

Immunologiske responsar i huda hos sjøaure (*Salmo trutta*) ved infeksjon av lakselus (*Lepeophtheirus salmonis*) i preadulte stadiet

Effektar av lakselus infeksjon på uttrykket til immunologiske gen i hud hos sjøaure, i sjøvattn og ved simulert prematur tilbakevandring i ferskvattn.



Magdalena Monika Swat

Master i Biologi - Havbruksbiologi

Juni 2022

Veiledere:

Sussie Dalvin- Forskningsgruppe; Smittespredning og sykdom, Havforskningsinstituttet.

Jon Vidar Helvik- Institutt for biovitenskap, Universitetet i Bergen

Institutt for biovitenskap, Universitetet i Bergen

Forord

Forsøket på sjøaure med simulert tilbakevandring i ferskvatn vert utført på Matre forskingsstasjon og er ein del av delprosjektet «Individeffekter av lakselus» koordinert og finansiert av Havforskningsinstituttet. Delprosjektet «Individeffekter av lakselus» er ein del av eit større prosjekt som heite «Overvåking av lakselus» .

Eg ønskjer å takke alle som har vert involvert i prosjektet. Alle på forskingsstasjonen på Matre og Havforskningsinstituttet som har vert med på uttak og prøvetaking av fisken. Samt ønskjer eg å gi spesiell stor takk til veiledaren min Sussie Dalvin (forskar på Havforskningsinstituttet) som har vert essensiell i utforminga av denne masteroppgåva.

Vidare vil eg også takke Mathias Ugelvik (postdoktor på Havforskningsinstituttet) og Tomasz Furmanek (senioringeniør på Havforskningsinstituttet) som har vert avgjerande i resultatutvinning.

Stor takk går også til min interne vegledar på Universitet i Bergen; Jon Vidar Helvik som har hjelpt og vegledda med gjennom denne oppgåva.

Ønsker også å takke min familie og vennar som har støtta og motivert meg gjennom denne prosessen.

Bergen, 2022



Magdalena Swat

Samandrag

Sjøaure er den anadrome delen av bestanden til brunaure (*Salmo trutta*). Arten gyter i elvar og bekkar før den smoltifiserer og vandrar ut i kystvatn for å finne større tilgang til føde og dermed vokse seg større. I kystvatn blir sjøaure utsett for nye typar patogen, der iblant lakselus (*Lepeophtheirus salmonis*). Lakselus er ektoparasitt som livsnære seg på hud, muskel og slimet til laksefiska. Lakselus finnes naturlig i norske kystområder, men dei siste 20 åra har denne blitt meir utbreidd i norske kystområder. Auka førekomst av lakselus skyldast opne-nett oppdrett der akkumulasjon av vertsfiska igjen fører til akkumulasjon av parasittar, i tillegg er lakselus svært tilpassingsdyktig og er resistent mot dei fleste kjemiske behandlingar som finnast i dag. Sjøaure som befinne seg i kystområder er svært utsett for lakselus og individa infisert med lakselus kan vandre tilbake i ferskvatn for å kvitte seg med parasitten. Høgt smittepress i kystområder kan føre til prematur tilbakevandring til ferskvatn, og på sikt kan dette potensielt utrydde den anadrome delen av bestanden. Dermed er det vesentleg å tileigne seg kunnskap om verknaden lakselus har på sjøaure. Får å tileigne seg denne kunnskapen er det vesentleg å studere parasitt-vert interaksjonar både på fysiologisk og immunologisk nivå. I dette studiet blir det sett på immunologiske responsar i huda hos sjøaure ved infeksjon med lakselus. Det blir sett på eit uttrykk av eit utval av immunologiske gen i hud hos sjøauresmolt, både i sjøvatn og ved simulert prematur tilbakevandring i ferskvatn.

Fisken i dette eksperimentet blei sampla på 6 ulike tidspunkt (uttak1-6). I kvar uttak blei det notert lengde, vekt, organvekt, kjønn, antall lus og det blei også tatt blodprøvar. Hudprøvar av infisert og kontroll fisk blei tatt i uttak 4 (i sjøvatn) og uttak 5 (i ferskvatn), lakselus var på preadulte stadiet i desse uttaka. Transkripsjon av immunologiske gen i huda; *tumor nekrose faktor (tnfa)*, *interleukin 8 (il8)*, *interleukin 6 (il6)*, *interleukin 10 (il10)*, *interleukin 1 beta (il1b)*, *interleukin 4/13a (il4/13a)*, *transforming vekst faktor beta (tgfb)*, *ccat/enhancer-bindende protein (ccatb)*, *GATA-binding protein 3 (gata3)*, *serum amyloid A (saa)*, *cathelicidin 2 (cath2)*, *matrise metalloproteinase 13 (mmp13)*, *matrise metalloproteinase 9 (mmp9)*, *immunoglobulin tung konstant mu (ighm)*, *cluster of differentiation 4 (cd4)*, *cluster of differentiation 8 alfa (cd8a)*, og *histokompatibilitetskompleks 2 (major histocompatibility complex 2 (mhc2))* blei analysert.

Resultata viste signifikant oppregulering av gena; *mmp13*, *ccatb*, *cath2* og *mmp9* i sjøvatn i hud ved festepunktet til lusa i forhold til kontroll. Signifikant oppregulering av gen; *il1b*, *mmp13*, *ccatb*, *cath2* og *mmp9* blei også observert ved festepunktet til lusa i forhold til upåverka hudområde hos infisert fisk. I tillegg viste analysen signifikant nedregulering av *cd8a* i upåverka hudområde hos

infisert fisk i forhold til kontrollen. I ferskvatn vert det sett oppregulasjon av gena; *il1b*, *mmp13*, *ccatb*, *cath2*, *tnfa*, *gata3*, *il6*, *mmp9* og *mhc2* i huden ved festepunktet til lusa i forhold til kontrollen. Det blei også sett oppregulasjon av gena; *il1b*, *mmp13*, *ccatb*, *il4/13a*, *cath2*, *tnfa* og *mmp9* i huden ved festepunktet til lusa i forhold til upåverka hudområdet hos infisert fisk. Infeksjonen med lakselus har påverka genuttrykket i huden til sjøaure, der ein ser oppregulasjon av proinflammatoriske gen og metalloproteinaser. Generelt ser ein oppregulasjon av gen knytt til den medfødde immunresponsen. Infeksjonen med lakselus ga ein lokalrespons i huden til sjøaure, der responsen er begrensa til festepunktet til lakselusa. Utrykket av immunologiske gen i sjøvatn og ferskvatn hadde ingen signifikante forskjellar, dette kan indikere at lakselus ikkje har immunmodulerande eigenskapar på sjøaure.

Innholdsliste

1.	Innleiing.....	7
1.1	Sjøaure (<i>Salmo trutta</i>)	9
1.1.1	Livsstrategi til brunaure	9
1.1.2	Smoltifisering	10
1.2	Lakselus (<i>Lepeophtheirus salmonis</i>).....	11
1.3	Immunologi.....	13
1.3.1	Barriere mot infeksjonar- fiskehud	13
1.3.2	Rolla til immunforsvaret.....	14
1.4	Respons på parasittar hos fisk	18
1.5	Immunmodulering forårsaka av lakselus.....	21
1.6	Immunologiske gen knytt til lakselusresistens	22
1.7	Transkripsjonsstudiar.....	23
1.8	Målet for oppgåva	24
2.	Material og metode	25
2.1	Fiskebestand	25
2.2	Behandlinga av fisken	25
2.3	Prøvetaking.....	26
2.4	Hudprøvar.....	27
2.4	RNA isolering og sekvensering.....	28
2.5	Dataanalyse	29
3.	Resultat	30
3.1	Infeksjonsforløp	30
3.2	Vekt, lengde og kondisjonsfaktor	31
3.3	Blodplasma	31
3.4	Organ størrelse	31
3.5	Genekspresjon	32
3.5.1	Pro-inflammatoriske cytokiner.....	33
3.5.2	Antiinflammatoriske cytokin	34
3.5.3	Transkripsjonsfaktorar	35
3.5.4	Akutfaseprotein	36
3.5.5	Matrise metalloproteinaser	37
3.5.6	Immunoglobulin	38
3.5.7	T-celle overflatemolekyl, <i>cd4</i> og <i>cd8</i> -alfa.....	39
3.5.8	MHC2.....	40
3.6	Kjønnsforkjellar i genekspresjon.....	40
4.	Diskusjon.....	42

4.1 Eksperimentell oppsett.....	42
4.2 Infeksjon med lakselus.....	44
4.3 Utrykk av immunologiske gen.....	44
4.6.1 Proinflammatoriske gen.....	45
4.6.2 Anti inflammatoriske cytokiner.....	46
4.6.3 Transkripsjonsfaktorer.....	47
4.6.4 Akutfaseprotein.....	47
4.6.5 Matrise metalloproteinaser.....	48
4.6.6 Immunoglobulin.....	49
4.6.7 T-celle overflate molekyl <i>cd8 alfa</i> og <i>cd4</i>	49
4.6.8. MHC 2.....	49
4.7 Immunrespons.....	50
5. Konklusjon.....	52
Kjelder.....	53
Appendix.....	63

1. Innleiing

Sjøaure er den anadrome delen av bestanden til brunaure (*Salmo trutta*). Denne arten vandrar ut i kystvatn for å finne føde og vokse seg større i dei marine habitat før den vandrar tilbake til ferskvatn for å gyte (Thorstad *et al.*, 2014). Når sjøaure befinne seg i kystvatn blir dei utsett for ulike sjukdomsframkallande mikrobar og parasittar, deriblant parasitten kalla for lakselus (*Lepeophtheirus salmonis*). Lakselus er ein ektoparasitt som finnast på laksefiskfamilien (*Salmonidae*), som i Noreg omfattar sjørøye (*Salvelinus alpinus*), Atlantisk laks (*Salmo salar*) og brunaure (*Salmo trutta*) (Pike and Wadsworth, 1999). Lakselus livsnære seg på hud, muskel og slimet til verten som fører til vevskadar. Høg infestasjon av lakselus kan forårsake osmoregulatoriske vanskar, auka dødelegheit og i verste fall død (Brandal, Egidius and Romslo, 1976; Wells *et al.*, 2006, 2007).

Lakselus finnast naturleg i norske kystområder, men grunna utviklinga innan akvakultur har denne blitt meir utbredt i norske kystområder (Finstad and Bjørn, 2011; Serra-Llinares *et al.*, 2014). Akvakultur gjennom dei siste tiåra har hatt ein merkbar vekst og forsette å vokse og utvikle seg. Berre frå 1980 til 2012 har industrien auka frå 9% til 43 % av den totale fiskeproduksjonen i følge FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations). Havet produserer ca. 17% av det totale forbruket av animalsk protein per innbyggjar i verda (FAO, 2018, Bennett *et al.*, 2018). Marine oppdrett har vert og er eit viktig bidrag for å dekke aukande matførespurnad og samtidig redusere fiskepresset på ville bestandar. Det blir forutsett stadig auke av oppdrett i framtida. I Noreg har lakseoppdrett blitt svært utbredt ettersom Noreg har gode forutsetningar for opne-nett oppdrett, men desse fører til akkumulasjon av lakselus grunna mange vertsfiska på same stad (Costello, 2009; Barrett *et al.*, 2020). Sjøaure i oppdrettsfrie områder viser ein generell låg førekomst av lakselus, førekomsten av lus på sjøaure i oppdrettsintensive områder varierer veldig mellom ulike lokalisasjonar. Men ein generell trend tilseie at førekomsten og skaden av lakselus er nokså større jo nærmare oppdrett ein kjem. Nivå av lakselus er særleg høgna innan 30 km frå eit oppdrett (Serra-Llinares *et al.*, 2014).

Den anadrome bestanden av brunaure er spesielt utsett for infestasjon av lakselus fordi den opphalde seg i kystvatn mesteparten av deira marine liv. I Noreg blei tilstanden til 1279 sjøaure vassdrag klassifisert, der berre 24,7 % av vassdraga blei kvalifisert til å vere i god stand. Studiet fant også ut at den mest negative effekten på tilstanden i vassdraga var lakselus, der den utgjør 47% av alle negative effektar (Forseth and Fiske, 2022).

Kjemiske behandlingar har vert brukt innan akvakultur for å både behandle oppdrettsfisken mot parasittar og redusere smittepresset i kystområder, men lakselus har gradvis blitt resistent mot dei fleste kjemiske behandlingar som finnast i dag (Aaen *et al.*, 2015; Helgesen *et al.*, 2022). Sida kjemiske behandlingar har kraftig redusert effekt, har Noreg innført trafikklyssystemet som lakselus reduserande tiltak (*Kapasitetsjustering / trafikklyssystemet 2021*). Trafikklyssystemet opererer med terskelverdiar der overstiging av desse fører til lovpålagt reduksjon i produksjon. Trafikklyssystemet baserer seg på data henta frå utvandrande ville laksesmolt, der den brukar dødelegheit grunna lakselus som terskelverdi. Under 10% død av ville laksesmolt forårsaka av lakselus reknast som låg, mellom 10%-30% som middels og over 30% som høg (Nilsen *et al.*, 2019). Trafikklyssystemet baserer seg på risikoevalueringa av Taranger *et al.* (2015). Sjøaure blir ikkje inkludert i dette systemet.

I motsetning til laks som vandrar ut i opne havområde, blir sjøaure verande i kystvatn. I kystvatn blir sjøaure utsett for kontinuerleg smitte. Konsekvensane av høg antall lus i kystvatn vil truleg vere meir kritiske for denne arten, og kan føre til prematur tilbakevandring i ferskvatn (Birkeland 1996). Dermed vil det vere vesentleg å ha nok kunnskap om påverknaden av lakselus på ville bestandar. For å tileigne seg denne kunnskapen er det nødvendig å studere verts-parasitt interaksjonar på ulike nivå, desse inkludere fysiologiske responsar, immunologiske responsar og populasjonsstudiar (Finstad *et al.* 2011). Kunnskap om parasitt-verts interaksjonar skapar moglegheit for vidare utvikling av effektive bekjempelse metodar og førebyggjande tiltak. Immunologiske studiar hos vertsfisken kartlegge immunrespons og avdekke eventuell immunologisk undertrykking forårsaka av parasitten. Den Atlantiske laksen har blitt hyppig studert, men det finnast lite litteratur rundt immunresponsen til brunaure. Og så vidt vi veit finnast det ingen studiar som har sett på immunologisk respons hos sjøaure ved prematur tilbakevandring i sjøvatn. I dette prosjektet blir det sett på sjøaure og kva effekt lakselus har på denne fiskearten. Det blir kartlagt både fysiologiske og immunologiske responsar ved ein lusinfestasjon i sjøvatn og simulert prematur tilbakevending.

1.1 Sjøaure (*Salmo trutta*)

Sjøaure tilhøyrer laksefiskfamilien *Salmonidae*, fiskearten er iteropar som vil sei at den kan gyte meir enn ein gong i livet (Went, 1964). Før blei det antatt at det fantes mange ulike arter av brunare grunna individa sin variasjon i både utsjånad og levemåte. Men seinare forskning har vist at individa er frå same art (*Salmo trutta*). Denne variasjonen skyldast i hovudsak ulike nedervde forskjellar og deira store tilpassings emne til endringa i omgivnader. Utsjånaden til aure forandrar seg også med levestedet og generelt gjennom heile livet. Yngel blir til parr og veks opp i ferskvatn, desse har mørk farge og ein kort og klumpete kropp. Parr i innsjø har ofte ein meir langstrakt kropp og lysare preg enn dei funne i elvar. Buken er gjerne kvit, med eit gult skjær langs sidene. Parr gjennomgår smoltifisering før dei vandrar ut i sjøen (Jonsson and Finstad, 1995). Aure har si opphav som ein europeisk art. Naturlege førekomsten av aure strekker seg frå nord i Island, Skandinavia og Russland til sør langs middelhavskysten og langs Nord-Afrika kysten. Den sjøvandrande bestanden førekomme oftast i Vest-Europa (Elliott 1994). I Noreg finnast brunaure i dei fleste kystvassdrag, men også innsjøar (Jonsson and Finstad, 1995).

1.1.1 Livsstrategi til brunaure

Levemåten til sjøaure varierer både mellom individa og populasjonar. Individ i same bestand kan både vere stasjonære (ferskvannstasjonære) og vandrande (anadrome) (Klemetsen *et al.*, 2003). Desse kan gyte saman innan same vassdrag, og avkommet kan både bli stasjonære eller vandrande (Jonsson and Jonsson, 2006). Sjøaure omfattar den anadrome delen av bestanden som foreta vandringar ut i kystområder, desse kan vandre ut i sjøen fleire gonga i løpet av livet (Jonsson and Jonsson, 2006). Vandringa til sjøaurar er primært langs kysten, men nokon individ kan vandre lengre ut i open hav (Klemetsen *et al.*, 2003). Dei sjøvandrede individa returnerer til elva der dei blei født i for å gyte. I elvar og bekkar gyter både dei stasjonære og tilbakevandrande individa (Jonsson and Jonsson 2006). Om eit individ vel å forbli i ferskvatn eller vandre ut i sjøen bestemast av fleire gen og miljøet til fisken (Ferguson, 2006).

Livsstrategien der brunaure velje sjøvandring er ein adaptiv strategi, der aura i dela av livet utnytta ressursar i sjøen for å auke fitness. Fordelen med sjøvandring er auke på mattilgang, der det finnast mykje meir mat i kystvatn enn i elvar og bekkar. Dette fører ofte til hurtigare og større vekst, og dermed større fekunditet (Gross *et al.* 1988, Lucas & Baras, 2001). Studiar har vist at det er oftare

hoer enn hannar som velje å sjøvandre, mest truleg grunna fordelene med auke i kroppsstørrelse som bidrar til auka eggproduksjon (Jonsson and Jonsson, 2011). Hannar har to strategiar for å auke gytesuksessen. Enten kan dei sjøvandre og vokse seg større og dermed dominere gyteplassen eller bli hurtig kjønnsmoden i ferskvatn, som då små kjønnsmodne parr. Desse kan benytte snikstrategi under gytinga og oppnå reproduktivt suksess på denne måten (Jonsson and Jonsson, 2011). Sjøvandring har også kostnader. Ein av desse er auka predasjon, samt som sjøvandring er energikrevjande i form av fysiologiske prosessar knytt til smoltifisering. Forholdet mellom anadrome og stasjonære individ innan same bestand halde seg som oftast stabilt, dette reflekterer at på sikt vil ein strategi gi betre fitness i gitt området. Men dette kan fort forandre seg med miljøet. Om det er dårlege vekstforhold i sjøen eller høg dødelegheit, kan preferansen om å bli stasjonær bli meir dominant innan bestanden (Thorstad *et al.*, 2014).

1.1.2 Smoltifisering

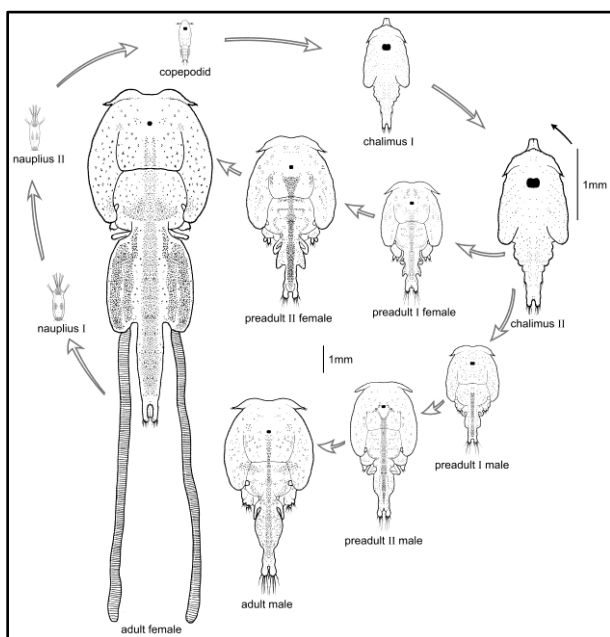
For at aureparren skal kunne vandre ut i sjøen og dermed tilpasse seg auka salinitet, må den gjennomgå ein prosess kalla for smoltifisering. Smoltifisering inneber ein del forandringa hos parren, deriblant store fysiologiske, åtferdsmessige og morfologiske forandringar (Høgåsen, 1998). Smoltifisering er ein preadaptasjon som forgår før sjølve utvandringa, i motsetning til adaptasjon som skjer ved miljøskifte. Forandringa frå parr til smolt inkluderer skifte i farge og fisken for ein meir langstrakt kropp. Ein av dei viktigaste forandringane aura gjennomgår frå parr til smolt er osmoregulatoriske forandringar. Sjølve overgangen frå fersk til sjøvatn krevjer store fysiologiske endringar. I ferskvatn må fisken aktiv ta opp ioner gjennom gjellene, i sjøvatn må fisken kvitte seg med overskudd av ioner. I sjøen må fisken balansere ut det passive vasstapet som skjer over hud og gjeller, dette blir gjort ved at fisken drikke sjøvatn (Heggberget *et al.*, 1992). Dette fører til at fisken må også kvitte seg med overskuddet av ioner, dette blir gjort med spesialiserte kloridceller i gjellene (Payan, Girard and Mayer-Gostan, 1984).

Smoltifisering styrast av lys, temperatur, føde og straumhastigheit (Aarestrup, Nielsen and Koed, 2002; Jonsson and Jonsson, 2009). I Norden startar smoltifisering rundt mai- juni (Svaerdson and Fagerstroem, 1982), lengre lysperiode og auke i temperatur signaliserer tidspunkt for smoltifisering hos parr (Heggberget *et al.*, 1992). Smoltifisering skjer på dette tidspunktet ettersom tilgangen på føde er betre i vår og sommar månadene.

1.2 Lakselus (*Lepeophtheirus salmonis*)

Lakselus (*Lepeophtheirus salmonis*) tilhører familien *Caligidae* og er ein ektoparasitt som livsnære seg på laksefisk. Utbredelse av denne parasitten strekker seg frå Nord-Atlanteren til det nordlege Stillehavet (Pike and Wadsworth, 1999). Lakselus i Atlanterhavet og Stillehavet betraktast som ulike underarter (Skern-Mauritzen, Torrissen and Glover, 2014). Denne parasitten leve i sjøvatn og i Noreg finnast den langs heile kysten (*Fiskehelse Uke 21, 2022 - BarentsWatch*).

Livssyklusen til parasittane består av 8 stadia. **Nauplius (I og II)** er fritt svømmande og planktonisk, første stadiet sleppes ut i vassmassane frå eggstrengene som bæres av hoer fram til klekking. Skalskift markera overgangen til nytt stadiet i livssyklusen til lakselusa. Etter skalskift nummer to går lusa over til kopepode stadiet. **Kopepoditt** er fritt svømmande og er det infestive stadiet. For at lusa skal kunne vidare utvikle seg og overleve må den finne ein vert å feste seg på. Dei festa seg til verten med frontalfilament. Etter eit skalskift til går dei over til chalimus stadiet. **Chalimus (I og II)** sitt fast på verten og livsnære seg på verten si hud ved festepunktet. **Preadult (I og II)** lusa er mobil og kan bevege seg rundt på kroppsoverflata til verten. Dette stadiet er mobilt og lusa kan befinne seg i fritt svømmande i vassmassane i korte periodar, dermed kan dette stadiet også infisere andre fisker (dette er då ikkje vanleg åtferd). Same gjelder det adulte stadiet. **Adult** lus er kjønnsmodne og klare for reproduksjon (Johnson and Albright, 2011; Hamre *et al.*, 2013). Livssyklusen med ulike stadia er illustrert i figur 1.



Figur 1: Illustrasjon av livssyklusen til lakselus (*Lepeophtheirus salmonis*). Dei 8 stadia består av; nauplius (I og II), kopepoditt, chalimus (I og II), preadult (I og II) og adult. Lakselus gjennomgår skalskift mellom kvar stadiet. Illustrasjon henta frå Wikimedia Commons.

Lusa livsnære seg på vertens slim, hud, underliggende vev og blod (Brandal, Egidius and Romslo, 1976; Wells *et al.*, 2006, 2007). Lakselus i parasittiske stadia tåle ikkje låg salinitet og faller av vertsfisken (Pike and Wadsworth, 1999; Bricknell *et al.*, 2006). Lakselus er planktoniske og fritt levande i sjøen dei første livsstadia, før dei feste seg til verten og forbli der resten av livsfasane. Lakselus har raspende munneler som den brukar til inntak av føde, det er preadulte og adulte stadia som gjer mest skade på verten (figur 2), der såra kan bli store og omfattande (Pike and Wadsworth, 1999). Lakselus treng vert for å kunne reprodusere seg, dermed er førekomsten av parasitten knytt til områder med stor tettheit av vertsfiska, som for eksempel opne-nett oppdrett.



Figur 2: Bileta tatt av sjøaure (*Salmo trutta*) i uttak 5 (07.06.21, 30 daga etter infeksjon). Bilete viser hudskadar (lyse pigmentfrie områder på fisken) der lakselus (*Lepeophtheirus salmonis*) har livnæra seg på fisken. Hud skadane er påført av lakselus i det preadulte stadiet.

Vaksne lus er lysebrune til mørkebrun i farge, men nokon kan også vere transparente. Lakselus er svært tilpassingsdyktige og bruk av reinsefisk til avlusning kan ha ført til seleksjon mot gjennomsløktigheit (Hamre *et al.*, 2021). Hoer blir 10-18 mm og hannar 5-7 mm (Pike and Wadsworth, 1999). Hoer har indre befruktning av eggane, så blir egga deponert i eggstrenger, kvar streng kan innehalde opp til 500 egg. Kvar ho kan legge egg heile livet, dermed kan ei ho produsere store mengder nye lus gjennom deira levetid. Maksimale levetid til lusa er ukjent hos villfisk (Pike and Wadsworth 1999). Det er lågare førekomst av lakselus på seinvinteren, dette kan skyldast låg reproduksjon og overleving om vinteren. Lus brukar kortare tid på å nå adult stadiet om våren og sommaren når vassstemperaturen stiger. Lakselus kan utvikle seg til det infestive stadiet sjølv om vassstemperaturen er låg, heilt ned til 4°C (Boxaspen and Næss, 2000; Hamre *et al.*, 2019). Skadane lakselus kan forårsake er osmoregulatorisk ubalanse, fysiologisk stress og fisken er meir utsett for sekundære infeksjonar (Bjørn and Finstad, 1997; Wells *et al.*, 2006). Dødelegheita hos auresmolt

under 150 g som vandrar ut i sjøen for første gang er 100% ved infestasjon intensitet på 0,3 lus per gram fisk. Dødelegheit på 50% med infestasjon intensitet på 0,2-0,3 lus per gram fisk, 20% dødelegheit med infestasjon intensitet på 0,1-0,2 lus per gram fisk og 0% dødelegheit med infestasjon intensitet på mindre enn 0,1 lus per gram fisk (Taranger *et al.*, 2012).

