

Karakterisering av et astacin i lakselus
(*Lepeophtheirus salmonis*) og dets rolle i vert-parasitt
interaksjonen mellom lakselus og
atlantisk laks (*Salmo salar*)

Linn Flesland



Masteroppgave i fiskehelse

Institutt for Biovitenskap

Universitetet i Bergen

Juni 2022

Forord

Denne masteren er en del av FHF-prosjektet FHF-prosjektet (901564): Samspill mellom lakselus og laks (ModuLus). Studien ble utført i samarbeid ved Sea Lice Research Center (SLRC) og Institutt for biovitenskap ved Universitetet i Bergen.

Tusen hjertelig takk til Aina-Cathrine Øvergård for å ha vært min krykke gjennom dette året. Fra jeg i siste liten fikk henne som veileder, til levering av oppgaven har hun loset meg trygt gjennom alle fasene en masterstudent gjennomgår. Tusen takk til Helena Marie for god hjelp, litt humor og støtte som medveileder. Takk til alle som hjalp til med prøveuttaket etter fiskeforsøket; Lars Are Hamre, Per Gunnar Espedal og Christiane Eichner. Tusen takk til denne etasjen som har vært full av behjelpelige og artige folk. Og sist, men ikke minst tusen takk til Heidi Kongshaug for utrolig grundig opplæring på lab, så grundig at jeg ikke lengre vegrer meg for å lese en protokoll.

Så vil jeg takke alle medstudentene mine gjennom 5 år. Dere har vært en fantastisk og rar gjeng, og det er litt vemodig at vi nå delvis skiller lag på vei ut i arbeidslivet. Jeg vil takke spesielt medlemmene av trioen, Anna og Marte for alle gode og tidige stunder.

Til slutt vil jeg takke venner og familie som har holdt ut med variasjoner av setningen «Ja, skal bare bli ferdig med eksamen/masteren først...», nå skal jeg ta meg en stor bolle for jeg er endelig i mål!

Bergen 1.juni.2022

Linn Flesland

Sammendrag

Lakselus (*Lepeophtheirus salmonis*) er en marin ektoparasitt som infiserer oppdrettsfisk og ville laksefisk bestander. Denne parasitten utgjør et av de viktigste problemene i oppdrettsnæringen. Den gir store utfordringer for fiskevelferden for vill og oppdrettet fisk, og bremser utviklingen av næringen. Behandling og tiltak gir store velferdsproblemer, økonomiske konsekvenser og beslaglegger mye ressurser. Det har også vært en resistens utvikling mot tidligere brukte behandlingsmetoder. Derfor er det et stort behov for å utvikle nye strategier for å bekjempe lakselusen. Økt kunnskap om vert-parasitt interaksjonen kan gi nye verktøy mot dette problemet. Lakselusens sekret fra spyttkjertelen har til nå vist seg å ha et stort potensial inn mot vaksineutvikling på grunn av immunmodulerende egenskaper.

Fra RNA-sekvenserings (RNAseq) data er det funnet flere proteiner som er antatt å være uttrykt i spyttkjertelen. I denne studien skal «*Lepeophtheirus salmonis* labial gland astacin 5» (LsLGA5) karakteriseres for å beskrive eventuelle funksjoner. LsLGA5 transkripter ble lokalisert til spyttkjertlene ved *in situ* hybridisering på snitt med chalmus I lus. Det ontogenetiske studiet viste at LsLGA5 er høyest uttrykt i de tidlige parasittiske livsstadiene når lusen etableres på verten. Bioinformative verktøy viste signalpeptid som indikerer at LsLGA5 sekreses ut av cellen. Det ble også identifisert et astacin domene med aminosyrer viktig i det aktive sete konserverte, i tillegg til 4 Shk domener med 6 konserverte cysteiner i hvert domene.

For å kartlegge eventuell immunmodulering ble det gjennomført et RNAinterferens (RNAi) forsøk for nedregulering av LsLGP5 i kopepoditter. Laks ble så smittet opp både med kontrollus og med lus som var behandlet med dsLsGA5 for gen-spesifikk nedregulering. Deretter ble transkripsjonsnivået av et utvalg av immungener hos laks målt fra hudprøver med og uten lus. Det ble ikke funnet indikasjoner på at LsLGA5 har en immunmodulerende effekt på disse immungenene. For å kunne konkludere rundt LsLGA5's rolle i vert-parasitt interaksjonen må det dermed gjøres mer forskning.

I tillegg ble det undersøkt om bruk av nellikolje som beroligende middel under transport kan påvirke forsøk som ser på uttrykking av immungener. Det var ikke mulig å observere påvirkning av dette i prøveuttaket 3 uker etter eksponering av nellikolje.

Forkortelser

AP	Alkalisk fosfatase
AS	Antisens
BmK1	<i>Brugia malayi</i> K 1
Bp	Basepar
C3a	Complement component 3a
CCL20	Chemokine ligand 20
CD4	Cluster of differentiation 4
CD8	Cluster of differentiation 8
cDNA	Komplementær DNA
CPY	Cymptrypsin peptidase
Ct	Terskelverdi
DAMPs	Damage-associated molecular patterns
Ddpi	Døgngrader etter infeksjon
DEPC	Dietylpyrokarbonat vann
DIG	Digoxigenin
DNA	Deoksyribonukleinsyre
Dnase I	Deoxyribonuclease I
Dpi	Dager etter infeksjon
dsDNA	Dobbeltrådig DNA
dsRNA	Dobbeltrådig RNA
EDTA	Etylendiamintetraeddiksyre
Ef1α	Elongeringsfaktor 1a
EtOH	Etanol
HCE	High choriolytic enzyme
HDP	Helminth-derived products
Ig	Immunglobulin
IgD	Immunglobulin D
IgM	Immunglobulin M
IgT	Immunglobulin T
IL1β	Interleukin 1 β
IL4	Interleukin 4

IL8	Interleukin 8
ISH	<i>In situ</i> hybridisering
K-faktor	Kondisjonsfaktor
LALP's	<i>Loxocles</i> Astacin-like Proteases
LCE	Low choriolytic enzyme
LPS	Lipopolysakkarider
LsLGA5	<i>Lepeoptheirus salmonis</i> labial gland astacin 5
LsLGP 1	<i>Lepeoptheirus salmonis</i> labial gland protein 1
LsLGP 2	<i>Lepeoptheirus salmonis</i> labial gland protein 2
LsLGP 3	<i>Lepeoptheirus salmonis</i> labial gland protein 3
LsLGP 4	<i>Lepeoptheirus salmonis</i> labial gland protein 4
LsLGP11	<i>Lepeoptheirus salmonis</i> labial gland protein 1 - like
MAC	Membran attack complex
MMP13	Matrix metallopeptidase 13
mRNA	messengerRNA
NCC	Uspesifikke cytotoksiske celler
PBS	Phosphate-Buffered Saline
PCR	Polymerasekjedereaksjon
PGE₂	Prostaglandin
PRR	Pattern recognition receptors
RACE	Rapid amplification of cDNA ends
RNA	Ribonukleinsyre
RNAi	RNAinterferens
RNAseq	RNA-sekvensering
S	Sens
ShK	Stichodactyla toksin
SK	Skinprøve uten lus
SKL	Skinprøve med lus
SSC	Salt-natriumcitratbuffer
ssRNA	Enkeltrådig RNA
Teg 1	Tegumental kjertel 1
Teg 2	Tegumental kjertel 2
Teg 3	Tegumental kjertel 3

TNFα	Tumor nekrose faktor- α
TOPO-kloning	Topoisomerase-kloning
UPM	Universal Primer A Mix
UVS.2	Embryonic protein

Innholdsfortegnelse

Forord.....	II
Sammendrag.....	III
Forkortelser	IV
1.0 Introduksjon.....	1
1.1 Generelt om lakselus	2
1.2 Hud – Teleoster	4
1.2.1 Sår og sårheling	4
1.3 Lakselusens patogenese.....	5
1.3.1 Immunmodulering	6
1.3.2 Lakselusens kjertler	7
1.4 Astaciner og ShK.....	8
1.5 Nellikolje – Eugenol og iso-eugenol	10
1.6 Målet med studien	11
2.0 Material og metode.....	12
2.1 RNA isolering.....	12
2.2 cDNA syntese.....	12
2.2.1 Polymerasekjedereaksjon – PCR.....	13
2.2.2 Gelelektroforese	13
2.3 TOPO-kloning	13
2.3.1 Rensing av PCR produkt	14
2.3.2 Sanger-sekvensering.....	14
2.3.3 Rensing av plasmid.....	15
2.4 RACE – Rapid Amplification of cDNA Ends.....	15
2.5 Sekvensering av åpen leseramme	16
2.6 Analyse av sekvenser med bioinformatiske databaser	16
2.7 <i>In situ</i> hybridisering.....	17
2.7.1 Probesyntese	17
2.7.2 <i>In situ</i> hybridisering, dag 1	18
2.7.3 <i>In situ</i> hybridisering, dag 2	19
2.7.4 <i>In situ</i> hybridisering, dag 3	19
2.8 Sanntids PCR.....	19
2.8.1 Primertesting av primere til sanntids PCR	20
2.8.2 Analyse av sanntids resultater	22

2.8.3 Statistiske analyser	22
2.8.4 Ontogenetisk studie	22
2.9 Eksperiment.....	23
2.9.1 RNA interferens – RNAi	23
2.9.2 Syntese av dsRNA.....	23
2.9.3 Bading av nauplii I larver i dsRNA.....	24
2.10.3 Smitteforsøk	24
2.10.3 Prøveuttak.....	25
3.0 Resultater.....	26
3.1 Analyse av LsLGA5 sekvens	26
3.2 Lokalisering av LsLGA5 ekspresjon.....	29
3.3 Ontogenetisk studie	32
3.4 RNAi knock down forsøk.....	32
3.4.1 K-faktor og lusetall.....	33
3.4.2 RNAi knock down effektivitet	34
3.4.3 Funksjonell studie av LsLGA5.....	35
4.0 Diskusjon.....	38
4.1 Konklusjon og videre arbeid	45
Referanser.....	47
Appendiks A – In situ hybridisering	59
Appendiks B – Primereffektivitet og smeltekurve	61
Appendiks C – Sekvenser.....	63

1.0 Introduksjon

Økt produksjon av atlantisk laks har ført til økt forekomst av *Lepeophtheirus salmonis* (videre kalt lakselus). Dette fører blant annet til at vill laksefisk har en høyere sannsynlighet for å bli infisert når de skal vandre ut fra elvene til sjøen om våren (Sommerset et al., 2022). Dette gjelder også laksearter som sjøørreten (*Salmo trutta trutta*). I de mest problematiske områdene blir oppdrettsanleggene pålagt å gjøre tiltak for å bedre tilstanden. Parasitten legger lokk på produksjonen ettersom det i 2017 ble innført et trafikklys-system som er ment å redusere belastningen på de ville bestandene. Forskrift om bekjempelse av lakselus i akvakulturanlegg § 8 sier at fra Nord-Trøndelag og sørover skal det fra uke 16 til 21 være færre enn 0,2 voksne hunnlus per fisk i anlegget og fra uke 22 til 15 skal det være færre en 0,5 voksne hunnlus. I Nordland, Troms og Finnmark skal det være færre enn 0,2 voksne hunnlus fra uke 21 til 26, og færre enn 0,5 voksne hunnlus fra uke 27 til 20. Konsekvensene som følge av for høye lusetall er at anlegget må redusere produksjonskapasiteten med 6%. Hvis et anlegg har lave lusetall, kan de potensielt øke produksjonskapasiteten med 6%. Dette gjør at mye ressurser og tid brukes på tiltak som skal redusere antall lus på fisken.

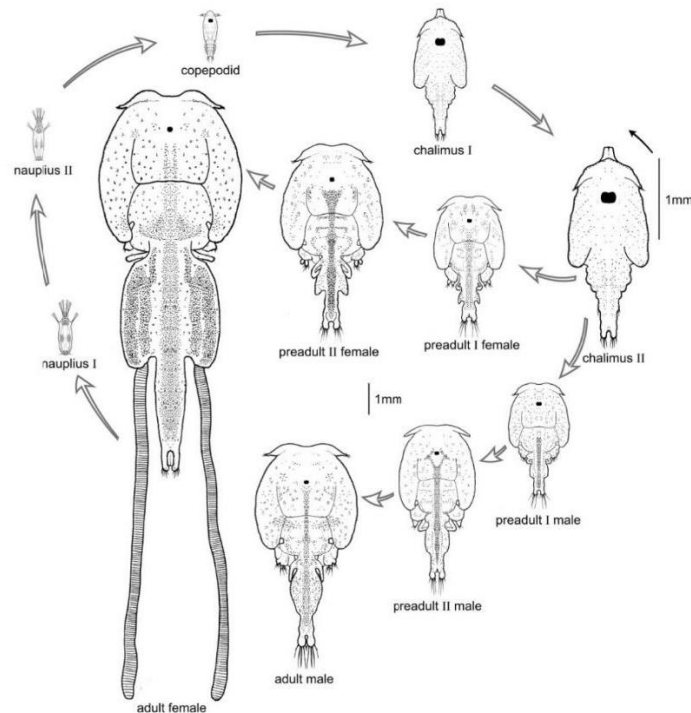
Tidligere har kjemisk avlusning blitt brukt med god effekt, men i senere tid har effekten avtatt på grunn av økt resistens (Aaen et al., 2015). Tiltak som brukes i stor skala i dag er ulike former for mekanisk og termisk avlusning, rensefisk og luseskjørt (Overton et al., 2019). Mekanisk avlusning er en metode der lusen mer eller mindre blir børstet eller spylt av laksen, men i senere tid er metoder der fisken blir badet i ferskvann og/eller varmtvann også blitt brukt. Avlusning kan i stor grad redusere fiskevelferden på flere måter. Fisken trenges før behandling som er stressende og kan gi problematisk lavt oksygenivå, i tillegg til ytre skader. Selve behandlingen skal utføres så skånsomt som mulig, men også her er det stressende for fisken og det kan gi ytre skader samt føre til økt dødelighet hos individer som allerede er svekket. Et annet tiltak er å bruke rensefisk som rognkjeks og berggylt. Det har vært antydning at disse kan spise lus av laksen, men i senere tid har det blitt stilt spørsmål om hvor effektiv de er, og om bruken av de er forsvarlig både etisk og miljømessig.

Samtidig som oppdrettsnæringen er begrenset av lakselus, har regjeringen et mål å femdoble produksjonen av laks innen 2050. Dette er imidlertid ikke mulig uten en videre utvikling av forskjellige tiltak mot lus som landbasert oppdrett eller lukkede/semilukkede systemer og merder lengre ut til havs. En annen løsning og kjernen til denne masteroppgaven er imidlertid

å lage en lakselusvaksine, men da er det nødvendig med mere kunnskap om lusens biologi spesielt rundt aktuelle vaksinekandidater.

