-TOPO. Vektoren er et «high copy number»-bakterieplasmid, 3965 basepar langt, designet for Sanger-sekvensering (Fig. 8). Agar-skåler ble laget for dyrking av klonene. Skålene ble laget med 32g/L LB-agar pulver. 0,5 l agar ble autoklavert i 20 min og kjølt til 60°C før den ble tilsatt ampisillin til en sluttkonsentrasjon på 100µg/L. Agar ble fordelt på 20 skåler. Skålene ble oppbevart på kjølerom i en stabel med lokket ned. Kloningen ble gjennomført med PCR-produkter fra en nyreprøve.



Figur 8. Kart over TOPO vektoren hentet fra USER GUIDE til TOPO[®] TA Cloning[®] Kit for Sequencing

2 µl PCR-produkt, 0,5 µl saltløsning (1,2M NaCl + 0,06M MgCl₂) og 0,5 µl TOPO[®]-vektor ble tilsatt til et 0,2ml PCR-rør. Røret ble blandet lett før det ble inkubert på romtemperatur i 5 min og deretter satt på is. Nye 1,5ml rør ble tilsatt 25 µl kompetente *Escherichia coli* bakterier og satt på is. Bakteriene ble tilsatt 1 µl av TOPO[®] reaksjonsmiksen og blandet lett med en pipettespiss før rørene ble satt på is til inkubering i 10 min. Deretter ble bakteriene varmesjokket i et 42°C vannbad i nøyaktig 30 sec før de ble satt direkte på is (for å stimulere transformasjon). Etter varmesjokket ble bakteriene tilsatt 125 µl romtemperert SOC-medium og inkubert i en risteinkubator på 250 rpm 37°C i 1 time. Bakteriene ble deretter sådd ut på 2 merkede LB-skåler med ampisillin laget dagen før. Den første skålen ble tilsatt 10 µl og den andre 100 µl bakterier. Bakteriene ble fordelt utover skålen med en L-formet bakteriespreder. Da skålene var tørket ble de inkubert på 37°C over natten (ca. 16t) i en lukket plastpose og deretter flyttet til et kjølerom for oppbevaring.

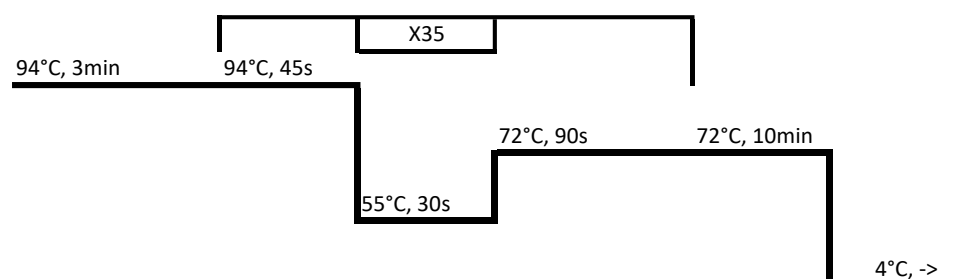
2.9 Koloni-screening

Plasmidene ble analysert ved PCR og gelelektroforese for å identifisere kloner med interessante fragmenter («inserts»). Bakteriene ble plukket og løst i 10 µl vann. 1 µl av bakterieløsningen ble tilsatt en PCR-MM. MMen (Tab. 6) besto av 2 µl 10x buffer (1x), 0,5 µl dNTPs (0,2mM), 0,6µl MgCl (1,5mM), 1 µl M13 «forward primer» (0,5µM), 1µl M13 «reverse primer» (0,5µM), 0,1µl *Taq* polymerase (25U/ml) og 13,8µl vann. PCR-en ble gjort

med følgende program; 5 min koking på 94°C før 35 sykluser med 94°C 45 sec, 55°C 30 sec og 72°C 90 sec, til slutt ble det brukt 1 syklus på 72°C i 10 min. Programmet inneholdt en syklus på 4°C til uendelig slik at rørene kunne stå over natten. PCR-produktene ble separert ved gelelektroforese. Interessante kloner ble dyrket opp i flytende LB-medium med 100µg/l ampicillin (fra de resterende 9 µl med vann brukt tidligere) over natten (ca. 16t) på 37°C og 250 rpm. Enkeltkolonier fra skålene ble sådd om til en ny plate (markert med 52 ruter) for å bevare levende bakterier med plasmid inntil positive kloner var karakterisert.

Tabell 6. Reagensliste med inkuberingstid og temperatur for Taq PCR.

	Stock	volum µ	konsentrasjon
buffer	10X	2	1X
forward primer	10µM	1	0,5µM
reverse primer	10µM	1	0,5µM
Taq polymerase	5U/µl	0,1	25U/ml
vann		13,8	
Templat	Plasmider	1	1:20
MgCl ₂	50mM	0,6	1,5mM
dNTPs	10mM	0,5	0,2mM
Total		20	



2.10 Plasmid-rensing

Plasmidene ble rensert med kittet NucleoSpin® Plasmid EasyPure, Machery Nagel. 1ml av en bakteriekultur dyrket i flytende LB-medium ble tilsatt til et 1,5ml rør og sentrifugert på 12000g i 30 sec, slik at en bakteriepellet ble dannet i bunnen av røret. Væsken ble pipettert av og pelleten ble tilsatt 150µl resuspensjonsbuffer (A1). Røret ble vortexet til pelleten var fullstendig resuspendert før 250µl lysisbuffer (A2) ble tilsatt. Røret ble vendt til løsningen var blandet (5 ganger) og inkubert på romtemperatur i 5 min for at cellene skulle gå i lysis. Røret ble tilsatt 350µl nøytraliseringsbuffer (A3) og vendt til løsningen ble gjennomsiktig og

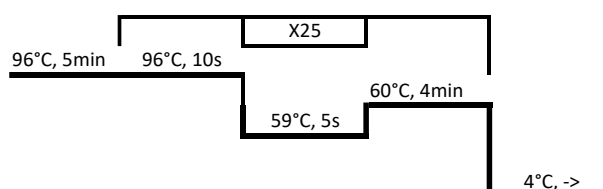
sentrifugert på 12000g i 3 min. Da sentrifugeringen var ferdig, ble supernatanten helt over i kolonnen og sentrifugert på 12000g i 30 sec. Væsken fra oppsamlingsrøret ble kastet og kolonnen ble tilsatt 450µl vaskebuffer (AQ) og sentrifugert på 12000g i 1 min. Vaskebufferen ble kastet og vaskingen ble repetert. Etter andre vasking ble kolonnen flyttet til et rent og merket 1,5ml rør og tilsatt 50-30 µl elueringsbuffer (AE) påfulgt av sentrifugering. Konsentrasjonen av plasmidene ble målt med Nanodrop. Ved målingen av plasmidene ble Nanodrop-maskinen blanket med AE-buffer. Rensete plasmider ble lagret på -20°C inntil sekvensering.

2.11 DNA-sekvensering

DNA-sekvenseringsreaksjoner ble gjort ved hjelp av BigDye reagenser. Avlesingen ble utført av personell ved UIB sitt sekvenseringslaboratorium på Høyteknologisenteret. MM besto av (Tab. 7): 1µl buffer, 1µl BigDye, 225-300 ng templat, 5 pmol «forward» eller «reverse» primer (ett rør med «M13 forward» og ett rør med «M13 reverse» for hver klon) og vann til et sluttvolum på 10µl. Følgende temperatur-syklus ble brukt: 96°C initialisering i 5 min og 25 sykluser med 96°C denaturering i 10 sec, 59°C annealing i 5 sec, 60°C elongation i 4 min. Programmet ble avsluttet med oppbevaring på 4°C. Rørene ble oppbevart i mørke frem til levering på sekvenseringslaboratoriet.

Tabell 7. Reagensliste med inkuberingsstid og temperatur for sekvenseringsreaksjonen.

	Volum µ
Vann	7,5-X
BigDye	1
Buffer	1
Templat	X
Primer	0,5
Total	10



2.12 Bioinformatikk

Kromatografi-data-, aminosyre-translasjon- og sekvens-analyse ble utført med Ugene ([Unipro UGENE - Integrated Bioinformatics Tools](#))(Okonechnikov, Golosova and Fursov, 2012). Søk i databaser ble gjort med BLAST («Basic Local Alignment Search Tool» (Altschul *et al.*, 1990) (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)). Sekvenser ble sammenlignet ved hjelp av ClustalW algoritmer, «maximum likelihood» og «bootstrapping» i [MegaX](#) («Molecular Evolutionary Genetics Analysis») (Kumar, Tamura and Nei, 1993). Intron/ekson-strukturen til genene ble funnet ved [Splign](#) (Kapustin *et al.*, 2008). N-Glykosyleringssteder ble identifisert med programmet [NetNGlyc 1.0](#) (Gupta and Brunak, 2002). O-Glykosyleringssteder ble identifisert med programmet [NetOGlyc 4.0](#) (Steentoft *et al.*, 2013). 3D-strukturen til proteinene ble predikert ved hjelp av «Protein Homology/analogy Recognition Engine V 2.0» ([PHYRE2](#)) (Kelley *et al.*, 2015).

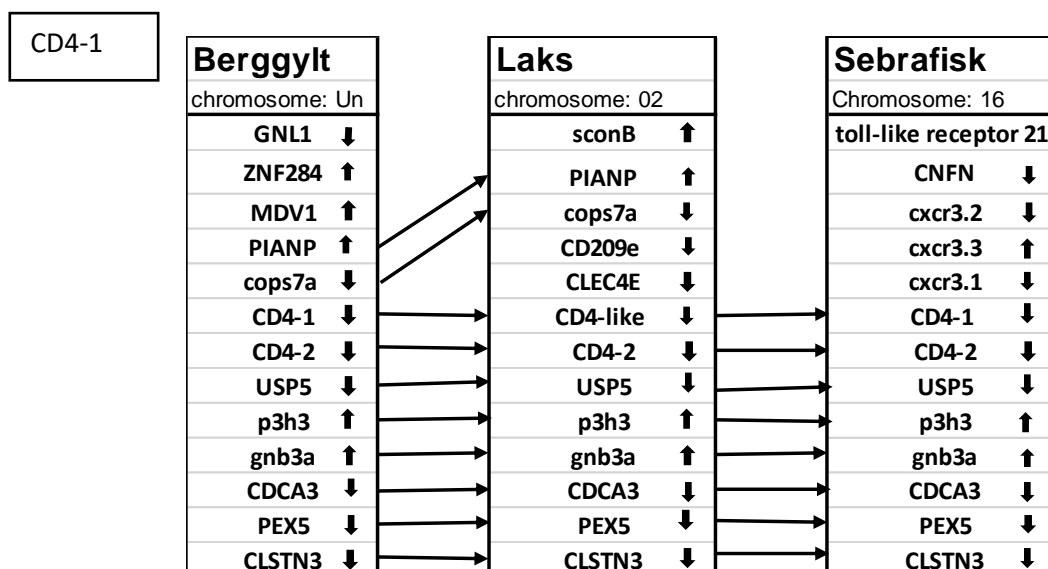
3. Resultater

3.1 Identifikasjon av CD4-1- og CD8a-gener i berggylt

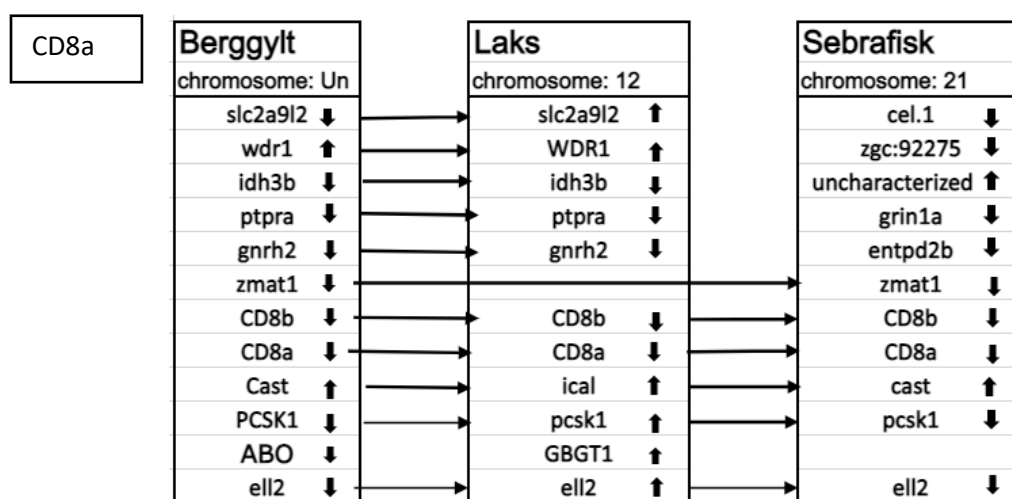
Potensielle CD4-1- og CD8a-sekvenser hos berggylt ble først identifisert ved søk i transkripsjonsdata fra tarmvev (personlig kommunikasjon, Ivar Hordvik). Automatisk predikerte transkripter fra de samme vevsprøvene har nå blitt tilgjengelig i åpne databaser. Slike sekvenser kan imidlertid inneholde betydelige feil, både med hensyn til hvilke gener de representerer, og i flere tilfeller er det påvist hybrider av flere ulike gener i databasen. I denne masteroppgaven ble det derfor innledningsvis gjort en dataanalyse av de genene som skulle undersøkes.