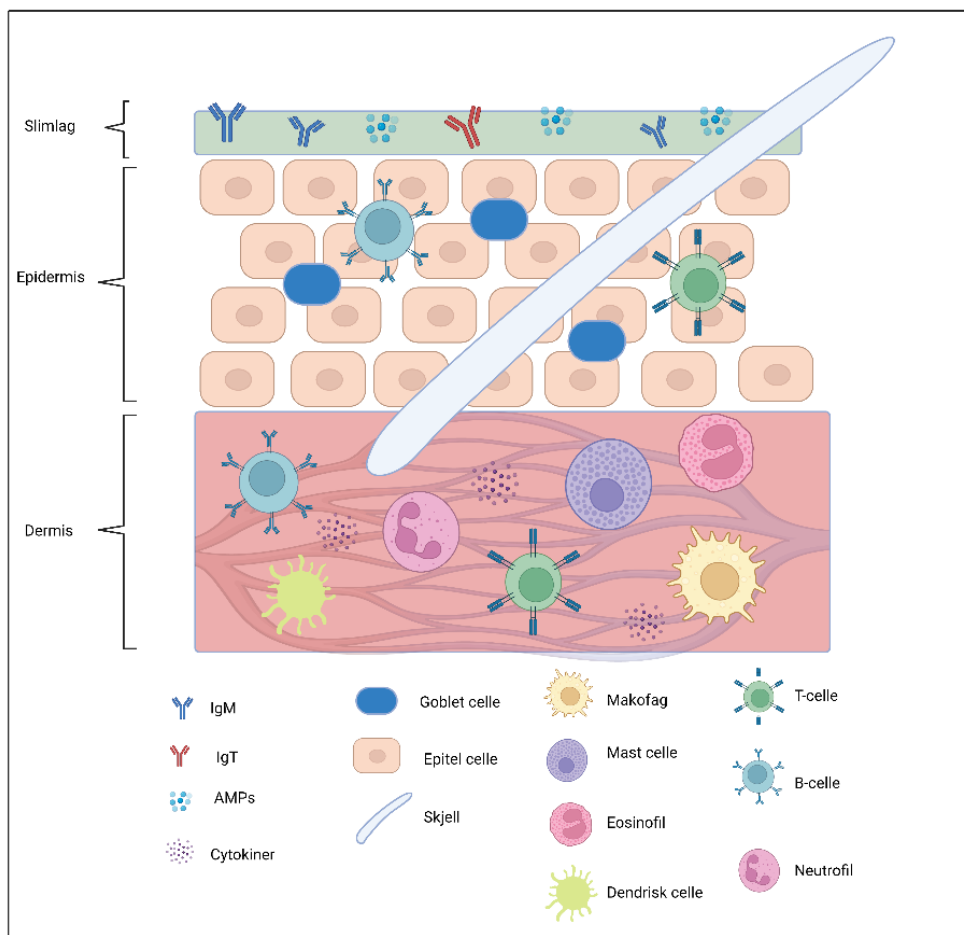
1.3 Immunologi

Immunologi er læra om komponentar og funksjonen til immunsystemet som beskytte organismen mot fremmande stoff og agens. Immunsystemet består av spesialiserte celler og løyselege protein som skal hemme bakterie, virus, sopp og parasittar. Fisk er vertebratar og immunsystemet deira liknar på immunsystemet hos andre vertebratar, men det er nokre forskjellar i histopatologi og lokasjonen av immunkomponentar (Hitzfeld, 2005).

1.3.1 Barriere mot infeksjonar- fiskehud

Rolla til fiskehud er å beskytte verten frå patogen og spelar ei viktig rolle i andre prosessar som bevaring av væskebalansen. Teleost hud skil seg betydeleg frå pattedyr hud, spesielt grunna emna til å produsere slim (mucus). Huda hos fisk består av epidermis og dermis. Epidermis er øvste laget som er i kontakt med omgivnader som består av fleirlaga plateepitel, alle cellalaga er levande. I tillegg til desse finn vi også pigmentceller og slimceller i epidermis. Dermis består av fast bindevev, der sjølve skjella er festa, det faste bindevevet består av tette buntar med collagen fibrar organisert i mange lag. Sår i fisken si hud har store konsekvensar for organismen, huda er ein viktig barriere for osmoregulasjon og beskyttelse mot ulike agens i havet (Kryvi and Poppe, 2016).

Hud og slimlag som dekkja overflata til fisken er førstelinje forsvar mot patogen. Slimproduserande celler finnast i epidermis. Slimet består i hovudsak av vatn og glykoproteiner. Slimlaget spelar ein rolle i osmoregulasjon, respirasjon, bevegelse, utskiljing av molekyl og i forsvaret mot patogen (Khong *et al.*, 2009, Shephard, 1994). I slimlaget finnast immunoglobuliner, immunoglobulin reseptorar, antimikrobielle peptid, lysozymer, komplementsystem komponentar, lektiner, proteaser, lipaser og jern bindande transferrin (Shephard, 1994). I tillegg finnast det andre immunologiske celler og substansar i huda som; makrofager, mastceller, b-celler, cytokinet, neutrofiler og dendriske celler (Figur 3).



Figur 3: Illustrasjon av huden hos teleoster inkludert slimlag, epidermis, dermis samt celletyper og molekyl som inngår i immunforsvaret. Celletyper og molekyl i denne illustrasjonen inkluderer: Immunoglobulin m (IgM), immunoglobulin t (IgT), antimikrobielle peptid (AMPs), cytokiner, goblet celler, epitel celler, makrofager, mast celler, eosinofiler, dendriske celler, t-lymfocytter (T-celle), b-lymfocytter (B-celle) og neutrofiler. Illustrasjon inspirert av Gomez, Oriol Sunyer og Salinas (2013).

1.3.2 Rolla til immunforsvaret

Alle kjevemunna fisk delar ein immunstruktur som består av medfødt immunsystem, komplementsystem og komponentar som bindar det medfødde og adaptive immunsystemet. Fisk og andre vertebratar har fysiske barrierar (f.eks. fiskehud) som beskyttar mot inntrenging av patogen i organismen. Når desse barrierane blir brote vil dette føre til ein immunologisk respons av det ikkje spesifikke, medfødde immunsystemet (Litman, Cannon and Dishaw, 2005). Vist patogenane likevel klarer å unngå det medfødde systemet vil det adaptive immunsystemet bli aktivert. Adaptiv immunrespons blir aktivert av det medfødde systemet og andre signaler, denne responsen er meir spesifikk i form av gjenkjenning av patogen og dermed responsen på spesifikke patogen (Mayer, 2010). Dermed er ofte det adaptive immunsystemet meir presis og vellykka i hemminga av patogen (Rauta, Nayak and Das, 2012).

Medfødde Immunsystemet:

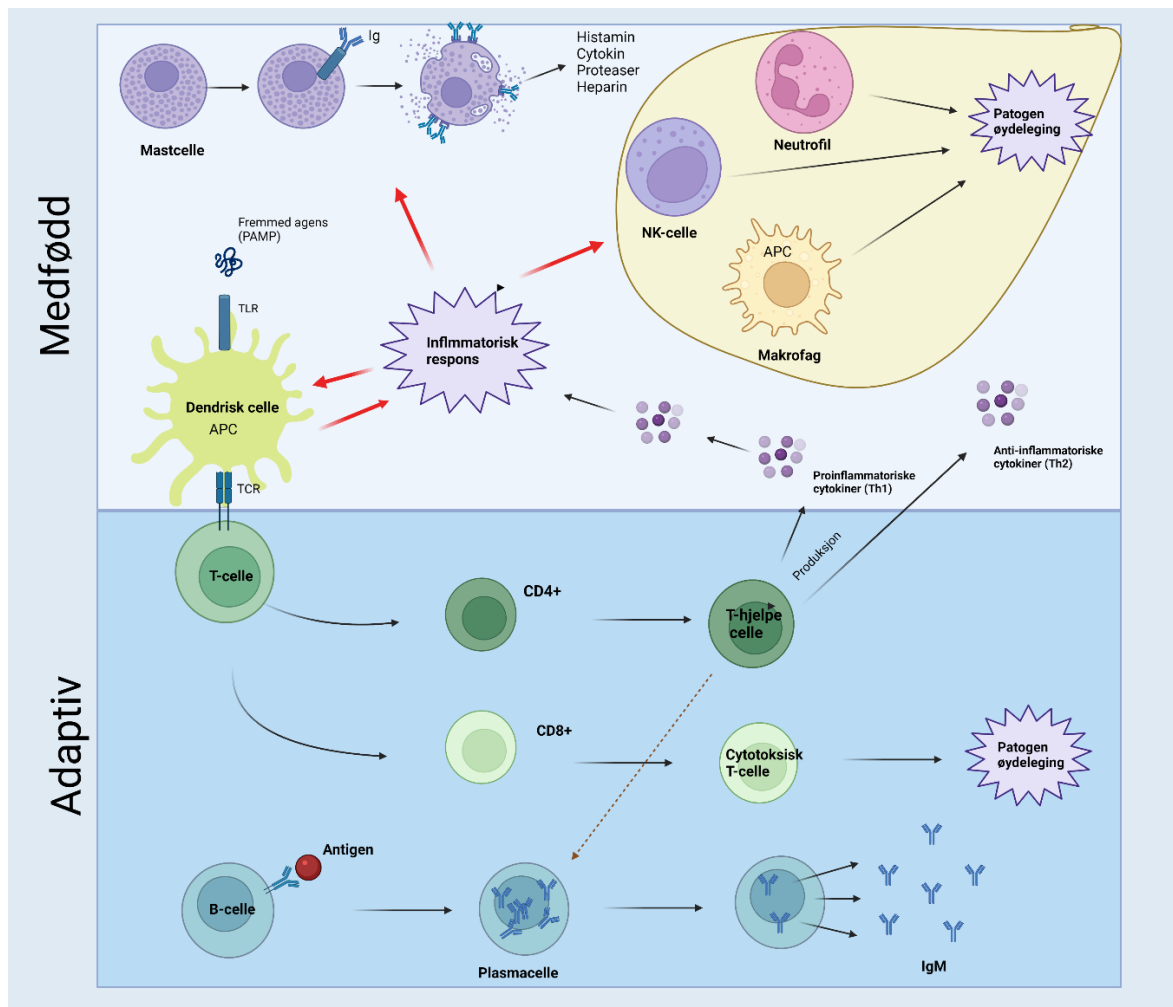
Det medfødde immunforsvaret er først til å bli aktivert ved inntrenging av patogen. Responsen frå dette systemet er generell, som vil sei at den respondera systematisk på patogen. Dette systemet kan kjenne igjen ulike patogen gjennom evolusjonær hukommelse frå tidlegare generasjonar (Kurtz, 2005). Det medfødde immunsystemet gjev beskyttelse i form av hud og slimlag, samt immunceller og protein. Dei medfødde humorale faktorar består av komplement systemet, lysozymer, cytokiner, akutfaseprotein, agglutiner, lysiner og transferrin (Uribe *et al.*, 2011). Medfødde responsar hos fisk er svært viktig ettersom desse er temperatur uavhengige, og kan aktiverast ved lågare temperaturar enn adaptive responsar (Magnadottir, 2005). Immunresponsen hos teleoster er delt i to fasar, i første fase er det ei tilstrøyming av neutrofiler og i andre fase kjem monocytter og makrofager til infeksjonsstaden (Reite and Evensen, 2005). Neutrofiler, monocytter og makrofager er fagocytter og øydelegge patogen (Neumann *et al.*, 2001). Neutrofiler og makrofager ser ut som har same eigenskapar hos teleoster som dei har hos pattedyr, der dei raskt kjem til inflammasjonsområdet (Rieger *et al.*, 2012), produsera cytokin (Verburg-van Kemenade *et al.*, 1995) og tar til seg bakteriar (Nikoskelainen *et al.*, 2005). Neutrofiler blir til i hovudnyren, makrofager kjem frå monocytter som er tilstades i blod. Monocytter er produsert i hovudnyren og milten (Reite and Evensen, 2005). B-celler har også vist fagocytterande eigenskapar (Bjørngen and Koppang, 2021). B-celler har vist fagocytterande formatering og intracellulær dreping av inntatte mikrobar (Li *et al.*, 2006; Øverland *et al.*, 2009). På grunn av dette blir det foreslått at b-celler hos teleoster kopla saman det adaptive og medfødde immunsystemet (Reite and Evensen, 2005).

Cellene i det medfødde immunsystemet inkludera fagocytter som makrofager, monocytter, fagocytiske b-celler, dendriske celler og neutrofiler. Der både makrofager, fagocytiske b-celler og dendriske celler har emne til å presentere antigen. Andre celler involvert i patogen bekjempelse er NK-celler (natural killer cells), mastceller, basofile granulocytter og eosinofile granulocytter. Løyselege forbindelsar assosiert med medfødde immunsystemet inkludere; antimikrobielle peptid, antimikrobielle forbindelsar i vev og vev-væsker, protease inhibitorar, lysiner, agglutininar og precipitiner, vekst-hemmande stoff, lektiner, cytokiner og komplement molekyl. Disse hemmar vekst av mikroorganismar ved å drepe (lysering), opsoniser (dekke og merke) og agglutinere (samle) mikroorganismar i tillegg signalisere dei til andre celler (Magnadottir, 2005). Proinflammatoriske cytokiner setter i gang migrasjon av fagocytterande celler til infeksjonstaden og dermed fremmar inflammasjon. I motsetning til dei proinflammatoriske cytokin har dei antiinflammatoriske cytokin

emne til å hemme og regulere inflammatorisk aktivitet, og dermed motverke proinflammatorisk respons (Secombes *et al.*, 2001). Figur 4 illustrerer nokre celler og forbindelsar inkludert i det medfødde immunforsvaret og korleis desse samanhandla med adaptive immunsystemet. Cellene i det medfødde immunsystemet detektere patogen ved å kjenne igjen patogen assosierte molekylære mønster (pathogen-associated molecular patterns, PAMP) på mikroorganismar ved hjelp av ulike reseptorar kalla for mønster gjenkjenning reseptorar (pattern recognition receptors, PRR). Hos fisk finne vi nokon hovudgrupper av PRR som TOLL liknande reseptorar, NOD-liknande reseptorar, C-type lektin reseptorar og peptidglycan gjenkjenning reseptorar (Uribe *et al.*, 2011).

Det adaptive immunforsvaret:

Det adaptive immunsystemet er aktivert av det medfødde immunsystemet og har eit minne som utviklar seg gjennom livstida til organismen. Denne er svært spesifisert og spelar ein viktig rolle i beskyttelse og bekjempelse av patogen. Dette systemet beskyttar mot tilbakevendande infeksjonar ved produksjon av hukommelse celler. Adaptive immunforsvaret består også av spesifikke løysningar og membran-bundne reseptorar (Ellis, 2001). Adaptive immunresponsar er svært komplekse, spesifikke, mangfaldige og har aktiv hukommelse (Rauta, Nayak and Das, 2012). Det adaptive immunsystemet gjev beskyttelse i form av t-lymfocytter og b-lymfocytter som finnast i vev, samt antistoff i blod og kroppsvæsker (Uribe *et al.*, 2011). Det spesifikke immunsystemet kjenne igjen epitoper (området på antigen) frå patogen, og gjenkjenning av same epitopen gjev ein rask respons frå adaptive immunsystemet. Cellene i det adaptive immunsystemet inkludera lymfocytter funne i blod og lymfoide vev (figur 4). B-lymfocytter eller b-celler produsera immunoglobulin. T-lymfocytter eller t-celler består av to typar celler, CD4 t-hjelp celler og CD8 cytotoksiske T-lymfocytter (Abbas, Litchman and Pillai, 2020).



Figur 4: Illustrasjon av molekyl og celler involvert i den adaptive og medfødde immunresponsen. Illustrasjonen viser korleis b-celler blir aktivert ved binding av antigen til b-celle reseptor, b-celler blir til plasmaceller og slepper ut frie immunoglobuliner (IgM). T-celle blir aktivert av dendrisk celle (TCR= T-celle reseptor). T-celler som uttrykker cd4+ blir kalla for t-hjelpe celler som står for ein stor del av cytokin produksjonen. T-celler som uttrykker cd8+ blir kalla for cytotoxiske t-celler og kan øydelegge ulike patogen. Dendrisk celle blir aktivert av fremmed agens (PAMP) ved binding til toll linkande reseptor (TLR). Proinflammatoriske cytokiner signaliserer for inflammasjon dette aktivere og tiltrekke fagocyterande celler som; neutrofiler, makrofager og NK-celler. Dendriske celler og makrofager er antigen presenterande celler (APC). Antiinflammatoriske cytokiner kontrollerer uttrykket av proinflammatoriske cytokiner. Illustrasjon inspirert av Kum og Sekki (2011).

Komplement systemet

Komplement systemet består av ca. 35 typar protein og hos teleoster er det antatt at desse har same rolle som hos pattedyr (Holland and Lambris, 2002). Aktivert komplementsystem spelar inn og medverke i øydelegging av mikrobar, inflammatoriske responsar og antistoff produksjon. Hos fisk har det blitt vist at komplementsystemet kan øydelegge fremmande celler og opsonisere ukjente agens for fagocyterande celler. Komplement systemet er inaktiv under normale forhold, men kan bli

aktivert direkte av mikroben eller ved antistoff-antigen kompleks. Aktivisering grunna antistoff-antigen komplekset gjer til at komplementsystemet er også viktig i effektivisering av adaptive immunforsvaret. Komplement systemet forbedrar evne til antistoff og fagocytterande celler (Fearon and Locksley, 1996; Carroll and Prodeus, 1998; Lambris and Sahu, 2001). Komplement systemet er ein viktig faktor som bindar medfødde og adaptive responsar. (Carroll and Prodeus, 1998; Holland and Lambris, 2002).

1.4 Respons på parasittar hos fisk

Omfanget av negative effektar grunna lakselus varierer både ut i frå mengde og stadiet på lusene. Hos laks blir det observert redusert vekst og osmoregulatoriske vanskar når lakselus er i det adulte og preadulte stadiet (Bjørn & Finstad 1998). Preadulte og adulte lus kan fritt bevege seg på overflata til verten og kan føre til hudskadar over store områder (Bron *et al.*, 1991). Hudskadane kan sjåast som pigmentfrie grå områder. Dei mest alvorlege såra har grå kant med raud senter der det manglar hud og muskelvev er synleg. Lusa i dei mobile stadia befinne seg på dorsale sida av hovudet, dorsale område frå hovudet til halefinnen og ventralt med analfinnen (Jonsdottir *et al.*, 1992).

Når dei fysiske barrierane blir broten, startar førte steget i immunresponsen. Epitelceller i slimlaget signalisera skade i huda ved å produsere skade assosierte molekylære mønstre (damage associated molecular patterns, DAMPs). Desse ilag med patogen igjen kjennande reseptorar (pathogen recognition receptors, PRRs) og Toll liknande reseptorar (Toll like receptors (TLRs)) aktivera ein inflammatorisk respons (Rubartelli and Lotze, 2007). Epitel celler kan skilje ut cytokiner, som aktivera immunceller og sette i gang migrasjon av desse til det skadde området. Produksjon av cytokiner som interleukin 1 beta (Il1b) og tumor nekrose faktor alfa (Tnfa) kan aktivere akutfaseprotein som serum amyloid A (Saa), men også C-reaktivt protein, fibrinogen, lactoferrin og haptoglobin. Akutfaseprotein tiltrekke seg immunceller, opsonisere for fagocytter, binde jern og aktivere komplementsystemet (Sander *et al.*, 2010). Monocyttar strøymar til skadde området der dei tilfører makrofager (Yang *et al.*, 2014). Makrofager har ulike reseptorar som vidare påverkar immunresponsen, deriblant kommunisere med b- og t- celler. I tillegg skilje dei ut cytokiner og presentere antigen til t-hjelpe celler (Abbas, Litchman and Pillai, 2020). T-celler uttrykker *cluster of differentiation 8 (cd8)*, mens t-hjelpe celler uttrykker *cluster of differentiation 4 (cd4)*. T hjelpe-celler er viktige produsentar av cytokiner som regulerer immunceller som b-celler og t-celler. Cd8+ T-celler kan drepe celler ved utskiljing av perforiner og granzymar, dei kjenne igjen peptid frå patogen som er presentert av histokompatibilitetskompleks 1 (major histocompatibility complex 1 (Mhc1)) (Abbas, Litchman and

Pillai, 2020). T-hjelpe celler (th) er videre kategorisert i th1 og th2. Der th1 produserer cytokiner interferon- γ , tumor nekrose faktor alfa og interleukin 12. Th2 produserer interleukin 4, interleukin 5 og interleukin 13, i tillegg aktivere dei eosinofiler og simulerer b-celler til å skilje ut immunoglobulin e. (Abbas, Litchman and Pillai, 2020). GATA-binding protein 3 (gata3) er transkripsjonsfaktor som stimulerer uttrykk av t-hjelpe celler type 2 (th2) (Ho, Tai and Pai, 2009).

Cytokiner er ein del av det medfødde immunforsvaret. Cytokiner fungere som signalmolekyl og har ei rolle i immunologisk respons ved å aktivere den, samt å regulere den. Interleukiner er ein undergruppe av cytokiner og medverke i intercellulære reguleringa av immunsystemet. Desse fungere som signalmolekyl mellom ulike leukocytter, men kan også ha andre funksjoner. Interleukiner produserast av ulike celletypar men mange syntetiserast av CD4⁺ t-hjelpeceller, makrofager/monocytter og endotelceller. Hos pattedyr vil inflammasjon føre til ein kaskade av cytokiner, der tumor nekrose faktor alfa er frigitt, interleukin 1 beta følger etter, samt interleukin 6 (kjemokin). Ei strøyming av desse cytokiner fungere som ein potent kjemoattraktant for å sette i gang migrasjon av neutrofiler og makrofager til infeksjonstaden (Secombes *et al.*, 2001).

Akutfaseprotein bidrar i den systematiske responsen til inflammasjon. Cytokiner begrensa spreinga til infeksjose agent, inaktivere proteaser, bidrar til nedkjemping av mikrobar og reparasjon av vevskadar (Bayne and Gerwick, 2001). Auke av desse proteina er observert under infeksjon og vevsskader, der dei spelar inn i aktivering av komplement systemet, forbetrar fagocytose og i fjerning av apoptotiske celler (Rauta, Nayak and Das, 2012).

Matrise metalloproteinaser. Fysiologiske prosessane knytt til reparasjon av vev er avhengig av remodellering av den ekstracellulære matriksen (ECM). ECM gjer mekanisk støtte og gjer signal til innsida av cellene som bidrar til ulike cellulære responsar. ECM er under stadig forandring som eit resultat av cellulær stimuli. Matrise metalloproteinaser har ein viktig funksjon i degradering av ECM. Der matrise metalloproteinase 13 (Mmp13) er collogenase (collagenase er enzym som kan bryte peptidbindingar i collagen) og matrise metalloproteinase 9 (Mmp9) er gelatinase (gelatinase er enzym som kan bryte ned gelatin) (Pedersen *et al.*, 2015). Mmp9 og Mmp13 kan også vere involvert i ei rekke prosessar som spalting og aktivering av cytokiner, frigjering av cytokin og vekstfaktorar frå ECM, og etablering av ein gradient for migrasjon av celler (Egeblad and Werb, 2002).

Transkripsjonsfaktorar regulerer transkripsjonen av gen ved binding til bestemte promotor og enhanser området på genomet. CCAAT/enhanser-binding protein (CEBP) er ein familie av transkripsjonsfaktorar som er med i positiv og negativ kontroll av celle proliferasjon og immun respons (Nerlov, 2007). *Ccaat beta (ccaatb)* genet hos vertebratar er spesielt relevant i regulering av immune og inflammatoriske responsar. Ccaat beta er binda til interleukin 6 respons, samt har områder som regulerer transkripsjonen av fleire akutfaseprotein og andre cytokiner (Poli, 1998). GATA binding protein 3 er ein transkripsjonsfaktor som regulerer th2 responsar, denne bidrar til produksjon av cytokiner (Ansel *et al.*, 2006a). Den er spesielt gunstig i regulering av interleukinet 4/13A (il4/13a) som fremmar immunoglobulin m sekresjon av b-celler (Xiang, 2012), noko som igjen er ein essensiell del av det adaptive immunsystemet.

Immunoglobuliner ofte kjent som antistoff, blir produsert av b-celler som er ein type kvite blodceller/lymfocytar, b-celler blir i hovudsak produsert i hovudnyren hos teleoster. Ein skil mellom membranbundne og løyselege antistoff, membranbundne immunoglobuliner blir kalla for b-celle reseptor. Når b-cellerreseptor kjem i kontakt med antigen blir b-celle aktivert og omdanna til plasmacelle som produserer frie immunoglobuliner (Sheikh *et al.*, 2022). Hos dei fleste teleoster er det tre hovudklasser immunoglobulin igm, igt og igd. Igm er den mest dominante varianten, denne finnast i blod og kroppsvæsker. Immunoglobulin sin rolle er patogen opsonisering, nøytralisering og aktivering av komplementsystemet (Mashoof and Criscitiello, 2016).

T-lymfocytar eller t-celler blir produsert i hovudsak i thymus og er ein viktig produsent av cytokiner. T-celler har membranbundne reseptorar som bindar seg til antigen. T-lymfocytar kan delast i to kategoriar ut ifrå celleoverflate molekyla cluster of differentiation 4 (Cd4) og cluster of differentiation 8 alfa (Cd8a). Desse molekyla fungere som co-reseptor for t-celle reseptor. T-celler som uttrykker Cd8a er også kalla for cytotoksiske t-celler, og kan øydelegge andre celler. T-celler som uttrykke cd4 are kjent som hjelpe t-celler, desse står for ein stor del av cytokin produksjonen. Videre kan dette subsetet blir kategorisert ut i frå kva type cytokin dei produserer. Th1- type cytokiner har som oftast rolle i å signalisere for proinflammatoriske responsar. Th2-type cytokiner signalisera ofte for dei motsette antiinflammatoriske responsar og motverke th1-responsen. Denne interaksjonen er viktig for å oppretthalde balansen i systemet under ulike tilstanda i organismen (Berger, 2000).

Mhc1 og mhc2 . For aktivering av adaptive komponentar av immunforsvaret må spesifikke antigen bli presentert til ulike immunceller. Molekyl som er ansvarleg for denne presentasjonen av antigen er histokompatibilitetskompleks 1 molekyl (Mhc1) og histokompatibilitetskompleks klasse 2 molekyl (Mhc2). Desse molekyla er funne på overflata av antigen- presenterande celler (APC). APC inkluderer celler som dendriske celler, makrofager og b-celler. Mhc1 og mhc2 bringer spesifikke peptid til celleoverflata for at desse skal bli gjenkjent av t-celler. Mhc 1 presenterer peptid frå intracellulære kjelde og Mhc2 presenterer peptid frå ekstracellulære kjelde (Neefjes *et al.*, 2011).