1.1 Generelt om lakselus

Lakselus tilhører fylumet arthropoda og undergruppen copepoda. Det er en marin ektoparasitt som lever på den nordlige halvkule der den kan infiserer flere laksearter, blant annet sjøørret, regnbueørret (*Onchorhynchus mykiss*) og atlantisk laks (videre kalt laks). Den spiser vertens slim, hud og blod, og hele livssyklusen kan fullføres på en vert. Lakselusens livssyklus går gjennom 8 stadier som skilles ved skallskifte (Hamre et al., 2013; Johnson & Albright, 1991), de ulike stadiene er illustrert av figur 1.



Figur 1. Oversikt over livssyklusen til lakselus. Illustrasjon: Sea Lice Research Centre, 2020, "SLRC - Life cycle of the salmon louse (*Lepeophtheirus salmonis*)", <https://doi.org/10.18710/GQTYYL>, DataverseNO, VI.

Stadiet 1 og 2 kalles nauplius og lever fritt i vannmassene og får næring fra plommesekken. Kopepoditt stadiet er det tredje stadiet, og det er i dette stadiet lusen må finne og infisere en vert før den dør av sult. I den påfølgende etableringsfasen som kopepoditt på verten er lusen på

sitt mest sårbar for å falle av, da den kun bruker 2. antenne og maxillipedsene for å gripe seg fast ved å føre de ned i vertens hud (Figur 2). Etter litt tid på verten som mobil kopepoditt vil en masse som danner frontal filamentet bli sekret og festet gjennom epidermisen som forankrer lusen til vertens basalmembran mens den skifter skall og går over til neste stadiet (Bron et al., 1991; Gonzalez-Alanis et al., 2001; Johnson & Albright, 1991). Stadiet 4 og 5 er chalimus 1 og 2, og i disse stadiene er lusen ubevegelig og fastsittende ved hjelp av frontalfilamentet som er sekret på verten. Stadie 6 (preadult 1), 7 (preadult 2) og 8 (adult) er bevegelige stadier der lusen kan forflytte seg på verten. Den forflytter seg rundt på verten ved å variere undertrykket dannet av cepalothorax og sekreterer frontalfilament når lusen gjennomgår skallskifte (Johnson & Albright, 1991).



Figur 2. Elektronmikroskop viser kopepoditt på en atlantisk laks finne. Kopepoditten griper med 2. antenne og maxilipedene ned i vertens hud, og har dradd kroppen litt fram og ned i epidermisen slik at cellene har løsnet litt i forkant av lusen. Bildet er brukt med tillatelse fra Aina-Cathrine Øvergård.

Når lakselusen når det adulte stadiet blir den kjønnsmoden og hunnlus begynner etter hvert å produsere eggstrenger. Enkelte mener at den i hver eggstreng kan putte 100-1000 embryo per par (Costello, 1993; *Generell biologi*, 2017; Heuch et al., 2000; Samsing et al., 2016). Ved 10 grader vil det ta ca. 40 til 52 dager for lusen å utvikle seg fra egg til adult (Johnson & Albright,

1991). Den raske reproduksjonen i tillegg til et høyt antall lus per eggstreng gir et økt smittepress på mulige verter som oppdrettsfisk og ville bestander. De tidlige stadiene fører til kløe og irritasjon, men det er de senere stadiene som gir den største skaden. Da spiser lusen også vertens blod i tillegg til slim og hud, og fører til kløende adferd og litt dypere sår (Dalvin et al., 2020; Finstad et al., 2000; Grimnes & Jakobsen, 1996; Heggland et al., 2020).

1.2 Hud – Teleoster

Som nevnt infesterer lakselusen verten og gjør skade på huden. Fisk lever i vann og har derfor et mye større mikrobielt press mot huden enn det landlevende dyr har (Kryvi & Poppe, 2021). Teleoster har levende epitelceller i alle lagene av huden som varierer i tykkelse og struktur i ulike områder på fisken. Hud kan deles inn i tre lag; epidermis, dermis og hypodermis. Epidermisen er det ytterste laget og består hovedsakelig av epitel- og slimceller. Dermisen består hovedsakelig av bindevev, og kan videre deles inn i *stratum spongiosum* der fiskeskjellene ligger (bortsett fra på hodet og finner), og *stratum compactum* som ligger under. I dermisen finner man også blodkar, pigmenter og nerveceller. Hypodermis er det siste laget før det går over i muskelvev, og består hovedsakelig av fettvev.

Huden er dekket av et multifunksjonelt slim, produsert av slimcellene som også kalles mukusceller eller gobletceller. Selve slimet består av muciner som er glykoproteiner med høy molekylærvekt som vil forme en glatt gele når de møter vann. I slimet er det også funnet lysozymer, immunoglobuliner, komplement proteiner, carbonisk anhydrase, lektiner, calmodulin og C-reaktivt protein (Nigam et al., 2012).

Slim er komplekst og er forskjellig fra art til art og kan endres ved ulike infeksjoner. Det er funnet at slimets egenskaper hos karper endres i takt med økt mengde bakterier i vannet, og at de kan ha en økt slimproduksjon selv om kliniske responser ikke kan detekteres (Van Der Marel et al., 2010). I en annen studie ble atlantisk laks, ørret og regnbueørret smittet med AGD, og hos atlantisk laks og ørret endret slimlaget seg over hele fisken som respons mot infestasjonen, mens hos regnbueørret var endringen i slimet lokalt begrenset til gjellene (Roberts & Powell, 2004). Dette sier litt om hvor komplisert slimlaget til fisk er.

1.2.1 Sår og sårheling

Sårskader er et gjentakende problem for oppdrettsfisk som følge av blant annet lusebehandling, notskift, notvask, predatorer, vær, strøm, sykdom, transport, og ikke minst som følge av

luseinfestasjoner (Takle et al., 2015). Sår kan forstyrre osmosereguleringen, åpner for sekundære infeksjoner og kan generelt gi dårligere fiskevelferd. Sårheling deles inn i flere steg; hemostase, inflammasjon, reparasjon av celler, proliferering av epitelceller, og til slutt lukking av såret (Richardson et al., 2013). I motsetning til pattedyr danner ikke fisk arr i stor grad. Hvordan sår hos fisk heles blir påvirket av blant annet hvor dypt såret er og temperatur da fisk er vekselvarme. Ikke overraskende heles overflatesår raskere enn sår som går ned i muskelvevet (Bullock et al., 1978; Ream et al., 2003; Richardson et al., 2013).

Når et sår oppstår vil «damage-associated molecular patterns» (DAMPs) frigis og tiltrekke leukocytter som neutrofile granulocytter og makrofager til skadestedet, blodårer trekkes sammen og blodet koagulerer (Quilhac & Sire, 1999). Deretter vil celler migrere over det skadede vevet og differensieres til basalceller og overflateceller, og lukke såret i midten. Fra en studie med sår hos postsmolt så man de to første ukene etter sår dannelse; hemostase, akutt inflammasjon, og reparasjon i epidermis (Sveen et al., 2019). Huden begynte å trekke seg sammen 14 til 36 dager etter sår dannelse, og uttrykking av de fleste immungenene ble redusert etter to uker, da huden igjen begynte å bli intakt. I samme studie så man også at slimet var mer heftende da det var økt transkripsjon av glykosyltransferaser, som kan indikere at slim endrer seg i en sårhelingsprosess.

1.3 Lakselusens patogenese

Lakselus skader verten i ulik grad gjennom livssyklusen (Dalvin et al., 2020), men felles for stadiene er at de gir sårskader. I de tidlige lusestadiene er lakselusen i kontakt med verten via 2. antennen, frontalfilamentet og maxillipedene for bevegelse, mens munntebulen beiter på vertens hud (Bron et al., 1991). I dette stadiet kan man hovedsakelig se ødeleggelse av celler i epidermis, det vil si erosjoner. Når frontalfilamentet er sekret ned på verten er det rapportert om overraskende lite immunrespons, men det forekommer at epitelceller løsnet rundt filamentet (Jones et al., 1990). Frontalfilamenter som ble stående igjen i huden førte derimot til hyperplasi og fibroplasia som innkapslet dem i noder, disse så man senere som melaniserte ringer. I chalimus I og II er det beskrevet runde sår med 2-3 mm diameter som kommer av at lusen spiser rundt frontalfilamentet (Wootten et al., 1977). Det er foreslått at måten lakselus beveger seg ikke gir særlig skade på huden, men fører til irritasjon og kløe. Denne irritasjonen øker med livsstadiene og kan føre til adferd hos verten som kan gi skader i form av rifter (Kabata, 1974a).

Preadulte og adulte lus er bevegelige, hovedsakelig ved å bruke marginalmembranen rundt cephalothorax til å skape vakuum mellom lusen og verten, i tillegg til å bruke 2. antennen, maxillipedsene og sekundær maxillia (Jønsdøttir et al., 1992). Denne studien fant at det er i de preadulte og adulte stadiene lakselusen gjør mest skade på verten ved beiting. Noen ganger kunne man også se hvordan det ble dannet en forhøyning av epitelceller foran lusen ettersom cephalothorax ble presset ned i vertens hud. Videre viste studien varierte resultater fra nesten ikke synlige lesjoner, til alvorlige lesjoner. Lakselusen befant seg spesielt på dorsalside av hodet, mellom dorsal finnen og fettfinnen, og ventralt bak analfinnen. De alvorligste lesjonene var dype, og man kunne se blødning og skjelltap. Selve beitingen er antatt å foregå ved at en strigil med tenner på enden i munntebulen skraper løst slim og vev fra verten og at mandiblene fører det inn mellom labium og labrum (Kabata, 1974b). Beiting, og skjelltap som følge av kløende atferd kan føre til osmotisk stress og sekundære infeksjoner (Takle et al., 2015).

1.3.1 Immunmodulering

Teleoster har et medfødt og adaptivt immunsystem, også i de mukosale overflatene som hud (Salinas, 2015). Det medfødte immunforsvaret består av uspesifikt forsvar med blant annet komplementsystem, cytokiner, kjemokiner, immunceller som makrofager, neutrofile, eosinofil, basofile, dendrittiske celler og uspesifikke cytotoxiske celler (NCC). Det adaptive forsvaret består av spesifikt forsvar med spesifiserte B- og T-celler. Dette er noe patogener, deriblant, parasitter må overkomme for å etablere infeksjon og kunne fullføre livssyklusen. Når lakselus infiserer en mottakelig laksefisk som atlantisk laks eller regnbueørret, ser man kun en mild og relativt lokal økning av gen forbundet med inflammasjon, og stort sett lite eller ingen oppregulering av adaptive immunmarkører (Braden et al., 2012; Dalvin et al., 2021; Dalvin et al., 2020; Øvergård et al., 2018). Fiskeparasitter generelt har flere strategier for å unngå immunforsvaret til verten, de kan leve intracellulært eller utenpå verten (ektoparasitter) slik som lakselus, variere antigener på overflaten, være resistent mot humorale og cellulære faktorer og modulere immunresponsen gjennom immunsuppresjon (Sitjà-Bobadilla, 2008).

At parasitter har immundepende egenskaper er blitt demonstrert for de fleste parasittartene som infiserer mennesker. Mer nylig har dette også indirekte blitt antydnet i fisk, ved at fisk som er infisert med parasitter er mer sårbar for blant annet bakterie- og virusinfeksjoner. Dette er observert i harr (*Thymallus thymallus*) infisert med *Diplostomum spathaceum* (Pylkkö et al., 2006), gyllen havkaruss (*Sparus aurata*) infisert med *Cryptosporidium molnari* (Sitjà-

Bobadilla et al., 2006) og chinook laks infisert med *Nanophyetus salmincola* (Jacobson et al., 2003). Det har blitt vist at laks koinfisert med lakselus og ILA hadde en økt dødelighet når lakselusen ble preadult (Barker et al., 2019). Det har også blitt observert at regnbueørret (*Oncorhynchus mykiss*) infisert med lakselus er mer mottagelig for *Loma salmonae* (Mustafa et al., 2000). I samme studie ble det sett en nedgang i fagocytisk aktivitet og evnen til å produsere reaktive oksygenforbindelse i makrofager isolert fra lakselusinfisert fisk. *Paramoeba perurans*, som forårsaker «amoebic gill disease» (AGD) er funnet å nedregulere transkripsjon av procathepsin L, cathepsin H forløper og cystatin B som alle er involvert i apoptose (Wynne et al., 2008). Det har også nylig blitt funnet immunmodulerende proteiner fra lakselusens spyttkjertler (Øvergård et al., 2022).

1.3.2 Lakselusens kjertler

Lakselusen kan beskrives som en blod-spisende parasitt, spesielt i de senere livsstadiene (Heggland et al., 2020). Eksokrine kjertler er spesielt viktige for interaksjonen mellom den blod-spisende parasitten og verten, ved å sekreere substanser som demper immunresponser og blodkoagulering hos verten (Sauer et al., 2000). Det har tidlig blitt vist at lakselusen har ulike typer kjertler, som sekreerer ut substanser (Bell et al., 2000; Bron et al., 1993). Det er funnet 4 ulike kjertler hos lakselus; tegumental kjertel 1-3 (videre kalt teg 1-3) og labialkjertel (videre kalt spyttkjertel) (Øvergård et al., 2016). Enkelte av disse antas å sekreere substanser som kan ha effekt på vert-parasitt interaksjonen. De ulike kjertlenes tilstedeværelse varierer med hvor i livssyklusen lakselusen befinner seg.

Teg 1 og 2 kjertlene er til stede fra nauplii I stadiet og utover, og har porer i kutikula på både ventral og dorsal side av lusen (Øvergård et al., 2016). Teg 1 er den mest tallrike kjerteltypen, mens Teg 2 har tidligere blitt navngitt etter plassering som medial, anterior, lateral og posterior kjertler (Bell et al., 2000), i tillegg til å være lokalisert på beinpar 1 og 2 (Øvergård et al., 2016). Det er foreslått at teg 1 og 2 kjertlene grunnet plassering og utførselskanaler kan være involvert i produksjon av sekret som smører cuticula og har en antimikrobiell funksjon (Bányai et al., 1994; Harasimczuk et al., 2018; Øvergård et al., 2016). Teg 3 kjertlene er ikke observert før preadult I stadiet og er jevnt fordelt lateralt med fem kjertler på hver side av cephalothorax, innenfor det subepidermale vevet med utførselskanaler ut i marginalmembranen (Øvergård et al., 2016). Videre har lakselus to spyttkjertler, som er først observert hos frittlevende kopepoditter. Spyttkjertlene ligger ovenfor munntebulen, anterior for hjernen. Disse har reservoar for sekreter med utførselskanaler som går relativt distalt i munntebulen, i nærheten

av mandiblene. At spyttkjertlene er utviklet ved kopepoditt stadiet og at sekretet antageligvis blir avsatt på vertens hud kan antyde en immunmodulerende funksjon (Øvergård et al., 2016; Øvergård et al., 2022).

Som nevnt tidligere har det blitt undersøkt ulike substanser som sekreses fra lakselus for å se på mulige immunmodulerende funksjoner. Tidlige studier så på sekretoriske og ekskretoriske produkter samlet.