3.1.1 Plassering i forhold til nabogener i genomet

Sammenligning mellom berggylt, atlantehavslaks og sebrafisk («synteny-analyse») viste at det er en stor grad av felles nedarving i nabogenene rundt CD4-1 og CD8a. Genene som koder for CD4-1 og CD4-2 er lokalisert rett etter hverandre og nedarves sammen (Fig. 9). Dette er også tilfellet for CD8a og CD8b (Fig. 10). Likhetene i gen-rekkefølgen er spesielt stor nedstrøms for CD4-1 og CD8a. Nedstrøms for CD4-1 var 7 av 7 gener like mellom laks og berggylt. Nedstrøms for CD8a var 6 av 7 gener like mellom laks og berggylt. Det eneste genet som ikke ble funnet hos laks («zmat1») ble funnet i sebrafisk på samme plass som i berggylt. CD4-1 og CD8a er lokalisert på forskjellige kromosomer. PCSK1, ABO og ell2 hos berggylt ble funnet på et annet scaffold (NW_018114440.1) enn CD8a (NW_018114708.1).



Figur 9. Rekkefølgen av nabogener rundt CD4-1 i berggylt, laks og sebrafisk. ↑ og ↓ viser retningen på genet i 3' 5' retning. Pilene mellom rutene viser plasseringen av de samme genene i de forskjellige artene. Berggylt CD4-1 ble identifisert i scaffold NW_018114738.1, *Salmo salar* er fra kromosom 2 ([GCF_000233375.1](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/assembly/GCF_000233375.1)) og *Danio rerio* fra kromosom 16 ([ZFIN:ZDB-GENE-100922-280](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/assembly/ZFIN:ZDB-GENE-100922-280)). Illustrasjon av Aslak Reikvam.



Figur 10. Rekkefølgen av nabogener til CD8a i berggylt, laks og sebrafisk. ↑ og ↓ viser retningen på genet i 3' til 5' retning. Pilene mellom rutene viser plasseringen av de samme genene i de forskjellige artene. Genene «cast» og «ical» er de samme, men har fått forskjellige navn i atlantisk laks versus sebrafisk og berggylt. Berggylt CD8a ble identifisert i scaffoldet NW_018114708.1 og denne regionen antas å være like i nærheten av NW_018114440.1 (PCSK1, ABO og ell2). *Salmo salar* -regionen er fra kromosom 12 ([GCF_000233375.1](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/assembly/GCF_000233375.1)) og *Danio rerio* regionen fra kromosom 21 ([ZFIN:ZDB-GENE-060210-2](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/assembly/ZFIN:ZDB-GENE-060210-2)). Illustrasjon av Aslak Reikvam.

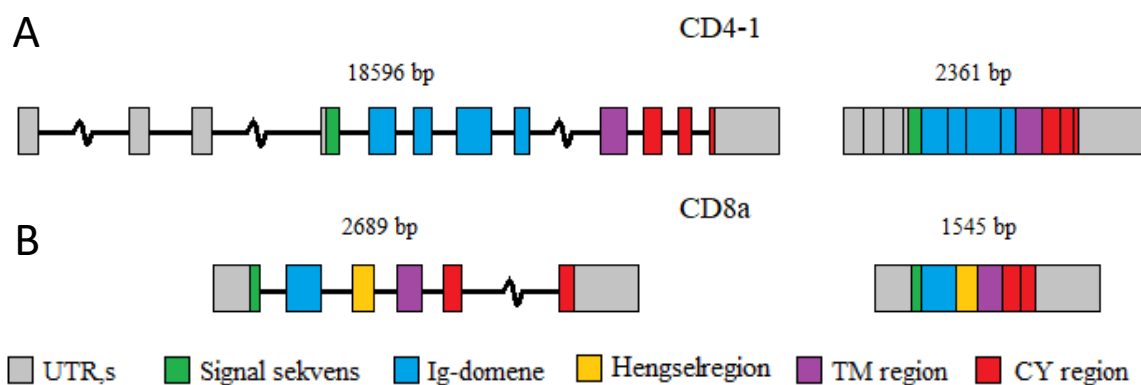
3.1.2 Ekson/intron-strukturen til CD4-1 og CD8a

Den predikerte CD4-1 mRNA-sekvensen er 2361 nt og består av 12 eksoner hvor start-kodonet først finnes i fjerde ekson (Fig. 11 A). Alle eksonene følger AG-GT-regelen.

Proteinet kodes av 1422 nt, inkludert stopp-kodonet. Dette gir et 473 aminosyrer stort protein.

Den predikerte CD8a mRNA-sekvensen er 1545 nt, og består av 6 eksoner, der alle følger AG-GT-regelen (Fig. 11 B). Proteinet kodes av 675 nt og består av 225 aminosyrer.

Størrelsen og antall eksoner samsvarer med tilsvarende gener fra andre arter. CD4-1 har 4 Ig-domener og er et større protein enn CD8a som har ett Ig-domene.



Figur 11. Ekson/intron-strukturen til CD4-1 (A) og CD8a (B). Eksonene er de fylte boksene og intronene strekene imellom. Eksonene er fargekodet etter domene de koder for. Lengden av pre-transkriptet (venstre) og mRNA (høyre) er oppgitt i antall basepar de utgjør i genomet. Sekvensene som ble analysert var predikerte mRNA for CD4-1 (XM_020649071) og CD8a (XM_020647964.2) mot scaffold NW_018114738.1 (CD4-1) og NW_018114708.1 (CD8a). Illustrasjon av *Aslak Reikvam*.

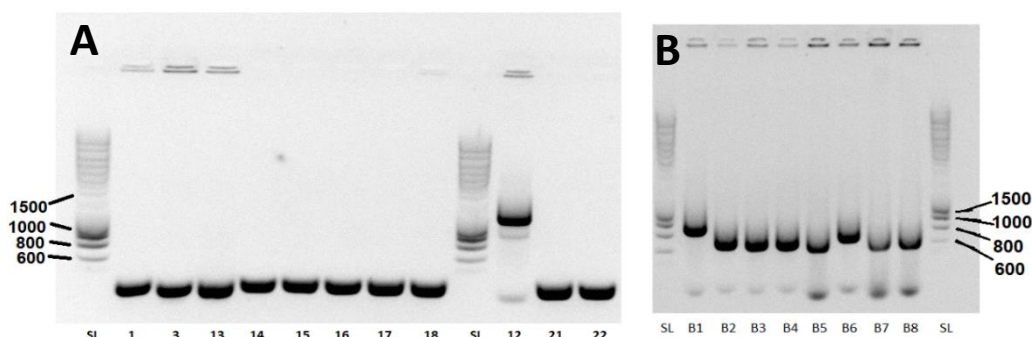
3.2 Karakterisering av berggyllt CD4-1 og CD8a cDNA

3.2.1 Kloning i plasmid

Kloningen av CD4-1 og CD8a fra berggyllt ble basert på nyrevev tatt fra fisken Ø5. Total-RNA ble brukt som templat, og cDNA ble syntetisert ved oligo-dT-priming. For å amplifisere CD4-1 ble primerne CD4 10F og CD4 R1 brukt. Disse amplifiserte mesteparten av den kodende delen av transkriptet. For CD8a ble primerne CD8 5F og CD8 4R. Disse amplifiserte kun Ig-domenet og hengselregionen. Primerparene for kloning av cDNA er beskrevet i Tab. 4 og indikert seinere på Fig. 14 og 15.

PCR-produktene ble klonet i plasmidvektor, og 11 kloner av CD4-1 og 8 kloner av CD8a ble testet for innsatte fragmenter (Fig. 12). 6 av CD8a-klonene viste innsatte fragmenter på ca 600 bp, mens to av klonene hadde «inserts» som var lengre (Fig. 12 B). En klon av hver lengde ble sekvensert (B1, B5 og B6).

CD4-1-klonene vokste dårligere enn CD8a-klonene. Screening viste at det var en klon med et innsatt fragment på 1500 bp og 10 kloner med innsatte fragmenter på ca 100 bp (Fig. 12 A). Forventet lengde var ca 1500 bp. 4 kloner ble sekvensert (CD4-1.1, CD4-1.3, CD4-1.13, CD4-1.12).



Figur 12. Analyse av CD4-1 og CD8a-kloner. A) Klonene 1-22 fra CD4-1-kloning. B) Klonene fra CD8a-kloning.

3.2.2 Berggylt CD4-1 cDNA

Kloning av CD4-1 resulterte i kun en positiv klon (CD4-1.12) (Fig. 12 A). Sekvensen fra klonen CD4-1.12 var lik den predikerte CD4-1-transkriptvarianten X2 (XM_020649071.2) i 1513 av 1519 nt. Alle 6 mutasjonene er substitusjons-punktmutasjoner (Fig. 13, posisjon: 326, 324, 383, 839, 846 og 1321). Mutasjonen i posisjon 839 fører til dannelsen av et stopp-kodon (Fig. 13) og (Fig. 17 under).

```

XM_020649070      tgtgtgtgtgagcgagagagagtatgacagagacacctgcatttcttacagcctacacaaa 60
CD4-1             ----- 0

XM_020649070      tgtcagtgaagaactcttcgcagcactgaaaacatcacgtaccaatcatcagcgaggag 120
CD4-1             ----- 0

XM_020649070      gtgcagccacgcttaaaaggagggctcgtttgataaatattctgcatttccatccgactc 180
CD4-1             ----- 0

XM_020649070      ctgatcgctgaacacaaaagacactcagctctcaaaaacagcttttgctgtccccacctt 240
CD4-1             ----- 0

XM_020649070      catctctgccgtggttgaccctcaccttcctttgcccttcccctcccccgctgcttgtt 300
CD4-1             -----tcaccttcctttgcccttccccctcccccgctgcttgtt 39
*****

```

XM_020649070 tttgaagctccatcctgactgcagatacgatcgtctcagtttctgggttacagctccaca 360
 CD4-1 tttgaagctccatcctgactgcagatacgatcgtctcagtttctgggttacagctccaca 99

XM_020649070 gagacctgactgagatgaagaactttattcaagccatcctcattctctctgctgtgc 420
 CD4-1 gagacctgatgactgagatgaagaactttattcaagccatcctcattctctctgctgtgc 159

XM_020649070 tcgcgatcctacgaaggcagaggaggtgatataatgctcaggtgggagacacagttacc 480
 CD4-1 tcgcgatcctacgaaggcagaggaggtgatataatgctcaggtgggagacacagttacc 219

XM_020649070 tcaagctgctgaataatttcatggaattatctgcactggtatcttgggtgacgaaagt 540
 CD4-1 tcaagctgctgaataatttcatggaattatctgcactggtatcttgggtgacgaaagt 279

XM_020649070 gcgctcactgcatggagtaatccccttgggtgaaaggatttcattaatacagaacatt 600
 CD4-1 gcgctcactgcatggagtaatccccttgggtgaaaggatttcattgatacagaacatt 339

XM_020649070 ggaaaactaagttgtctgacgactcatcactgatcatcaatgacatcaacaagaaaact 660
 CD4-1 ggaaaactaagttgtctgacgactcatcactgatcatcaatgacatcaacaagaaaact 399

XM_020649070 ttggaactttgtctgtaaatctcttctgaaagtaacaaactcacatacagactgctta 720
 CD4-1 ttggaactttgtctgtaaatctcttctgaaagtaacaaactcacatacagactgctta 459

XM_020649070 aatcagcgtcactgtggaccgagcctctcctctggtgccgggagaacttctgactctga 780
 CD4-1 aatcagcgtcactgtggaccgagcctctcctctggtgccgggagaacttctgactctga 519

XM_020649070 ctgcatagcagagactcctccaaatgctcagagtcagagatacactggctgaatccac 840
 CD4-1 ctgcatagcagagactcctccaaatgctcagagtcagagatacactggctgaatccac 579

XM_020649070 ggggggagaaggttgagaccaaacaaggaaagcacaagtgagagttacaagccaagacc 900
 CD4-1 ggggggagaaggttgagaccaaacaaggaaagcacaagtgagagttacaagccaagacc 639

XM_020649070 atggccagtgacatgtgtgtgacaaataataaaaaggaaaaccaagccaaaacctctg 960
 CD4-1 atggccagtgacatgtgtgtgacaaataataaaaaggaaaaccaagccaaaacctctg 699

XM_020649070 ttactgttgaggacctttcccagctcctttagatcctctgtatacatctaaatccacgc 1020
 CD4-1 ttactgttgaggacctttcccagctcctttagatcctctgtatacatctaaatccacgc 759

XM_020649070 ctctgaccgtcccctggttccgctcacatctcctgggaacagatcaaagctgtgg 1080
 CD4-1 ctctgaccgtcccctggttccgctcacatctcctgggaacagatcaaagctgtgg 819

XM_020649070 gcctccaggaagtttaactggcacttcaatcctcaacctggatcaaataatgtttctgggt 1140
 CD4-1 gcctccaggaagtttaactggcacttcaatcctcaacctggatcaaataatgtttctgggt 879

XM_020649070 acccacagagactcttctcctcctcctgggtgatccgcccacttgggaagaaagaccagg 1200
 CD4-1 acccacagagactcttctcctcctcctgggtgatccgcccacttgggaagaaagaccagg 939

XM_020649070 atagagatctgactcctgtactagacctcaaaaaggccttctgtctttgaccagaaagc 1260
 CD4-1 atagagatctgactcctgtactagacctcaaaaaggccttctgtctttgaccagaaagc 999