1.5 Immunmodulering forårsaka av lakselus

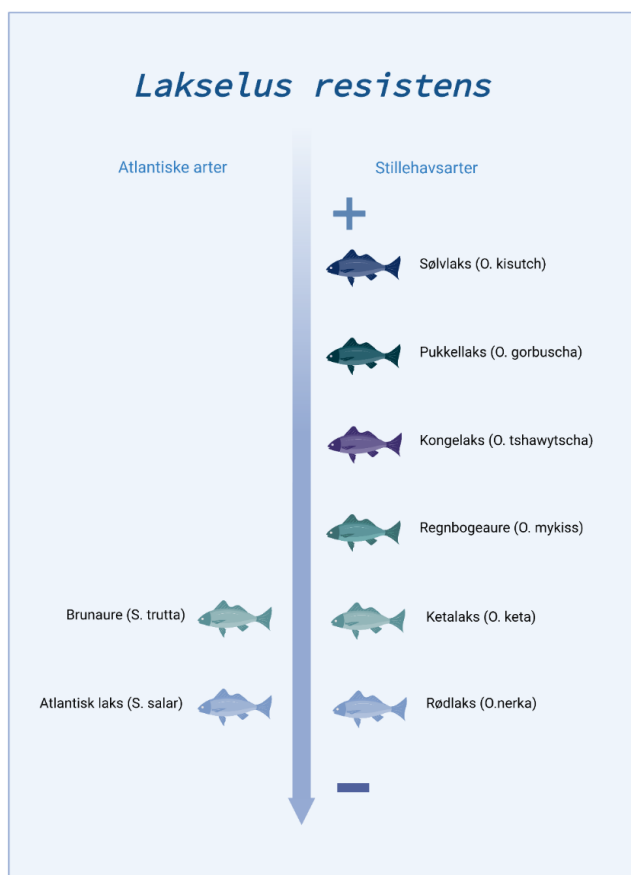
Det har blitt vist at parasittar kan utøve immunmodulering hos verten, dette har blitt sett hos pattedyr med andre ektoparasittar. Dei skil ut substans som ligere, degradere og ha interaksjon med verten sine celler og signalvegar (Hewitson, Grainger and Maizels, 2009). Gjennom evolusjonen har parasitt-vert interaksjonar parallellutvikla seg, der konkurransen mellom verten sitt immunforsvar og parasitten sitt evne til å unngå verten sitt immunforsvar er i stadig utvikling. Hos lakselus har det blitt foreslått at proteaser, cathepsin L og prostaglandin endoperoksidsyntase 2 spelar inn ein rolle i undertrykking av immunforsvaret hos laks (Fast *et al.*, 2004). Men seinare studiar har vist at prostaglandin endoperoksidsyntase 2 mest truleg ikkje spela ein rolle i undertrykkinga av immunforsvaret (Eichner *et al.*, 2015; Dalvin *et al.*, 2021).

Infestasjon med lakselus indusere lokale og systematiske responsar i huda hos verten. Hos laks infisert med betydeleg mengde lus blir det observert hudskadar og redusert vekst. Hudskadane påført av lus kan føre til blødingar og tap av serumprotein (Grimnes and Jakobsen, 1996; Fjellidal *et al.*, 2019, 2020, 2022). Immunreaksjon hos laks og sjøaure er ikkje tilstrekkeleg for å kvitte seg med lusa. Hos andre resistente arter ser ein kraftig inflammatorisk aktivitet og hyperplastisk aktivitet i epidermis og dermis, desse arter klare å bli kvit lus i chalimus stadiet. Desse responsar ser ut som ikkje er kraftige nok eller manglar hos atlantisk laks (Braden *et al.*, 2015). Same responsmønster er forventa hos sjøaure.

1.6 Immunologiske gen knytt til lakselusresistens

Meir resistente arter som for eksempel sølvlaks (*Oncorhynchus kisutch*) klare å støyte vekk lakselusa mens den er i chalimus stadiet. Laksearter som er mindre resistente klare ikkje å initiere sterk nok inflammatorisk respons, og viser begrensa spesifikk respons på parasitten. Evna til å støyte ifrå seg parasittar er knytt til hyperplastiske (forstørrelse av vev ved auke av organisk vev frå celle proliferasjon) og inflammatoriske responsar i epidermis og dermis. Hos den resistente sølvlaksen er det typisk å sjå ein kraftig tilstrøyming av neutrofiler til festepunktet til lusa i chalimus stadiet (Braden, Monaghan and Fast, 2020). Andre arter som viser god resistens mot lus dele emna til å initiere ein rask og kraftig inflammatorisk og akutfase respons i huda, regulatoriske th2 type respons, samt tilstrøyming av antigen og vev reparerande celler (Braden, Koop and Jones, 2015). Tidleg og kraftig uttrykk av proinflammatoriske interleukiner som interleukin 8 og tumor nekrose faktor alfa blir observert i resistente artar. Resistente artar som sølvlaks og pukkellaks (*Oncorhynchus gorboscha*) er meir resistente i forhold til Atlantisk laks (*Salmo salar*), kongelaks (*Oncorhynchus tshawytscha*) eller ketalaks (*Oncorhynchus keta*) (Jones, 2001; Jones *et al.*, 2007; Sutherland *et al.*, 2011, 2014; Braden *et al.*, 2012). Resistensen mellom ulike artar er illustrert i Figur 5.

Andre immunologiske responsar knytt til immunitet er th2 type cytokin som forsterkar sekresjon av igm, transkripsjon av matrise metalloproteinaser, auka produksjon av t-celler som blir markert av høgare ekspresjon av cd4. Komposisjonen av slimlaget har også ein effekt på parasitt-vert interaksjonar (Braden, Koop and Jones, 2015). Tidlegare studiar har lokalisert immunologiske molekyl i slimlaget, desse varierer mellom fiskeartar (Brinchmann, 2016). Desse molekyla kan føre til immobilisering av parasitten, hemme patogene celler frå å binde seg til overflata, aktivere vertens immunforsvar og sette i gang fagocytose. Komposisjonen til slimlaget varierer frå art til art og det er ikkje gitt at tjukt slimlag gjev betre beskyttelse, men ein studie gjort på regnbogeaure (*Oncorhynchus mykiss*) viste at fisk med færre slimceller hadde større antall parasittar enn fisk med fleire slimceller (Buchmann and Bresciani, 1997). Laks er ein art som ikkje klara å kvitte seg med lakselus. Hos laks trigger lakselusa ein lokal respons i huda, der immunologisk respons er begrensa til festepunktet til lusa (Braden *et al.*, 2012). Ettersom sjøaure er ganske mottakeleg art for lakselus er det forventta same lokal reaksjon som hos laks.



Figur 5: Illustrasjon over grad av lakselus resistens hos ulike laksearter (atlantiske: brunaure (*Salmo trutta*) og Atlantisk laks (*Salmo salar*) og stillehavsarter; sølvlaks (*Oncorhynchus kisutch*), pukkellaks (*Oncorhynchus gorboscha*), kongelaks (*Oncorhynchus tshawytscha*), ketalaks (*Oncorhynchus keta*) og rødlaks (*Oncorhynchus nerka*). Skalaen går fra mottakelege artar (-) til resistente artar (+). Illustrasjon inspirert av Braden, Monaghan og Fast (2020).

1.7 Transkripsjonsstudiar

For å kunne kartlegge immunologisk respons på lakselus blir det brukt ei rekke metodar deriblant RNA-sekvensering. RNA-sekvensering er ein metode der ein får ein oversikt over transkripsjonen i gitte prøvar. Transkripsjonen gjev kunnskap om kva gen blir uttrykka og kva protein gen gjev opphav til, under gitte kondisjoner i cellene i organismen ein tar prøve av. Dette gjer ein innblikk i kva gen som bli uttrykka (gjennom transkripsjon) i prøva. Ved å samanlikne transkripsjonen i to like prøver ved ulik behandling (som for eksempel infisert prøve vs. kontroll prøve) kan ein sjå kva gen blir oppregulert, nedregulert eller uforandra. RNA-sekvensering skil seg frå qPCR metoden ved at den inkluderer alle sekvensar og gir oversikt over heile transkriptomet, mens qPCR berre tar for seg noen enkelt gen med kjente sekvensar. Mogleheite for å finne nye variantar av sekvensar er mogleg med RNA-sekvensering. Metoden qPCR er begrensa til antall gen ein vel, og skalaen på ekspresjonen blir ikkje fullstendig i forhold til alle gen som blir uttrykt. RNA-sekvensering er også meir effektiv når du skal analysere større antall gen (NGS vs. qPCR).

1.8 Mål for oppgåva

Lakselus forårsakar infeksjon hos verten, den fester seg på huda til fisken der den livsnære seg på slim, hud og blod, som igjen fører til skade på huda til fisken. Dette kan føre til stress, sekundære infeksjonar og osmoregulatorisk ubalanse. Dette skaper problem for den ville bestanden av sjøaure i frie vassmassar rundt om i kysten. Lakselus er svært motstandsdyktig og har blitt resistent mot dei fleste kjemikaliebehandingar tilgjengeleg i dag. For å bli kvitt parasitten må andre tiltak bli tatt i bruk som f.eks. vaksinerings, funksjonelle fôr og genetisk kunstigseleksjon for lakselusresistens hos verten. Ein viktig del av forskinga er å forstå vert-parasitt interaksjonen og kva påverknad det har for immunsystemet for å kunne redusere/nedkjempe lakselus problemet som både industrien og ville bestanden står ovanfor i dag. Studiar viser også at immunrespons hos andre meir resistente laksefiskar er mykje sterkare tidleg i infeksjonsforløpet, svakare immunologisk respons ved dei mobile stadia til lusa kan indikere immunmodulering induisert av utskilte stoff frå lakselus. Det er blitt gjort mange studiar på vert-parasitt interaksjonar hos laks, men det er svært få studiar utført på sjøaure.

Målet med oppgåva er å få betre forståing av korleis immunsystemet i huda til sjøaure resonderar på lakselus infeksjon ved å kartlegge responsen hjå det adaptive og medfødde immunsystemet. Dette blir gjort med transkripsjonsanalyse av eit utval av immunologiske gen etter simulert naturlig lakselus infeksjon.

Hypotesar:

1. Effekten av lakselus infeksjon vil påverke genuttrykket til immunsystemet, inflammatorisk aktivitet og vevet sitt reperasjonssystem i huda hos sjøaure.
2. Infeksjonen av lakselus hos sjøauresmolt i sjøvatn vil gje ein lokal immunrespons i huda ved festepunktet til lakselusa, i forhold til uinfisert hud på både smitta og ikkje smitta individ.
3. Utrykket til immunologiske gen til sjøauresmolt i ferskvatn vil vere likt genuttrykket til sjøauresmolt i sjøvatn.

2. Material og metode

Forsøket blei utført på Havforskningsinstituttet (HI) sin forskningsstasjon på Matre.

2.1 Fiskebestand

Sjøaure som blei brukt i eksperimentet var avkommet frå ein vill bestand som stammar frå Matreelva, og som blei fanga nær elvemunninga til same elva. Fisken blei fanga og frakta til karer på Matre forskningsstasjon der egg frå hoar og sperm frå hannar blei blanda saman, dei fertiliserte eggja blei deretter inkubert og klekt i karer på forskningsstasjonen. Den klekte fisken blei haldt i 12 °C og i kontinuerleg lys. Temperaturen blei skifta til den naturlege temperaturen i elva den 20. juni 2020 og kontinuerleg lys blei erstatta med simulert naturlig fotoperiode i dette området 1. oktober 2020.

2.2 Behandlinga av fisken

26. april 2021 blei same sjøauresmolten tilfeldig fordelt på 8 firkanta kvite glasfiberbelagt kar (1x1x0,43m). Antallet fisk per kar var 45, fisken i alle kar blei haldt i naturleg temperatur og simulert naturleg fotoperiode. 3 mai blei alle fiskene frå alle kar bedøvd med Finquell MS-222 (0.1 g L⁻¹ tricaine methanesulfonate), den bedøvde fisken blei veid og deira lengde blei målt. Etter målingane 3. mai blei fisken sett tilbake i kara, i perioden 3. mai til 7. mai blei salthaldigheita gradvis justert frå 0,8 ppt til 34 ppt. Salthaldigheit blei justert for å sette i gang smoltifiseringsprosessen, tidspunktet for justeringa i salthaldigheit blei basert på migrasjon åtferda til ville bestanden. Dette vert basert på daglege observasjonar frå stasjonen plassert ved elveutløpet til Matreelva der den eksperimentelle bestanden stammar ifrå.

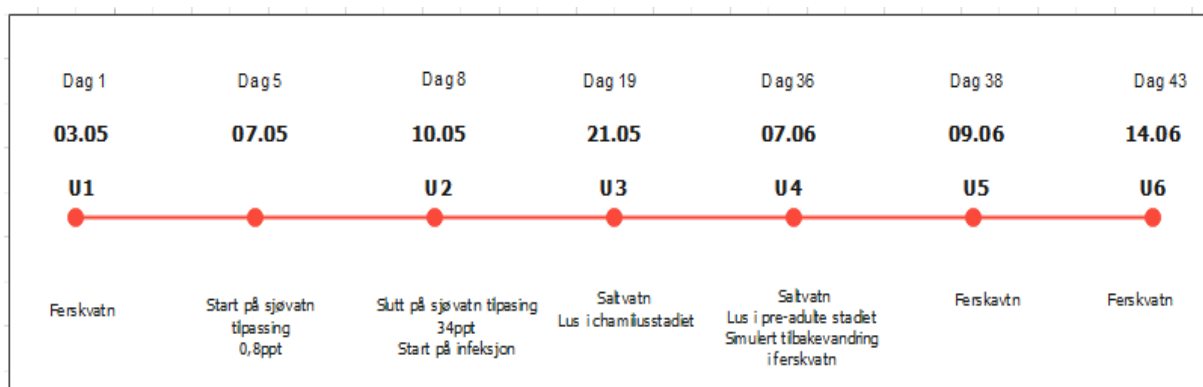
Den 10. mai 2021 har fisken vert i salthaldigheit 34 ppt i 3 dagar og infeksjonen av fisken med lakselus blei også starta på den dagen. I alle 8 kara blei vassflyten stoppa og vassnivå blei redusert til 20 cm. 4 av kara blei så tilsett 10 dagar gamle kopepodittar. Dei resterande 4 kara blei det ikkje tilsett kopepodittar, desse karene blei kontrollen i eksperimentet. Etter 20 minuttar vert vassflyten skrudd på. I dei 4 infiserte kara blei det totalt tilsett 11480 kopepodittar (2870 fisk per kar), som ga ein gjennomsnittleg smittepress på 70 lus per fisk. Kopepodittane var henta ifrå Havforskningsinstituttet sitt bestand og blei produsert etter standard metode (Hamre, Glover and Nilsen, 2009) ved 8° C. Kopepodittane blei frakta til Matre forskningsstasjon i kjøleboksar og blei tilsett i fiskekara på same

dagen som dei blei frakta. Etter infeksjonen med lakselus var fisken i sjøvatn til 7. juni, deretter blei saltkonsentrasjonen justert tilbake til 0,8 ppt for å simulere en prematur tilbakevandring. Forsøket blei avslutta 14. juni 2021.

2.3 Prøvetaking

Det blei tatt prøver av fisken totalt 6 gangar i forsøket (Figur 6). 3. mai når fisken opphaldt seg i ferskvatn (U1), 10. mai når den har vert i salthaldigheit 34 ppt i 3 døgn (U2), 21. mai i sjøvatn etter smitte når lakselusa var i chalimus stadiet (U3), 7. juni i sjøvatn når lakselus var på det pre-adulte stadiet (U4), 9. juni når den har vert i ferskvatn i 2 døgn (U5) og 14. juni når den har vert i ferskvatn i 7 døgn (U6).

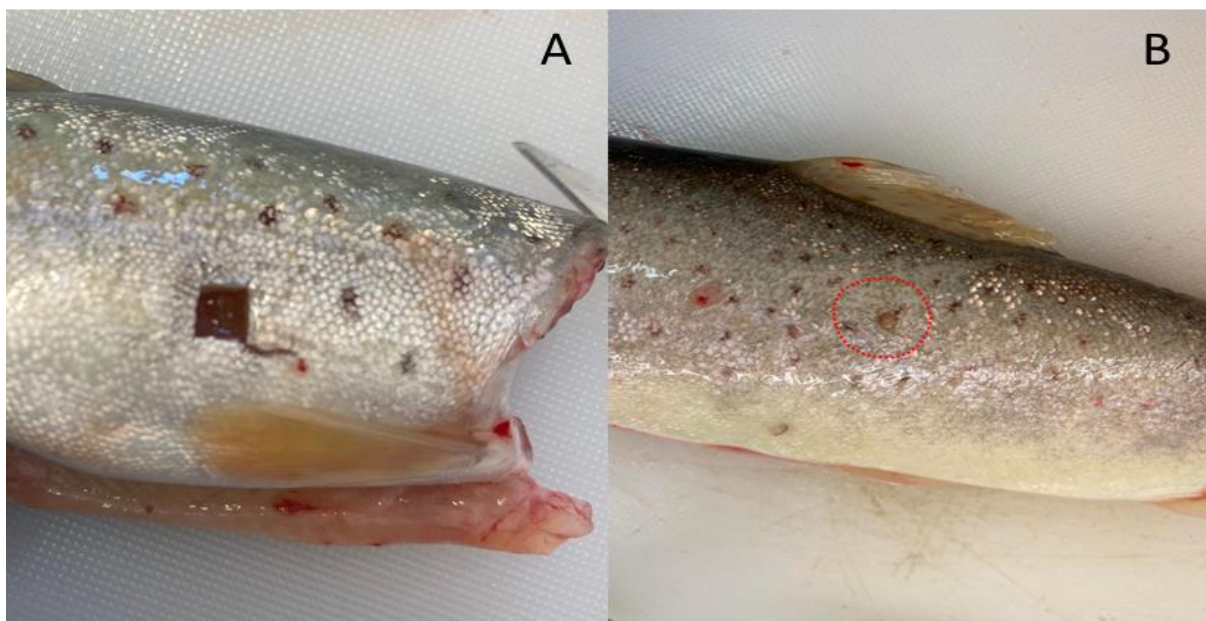
I uttak 1-3 blei det tatt ut 24 fisker (3 frå kvar kar), i uttak 4-6 blei det tatt ut 80 fisker (10 per kar). Fisken blei ved hjelp av hov tatt ut av karene og bedøvd med middelet Aquacalm (0.01 g L⁻¹ metomidate hydrochloride; Aquacalm vet., Scan Aqua AS, Årnes, Noreg). Etter at fisken blei bedøvd blei det att blodprøver frå den kaudale åra, antall lus per fisk blei telt (gjelder uttak U3-U6), fisken blei vegd (g) og målt i lengd (cm). Deretter blei fisken avliva ved eit kraftig slag mot hovudet. Vidare blei det tatt målingar av lever, hjarte, innvollar og gonadene i vekt (g). Kjønn blei determinert frå gonadane. I tillegg blei det tatt prøver frå hovudnyra og prøver frå hud. I uttaka der fisken var smitta med lakselus, blei telt lakselus per fisk og det blei notert stadiet på lakselusa.



Figur 6: Tidslinje over alle uttak gjort i eksperimentet over ein periode frå 3. mai 2021 til 14. juni 2021. Uttak 2 (U2) blei utført før infeksjon med lakselus som starta same dagen. Uttak 4 (U4) blei utført før justering av salthaldigheit (simulert tilbakevandring).

2.4 Hudprøvar

Det blei tatt hudprøvar av auresmolt frå U4 og U5. Det blei tatt prøve av 16 fisk per uttak, 8 fisk frå kontroll og 8 frå infisert fisk. Frå kontroll fisken (K) blei det tatt ei prøve per fisk (n=8), hos den infiserte fisken blei et tatt to prøvar per fisk. Ei prøve rett under festepunktet til lusa (ML) (n=8) og ei prøve frå lus upåverka området på huda (UL) (n=8). Lakselusa var på preadulte stadiet i U4 og U5 (figur 7- B). Totalt blei det tatt 48 hudprøvar (24 per uttak). Det blei tatt ei prøve frå den dorsale delen av fisken over laterallinja, og mellom hovudet og halefinnen. Alle hudprøvane vart skjert ut ved hjelp av skalpell på tilsvarande same stadet på kvar auresmolt, og var på ca. 0,5cmx0,5cmx0,5cm (figur 7-A). I utskjering av hudprøvane er det mogleg at noko av muskelvev blei skrapa og hava i prøvane. Skalpellblad vert skifta ut mellom kvar fisk. Prøvane blei plassert i fastpreptuber og deretter lagt på tørris rett etter ekstraheringa. Deretter blei prøvene lagt i frysen med temperatur på -80 grader C for å forhindre degradering av RNA-et og dermed unngå forandringar i gen uttrykksprofilen.



Figur 7: Bilete av sjøaure (*Salmo trutta*). Bilete A viser utsnitt i hud, snittet tatt ut frå huda blei brukt til utvinning av RNA. Bilete B viser lakselus (*Lepeophtheirus salmonis*) på huda til sjøaure, lakselus i dette bilete befinne seg i pre-adulte stadiet.

2.4 RNA isolering og sekvensering

Sekvensen til alle mRNA frå transkriberte gen på eit gitt tidspunkt utgjør transkriptomet til organismen. RNA blir revers-transkribert til cDNA (kopiDNA), desse blir ligert med adaptere for å så bli sekvensert, cDNA bli sekvensert til ein «read». Det blir telt opp RNA sekvensa for kvart gen. Jo fleire RNA fragment jo fleire reads per kodande området. Gen som blir uttrykt mest har større antall RNA fragment som fører igjen til fleire cDNA og dermed reads.

Hos fleircella organismar (eukaryotar), isolera ein RNA ved å øydelegge cella (lysere), og fjerne DNA med enzymet DNA-ase. Dette blir gjort i RNA sett. Desse setta inneheld kolonne som binder og kan sentrifugerast. Ein vaskar kolonna med bufferløyninga og eluerer ut RNA med ein buffer. Kor mykje nukleinsyrer ein får eluert ut og kor rein det er blir undersøkt ved å ta ein prøve og måle absorpsjonen i eit spektrofotometer. Det absorpsjonen av UV-lys med bølgelengde 260nm som blir absorbert av nukleinsyrer, og samanlikne det med absorpsjonen 260 nm som blir absorbert av aromatiske aminosyrer i protein. Deretter overretter ein RNA til cDNA med hjelp av enzymet revers-transkriptase (*Sekvensering - Institutt for biovitenskap, 2011*).

For å ekstrahere og isolere RNA i hudprøvane blei det brukt Trizol- RNAeasy micro kit. Settet eigna seg til isolering av RNA molekyl som er lenger enn 200 neuklotider lang og kjem frå små prøvar frå dyrevev (<5mg). Til kvar hudprøve blei det tilsett 0,5 ml Trizol, deretter blei desse rista ved hjelp av FastPrep maskin på 1400 rpm i 120 sekund (vevet blir løyst opp ved hjelp av kjemikaliar samt mekanisk mosjon av ristinga og kulene i fastpreptubene). Deretter kvilte prøvene i romtemperatur i 5 minuttar. Prøvene blei tilsett 100 ul kloroform for å så blir rista ved bruk av fastprep maskin igjen på 1400rpm i 1 minutt, deretter blei desse sentrifugert i 15 minuttar på 16000 RCF ved 4 °C. Det blei tatt ut 200 ul av supernatanten og overført til ny tube, deretter blei det tilsett 400 ul RLT og 600 uL 70 % etanol til tuben med supernatanten. Dette blei blanda og overført til ein RNeasy MinElute spin column i 2 omgangar ettersom det er kunn plass til 700 ul væske i desse. Resten av isoleringa blei gjort ifølgje med Rneasy Micro kit (QIAGEN) protokollen. Deretter blei Rneasy minelute spin column plassert i ny tube og blei tilsatt 14 ul RNase fritt vatn i senteret av spin column membranen. Til slutt blei prøven sentrifugert i 1 minutt på 16000 rcf for å eludere RNA. Kvaliteten og mengde RNA henta frå hudprøvane vert skjekka ved bruk av spektrometri og bioanalyser. Det ferdig ekstraherte RNA blei fryst og sendt til illumna sequencing for seknevesering.

2.5 Dataanalyse

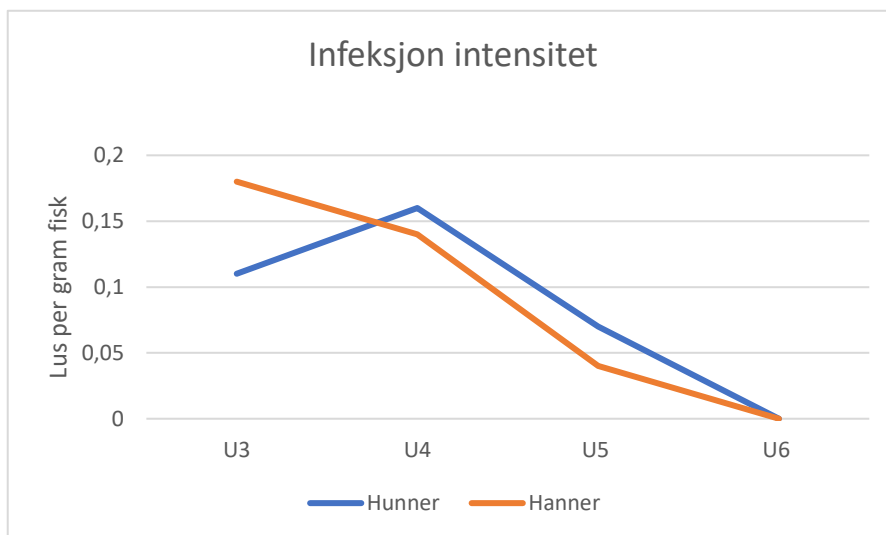
Bioinformatisk analyse blei utført av bioinformatiker der data blei kartlagt mot genmodell frå Atlantisk laks. Det blei valt å bruke genmodell frå Atlantisk laks ettersom RNA frå hudprøvane frå sjøaure samsvara like godt med sjørørret genom som med laksegenom, i tillegg er genomet til laks betre kvalitet. Kor mykje kvar hudprøve samsvara med genmodellen til atlantisk laks ligge ved i Appendix A. Videre behandling av data vert gjort med normalisering av antall transkript i kvar prøve (Appendix B.1- normaliserte verdier i sjøtvatn, Appendix B.2 – normaliserte verdier i ferskvatn). Differensial utrykte genar blei henta fram og analysert ved bruk av NOISeq R/bioconductor pakke. Signifikansnivå blei satt til $1-PNOI < 0,05$ som tilsvara 0,05 falsk oppdagelse rate justert p-verdi (Appendix C). Vidare blei det henta fram normalisert antall transkript for 17 immunologiske gen i kvar hudprøve. Hudprøvane vert sortert i 6 grupper. Traskripsjonsprofilen per gen vert sortert etter desse gruppene og gjennomsnittet og standardfeilen til gjennomsnittet (SEM) blei rekna ut per gruppe.