En slik studie indikerte at et trypsin og prostaglandin E₂ (PGE₂) kunne begrense inflammasjon hos verten og ble sekret i forbindelse med lakselusens beiting (Fast et al., 2007). I studien ble cellekulturer basert på hodenyre fra laks, tilsatt PGE₂ som reduserte uttrykk av IL-1 β og MHC I. Dette har imidlertid ikke blitt bekreftet i senere studier der tre antatte PGE₂ syntetaser ble nedregulert i lakselus (Dalvin et al., 2021). Fra RNAi knock down forsøket ble det ikke funnet endringer i fenotype, reproduksjon eller indikasjoner på immunmodulerende funksjon.

Fem gener som er assosiert med spyttkjertlene i lakselus har imidlertid nylig blitt identifisert der noen har vist seg å ha en immundempende effekt, kalt «*Lepeotheirus salmonis* labial gland protein 1-4» (LsLGP 1-4) og «*Lepeoptheirus salmonis* labial gland protein 1 - like» (LsLGP11) (Øvergård et al., 2022). De funksjonelle studiene som ble gjennomført antydte at LsLGP1 og/eller LsLGP1L regulerer uttrykk av andre gener i spyttkjertelen. Videre ble det funnet at LsLGP2 demper cytokiner involvert i inflammasjon, og ble uttrykt i alle parasittiske livsstadiene. LsLGP3 ble oppregulert i de bevegelige stadiene og hadde en dempende funksjon på cellulære immunresponser. Under skallskifte til preadult I stadiet sammenfalt oppregulering av LsLGP4. Det er i dette stadiet lakselusen spiser blod, og man antok at LsLGP4 kunne ha en antikoagulerende effekt. Dette ble underbygget av at syntetisk LsLGP4 økte koaguleringstiden til plasma i et in vitro assay. Dette bekrefter antagelsen om at lakselus sekreter ut modulerende substanser på verten som demper både immuneresponser og koagulasjon.

1.4 Astaciner og ShK

Gjennom RNAsekvensering av spyttkjertlene til lakselus har man predikert flere gener som uttrykkes her og som dermed er interessante å karakterisere for å forstå vert-parasitt interaksjonen. Blant genene som er predikert til å være uttrykt i spyttkjertelen er det en rekke gener som antas å kode for et astacin domene og flere ShK-domener (personlig kommunikasjon, Aina-Cathrine Øvergård). Astaciner er metallopepsidaser som kan være både membranbundet eller sekret (Gomis-Rüth et al., 2012). Denne gruppen har N-terminale signalpeptider, sink-

avhengige katalytiske domener, nedstrøms ekstracellulære domener, og noen har transmembrane ankre og cytosoliske domener. Astaciner blir videre gruppert i metzincin delen av metallopeptidasene på grunn av en utvidet sink-bindende motif som inkluderer tre metall ligander (Gomis-Rüth et al., 2012).

Astaciner ble først beskrevet på 1960-tallet og ble da kalt «crayfish small-molecule protease» eller «*Astacus* protease» (Sonneborn et al., 1969). Det ble funnet i europeisk ferskvanns kreps, *Astacus astacus* og er her beskrevet som en protease involvert i fordøyelsen. Det var først i 1991 at disse proteinene fikk termen astacin som refererer til ekstracellulære sink endopeptidaser (Dumermuth et al., 1991; Stöcker et al., 1991). Senere har astaciner blitt funnet i flere hundre dyrearter og bakterier, seks ulike er funnet i mennesker og opptil 40 ulike i rundormen *Caenorhabditis elegans* (Möhrlen et al., 2003), med et bredt spekter av funksjoner. Noen eksempler er «embryonic protein» (UVS.2) i afrikansk klofrosk (*Xenopus laevis*), som er viktig for den dorsoanteriore utviklingen av embryoet (Sato & Sargent, 1990), mens tolloid i bananfluer (*Drosophila melanogaster*) er viktig for differensieringen av celler langs dorsal-ventral aksene (Shimell et al., 1991). «Low choriolytic enzyme» (LCE) og «high choriolytic enzyme» (HCE) er i japansk risfisk (*Oryzias latipes*) enzymer som er avgjørende for at larven skal kunne klekke ut av skallet (Yasumasu et al., 1992). Andre foreslåtte funksjoner for astaciner er å aktivere vekstfaktorer, bryte ned polypeptider og prosessere ekstracellulære proteiner (Bond & Beynon, 1995).

I *C.elegans* er astacinene samlet i seks undergrupper basert på hvilke domener de har i tillegg til astacin (Möhrlen et al., 2003). Fire av disse uttrykkes i hypodermis og har blitt funksjonelt karakterisert til å fordøye eggeskall og prosessere komponenter i kutikula (Davis et al., 2004; Hedgecock et al., 1987; Hishida et al., 1996; Novelli et al., 2004; Suzuki et al., 2004).

I brune edderkopper (*Loxosceles*), er det funnet astacin-lignende toksiner kalt LALPS som muligens kan paralisere eller drepe edderkoppens insektbytte (Trevisan-Silva et al., 2010). Det er observert nekrose i hud og hemorragiske forstyrrelser som redusert blodplatehefting rundt bitt fra *Loxosceles*, og det er foreslått at LALP's kan være involvert her ved å bryte ned ekstracellulært matrix og hemme sårheling (Barbaro et al., 2005; Medved et al., 2001; Ricard-Blum & Ballut, 2011; Silveira et al., 2007; Trevisan-Silva et al., 2010).

Hakeorm (*Ancylostoma caninum*), er en parasitt som infiserer særlig hunder, men også mennesker. De infiserer gjennom hudkontakt og penetrerer verten via hårfolliklene. Disse ormene sekreterer et astacin, Ac-MTP-1 i det infektive larve stadiet og det er indikert at det har en kritisk rolle i penetreringen og nedbrytning av makromolekyler i huden (Williamson et al.,

2006). Dette astacinet ligner på peptidaser fra frittlevende og parasittiske nematoder, inkludert stronglyastacin, som er antatt å ha en rolle i den invasive delen av infeksjonen.

Noen astaciner i evertebrater har et stichodactyla toksin domene (videre kalt ShK), dette er et toksin som først ble funnet i *Stichodactyla helianthus*, en sjøanemone i Karibien (Castañeda et al., 1995). Det er en gift som er sekretet i mucus til sjøanemonen som en del av dens forsvar, og er et 35-residue peptid toksin som påvirker kaliumkanaler. ShK-toksinet binder til alle subenheter i kalium-kanalen og blokkerer den. Kaliumkanaler er i cellemembranen og har som funksjon å slippe kaliumioner gjennom for å danne membranpotensialet og aksjonspotensialer (Kuo et al., 2005). I *C. elegans* er det seks subgrupper med astaciner der to av de har ShK domene i tillegg til astacin domene (Möhrle et al., 2003). Disse subgruppene kalles subgruppe II og subgruppe IV. I subgruppe II har man astacinene nas-6 til nas-15 som har flere SXC/ShK-domener. Subgruppe IV har et SXC/ShK-domene i tillegg til EGF- og CUB-domener.

1.5 Nellikolje – Eugenol og iso-eugenol

Parasittiske infestasjoner kan dempe immunresponser, men det kan også stress (Tort, 2011). Transport og håndtering av fisk som brukes i forsøk kan føre til dårlig dyrevelferd på grunn av unødig stress som igjen kan påvirke resultatene. I den forbindelse er det mulig å tilsette nellikolje i transport vannet som absorberes over hud og gjeller, da dette har en beroligende effekt og reduserer stress. Nellikolje blir laget av blomsten og knoppene fra nelliktreet (*Syzygium aromaticum*) (Chaieb et al., 2007). De aktive ingrediensene i nellikolje er eugenol (4-allyl-2-methoxyphenol) og isoeugenol (4-propenyl-2-methoxyphenol). Aqui-S® (MSD Animal Health) som er et velkjent bedøvelses middel til fisk består av 50% isoeugenol. Det er i mange år blitt brukt som en mild lokal bedøvelse mot tannpine, hodepine og leddsmerter hos mennesker (Ross et al., 2008), og er også et potent og effektivt bedøvelse for fisk i oppdrett og forsøk (Keene et al., 1998; Ross et al., 2008). Det er stadig utvikling av metoder for å bedre fiskevelferd, og det er antydning at et mye brukt bedøvelsesmiddel for å avlive sebrafisk (*Danio rerio*), MS-222 gir en ubehagelig opplevelse for fisken (Readman et al., 2013; Wong et al., 2014). Denne stressresponsen kan gjøre MS-222 mindre anvendelig for enkelte studier. Nellikolje har da blitt foreslått som et like eller mer effektivt avlivningsmiddel (Davis et al., 2015). I en annen studie ble plasma kortisol, osmoseregulering og dødelighet sammenliknet hos to grupper (bedøvet med nellikolje og ikke bedøvet) laks i smoltstadiet under transport og overføring til sjø (Iversen et al., 2009). Plasma kortisol og osmoseregulering målte ingen

forskjell mellom gruppene. Men gruppen som ble transportert i 4 mg⁻¹ nellikolje hadde 2,1 % dødelighetsrate, mens den ubedøvede hadde 12,2 %. Dette viser at i noen tilfeller kan nellikolje være et supplement for å bedre fiskevelferden.

Det er ulike studier som viser at nellikolje kan være immundempende. En *in vitro* studie med epitelceller fra tarm i gris eksponerte cellene for 16,42 mg/l eugenol i 2 timer og stimulererte deretter med lipopolysakkarider (LPS) (Hui et al., 2020). Målinger av cytokin sekresjonen viste betydelig nedregulering av interleukin 8 (IL8) og tumor nekrose faktor- α (TNF α). Noe lignende ble også observert i en studie med mus, der eugenol ble injisert en time før LPS stimulering (Huang et al., 2015). Der fant de indikasjoner på at eugenol kan dempe produksjonen av cytokiner ved å regulere inflammasjonen. Dette tyder på at nellikolje ikke er egnet som beroligende middel i forsøk som ser på immunresponser og burde kartlegges mer.

1.6 Målet med studien

På bakgrunn av at man mistenker at atlantisk laks blir immunmodulert av lakselus har det blitt gjennomført RNAseq av området rundt spyttkjertlene. Der har man funnet flere astaciner, proteaser med et stort spekter av funksjoner i ulike arter. Det ene astacinet, «*Lepeoptheirus salmonis* labial gland astacin 5» videre kalt LsLGA5 skal karakteriseres for å antyde hvilken funksjon det har i vert-parasitt interaksjonen.

Delmålene:

- Sekvensere og bekrefte leserammen til LsLGA5 via «Rapid Amplification of cDNA Ends» (RACE) og Topo-kloning. Og videre bruke sekvensen i bioinformative verktøy for å kunne indikere om det er et aktivt enzym og eventuelt slektskap til andre sekvenser med kjent funksjon.
- Bekrefte at LsLGA5 uttrykkes i spyttkjertelen via *in situ* hybridisering.
- Analysere prøver fra ontogenetisk studie for å se når LsLGA5 blir uttrykt i lakselusens livssyklus.
- Undersøke hvordan lus med nedregulert LsLGA5 via RNAi knock down påvirker vertens lokale immunrespons.
- Analysere om fisk flyttet i nellikolje i forkant av forsøket har en innvirkning på uttrykket av utvalgte immungener.

2.0 Material og metode

2.1 RNA isolering

RNA-ekstraksjon ble gjennomført med protokollene Tri Reagent® protokoll (Sigma-Aldrich) steg 1A og 2, og RNeasy® Micro Handbook Second edition December 2007 (Qiagen) fra steg 4 side 27 og frem til steg 13 side 29. Prøvene ble tilsatt 1 ml Trizol (Sigma-Aldrich) og ca. 650 mg zirkoniumoksid keramiske kuler og ble deretter homogenisert i 5 min ved 30 Hz i TissueLyser II (Qiagen). Prøvene stod 5 min i romtemperatur og ble deretter tilsatt 0,2 kloroform (Sigma-Aldrich) og ristet kraftig i 15 sek, etterfulgt av 2 min i romtemperatur. Prøvene ble så sentrifugert i 40 min ved 4 °C på 21 000 x G. Dette fase-separerte prøvene i tre lag; RNA øverst, DNA i midten og protein nederst. Her gikk jeg videre med nevnt protokoll for RNeasy® Micro kit (Qiagen) med noen endringer. I steg 4 ble volumet endret, 450 µl fase-separert RNA ble overført til rør med 450 µl 70% etanol. Og i steg 13 ble RNA eluert ut i 14 µl RNase fritt vann, det ble eluert 2 ganger med samme vann for å få høyere konsentrasjon. Alle prøvene ble målt på NanoDrop™ One (Thermo Scientific) og lagret på -80°C.

2.2 cDNA syntese

cDNA syntese er en metode der revers transkriptase enzymer transkriberer rensert totalRNA til cDNA. cDNA syntese til vanlig PCR ble gjort i henhold til qScript® cDNA SuperMix protokollen (Quanta Bioscience). Det ble brukt totalRNA fra fastsittende kopepoditter. Komponentene i cDNA syntesen var 1 x qScript cDNA SuperMix, 1000 ng RNA templat fra fastsittende kopepoditter og RNase-fritt vann opptil totalt 20 µl. Dette ble inkubert i termosyklus i 5 min på 25 °C, 30 min på 42 °C, 5 min på 85 °C, deretter holdt på 4 °C.

cDNA til bruk i sanntids PCR ble syntetisert med AffinityScript QPCR cDNA synthesis kit i henhold til protokollen (Agilent Technologies). Fra protokollen er det totale volumet 20 µl for en standard reaksjon, dette ble redusert til 15 µl. En 15 µl reaksjon bestod av 1 x first stand master mix, 225 ng oligo (dT) primer, 0,75 µl AffinityScript RT/RNase Block enzyme mixture og 1500 ng total RNA. Syntesen ble kjørt på Miniamp Thermal Cycler (Applied Biosystems™ by Thermo Fisher Scientific) i henhold til protokollen. Deretter ble prøvene fortynt 1:5 med RNase fritt vann og lagret på -20 °C.

2.2.1 Polymerasekjedereaksjon – PCR

PCR brukes for å amplifisere spesifikke fragmenter av DNA ved å bruke spesifikke primere til det DNAet som skal amplifiseres. PCR-reaksjonene ble utført i henhold til GoTaq® G2 DNA Polymerase protokollen (Promega). En master mix til PCR reaksjonene ble laget med 1 x Green GoTaq® Reaction Buffer, 0,1 mM dNTP, 0,2 mM forward og revers primer, 2,5 U GoTaq® G2 DNA Polymerase, 1 µl templat DNA, og RNase-fritt vann opptil 25 µl. Dette ble amplifisert i en Applied Biosystems™ Veriti™ 96-Well Thermal Cycler (videre kalt termosykler). En standard PCR-reaksjon ble amplifisert på 94 °C i 2 min, deretter 30 sykluser med 94 °C i 30 sek, 59 °C i 15 sek, 72 °C i 15 sek og 72 °C i 1 min, deretter 72 °C i 5 min og holdt på 4 °C.