XM_020649070 aaggagggaacatgacaaaggagattacttttgcctcatgaaagtttagagatgggtgtga 1320
 CD4-1 aaggagggaacatgacaaaggagattacttttgcctcatgaaagtttagagatgggtgtga 1059

```

XM_020649070      ttctgaacaggactgttcatgttaaggtgctgcaaatacacttcctctgcaggaaccgagt 1380
CD4-1              ttctgaacaggactgttcatgttaaggtgctgcaaatacacttcctctgcaggaaccgagt 1119
*****

XM_020649070      tcatttctggccagcaggttaacctgtcttgacagcgttgccgagcctctgccctcttccc 1440
CD4-1              tcatttctggccagcaggttaacctgtcttgacagcgttgccgagcctctgccctcttccc 1179
*****

XM_020649070      ttagactaaaatgggtcccacctgaacaatcgtctcttctatctctgacaactgaccatc 1500
CD4-1              ttagactaaaatgggtcccacctgaacaatcgtctcttctatctctgacaactgaccatc 1239
*****

XM_020649070      accctgccacctcaccatccggggagtgggggcaggagacggaggaaggtggaggtgtg 1560
CD4-1              accctgccacctcaccatccaggagtgggggcaggagacggaggaaggtggaggtgtg 1299
*****

XM_020649070      agctgtggcagggcaatgtatgcctgacgtctgctgtgataaactcaagatcgagccta 1620
CD4-1              agctgtggcagggcaatgtatgcctgacgtctgctgtgataaactcaagatcgagccta 1356
*****

XM_020649070      agctgagtggtggatgctggtgatcatatgtagtgtcacagtcacatcgtcctcctcc 1680
CD4-1              agctgagtggtggatgctggtgatcatatgtagtgtcacagtcacatcgtcctcctcc 1416
*****

XM_020649070      tcatacttgttttcatcatctgcagacgcagacaacggaagacgagtcacctcagacatc 1740
CD4-1              tcatacttgttttcatcatctgcagacgcagacaacggaagacgagtcacctcagacatc 1476
*****

XM_020649070      ggctctgtaaatgcaaaaacccgaagcccaaggattcta--cagaaca--ta--atctcacaca 1800
CD4-1              ggctctgtaaatgcaaaaacccgaagcccaaggattcta----- 1519
*****

XM_020649070      aagacatttccaagaggacatcgcagccaatttaatttatgtccagataagatggatttt 1860
CD4-1              ----- 1519

XM_020649070      tttgtcagatccaataaacggggacgctctgtttggtgtttatgacgagggctctgaaagt 1920
CD4-1              ----- 1519

XM_020649070      tcagttgttcttgaaatgtcagacaagaaatataatatttagatcgttgtagatatcagt 1980
CD4-1              ----- 1519

XM_020649070      tttgtttttatatactctaataatgtaacatgtgattgatttctttgggattttaagaaattgc 2040
CD4-1              ----- 1519

XM_020649070      tctgtgaaggtgtacttccatttcaagtgttttttttattgttatatatgattaaagat 2100
CD4-1              ----- 1519

XM_020649070      tattaagatatttttatgtttgtgctccatttaaccatttaatgtgatgttcgctgtata 2160
CD4-1              ----- 1519

XM_020649070      ataatgcatttcaaagcttgggttaaatcctttattaatatttagaaacagatattttttta 2220
CD4-1              ----- 1519

XM_020649070      aatgagatataatattaaactaaatatacctactttactacttcaatcaaaacaggacgg 2280
CD4-1              ----- 1519

XM_020649070      ataattcttctttgaatgatgatgaaaccttcaaaaacactgtctatataaagtttttaa 2340
CD4-1              ----- 1519

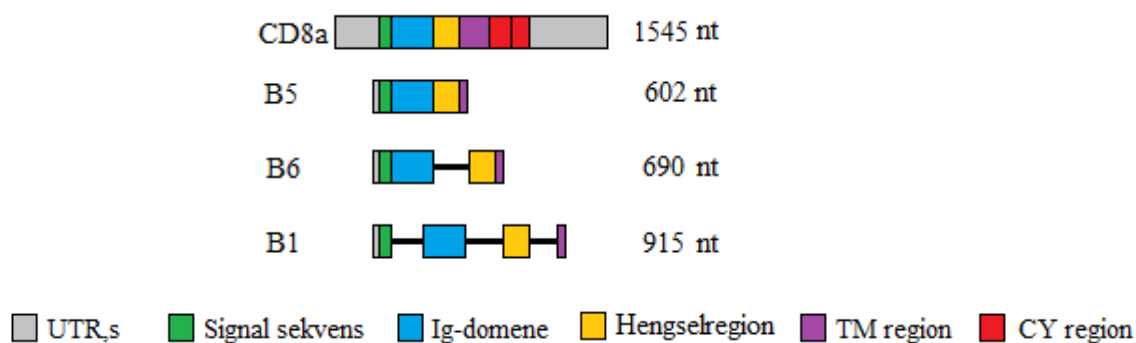
XM_020649070      taaagactgttaaactgc----- 2358
CD4-1              ----- 1519

```

Figur 13. Berggylt CD4-1 cDNA-sekvens. CD4-1-12 sekvensen er alignet mot den predikerte sekvensen XM_020649070. Primerene som ble brukt er markert gult. Start- og stopp-kodonene er markert med rødt. Nukleotid-substitusjoner er markert med blått.

3.2.3 Berggylt CD8a cDNA

Sekvensering av CD8a cDNA-klonene viste at noen av fragmentene representerte pre-transkripter. Klonene med introner var B1 med 3 introner og B6 med ett intron. B1 inneholdt intron nr. 1, 2 og 3. B6 inneholdt intron nr. 2 (Fig. 14). Disse intronene fører til rammeskifte og dannelsen av stopp-kodon i begge tilfellene.



Figur 14. Skjematisk illustrasjon av CD8a mRNA og tre CD8a cDNA-kloner som ble karakterisert i dette studiet. De svarte strekene indikerer intronene som ble funnet i de ferdige sekvensene. PCR av klonene kan sees på Fig. 12 B. Illustrasjon av *Aslak Reikvam*.

CD8a-klonen B5 var identisk med den predikterte CD8a-sekvensen i GenBank (XM_020647964.2), bortsett fra 2 punktmutasjoner som ikke førte til endring av den translaterete aa-sekvensen. Den ene mutasjonen (A»G) fantes kun i B1 klonen (Fig. 15 posisjon 361). Den siste mutasjonen (T»C) var til stede i alle CD8a-klonene og er derfor høyst sannsynlig en allel-variant (Fig. 15 posisjon 308).

XM_020647964.2 taggcagaggtgttgggtgcagatcgggtgggctccacttcaaacaccttgagaccacga 60
 CD8a ----- 0

XM_020647964.2 ctgtgctgcagaaggctctctgcaacactctgctgcaatgatctcatttgacatagcagtg 120
 CD8a ----- 0

XM_020647964.2 aagaagattacggctggggcgtggtttgatatctcactgaa **ttatcccccgctcagtctcc** 180
 CD8a -----ttatcccccgctcagtctcc 19

XM_020647964.2 **aa**caaacaccacaaagacaaatTTAACAGCTAAAactgtcaggggttaaa **atc**gaccaa 240
 CD8a aacaacaccacaaagacaaatTTAACAGCTAAAactgtcaggggttaaaatggaccaa 79

XM_020647964.2 aatggatacagattctgggtgattctgggtgttttttcagaaaattactacgggagcctgtg 300
 CD8a aatggatacagattctgggtgattctgggtgttttttcagaaaattactacgggagcctgtg 139

XM_020647964.2 aagaaagagtgataaaagagaaggagcaagttgaaatcaaatgtaatactcaagatttcg 360
 CD8a aagaaagagtgataaaagagaaggagcaagttgaaatcaaatgtaatactcaagatttcg 199

XM_020647964.2 gctccacttttgtctggtttcagtgctggacagaactgccatggaattcattgcatctt 420
 CD8a gctccacttttgtctggtttcagtgctggacagaactgccatggaattcattgcatctt 259

XM_020647964.2 ctaacttaattggtgatatgaaggaagcacattcctccttctcctccatcttcagtacca 480
 CD8a ctaacttaattggtgatatgaaggaagcacattcctccttctcctcca **c**cttcagtacca 319

XM_020647964.2 gaaagagcaaaccaattgatccttacattgaactccttcaacaagctagtgcagtggtg 540
 CD8a gaaagagcaaaccaattgatccttacattgaactccttcaac **g**aagctagtgcagtggtg 379

XM_020647964.2 ttacagctgtatctctcagaaaggctcaggtattgaaaattggcgtgtgactcgactgg 600
 CD8a ttacagctgtatctctcagaaaggctcaggtattgaaaattggcgtgtgactcgactgg 439

XM_020647964.2 gcgagaaaaagttaaagtctcaacagaagcaccactgaacaccaccaaaccaagtccat 660
 CD8a gcgagaaaaagttaaagtctcaacagaagcaccactgaacaccaccaaaccaagtccat 499

XM_020647964.2 gcacgactgtgcgcatgctgtgaccataaaacacggaagaggaagcaagtatcc 720
 CD8a gcacgactgtgcgcatgctgtgaccataaaacacggaagaggaagcaagtatcc 559

XM_020647964.2 tgatgctttgctctccaatca **tattgggtccacttgttggcag**ctgtggccttctcttc 780
 CD8a tgatgctttgctctccaatca **tattgggtccacttgttggcag**----- 602

XM_020647964.2 ttctcctcatcatcaccactctgtactgcaataagataaggacacggagatgccacatc 840
 CD8a ----- 602

XM_020647964.2 attataaaagaaaaccgcgggcgatgcctcctggaaatcaaatgaagaccagcagacaga 900
 CD8a ----- 602

XM_020647964.2 ta **ca**agagaatggttgagacatTTTcttcactgaaaatgttttacagtgtgttta 960
 CD8a ----- 602

XM_020647964.2 tttgttgagaaatTTTcaaggctttcattgcttgagacagaaatgtatgaaagtagttc 1020
 CD8a ----- 602

XM_020647964.2 aagaagtagacacatgcaatcatttcaaaactgtttattgtcaacttcagttgaactgt 1080
 CD8a ----- 602

XM_020647964.2 ttgttttagttgacggctgatgaagctgtgccgttatgttctaattgaactatcaaaga 1140
 CD8a ----- 602


```

XM_020647964.2 gatataaccagttgaatgctaataaggttataaaaaaaaaacacacaagatccaagaaaacat 1200
CD8a ----- 602

XM_020647964.2 tcagattcagcattatgatcgatggtttcttgacaattgtaaaaagaatttgtaatactt 1260
CD8a ----- 602

XM_020647964.2 tttagtttagcatacatttgattaataataaacataagtgcccttgatgctttcttcata 1320
CD8a ----- 602

XM_020647964.2 cttcttacttgatcctaaataatgacttactttgtatTTTTTTgtaatttaagcaatttaa 1380
CD8a ----- 602

XM_020647964.2 gcttgaagttcatttgcttttagcttgaattatTTTcagttctttactctttgctcttaaat 1440
CD8a ----- 602

XM_020647964.2 aaatgtgattaaatgatgccgggctcaggcataacttgaaatgctgaatcaaatggaatt 1500
CD8a ----- 602

XM_020647964.2 gtatTTTTTgatctgagctttattaaacattTTTTgttcatctaaa 1545
CD8a ----- 602

```

Figur 15. Berggylt CD8a cDNA. Sekvensen til CD8a cDNA-klonen er alignet mot den predikerte sekvensen XM_020649070. Primerene som ble brukt er markert med gult. Start- og stopp-kodonene er med markert rødt. Nukleotid substitusjoner er markert med blått.

3.3 Analyse av de translaterede CD4-1 og CD8a polypeptidene fra berggylt

3.3.1 Sammenligning med andre arter og beskrivelse av domener i proteinene

CD4-1 og CD8a ble translateret og sammenlignet med representative arter som vist i Fig. 16 og 17. CD4-1 kan deles inn i 4 Ig-domener en transmembran region og en cytoplasmisk region som vist i Fig. 17. CD8a kan deles inn i et Ig-domene, en kort hengselregion, en transmembran-region og en cytoplasmisk region som vist i Fig. 16. Glykosyleringssetene i CD8a (kapitel 3.3.2. Tab. 8) var lokalisert i hengselsregionen (Fig. 16).

3.3.2 Glykosylering

Glykosylering er en viktig del av proteinmodifiseringen og er avgjørende for den ferdige strukturen til proteinet. N-glykosylering dannes i aminosyregruppene Asn-Xaa-Ser/Thr (der Xaa kan være alle aminosyrer utenom prolin). N-glykosyleringssetene som ble funnet i de predikerte transkriptene og de sekvenserte klonene var like. O-glykosyleringssetene for CD8a var like mellom den sekvenserte og den predikerte sekvensen. CD8a er sannsynligvis sterkt glykosylert i hengselregionen. Det var 7 mulige O-glykosyleringsseter i dette området, alle med over 0.9 sannsynlighetsindeks (Tab. 8). Det er også et N-glykosyleringssete i dette området med en moderat høy sannsynlighet for glykosylering, men det er hovedsakelig O-glykosylering som antas å være viktig i dette området (Leahy, 1995).

I CD4-1 er det 2 N-glykosyleringsseter i området mellom tredje og fjerde Ig-domene. Den høyt O-glykosylerte hengselsregionen fantes ikke i CD4.

Tabell 8. Oversikt over potensielle glykosyleringsseter i CD4-1 og CD8a.

O-glykosylering					N-glykosylering				
#seqname	strand	frame	potential*	comment*	SeqName	Position	Potential*	Jury agreement	N-Glyc result
CD4-1	258	258	0.510906	#POSITIVE	CD4-1	254 NVSG	0.6796	(8/9)	+
CD4-1	268	268	0.513406	#POSITIVE	CD4-1	320 NRTV	0.6650	(9/9)	++
CD8-a	131	131	0.935685	#POSITIVE	CD4-1	345 NLSC	0.5200	(7/9)	+
CD8-a	132	132	0.841631	#POSITIVE	CD8-a	137 NTKK	0.6691	(9/9)	++
CD8-a	138	138	0.900364	#POSITIVE					
CD8-a	139	139	0.863326	#POSITIVE					
CD8-a	142	142	0.982004	#POSITIVE					
CD8-a	145	145	0.938869	#POSITIVE					
CD8-a	146	146	0.9566	#POSITIVE					

*Sannsynlighetsindeksen er vist under «potential» og «comment». «Cut-off» verdien er 0,5: Verdier over 0,5 indikerer høy sannsynlighet for glykosylering. Resultatene er fra NetNGlyc 1.0 og NetOGlyc 4.0, for henholdsvis N-glykosylering og O-glykosylering.