3. Resultat

Resultata lista i avsnitta 3.1-3.4 er ei oppsummering av data henta frå manuskript om heile forsøket som er under utarbeiding (Fjelldal et al in prep). Her samanliknast den fysiologiske responsen på lakselus. All data er samanlikna mellom 4 grupper (infisert ho, infiserte hann, kontroll ho og kontroll hann fisk) i alle 6 uttaka. Desse resultata blir nemnt i oppgåva for tilleggsinformasjonen om fiskebestanden og for å sette resultatane frå transkripsjons studiet i perspektiv, men vil ikkje bli diskutert.

3.1 Infeksjonsforløp

Fisken blei smitta med lakselus etter uttak U2, smittepresset blei registrert ved resterande uttaka. Det blei funne variasjon i smittepresset mellom hannar og hoer i uttak U3-U6. Hannar i U3 hadde eit signifikant høgare antall lus med 0,18 lus per gram fisk i forhold til hoar som hadde 0,11 lus per gram fisk, på dette tidspunktet var lakselusa i chalimus stadiet. Frå U3 til U4 (lakselus i preadult stadiet) blir det observert eit auke i antall lakselus hos hofisk der intensiteten var 0,16 lus per gram fisk, og hos hannfisk 0,14 lus per gram fisk. Frå U3-U4 blei salthaldigheita senka frå 34ppt til 0,8 ppt, begge kjønn viste eit kraftig nedgang i smittepress. Der hannar låg på 0,04 lus per gram fisk og hoer låg på 0,07 lus per gram fisk. Ved U6 var smittepresset hos begge tilnærma 0 (figur 8).



Figur 8: Infeksjon intensitet (gjennomsnittleg) på sjøaure (Salmo trutta) påført av lakselus (Lepeophtheirus salmonis). Infeksjon intensiteten er illustrert mellom hannar og hoer i uttak 3-6 og målt i lus per gram fisk. Uttak 3 er 11 dagar etter infeksjon med kopepodittar, lusa befinne seg i chalimus stadiet. Uttak 4 er 38 dagar etter infeksjon der lusa er i det pre-adulte stadiet, etter uttaket blei salthaldegheit justert ned frå 34 ppt til 0,8 ppt for å simulere prematur tilbakevandring. Uttak 5 og 6 er 2 og 7 dagar etter den simulerte tilbakevandringa i ferskvatn.

3.2 Vekt, lengde og kondisjonsfaktor

Ved starten av eksperimentet (26. april) når fiskene blei flytta til dei 8 eksperimentelle kara, blei det tatt vekt og målt lengd av alle fiskane. Det blei ikkje funne nokon signifikante forskjellar mellom dei 4 kontroll tankane og dei 4 infiserte karene (før infisering med lakselus). Ved uttak U1 hadde hannar eit signifikant høgare kondisjonsfaktor enn hoer. Frå U1 til U2 blei salthaldigheita juster frå 0,08 ppt til 34 ppt, hannar hadde ein signifikant reduksjon i kondisjonsfaktor frå U1 til U2. Det blei ikkje funne nokon signifikante forskjellar i vekt eller lengd mellom hannar og hoer, heller ikkje mellom infisert fisk og kontroll fisk. Men frå U2-U6 blei det funne signifikante forskjellar mellom uttaka i lengde, vekt og kondisjonsfaktor. Det blei også observert ein trend som viser auke i kondisjonsfaktor frå U2 og utover. Gjennomsnittleg lengde og vekt per uttak er lagt ved i Appendix D.

3.3 Blodplasma

Prøvane tekne av blodet blei analysert og nivå av Na, Cl, Osmolalitet, kortisol, glukose og laktat blei målt. Na (mmol L⁻¹) og Cl (mmol l⁻¹) viser same trend der konsentrasjonen stig frå U1 til U2 (ved saltvassstilpassing), deretter søkk den i frå U2 til U3 for å så stige igjen frå U3 TIL U4. Frå U4 til S5 søkk konsentrasjonen, frå S5 til S6 flater kurven ut. Det er svært lite forskjellar mellom kjønn og dei ulike behandlingane (unntak i konsentrasjonen av Cl i kontroll hoer i U3). Osmaliteten følgjer same trend som Na og Cl, det blei registrert høgna verdiar av plasma osmaliteten hos smitta hoer i U4 når lusa var i chalimus stadiet. Det var ingen kjønns eller behandlings forskjellar i kortisol konsentrasjonen innan uttaka, men det blei registrert forskjell i kortisol nivå hos kontroll hannar og hoer ved U1. Plasma glukose steig signifikant hos hannar (både kontroll og infisert fisk) mellom U4 og U5 (bytte frå sjøvatn til ferskvatn). Plasma laktat sank signifikant frå U2 til U3 og steig signifikant frå U3 til U4 i alle 4 grupper. Frå U4 til U5 steig laktat konsentrasjonen hos hannar signifikant.

3.4 Organ størrelse

Lever/kroppsvekt ratio var lik mellom infiserte og ikkje infisert fisk, heller ingen signifikante forskjellar mellom kjønn vert sett med unntak av infiserte hoer i U4. Der infiserte hoer hadde høgare verdi enn dei resterande gruppene. Trenden i lever/kroppsvekt ratio var søkkande fram til U4 og stigande frå U4 til U6. Både hannar og hoer hadde signifikant lågare lever/kroppsvekt ratio i U2 enn

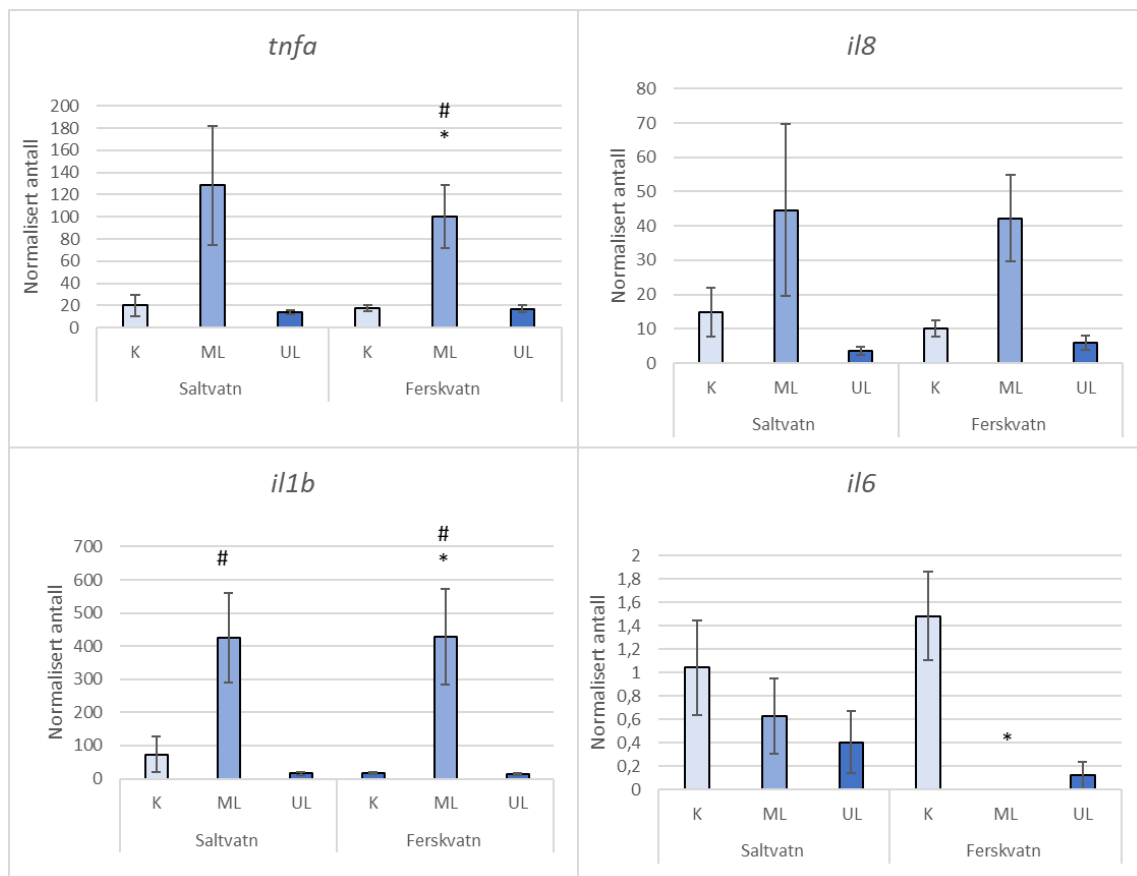
det dei hadde i U1. Hjarte/kroppsvekt ratio viste signifikante forskjellar mellom kjønna der hannar hadde i gjennomsnitt større ratio enn hoer. Hannar hadde signifikant høgare hjarte/kroppsvekt ratio enn hoer i U1 og U2. Gonade/kroppsvekt ratio hadde ingen signifikante forskjellar. Trenden viser lågare gonade vekt hos hoer ved u1 enn hannar, denne trenden snur i U2 og hoer har høgare verdiar på gonade/kroppsvekt ratio. Frå U2 til U6 er det stabil gjennomsnittleg trend mot auke av gonade størrelsen.

3.5 Genekspresjon

I forsøket blei det samanlikna transkripsjon frå hud til sjøaure gjennom RNA-sekvensering ved infestasjon med lakselus i sjøvatn og ferskvatn. Transkripsjon frå uinfisert fiskehud (K), transkripsjon frå infisert fiskehud ved festepunktet til lusa (ML) og transkripsjon frå infisert fisk frå upåverka hud (UL), desse blei samanlikna med kvarandre både i sjøvatn og ferskvatn. Samt blei dei ML, UL og K tatt i sjøvatn samanlikna med ML, UL og K tatt i ferskvatn. Totalt i forsøket blei det identifisert sekvensar frå 55104 utrykte gen frå sjøaure (i tillegg til sekvensar tilhøyrande lakselus og metagenom, ikkje omtalt i denne oppgåva). I denne oppgåva blei det sett på forskjellane i ekspresjonen av 17 immunrelevante gen mellom dei ulike gruppene i sjøvatn og saltvatn. Data frå RNA-sekvensering har blitt normalisert, deretter har differensial ekspresjon analyse blitt utført ved bruk av R-pakke NOIseq der signifikansnivå har blitt satt til 0,95 ($1 - \text{PNOI} < 0,05$, som tilsvara ein falsk oppdagelsesrate (false discovery rate, FDR) justert p-verdi). Differensial ekspresjon analyse blei utført for å kunne oppdage kvantitative endringar i uttrykk til gen mellom ulike grupper. Hud prøvane tatt frå festepunktet til lakselusa (ML) og prøvane tatt på frisk upåverka hud (UL) kjem frå same individ (til dømes er ML1 og UL1 tatt frå same individ), sida prøvane kjem frå same fisk fjernar dette potensielle forskjellar mellom individa. Dei fleste signifikante forskjellane blei sett i infisert hud tatt frå festepunktet til lusa (ML) i forhold til kontroll (K) og infisert hud frå upåverka området (UL). Det blei ikkje observert nokre signifikante forskjellar mellom individ i sjøvatn og ferskvatn. I dette studiet har to hudprøvar blitt utelukka av resultat ettersom desse samstemte meir med lakselusreferansen enn dei gjorde med laksereferansen (ML10 og ML11).

3.5.1 Pro-inflammatoriske cytokiner

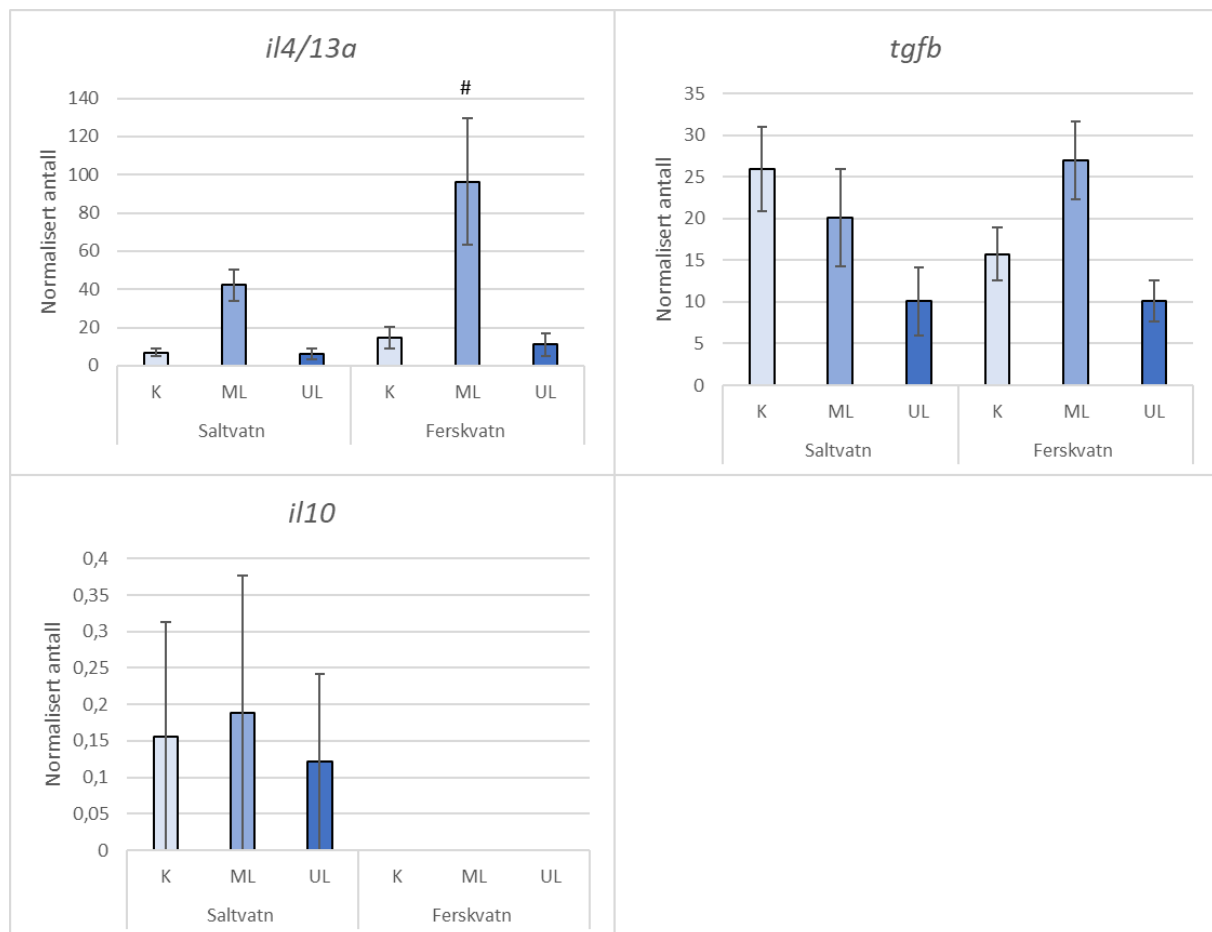
Cytokiner er viktig i bevaring av lymfocytt balansen både under normale forhold og under inflammasjon. Dei proinflammatoriske cytokin; tumor nekrose faktor alfa (Tnfa), interleukin 8 (Il8), interleukin 1 beta (Il1b) og interleukin 6 (Il6) fungerer som signalmolekyl og fremmer tilstrømming av fagocytterende celler til infeksjonstaden. Transkripsjonen til cytokinet *tnfa* var signifikant oppregulert i prøvane ML i forhold til prøvar UL og K i ferskvatn (FV, simulert tilbakevandring i ferskvatn). Ingen signifikante forskjellar var funne i ekspresjonen av *il8*. Ekspresjonen av *il8* viser trend til oppregulasjon i ML både i FV og SV (sjøvatn),. *Il1b* var signifikant oppregulert i ML i SV i forhold til UL, ML var også signifikant oppregulert i FV i forhold til kontroll og UL. *Tnfa*, *il8* og *il1b* viser same trend, med oppregulasjon i ML i både SV og FV. *Il6* hadde svært låg ekspresjon i alle 6 gruppene, *il6* var signifikant nedregulert i ML i FV i forhold til kontroll (Figur 9).



Figur 9: Genespresjon til proinflammatoriske cytokin *tnfa*, *il8*, *il1b* og *il6* i hudprøvar frå sjøaure (*Salmo trutta*) smitta med lakselus og sjøvatn og i ferskvatn. Hudprøvene i sjøvatn er tatt av uinfisert kontroll fisk (K) (n=8), lakselus infisert fisk ved festepunktet til lakselusa (ML) (n=6) og lakselus infisert fisk ved upåverka området utan lus (UL) (n=8). Hudprøvene i ferskvatn er tatt av uinfisert kontroll fisk (K) (n=8), lakselus infisert fisk ved festepunktet til lakselusa (ML) (n=8) og lakselus infisert fisk ved upåverka området utan lus (UL) (n=8). Prøvene ML og UL er tatt frå same individ innan kvar salinitet. Hudprøvene vert tekne på tilsvarande området hos alle individ. Spøylene representerer gjennomsnittet +/- SEM av normalisert antall transkript. #-indikere signifikante forskjellar i forhold til UL. *-indikere signifikante forskjellar i forhold til K. Signifikansnivå er satt opp til mindre enn 0,05 falsk oppdagelse rate justert p-verdi (1-PNOI <0,05, som tilsvara 0,05 falsk oppdagelsesrate justert p-verdi).

3.5.2 Antiinflammatoriske cytokin

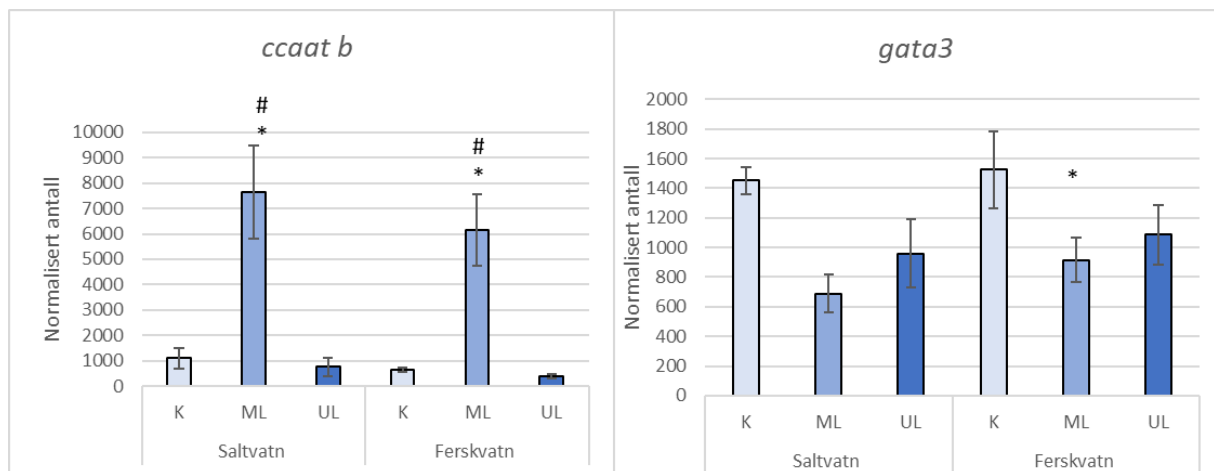
I motsetning til dei proinflammatoriske cytokin som fremmer inflammasjon, har dei antiinflammatoriske cytokin emne til å hemme og regulere inflammatorisk aktivitet. Ekspresjonen til det regulatoriske cytokinet interleukin 10 (*il10*) viste ingen signifikante forskjellar mellom gruppene, og ekspresjonen til cytokinet var svært låg. *il4/13a* er viktig i adaptiv respons og th2 respons, denne var signifikant oppregulert i ML i FV i forhold til UL. I SV viser den oppregulasjon i ML, men denne er ikkje signifikant. I tillegg til antiinflammatoriske eigenskapar, er transformasjon vekst faktor beta (*Tgfb*) også viktig i vev reparasjon og produksjon av nye blodceller. Uttrykk av *tgfb* var ikkje signifikant forskjellig i ferskvatn i ML i forhold til K og UL, denne viste heller ikkje signifikante forskjellar i sjøvatn i ML i forhold til K og UL (figur 10).



Figur 10: Genespresjon av anti-inflammatoriske cytokin *il10*, *il4/13a* og *tgfb* i hudprøvar frå sjøaure (*Salmo trutta*), smitta med laccase i ferskvatn og sjøvatn. Hudprøvene i sjøvatn er tatt av uinfisert kontroll fisk (K) (n=8), laccase infisert fisk ved festepunktet til laccase (ML) (n=6) og laccase infisert fisk ved upåverka området utan lus (UL) (n=8). Hudprøvene i ferskvatn er tatt av uinfisert kontroll fisk (K) (n=8), laccase infisert fisk ved festepunktet til laccase (ML) (n=8) og laccase infisert fisk ved upåverka området utan lus (UL) (n=8). Prøvene ML og UL er tatt frå same individ innan kvar salinitet. Hudprøvene vert tekne på tilsvarande området hos alle individ. Søylenes representerer gjennomsnittet +/- SEM av normalisert antall transkript. #-indikere signifikante forskjellar i forhold til UL. *-indikere signifikante forskjellar i forhold til K. Signifikansnivå er satt opp til mindre enn 0,05 falsk oppdagelse rate justert p-verdi (1-PNOI <0,05, som tilsvara 0,05 falsk oppdagelsesrate justert p-verdi).

3.5.3 Transkripsjonsfaktorar

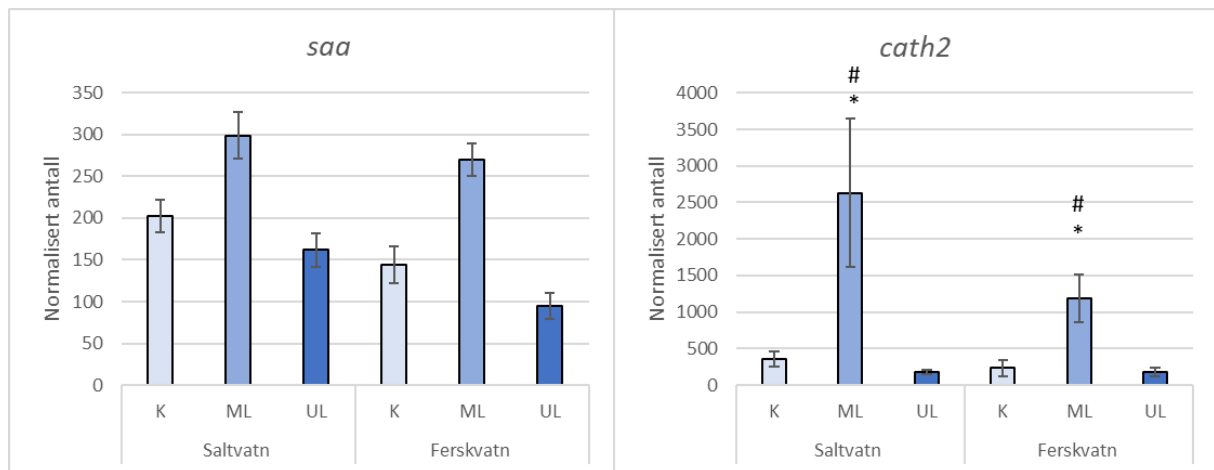
Transkripsjonsfaktoren *Ccaat*-beta fremmer inflammatoriske respons, samt regulerer transkripsjonen av akutfaseprotein og cytokin. *Ccaatb* var signifikant oppregulert i hudprøvar frå ML både i forhold til kontrollen og UL i FV og SV. Transkripsjonsfaktoren *gata3* regulerer antiinflammatoriske responsar, og bidrar til produksjon av cytokin. *Gata3* var signifikant nedregulert i ML i FV i forhold til kontrollen. Trenden viser nedregulasjon i ML og UL både i SV og FV i forhold til kontrollen (figur 11).



Figur 11: Genespresjon av transkripsjonsfaktorar *ccaatb* og *gata3* i hudprøvar frå sjøaure (*Salmo trutta*), utsett for lakselus infestasjon i ferskvatn og sjøvatn. Hudprøvene i sjøvatn er tatt av uinfisert kontroll fisk (K) (n=8), lakselus infisert fisk ved festepunktet til lakselusa (ML) (n=6) og lakselus infisert fisk ved upåverka området utan lus (UL) (n=8). Hudprøvene i ferskvatn er tatt av uinfisert kontroll fisk (K) (n=8), lakselus infisert fisk ved festepunktet til lakselusa (ML) (n=8) og lakselus infisert fisk ved upåverka området utan lus (UL) (n=8). Prøvene ML og UL er tatt frå same individ innan kvar salinitet. Hudprøvene vert tekne på tilsvarende området hos alle individ. Søylenes representerer gjennomsnittet +/- SEM av normalisert antall transkript. #-indikere signifikante forskjellar i forhold til UL. *-indikere signifikante forskjellar i forhold til K. Signifikansnivå er satt opp til mindre enn 0,05 falsk oppdagelse rate justert p-verdi ($1-PNOI < 0,05$, som tilsvara 0,05 falsk oppdagelsesrate justert p-verdi).