2.2.2 Gelelektroforese

PCR-produkter ble kjørt på gelelektroforese for å indikere størrelsen på produktene. Gelen bestod av 1 % agarose (Seakem LE Agarose, Lonza) i 1 x TAE buffer (40 mM TRIS, 1 mM EDTA pH 8,0) tilsatt 1 µl GelRed™ (Sigma-Aldrich) per 25 ml gel. For å estimere basepar lengden på PCR-produktet ble det tilsatt 2 µl GeneRuler DNA Ladder Mix (Thermo Fisher) i første brønn. Det ble brukt 5 µl PCR-produkt per brønn. PCR produkter som ikke inneholdt farge i bufferen, ble tilsatt 1 x DNA Gel Loading Dye (Thermo Fisher) før overføring til gelen. Gelelektroforesen ble kjørt på 90 volt i 30 minutter. GelLogic 212PRO med UV—lys ble brukt for å observere produktene.

2.3 TOPO-kloning

TOPO® TA Cloning® Kit er en metode for å ligere PCR-produkter inn i plasmider, som deretter kan transformeres inn i One Shot™ TOP10 Chemically Competent *E. coli* (Thermo Fisher), som videre dyrkes for å klonе PCR-produktet. Dette ble gjort i henhold til protokollen (Thermo Fisher), med halvert volum. I TOPO reaksjonen ble det brukt 2 µl PCR-produkt. Dette ble inkubert i 5 min i romtemperatur, deretter plassert på is frem til transformering inn i One Shot® Mach1™-T1R Competent Cells. Transformeringen fulgte tidligere nevnte protokoll med halverte volum. I transformeringen ble 1 µl av TOPO® vector løsningen tilsatt i 25 µl One Shot™ TOP10 Chemically Competent *E. coli* (Thermo Fisher) og blandet forsiktig. Løsningen ble satt på is i 5 min, deretter varmesjokket i 30 sekunder på 42 °C og overført til is. Deretter ble det tilsatt 125 µl S.O.C medium og inkubert på varmeblokk ved 37 °C i 60 min på 650 rpm.

Bakteriene ble sådd ut på forvarmede LB-medium agarskåler med $100 \mu\text{g ml}^{-1}$ ampicillin og inkubert på $37 \text{ }^\circ\text{C}$ over natt.

Utvalgte kolonier ble plukket og brukt som templat i en PCR-reaksjon for å lage PCR-produkt til sekvensering. Komponentene i PCR-reaksjonen var like som i seksjon 2.1.1, med M13 forward og M13 revers primere. PCR-reaksjonen ble amplifisert på termosyklus $94 \text{ }^\circ\text{C}$ i 5 min, deretter 25 sykluser med $94 \text{ }^\circ\text{C}$ i 30 sek, $55 \text{ }^\circ\text{C}$ i 15 sek og $72 \text{ }^\circ\text{C}$ i 1 min etterfulgt av $72 \text{ }^\circ\text{C}$ i 5 min og holdt på $4 \text{ }^\circ\text{C}$.

2.3.1 Rensing av PCR produkt

PCR-produkt ble rensset for å fjerne ubrukte nukleotider og primere med illustra™ ExoProStar™ 1-STEP (Cytiva). Protokollen ble halvert, og det ble brukt $2,5 \mu\text{l}$ PCR-produkt og $1 \mu\text{l}$ illustra™ ExoProStar™ 1-STEP (Cytiva). Dette ble inkubert på termosyklus på $37 \text{ }^\circ\text{C}$ i 15 min, deretter $80 \text{ }^\circ\text{C}$ i 15 min. Deretter ble PCR-produktet fortynnet 1:5 før sekvensering.

2.3.2 Sanger-sekvensering

Sanger-sekvensering er en metode for å finne nukleotidsekvensen til et PCR-produkt. PCR-produktet blir amplifisert sammen med en blanding av deoksyribonukleotider og fluoriserende dideoksynukleotider. Elongeringen av fragmentet stopper når et fluoriserende dideoksynukleotid er festet, og dette gir fragmenter med ulik lengde der den maksimale lengden er 1000 basepar (bp). Sekvenseringsmaskinen som brukes vil da fange opp fluorescens fragmenter fra minst til størst som til slutt gir den komplette sekvensen. Til dette ble BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Thermo Fisher) benyttet, en reaksjon inneholdt $1 \mu\text{l}$ BigDye™ Terminator v3.1 Ready Reaction Mix, $0,5 \times$ Sequencing Buffer, $1 \mu\text{l}$ templat og RNase fritt vann opptil $10 \mu\text{l}$. Dette ble kjørt på termosyklus på $96 \text{ }^\circ\text{C}$ i 5 min, deretter 25 sykluser med $96 \text{ }^\circ\text{C}$ i 10 sek, $50 \text{ }^\circ\text{C}$ i 5 sek og $60 \text{ }^\circ\text{C}$ i 4 min, og deretter holdt på $4 \text{ }^\circ\text{C}$. Deretter ble det fortynnet med RNase fritt vann opptil $20 \mu\text{l}$, og sekvensert med Applied Biosystem 3730XL Analyser ved sekvenseringslaboratoriet ved Universitetet i Bergen.

2.3.3 Rensing av plasmid

Analyser av den predikerte nukleotidsekvensen til LsLGA5 via Basic Local Alignment Search Tool (videre kalt BLAST), National Center for Biotechnology Information (NCBI) (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) har vist at lakselus har flere astaciner som ligner på LsLGA5. For å få et rent templat uten paraloger og amplifisering av andre astaciner, ble plasmider fra kolonidyrking sekvensert og bekreftet at det var LsLGA5. Deretter ble de utvalgte koloniene sådd ut på nye agarskåler md LB medium. Deretter ble det rensset med Monarch® Plasmid Miniprep Kit (New England BioLabs®Inc.) i henhold til protokoll. Dette ble brukt som templat til syntese av *in situ* hybridiserings (ISH) probe og dobbeltrådig RNA (dsRNA) til RNAi knock down forsøk.

2.4 RACE – Rapid Amplification of cDNA Ends

LsLGA5 sekvensen (EMLSAT00000010888) er predikert ut fra den genomiske sekvensen til lakselus (Skern-Mauritzen et al., 2021), men ikke bekreftet. Når en del av en sekvens er kjent, kan man bruke RACE som metode for å finne nukleotidsekvensen i 5' ende og 3' ende. SMARTer® RACE 5'/3' Kit (Clontech Laboratories, Inc/A Takara Bio Company) ble brukt i henhold til protokoll. Primere basert på den predikerte sekvensen til LsLGA5 ble designet i Geneious Prime 8 (Dotmatics) og er listet i tabell 1.

Tabell 1. Primere genspesifikk til LsLGA5 brukt i RACE.

Primer	Reaksjon	Sekvens (5' → 3')
5' LsLGA5	5' reaksjon	CTGGGTCTGCATTGGGGTGGTACGAT
3' LsLGA5	3' reaksjon	GGTCATGAGCAAACACGACCTGACCG
3'2 LsLGA5	3' reaksjon	TAATACCACTATCGTACCACCCCAATGCAG

Templatene som ble brukt var syntetisert av Heidi Kongshaug i henhold til SMARTer RACE 5'/3' Kit protokollen (Takara Bio) der totalRNA fra fastsittende kopepoditter ble brukt for cDNA syntese. PCR reaksjonene inneholdt 1 x Advantage® 2 PCR Buffer, 1 x dNTP Mix (10mMol), 1 x Universal Primer A Mix (UPM), 1 x Advantage® 2 Polymerase Mix, 1 µl templat, 0,2 µM primer og RNase fritt vann opp til 25 µl. Dette ble kjørt på termosyklus på 95

°C i 2 min, deretter 35 sykluser med 94 °C i 30 sek, 64 °C i 30 sek, og 72 °C i 1 min, etterfulgt av 72 °C og holdt på 4 °C.

5' – og 3' - produktene ble transformert inn i plasmider for ligering, transformering, kloning og videre dyrking som nevnt i seksjon 2.3. Det ble amplifisert PCR-produkt av koloniene i henhold til seksjon 2.2.1, men det ble brukt 1 x Green GoTaq® Reaction Buffer istedenfor 1 x Colorless GoTaq® Reaction Buffer.

RACE-produktene ble rensset i henhold til seksjon 2.3.1 og deretter brukt i BigDye reaksjon som beskrevet i seksjon 2.3.2. Prøvene ble deretter sekvensert av sekvenseringslaboratoriet ved Universitetet i Bergen med 3730 xl DNA analyser.

2.5 Sekvensering av åpen leseramme

Det ble designet primere basert på resultatene fra RACE som ble sammenstilt i Geneious prime 8 (Dotmatics) for å ta ut hele den åpne leserammen til LsLGA5 for sekvensering. Primere i tabell 2 ble brukt i en standard PCR reaksjon (seksjon 2.2.1). PCR-produktet ble klonet i henhold til TOPO-kloning (seksjon 2.3). Kolonier ble valgt ut etter gelelektroforese (seksjon 2.1.2), disse ble amplifisert (seksjon 2.2), PCR produktet ble rensset (seksjon 2.3.1) og behandlet i henhold til seksjon 2.3.2 for sekvensering og levert til sekvenseringslaboratoriet på Universitetet i Bergen.

Tabell 2. Genspesifikke primere til LsLGA5 brukt for å sekvensere den åpne leserammen.

Primer	Sekvens (5' → 3')
Forward	AGCATATTCCGAACTGAGCCAT
Revers	CCACAAGTGGCTTTACAATTCTC

2.6 Analyse av sekvenser med bioinformatiske databaser

Sekvensfragmentene fra RACE og sekvenseringen av den åpne leserammen ble sammenstilt med predikert sekvens ved bruk av Geneious Prime 8 (Dotmatics). Dette programmet ble også brukt til å translaterer nukleotidsekvensen til aminosyresekvens. Samme program ble også brukt for å finne isoelektrisk punkt, ladning og størrelse. Aminosyresekvensen ble sammenliknet med andre sekvenser hos andre mulige arter gjennom BLAST. Alle sekvenser ble sammenstilt med

Clustal Omega Alignment (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>). Den translatererte aminosyresekvensen ble analysert i SignalP-5.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) for å finne mulig signalpeptid. Videre ble aminosyresekvensen karakterisert i InterProScan (<https://www.ebi.ac.uk/interpro/>) for å finne protein familie, domener og konserverte seter.

2.7 *In situ* hybridisering

In situ hybridisering (ISH) brukes for å lokalisere hvor i vev eller celler på et histologisk snitt et spesifikt mål mRNA er uttrykt. Det gjøres ved å lage prober som er antisens komplementær til mRNAet og vil binde til det. Probene består av blant annet digoxigenin, og ved tilsetning av anti-DIG antistoff med alkalisk fosfatase (AP) og BCIP/NTB, da vil AP reagere med BCIP å farge preparatet lilla ved tilstedeværelse av det spesifikke mål mRNAet.

Til *in situ* hybridisering ble det brukt formalin fiksert (4 % paraformaldehyd) chalmus I, som var støpt i parafin og snittet og lagt på Superfrost® Plus objektglass (Thermo Scientific). Trypsin antisens- og sensprober til kontroll var laget av Heidi Kongshaug.

2.7.1 Probesyntese

Det ble laget sens (S) og antisens (AS) prober spesifikk til LsLGA5 for ISH. For å lage PCR-produkt til syntetisering av prober ble rensede plasmider (se seksjon 2.3.3) brukt som templat og amplifisert med spesifikke T7-primere, se tabell 3. Dette gav et PCR-produkt med T7 promotor sekvens. PCR-produktet ble rensert med GenElute™ PCR Clean-Up Kit (Sigma-Aldrich) i henhold til protokoll. Det rensede PCR-produktet ble brukt til syntese av probe med DIG RNA labelling kit (Roche). Syntesen bestod av 1 x DIG label mix, 1 U RNase inhibitor, 1 x transkripsjons buffer, 1 U T7 polymerase og RNase fritt vann opptil 20 µl. Dette ble inkubert ved 37 °C i 2 timer på termosyklar. For å fjerne DNA ble det tilsatt 2 U DNase I til reaksjonen og inkubert i 15 minutter på 37 °C på termosyklar. DNase behandlingen ble stoppet med 0,2 M EDTA. For å felle ut probene ble det tilsatt 1 µl GenElute LPA (25ug/µl), 2 µl 4 M LiCl og 66 µl 100 % EtOH. Probene ble inkubert på -20 °C over natt og deretter sentrifugert på 4 °C i 30 min for å separere supernatant og pellet. Pelleten ble vasket med 1 ml kald 70 % EtOH i DEPC og deretter sentrifugert på 4 °C i 15 minutter. Pelleten ble tørket og vannbehandlet i 40 µl DEPC. Konsentrasjonen ble målt med Nanodrop® ND-1000 Spectrophotometer (Thermo Fisher). Probene ble lagret på -80 °C.

Tabell 3. Primere brukt til probesyntese av antisens (AS) og sens (S) prober til ISH. Trypsin prober ble brukt som kontroll.

Primerpar	Retning	Sekvens (5' → 3')
AS LsLGA5	Forward	TTCCGAACTGAGCCATGCTCAA
	Revers (T7)	(TAATACGACTCACTATAGGG)CGAATTCCAAACG GTACAGGTCTCAG
S LsLGA5	Forward (T7)	(TAATACGACTCACTATAGGG)TTCCGAACTGAGCC ATGCTCAA
	Revers	CGAATTCCAAACGGTACAGGTCTCAG

2.7.2 *In situ* hybridisering, dag 1

I denne *in situ* hybridiseringen ble det brukt snitt med chalmus I fiksert med 4% paraformaldehyd i parafin. Disse ble bakt i 20 min på 65 °C og deretter vasket med Histo-Clear II Histological Clearing agent i 10 min, dette ble gjort 3 ganger for å fjerne parafinen. Snittene ble så rehydrert med 2 x 100 %, 95 %, 70 % og 50 % EtOH i DEPC, 1 min for hver løsning. Deretter ble snittene vasket i 1 min 2 ganger i 2 x SSC buffer (Appendiks A). Snittene ble deretter behandlet med Proteinase K løsning bestående av 1 M Tris pH 8, 0,5 M EDTA, og 2 mg/ml proteinase K, i 18 minutter. For å ivareta den histologiske strukturen ble snittene fiksert med kald 4 % paraformaldehyde i 1 x Phosphate-Buffered Saline (videre forkortet 1 x PBS) (Appendiks A) i 5 min. Snittene ble deretter vasket 2 ganger i 1 x PBS. Videre ble snittene inkubert i en acetylerende løsning (0,1 M Triethanolamine og 0,25% acetic anhydride i DEPC) i 5 min og vasket med 2 x SSC buffer (Appendiks A). Snittene ble deretter dehydrert med 50 %, 70 %, 95 % og 2 x 100 % EtOH i DEPC, 1 min for hver løsning. Det ble laget en hydrofob ramme på hvert snitt med PAP penn (Sigma) og lagt til tørk i 1 time. Probene og hybridiseringsløsningene ble forberedt ved å blande 480 µl hybridiserings løsning og 42,5 µl DEPC vann. I antisensløsningen ble det tilsatt 5 ng/µl probe, og 10 ng/µl i sensløsningen. Dette ble kokt på 95 °C i en varmeblokk i 5 min og deretter satt på is. Når løsningen var nedkjølt, ble 60 µl 10 % blokkeringsløsning tilsatt. Hvert snitt ble tilsatt 200 µl probeløsning, fargekammer ble lagt på, og ble inkubert i fukt-kammer med 3 lag med 3MM Whatman® (Sigma-Aldrich) papir trukket i 2 x SSC. Dette ble forsegle og inkubert over natt på 65 °C.