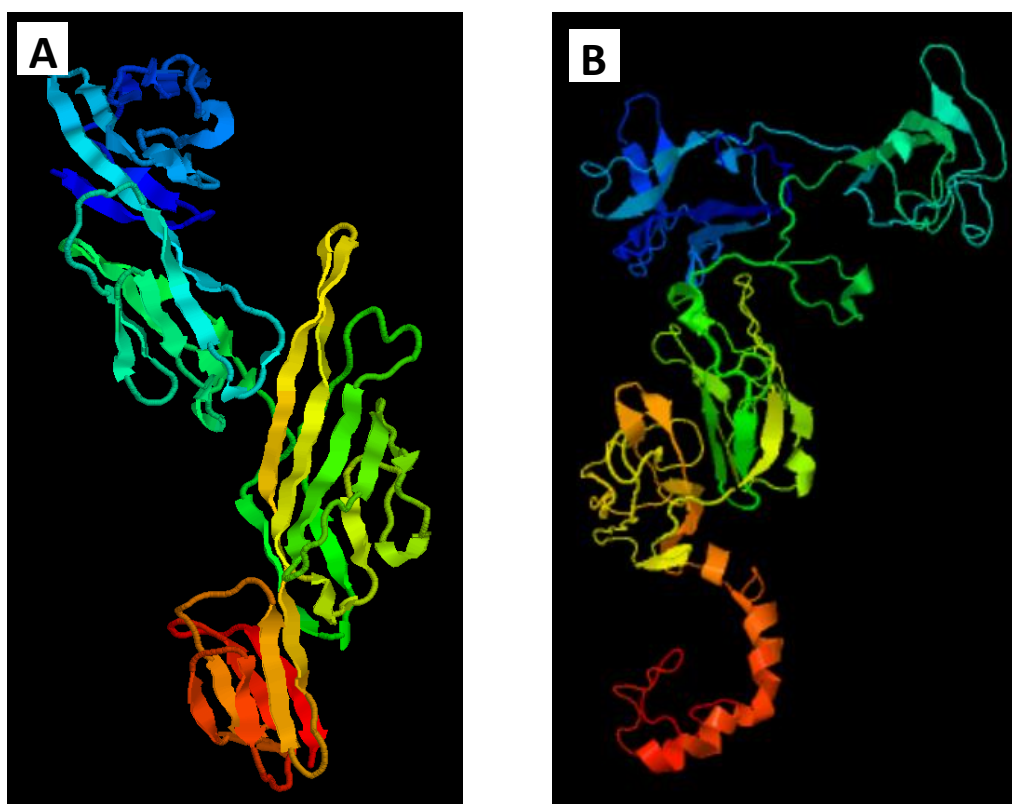
3.3.3 Predikerte 3D-strukturer av berggylt CD4-1 og CD8a

3D-modellering av CD8a viste ett Ig-domene med 2 plan av β -flak som ligger inntil hverandre (Fig. 18, blå og grønn). Strukturen viste også en α -heliks (oransje), som er transmembran-regionen. Hengselregionen imellom er indikert med gult. En kort cytoplasmisk hale er farget rød. Modellen baserer seg på kjente krystallstrukturer i menneskeproteiner. Figuren inneholder signalpeptidet som normalt ville vært kuttet av. Den tar heller ikke hensyn til endringer i strukturen som er påvirket av glykosylering.



Figur 18. Modellert 3D-struktur av berggyt CD8a. N-terminal ende er blå mens C-terminal ende er rød (Apache/2.4.39 (Unix) PHP/7.3.4 mod wsgi/4.4.1 Python/2.7.4 Server at www.sbg.bio.ic.ac.uk Port 80).

Modelleringen av berggylt CD4-1 på basis av menneske CD4 viste 4 separate domener med beta-flak (Fig. 19 A). Denne modellen inkluderer ikke transmembrandelen og cytoplasmisk hale. Når hele proteinet modelleres dannes ikke de typiske Ig-domenene, men transmembranpeptidet og cytoplasmisk hale er tydelig i den C-terminale enden av proteinet (rød) (Fig. 19 B). Modellen viser en høy grad av usikkerhet i området rundt transmembranpeptidet og cytoplasmisk hale.



Figur 19. Modellert 3D-struktur for berggyt CD4-1 med og uten transmembrandel. N-terminal ende er indikert med blått mens C-terminal ende er rød. A) predikert 3D-struktur for translateret CD4-1-sekvens av Ig-domenene formet etter CD4 fra menneske. B) predikert 3D-struktur for CD4-1, med transmembrandel. (Apache/2.4.39 (Unix) PHP/7.3.4 mod_wsgi/4.4.1 Python/2.7.4 Server at www.sbg.bio.ic.ac.uk Port 80)

3.4 Analyse av CD4-1 og CD8a -uttrykking i ulike vev

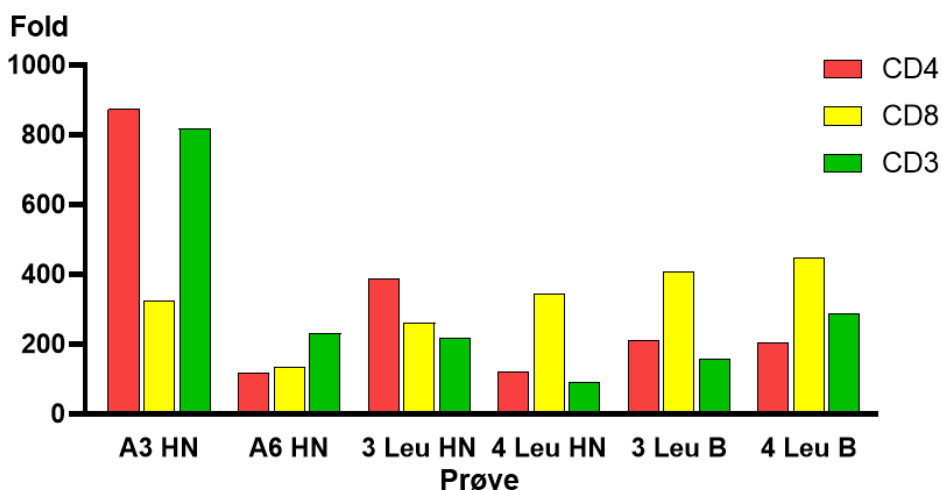
Det ble designet 4 primerpar for CD4-1 og 4 primerpar for CD8a med tanke på qPCR. På bakgrunn av uttesting av primerparene ble ett primerpar for hvert av målgenene valgt ut (CD4-1 10F+R og CD8a 1F+R). De resterende parene viste tendenser til primer/dimerdannelse (Appendiks 1).

Relativ uttrykking i et vev kalkuleres normalt ved hjelp av et referanse-gen. Referanse-gener er knyttet til sentrale prosesser i celler, og er derfor oftest uttrykt relativt likt i alle vev i organismen. Dette gjør at de kan brukes til å standardisere CT-verdiene fra vev uavhengig av mengden RNA tilsatt reaksjonen. Tradisjonelle referansegener som elongeringsfaktor 1 (EF1), UBI 3 og RPL-37 ble brukt i forsøkene mine. Ingen av disse ga lik uttrykking i forskjellige organer. Denne forskjellen i uttrykking så ut til å avvike like mye i alle fiskene, noe som indikerte problemer i forhold til valg av referanse-gen. Siden vi ikke fant et akseptabelt referanse-gen for berggyllt i dette studiet, ble uttrykkingen av målgenene beregnet i forhold til μg RNA brukt i cDNA syntesereaksjonen. «Fold change» ble regnet ut fra et nullpunkt satt som gjennomsnittet av det lavest uttrykte genet i det lavest uttrykte organet.

Høye verdier for CD4-1, CD8a, CD3e, RAG1 og RAG2 i prøvene tatt dorsalt i gjellehulen indikerte at prøvetakingen fra tymus var vellykket om enn noe varierende (dette blir utdypet i diskusjonsdelen, henholdsvis Fig. 24 og Fig. 23). RAG-1 og RAG-2 genene er essensielle for rekombinering av immunoglobulin- og T-cellereseptor-genene, og forventes å være aktive i tymus. Det var varierende mengde mRNA fra mål-genene i tymus-prøvene. Tymus-prøven tatt fra den fullvoksne villfangete berggylten (F1) viste relativt lave verdier i tymus sammenlignet med de andre fiskene. Det ble funnet opptil 10000 ganger mer CD4-1 i tymus (A5T1) enn i lever-prøvene fra fisk i samme tank (A3 og A6). CD8a ga tilsvarende resultater med rundt 40000 ganger mer uttrykking i tymus enn i lever. Blodrike organer viste noe uttrykking av CD4-1 og CD8a, men langt fra nivået i tymus. Det var typisk mellom 20-50 ganger mer CD4-1 mRNA i nyre, milt, tarm og gjeller enn i lever, mens det var 15-100 ganger mer CD8a mRNA i nyre, milt og tarm enn i lever. For disse organene var variasjonen større fra fisk til fisk enn mellom organene. Disse sammenligningene ble gjort med fold per μg RNA «input». Kun i muskel var det to prøver der uttrykking av målgenet ikke kunne detekteres. Både muskel og lever er regnet som negative organer, selv om det var litt

uttrykking i de fleste prøvene. Det varierte om uttrykkingen var aller lavest i lever eller muskel. Det er verdt å nevne at noen av disse verdiene var veldig lave, med CT-verdier på rundt 31.

Den relative mengden av transkripter ble også undersøkt i leukocytter fra blod og hodenyre (leukocytter fra 4 individer isolert av Ph.d.-student Angela Etayo). Nivået av CD4-1- og CD8a-transkripter i leukocytterne fra blod (Fig. 20) var 13 ganger høyere enn i lever for CD4-1, og 30 ganger høyere for CD8a. Når dette sammenlignes med uttrykkingen i milt-prøvene fra samme anlegg tilsvarer dette 77% av uttrykkingen for CD4-1 og 88-97% for CD8a.

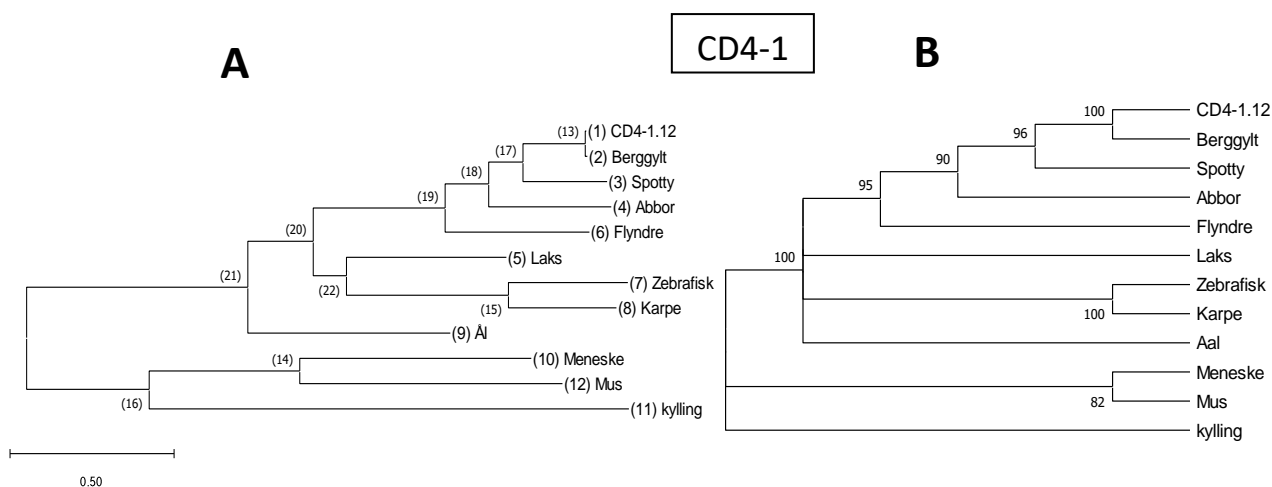


Figur 20. Uttrykking av T-cellemarkører i hodenyre og leukocytter fra blod og hodenyre. Y-aksen viser fold/mikrogram RNA tilsatt. Markørene undersøkt var CD4-1, CD8a og CD3e. Prøvene som ble analysert var 2 hodenyreisolater, 2 leukocyttilisolater fra hodenyre og 2 leukocyttilisolater fra blod.