3.5.4 Akutfaseprotein

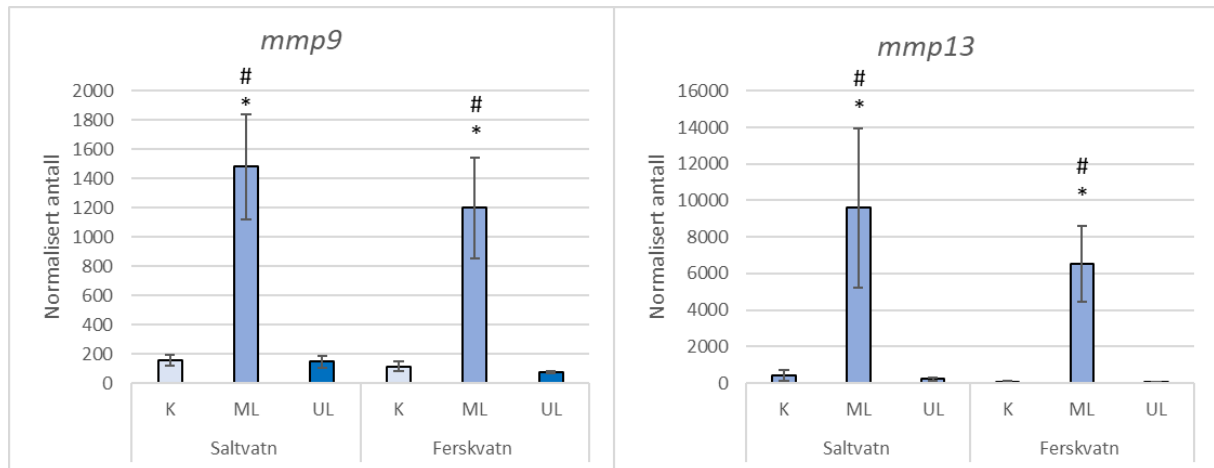
Akutfaseprotein har ein rekke viktige funksjonar i den systematiske responsen på inflammasjon. Akutfaseproteinet *cath2* viser signifikant oppregulasjon i ML i forhold til kontroll og UL i både FV og SV. Akutfaseproteinet *saa* viste ingen signifikante forskjellar, men trenden viser ein oppregulasjon i ML (figur 12).



Figur 12: Genekspresjon av akutfaseprotein *cath2* og *saa* i hudprøvar frå sjøaure (*Salmo trutta*), utsett for lakselus infestasjon i ferskvatn og sjøvatn. Hudprøvene i sjøvatn er tatt av uinfisert kontroll fisk (K) (n=8), lakselus infisert fisk ved festepunktet til lakselusa (ML) (n=6) og lakselus infisert fisk ved upåverka området utan lus (UL) (n=8). Hudprøvene i ferskvatn er tatt av uinfisert kontroll fisk (K) (n=8), lakselus infisert fisk ved festepunktet til lakselusa (ML) (n=8) og lakselus infisert fisk ved upåverka området utan lus (UL) (n=8). Prøvene ML og UL er tatt frå same individ innan kvar salinitet. Hudprøvene vert tekne på tilsvarande området hos alle individ. Søylenes representerer gjennomsnittet +/- SEM av normalisert antall transkript. #-indikere signifikante forskjellar i forhold til UL. *-indikere signifikante forskjellar i forhold til K. Signifikansnivå er satt opp til mindre enn 0,05 falsk oppdagelse rate justert p-verdi (1-PNOI <0,05, som tilsvara 0,05 falsk oppdagelsesrate justert p-verdi).

3.5.5 Matrise metalloproteinaser

Metalloproteinaser spelar ein viktig rolle i vevreparasjons prosessen der desse remodellere den ekstracellulære matrise. Utrykker til *mmp9* og *mmp13* viste signifikant oppregulering i ML både i forhold til kontroll og UL i SV og FV (figur 13). *Mmp13* hadde spesielt høg oppregulering i ML og var det genet som var hadde høgast ekspresjon av alle 17 immunologiske gen i dette studiet.

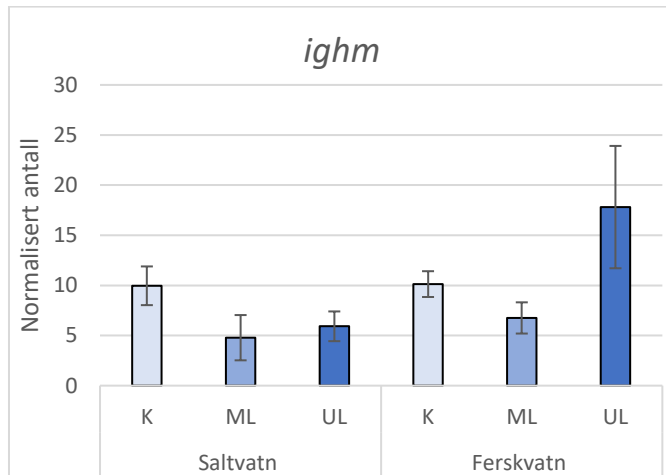


Figur 13: Genekspressjon av matrise metalloproteinaser *mmp9* og *mmp13* i hudprøvar frå sjøaure (*Salmo trutta*), utsett for lakselus infestasjon i ferskvatn og sjøvatn. Hudprøvene i sjøvatn er tatt av uinfisert kontroll fisk (K) (n=8), lakselus infisert fisk ved festepunktet til lakselusa (ML) (n=6) og lakselus infisert fisk ved upåverka området utan lus (UL) (n=8). Hudprøvene i ferskvatn er tatt av uinfisert kontroll fisk (K) (n=8), lakselus infisert fisk ved festepunktet til lakselusa (ML) (n=8) og lakselus infisert fisk ved upåverka området utan lus (UL) (n=8). Prøvene ML og UL er tatt frå same individ innan kvar salinitet. Hudprøvene vert tekne på tilsvarande området hos alle individ. Søylenes representerer gjennomsnittet +/- SEM av normalisert antall transkript. #-indikere signifikante forskjellar i forhold til UL. *-indikere signifikante forskjellar i forhold til K. Signifikansnivå er satt opp til mindre enn 0,05 falsk oppdagelse rate justert p-verdi (1-PNOI <0,05, som tilsvara 0,05 falsk oppdagelsesrate justert p-verdi).

3.5.6 Immunoglobulin

Immunoglobulin M produserast av B-celler, desse spelar ein viktig rolle i aktivering av komplementsystemet samt har desse emne til opsonisere og nøytralisere patogen.

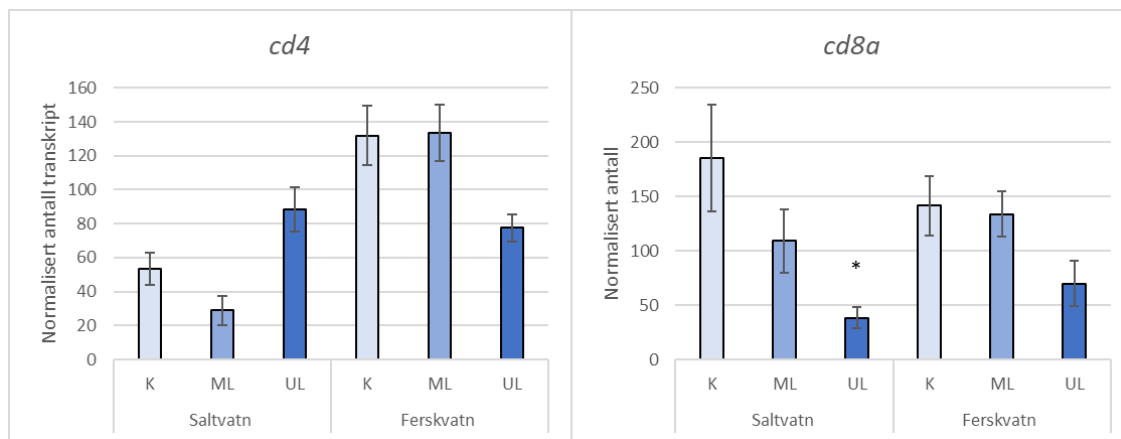
Immunoglobuliner er viktig del av det adaptive immunforsvaret. Utrykket av immunoglobulin m, *igm* viste ingen signifikante resultat og uttrykker er generelt låg, ingen spesielle trendar vert observert (figur 14).



Figur 14: Genekspresjon av immunoglobulin m i hudprøvar frå sjøaure (*Salmo trutta*), utsett for lakselus infestasjon i ferskvatn og sjøvatn. Hudprøvene i sjøvatn er tatt av uinfisert kontroll fisk (K) (n=8), lakselus infisert fisk ved festepunktet til lakselusa (ML) (n=6) og lakselus infisert fisk ved upåverka området utan lus (UL) (n=8). Hudprøvene i ferskvatn er tatt av uinfisert kontroll fisk (K) (n=8), lakselus infisert fisk ved festepunktet til lakselusa (ML) (n=8) og lakselus infisert fisk ved upåverka området utan lus (UL) (n=8). Prøvene ML og UL er tatt frå same individ innan kvar salinitet. Hudprøvene vert tekne på tilsvarande området hos alle individ. Søylenes representerer gjennomsnittet ± SEM av normalisert antall transkript. #-indikere signifikante forskjellar i forhold til UL. *- indikere signifikante forskjellar i forhold til K. Signifikansnivå er satt opp til mindre enn 0,05 falsk oppdagelse rate justert p-verdi (1-PNOI <0,05, som tilsvara 0,05 falsk oppdagelsesrate justert p-verdi).

3.5.7 T-celle overflatemolekyl, *cd4* og *cd8*-alfa

Cd4 og Cd8a er overflatemolekyl funne på t-celler, t-celler som uttrykker *cd8a* er cytotoksiske t-celler som kan ødelegge fremmande celler. T-celler som uttrykker *cd4* er omtalt også som t-hjelpeceller og står for en stor del av cytokin produksjonen. Utrykket til *cd4* viste ingen signifikante resultat, trenden viser generell oppregulasjon i ferskvatn i forhold til sjøvatn, men ingen signifikante forskjeller. Utrykket til *cd8a* var signifikant nedregulert i UL i FV i forhold til kontrollen. Trenden viser lågere uttrykt *cd8a* i UL i både ferskvatn og sjøvatn (figur 15).

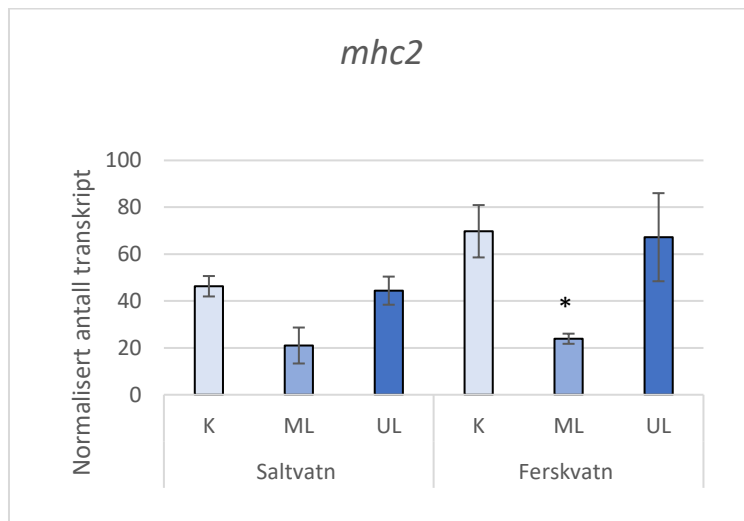


Figur 15: Genekspresjon av overflatemolekyl *cd4* og *cd8a* i hudprøver fra sjøaure (*Salmo trutta*), utsett for lakselus infestasjon i ferskvatn og sjøvatn. Hudprøverne i sjøvatn er tatt av uinfisert kontroll fisk (K) (n=8), lakselus infisert fisk ved festepunktet til lakselusa (ML) (n=6) og lakselus infisert fisk ved upåverka området utan lus (UL) (n=8). Hudprøverne i ferskvatn er tatt av uinfisert kontroll fisk (K) (n=8), lakselus infisert fisk ved festepunktet til lakselusa (ML) (n=8) og lakselus infisert fisk ved upåverka området utan lus (UL) (n=8). Prøvene ML og UL er tatt frå same individ innan kvar salinitet. Hudprøverne vert tekne på tilsvarande området hos alle individ. Søylenes representerer gjennomsnittet +/- SEM av normalisert antall transkript. #-indikere signifikante forskjellar i forhold til UL. *-indikere signifikante forskjellar i forhold til K. Signifikansnivå er satt opp til mindre enn 0,05 falsk oppdagelse rate justert p-verdi (1-PNOI <0,05, som tilsvara 0,05 falsk oppdagelsesrate justert p-verdi).

3.5.8 MHC2

Mhc er overflate molekyl funne på antigenpresentrande celler, desse står for presentasjon av antigen til ulike immunceller. Mhc klasse 2 står for presentasjon av antigen frå ekstracellulære kjelde.

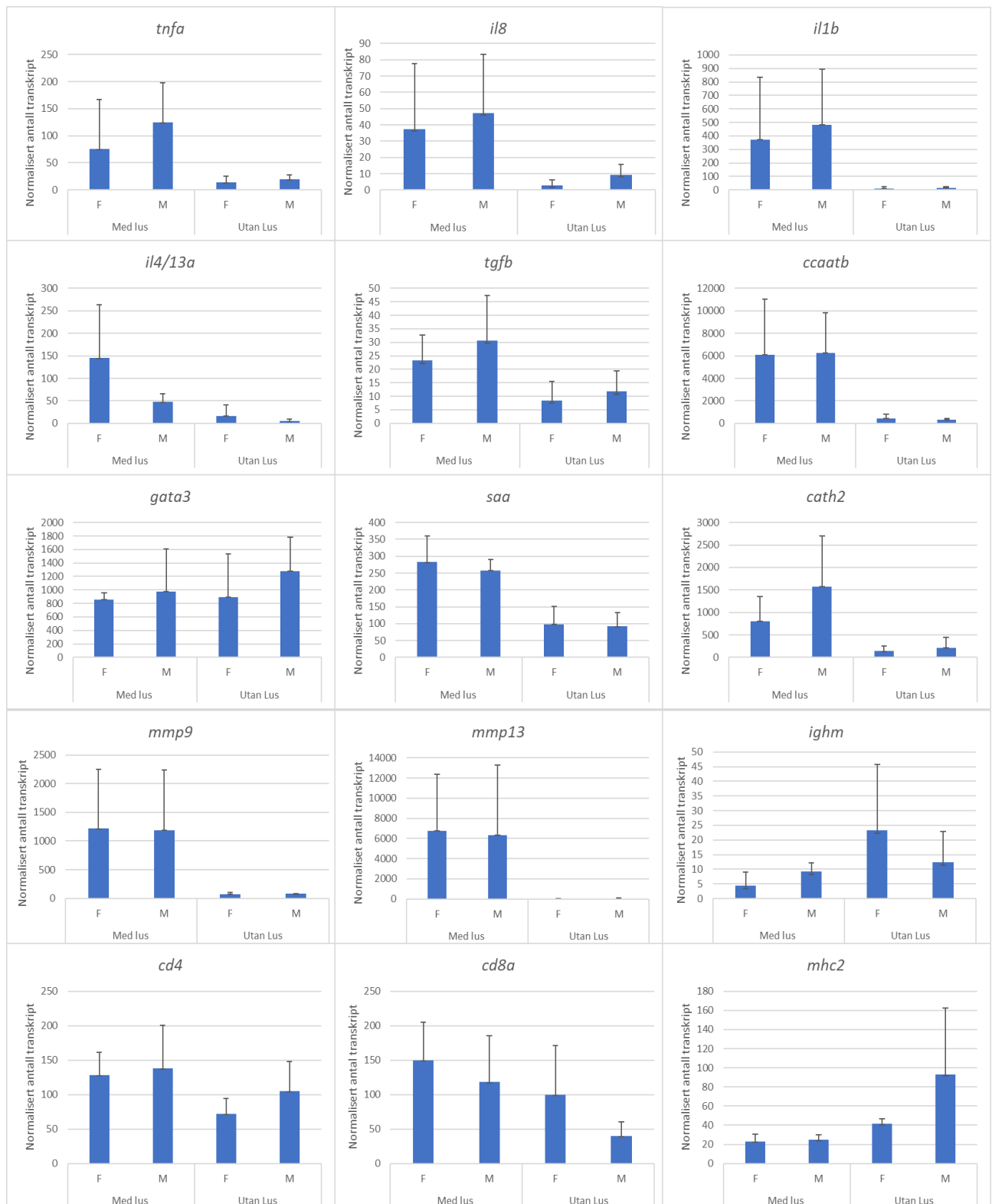
Utrykket til *mhc2* er signifikant nedregulert i ML i forhold til kontroll. Trenden i grafen (figur 16) viser eit lågare uttrykt *mhc2* i ML i FV og SV.



Figur 16: Genekspresjon av overflatemolekyl *mhc2* i hudprøvar frå sjøaure (*Salmo trutta*), utsett for laxselus infestasjon i ferskvatn og sjøvatn. Hudprøvane i sjøvatn er tatt av uinfisert kontroll fisk (K) (n=8), laxselus infisert fisk ved festepunktet til laxselusa (ML) (n=6) og laxselus infisert fisk ved upåverka området utan lus (UL) (n=8). Hudprøvane i ferskvatn er tatt av uinfisert kontroll fisk (K) (n=8), laxselus infisert fisk ved festepunktet til laxselusa (ML) (n=8) og laxselus infisert fisk ved upåverka området utan lus (UL) (n=8). Prøvene ML og UL er tatt frå same individ innan kvar salinitet. Hudprøvane vert tekne på tilsvarande området hos alle individ. Søylenes representerer gjennomsnittet +/- SEM av normalisert antall transkript. #-indikere signifikante forskjellar i forhold til UL. *-indikere signifikante forskjellar i forhold til K. Signifikansnivå er satt opp til mindre enn 0,05 falsk oppdagelse rate justert p-verdi (1-PNOI <0,05, som tilsvara 0,05 falsk oppdagelsesrate justert p-verdi).

3.6 Kjønnsforskjellar i genekspresjon

Sida det blei observert kjønnsforskjellar i dei fysiologiske målinga beskrivne i resultatdel 3.2-3.4, blei uttrykket til dei 17 immunologiske gen samanlikna mellom hannar og hoer i uttak 6 (ferskvatn). Dette blei gjort for å detektere eventuelle kjønnsforskjellar i genekspresjonen. Uttak 6 blei valt grunna likt antall hoer og hannar (antall hoer=4, antall hannar=4). Ingen signifikante forskjellar blei funne i genekspresjonen mellom kjønna både i ML og UL (figur 17). Il10 og il6 er ikkje illustrert i figur 17, både il10 og il6 hadde gjennomsnittleg antall normalisert transkript =0.



Figur 17: Genespresjon av immunologiske gen: *tnfa*, *il8*, *il1b*, *il4/13a*, *tgfb*, *ccaatb*, *gata3*, *saa*, *cath2*, *mmp9*, *mmp13*, *ighm*, *cd4*, *cd8a* og *mhc2* mellom hannar (M)(n=4) og hoar (F)(n=4) i hudprøvar frå sjøaure (*Salmo trutta*) i ferskvatn (uttak 5) ved simulert tilbakevandring. Hudprøvene er tatt av same fiskeindivid både ved festepunktet til lusa (Med lus) og ved upåverka området (Utan lus). Hudprøvene vert tekne på tilsvarende området hos alle individ. Søylenes representer gjennomsnitt + st.av. av normalisert antall transkript.

4. Diskusjon

Ekspresjonen av gen gjer eit innblikk i kva forbindelsar og celler er tilstades i huda til fisken og er essensiell i forståinga av fisken sin respons på ulike patogen. Transkripsjonsstudiar gjer oss informasjon om kva type gen blir aktivert under ulike forhold, transkripsjonsstudiar gjev også eit målbar resultat. Tidlegare studiar gjort på lakselus infiserte laksefisk har vist at immunresponsen er som regel lokal og begrensa til festepunktet til lusa (Tadiso *et al.*, 2011; Braden *et al.*, 2012; Dalvin *et al.*, 2020). Atlantisk laks og aure blir rekna som ikkje resistente arter for lakselus og immunresponsen til dessa er ikkje tilstrekkeleg for å kvitte seg med parasitten (Braden, Monaghan and Fast, 2020). Grunna lakselus sitt emne til å unngå immunforsvaret til verten har det blitt teoretisert at lakselus skil ut stoff som kan hemme immunforsvaret til verten (Fast *et al.*, 2004, 2007). Det har blitt utført mange transkripsjonsstudiar på lakselusrespons hos laks (Skugor *et al.*, 2008; Fast *et al.*, 2011; Tadiso *et al.*, 2011; Braden *et al.*, 2012; Krasnov *et al.*, 2012; Sutherland *et al.*, 2014; Gallardi *et al.*, 2019), men svært få tilsvarande studiar på sjøaure (Karami *et al.*, 2018; Djurdjevič *et al.*, 2019). Ingen ekspresjonsstudiar har blitt gjort på sjøaure når den tidleg tilbakevandrar i ferskvatn for å avluse som vi veit om. Etersom sjøaure har sine beiteområda rundt kysten der lakselus har sitt naturleg opphav, er den endå meir utsett for lakselus enn det laksen er. Derfor har dette studiet sett på ekspresjonen av immunologiske gen hos sjøaure smitta med ektoparasitten lakselus der immunologiske gen blir analysert når sjøaure befinne seg i sjøvatn, men også etter en simulert tilbakevandring i ferskvatn.

4.1 Eksperimentell oppsett

Fisken blei haldt i lysregime og temperatur som tilsvara forholda i Matreelva, der foreldregenerasjonen blei henta frå. Dette blei gjort for å simulere naturlege forhold til sjøauren, men ikkje alle faktorar kunne simulerast i forsøkskar. Fisken blei sett på kommersiell fôr. I tillegg er vatnet i kara filtrert og dermed talet mikroorganismar, samt patogen redusert. Fisken brukt i forsøket er oppdretta og haldt under ideelle forhold, der den for nok mat og er mindre utsett for andre sjukdommar. Dette fører til hemning av naturlig seleksjon og svakaste individ i populasjon har like stor fitness som betre tilpassa individ. I tillegg blir sjøvatn justert og fisken blir tvungen til smoltifisering. Brunaure har komplekse livstrategier og både når og kven vandrar ut i sjøen er avhengig av miljømessige og arvelege faktorar. Det er ein potensiell sjanse for at sjøvandring og delvis arveleg livsstrategi som igjen kan potensiell føre til at sjøvandrande individ er meir resistente for lakselus. Dette kan potensielt ha påverknad på resultatata i dette studiet. Smolt brukt i dette eksperimentet er 2 år gamle. Quigley *et al.* (2006) fant ut at 2 år gammal sjøaure under naturlig

fotoperiode og temperatur smoltifiserte normalt og har vist progressiv auke i sjøvatntoleranse i smoltperioden. Rutkovska et al. (2019) fant ut at berre 33% av 1 års-smolten overlevde sjøvatntest (24 timer i 30 ppt i mai).

Lengde, vekt og kondisjonsfaktor, blodplasma og organ størrelse vert målt og kalkulert for alle fiskar brukt i eksperimentet, dette blei gjort for å sjå fysiologiske effektar av lakselus på sjøaure, samt for å kunne detektere eventuelle individ eller kjønnsforskjellar i populasjonen. Dei tre første uttak blei det tatt prøver av 24 fiskar per uttak (3 frå kvar kar), dei 3 resterande uttaka vert det tatt prøver/målingar av 80 fisker per uttak (10 per kar). Denne variasjonen i antall fisk per uttak kan gje ein betre estimat dei siste tre uttaka ettersom talet på fiska er høgare, men dette skal ikkje ha signifikante effektar på resultatata etter som uttaka hadde tilstrekkelege tal til tross av skjelvfordelinga.

Hudprøvane ble tatt manuelt ved hjelp av skalpell, dette vil automatisk medføre til individuelle forskjellar i størrelse på hud bitane tatt til RNA- sekvensering, dette har vanlegvis liten betydning for påverknaden av resultat. Kontaminasjon av andre vev kan førekomme i prøvane, der i hovudgrunn muskelvev som kan bli funne i prøvane. Hudprøvane tekne frå rett under lusa kan innehalde frammed RNA til eksempel frå lakselus, dette kan også vere tilfelle i hudprøvar som vert tekne hos infisert fisk ved upåverka området ettersom lakselusa er i det mobile preadulte stadiet, kor dei kan bevege seg rundt på fisken. To hudprøvar har blitt tatt ut av resultat, dei to prøvane samstemte meir med lakselus-referansen enn dei gjorde med lakse-referansen (ML10 og ML11). Dette indikere at prøvane hadde meir RNA som stammar frå lakselus enn frå sjøaure, årsaka til dette er nokså usikker. Hudprøvane innehalde metagenomiske sekvensar, som er sekvensar av bakterie og virus RNA. Bakterie og virus førekomme på fiskens hud og slimlag dermed er det naturleg å finne desse sekvensane. RNA ekstraksjon, DNase behandling, cDNA og RNA-sekvensering kan føre til degradering av RNA under dei ulike prosessane.

Kartlegginga av mRNA sekvensar vert gjort med laksereferanse og lakselusreferanse. Laks har vert hyppig studert og transkriptomet er mykje betre kartlagt enn hos brunaure. RNA i prøvane i gjennomsnitt samsvare 39% (st. avvik =13,2) mot lakselusreferansen. Dette talet er nokså lågt og mange sekvensar har ikkje blitt kartlagt. Dette skal ikkje ha påverka ekspresjon resultatata ettersom sekvensane til desse samsvarte med referansen.

4.2 Infeksjon med lakselus

Lus infeksjonen i dei fire infeksjonskara hadde ein infeksjonssuksess på 29% der gjennomsnittleg antall lus per fisk var 20. Det vert observert låg variasjon i antall lus per fisk mellom kara.

Variasjonen mellom antall lus på hoer og hannar vert berre observert ved U3 der hannar hadde signifikant høgare antall lus (chalimus) enn hoer. Variasjonen ved utakk U3 jamna seg ut ved resterande uttak. Denne variasjonen i U3 kan indikere at hannar kan ha hatt redusert emne til å kvitte seg med lus i chalimus stadiet. Variasjonen i smittepress mellom hannar og hoer var ikkje signifikant ved U4 og U5 når hudprøvar blei tatt til RNA-sekvensering, dermed har denne faktoren mest truleg ikkje påverka genekspressjon resultat.

Den gjennomsnittlege lus intensiteten hos fisk tatt hudprøve i U4 (sjøvatn) var på 0,18 lus per gram fisk, og i U5 (ferskvatn) var den på 0,04 lus per gram fisk. Nedgang i lakselus intensiteten i ferskvatn var som forventa ettersom lakselus dør eller forlate fisken i ferskvatn. Studiet gjort på Atlantisk laks har også vist at lakselus intensiteten ikkje påverkar ekspresjonen av immunologiske genar (Akseptert Manuskript, Ugelvik and Dalvin 2022). Dermed skal ikkje eventuelle skeivfordelingar av lakselus hos sjøaure ha noko å sei for genuttrykket.

4.3 Utrykk av immunologiske gen

Ekspresjon av immunologiske gen gjer eit innblikk i helsetilstanden til organismen og blir brukt til kartlegging av immunrespons. Utvalet av immunologiske gen var basert på tidlegare studiar der ein ser respons i huda hos andre artar (f. eks. Skugor *et al.*, 2008a; Braden *et al.*, 2012; Braden, Monaghan and Fast, 2020; Dalvin *et al.*, 2020). Kraftig og tidleg transkripsjon av cytokiner, akutfaseprotein og matrise metalloproteinaser er knytt til resistens, ettersom dette blir observert hos dei resistente artene (Braden, Monaghan and Fast, 2020). Desse er også knytt mot det medfødde responsen. Immunoglobulin er viktig i den adaptive responsen, ettersom den adaptive responsen har «minne» er den effektiv i nedkjemping av tilbakekommande infeksjonar.