2.7.3 *In situ* hybridisering, dag 2

Snittene ble skylt med 2 x SSC og deretter vasket i 2 x SSC i 30 minutter ved romtemperatur 2 ganger. Videre ble snittene vasket med 50 % deionisert formamid i 2 x SSC i 30 minutter i vannbad på 65 °C. Deretter ble snittene vasket to ganger med forvarmet 2 x SSC (37 °C) i 10 minutter. Snittene ble behandlet med 0,02 mg/ml RNase A i RNase buffer (Appendiks A) i 30 minutter i vannbad på 37 °C. Snittene ble vasket 3 ganger med 1 x maleate buffer (Appendiks A) i 10 minutter. Deretter ble snittene blokkert med 0,05 % Triton X-100 og 1 % blocking løsning i 1 x maleate buffer i 1,5 time. Videre ble snittene vasket i 1 x maleate buffer i 5 minutter, dette ble gjentatt 2 ganger. Anti-Dig-AP FAB fragment (Roche) ble fortynnet 1:2000 i blokkeringsløsning (0,05 % Triton X-100, 1 % blokkingsløsning i 1 x maleate buffer) og det ble tilsatt 200 µl til hvert snitt. Snittene ble lagt i fuktkammer med 3 lag 3MM Whatman® (Sigma-Aldrich) papir fuktet med 2 x SSC. Fuktkammeret ble forseglet og inkubert i romtemperatur over natt.

2.7.4 *In situ* hybridisering, dag 3

Snittene ble vasket i 1 x maleate buffer i 10 min, dette ble gjort 2 ganger. Deretter ble de vasket i prosesseringsbuffer (Appendiks A) i 10 min. Snittene ble tørket forsiktig med 3MM Whatman® (Sigma-Aldrich) og 200 µl 1-step BCIP/NBT Plus supressor substrate solution (Sigma-Aldrich) ble tilsatt hvert snitt. Fargekammer ble lagt på, fuktkammeret ble forseglet og plassert mørkt over natt. Etter 25,5 timer ble utviklingen stoppet, og snittene ble skylt og vasket i vann. De ble tørket forsiktig og tilsatt Immuno HistoMount™ Mounting Solution (Thermo Fisher) og dekkglass. Dette stod med vekt på over natt og ble deretter forseglet.

2.8 Sanntids PCR

Sanntids PCR er en metode der man kan følge amplifiseringen av templatet i sanntid på grunn av detekteringen av det fluoriserende fargestoffet i SYBR®Green (Thermo Fisher) som er inkorporert i dsRNA reaksjonen. Dette komplekset emitterer et grønt lys som er proporsjonal med mengden dobbeltrådig DNA (dsDNA) som blir amplifisert. Det settes en terskelverdi på 0,2, videre kalt Ct som er hvor mange sykluser det fluoriserende signalet i prøven brukte for å krysse grenseverdien og passere støy fra bakgrunnen.

Sanntids PCR ble utført ved bruk av PowerUp™ SYBR™ Green Master Mix (Thermo Fisher) i henhold til produsentens protokoll. En reaksjon besto av 1 x PowerUp™ SYBR™ Green Master Mix, 500 nM forward og revers primer, 2 µl cDNA templat (se seksjon 2.2) og RNase fritt vann opptil 10 µl. Reaksjonene ble fordelt ut i MicroAmp Optical 96-wells reaksjonsplater (Applied Biosystems). Alle prøver ble kjørt i duplikat og kjørt med QuantStudio™ 5 (Applied Biosystems) termosyklus Real-time PCR med innstillinger listet i tabell 4.

Tabell 4. Tabell over sykluser, temperatur og tid ved kjøring av sanntids PCR.

Sykluser	Temperatur, °C	Tid
	50	2 min
	95	2 min
45	95	15 sek
	60	1 min
	95	15 sek
	60	1 min
	95	1 sek

2.8.1 Primertesting av primere til sanntids PCR

Det ble designet genspesifikke primere til LsLGA5 for å bruke i sanntids PCR. Se tabell 5 for alle primere brukt i sanntids PCR. Primereffektiviteten til LsLGA5 primerparet ble testet ved å fortynne cDNA fra fastsittende kopepoditter i en to folds fortynningsrekke med 8 punkter. Denne fortynnings rekken ble brukt som templat i sanntids PCR (se seksjon 2.8). Ct-verdiene av fortynningsrekken ble plottet mot logaritmen til prøvemengden, og stigningstallet til denne grafen ble brukt i qPCR Efficiency Calculator (Thermo Fisher) for å beregne primereffektiviteten (Appendiks B).

Tabell 5. Tabell over primere brukt i sanntids PCR.

Primerpar	Retning	Sekvens (5' → 3')
-----------	---------	-------------------

LsLGA5	Forward	ATGGTGCCCCTTTAAATATACTAGC
	Revers	GTCAAAGCAATCTGAAGTGGTTGTA
LsEF1 α - Referanse	Forward	GGTCGACAGACGTACTGGTAAATCC
	Revers	TGCGGCCTTGGTGGTGGTTC
AsTRIM - Referanse	Forward	TTACTGTAGGAGCTGTATTGAGGGCTGCTG
	Revers	TTCTCCACCAGCTCAGCCAACATG
AsEF1 α - Referanse	Forward	CACCACCGGCCATCTGATCTACAA
	Revers	TCAGCAGCCTCCTTCTCGAACTTC
AsIL4/13A	Forward	CGTACCGGCAGCATAAAAATCACCATTCC
	Revers	CCTTGCATTTTGTGGTGGTCCCA
AsIgT	Forward	GGTGGTCATGGACGTACTATTT
	Revers	CCTGTGCAGGCTCATATCTT
AsIgD	Forward	CACCAGGAGGAAAGTTTGGCATCA
	Revers	CCCCAAGGAGCTCTGGTTTGGGA
AsC3a	Forward	ATTCTTCCCCTCCACTCCCTCG
	Revers	CGATTTGGTCGTCAAGCCAGG
AsCD4	Forward	GAGTACACCTGCGCTGTGGAAT
	Revers	GGTTGACCTCCTGACCTACAAAGG
AsCD8 α	Forward	TAGAGTGCAAGACAACGCTGGAATGGA
	Revers	TCTCGAGCCTTTTTGAAAGCCTTCAG
AsIL8	Forward	GCATCAGAATGTCAGCCAGCC
	Revers	ACGCCTCTCAGACTCATCCC
AsIL1 β	Forward	GCTGGAGAGTGCTGTGGAAGA
	Revers	TGCTTCCCTCCTGCTCGTAG
AsMMP13	Forward	ACTCTTTGCCAATATCGCCACCCA

	Revers	TGGGCCCTCGTTTGAACGCA
AsCCL20	Forward	ATCTTTCAGACCGATGGCAACT
	Revers	GTGTGGTGTAGATGACCAGGTT

2.8.2 Analyse av sanntids resultater

For å finne den relative uttrykkningen, ble resultatene fra sanntids PCR kalibrert ved hjelp av referansegener, også kalt delta-delta metoden (Livak & Schmittgen, 2001). Det ble gjort ved å finne ΔCt mellom målgener og referansegener.

$$\Delta Ct = [M\ddot{a}lgen Ct] - [Referansegen Ct]$$

Videre ble det relative uttrykket i hver prøve regnet ut i forhold til en gruppe med kalibrator prøver, $\Delta\Delta Ct$.

$$\Delta\Delta Ct = [\Delta Ct] - [\Delta Ct kalibratorgruppe]$$

Disse verdiene ble omgjort til $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

2.8.3 Statistiske analyser

Statistiske analyser ble gjort med programmet GraphPad Prism 9 (Dotmatics). Det ble utført toveis ANOVA for å undersøke normalfordeling, standardavvik og statistisk signifikans ($P < 0,05$) mellom gruppene nellik og ikke-nellik. Deretter ble gruppene slått sammen og kjørt enveis ANOVA og bonferroni-test for å sammenlikne uttrykkningen av immungener fra atlantisk laks i skinn og skinn med lus prøver (videre kalt SK og SKL). Dersom dataen ikke møtte kravene, ble det brukt nonparametisk Kruskal-Wallis test.

2.8.4 Ontogenetisk studie

For å se på uttrykkningen av LsLGA5 i de ulike livsstadiene til lakselus ble det kjørt sanntids PCR med cDNA som templat fra de ulike livsstadiene til lus, dette var syntetisert i forbindelse med tidligere studier. Det ble brukt cDNA fra 5 biologiske paralleller der egg inneholdt 1 eggstreng med ca 200 embryo. Naupli I, naupli II, og frittlevende kopepoditter bestod av ca 100 larver hver. Kopepoditter 4 dager post i infestasjon (dpi) inneholdt 60 larver, chalimus I 30 individer, chalimus II 20 individer. I parallellene med pre-adult hann og hunn 1, pre-adult hann og hunn 2, adult ung hunn, adult moden hunn og adult hann ble det brukt 1 individ til cDNA

syntese. I dette oppsettet for sanntids PCR (se seksjon 2.8) ble det brukt primere for LsLGA5 og LsEF1 α , se tabell 5. Alle reaksjonene ble kjørt i 4 duplikat.

2.9 Eksperiment

2.9.1 RNA interferens – RNAi

RNAi er en metode som brukes for å nedregulere uttrykking av et eller flere gener, i dette tilfellet for å undersøke funksjonen til LsLGA5. RNAi er en forsvarsmekanisme i eukaryote celler mot dsRNA virus. Det går ut på at dsRNA i cytoplasmaet bindes til proteinkomplekset Dicer som klyver dette til mindre fragmenter. Deretter blir enkeltrådig RNA (ssRNA) innlemmet i proteinkomplekset RISC som vil feste seg til mRNA med en sekvens som er komplementær til det innlemmede ssRNAet og destruere det. Dette forhindrer translasjon av dette mRNAet til protein. RNAi som metode innen forskning ble oppdaget i 1998 av Andrew Zachary Fire og Craig Cameron Mello (Carthew, 2001). I denne studien er RNAi som metode brukt for å undersøke LsLGA5 sin funksjon og påvirkning på et utvalg av immungener hos laks.

2.9.2 Syntese av dsRNA

For å syntetisere dsRNA spesifikt til LsLGA5 ble det kjørt en standard PCR-reaksjon med plasmid som templat (se seksjon 2.2.1 og 2.3.3) med totalt volum på 105 μ l. Det ble brukt LsLGA5 spesifikke primere med T7 inkorporert i sekvensen, se tabell 6. Dette ble amplifisert på termosyklus på 94 °C i 2 min, deretter 30 sykluser på 94 °C i 30 sek, 58 °C i 15 sek og 72 °C i 45 sek, deretter 72 °C i 5 min og holdt på 4 °C. PCR-produktet ble deretter undersøkt på 1% agarose gel (se seksjon 2.2.2).

Tabell 6. Oversikt over primere brukt for å syntetisere dsRNA til RNAi knock down forsøk.

Primerpar	Retning	Sekvens (5' \rightarrow 3')
LsLGA5_T7	Forward	TAATACGACTCACTATAGGG_GTTTCAGTTTGTGAAGA TAAATGG
	Revers	TAATACGACTCACTATAGGG_TTTATTAGAACACCATT CTGGC

PCR-produktet med T7 vedheng ble renset med Monarch™ PCR & DNA Cleanup Kit (New England BioLabs®Inc), i henhold til protokollen. Konsentrasjonen ble målt på Nanodrop® ND-1000 Spectrophotometer (Thermo Fisher).

PCR-produktet ble brukt i syntese av dsRNA med The Ambion™ MEGAscript® RNAi Kit (Thermo Fisher) i henhold til protokoll. Polymerasen i dette kittet er spesifikk til T7-promotorene som er inkorporert i PCR-produktet. dsRNA syntesen inneholdt 768 ng renset PCR-produkt som templat, og de resterende komponentene i henhold til protokollen, totalt volum 20 µl. Dette ble inkubert i termosyklus over natt på 37 °C, deretter inkubert på 75 °C i 5 minutter og kjølt ned til romtemperatur. Dette ble DNase/RNase behandlet for å fjerne templat DNA og ssRNA, og ble utført i henhold til protokollen. Dette ble deretter renset og vasket i henhold til protokoll og alle sentrifugeringer ble gjort på 21,1 x G.

dsRNA ble eluert ved å tilsette 160 µl elueringsløsning som var forvarmet til 95 °C i to omganger, en på 100 µl og 60 µl. Hver kolonne stod 2 min i romtemperatur før det ble sentrifugert i 2 min på 21,1 x G og dsRNAet ble eluert ut i rør og målt på Nanodrop® ND-1000 Spectrophotometer (Thermo Fisher).

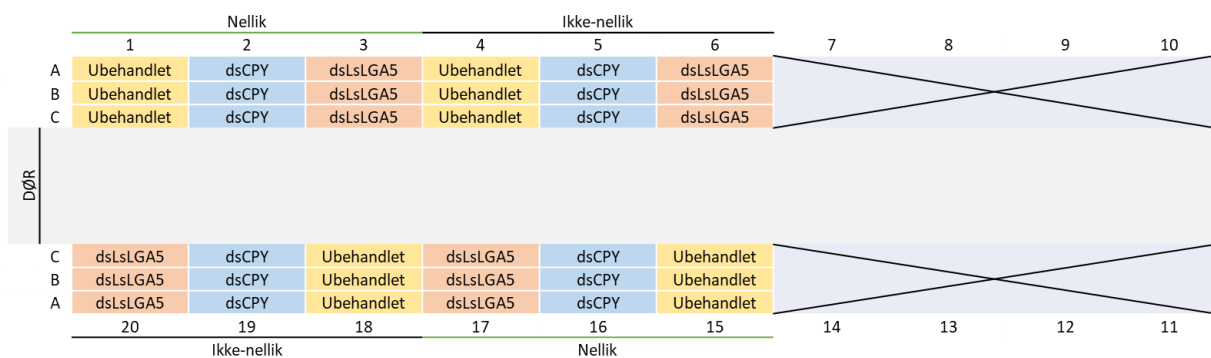
2.9.3 Bading av nauplii I larver i dsRNA

Den mest effektive måten å føre inn dsRNA i lus i de tidlige stadiene er ved skallskifte fra naupli I til naupli II (Eichner et al., 2014). Naupli I larver ble fordelt i lokk fra 1,5 ml Eppendorf™ rør, ca 20-50 stykker per lokk i ca 150 µl saltvann tilsatt 3000 ng dsLsLGA5. Kontrollgruppen ble behandlet med dsCPY som var laget på forhånd. CPY kommer fra cymptrypsin peptidase i atlantisk torsk (*Gadus morhua*). Alle lokkene ble inkubert i ca. 17 timer på 8 °C. Tilstedeværelsen av excuvia ble sjekket for å se at skallskiftet var gjennomført og larvene var utviklet til naupli II. Deretter ble larvene telt og blandet sammen etter gruppe og overført til gjennomstrømnings inkubatorer.