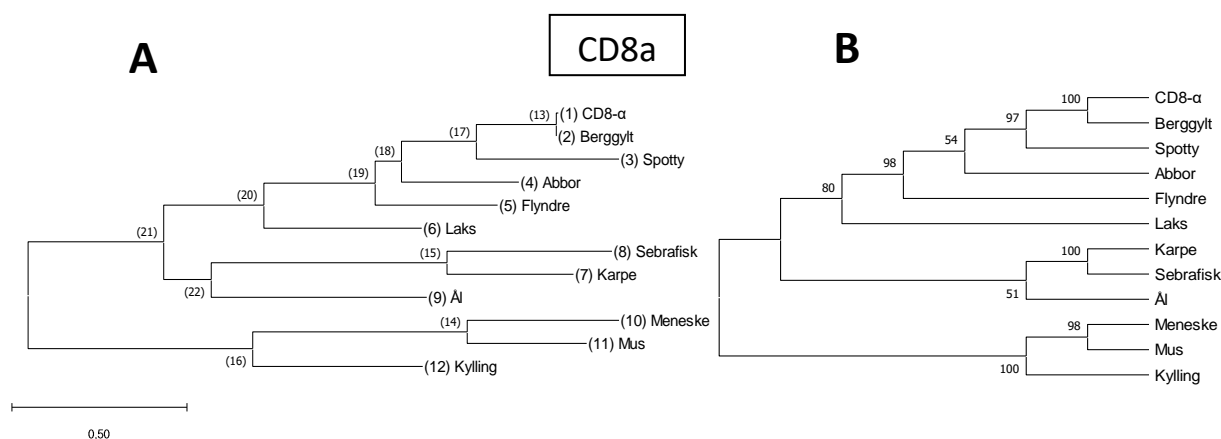
4. Diskusjon

Denne hovedfagsoppgaven ble initiert for å identifisere og karakterisere de to sentrale T-cellemarkørerne CD4-1 og CD8a i berggyllt. Etter å ha identifisert genene som koder for disse molekylene i to regioner av berggyllt-genomet ble det vist at nabogenene deres var de samme som i laks og berggyllt. CD4-1- og CD8a-genene i berggyllt viste seg å være enkeltkopi-gener, og ekson/intron-strukturen var konserverv i forhold til andre teleoster. De translaterede CD4-1 og CD8a polypeptidene viste sekvenslikhet til andre teleoster som forventet ut fra fylogenetisk slektskap, og transkriptene av genene var spesielt tallrike i tymus.

Slektskapet mellom berggyllt CD4-1 og de tilsvarende sekvensene i andre arter er illustrert i Fig. 21. Sammenligningen med CD4-sekvenser fra et utvalg av representative arter viste et fylogenetisk tre i samsvar med det forventede slektskapet til artene i analysen. Slektskapet mellom berggyllt CD8a og tilsvarende sekvenser i andre arter viste de samme trekkene som for CD4-1 (Fig. 22).



Figur 21. Opprinnelses tre (A) og bootstrap konsensus tre (B) for CD4-1. Proteinene er fra (1 *Labrus bergylta*) egen prøve, (2 *Labrus bergylta* predikert variant 2, XP_020504727.1), (3 *Notolabrus celidotus*, [XP_034553175.1](#)), (4 *Dicentrarchus labrax*, [AM849812.1](#)), (5 *Salmo salar*, NM_001123611.1), 6 *Paralichthys olivaceus*, BAM65615.1), (7 *Danio rerio*, NM_001135096.1), (8 *Cyprinus carpio*, ABD58988.1), (9 *Anguilla anguilla*, [XP_035248818.1](#)), (10 *Homo sapiens*, BC025782, (11 *Gallus gallus*, XM_004940497) og (12 *Mus musculus*, [NM_013488.3](#)). Treet er et maximum likelihood tre, bootstrappet 1500 ganger. Forgreiningspunktene i opprinnelsestree er nummererte mens forgreiningspunktene i bootstrap konsensus treet viser konsensusen mellom kalkulasjonene med en «cut off»-verdi på 50.



Figur 22. Opprinnelses tre (A) og bootstrap konsensus tre (B) for CD8a. Proteinene er fra (1 *Labrus bergylta*) egen prøve, (2 *Labrus bergylta* predikert, [XP_020503620.1](#)), (3 *Notolabrus celidotus*, [XP_034545051.1](#)), (4 *Dicentrarchus labrax*, [AAZ66439.1](#)), (5 *Paralichthys olivaceus*, [BAC66490.1](#)), (6 *Salmo salar*, [NP_001117055.1](#)), (7 *Cyprinus carpio*, [ABY75170.1](#)), (8 *Danio rerio*, [NP_001035138.1](#)), (9 *Anguilla Anguilla*, [XP_035248263.1](#)), (10 *Homo sapiens*, [AAH25715.1](#)), (11 *Mus musculus*, [NP_001074579.1](#)) og (12 *Gallus gallus*, [XP_015141436.1](#)). Treet er et maximum likelihood tre bootstrappet 1500 ganger. Forgreiningspunktene i opprinnelsestreet er nummererte mens forgreiningspunktene i bootstrap konsensus treet viser konsensusen mellom greinene med en «cut off»-verdi på 50.

Nabogenene rundt målgenene var i stor grad konserverte i forhold til andre teleoster.

Nedstrøms for CD8a hos både laks og sebrafisk var cast-genet etterfulgt av PCSK1-genet (Fig. 10). Hos berggylt var PCSK1 og cast lokalisert helt i enden av to forskjellige scaffolds. Dette kan tyde på at disse scaffoldene er lokalisert etter hverandre på samme kromosom, men at det ikke har vært mulig å koble disse sammen fra de genomiske sekvensene som foreligger per i dag. I analysen ble berggylt-scaffoldene sammenlignet med laksens kromosom 12 for CD8a. Et CD8b gen ble også funnet på kromosom 5. Denne kopien av CD8b stammer antageligvis fra når genomet til laksefiskene ble duplisert (Macqueen and Johnston, 2014). Det kunne ikke påvises noen tydelig sammenheng mellom funksjonen til de samlokaliserte genene bortsett fra den til CD4-1/CD4-2 og CD8a/CD8b. Områdene inneholder gener for alt fra en elongeringsfaktor (ell2) til reseptorer uttrykt i hjernen (PCSK1, CLSTN3, gnb3a). Flere av genene er knyttet til celledeling og vil kunne være uttrykt sammen med CD4-1 og CD8a i dannelsen av nye T-celler. Det kan ikke utelukkes at samlokaliseringen av disse genene spiller en rolle, men det var ingen åpenbare koblinger.

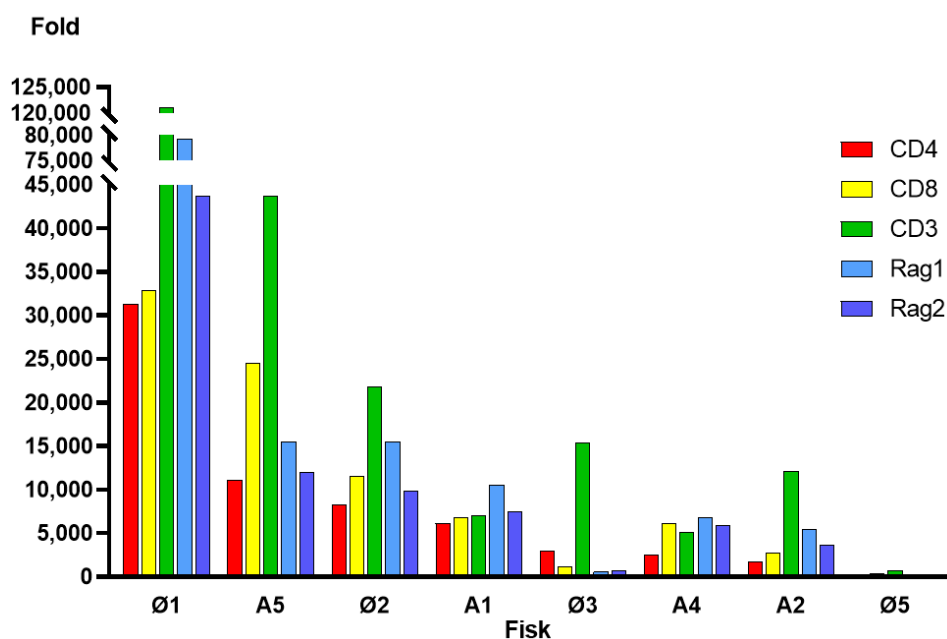
Ved dyrkingen av klonene var det tydelige forskjeller mellom veksten på kolonier med innsatt CD4-1 og CD8a. cDNA sekvensen til CD4-1 er vesentlig lengre enn den til CD8a, noe som kan føre til dårligere kloningseffektivitet. Screeningen av CD4-1 klonene viste at mange av plasmidene hadde et kort innsatt fragment istedenfor det forventete fragmentet på 1519 bp (Fig. 12 A). Sekvensering av en slik klon viste et overlappende fragment av primerne CD4F10 og CD4R1. Overlappet var på 3 nt i enden av hver primer og bestod av henholdsvis CCC og GGG. Dette bekreftet at det ble dannet primer-dimer under PCR-amplifikasjonen. Den lite effektive kloningen av CD4-1 kan skyldes tilstedeværelsen av primer-dimerne kombinert med det relativt lange CD4-1-fragmentet. Når cDNA-klonene ble sammenlignet med de predikerte sekvensene kunne flere av substitusjonene defineres som PCR-mutasjoner. Substitusjonen (G»A) (Fig. 13 CD4-1, posisjon 839) dannet et stopp-kodon midt i proteinet (TGG»TGA). Dette er høyst sannsynlig en PCR-mutasjon siden den vil føre til et ikke-fungerende protein.

Klonene av CD8a produserte 3 forskjellige lengder av cDNA. 2 av disse var pretranskriptet med enten 1 eller 3 introner. De forskjellige klonene hadde flere PCR-mutasjoner som kun eksisterte i en av de 3 sekvensene. En av substitusjonene var lik i alle klonene og forskjellig fra den predikerte sekvensen. Denne sannsynlige allel-variasjonen førte ikke til endring av aminosyre sekvensen (Fig. 15 posisjon 307).

Modelleringen av proteinenes 3D-struktur var ufullstendig siden det ikke var mulig å ta hensyn til glykosylering av proteinene. Dette påvirket CD8a mest. På modellen er hengselregionen sammenkrøllet, men med glykosylering vil den antageligvis rette seg ut og skape rom mellom transmembrandelen og Ig-domenet. Dette vil være nødvendig for at CD8 skal kunne interagere med alfa 1-domenet på MHC klasse I-molekylet (Fig. 4 A).

Glykosyleringssetene som ble funnet på berggyllt CD8a er de samme 7 setene som ble funnet på hengselregionen til CD8a fra kveite (Patel, Øvergård and Nerland, 2008). CD4-1 har også glykosyleringsseter som vil endre 3D-strukturen. De er plassert i eller nær enden av Ig-domenene og vil sannsynligvis strekke ut proteinet slik at Ig-domenene ligger mer på linje.

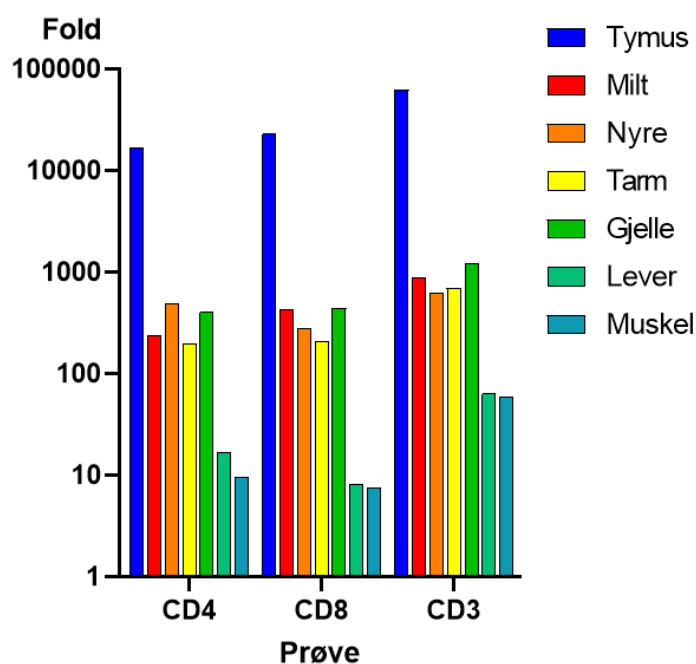
Mengden av CD4-1 og CD8a mRNA i tymus-prøvene varierte veldig mye (Fig. 23). Denne variasjonen ble ikke bare sett mellom fisker, men også mellom tymus-prøver tatt fra høyre og venstre side på samme fisk. Dette skyldtes sannsynligvis først og fremst hvor mye omliggende vev som kom med under prøvetakingen. Grunnet tymusens lite iøynefallende utseende, plassering og forandring under fiskens utvikling var det vanskelig å få rene tymus-prøver. Mengden av CD4-1 og CD8a mRNA i tymus-prøvene avspeiler derfor også hvor vellykket prøvetakingen var. Den høye uttrykkningen i en del av tymus-prøvene bekreftet imidlertid at tymus ble identifisert. En histologisk undersøkelse vil være nødvendig for å karakterisere tymus nærmere. Den villfangete berggylden hadde spesielt lite uttrykkning i tymus sammenlignet med andre tymus-prøver og de øvrige organene. Dette kan ha hatt sammenheng med at den var en vesentlig eldre fisk og at tymus kan tilbakedannes i voksen fisk (Press and Evensen, 1999). Det er også mulig at prøven som ble tatt inneholdt mye omliggende vev rundt tymusen, eller en kombinasjon av disse to faktorene.



Figur 23. Variasjon i uttrykkning av T-cellemarkører mellom forskjellige tymus-prøver. Markørene CD4-1, CD8a, CD3e, RAG1 og RAG2 ble benyttet. Y-aksen viser Fold- «change» / μ g tilsatt templat. Søylen er tredelt ved 45.000-75.000 og 80.000-120.000 for å tydeligere vise de lave verdiene i Ø3 og Ø5. Søylen viser den høyest uttrykte verdien av de to tymus-prøvene fra hver fisk.