4.6.1 Proinflammatoriske gen

I dette studiet har det blitt sett på ekspresjon i hud av ulike relevante immunologiske gen hos smitta sjøaureindivid både ved festepunktet til lakselusa (ML) og ved frisk upåverka hud-området (UL). Transkripsjonen av gena blei samanlikna mellom hudprøvane ML og UL, desse blei også samanlikna med transkript frå hud til kontroll fisk. Kontroll fisk var friske individ som ikkje har vore utsett for lakselus infeksjon eller andre sjukdommar/parasittar. Proinflammatoriske gen fremmar inflammasjon og proinflammatoriske cytokiner setter i gang migrasjon av fagocytterande celler til infeksjonstaden (Secombes *et al.*, 2001; Lindenstrøm, Buchmann and Secombes, 2003; Sigh, Lindenstrom and Buchmann, 2004). Resultata viser trend der både *tnfa*, *il1beta* og *il8* blir oppregulert ved ML, mens UL ikkje viser trend til oppregulering. *Il1b* var signifikant oppregulert ved infestasjonsstaden. Hos pattedyr kan ein finne *Il1b* i epidermis slik at ved ein skade oppstår det ein rask induksjon av inflammasjonsprosessen. Dette er til fordel ettersom dette skjer raskt og krev ikkje gen aktivering og proteinsyntese (Lee *et al.*, 1997). Den pro-inflammatoriske *Il1b* hos pattedyr er funne i inflammasomet (multiprotein oligomer i cytosol, del av det medfødde immunforsvar), denne kan bli rask aktivert ved spalting av PAMP eller DAMP (Mariathasan and Monack, 2007). Same mekanismar kan gjelde for teleoster, der frigjeringa av *Il1b* frå reservoarceller i epidermis kan indusere vidare inflammatorisk respons (Braden *et al.*, 2012).

Braden (2012) fant *il1beta* hos laks til å bli også oppregulert ved mekaniske skade som ikkje har blitt påverka av patogen. Denne oppregulering av *il1b* ved mekanisk skade har også blitt observert i studiar av karpe (Gonzalez *et al.*, 2007) og i regnbogeaure (Ingerslev, Lunder and Nielsen, 2010). Oppregulasjon av *il1b* kan forklart av både av infestasjon av lakselus og mekanisk skade, dermed er det uklart kor stor del av oppregulasjon er spesifikt knytt til lusinfestasjon. I eit anna studiet blei oppregulasjon av *tnfa* og *il1b* blitt knytt til seinare studiar av lus der oppregulasjon ikkje var tilstedet ved kopepoditt infestasjon (Tadiso *et al.*, 2011). Under infestasjon med kopepodittar er det lite mekanisk skade som er oftast begrensa til epidermis (Jones, Sommerville and Bron, 1990). Oppregulasjon av *il1b* har blitt funne hos resistente artene sølvlaks og rødlaks smitta med adulte lakselus (Braden *et al.*, 2015), tidleg og kraftig ekspresjon av *il1b* kan vere knytt til resistens.

Il6 som er ein proinflammatorisk cytokin, viste svært lite forskjellar i ekspresjonen, og hadde eit generell låg ekspresjon. Liknande mønster har også blitt observert hos den resistente pukkellaksen (Braden *et al.*, 2012). Oppregulasjon av *il6* har blitt sett hos dei mottakelege artene Atlantisk laks og ketalaks (Braden *et al.*, 2012). *Il8* er kjemokin som blir produsert av makrofager og epitelceller, denne

har ein rolle i inflammatorisk aktivitet ved å tiltrekke neutrofiler til infeksjonstaden (Murphy and Weaver, 2017). Oppregulasjon i festepunktet til lusa indikere tilstrøyming av neutrofiler, men denne oppregulasjon var ikkje signifikant.

4.6.2 Anti inflammatoriske cytokiner

Il10 er eit regulatorisk cytokin som nedregulerer inflammatoriske mediatorer aktivert av Il1b og Tnfa (Dinarello, 2000). Il10 sitt emne til å nedregulere inflammatorisk aktivitet er viktig i opprett halding av balansen ved ein inflammasjon. Il10 er produsert av makrofager samt også t- og b- celler. Den har ein undertrykkande effekt på makrofager. Sida den er antiinflammatorisk kan bidra til minske av skade påført av inflammasjon (Murphy and Weaver, 2017). Dermed kan det bli forventa at ein oppregulasjon av *il1b* og *tnfa* vil samtidig føre til oppregulasjon av *il10* (Braden *et al.*, 2012). I dette studiet var ekspresjonen av *il10* låg. Mangel på antiinflammatorisk aktivitet ved luseinfeksjon kan ha negative effektar ved ein vedvarande infeksjon. Låg uttrykk av *il10* kan indikere mangel på antiinflammatoriske responsar på lakselus. Brandon *et al.* (2015) fant oppregulasjon av *il10* hos den resistente sølvlaksen, men ikkje hos den Atlantiske laksen. Dette kan indikere at *il10* har ein rolle i resistens mot lakselus.

Il4/il13a oppregulasjon i ferskvatn i ML er høgare enn i sjøvatn. I ferskvatn har antall lus per fisk blitt kraftig redusert, samtidig har eventuell immunmodulering grunna lakselus blir antatt å vere redusert også. Dette kan forklare oppregulasjon av ML i ferskvatn. *Il4/13a* er ofte oppregulert i huden hos teleoster under parasittiske infeksjonar (Chettri *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2016). Hos teleoster finn ein *Il4/13a* og *Il4/13b* som er evolusjonært i slekt med pattedyr sitt *Il4* og *Il13* (Ohtani *et al.*, 2008). Hos regnbogeaure har *Il4/il13a* vist å fremme b-celle proliferasjon og igm sekresjon, *Il4/il13a* spelar ein viktig rolle i adaptiv immunitet og th2 responsar (Wang *et al.*, 2016). *Il4/13a* blir linka til aktiviteten til Gata3, sida denne ikkje var oppregulert kan det vere sannsynleg at *Il4/13a* kjem frå alternative kjelder. Hos pattedyr kan andre typar celler produsere *Il4* og *Il13*, desse er blant anna NKT celler, eosinofiler, basofiler og mast celler (Yoshimoto, 2018, Piehler *et al.*, 2011). *Tgfb* regulerer immunologiske responsar, celle proliferasjon, remodelering og vevreparasjon (Skugor *et al.*, 2008; Yang *et al.*, 2012). Utrykket til *tgfb* viste ingen signifikante resultat. Auka celle proliferasjon blir knytt til resistens for lakselus, manglande uttrykk på *tgfb* indikere dermed også mangel på celle proliferasjon hos sjøaure, noko som samsvarer med sjøaure sitt manglande emne til å kvitte seg med lakselus.

4.6.3 Transkripsjonsfaktorer

Transkripsjonsfaktoren Gata3 hos pattedyr ein viktig regulator i th2 responsar. Denne stimulerer produksjonen av Il4 og Il13 (Ansel *et al.*, 2006). Teleost Il4/il13a fremmer også sekresjon av Igm frå B-celler (Murphy and Weaver, 2017). Dermed spelar ein viktig rolle den adaptive responsen på infeksjon. Resultata frå dette studiet viser ein nedregulasjon av *gata3* i ML og UL i forhold til kontroll (ikkje signifikant). Det blei funne signifikant nedregulasjon av *gata3* i ML i FV i forhold til kontroll. I uttrykket til *il4/13a* var det observert ein oppregulasjon i ML, dette indikerer alternative veier for ekspresjonen av *il4/13a* uavhengige av ekspresjonen av *gata3*.

Ccaatb er ein viktig transkripsjonsfaktor for akutfase respons, den er også ein viktig faktor i produksjon av proinflammatoriske cytokiner Il1b, Il6 og Tnfa (Nerlov, 2007; Skugor *et al.*, 2008b; Wang *et al.*, 2019). I dette studiet blei det observert ein signifikant oppregulasjon av *ccaatb* i ML i forhold til UL og kontroll, i både SV og FV. Denne oppregulasjonen samsvarer med oppregulasjon av *il1b* og *tnfa* i ML. Oppregulasjon av *ccaatb*, samt *il1b* og *tnfa* indikerer aktivitet av det medfødde immunforsvaret og proinflammatorisk miljø i ML.

4.6.4 Akutfaseprotein

Akutfase respons aktiverast ved vevsskader, infeksjon og inflammasjon. Akutfaseprotein hos teleoster inkluderer serum amyloid-A (Saa) som kan raskt auke berre nokre timar etter at skaden eller infeksjon finne stad (Jensen *et al.*, 1997; Bayne and Gerwick, 2001). Akutfase respons stimulerast av proinflammatoriske cytokiner, som blir utskilt av aktiverte monocytter og makrofager som bindar seg til passande reseptorar og fører til tranlokasjon og aktivering av blant anna *ccaatb* (Poli, 1998). Tilstrøyming av neutrofiler til infeksjonstaden har vert vist til å vere ein viktig respons i motverking av lakselus hos resistente arter (Johnson and Albright, 1992). Il8 og Saa kan ha påverknad på infiltrasjon av neutrofiler til infeksjonstaden. Det blir foreslått at denne mekanismen liknar pattedyr sitt emne til å syntetisere akutfaseprotein utanfor levra, og som induserer lokal tilstrøyming av inflammatoriske celler (Cray, Zaias and Altman, 2009). Hos den resistente sølvlaksen har eit tidleg og kraftig ekspresjon av *saa* blitt vist (Braden, Koop and Jones, 2015), denne har blitt foreslått til å kunne knytast mot resistens. Saa er ein generell markør for inflammasjon og har vert oppregulert i andre studiar på regnbogeaure som respons på virus, parasitt og bakterielle infeksjonar (Jørgensen *et al.*, 2008). I denne studien er ekspresjonen av *saa* ikkje signifikant oppregulert, men viser trend til

oppregulasjon ved festepunktet både i SV og FV. Ekspresjonen av *saa* i festepunktet til lusa i dette studiet er låg og kan indikere ein eventuell immunologisk undertrykking forårsaka av utskilte stoffar frå lakselus.

Cath2 er uttrykt i hud der den er mest truleg produserast av epidermale celler, og har funksjon som antimikrobiell peptid (Rakers *et al.*, 2013). Utrykket til *cath2* var signifikant auka i ML både i SV og FV i forhold til kontrollen og UL. Denne viser trend til å vere meir uttrykt i SV enn i FV, men denne forskjellen er ikkje signifikant. Lågare ekspresjonen til *cath2* i FV kan forklarast av svekkelsen av lakselusa i ferskvatn. *Il6* hos regnbogeare har blitt vist til å inducere ekspresjonen av *cath2* (Costa *et al.*, 2011). I dette studiet har sjøauren signifikant oppregulering av *cath2* ved festepunktet til lusa, noko som ikkje samsvarer med låg ekspresjon av *il6*. Dette kan vise eit alternativ aktiveringsveg av *cath2* som er uavhengig av *il6* hos sjøaure. *Cath2* har også blitt foreslått til å fungere som trigger for kopepoditter hos atlantisk laks, der den signaliserer for kopepoditter ein eigna vert (Núñez-Acuña *et al.*, 2018). Derfor kan høg ekspresjon av *cath2* genet vere med på å oppretthalde og inducere infestasjon med lakselus.

4.6.5 Matrise metalloproteinaser

Matrise metalloproteinaser (Mmp) remodellerer og bryter ned collagen og fjernar ekstracellulære matrise (ECM) under infeksjon av patogen (Xue, Le and Jackson, 2006). Mmp finnast i frisk vev og blir aktivert av pro-inflammatoriske cytokiner ved ein skade eller infeksjon. *Mmp9* og *mmp13* er signifikant oppregulert i dette studiet i ML både i FV og SV. Både *mmp13* og *mmp3* viser ein svak trend i reduksjon i oppregulering frå SV til FV. Lågare uttrykk av *mmp* i FV kan skuldast redusert lakselus aktivitet på vertens hud. Andre studiar av Atlantisk laks infisert med lakselus har også funne ein oppregulasjon av *mmp* (Skugor *et al.*, 2008b; Tadiso *et al.*, 2011). Pukkellaks som er ein resistent art viser svært høge verdiar av *mmp13* ved festepunktet til lusa (Braden *et al.*, 2012), men *mmp13* blei også oppregulert ved mekanisk skade i huda i både resistente og ikkje resistente arter (pukkellaks, ketalaks og Atlantisk laks). Høge verdiar av *mmp* kan indikere ei forsterka emne til å remodellere vev under lusinfestasjon. Atlantisk laks som bli utsett for vedvarande lakselus infestasjon har redusert celle proliferasjon samtidig som dei har høg vev remodellering aktivitet (Skugor *et al.*, 2008). Høg ekspresjon av *mmp* kan bli knytt til resistens, men ved manglande celle proliferasjon kan forhøga verdiar av Mmp føre til kroniske sår (Xue, Le and Jackson, 2006). Sjøaure blir sett på som ein mottakeleg art for lakselus og viser manglande emne til å kvitte seg med parasitten. Derfor kan sjøaure lik Atlantiske laksen ha redusert celle proliferasjon, men fortsett høge ekspresjon av *mmp*.

4.6.6 Immunoglobulin

Immunoglobulin m er den mest talrike immunoglobulin klassen og blir produsert av b-celler. Immunoglobulin er spesielt viktig i aktivering av komplement systemet, men kan også opsonisere og nøytralisere patogen (Mashoof and Criscitiello, 2016). I dette studiet var *ighm* ekspresjon låg og ingen signifikante forskjellar har blitt observert mellom dei 6 gruppene. Den uforandra ekspresjonen av *ighm* indikere samtidig uforandra nivå av b-celler både i ML og generelt hos infisert fisk. B-celler er viktige komponent i det adaptive immunforsvaret, uforandra ekspresjon av *ighm* vil dermed indikere mangel på adaptiv respons på lakslusinfeksjon.

4.6.7 T-celle overflate molekyl *cd8 alfa* og *cd4*

Cd4 og Cd8a er overflate molekyl som er funne hos t-celler (Berger, 2000). Utrykket av *cd4* vise ingen signifikante forskjellar, ein svak trend kan bli observert ved ei svak auke i utrykk i FV.

Immunmodulering av verten sitt immunforsvar har lenge blitt foreslått som grunnen for vedvarande lusinfestasjon. Lakselus har ikkje toleranse for FV, dermed vil ei auke i utrykk av *cd4* kunne vere indikasjon på immunmodulering og at denne minka ved ugunstige forhold for lusa. *Cd8a* var nedregulert i UL i forhold til kontrollen i FV. Trenden i ekspresjonen av *cd8a* er nedregulasjon i ML og UL i forhold til kontroll. Immunmodulasjon forårsaka av lakselus kan vere forklaringa til denne trenden, men ML hadde høgare verdiar enn UL, eventuell effekt av lakselus på nedregulasjon av *cd8a* er lågare ved infeksjonstaden. Låg ekspresjon av *cd4* og *cd8a* indikere låg førekomst av t-celler. T-celler er viktige komponentar av det adaptive immunforsvaret, mangel på signifikant oppregulasjon av *cd4* og *cd8a* indikere mangel på adaptiv respons.

4.6.8. MHC 2

Mhc reseptorar kople det medfødde og adaptive immunforsvaret saman. Dette skjer ved at reseptorane lar antigenpresentrande celler samhandlar med t-celler for å sette i gang immunrespons (Klein and Sato, 2000). Høg ekspresjon av *mhc2* ved lus infeksjon kan indikere tilstedeværelse av Mhc2 presenterande celler som makrofager, som strøymer til infeksjonstaden og spelar mest sannsynleg ei rolle i inflammatoriske prosessar. I dette forsøket hadde *mhc2* signifikant nedregulasjon i ML i FV i forhold til kontrollen, trenden viser også generelt låg ekspresjon av *mhc2* i ML både i FV og SV. Nedregulasjon av *mhc2* i ML i dette studiet kan indikere undertrykking av immunforsvaret forårsaka

av lakselus hos sjøaure. Ein nedregulasjon av *mhc2* har blitt observert i Atlantisk laks infisert med lakselus (Braden *et al.*, 2012). Genetisk variasjon av Mhc er blitt assosiert med resistens mot patogen (Dionne *et al.*, 2009). Hos den resistente pukkellaksen blei ein oppregulasjon av *mhc2* i festepunktet til lakselus registrert (Braden *et al.*, 2012), *mhc2* kan dermed spele ein rolle i resistens for lakselus.

4.7 Immunrespons

Signifikante resultat i dette studiet viser immunologisk respons i hud hos sjøaure som er begrensa til festepunktet til preadulte lakselus. Gen involvert i det medfødde immunforsvaret inkluderer *mmp13*, *mmp9*, *il1b*, *tnfa*, *il8*, *il10*, *il6*, *cath2*, *saa* og *ccatb*. Utrykket til alle desse genane viste same trend, med unntak av *il6* og *il10*. *il10* og *il6* hadde svært låg ekspresjon, grunna denne låge ekspresjonen er ikkje det mogleg å observere noko tydeleg trend. Andre studiar gjort på atlantisk laks og regnbogaure (Braden *et al.*, 2012; Dalvin *et al.*, 2020) fant oppregulasjon av *il6* i festepunktet til lakselusa, denne oppregulasjonen blei funne ved qPCR metoden. Dette kan tyde på at oppregulasjon av *il6* er tilstades, men sida RNA-sekvensering tar for seg alle transkript i gitt prøve vil antallet i normaliseringa av data vere for låg til å bli detektert i forhold til andre transkript. Resten av uttrykket til gen involvert i det medfødde forsvaret viser same trend, der ein ser oppregulasjon i både sjøvatn og simulert tilbakevandring i ferskvatn ved festepunktet til lusa. Forskjellen mellom uttrykket av desse i sjøvatn og ferskvatn hadde ingen signifikante forskjellar, heller ingen klar trend har blitt observert. Dette indikere at medfødd respons ikkje blir undertrykt av utskilte stoff frå preadulte lakselus.

Når det gjelder uttrykket av gen knytt den adaptive responsen har den vert nokså ulik frå uttrykket til gena knytt den medfødde responsen. Gen som spelar ei rolle i den adaptive responsen i dette studiet inkludere *mhc2*, *cd4*, *cd8a*, *il4/13a* *tgfb*, *ighm* og *gata3*. Desse viser få signifikante forskjellar mellom alle 6 grupper, men desse viser også ein trend i uttrykk i huda ved festepunktet til lakselusa. Trenden viser ein oppregulasjon av desse genane i ferskvatn i forhold til sjøvatn (ikkje signifikant). Ettersom oppregulasjon skjer i ferskvatn når lakselus blir svekka og eventuell undertrykking av immunrespons minskar, kan dette tyde på immunmodulering av adaptive reposnar hos sjøaure. Men dette er ein svak trend der ingen av forskjellane ga signifikante resultat. I tillegg følger UL same trend, men igjen ingen signifikante forskjellar vert funne. Eventuell undertrykking av adaptive responsar forårsaka av lakselus må vidare undersøkast for å kunne konkludere med dette.

Utrykket av immungenar knytt medfødde immunforsvaret er generelt kraftigare (fleire reads), enn det adaptive uttrykket. Dette indikere at det er primært det medfødde immunforsvaret som blir aktivert ved ein lakselus infeksjon. Resultata viser også at responsen av det medfødde immunforsvaret er begrensa til festepunktet til lakselusa.

Det vert ikkje observert noko signifikante forskjellar i ekspresjonen av immunologiske gen mellom sjøvatn og ferskvatn i nokon av gruppene. Dette kan indikere at lakselus ikkje har immunmodulering emne på sjøaure. Forventinga til immunmodulering forårsaka av lakselus var at den skulle minske i ferskvatn, dermed kunne det bli forventa ein kraftigare oppregulasjon av immunologiske gen. I tillegg har studiet av Ugelvik (Akseptert Manuskript, Ugelvik and Dalvin, 2022) vist at infeksjonsintensiteten har ingen påverking på ekspresjonen til immunologiske gen. Der igjen ein kan forvente nedregulering av immunologiske gen som følgje av større antall lus og dermed større konsentrasjon av utskilte immunmodulerande substansar. I dette studiet har det blitt sett på transkripsjon til utvalde immunologiske gen, der prøvane i sjøvatn blei tatt 28 dagar etter lakselus infeksjon (07.06.21), same dagen blei fisken satt i ferskvatn for å simulere tidleg tilbakevandring hos sjøaure. Etter to dagar i ferskvatn (09.07.21) blei det igjen tatt prøve. Sida sjøaure var berre to dagar i ferskvatn, kan det forsett vere immunmodulerande substansar i huda til fisken. Samt blei det observert lakselus på fisken etter to daga i ferskvatn, men det blei også observert signifikant tap av lus (Appendix E).

5. Konklusjon

Infeksjon med lakselus har påverka genuttrykket til immunologiske gen i huden til sjøaure. Signifikante resultat viser særleg ein oppregulasjon av proinflammatoriske gen, samt også oppregulasjon av matrise metalloproteinaser som er knytt mot vev reperasjon. Resultata viser også at uttrykke til gen knytt til medfødde immunforsvaret er generelt oppregulert med nokre unntak. Utrykket til gen knytt adaptiv respons hadde generelt uforandra uttrykk. Forandringar i uttrykk som ga signifikante resultat var hovudsakeleg under festepunktet til lusa i forhold til kontroll og upåverka område. Dette indikere at lakselus gjer ein lokal immunrespons begrensa til festepunktet, ettersom nesten ingen (med unntak av *cd8a*) signifikante forskjellar vert detektert i ekspresjonen til utvalde immunologiske gen i upåverka hudområde hos smitta sjøaure og kontroll. Det var heller ingen signifikante forskjellar i ekspresjonen av utvalde gen mellom sjøvatn og ferskvatn. Det uforandra genuttrykket kan indikere at lakselus ikkje har immunmodulerande eigenskapar på sjøaure.

Lakselus infeksjon hos brunaure truar ikkje overlevinga til arten, men truar den anadrome bestandelen av arten. Sjøaure viser som laks begrensa immunologisk respons på parasitten og klarer ikkje å kvitte seg med lakselus i sjøvatn. Konsekvensane av høg tal på lus i kystområder og sjøaure si manglande evne til å bli kvitt parasitten vil føre til prematur tilbakevandring i ferskvatn. Seleksjon mot stasjonerte individ i staden for migrasjon, kan føre i verste fall til tap av den anadrome delen av bestanden. Fisken foreta sjøvandringar for å finne føde og dermed vokse hurtigare, hoer oftare enn hannar velje denne strategien. På populasjonsnivå vil auke av stasjonære individ føre til reduksjon i vekst og størrelse, samt kan dette medføre til langsamare kjønnsmodning.

Kjelder

- Aaen, S. M. *et al.* (2015) 'Drug resistance in sea lice: a threat to salmonid aquaculture', *Trends in Parasitology*, 31(2), pp. 72–81. doi: 10.1016/J.PT.2014.12.006.
- Aarestrup, K., Nielsen, C. and Koed, A. (2002) 'Net ground speed of downstream migrating radio-tagged Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) and brown trout (*Salmo trutta* L.) smolts in relation to environmental factors', *Hydrobiologia*, 483, pp. 95–102. doi: 10.1023/A:1021306907338.
- Abbas, A. K., Litchman, A. H. and Pillai, S. (2020) *Basic Immunology: Functions and Disorders of the Immune System, 6e: Sae-E-Book - Abul K Abbas, Mbbs, Andrew H Lichtman, MD PhD, Shiv Pillai, Mbbs PhD - Google Bøker*. 6th edn. Available at: [https://books.google.no/books?hl=no&lr=&id=LGzWDwAAQBAJ&oi=fnd&pg=PP1&dq=abbas+A,+Lichtman+A+\(2007\).+Basic+Immunology+Functions+and+Disorders+of+the+Immune+System+2nd+edition.+p11-160.+Philadelphia,+US:+Saunders+Elsevier.&ots=fRQTPbspwj&sig=miy0ZTpS1TPB5YP34ib1nhpSZ2k&redir_esc=y#v=onepage&q&f=false](https://books.google.no/books?hl=no&lr=&id=LGzWDwAAQBAJ&oi=fnd&pg=PP1&dq=abbas+A,+Lichtman+A+(2007).+Basic+Immunology+Functions+and+Disorders+of+the+Immune+System+2nd+edition.+p11-160.+Philadelphia,+US:+Saunders+Elsevier.&ots=fRQTPbspwj&sig=miy0ZTpS1TPB5YP34ib1nhpSZ2k&redir_esc=y#v=onepage&q&f=false) (Accessed: 29 April 2022).
- Ansel, K. M. *et al.* (2006) 'Regulation of Th2 Differentiation and Il4 Locus Accessibility'. doi: 10.1146/annurev.immunol.23.021704.115821.
- Barrett, L. T. *et al.* (2020) 'Prevention not cure: a review of methods to avoid sea lice infestations in salmon aquaculture', *Reviews in Aquaculture*, 12(4), pp. 2527–2543. doi: 10.1111/RAQ.12456.
- Bayne, C. J. and Gerwick, L. (2001) 'The acute phase response and innate immunity of fish', *Developmental & Comparative Immunology*, 25(8–9), pp. 725–743. doi: 10.1016/S0145-305X(01)00033-7.
- Bennett, A. *et al.* (2018) *Contribution of Fisheries to Food and Nutrition Security Current Knowledge, Policy, and Research Environmental Defense Fund Citation Acknowledgments*. Available at: https://nicholasinstitute.duke.edu/sites/default/files/publications/contribution_of_fisheries_to_food_and_nutrition_security.pdf (Accessed: 20 May 2022).
- Berger, A. (2000) 'Science commentary: Th1 and Th2 responses: what are they?', *BMJ : British Medical Journal*, 321(7258), p. 424. doi: 10.1136/BMJ.321.7258.424.
- Bjørngen, H. and Koppang, E. O. (2021) 'Anatomy of teleost fish immune structures and organs', *Immunogenetics*, 73(1), pp. 53–63. doi: 10.1007/S00251-020-01196-0/FIGURES/7.
- Bjørn, P. and Finstad, B. (1997) 'The physiological effects of salmon lice infection on sea trout post smolts', *A Journal of Life Sciences in Holarctic Waters*. Available at: https://gupea.ub.gu.se/bitstream/handle/2077/48948/gupea_2077_48948_1.pdf?sequence=1#page=63 (Accessed: 28 May 2022).
- Boxaspen, K. and Næss, T. (2000) 'Development of eggs and the planktonic stages of salmon lice (*Lepeophtheirus salmonis*) at low temperatures', *Contributions to Zoology*, 69(1–2), pp. 51–55. doi: 10.1163/18759866-0690102005.
- Braden, L. M. *et al.* (2012) 'Comparative defense-associated responses in salmon skin elicited by the ectoparasite *Lepeophtheirus salmonis*', *Comparative Biochemistry and Physiology Part D: Genomics and Proteomics*, 7(2), pp. 100–109. doi: 10.1016/J.CBD.2011.12.002.
- Braden, L. M. *et al.* (2015) 'Differential modulation of resistance biomarkers in skin of juvenile and mature pink salmon, *Oncorhynchus gorboscha* by the salmon louse, *Lepeophtheirus salmonis*', *Fish & Shellfish Immunology*, 47(1), pp. 7–14. doi: 10.1016/J.FSI.2015.08.008.
- Braden, L. M., Koop, B. F. and Jones, S. R. M. (2015) 'Signatures of resistance to *Lepeophtheirus salmonis* include a TH2-type response at the louse-salmon interface', *Developmental & Comparative*

Immunology, 48(1), pp. 178–191. doi: 10.1016/J.DCI.2014.09.015.