2.10.3 Smitteforsøk

I forsøket ble det brukt 36 atlantisk laks. De ble delt i to grupper under transport, halvparten ble transportert i tank med 30 liter saltvann med 54 mg/l AQUI-S® (MSD Animal Health), andre halvparten ble transportert uten noe beroligende. Transporten tok like lang tid for alle fiskene, 6 min og 21 sek. Fiskene ble overført til enkelt kar på 40 liter, en fisk i hvert kar. Nellik og ikke-nellik gruppene ble videre delt inn i tre grupper med 6 fisk i hver; ubehandlet, dsLsLGA5

og dsCPY. Ubehandlet gruppen ble ikke smittet med lus. dsLsLGA5 gruppen ble smittet med lus badet i dsRNA for nedregulering av LsLGA5. dsCPY gruppen ble smittet med lus badet i dsRNA fra CPY som ikke skal ha en påvirkning på lusen. Hver kolonne med kar var seriekoblet med sjøvann (34,5 ‰) med en strømhastighet på 6 liter i minuttet og 12 °C. Fisken ble akklimatisert i 3 uker før den ble smittet med kopepoditter. Før oppsmitting ble karene koblet til individuelle vanninntak med 2 liter i minuttet, og vannmengden ble tappet til ca 15-20 liter. Ca. 155 lus ble tilsatt hvert kar i dsRNA gruppene, ubehandlede kar ble håndtert på samme måte uten å tilsette lus. Figur 3 viser en skjematisk oversikt over gruppene og forsøksrommet.



Figur 3. Oversikt over de ulike gruppene i forsøksrommet. Ubehandlet er fisk som ikke ble smittet med kopepoditter. dsCPY er fisk som ble smittet med dsCPY behandlede kopepoditter. dsLsLGA5 er fisk som ble smittet med dsLsLGA5 behandlede kopepoditter.

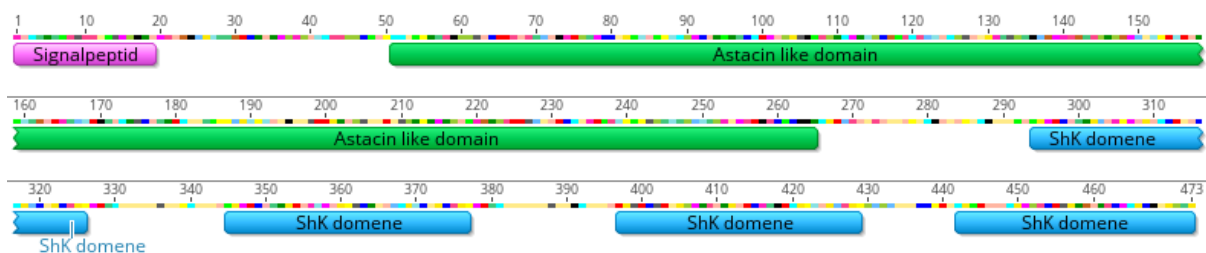
2.10.3 Prøveuttak

Uttaket av prøver skjedde 3 dager etter smitte med kopepoditter. Fiskene ble bedøvet med 100-120 mg/l Fiquel® (MSD Animal Health), og avlivet med slag mot hodet. Vekt og lengde ble målt og deretter ble fisken tappet for blod. Det ble tatt en skinnprøve ca 0,5 x 0,5 cm fra all fisk i forsøket. Fra dsCPY og dsLsLGA5 behandlet fisk ble det i tillegg tatt skinn med lus. Det ble byttet skalpell blad mellom hver fisk og antall kopepoditter per fisk ble talt. Alle prøver ble lagret på RNAlater® (ThermoFisher) på 4 °C over natt og deretter overført til -20 °C. Prøvene ble RNA isolert (seksjon 2.1), cDNA syntetisert (seksjon 2.2) og brukt i sanntids PCR (2.8).

3.0 Resultater

3.1 Analyse av LsLGA5 sekvens

Nukleotidsekvensen til LsLGA5 ble bekreftet ved RACE og konvensjonell PCR, etterfulgt av TOPO-kloning og sekvensering, for å videre kunne antyde genets potensielle funksjon. LsLGA5 sekvensen bestod totalt av 1661 bp, med en åpen leseramme på 645 bp (Appendiks C). Den åpne leserammen koder for 473 aminosyrer med molekylærvekt 53,56 kDa, med isoelektrisk punkt på 5,70, og en ladning på -8,28 ved pH 7. Et signalpeptid med kløyvingssete mellom aminosyre 19 og 20 ble predikert med 99% sannsynlighet i SignalP-5.0. To domentyper, et astacin-liknende domene og fire ShK domener, som ble predikert i InterPro. I figur 4 kan man se en skjematisk oversikt over signalpeptidet, astacin domenet og ShK domener. I figur 5 er LsLGA5 aminosyresekvens sammenstilt med andre astaciner uten at ShK domene er inkludert. Det aktive setet er konservert i alle artene, og er markert i rødt. Det er også en konservert met-turn markert i blå uthevet skrift. I figur 6 er LsLGA5 sammenstilt med andre arter som har med astacin og flere ShK domener. ShK domenet er markert i blått med konserverte cysteiner markert i grått. Her kan man se at alle 6 cysteiner er konservert i 1-, 2-, og 4- ShK domene mellom nas-15 fra *C.elegans*, metalloprotease fra *S.ratti* og LsLGA5. I figur 7 kan man se at 5 av 6 cysteiner er konservert i 2. og 3. ShK domene mellom LsLGA5 og *Brugia malayi* K 1 (BmK1) fra *Brugia malayi*. Det samme gjelder for 4. ShK domene ved sammenstilling av LsLGA5 og ShK-toksin *Stichodactyla helianthus* i figur 8.



Figur 4. Skjematisk oversikt over aminosyre sekvensen med signalpeptid (lilla), astacin domene (grønn) og ShK domener (blå).

L. SALMONIS	-----	0
C. ELEGANS	----MIFPLLLTLILPNFV-----APKVLPEE--KDDEIAVSTQ	33
X. LAEVI	MDVKISAILLAC-IIQYAVSSPIQVFYSGAKILAEEDAMAKEDILKAIE-KADPGSV---	55
D. RERIO	MDIRASLSILLL-LFGLSQA-----SP--LREFE----AIFV---	30
O. LATIPES	MDLLAKASVLLLLLLSLSNA-----QTDNMEEAENGSSKEEI---	37

```

L. SALMONIS      ----MWNIIYIVLFLLLTFEGAYS-----ELSHAQCRIIHDKYSYEGMGSRNLLGGKVWPNM---- 52
C. ELEGANS      REKTFDFMKLILTKLPTTFEPSK----YGHINIPLRKK-RGIALHPLQWASYLWPNNA---- 84
X. LAEVI        KTQDSMDIL--SQILEANKGIKLTQEGD--IIQ-KQGRSAIN----DARFLWPKSADGI 106
D. RERIO        SEPETVDIT--TQILETNKGSSEVLFEVD--VVL-PKRNALICE--DKSCFWKKNANNI 83
O. LATIPES      DESELEDVS--SIIIFRMNNNSMEELLEGD--LVL-PKTRNAMKCFGAPDSCRWPKSSNGI 92
                ::      :      :      . .      :      *      :

```

```

L. SALMONIS      -TVPYILAGGFSKDDLSLIQSAMDGIEKKTQVRRVPRNGEK-SYVYIKN--DESGCFAVI 108
C. ELEGANS      -EVPYDIATHYTSTEKSIILSAMESAFKNVTCVRFPRRAATDKHYLQINKYFNVERCFSYI 143
X. LAEVI        VVPVYNLSYSYNADQLALFKKAIQEFALTCVRFVWPWTTEV-NFLNIMS---NGGCGSLI 162
D. RERIO        VEVVYVVSGEFSSINDKSVIANASIFHAQTCIRFVPRSIQA-DYLSIEN---KDGCSYSAI 139
O. LATIPES      VKVPYVVSVDNYESDEKETIRNAMKEFAEKTCTIHFVPRNNER-AYLSLEP---RFGCKSMM 148
                *** :: : : : * . : : ** : : * : : :

```

```

L. SALMONIS      GYNEYRGR-----HVLNLRQSNFSTCMIFGIAQHEMLHILGYGHEQTRPDRDSYVRI 161
C. ELEGANS      GRQSSRTLFGTPEGNVETRMRLDPACLRNGRGIVMHELMHILGFYHEHQDRDRDRRIVG 203
X. LAEVI        GKNG--GA-----QRLELDA----NGCMNMGIIQHELNHALGFYHEQNRSDRDDYVVI 209
D. RERIO        GRTG--GK-----QVVSLNR----KGCVYSGIAQHELNHALGFYHEQSRSDRDQYVRI 186
O. LATIPES      GYVG--DK-----QVVVLQR----FGCIKHAVIQHELNHALGFYHEHTRSDRDQHVKI 195
                *                :                . : ** : * ** : ** : * ** :

```

```

L. SALMONIS      HWDMIQRDAISNYFKSIYDNTTIVPPQCRPRSTATTFFDDCYSGFTTDTDFGYPYEYGSVMH 221
C. ELEGANS      S-----AVHYNF--KIY-----R-RAKTLYMGAYDANSIMH 231
X. LAEVI        HTENIIPDFLKM-----EKYNTNNGIEYDYASVMH 241
D. RERIO        NWNNISPGMAYNF-----LQKTNNTNTPYDYGSIMH 218
O. LATIPES      NWENIIKDFTHNF-----DKNDTDNLGTPYDYGSIMH 227
                :                .                * : * : **

```

```

L. SALMONIS      XGLDDFQTSKNTMDVLRPVE-FGIRIGQRIGMTELDALKVKAXYNCQDL----- 270
C. ELEGANS      XNFQNL-----WQRRDHFSTSDIININTFYKCKNLLSSKLAPK-V 271
X. LAEVI        XSRYSYHIN-GDI--TIEPKDPNPVIGQRDGLSILDISKINKLYECNVCSNLLPYSNMG 298
D. RERIO        XGKTAFAIQPGLE--TITPIPDENVQIGQRQGLSKIDILRINKLYGC----- 263
O. LATIPES      XGRTAFGKD-RKE--TITPIPNPKAAIGQTERMSDIDILRVNKLYKC----- 271
                * .                :                : : * . : : * *

```

Figur 5. Sekvenser sammenstilt med astacin domene, men uten ShK domene fra LsLGPA5. Sammenstillingen består av LsLGPA L. salmonis, zinc metalloproteinase nas-2 fra C. elegans (accession Q9N5R0.3), embryonic protein UVS.2 i X. laevis (accession P42664.2), Hatching enzym 1 fra D. rerio (accession Q1LW01.1) og Low choriolytic enzyme fra O. latipes (accession P31579.1). Lilla er signalpeptid, lysegrønn er astacin domenet, rødt markerer aktivt sete og blå uthevet skrift markerer met-turn.

```

L. SALMONIS      ----- 0
C. ELEGANS      -MREYVLI FLVAPVFAAILGPYDIPPELPLNDENFFDRSHSEYETVLTPEDFELGTRIT 59
S. RATTI        MVKII FLILFISSSLVLSLDIHNTALKELLNDELYFDKSIPEYATVLT PND FINGAQLD 60

```

```

L. SALMONIS      -----MWNIIYIVLFLLLTFEGAYS-----ELSHAQCRIIHDKYSYEGMGSRNLLGGKVWPNM----RN-- 42
C. ELEGANS      AAMAHNGDDIWDSDA-MYSKDRFEGDIANDNLNAS--TAE L FANGSGKSE DGK WYNAI 116
S. RATTI        AQIGE-DDNYMWDNEA-IYSNDKFEGDIVG--INAS--TINAFVNGGVDPN SKDIHRNAI 114
                : * : : : ** . : : * . *

```

```

L. SALMONIS      LLGGKVWPNNTVPYILAGGFSKDDLSLIQSAMDGIEKKTQVRRVPRNGEK-SYVYIKNDE 101
C. ELEGANS      KNRLQLWPEGRIPTYTISSQYSSYSRSLIAASMQEYASHTCIRWVPKEAADVNYVHIY-PD 175
S. RATTI        KNKHQLWKNGRIPYVLSSQYSPHSRSIIANSMEEYKHTCIRWVPKENTD TDYVYIM-PD 173
                : * . : ** : : * . * : : * : : ** : ** : :

```

```

L. SALMONIS   SGCFAVLGYNEYRQKHLVNLQRSNGFSTCMIFGIAQHEMLEHILGYGHEQTRPDRDSYVRI 161
C. ELEGANS   RGCYSMVGKMG--GKQSLSL-----GSGCIQKGIILHELMHAVGFFHEQSRTRDDHITI 228
S. RATI     RGCYSMVGKMG--NRQVLSL-----GSGCIQKGIILHEMMHAVGFFHEQSRTRDRDEHITI 226
              *:::* * . . . . . * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
L. SALMONIS   HWDMIQRDAISNYFKSIYDNTTIVPPQCRPRSTATTFFDDCYSGFTTDTDFGYPVEYGSVMH 221
C. ELEGANS   MWNNIQAGMQQFE-----KYGHGTIQSLGTGYDYGSIMH 263
S. RATI     YWNNIMNGMANQFE-----KYGQGVISALGTSYDYGSIMH 261
              * : * . . . . . * . . . . . * : * * * * * *
L. SALMONIS   YGLDDFQTSDKNTMDVLRPVPFGRIGRIGMTELDALKVKAXYNCDQLSTLSTTSPTNA 281
C. ELEGANS   YGTKAFSRNGQPT---MIPKKNATIGQRNGFSKVDKFKINTLYGCPVEGEKPTTSAPTS 320
S. RATI     YGSTAFSKNGQPT---MLPKKNGAQIGQRDGFSGKVDTFKINTLYQDDKLVGTIKSTTTT 318
              ** * . . . : * : * * * * * : * * * * * * * * * * * * * * * *
L. SALMONIS   S-----TSP-----TNATTTVSVCEDKWIYCQS--MPEWCSNKD- 313
C. ELEGANS   GPIVITVKPVVITT----GKPPVIQTVSPAVPLKPSECRNLRGDCDDLAQGWCIRNPG 375
S. RATI     PPATTISTTIKMSSPRVPVPQPIISP--SPPLPVVECKNRPDCNLAAQGWCINAP 376
              : * . . . . . * : * : * * * *
L. SALMONIS   -TSKNCQKTCKLCPEDINTTTT-----TFTTPNTTTS 344
C. ELEGANS   WMRANCPISCGMCIPTKETQKPVQTTTQAATTTARPQKPVTQPIQPLPPVPLPPTTPE 435
S. RATI     WMKDNCPESCGYCGT-----LPPKPEE 398
              ** : * * * * * * * * * *
L. SALMONIS   VCEDKWIYCDSMRE--WCP--FKYTSQNCRKTCKLCPEDINTTTTFTTANTTTS DCFD 400
C. ELEGANS   DCEDLRVDCLVLVSQRYCKISQNFMKSYCAKSCGFCFKPPTEIPDNRPTVVTRLPVT- 494
S. RATI     ICEDLRVDCDKLVTARYCITSEHFMRTYCQKSCGFCTPKSITKKPTE-PTLPGIVPIS- 456
              *** : * : : * : : * * * * * * * * * *
L. SALMONIS   KFDTCGEYLSYCSDKMIADNCPRSCQLCPGQQ-----TTTKPDTNCVDSSN 449
C. ELEGANS   -L-----PPAVIRSRSPAPPVSTTKAAPTTSTSA-----APYSPTPLPSECSDRKHF 542
S. RATI     -I-----TLPTTSTKS-----TQSTTIPTTFTTSTSNPSIIQNLTTKIICVDRKHF 504
              : : * * * * *
L. SALMONIS   CE-----GLKDFCYHSYLKENCKATCGIC 473
C. ELEGANS   CSHWKSAGFCEGIFMNYMKKNCPASCGLC 571
S. RATI     CSQWKVSGFCEGIFLSYMRKNCPKACGYC 533
              * . * : : : * * * * * * * * *