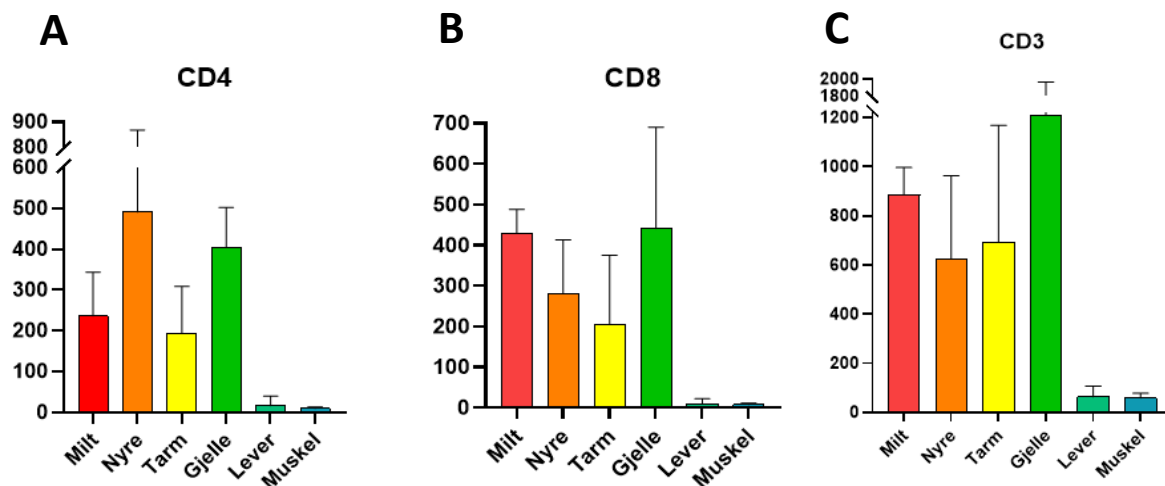
Uttrykkningen i de andre organene tenderte til å samle seg på to nivåer på den logaritmiske grafen (Fig. 24). De positive organene (milt, nyre, tarm og gjelle) plasserte seg omtrent midt mellom tymus og de «negative» organene lever og muskel. Dette uttrykkmønsteret samsvarer med observasjoner i kveite (Patel, Øvergård and Nerland, 2008, 2009).

Mesteparten av de positive organene inneholder mye blod. De relativt høye nivåene av CD4-1 og CD8a mRNA som ble detektert i leukocyt-prøvene fra blod innebærer at blodrester i prøver må tas i betraktning da dette vil påvirke uttrykksprofilen i vevene. Når fold/ μg RNA fra leukocytter i blod og hodenyre sammenlignes med nyreprøvene ser man at de er innenfor spredningen av andre nyre-prøver (Fig. 20). Dette betyr at deler av uttrykkningen i blodrike organer som milt, nyre og gjeller kan forklares av leukocytene i blodet. Prøven fra en av fiskene skilte seg ut ved abnormt høye CD4-1 og CD8a verdier i nyren og lav uttrykking i blodet (HN2 og Blod 2).



Figur 24. Logaritmisk fremstilling T-cellemarkører i tymus sammenlignet med blodrike og «negative» organer. De forskjellige organene ble analysert ved RT-qPCR for å estimere relative mengder CD4-1, CD8a og CD3e mRNA. Verdiene er gjennomsnittet av fold- «change»/ μg templat mellom de 3 individene A3, A6 og Ø5. Y-aksen er logaritmisk og viser tydelig grupperingen av 1) tymus, 2) blodrike organer og 3) «negative» organer.

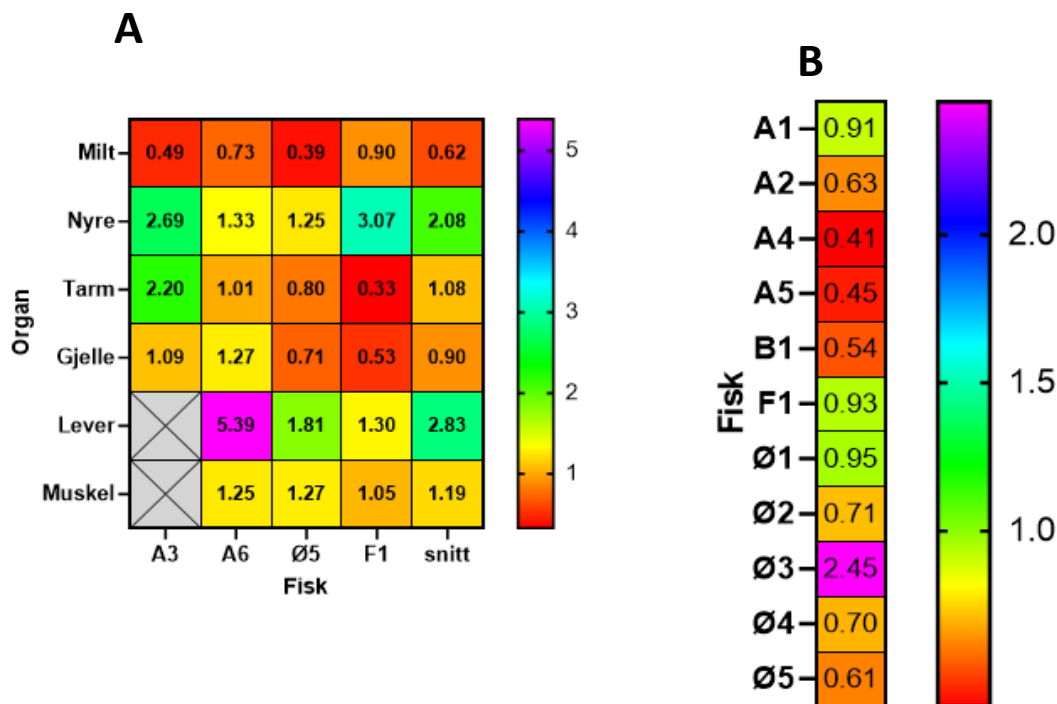
Prøvene fra den villfangete fisken (F1) viste ekstremt høye verdier, og ble derfor utelatt fra grafene i Fig. 25. Uttrykkningen var 10 ganger høyere i alle organer unntatt tymus. Dette kan forklares med at F1 er en eldre villfisk som har vært mer eksponert enn oppdrettsfisken. Samme tendens ble observert tidligere i forbindelse med analyse av IgM-uttrykking i oppdrettet berggylt kontra villfisk (Bilal et al., 2019).



Figur 25. Uttrykking av CD4-1 (A), CD8a (B) og CD3-e (A) i ulike vev. Y-aksen viser gjennomsnittet av Fold «change» / μg RNA input i cDNA reaksjonen for organpakke fra fisk A6, A3, Ø5.

Forholdet mellom antall CD4⁺-celler og CD8⁺-celler har blitt brukt til å indikere immunkompetanse i eldre mennesker (Strindhall *et al.*, 2013). I karpe ble CD4/CD8 forholdet målt i friske individer og funnet å være over 1 i nesten alle organer (Khallaf A. *et al.*, 2018). Unntaket var i tarmen, som hadde vesentlig mere CD8 enn CD4. Forholdet mellom CD4 og CD8 varierte med fiskens livsstadier og var høyest i området mellom 3-6 måneder. Dette kan bety at alderen på berggylden vil kunne påvirke CD4/CD8 forholdet.

I alle tymus-prøvene (unntatt Ø3) ble det funnet større mengder transkripter av CD8a enn CD4-1 (Fig. 26 B), gitt at qPCR-assayene var omtrent like effektive for begge genene. Det syntes å være lite sammenheng mellom CD4-1/CD8a-forholdet og uttrykkningsnivået. Dette tyder på at variasjonen i CD4-1/CD8a-forholdet ikke skyldtes prøvetakingen, men at det er et resultat av variasjoner i fisken.



Figur 26. Forholdet CD4-1/CD8a i organpakkene (A) og tymus-prøvene (B).

Det var mere CD4-1 enn CD8a i nyre mens forholdet var omvendt i tymus og milt. Nyre hadde et CD4-1/CD8a-forhold på rundt 3 for fisk F1 og A3 (Fig. 26 A) og 1,3 hos fisk Ø5 og A6. Dette kan samsvare med den store mengden B-celler som lagres i nyren og at disse interagerer med CD4-1-positive T-celler i dette organet (Press and Evensen, 1999). Et forsøk på japansk flyndre viste at 15-30% av CD4+ celler var CD4-1-/CD4-2+ (Xing *et al.*, 2017). Hvis dette er tilsvarende for berggyllt vil disse cellene ikke ha blitt fanget opp i dette forsøket. Trendene som ble observert i dette masterprosjektet bør derfor gjentas på et større materiale av fisk, og inkludere CD4-2 i tillegg. Karakteriseringen av CD4-1 og CD8a har imidlertid lagt forholdene godt til rette for å identifisere sentrale sub-populasjoner av T-celler i berggyllt, og dannet et grunnlag som videre forskning kan bygge på.

5. Kilder

Altschul, S. F. *et al.* (1990) ‘Basic local alignment search tool’, *Journal of Molecular Biology*, 215(3), pp. 403–410. doi: 10.1016/S0022-2836(05)80360-2.

Álvarez, F. *et al.* (1994) ‘Seasonal intrathymic erythropoietic activity in trout’, *Developmental and Comparative Immunology*, 18(5), pp. 409–420. doi: 10.1016/0145-305X(94)90006-X.

Álvarez, F. *et al.* (1998) ‘Seasonal changes in the lymphoid organs of wild brown trout, *Salmo trutta* L: A morphometrical study’, *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 64(3), pp. 267–278. doi: 10.1016/S0165-2427(98)00137-8.

Alzari, P. M. (1998) ‘Domains, Immunoglobulin-Type’, in *Encyclopedia of Immunology*. Elsevier, pp. 775–778. doi: 10.1006/rwei.1999.0204.

Arcy, D. J. *et al.* (2012) ‘Embryonic development in ballan wrasse *Labrus bergylta*’, *Journal of Fish Biology*, 81(3), pp. 1101–1110. doi: 10.1111/j.1095-8649.2012.03337.x.

Arcy, J. D. (2013) *Title Studies on the biology of the ballan wrasse, Labrus bergylta*. Available at: <http://hdl.handle.net/10379/3925> (Accessed: 3 March 2021).

ASCHE, F. (1997) *Thalassorama Trade Disputes and Productivity Gains: The Curse of Farmed Salmon Production?*

Barraza, F. *et al.* (2021) ‘Revisiting the teleost thymus: Current knowledge and future perspectives’, *Biology*, 10(1), pp. 1–18. doi: 10.3390/biology10010008.

Bilal, S. *et al.* (2016) ‘Characterization of IgM in Norwegian cleaner fish (lumpfish and wrasses)’, *Fish and Shellfish Immunology*, 59, pp. 9–17. doi: 10.1016/j.fsi.2016.09.063.

Bilal, S. *et al.* (2018) ‘T cell receptor alpha chain genes in the teleost Ballan wrasse (*Labrus bergylta*) are subjected to somatic hypermutation’, *Frontiers in Immunology*, 9(MAY), p. 22. doi: 10.3389/fimmu.2018.01101.

Bilal, S. *et al.* (2019) ‘Analysis of immunoglobulin and T cell receptor gene expression in ballan wrasse (*Labrus bergylta*) revealed an extraordinarily high IgM expression in the gut’, *Fish and Shellfish Immunology*, 87, pp. 650–658. doi: 10.1016/j.fsi.2019.02.007.

Bilal, S. (2019) ‘Molecular characterization of key components of the adaptive immune system in ballan wrasse (*Labrus bergylta*)’, *Bioengineering*, pp. 1–205.

Bilal, S., Etayo, A. and Hordvik, I. (2021) ‘Immunoglobulins in teleosts’, *Immunogenetics*. Springer Science and Business Media Deutschland GmbH, pp. 65–77. doi: 10.1007/s00251-020-01195-1.

- Bjørngen, H. and Koppang, E. O. (2021) 'Anatomy of teleost fish immune structures and organs', *Immunogenetics*. Springer Science and Business Media Deutschland GmbH, pp. 53–63. doi: 10.1007/s00251-020-01196-0.
- Boshra, H., Li, J. and Sunyer, J. O. (2006) 'Recent advances on the complement system of teleost fish', in *Fish and Shellfish Immunology*. Academic Press, pp. 239–262. doi: 10.1016/j.fsi.2005.04.004.
- Dalmo, R. A., Ingebrigtsen, K. and Bogwald, J. (1997) 'Non-specific defence mechanisms in fish, with particular reference to the reticuloendothelial system (RES)', *Journal of Fish Diseases*, 20(4), pp. 241–273. doi: 10.1046/j.1365-2761.1997.00302.x.
- Fischer, U. *et al.* (2006) 'Cytotoxic activities of fish leucocytes', *Fish and Shellfish Immunology*, 20(2), pp. 209–226. doi: 10.1016/j.fsi.2005.03.013.
- Forskrift om bekjempelse av lakselus i akvakulturanlegg* (2012). Nærings- og fiskeridepartementet. Available at: <https://lovdata.no/dokument/SF/forskrift/2012-12-05-1140> (Accessed: 21 May 2021).
- Granja, A. G. *et al.* (2015) 'Identification of Teleost Skin CD8 α + Dendritic-like Cells, Representing a Potential Common Ancestor for Mammalian Cross-Presenting Dendritic Cells', *The Journal of Immunology*, 195(4), pp. 1825–1837. doi: 10.4049/jimmunol.1500322.
- Gupta, R. and Brunak, S. (2002) 'Prediction of glycosylation across the human proteome and the correlation to protein function', *Pacific Sy*(7), pp. 310–322.
- Haugland, G. T., Rønneseth, A. and Wergeland, H. I. (2014) 'Flow cytometry analyses of phagocytic and respiratory burst activities and cytochemical characterization of leucocytes isolated from wrasse (*Labrus bergylta* A.)', *Fish and Shellfish Immunology*, 39(1), pp. 51–60. doi: 10.1016/j.fsi.2014.04.023.
- Havixbeck, J. J. and Barreda, D. R. (2015) 'Neutrophil Development, Migration, and Function in Teleost Fish', *Biology*, 4(4), pp. 715–734. doi: 10.3390/biology4040715.
- Jung, W. J. *et al.* (2020) 'Characterization of CD4-positive lymphocytes in the antiviral response of olive flounder (*Paralichthys oliveceus*) to nervous necrosis virus', *International Journal of Molecular Sciences*, 21(11), pp. 1–17. doi: 10.3390/ijms21114180.
- Kapustin, Y. *et al.* (2008) 'Splign: Algorithms for computing spliced alignments with identification of paralogs', *Biology Direct*, 3(1), p. 20. doi: 10.1186/1745-6150-3-20.
- Karlsbakk, E. *et al.* (2013) 'Amoebic gill disease due to *Paramoeba perurans* in ballan wrasse (*Labrus bergylta*)', *Aquaculture*, 412–413, pp. 41–44. doi: 10.1016/j.aquaculture.2013.07.007.
- Kelley, L. A. *et al.* (2015) 'The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis', *Nature Protocols*, 10(6), pp. 845–858. doi: 10.1038/nprot.2015.053.