Braden, L. M., Monaghan, S. J. and Fast, M. D. (2020) 'Salmon immunological defence and interplay with the modulatory capabilities of its ectoparasite *Lepeophtheirus salmonis*', *Parasite Immunology*, 42(8). doi: 10.1111/PIM.12731.

Brandal, P. O., Egidius, E. and Romslo, I. (1976) 'HOST BLOOD: A MAJOR FOOD COMPONENT FOR THE PARASITIC COPEPOD LEPEOPHTHEIRUS SALMONIS KROEYERI, 1838 (CRUSTACEA: CALIGIDAE).', *HOST BLOOD: A MAJOR FOOD COMPONENT FOR THE PARASITIC COPEPOD LEPEOPHTHEIRUS SALMONIS KROEYERI, 1838 (CRUSTACEA: CALIGIDAE)*.

Bricknell, I. R. *et al.* (2006) 'Effect of environmental salinity on sea lice *Lepeophtheirus salmonis* settlement success', *Diseases of Aquatic Organisms*, 71(3), pp. 201–212. doi: 10.3354/DAO071201.

Brinchmann, M. F. (2016) 'Immune relevant molecules identified in the skin mucus of fish using-omics technologies', *Mol. BioSyst*, 12, p. 2056. doi: 10.1039/c5mb00890e.

Bron, J. E. *et al.* (1991) *The settlement and attachment of early stages of the salmon louse, Lepeophtheirus salmonis (Copepoda: Caligidae) on the salmon host, Salmo salar, J. Zool.*

Buchmann, K. and Bresciani, J. (1997) 'Microenvironment of *Gyrodactylus derjavini* on rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*: association between mucous cell density in skin and site selection', *Parasitology Research* 1997 84:1, 84(1), pp. 17–24. doi: 10.1007/S004360050350.

Caroll, M. C. and Prodeus, A. P. (1998) 'Linkages of innate and adaptive immunity', *Current Opinion in Immunology*, 10(1), pp. 36–40. doi: 10.1016/S0952-7915(98)80028-9.

Chettri, J. K. *et al.* (2014) 'Epidermal response of rainbow trout to *Ichthyobodo necator*: immunohistochemical and gene expression studies indicate a Th1-/Th2-like switch', *Journal of Fish Diseases*, 37(9), pp. 771–783. doi: 10.1111/JFD.12169.

Costa, M. M. *et al.* (2011) 'Bioactivity studies of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) interleukin-6: Effects on macrophage growth and antimicrobial peptide gene expression', *Molecular Immunology*, 48(15–16), pp. 1903–1916. doi: 10.1016/J.MOLIMM.2011.05.027.

Costello, M. J. (2009) 'How sea lice from salmon farms may cause wild salmonid declines in Europe and North America and be a threat to fishes elsewhere', *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 276(1672), pp. 3385–3394. doi: 10.1098/RSPB.2009.0771.

Cray, C., Zaias, J. and Altman, N. H. (2009) 'Acute Phase Response in Animals: A Review', *Comparative Medicine*, 59(6). Available at: <https://www.ingentaconnect.com/content/aalas/cm/2009/00000059/00000006/art00003#> (Accessed: 29 May 2022).

Dalvin, S. *et al.* (2020) 'Rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* skin responses to salmon louse *Lepeophtheirus salmonis*: From copepodid to adult stage', *Fish & Shellfish Immunology*, 103, pp. 200–210. doi: 10.1016/J.FSI.2020.05.014.

Dalvin, S. *et al.* (2021) 'Roles of three putative salmon louse (*Lepeophtheirus salmonis*) prostaglandin E2 synthases in physiology and host–parasite interactions', *Parasites and Vectors*, 14(1), pp. 1–17. doi: 10.1186/S13071-021-04690-W/FIGURES/7.

Dinareello, C. A. (2000) 'Proinflammatory Cytokines', *Chest*, 118(2), pp. 503–508. doi: 10.1378/CHEST.118.2.503.

Dionne, M. *et al.* (2009) 'MHC standing genetic variation and pathogen resistance in wild Atlantic salmon', *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 364(1523), pp. 1555–1565. doi: 10.1098/RSTB.2009.0011.

Djurdjevič, I. *et al.* (2019) 'Comparative transcriptome analysis of trout skin pigment cells', *BMC*

- Genomics*, 20(1), pp. 1–15. doi: 10.1186/S12864-019-5714-1/FIGURES/6.
- Egeblad, M. and Werb, Z. (2002) 'Regulation of MMP activity NEW FUNCTIONS FOR THE MATRIX METALLOPROTEINASES IN CANCER PROGRESSION', *Nature Reviews Cancer*, (2). doi: 10.1038/nrc745.
- Eichner, C. *et al.* (2015) 'Molecular characterization and knock-down of salmon louse (*Lepeophtheirus salmonis*) prostaglandin E synthase', *Experimental Parasitology*, 159, pp. 79–93. doi: 10.1016/J.EXPPARA.2015.09.001.
- Ellis, A. E. (2001) 'Innate host defense mechanisms of fish against viruses and bacteria', *Developmental & Comparative Immunology*, 25(8–9), pp. 827–839. doi: 10.1016/S0145-305X(01)00038-6.
- Fast, M. D. *et al.* (2004) 'Lepeophtheirus salmonis: characterization of prostaglandin E 2 in secretory products of the salmon louse by RP-HPLC and mass spectrometry'. doi: 10.1016/j.exppara.2004.04.001.
- Fast, M. D. *et al.* (2007) 'Lepeophtheirus salmonis secretory/excretory products and their effects on Atlantic salmon immune gene regulation', *Parasite Immunology*, 29(4), pp. 179–189. doi: 10.1111/J.1365-3024.2007.00932.X.
- Fast, M. D. *et al.* (2011) 'Differential Gene Expression in Atlantic Salmon Infected with *Lepeophtheirus salmonis*', *Changed publisher: Wiley*, 18(2), pp. 116–127. doi: 10.1577/H05-043.1.
- Fearon, D. T. and Locksley, R. M. (1996) 'The instructive role of innate immunity in the acquired immune response', *Science (New York, N.Y.)*, 272(5258), pp. 50–54. doi: 10.1126/SCIENCE.272.5258.50.
- Ferguson, A. (2006) *Genetics of Sea Trout, with Particular Reference to Britain and Ireland, Sea Trout: Biology, Conservation and Management*. Wiley Blackwell. doi: 10.1002/9780470996027.CH12.
- Finstad, B. and Bjørn, P. A. (2011) 'Present Status and Implications of Salmon Lice on Wild Salmonids in Norwegian Coastal Zones', *Salmon Lice: An Integrated Approach to Understanding Parasite Abundance and Distribution*, pp. 279–305. doi: 10.1002/9780470961568.CH9/PDF.
- Fiskehelse Uke 21, 2022 - BarentsWatch* (no date). Available at: <https://www.barentswatch.no/fiskehelse/localities> (Accessed: 28 May 2022).
- Fjellidal, P. G. *et al.* (2019) 'Effects of laboratory salmon louse infection on Arctic char osmoregulation, growth and survival', *Conservation Physiology*, 7(1). doi: 10.1093/CONPHYS/COZ072.
- Fjellidal, P. G. *et al.* (2022) 'Effects of laboratory salmon louse infection on mortality, growth, and sexual maturation in Atlantic salmon', *ICES Journal of Marine Science*. Edited by F. Pernet, 0, pp. 1–9. doi: 10.1093/ICESJMS/FSAC078.
- Fjellidal, P. G., Hansen, T. J. and Karlsen, Ø. (2020) 'Effects of laboratory salmon louse infection on osmoregulation, growth and survival in Atlantic salmon', *Conservation Physiology*, 8(1). doi: 10.1093/CONPHYS/COAA023.
- Forseth, T. and Fiske, P. (2022) *NINA Brage: Vitenskapelig råd for lakseforvaltning 2022. Klassifisering av tilstanden til sjøørret i 1279 vassdrag*. Trondheim. Available at: <https://brage.nina.no/nina-xmlui/handle/11250/2988348> (Accessed: 11 May 2022).
- Gallardi, D. *et al.* (2019) 'Impact of origin (wild vs. farmed) and sea lice (*Lepeophtheirus salmonis*) infestation on expression of immune-relevant genes in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) skin', *Aquaculture*, 499, pp. 306–315. doi: 10.1016/J.AQUACULTURE.2018.09.036.
- Gomez, D., Oriol Sunyer, J. and Salinas, I. (2013) 'The mucosal immune system of fish: the evolution of tolerating commensals while fighting pathogens'. doi: 10.1016/j.fsi.2013.09.032.

- Gonzalez, S. F. *et al.* (2007) 'Real-time gene expression analysis in carp (*Cyprinus carpio* L.) skin: Inflammatory responses to injury mimicking infection with ectoparasites', *Developmental & Comparative Immunology*, 31(3), pp. 244–254. doi: 10.1016/J.DCI.2006.06.010.
- Grimnes, A. and Jakobsen, P. J. (1996) *The physiological effects of salmon lice infection on post-smolt of Atlantic salmon*, *Journal of Fish Biology*.
- Hamre, L. A. *et al.* (2013) 'The Salmon Louse *Lepeophtheirus salmonis* (Copepoda: Caligidae) Life Cycle Has Only Two Chalimus Stages', *PLOS ONE*, 8(9), p. e73539. doi: 10.1371/JOURNAL.PONE.0073539.
- Hamre, L. A. *et al.* (2019) 'Development of the salmon louse *Lepeophtheirus salmonis* parasitic stages in temperatures ranging from 3 to 24°C', *Aquaculture Environment Interactions*, 11, pp. 429–443. doi: 10.3354/AEI00320.
- Hamre, L. A. *et al.* (2021) 'The potential for cleaner fish-driven evolution in the salmon louse *Lepeophtheirus salmonis*: Genetic or environmental control of pigmentation?', *Ecology and Evolution*, 11(12), pp. 7865–7878. doi: 10.1002/ECE3.7618.
- Hamre, L. A., Glover, K. A. and Nilsen, F. (2009) 'Establishment and characterisation of salmon louse (*Lepeophtheirus salmonis* (Krøyer 1837)) laboratory strains', *Parasitology International*, 58(4), pp. 451–460. doi: 10.1016/J.PARINT.2009.08.009.
- Heggberget, T. G. *et al.* (1992) *Smoltifisering hos laksefisk*. Trondheim. Available at: <https://www.nina.no/archive/nina/pppbasepdf/forskningsrapport/031.pdf> (Accessed: 10 September 2020).
- Helgesen, K. O. *et al.* (2022) *The surveillance programme for resistance in salmon lice (Lepeophtheirus salmonis) in Norway 2021*.
- Hewitson, J. P., Grainger, J. R. and Maizels, R. M. (2009) 'Helminth immunoregulation: The role of parasite secreted proteins in modulating host immunity', *Molecular and Biochemical Parasitology*, 167(1), pp. 1–11. doi: 10.1016/J.MOLBIOPARA.2009.04.008.
- Hitzfeld, B. (2005) 'Fish Immune System', *Encyclopedic Reference of Immunotoxicology*, pp. 242–245. doi: 10.1007/3-540-27806-0_574.
- Ho, I. C., Tai, T. S. and Pai, S. Y. (2009) 'GATA3 and the T-cell lineage: Essential functions before and after T-helper-2-cell differentiation', *Nature Reviews Immunology*, 9(2), pp. 125–135. doi: 10.1038/NRI2476.
- Høgåsen, H. R. (1998) *Physiological Changes Associated with the Diadromous Migration of Salmonids - Helga Rachel Høgåsen - Google Bøker*. Canadian Special Publication of Fisheries and Aquatic Sciences. Available at: https://books.google.no/books?hl=no&lr=&id=o2Rs-DFX1mUC&oi=fnd&pg=PR7&dq=Høgåsen,+H.R.+1998.+Physiological+changes+associated+with+the+diadromous+migration+of+salmonid&ots=30oke0lcoG&sig=gQwUtkd49wgrxP7to8ULNTPC08U&redir_esc=y#v=onepage&q=Høgåsen%2C H.R. 1998. Physiological changes associated with the diadromous migration of salmonid&f=false (Accessed: 28 May 2022).
- Holland, M. C. H. and Lambris, J. D. (2002) 'The complement system in teleosts', *Fish & Shellfish Immunology*, 12(5), pp. 399–420. doi: 10.1006/FSIM.2001.0408.
- Ingerslev, H. C., Lunder, T. and Nielsen, M. E. (2010) 'Inflammatory and regenerative responses in salmonids following mechanical tissue damage and natural infection', *Fish & Shellfish Immunology*, 29(3), pp. 440–450. doi: 10.1016/J.FSI.2010.05.002.
- Jensen, L. E. *et al.* (1997) 'Acute phase proteins in salmonids: evolutionary analyses and acute phase response.', *The Journal of Immunology*, 158(1).
- Johnson, S. C. and Albright, L. J. (1992) 'Comparative susceptibility and histopathology of the

response of naive Atlantic, chinook and coho salmon to experimental infection with *Lepeophtheirus salmonis* (Copepoda: Caligidae)', *Diseases of Aquatic Organisms*, 14, pp. 179–193. doi: 10.3354/DAO014179.

Johnson, S. C. and Albright, L. J. (2011) 'The developmental stages of *Lepeophtheirus salmonis* (Krøyer, 1837) (Copepoda: Caligidae)', <https://doi.org/10.1139/z91-138>, 69(4), pp. 929–950. doi: 10.1139/Z91-138.

Jones, M. W., Sommerville, C. and Bron, J. (1990) 'The histopathology associated with the juvenile stages of *Lepeophtheirus salmonis* on the Atlantic salmon, *Salmo salar* L.', *Journal of Fish Diseases*, 13(4), pp. 303–310. doi: 10.1111/J.1365-2761.1990.TB00786.X.

Jones, S. R. M. (2001) 'The occurrence and mechanisms of innate immunity against parasites in fish', *Developmental & Comparative Immunology*, 25(8–9), pp. 841–852. doi: 10.1016/S0145-305X(01)00039-8.

Jones, S. R. M. *et al.* (2007) 'Differential rejection of salmon lice by pink and chum salmon: disease consequences and expression of proinflammatory genes', *Diseases of Aquatic Organisms*, 75(3), pp. 229–238. doi: 10.3354/DAO075229.

Jonsdottir, H. *et al.* (1992) 'The histopathology associated with the pre-adult and adult stages of *Lepeophtheirus salmonis* on the Atlantic salmon, *Salmo salar* L', *Journal of Fish Diseases*, 2, pp. 521–527.

Jonsson, B. & Jonsson, N. (2006). Life-history effects of migratory costs in anadromous brown trout. *J. Fish Biol.* 69, 860-869

Jonsson, B. and Jonsson, N. (2009) 'A review of the likely effects of climate change on anadromous Atlantic salmon *Salmo salar* and brown trout *Salmo trutta*, with particular reference to water temperature and flow', *Journal of Fish Biology*, 75(10), pp. 2381–2447. doi: 10.1111/J.1095-8649.2009.02380.X.

Jonsson, B. and Jonsson, N. (2011) 'Ecology of Atlantic Salmon and Brown Trout', *Ecology of Atlantic Salmon and Brown Trout*. doi: 10.1007/978-94-007-1189-1.

Jonsson, N. and Finstad, B. (1995) 'Sjøørret: økologi, fysiologi og atferd', *NINA fagrapport*.

Jørgensen, L. V. G. *et al.* (2008) 'Immune-relevant genes expressed in rainbow trout following immunisation with a live vaccine against *Ichthyophthirius multifiliis*', *Diseases of Aquatic Organisms*, 80(3), pp. 189–197. doi: 10.3354/DAO01935.

Kapasitetsjustering / trafikklyssystemet 2021 (no date). Available at: <https://www.fiskeridir.no/Akvakultur/Tildeling-og-tillatelser/Kapasitetsjustering-trafikklyssystemet> (Accessed: 28 May 2022).

Karami, A. M. *et al.* (2018) 'Comparative susceptibilities and immune reactions of wild and cultured populations of Caspian trout *Salmo trutta caspius* to VHSV', *Diseases of Aquatic Organisms*, 128(3), pp. 187–201. doi: 10.3354/DAO03231.

Khong, H.-K. *et al.* (2009) 'Prolactin receptor mRNA is upregulated in discus fish (*Symphysodon aequifasciata*) skin during parental phase', *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B*, 153, pp. 18–28. doi: 10.1016/j.cbpb.2009.01.005.

Klein, J. and Sato, A. (2000) 'The HLA System', *Advances In Immunology*, 343(10), pp. 702–9. doi: 10.1056/NEJM200009073431006.

Klemetsen, A. *et al.* (2003) 'Atlantic salmon *Salmo salar* L., brown trout *Salmo trutta* L. and Arctic charr *Salvelinus alpinus* (L.): a review of aspects of their life histories', *Ecology of Freshwater Fish*, 12(1), pp. 1–59. doi: 10.1034/J.1600-0633.2003.00010.X.

- Krasnov, A. *et al.* (2012) 'Gene expression in Atlantic salmon skin in response to infection with the parasitic copepod *Lepeophtheirus salmonis*, cortisol implant, and their combination', *BMC Genomics*, 13(1), pp. 1–15. doi: 10.1186/1471-2164-13-130/TABLES/8.
- Kryvi, H. and Poppe, T. (2016) *Fiskeanatomy*. 1st edn. Bergen.
- Kum, C. and Sekki, S. (2011) 'The Immune System Drugs in Fish: Immune Function, Immunoassay, Drugs', *Recent Advances in Fish Farms*. doi: 10.5772/26869.
- Kurtz, J. (2005) 'Specific memory within innate immune systems', *Trends in Immunology*, 26(4), pp. 186–192. doi: 10.1016/J.IT.2005.02.001.
- Lambris, J. D. and Sahu, A. (2001) 'Structure and biology of complement protein C3, a connecting link between innate and acquired immunity *Immunological Reviews*', *Immunological Reviews*, 180, pp. 35–48.
- Lee, R. T. *et al.* (1997) 'Mechanical deformation promotes secretion of IL-1 alpha and IL-1 receptor antagonist.', *The Journal of Immunology*, 159(10).
- Li, J. *et al.* (2006) 'B lymphocytes from early vertebrates have potent phagocytic and microbicidal abilities'. doi: 10.1038/ni1389.
- Lindenstrøm, T., Buchmann, K. and Secombes, C. J. (2003) 'Gyrodactylus derjavini infection elicits IL-1 β expression in rainbow trout skin', *Fish & Shellfish Immunology*, 15(2), pp. 107–115. doi: 10.1016/S1050-4648(02)00142-0.
- Litman, G. W., Cannon, J. P. and Dishaw, L. J. (2005) 'Reconstructing immune phylogeny: new perspectives', *Nature Reviews Immunology* 2005 5:11, 5(11), pp. 866–879. doi: 10.1038/nri1712.
- Magnadottir, B. (2005) 'Innate immunity of fish (overview)'. doi: 10.1016/j.fsi.2004.09.006.
- Mariathasan, S. and Monack, D. M. (2007) 'Inflammasome adaptors and sensors: intracellular regulators of infection and inflammation', *Nature Reviews Immunology* 2007 7:1, 7(1), pp. 31–40. doi: 10.1038/nri1997.
- Mashoof, S. and Criscitiello, M. F. (2016) 'Fish Immunoglobulins', *Biology* 2016, Vol. 5, Page 45, 5(4), p. 45. doi: 10.3390/BIOLOGY5040045.
- Mayer, G. (2010) *Microbiology and Immunology On-Line Textbook, USC School of Medicine*. Available at: <https://www.microbiologybook.org/ghaffar/innate.htm> (Accessed: 19 April 2022).
- Murphy, K. and Weaver, C. (2017) *Janeway's Immunobiology*. 9th edn. New York: Garland Science. Available at: https://books.google.no/books?hl=no&lr=&id=GmPLCwAAQBAJ&oi=fnd&pg=PP1&dq=Murphy+and+Weaver,+immunobiology+9th+edition&ots=6bue8ap4on&sig=IMI5WrvTUPu0QYIPsJYdHMWAF5M&redir_esc=y#v=onepage&q=Murphy+and+Weaver%2C+immunobiology+9th+edition&f=false (Accessed: 28 May 2022).
- Neefjes, J. *et al.* (2011) 'Towards a systems understanding of MHC class I and MHC class II antigen presentation', *Nature Reviews Immunology* 2011 11:12, 11(12), pp. 823–836. doi: 10.1038/nri3084.
- Nerlov, C. (2007) 'The C/EBP family of transcription factors: a paradigm for interaction between gene expression and proliferation control', *Trends in cell biology*, 17(7), pp. 318–324. doi: 10.1016/j.tcb.2007.07.004.
- Neumann, N. F. *et al.* (2001) *Antimicrobial mechanisms of fish phagocytes and their role in host defense*. Available at: www.elsevier.com/locate/devcompimm.
- NGS vs. qPCR (no date). Available at: <https://www.illumina.com/science/technology/next-generation-sequencing/ngs-vs-qpcr.html> (Accessed: 24 March 2022).
- Nikoskelainen, S. *et al.* (2005) 'Adhesion and ingestion activities of fish phagocytes induced by

- bacterium *Aeromonas salmonicida* can be distinguished and directly measured from highly diluted whole blood of fish', *Developmental and Comparative Immunology*, 29, pp. 525–537. doi: 10.1016/j.dci.2004.10.006.
- Nilsen, F. *et al.* (2019) *Vurdering av kunnskapsgrunnlaget for å implementere lakselus på sjørret som en baerekraftsindikator i «produksjonsområdeforskriften»*. Bergen .
- Núñez-Acuña, G. *et al.* (2018) 'The Atlantic salmon (*Salmo salar*) antimicrobial peptide cathelicidin-2 is a molecular host-associated cue for the salmon louse (*Lepeophtheirus salmonis*)', *Scientific Reports* 2018 8:1, 8(1), pp. 1–11. doi: 10.1038/s41598-018-31885-6.
- Ohtani, M. *et al.* (2008) 'Comprehensive clarification of two paralogous interleukin 4/13 loci in teleost fish', *Immunogenetics*, 60(7), pp. 383–397. doi: 10.1007/S00251-008-0299-X/FIGURES/6.
- Øverland, H. S. *et al.* (2009) 'Phagocytosis by B-cells and neutrophils in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) and Atlantic cod (*Gadus morhua* L.)'. doi: 10.1016/j.fsi.2009.10.021.
- Payan, P., Girard, J. P. and Mayer-Gostan, N. (1984) '2 Branchial Ion Movements in Teleosts: The Roles of Respiratory and Chloride Cells', *Fish Physiology*, 10(PB), pp. 39–63. doi: 10.1016/S1546-5098(08)60181-8.
- Pedersen, M. E. *et al.* (2015) 'Matrix metalloproteinases in fish biology and matrix turnover', *Matrix Biology*, 44–46, pp. 86–93. doi: 10.1016/J.MATBIO.2015.01.009.
- Piehler, D. *et al.* (2011) 'Eosinophils Contribute to IL-4 Production and Shape the T-Helper Cytokine Profile and Inflammatory Response in Pulmonary Cryptococcosis', *The American Journal of Pathology*, 179(2), pp. 733–744. doi: 10.1016/J.AJPATH.2011.04.025.
- Pike, A. W. and Wadsworth, S. L. (1999) 'Seallice on Salmonids: Their Biology and Control', *Advances in Parasitology*, 44, pp. 233–337. doi: 10.1016/S0065-308X(08)60233-X.
- Poli, V. (1998) 'The Role of C/EBP Isoforms in the Control of Inflammatory and Native Immunity Functions', *Journal of Biological Chemistry*, 273(45), pp. 29279–29282. doi: 10.1074/JBC.273.45.29279.
- Quigley, D. T. . *et al.* (2006) 'A Comparative Study of Smoltification in Sea Trout (*Salmo trutta* L.) and Atlantic Salmon (*Salmo salar* L.): Seawater Tolerance and Thyroid Hormone Titres', *Biology and Environment: Proceedings of the Royal Irish Academy*, 106b, pp. 35–47. Available at: <https://muse.jhu.edu/article/809803/summary> (Accessed: 28 May 2022).
- Rakers, S. *et al.* (2013) 'Antimicrobial Peptides (AMPs) from Fish Epidermis: Perspectives for Investigative Dermatology', *Journal of Investigative Dermatology*, 133(5), pp. 1140–1149. doi: 10.1038/JID.2012.503.
- Rauta, P. R., Nayak, B. and Das, S. (2012) 'Immune system and immune responses in fish and their role in comparative immunity study: A model for higher organisms', *Immunology Letters*, 148(1), pp. 23–33. doi: 10.1016/J.IMLET.2012.08.003.
- Reite, O. B. and Evensen, Ø. (2005) 'Inflammatory cells of teleostean fish: A review focusing on mast cells/eosinophilic granule cells and rodlet cells'. doi: 10.1016/j.fsi.2005.01.012.
- Rieger, A. M. *et al.* (2012) 'Fish and Mammalian Phagocytes Differentially Regulate Pro-Inflammatory and Homeostatic Responses In Vivo', *PLoS ONE*, 7(10), p. 47070. doi: 10.1371/journal.pone.0047070.
- Rubartelli, A. and Lotze, M. T. (2007) 'Inside, outside, upside down: damage-associated molecular-pattern molecules (DAMPs) and redox', *Trends in Immunology*, 28(10), pp. 429–436. doi: 10.1016/J.IT.2007.08.004.
- Rutkovska, I., Medne, R. and Purviņa, S. (2019) 'Seawater tolerance and morphological assessment of yearling sea trout (*Salmo trutta* L.)', *International Aquatic Research*, 11(3), pp. 295–302. doi:

10.1007/S40071-019-00238-Y/TABLES/4.