```

Figur 6. Sekvenser sammenstilt med astacin og ShK domene fra LsLGA5. Sammenstillingen består av proteinsekvensene til zinc metalloproteinase nas-15 fra *C.elegans* (accession P55115.2) og metalloprotease fra *S.ratti* (accession XP_024510573.1). Lilla er signalpeptid, lysegrønn er astacin domenet, rødt markerer aktivt sete og blå uthevet skrift viser met-turn.

```

L. SALMONIS   -----SPTNATTTVSVCEDKWIYCQSMPEWCSNKDTSKN---CQKTCK 40
B. MALAYI   TSLPPTTGTPVTLTLLPPTTASATLITNETIITLSLKSNWSRNIITLFPFRSFRTKRP 360
              * * . . . . . * . . . . . * * * * *
L. SALMONIS   LCPEDINTTTTFTTPNTTTSVCEDKWIYCDSMREW----CPFKYTSQNCRKTCKLCPED 96
B. MALAYI   VITEKLRAINTTVKAKTTVVTVCEDLNAHCEMWQLGHCQYSPKYMGHYCKKACGLCPPK 420
              : * . . . . * * . . . * . . . * * * * * * * * * *
L. SALMONIS   INTTTTTTFTTANTTTSDCFDKFDTCGEYLSY----CSDKMIADNCPRSCQLCPGQQT 152
B. MALAYI   TNKKLNW----KIESSRCVDKNLFCSYWASIGECNTGSKFMTIFCKRSCNNCGNKVGNA 476
              * . . . . : * * * * * * . : * . . * * * * * * * *
L. SALMONIS   TKKPDTNCVDSSSNCEGLKDFCYHSYLKENCKATCGIC 190
B. MALAYI   VHE----- 479

```

. . .

Figur 7. Sammenstilling av aminosyresekvensen til ShK domene fra LsLGA5 og BmK1 fra *Brugia malayi* (Accession XM_001897715). Lyse blått markerer ShK-domener hos LsLGA5, grått markerer konserverte cysteiner.

```
L.SALMONIS      SPTNATTTVSVCEDKWIYCQSMPEWCSNKDTSKNCQKTCKLCPEDINTTTTTFTTPNTTT 60
S.HELIANTHUS    -----0

L.SALMONIS      SVCEDKWIYCDSMREWCPFKYTSQNCRKTKLCPEDINTTTTTFTTANTTTSDCFDKFD 120
S.HELIANTHUS    -----0

L.SALMONIS      TCGEYLSYCSDKMIADNCPKSCQLCPGQGQTTTKKPDNTNVDSS--SNCEGLKDFCYHSY 178
S.HELIANTHUS    -----RSCIDTIPKSRCTAFQCKHSMKY 23
                .*: *:  *:  *:  .*
```

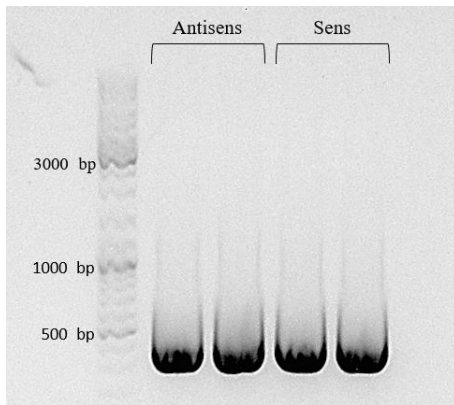


```
L.SALMONIS      LKENCKATCGTC      190
S.HELIANTHUS    RLSFCRKTGTC      35
                . *:  **  *
```

Figur 8. Sammenstillingen består av proteinsekvensen til ShK domene fra LsLGA5 og ShK fra *Stichodactyla helianthus* (accession P29187). Lyse blått markerer ShK-domener hos LsLGA5, grått markerer konserverte cysteiner.

3.2 Lokalisering av LsLGA5 ekspresjon

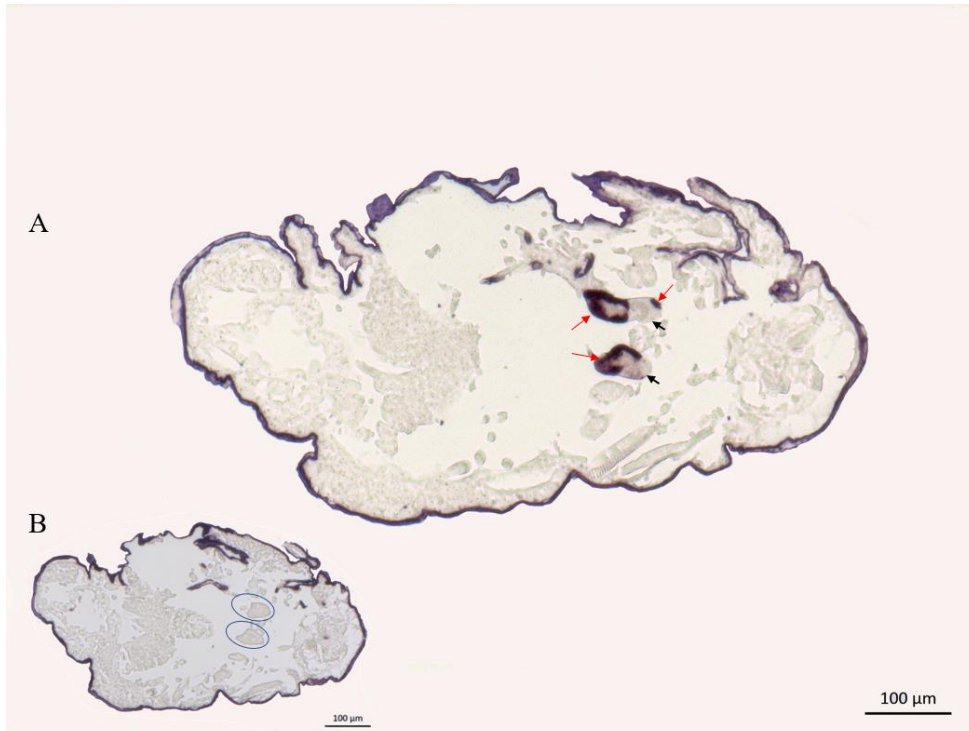
Uttrykk av LsLGA5 ble lokalisert i spyttkjertelen ved in situ hybridisering av antisensprobe på parafinsnitt med chalimi I lus (Figur 11 og 12). Figur 9 viser PCR-produktene brukt i syntesen av probene med rensset plasmid som templat. Sensproben til LsLGA5 ble inkludert som negativ kontroll, og gav ingen fargeindikasjon. Antisens- og sensprober for trypsin ble brukt som negativ og positiv kontroll på parafin snitt med adulte hunn lus (Figur 10). Det ble utviklet hybridiserings signal innen 8 timer på alle snitt med antisensprober.



Figur 9. PCR-produkter kjørt med T7-primere til bruk i probesyntese, vist på 1% agarosegel. Forventet størrelse var ca. 681 bp for probene



Figur 10. 2,5x forstørret. Til venstre: Adult hunn lus tilsatt antisensprobe for trypsin som positiv kontroll som gav signal i tarmepitel (svart sirkel). Til høyre: Adult hunn lus tilsatt sensprobe for trypsin som negativ kontroll uten signal (blå sirkel).



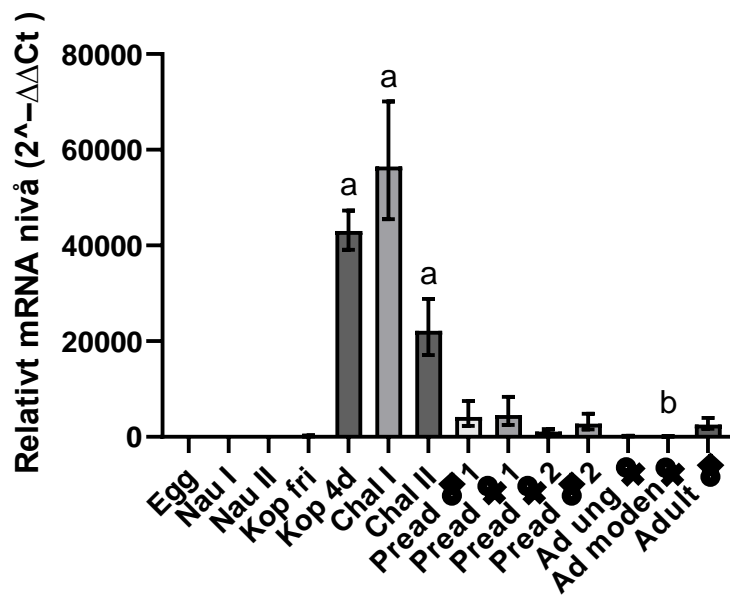
Figur 11. 10x forstørret. A: Chalimus I med antisensprobe for LsLGA5 som viser sekretorisk enhet i spyttkjertel (rød pil) og reservoar (svart pil). B: Chalimus I med sensprobe for LsLGA5 som negativ kontroll uten signal (blå sirkel).



Figur 12. 63x forstørret. Chalimus I med antisensprobe for LsLGA5 viser spyttkjertlenes sekretoriske enheter (rød pil), reservoar (svart pil).

3.3 Ontogenetisk studie

Sanntids PCR av LsLGA5 med forskjellige lusestadier, fra egg til adult, ble kalibrert mot det relative mRNA nivået i egg. Figur 13 viser at LsLGA5 blir kraftig oppregulert fra lusen er fritt levende kopepoditt til fire dager etter den har infisert verten. Den høye uttrykkningen av LsLGA5 fortsetter inn i chalimus I stadiet før det avtar i chalimus II og minker videre i de øvrige senere stadiene.



Figur 13. Relativt uttrykk av LsLGA5 i ulike livsstadier til *L. salmonis* ved 10 °C, målt med sanntids PCR. Nau I = nauplii I, Nau II = nauplii II, Kop fri = frittlevende kopepoditter, Kop 4d = kopepoditt 4 dager post infestasjon, Chal I = chalimus I, Chal II = chalimus II, Pread ♂ 1 = preadult hann 1, Pread ♀ 1 = preadult hunn 1, Pread ♂ 2 = preadult hann 2, Pread ♀ 2 = preadult hunn 2, Ad ung ♀ = adult ung hunn, Ad moden ♀ = Adult moden hunn, Adult ♂ = adult hann. Relativt uttrykk av LsLGA5 ble kvantifisert og regnet med $2^{-\Delta\Delta C_t} \pm SD$ (N=5), dette ble relatert til mRNA nivået i egg som ble satt til 1. Livsstadier merket med a er signifikant forskjellig fra egg, nauplii I og nauplii II, b markerer forskjell mellom adult moden ♀ og chalimi I.

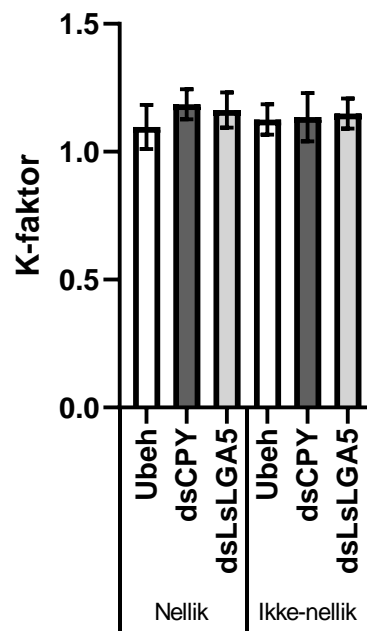
3.4 RNAi knock down forsøk

RNAi mediert nedregulering ble utført ved bad behandling av lus med dsRNA for å undersøke om LsLGA5 kunne ha en mulige immunmodulerende funksjon. Det var 3 ulike grupper med det 12 laks i hver. Ubehandlet gruppen ble ikke infisert med lus. Kontroll gruppen ble infisert

med lus bad behandlet med kontrollfragmentet dsCPY. RNAi knock down LsLGPA5 gruppen ble infisert med lus badet i dsLsLGA5.

3.4.1 K-faktor og lusetall

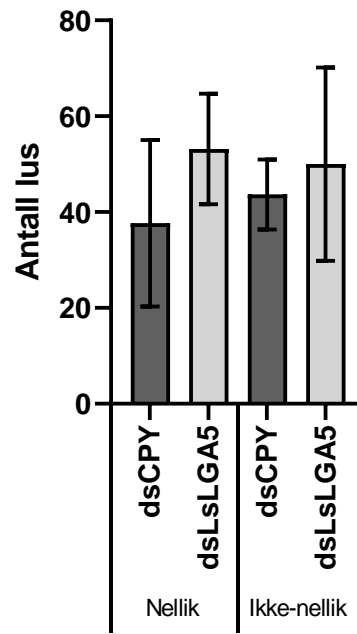
Lengde og vekt av fisken ble målt ved forsøkslutt, for å kalkulere kondisjonsfaktoren (k-faktor) til fisken. Under forsøket ble fisken observert hver dag, det var ingen individer som hadde dårlig appetitt og adferden var normal. K-faktoren på tvers av gruppene var $1,143 \pm 0,07$, som er god kondisjon. Enveis ANOVA viste ingen signifikante forskjeller i k-faktor mellom nellik og ikke-nellik (Figur 14). Det var heller ikke signifikant forskjell mellom ubehandlet, dsCPY eller dsLsLGA5 på tvers av nellik og ikke nellik gruppene.



Figur 14. Gjennomsnittlig k-faktor \pm SD for de ulike gruppene i RNAi knock down forsøket (N=6). Ubehandlet (ubeh) er fisk som ikke er infisert med kopepoditter. dsCPY er fisk som ble smittet med lus badet i dsRNA for trypsin fra torsk. dsLsLGA5 er fisk som ble smittet med lus badet i dsRNA for LsLGA5.