Khallaf A., M. *et al.* (2018) *Percentage Dynamics of CD4-1+ and CD8 α + T Cells in different tissues at various developmanteal stages in ginbuna crucian carp carassius langsdorfii*, *The Japanese Society of Fish Pathology*. Available at: https://www.jstage.jst.go.jp/article/jsfp/53/1/53_10/_pdf (Accessed: 23 April 2021).

Kumar, S., Tamura, K. and Nei, M. (1993) *Molecular Evolutionary Genetics Analysis*.

Laing, K. J. *et al.* (2001) 'Cloning and expression analysis of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* tumour necrosis factor- α ', *European Journal of Biochemistry*, 268(5), pp. 1315–1322. doi: 10.1046/j.1432-1327.2001.01996.x.

Leahy, D. J. (1995) 'A structural view of CD4 and CD8', *The FASEB Journal*, 9(1), pp. 17–25. doi: 10.1096/fasebj.9.1.7821755.

Li, J. *et al.* (2006) 'B lymphocytes from early vertebrates have potent phagocytic and microbicidal abilities', *Nature Immunology*, 7(10), pp. 1116–1124. doi: 10.1038/ni1389.

Lie, K. K. *et al.* (2018) 'Loss of stomach, loss of appetite? Sequencing of the ballan wrasse (*Labrus bergylta*) genome and intestinal transcriptomic profiling illuminate the evolution of loss of stomach function in fish', *BMC Genomics*, 19(1), p. 186. doi: 10.1186/s12864-018-4570-8.

Macqueen, D. J. and Johnston, I. A. (2014) *A well-constrained estimate for the timing of the salmonid whole genome duplication reveals major decoupling from species diversification*, *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*. Royal Society. doi: 10.1098/rspb.2013.2881.

Maisey, K. *et al.* (2016) 'Isolation and Characterization of Salmonid CD4 + T Cells ', *The Journal of Immunology*, 196(10), pp. 4150–4163. doi: 10.4049/jimmunol.1500439.

Monica, B. (2016) *Evolutionary and functional insight into the teleost immune system-lessons learned from Atlantic cod and other teleosts*.

Mulero, I. *et al.* (2007) 'Histamine is stored in mast cells of most evolutionarily advanced fish and regulates the fish inflammatory response', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(49), pp. 19434–19439. doi: 10.1073/pnas.0704535104.

Murphy, K. (2017) *Janeway's immunobiology*, *Garland Science/Taylor & Francis Group*.

Nakanishi, T. *et al.* (2011) 'Cytotoxic T cells in teleost fish', *Developmental and Comparative Immunology*, 35(12), pp. 1317–1323. doi: 10.1016/j.dci.2011.03.033.

Okonechnikov, K., Golosova, O. and Fursov, M. (2012) 'Unipro UGENE: a unified bioinformatics toolkit', *Bioinformatics*, 28(8), pp. 1166–1167. doi: 10.1093/bioinformatics/bts091.

Ottesen, O. H., Dunaevskaya, E. and Arcy, J. D. (2012) 'Development of labrus bergylta (*Ascanius*

- 1767) larvae from hatching to metamorphosis', *Journal of Aquaculture Research and Development*, 3(3). doi: 10.4172/2155-9546.1000127.
- Patel, S., Øvergård, A. C. and Nerland, A. H. (2008) 'CD8 α and CD8 β in Atlantic halibut, *Hippoglossus hippoglossus*: Cloning, characterization and gene expression during viral and bacterial infection', *Fish and Shellfish Immunology*, 25(5), pp. 570–580. doi: 10.1016/j.fsi.2008.08.007.
- Patel, S., Øvergård, A. C. and Nerland, A. H. (2009) 'A CD4 homologue in Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*): Molecular cloning and characterisation', *Fish and Shellfish Immunology*, 26(3), pp. 377–384. doi: 10.1016/j.fsi.2008.11.013.
- Pilström, L., Warr, G. W. and Strömberg, S. (2005) 'Why is the antibody response of Atlantic cod so poor? The search for a genetic explanation', *Fisheries Science*, 71(5), pp. 961–971. doi: 10.1111/j.1444-2906.2005.01052.x.
- Press, C. M. L. and Evensen, O. (1999) 'The morphology of the immune system in teleost fishes', *Fish and Shellfish Immunology*, 9(4), pp. 309–318. doi: 10.1006/fsim.1998.0181.
- Quintela, M. *et al.* (2016) 'Is the ballan wrasse (*Labrus bergylta*) two species? Genetic analysis reveals within-species divergence associated with plain and spotted morphotype frequencies', *Integrative Zoology*, 11(2), pp. 162–172. doi: 10.1111/1749-4877.12186.
- Qviller, L., Helgesen, K. O. and Leif, S. C. (2021) *Fiskehelserapporten 2020, kappitel 7*. Available at: <https://www.vetinst.no/rapporter-og-publikasjoner/rapporter/2021/fiskehelserapporten-2020> (Accessed: 21 May 2021).
- Ronza, P. *et al.* (2020) 'The Teleost Thymus in Health and Disease: New Insights from Transcriptomic and Histopathological Analyses of Turbot, *Scophthalmus maximus*', *Biology*, 9(8), p. 221. doi: 10.3390/biology9080221.
- Ruane, N. M. *et al.* (2018) 'Isolation of salmonid alphavirus subtype 6 from wild-caught ballan wrasse, *Labrus bergylta* (Ascanius)', *Journal of Fish Diseases*, 41(11), pp. 1643–1651. doi: 10.1111/jfd.12870.
- Salinas, I. (2015) 'The mucosal immune system of teleost fish', *Biology*. MDPI AG, pp. 525–539. doi: 10.3390/biology4030525.
- SSB (2021) 09283: Eksport av fisk, etter varegruppe, land, statistikkvariabel og år. Statistikkbanken, www.SSB.no. Available at: <https://www.ssb.no/statbank/table/09283/tableViewLayout1/> (Accessed: 21 May 2021).
- Steentoft, C. *et al.* (2013) 'Precision mapping of the human O-GalNAc glycoproteome through SimpleCell technology', *EMBO Journal*, 32(10), pp. 1478–1488. doi: 10.1038/emboj.2013.79.

- Strindhall, J. *et al.* (2013) 'The inverted CD4/CD8 ratio and associated parameters in 66-year-old individuals: The Swedish HEXA immune study', *Age*, 35(3), pp. 985–991. doi: 10.1007/s11357-012-9400-3.
- Suetake, H., Araki, K. and Suzuki, Y. (2004) 'Cloning, expression, and characterization of fugu CD4, the first ectothermic animal CD4', *Immunogenetics*, 56(5), pp. 368–374. doi: 10.1007/s00251-004-0694-x.
- Sun, X. F. *et al.* (2007) 'Molecular cloning and characterization of carp (*Cyprinus carpio* L.) CD8 β and CD4-like genes', *Fish and Shellfish Immunology*, 23(6), pp. 1242–1255. doi: 10.1016/j.fsi.2007.06.004.
- Wan, F. *et al.* (2017) 'Characterization of $\gamma\delta$ T cells from zebrafish provides insights into their important role in adaptive humoral immunity', *Frontiers in Immunology*, 7(JAN), p. 9. doi: 10.3389/fimmu.2016.00675.
- Williams, A. F. and Barclay, A. N. (1988) 'The Immunoglobulin Superfamily—Domains for Cell Surface Recognition', *Annual Review of Immunology*, 6(1), pp. 381–405. doi: 10.1146/annurev.iy.06.040188.002121.
- Xing, J. *et al.* (2017) 'Characterizations of CD4-1, CD4-2 and CD8 β T cell subpopulations in peripheral blood leucocytes, spleen and head kidney of Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*)', *Molecular Immunology*, 85, pp. 155–165. doi: 10.1016/j.molimm.2017.02.015.
- Zaccai, N. R. (2010) 'Handbook of Cell Signaling, 2/e', in, pp. 49–54.
- Zapata, A. G., Varas, A. and Torroba, M. (1992) 'Seasonal variations in the immune system of lower vertebrates', *Immunology Today*. Elsevier Current Trends, pp. 142–147. doi: 10.1016/0167-5699(92)90112-K.
- Zhang, Y. A., Salinas, I. and Oriol Sunyer, J. (2011) 'Recent findings on the structure and function of teleost IgT', *Fish and Shellfish Immunology*. Academic Press, pp. 627–634. doi: 10.1016/j.fsi.2011.03.021.

6. Appendiks

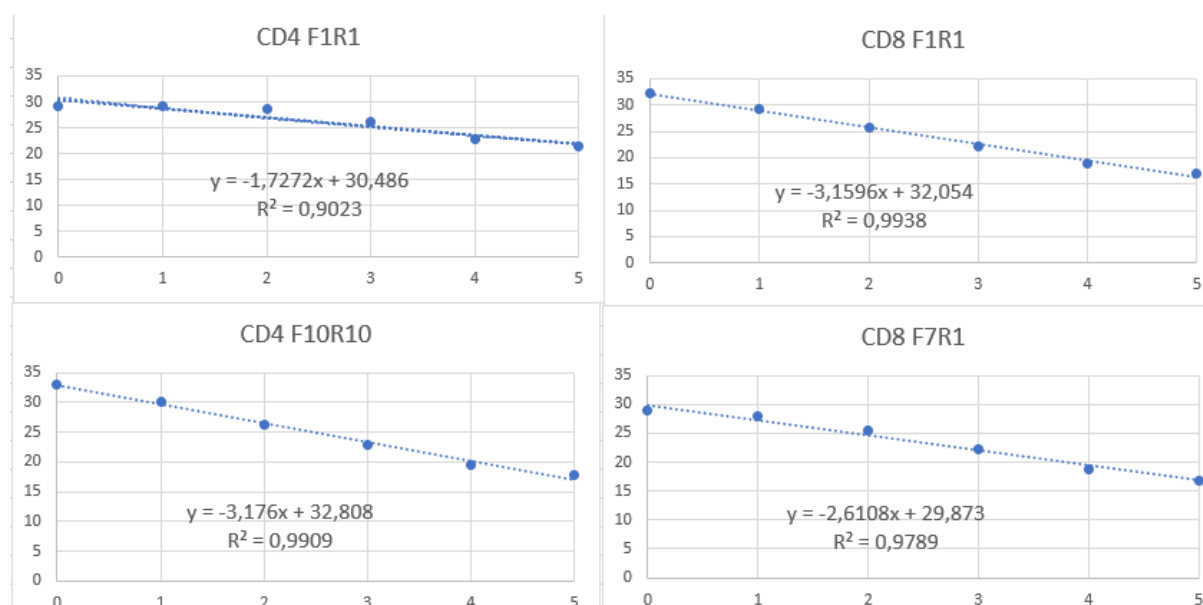
6.1 Primer effekt

Efekten av primerene ble målt med en 5 leds 1:10 fortyningsserie med 3 paralleller.

Gjennomsnitte av CT verdiene for fortyningsserien var.

	log	CD4 F1R1	CD4 F10R10	CD8 F1R1	CD8 F7R7
100000	5	21,3	17,8	17,0	16,8
10000	4	22,9	19,4	18,8	18,7
1000	3	26,0	22,8	22,2	22,2
100	2	28,6	26,2	25,7	25,4
10	1	29,1	30,1	29,1	28,0
1	0	29,1	32,9	32,2	28,9

CT-verdiene ble plottet i en graf hvor R² og stigningstallet ble beregnet.