Sander, L. E. *et al.* (2010) 'Hepatic acute-phase proteins control innate immune responses during infection by promoting myeloid-derived suppressor cell function', *Journal of Experimental Medicine*, 207(7), pp. 1453–1464. doi: 10.1084/JEM.20091474.

Secombes, C. J. *et al.* (2001) 'Cytokines and innate immunity of fish _____', *Developmental & Comparative Immunology*. Available at: www.elsevier.com/locate/devcompimm (Accessed: 19 April 2022).

Serra-Llinares, R. M. *et al.* (2014) 'Salmon lice infection on wild salmonids in marine protected areas: An evaluation of the Norwegian "National Salmon Fjords"', *Aquaculture Environment Interactions*, 5(1), pp. 1–16. doi: 10.3354/AEI00090.

Sheikh, B. A. *et al.* (2022) 'Immunoglobulin', *Basics and Fundamentals of Immunology*, pp. 139–174. doi: 10.5581/1516-8484.20110102.

Shephard, K. L. (1994) *Functions for fish mucus*, *Reviews in Fish Biology and Fisheries*.

Sigh, J., Lindenstrom, T. and Buchmann, K. (2004) 'The parasitic ciliate *Ichthyophthirius multifiliis* induces expression of immune relevant genes in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum)', *Journal of Fish Diseases*, 27(7), pp. 409–417. doi: 10.1111/J.1365-2761.2004.00558.X.

Skern-Mauritzen, R., Torrissen, O. and Glover, K. A. (2014) 'Pacific and Atlantic *Lepeophtheirus salmonis* (Krøyer, 1838) are allopatric subspecies: *Lepeophtheirus salmonis salmonis* and *L. salmonis oncorhynchi* subspecies novo', *BMC Genetics*, 15(1), pp. 1–9. doi: 10.1186/1471-2156-15-32/FIGURES/3.

Skugor, S. *et al.* (2008a) 'Local and systemic gene expression responses of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) to infection with the salmon louse (*Lepeophtheirus salmonis*)', *BMC Genomics*, 9(1), pp. 1–18. doi: 10.1186/1471-2164-9-498/TABLES/1.

Skugor, S. *et al.* (2008b) 'Local and systemic gene expression responses of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) to infection with the salmon louse (*Lepeophtheirus salmonis*)', *BMC Genomics*, 9(1), pp. 1–18. doi: 10.1186/1471-2164-9-498/TABLES/1.

SLRC - Life cycle of the salmon louse (*Lepeophtheirus salmonis*).png - Wikimedia Commons (no date). Available at: [https://commons.wikimedia.org/wiki/File:SLRC_-_Life_cycle_of_the_salmon_louse_\(Lepeophtheirus_salmonis\).png](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:SLRC_-_Life_cycle_of_the_salmon_louse_(Lepeophtheirus_salmonis).png) (Accessed: 30 May 2022).

Sutherland, B. J. G. *et al.* (2011) 'Differentiating size-dependent responses of juvenile pink salmon (*Oncorhynchus gorbuscha*) to sea lice (*Lepeophtheirus salmonis*) infections', *Comparative Biochemistry and Physiology Part D: Genomics and Proteomics*, 6(2), pp. 213–223. doi: 10.1016/J.CBD.2011.04.001.

Sutherland, B. J. G. *et al.* (2014) 'Comparative transcriptomics of Atlantic *Salmo salar*, chum *Oncorhynchus keta* and pink salmon *O. gorbuscha* during infections with salmon lice *Lepeophtheirus salmonis*', *BMC Genomics*, 15(1), pp. 1–17. doi: 10.1186/1471-2164-15-200/TABLES/2.

Svaerdson, G. and Fagerstroem, A. (1982) *Adaptive differences in the long-distance migration of some trout (*Salmo trutta* L.) stocks*. Drottningholm. Available at: <https://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=SE8310152> (Accessed: 28 May 2022).

Tadiso, T. M. *et al.* (2011) 'Gene expression analyses of immune responses in Atlantic salmon during early stages of infection by salmon louse (*Lepeophtheirus salmonis*) revealed bi-phasic responses coinciding with the copepod-chalimus transition', *BMC Genomics*, 12(1), pp. 1–17. doi: 10.1186/1471-2164-12-141/TABLES/2.

Taranger, G. L. *et al.* (2012) *Forslag til førstegenerasjons målemetode for miljøeffekt (effektindikatorer) med hensyn til genetisk påvirkning fra oppdrettslaks til villaks, og påvirkning av*

lakselus fra oppdrett på viltlevende laksefiskbestander. Available at: www.imr.no (Accessed: 28 May 2022).

Taranger, G. L. *et al.* (2015) 'Risk assessment of the environmental impact of Norwegian Atlantic salmon farming', *ICES Journal of Marine Science*, 72(3), pp. 997–1021. doi: 10.1093/ICESJMS/FSU132.

Thorstad, E. B. *et al.* (2014) 'Effekter av lakselus på sjøørret - en litteraturoppsummering', 144 s. Available at: <https://brage.nina.no/nina-xmlui/handle/11250/2372370> (Accessed: 7 December 2021).

Uribe, C. *et al.* (2011) 'Innate and adaptive immunity in teleost fish: A review', *Veterinarni Medicina*, 56(10), pp. 486–503. doi: 10.17221/3294-VETMED.

Verburg-van Kemenade, B. M. L. *et al.* (1995) 'Carp macrophages and neutrophilic granulocytes secrete an interleukin-1-like factor', *Developmental & Comparative Immunology*, 19(1), pp. 59–70. doi: 10.1016/0145-305X(94)00047-J.

Wang, T., Johansson, P., Abós, B., Holt, A., Tafalla, C., Jiang, Y., Wang, A., Xu, Q., Qi, Z., Huang, W., Costa, M. M., Diaz-Rosales, P., Holland, J. W. and Secombes, C. J. (2016) 'First in-depth analysis of the novel Th2-type cytokines in salmonid fish reveals distinct patterns of expression and modulation but overlapping bioactivities', *Oncotarget*, 7(10), p. 10917. doi: 10.18632/ONCOTARGET.7295.

Wang, T., Johansson, P., Abós, B., Holt, A., Tafalla, C., Jiang, Y., Wang, A., Xu, Q., Qi, Z., Huang, W., Costa, M. M., Diaz-Rosales, P., Holland, J. W., Secombes, C. J., *et al.* (2016) 'First in-depth analysis of the novel Th2-type cytokines in salmonid fish reveals distinct patterns of expression and modulation but overlapping bioactivities', *Oncotarget*, 7(10), pp. 10917–10946. doi: 10.18632/ONCOTARGET.7295.

Wang, W. *et al.* (2019) 'The CCAAT/Enhancer-Binding Protein Family: Its Roles in MDSC Expansion and Function', *Frontiers in immunology*, 10, p. 1804. doi: 10.3389/FIMMU.2019.01804/BIBTEX.

Wells, A. *et al.* (2006) 'Physiological effects of simultaneous, abrupt seawater entry and sea lice (*Lepeophtheirus salmonis*) infestation of wild, sea-run brown trout (*Salmo trutta*) smolts', <https://doi.org/10.1139/f06-160>, 63(12), pp. 2809–2821. doi: 10.1139/F06-160.

Wells, Alan *et al.* (2007) 'Physiological consequences of "premature freshwater return" for wild sea-run brown trout (*Salmo trutta*) postsmolts infested with sea lice (*Lepeophtheirus salmonis*)', <https://doi.org/10.1139/f07-107>, 64(10), pp. 1360–1369. doi: 10.1139/F07-107.

Went, A. E. J. (1964) 'The Pursuit of Salmon in Ireland', *Royal Irish Academy*, 63. Available at: https://www.jstor.org/stable/25505116?casa_token=JqacGGX1SDYAAAAA%3AVRqmo2IQIVVH2YF1yMLG38OS1E42Hjpf3qhj2ynciGgow96BijQMzacJFNTZ2gMQ10ax7veLz2wjQHTntKB6XoSHIBy7FApA7GpSU3n3p9ou8ut2Mw&seq=1 (Accessed: 29 May 2022).

Xiang, L.-X. (2022) 'Vertebrates Regulatory Mechanism in Ancient Zebrafish: Insight into the Origin of Th2-like Interaction in Adaptive Immunity of α Essential Role of IL-4 and IL-4R', *J Immunol*, 188, pp. 5571–5584. doi: 10.4049/jimmunol.1102259.

Xue, M., Le, N. T. V. and Jackson, C. J. (2006) 'Targeting matrix metalloproteases to improve cutaneous wound healing', <http://dx.doi.org/10.1517/14728222.10.1.143>, 10(1), pp. 143–155. doi: 10.1517/14728222.10.1.143.

Yang, J. *et al.* (2014) 'Monocyte and macrophage differentiation: Circulation inflammatory monocyte as biomarker for inflammatory diseases', *Biomarker Research*, 2(1), pp. 1–9. doi: 10.1186/2050-7771-2-1/TABLES/4.

Yang, Y. C. *et al.* (2012) 'Transforming growth factor-beta1 in inflammatory airway disease: a key for understanding inflammation and remodeling', *Allergy*, 67(10), pp. 1193–1202. doi: 10.1111/J.1398-9995.2012.02880.X.

Yoshimoto, T. (2018) 'The hunt for the source of primary interleukin-4: How we discovered that

natural killer T cells and basophils determine T helper type 2 cell differentiation in vivo', *Frontiers in Immunology*, 9(APR), p. 716. doi: 10.3389/FIMMU.2018.00716/BIBTEX.

Appendix A- mapping % i hudprøver fra sjøaure

Mapping i hudprøver tatt fra sjøaure i uttak 5 og 6, prøvane vert mappa mot laksegenom og lakslusgenom.

Appendix A: Tabell over mapping % i hudprøver fra sjøaure, mapping mot lakselusgenom og lakreferanse.

Mapping mot Atlantisk laks referanse	Mapping mot lakselus referanse	Prøve nr.
27.37%	0.13%	K1
40.63%	0.10%	K2
30.98%	0.13%	K3
35.42%	0.09%	K4
41.54%	0.11%	K5
42.51%	0.09%	K6
46.87%	0.07%	K7
56.05%	0.06%	K8
41.61%	0.09%	K9
51.82%	0.07%	K10
32.05%	0.09%	K11
51.67%	0.06%	K12
36.52%	0.11%	K13
48.98%	0.07%	K14
49.99%	0.06%	K15
59.21%	0.04%	K16
47.28%	11.20%	ML1
22.32%	24.28%	ML2
25.56%	26.89%	ML3
43.88%	15.38%	ML4
38.02%	16.34%	ML5
25.29%	16.17%	ML6
40.87%	18.28%	ML7
25.22%	23.87%	ML8
60.92%	0.05%	ML9
3.75%	35.76%	ML10
5.03%	41.13%	ML11
37.89%	17.51%	ML12
32.53%	23.76%	ML13
15.18%	36.39%	ML14
40.85%	19.21%	ML15
15.90%	0.15%	ML16
23.43%	0.14%	UL1
59.81%	0.03%	UL2
51.44%	0.08%	UL3
46.28%	0.10%	UL3
48.93%	0.10%	UL5
24.28%	0.12%	UL6

Mapping mot Atlantisk laks referanse	Mapping mot lakselus referanse	Prøve nr.
35.50%	0.11%	UL7
16.73%	0.13%	UL8
52.53%	0.05%	UL9
32.18%	0.11%	UL10
12.51%	7.36%	UL11
56.49%	0.10%	UL12
26.54%	0.16%	UL13
49.38%	0.07%	UL14
55.39%	0.04%	UL15
53.75%	0.07%	UL16

Appendix B – Normalisert antall transkript av utvalde immunologiske gen i hudprøvene

Appendix B.1 - Normalisert antall transkript av utvalde immunologiske gen i hudprøvar tatt i saltvatn.

Gen id.	Kontroll										Gjennomsnitt	SEM +/-
	K9	K10	K11	K12	K13	K14	K15	K16				
<i>cd4</i>	41	95	22	73	17	54	47	79			53,4	9,7
<i>il1 beta</i>	18	24	18	27	27	450	11	13			73,5	53,9
<i>mmp 13</i>	123	140	64	187	187	2485	61	148			424,5	294,9
<i>ccaat beta</i>	268	644	566	611	471	1865	3599	697			1090,1	396,6
<i>il4/13a</i>	17	8	6	9	6	1	7	1			7,0	1,8
<i>igm</i>	20	12	8	12	4	8	3	13			10,0	1,9
<i>il10</i>	0	0	0	0	0	0	0	1			0,2	0,2
<i>cath2</i>	474	75	236	147	322	1038	118	438			356,1	110,2
<i>il8</i>	7	9	11	7	6	65	7	7			14,8	7,1
<i>tnf alfa</i>	13	9	21	9	2	85	8	12			20,0	9,5
<i>saa</i>	316	199	163	143	195	239	202	159			202,0	19,5
<i>gata3</i>	1466	1495	1752	1159	1876	1186	1286	1393			1451,6	90,6
<i>il6</i>	0	3	0	2	1	1	0	1			1,0	0,4
<i>mmp9</i>	141	143	76	126	66	401	153	141			155,8	36,8
<i>cd8 alfa</i>	229	284	96	465	64	67	90	187			185,2	49,3
<i>mhc2</i>	64	47	57	54	29	49	39	32			46,3	4,4
<i>tgf beta</i>	10	30	14	20	53	22	20	39			25,9	5,0
Infisert, under festepunktet til lusa												
Gen id.	ML9	ML12	ML13	ML14	ML15	ML16					Gjennomsnitt	SEM +/-
<i>cd4</i>	39	44	40	4	46	0					28,8	8,6
<i>il1 beta</i>	145	726	18	810	600	247					424,3	134,8
<i>mmp 13</i>	3970	21851	369	24686	3816	2931					9603,7	4368,4
<i>ccaat beta</i>	10553	8354	549	10210	12314	3931					7651,9	1839,2
<i>il4/13a</i>	76	36	33	57	26	25					42,2	8,2
<i>igm</i>	2	3	0	4	4	16					4,8	2,3
<i>il10</i>	1	0	0	0	0	0					0,2	0,2
<i>cath2</i>	1728	3290	426	7288	906	2144					2630,4	1016,7
<i>il8</i>	11	95	4	146	12	0					44,5	25,0
<i>tnf alfa</i>	36	84	24	306	285	36					128,3	53,6
<i>saa</i>	263	336	204	280	403	309					299,1	27,6
<i>gata3</i>	606	768	1119	310	378	951					688,7	130,0
<i>il6</i>	0	1	1	2	0	0					0,6	0,3
<i>mmp9</i>	790	2150	204	2628	1499	1614					1480,8	360,0
<i>cd8 alfa</i>	94	53	242	120	100	45					109,0	29,1
<i>mhc2</i>	30	34	47	0	6	9					21,0	7,7
<i>tgf beta</i>	33	25	9	38	16	0					20,1	5,9
Infisert, upåverka området												
Gen id.	UL9	UL10	UL11	UL12	UL13	UL14	UL15	UL16			Gjennomsnitt	SEM +/-
<i>cd4</i>	74	84	115	87	85	48	83	44			77,4	8,1
<i>il1 beta</i>	12	17	14	29	31	3	16	4			15,7	3,6
<i>mmp 13</i>	57	78	839	79	272	111	137	219			224,1	91,7
<i>ccaat beta</i>	340	176	346	3217	475	905	340	276			759,2	359,6
<i>il4/13a</i>	2	0	24	5	4	1	10	4			6,2	2,7
<i>igm</i>	6	12	9	8	7	1	3	1			5,9	1,5
<i>il10</i>	1	0	0	0	0	0	0	0			0,1	0,1
<i>cath2</i>	270	176	66	353	128	163	215	65			179,5	34,9
<i>il8</i>	1	9	0	8	4	3	4	0			3,5	1,2
<i>tnf alfa</i>	12	20	9	23	20	13	12	4			13,9	2,2
<i>saa</i>	206	167	110	232	242	124	114	99			161,8	20,5
<i>gata3</i>	519	749	1208	1052	2431	806	409	494			958,5	232,0
<i>il6</i>	0	0	0	1	2	0	0	0			0,4	0,3
<i>mmp9</i>	52	119	421	144	87	95	123	130			146,4	40,5
<i>cd8 alfa</i>	16	23	92	22	7	34	53	61			38,4	10,0
<i>mhc2</i>	70	50	52	14	27	47	52	44			44,4	6,0
<i>tgf beta</i>	7	7	38	7	11	2	5	4			10,1	4,1

Appendix B.2: Normalisert antall transkript av utvalde immunologiske gen i hudprøver tatt i ferskvatn.

Kontroll											
Gen id.	K1	K2	K3	K4	K5	K6	K7	20_K8	Gjennomsnitt	SEM +/-	
<i>cd4</i>	91	87	90	114	179	107	215	172	131,7	17,5	
<i>il1 beta</i>	15	16	16	29	6	13	18	22	16,8	2,3	
<i>mmp 13</i>	26	13	37	25	105	30	55	333	78,0	37,8	
<i>ccat beta</i>	525	345	694	371	608	1036	788	893	657,4	86,3	
<i>il4/13a</i>	14	24	1	13	3	8	50	6	14,7	5,6	
<i>igm</i>	12	7	16	11	5	8	9	13	10,1	1,3	
<i>il10</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0,0	0,0	
<i>cath2</i>	43	112	96	30	373	101	140	959	231,7	110,4	
<i>il8</i>	9	7	3	14	10	7	5	25	10,1	2,4	
<i>tnf alfa</i>	15	20	11	25	27	20	14	8	17,6	2,4	
<i>saa</i>	104	136	264	131	145	74	97	200	143,9	21,7	
<i>gata3</i>	2465	1103	1272	1652	2437	781	1968	522	1525,0	258,1	
<i>il6</i>	0	2	1	2	0	3	2	2	1,5	0,4	
<i>mmp9</i>	54	63	97	88	160	49	89	322	115,2	32,0	
<i>cd8 alfa</i>	167	100	32	256	42	179	171	187	141,7	27,3	
<i>mhc2</i>	41	61	120	36	75	90	100	36	69,8	11,2	
<i>tgf beta</i>	7	12	15	20	17	17	3	33	15,8	3,2	
Infisert, under festepunktet til lusa											
Gen id.	ML1	ML2	ML3	ML4	ML5	ML6	ML7	ML8	Gjennomsnitt	SEM +/-	
<i>cd4</i>	164	145	69	105	88	115	206	174	133,3	16,5	
<i>il1 beta</i>	77	1035	358	589	351	22	986	4	427,8	145,4	
<i>mmp 13</i>	5237	13623	931	10047	8031	94	14300	143	6550,6	2072,6	
<i>ccat beta</i>	2246	11280	8687	7294	9337	1410	8057	891	6150,4	1421,8	
<i>il4/13a</i>	78	293	33	73	184	27	35	48	96,5	33,3	
<i>igm</i>	8	0	9	5	1	8	9	13	6,8	1,6	
<i>il10</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0,0	0,0	
<i>cath2</i>	784	1189	617	1770	1210	34	3085	843	1191,6	324,0	
<i>il8</i>	16	96	8	80	33	6	76	25	42,3	12,7	
<i>tnf alfa</i>	6	197	173	134	95	6	174	19	100,5	28,6	
<i>saa</i>	348	275	214	293	331	178	269	254	270,1	19,9	
<i>gata3</i>	973	907	186	1046	731	802	957	1726	915,9	149,9	
<i>il6</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0,0	0,0	
<i>mmp9</i>	788	1411	509	1835	2553	106	2313	80	1199,4	343,7	
<i>cd8 alfa</i>	106	149	82	207	116	228	131	52	133,9	21,1	
<i>mhc2</i>	35	19	20	21	19	20	26	31	23,9	2,2	
<i>tgf beta</i>	37	19	32	53	21	15	23	15	27,0	4,7	
Infisert, upåverka området											
Gen id.	UL1	UL2	UL3	UL3	UL5	UL6	UL7	UL8	Gjennomsnitt	SEM +/-	
<i>cd4</i>	59	48	90	81	58	92	126	154	88,4	12,8	
<i>il1 beta</i>	27	0	7	20	9	28	10	4	13,3	3,8	
<i>mmp 13</i>	30	25	42	97	20	51	22	53	42,6	9,0	
<i>ccat beta</i>	469	102	937	294	304	350	303	275	379,2	87,3	
<i>il4/13a</i>	2	7	53	3	6	0	9	8	11,0	6,1	
<i>igm</i>	11	49	6	26	4	35	12	0	17,8	6,1	
<i>il10</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0,0	0,0	
<i>cath2</i>	558	30	145	161	77	297	48	83	174,8	62,4	
<i>il8</i>	15	0	8	2	3	0	6	14	5,9	2,1	
<i>tnf alfa</i>	25	0	19	10	12	26	15	28	16,9	3,4	
<i>saa</i>	85	41	136	65	68	149	151	67	95,1	15,3	
<i>gata3</i>	695	316	1601	1037	397	1259	1744	1650	1087,6	201,3	
<i>il6</i>	1	0	0	0	0	0	0	0	0,1	0,1	
<i>mmp9</i>	81	24	102	89	54	98	73	77	74,8	9,0	
<i>cd8 alfa</i>	48	63	71	65	207	57	23	24	69,8	20,6	
<i>mhc2</i>	64	42	47	62	42	35	49	196	67,2	18,8	
<i>tgf beta</i>	13	16	6	22	11	0	8	4	10,1	2,5	

Appendix C- Signifikante verdier til uttrykket av immunologiske gen

Appendix C- Signifikante verdier (markert i grønn). Forskjell i genuttrykk mellom hudprøver tatt i sjøvatn og saltvatn (K=kontroll, ML = infisert fisk, under festepunktet til lus, UL= infisert fisk- upåverka hud området).

Gen id.	Ferskvatn			Saltvatn			Ferskvatn vs. Saltvatn		
	ML vs K	ML vs. UL	K vs. UL	ML vs K	ML vs. UL	K vs. UL	K vs. K	ML vs. ML	UL vs. UL
<i>cd4</i>	0,01	0,45	0,65	0,60	0,27	0,93	0,36	0,01	0,80
<i>il1 beta</i>	1,00	1,00	0,39	0,93	0,99	0,89	0,41	0,02	0,76
<i>mmp 13</i>	1,00	1,00	0,65	1,00	1,00	0,76	0,47	0,59	0,82
<i>ccaat beta</i>	1,00	1,00	0,74	1,00	0,99	0,72	0,39	0,53	0,78
<i>il4/13a</i>	0,92	0,95	0,36	0,93	0,87	0,20	0,54	0,28	0,84
<i>igm</i>	0,55	0,83	0,09	0,56	0,10	0,67	0,01	0,06	0,88
<i>il10</i>	0,00	0,00	0,00	0,01	0,00	0,16	0,05	0,12	0,76
<i>cath2</i>	0,98	0,99	0,49	0,99	0,99	0,87	0,27	0,79	0,77
<i>il8</i>	0,87	0,94	0,59	0,62	0,91	0,88	0,13	0,03	0,85
<i>tnf alfa</i>	0,95	0,96	0,19	0,91	0,94	0,46	0,03	0,14	0,81
<i>saa</i>	0,81	0,94	0,66	0,57	0,64	0,54	0,27	0,11	0,76
<i>gata3</i>	0,97	0,51	0,73	0,93	0,51	0,90	0,10	0,26	0,82
<i>il6</i>	0,96	0,09	0,74	0,30	0,00	0,59	0,18	0,41	0,75
<i>mmp9</i>	1,00	1,00	0,63	0,99	0,99	0,18	0,19	0,36	0,76
<i>cd8 alfa</i>	0,08	0,64	0,73	0,61	0,69	0,95	0,17	0,06	0,86
<i>mhc2</i>	0,96	0,91	0,19	0,67	0,52	0,14	0,48	0,02	0,85
<i>tgf beta</i>	0,51	0,77	0,58	0,24	0,27	0,83	0,25	0,08	0,77

Appendix D- Vekt, lengde, antall fisk og antall lus

Appendix D: Antall fisk per uttak og gjennomsnittsverdiar per uttak av vekt, lengde og antall lus per fisk.

	Vekt (gram)			Lengde (cm)			Antal fisk per gruppe (n)			Antal lus
	Alle	Kontroll	Infisert	Alle	Kontroll	Infisert	Alle	Kontroll	Infisert	Infisert
U1	116,8	x	x	20,2	x	x	357	x	x	0
U2	117,1	x	x	21,1	x	x	24	x	x	0
U3	130,4	123,3	121,7	21,8	21,6	21,1	25	11	14	17,1
U4	138,3	138,1	138,5	21,6	21,5	21,6	80	40	40	20,0
U5	121,5	126,4	116,8	20,5	20,5	20,4	80	40	40	5,5
U6	128,1	136,4	119,5	20,7	21,1	20,2	90	46	44	0,3

Appendix E- Antall lus per fisk, lengde og vekt hos sjøaure individ som blei brukt i genekspresjon analyse

Appendix E: Lengde, vekt og antall lus hos sjøaureindivid som blei tatt hudprøver av i uttak 4 og 5.

Prøvatakingdato	Prøve nr.	uttak	lengde (cm)	vekt (gram)	antall lus
07.06.2021	ML9/UL9	4	20,4	107	15
07.06.2021	ML13/UL13	4	16,5	54	16
07.06.2021	ML10*/UL10	4	17,4	74	13
07.06.2021	ML14/UL14	4	14,6	36	12
07.06.2021	ML12/UL12	4	19,5	90	15
07.06.2021	ML16/UL16	4	20,8	116	13
07.06.2021	ML11/UL11	4	22,0	125	20
07.06.2021	ML15/UL15	4	22,6	154	29
07.06.2021	K9	4	19,3	83	0
07.06.2021	K12	4	19,9	95	0
07.06.2021	K13	4	20,5	106	0
07.06.2021	K16	4	22,4	168	0
07.06.2021	K10	4	18,5	89	0
07.06.2021	K14	4	20,8	118	0
07.06.2021	K11	4	24,0	190	0
07.06.2021	K15	4	25,2	206	0
09.06.2021	ML3/UL3	5	22,9	151	8
09.06.2021	ML2/UL2	5	20,6	107	5
09.06.2021	ML1/UL1	5	18,0	83	10
09.06.2021	ML4/UL4	5	26,8	207	9
09.06.2021	ML5/UL5	5	22,9	128	6
09.06.2021	ML6/UL6	5	18,2	81	3
09.06.2021	ML7/UL7	5	22,1	145	5
09.06.2021	ML8/UL8	5	27,8	290	6
09.06.2021	K8	5	14,2	34	0
09.06.2021	K7	5	22,3	148	0
09.06.2021	K6	5	16,0	49	0
09.06.2021	K5	5	25,9	243	0
09.06.2021	K1	5	23,2	188	0
09.06.2021	K2	5	23,2	173	0
09.06.2021	K4	5	25,4	234	0
09.06.2021	K3	5	22,9	174	0