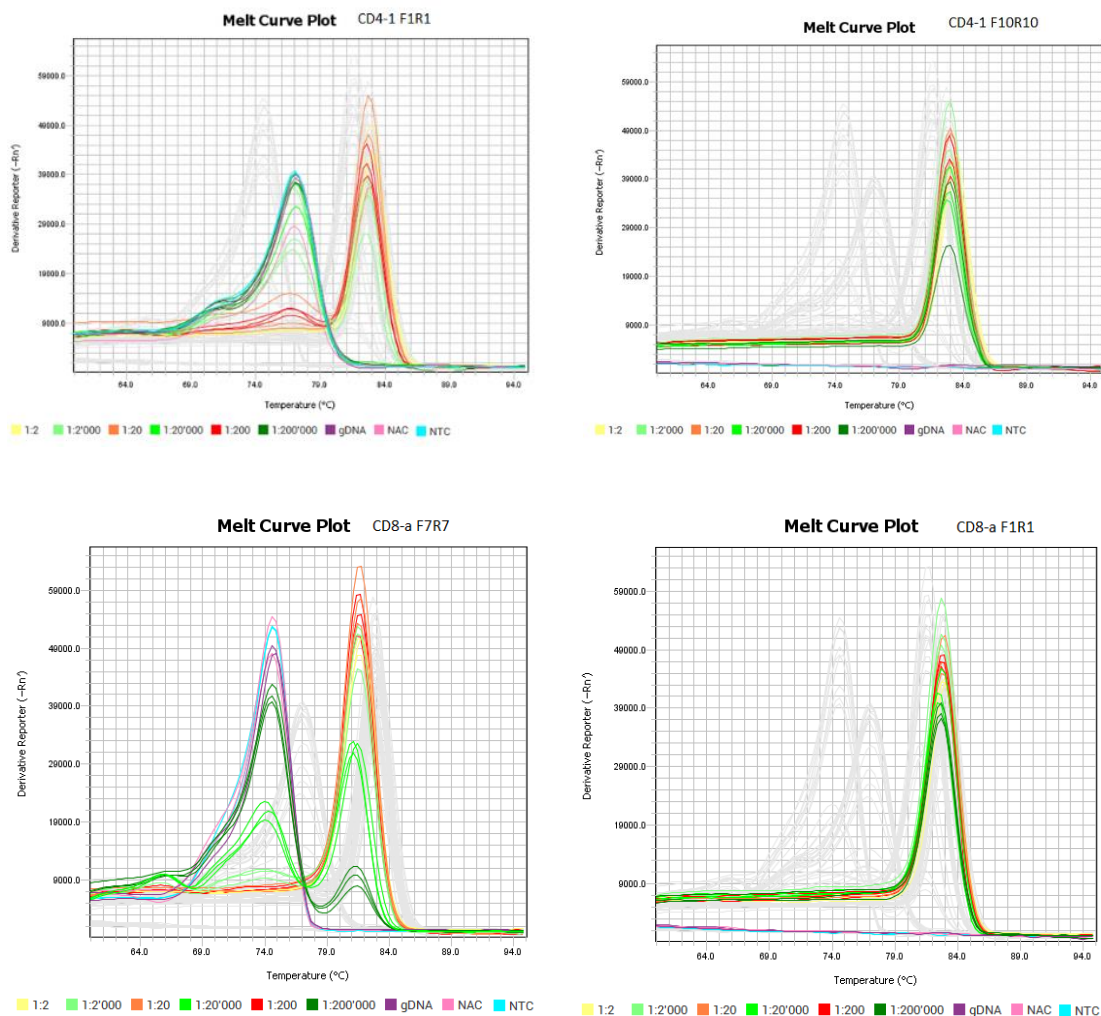


Effektiserte ble beregnet med formelen: $E = (10^{(-1/\text{The Slope Value})} - 1) * 100$

	CD4 F1R1	CD4 F10R10	CD8 F1R1	CD8 F7R7
Stigningstall	-1,7272	-3,176	-3,1596	-2,6102
Efficiency	279	106	107	142

Efekten til CD4 F1R1 og CD8 F7R7 er langt over 100%, som indikerer at de kopierer noe som ikke skal kopieres. Dette kunne også sees på smeltekurvene. CD4 F10R10 og CD8 F7R7 hadde også en R² nærmere 1 og er sannsynligvis de beste primerparene av de 4.

Testing av primerparene for CD4-1, CD8a ga splittede smeltekurver for CD4-1 F1R1 og CD8a F7R7 primerparene (Fig. 27). De hadde en sekundær topp ved lavere konsentrasjoner (til venstre for hoved-toppen), ved gDNA og NTC. Dette betyr at det dannes et annet og mindre produkt under PCR reaksjonen ved tilstedeværelsen av lite templat. Disse korte produktene er antageligvis primer-dimar og uønskete for primerparet.

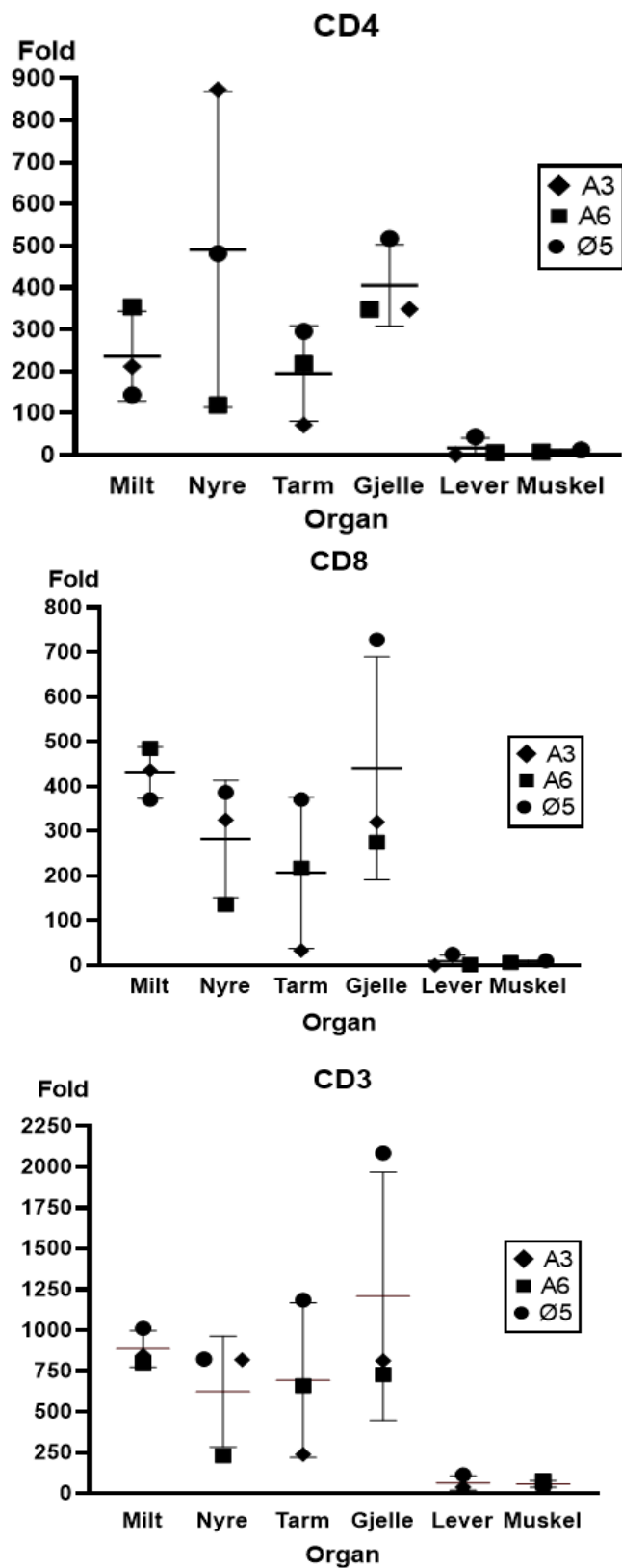


Figur 27. Smeltekurve for primerparene testet.

6.2 Bioanalyser

Bioanalyser ble brukt til å bedømme templat kvalitet. Analysen viser i hovedsak god RNA-kvalitet, med resultater der prøvene skårte over 8 RIN («RNA integrity number») (Fig. 28). Dette er en skala mellom 1-10, hvor 10 er perfekt bevart RNA og 1 er fullstendig nedbrutt RNA. Grafene hadde 2 tydelige topper med høy fluoresens. Dette var ribosomal RNA (18s og 28s). Disse RNA-molekylene er det mest av i en celle. Derfor indikerer disse at vi hadde god bevaring av RNA-et under rensing og lagring. Testen ble kun gjort på 12 av prøvene og kun på prøver tatt fra fisk i Øygarden. Alle andre prøver ble imidlertid tatt, rensset og oppbevart på samme måte. Derfor kan det antas at alle prøvene inneholdt RNA av en god kvalitet. Den eneste prøven som ga dårlige resultater var den fra tarm (prøve 3). Selv om tarm-prøven inneholdt de typiske toppene hadde den en stor andel veldig små RNA-biter. Disse bitene skyldtes ikke nødvendigvis nedbryting eller dårlig isolering, men rester fra tarminnholdet. Tarm hadde en RIN på 6.6, som var noe lavere enn det som var ønsket, men fortsatt brukbart. Prøven fra milt hadde en verdi på 6.7 mens enkelte tymusprøver (prøve 7 og 8) hadde en verdi på 9.3.

6.3 Fold per organ



Figur 28 Fold per organ for CD4-1, CD8a og CD3e. Alle prøvene for de 3 oppdrettsfiskene hvor det ble fulle organpakker er vist.

6.4 CT-verdier

Tabell 9. CT verdier for alle qPCR

Prøve	CD4	CD8	BCD3e	RAG1	RAG2	RPL37	UBI	ng mRNA
Ø1T2	17,4	17,1	N/A	17,2	17,3	19,4	15,5	5000
Ø2T2	17,2	16,7	N/A	16,3	17,0	18,1	13,9	5000
A5T1	16,8	15,6	N/A	16,3	16,7	17,7	13,5	5000
A2T2	21,4	20,0	N/A	20,5	21,0	21,3	17,5	943
A1T2	19,5	19,5	N/A	19,3	19,8	21,3	16,9	2305
A6N	24,8	25,2	N/A	30,6	26,1	21,0	16,8	1569
A6MU	29,5	30,3	N/A	35,2	28,5	23,2	18,7	606
A6N	25,0	24,8	24,0	28,7	25,1	19,5	N/A	1569
A6Tarm	22,5	22,5	20,9	30,7	25,3	16,4	N/A	5000
A6Gjelle	21,8	22,1	20,7	33,9	26,0	16,9	N/A	5000
A6Muskel	30,3	30,6	27,0	33,4	27,4	N/A	N/A	606
A6Milt	21,8	21,3	20,6	29,9	24,8	16,4	N/A	5000
A6Lever	27,6	29,3	25,0	30,8	25,4	17,8	N/A	5000
A1T2	18,8	18,6	18,6	18,0	18,5	19,1	N/A	2305
A3N	20,5	21,9	20,5	26,2	24,0	16,6	N/A	5000
A3Tar	29,1	30,2	27,3	33,8	27,2	21,5	N/A	155
A3Gjelle	22,0	22,1	20,8	31,4	23,6	17,1	N/A	4318
A3Muskel	N/A	N/A	25,8	34,3	33,3	26,0	N/A	1741
A3Milt	22,8	21,8	20,8	29,9	25,0	16,7	N/A	4065
A3Lever	29,5	31,2	24,9	32,5	25,1	18,0	N/A	5000
A4Ty1	20,9	19,6	19,9	19,4	19,6	19,5	N/A	1286
O5N	21,3	21,6	20,5	24,4	20,3	18,0	N/A	5000
O5Tar	22,0	21,7	20,0	28,6	23,7	16,4	N/A	5000
O5Gjelle	21,2	20,7	19,2	29,1	26,0	17,8	N/A	5000
O5Muskel	26,5	26,8	25,0	33,3	25,6	18,6	N/A	4906
O5Milt	23,1	21,7	20,2	31,2	25,8	17,0	N/A	5000
O5Lever	24,7	25,6	23,4	29,4	24,4	16,8	N/A	5000
O5Ty1	27,2	26,7	25,5	32,8	27,3	20,4	N/A	755
O5Ty2	24,1	23,4	22,3	23,9	24,3	18,5	N/A	1690
F1Nyre	20,1	21,7	19,7	23,0	19,7	15,1	N/A	5000
F1Tarm	20,9	19,2	18,3	31,5	28,9	16,3	N/A	5000
F1Gjelle	18,7	17,8	16,5	28,8	27,9	14,5	N/A	5000
F1Muskel	23,3	23,4	22,2	27,2	23,4	17,7	N/A	5000
F1Milt	18,7	18,5	17,4	30,5	25,0	14,6	N/A	5000
F1Lever	24,4	24,7	23,0	29,9	25,4	16,3	N/A	5000
F1Ty2	22,5	22,4	20,4	23,2	21,6	17,9	N/A	5000
1 Lym B	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	28,7	22,8	160

1 Leu B	N/A	33,7	25,8	N/A	N/A	25,6	21,2	160,0
2 Lym B	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	23,8	18,5	160
2 Lym Hk	34,8	N/A	26,6	N/A	N/A	25,9	21,7	160
2 Leu B	31,0	29,9	26,3	N/A	N/A	22,0	17,7	160
2 Leu HK	24,7	25,5	26,5	N/A	N/A	20,8	17,5	160
3 Lym B	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	23,2	19,4	160
3 Lym HK	31,6	30,6	31,4	N/A	N/A	21,7	17,5	160
3 Leu B	27,5	26,5	27,9	N/A	N/A	21,2	17,6	160
3 Leu HK	26,6	27,2	27,4	N/A	N/A	21,6	17,2	160
4 Lym B	N/A	N/A	31,9	N/A	N/A	25,3	20,8	160
4 Lym HK	29,6	27,5	29,0	N/A	N/A	22,0	17,6	160
4 Leu B	27,5	26,4	27,0	N/A	N/A	21,9	17,8	160
4 Leu HK	28,2	26,8	28,6	N/A	N/A	21,3	17,1	160

*N/A er prøver hvor genet ikke ble testet eller ikke ga entydige resultater. ng mRNA er mengden total RNA brukt i cDNA syntese reaksjonen for prøvene. qPCR ble kjørt 45 sykluser. Threshold var satt til 0,1.