I forsøket ble 24 av 36 laks infisert med lus, 12 i hver av dsCPY- og dsLsLPGA5-gruppene. Hver fisk fikk tilsatt ca. 155 kopepoditter i karet. Etter 3 dager ble fisken avlivet og antall etablerte kopepoditter ble telt for hver fisk. Dette er ikke absolutte tall ettersom kopepoditter er svært små. Gjennomsnittet for dsCPY gruppene, var $40,67 \pm 12,51$ kopepoditter per fisk (Figur

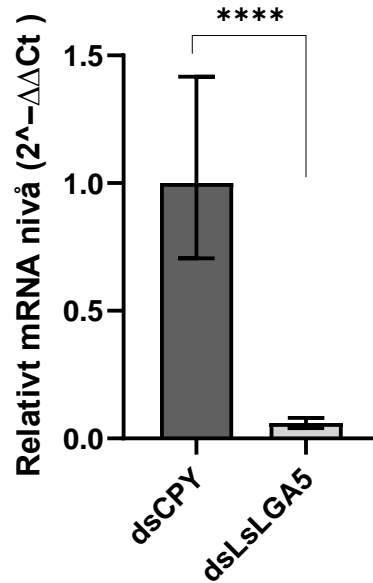
15). dsLsLGP5 gruppene hadde et gjennomsnittlig lusetall på $51,58 \pm 15,09$ kopepoditter per fisk. Enveis-ANOVA viste ingen signifikante forskjeller mellom de ulike gruppene.



Figur 15. Det gjennomsnittlige luseantallet for kopepoditter per fisk i gruppene dsCPY og dsLsGA5 ($N=6$). Enveis-ANOVA viste ikke signifikant forskjell på tvers av gruppene.

3.4.2 RNAi knock down effektivitet

For å vurdere effekten av nedreguleringen av LsLGA5, ble det gjort sanntids PCR av alle SKL prøver. Deretter ble dsLsLGA5 kalibrert mot dsCPY og det ble funnet en signifikant nedregulering på 93,9 % (Figur 16)



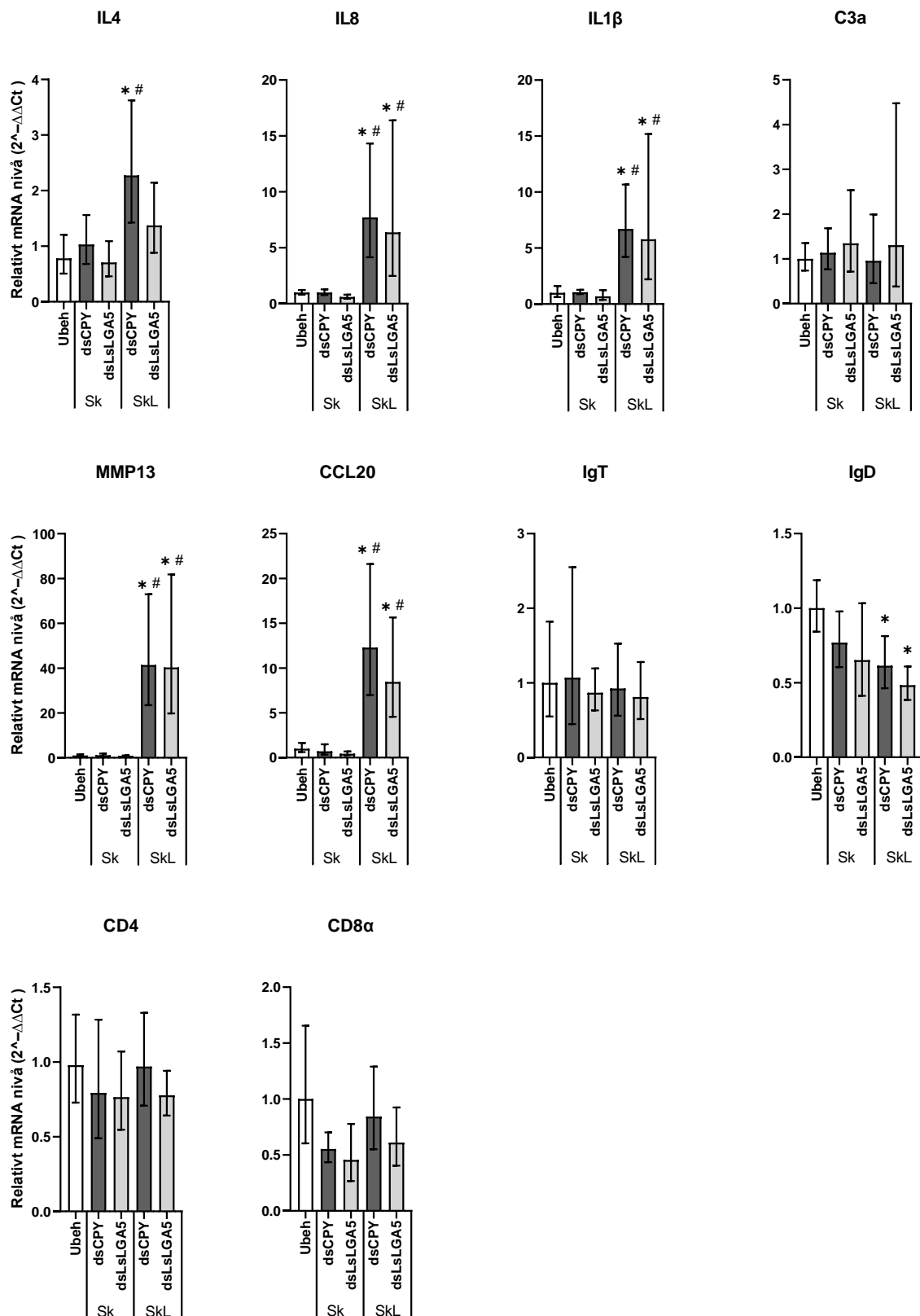
Figur 16. Relativt nedregulert mRNA nivå av LSLGA5 hos kopepoditter badet i dsLsLGA5. Den relative uttrykkningen av LSLGA5 ble beregnet ved $2^{-\Delta\Delta Ct} \pm SD$ (N=12) og relatert til dsCPY. Det var en signifikant nedregulering, $P < 0,0001$.

3.4.3 Funksjonell studie av LsLGA5

For å undersøke om LsLGA5 har immunmodulerende egenskaper ble et utvalg av immungener fra laks brukt i sanntid PCR for å analysere skinnprøver uten lus (SK) og skinnprøver med lus (SKL) fra RNAi knock down forsøket (Figur 17). Uttrykket av de utvalgte genene i alle prøvene ble relatert til SK prøver fra ubehandlet fisk. Toveis ANOVA ble brukt for å se på forskjellen mellom nellik og ikke-nellik gruppene. Det var ingen betydelig forskjell mellom gruppene, og de ble dermed slått sammen. Enveis ANOVA ble brukt for å sammenlikne gruppene, men normalitetskravet ble ikke oppfylt og det var statistiske forskjeller i standardavviket mellom noen av gruppene. Det ble derfor brukt nonparametrisk test.

Det var ikke signifikant forskjell som tydet på at LsLGA5 hadde en immunmodulerende effekt på disse utvalgte immungenene. Det var signifikant forskjell i uttrykkningen av IL4 i SK prøver fra ubehandlet sammenliknet med SKL prøver fra dsCPY ($P < 0,0018$), men ikke fra dsLsLGA5. Og IgD viste signifikant oppregulering ($P < 0,0005$) mellom ubehandlet og SKL prøve fra dsLsLGA5. Videre var det en signifikant oppregulering i uttrykking av IL8 ($P < 0,0070$), IL1 β ($P < 0,0083$), MMP13 ($P < 0,0005$), og CCL20 ($P < 0,0173$) lokalt under lusen (SKL)

sammenlignet med ubehandlet fisk og SK prøvene på behandlet fisk. Det ble ikke sett signifikant forskjell i uttrykking av C3a, IgT, CD4 og CD8 på tvers av gruppene.



Figur 17. Oversikt over uttrykking av utvalgte immungener fra atlantisk laks i SK- og SKL prøver fra RNAi forsøk. Ubehandlet er SK prøver fra uinfisert laks. SK er skinnprøver uten lus. SKL er skinnprøver med kopepoditt. dsCPY er laks smittet med dsCPY behandlede lus. dsLsLGA5 er laks

smittet med dsLsLGA5 behandlede lus. Relativ uttrykking av LsLGA5 ble målt ved sanntid PCR analyser og utregnet via $2^{-\Delta\Delta C_t} \pm SD$ ($N=12$) med ubehandlet gruppe som kalibrator = 1. Signifikans er markert med * mellom SK fra ubehandlet og SKL prøver. Og markert med # mellom SK og SKL prøver fra samme individ.

4.0 Diskusjon

Der parasitt og vert er i tett kontakt er det naturlig at eventuelle immunmodulerende forbindelser skilles ut. Det er godt dokumentert at det er velutviklede og intrikate samspill i flere vert-parasitt interaksjoner, blant annet hos flått (*Ixodidae*) og malariamygg (*Anopheles*). Hos malariamygg endrer føden sammensetningen av spyttet som skilles ut, i tillegg til å ha en smørende effekt på leddene som utgjør munnen (Rodriguez & Hernández-Hernández, 2004). Spyttet inneholder også molekyler som hemmer blodkoagulering og demper inflammasjon av bittet (Ribeiro, 1995). Flått har tettere kontakt med verten over lengre tid sammenliknet med andre ektoparasitter som mygg og lakselus. For å motvirke vertens respons har dermed flått strategier. De skiller ut forbindelser som motvirker vertens blodkoagulering og vasokonstriksjon (Sauer et al., 2000). Og de demper vertens smerte og kløe med forbindelser som bradykinin-deaktiverende dipeptidyl karboksypeptidase og histamin-bindende protein (Paesen et al., 1999; Ribeiro & Mather, 1998). Dette kan minne om lakselusens spyttkjertler og hvordan sekretet blir ført ut på verten (Øvergård et al., 2016). I dette sekretet er det identifisert flere proteiner, deriblant LsLGP1-4 og LsLG1L, der noen av dem er funnet å dempe immunresponser og motvirke koagulering (Øvergård et al., 2022).

Hvis LsLGA5 blir uttrykt i spyttkjertlene kan det tyde på at det også har påvirkning på vert-parasitt interaksjonen. Derfor ble det utført *in situ* hybridisering på snitt med chalimus I lus, som er et livsstadie der LsLGA5 er høyt uttrykt. Som negativ kontroll ble sensprober til LsLGA5 og trypsin brukt, disse gav ikke signal utenom den uspesifikke bindingen i kutikula som forekommer av ukjent grunn (Dalvin et al., 2021; Mørkved, 2020; Tysseland, 2020). I snitt som var tilsatt LsLGA5 antisensprober (Figur 11 og 12) var det signal i de sekretoriske enhetene i lakselusens spyttkjertel som samsvarer med det som tidligere er dokumentert for andre proteiner i spyttkjertlene (Øvergård et al., 2016; Øvergård et al., 2022). Dette bekrefter at LsLGA5 er uttrykt i spyttkjertlene.

Det er dokumentert at vertens adferd endrer seg når den blir smittet med kopepoditter, som fører til kløe og hopping (Grimnes & Jakobsen, 1996). I dette stadiet er kopepoditten ekstra sårbar for å falle av verten under etableringen av infestasjon. Lusen er da avhengig av å modulere den lokale vertresponen. Dette er underbygget av hvordan coholaks (*Oncorhynchus kisutch*) har mekanismer med hyperplasi som fører til at kopepoditt og chalimus I blir begravd av epitelceller (Jones, 2011). Derfor kan det være opplysende å kartlegge når LsLGA5 er høyest uttrykt i livsstadiene LsLGA5 ble videre kraftig oppregulert i kopepoditter fra 4 dager etter infeksjon, deretter sank uttrykket etter chalimus II stadiet. Dette kan antyde at LsLGA5 er viktig for å etablere infeksjonen på verten. Det kan også forklares ved at spyttkjertlene ikke er utviklet før i kopepoditt stadiet (Øvergård et al., 2016). Uttrykksmønsteret til LsLGA5 er dessuten sammenfallende med noen av de nylig karakteriserte LsLGP genene, da felles for tre av disse proteinene er en oppregulering når lusen er i det infiserende stadiet (Øvergård et al., 2022). At uttrykkningen av disse genene varierer gjennom livssyklusen kan komme av at infeksjonen og vertresponen varierer under utviklingen fra små fastsittende kopepoditter, til større og bevegelige adulte lus. Det kunne vært interessant å utføre enda mer presis sanntids PCR på cDNA fra frie kopepoditter, nylig etablerte fastsittende kopepoditter, kopepoditter 1 dag etter etablering, til 2 dager etter etablering osv, for å få et enda mer presist inntrykk av LsLGA5 uttrykket i den tidlige og viktige etableringsfasen før kopepoditten har satt ned filamentet.

Analysen av aminosyresekvensen til LsLGA5 viste at den har et signalpeptid i N-terminus ende, dette antyder at LsLGA5 transporteres ut av spyttkjertelcellen og sekreses. Dette sammen med spyttkjertlenes plassering og utførselskanal i labium, underbygger at LsLGA5 sekreses ut på verten i forbindelse med beiting på huden. En sekvensanalyse ble videre utført for å indikere om LsLGA5 er et aktivt enzym ved å identifisere aminosyrer konserverte i det aktive setet samt for å identifisere eventuelle andre proteindomener. Det ble funnet at LsLGA5 har et astacin-lignende domene på 215 aminosyrer, med et konserverte sink-bindende motif (HEXXHXXGXXH) som utgjør det aktive setet som er felles for astacinfamilien, i tillegg til en konserverte met-turn (SIMHY) (Gomez Gallego et al., 2005; Tallant et al., 2010). I LsLGA5 sees isoleucin imidlertid som valin, men disse er svært like aminosyrer og man kan gå ut ifra at LsLGA5 har en fungerende met-turn. Denne gjør antageligvis at konformasjonen til det aktive setet blir mulig.

Et BLAST søk med aminosyresekvensen til LsLGA5 indikerte at den er nærmest beslektet med astaciner som er annotert som «hatching enzym 1» også kalt «high choriolytic enzym 1» og «low choriolytic enzyme». De fleste enzymene som er viktig for klekking av fiskeegg er sink

metalloproteaser med et astacin-liknende domene (Hiroi et al., 2004; Kawaguchi et al., 2008; Kawaguchi et al., 2006; Kawaguchi et al., 2007; Kawaguchi et al., 2005). «Hatching enzym 1» er et enzym funnet blant annet hos sebrafisk, *Fundulus heteroclitus* og japansk risfisk også kalt medaka. Enzymet er viktig for å bryte ned chorion proteiner slik at kontrahering fra larven sprekker skallet og larven klekkes (Okada et al., 2010). Japansk risfisk har to enzymer som er sentral ved klekking av larvestadiet, «low choriolytic enzyme» og «high choriolytic enzyme» (Yasumasu et al., 1989). Disse enzymene fungerer sammen ved at «high choriolytic enzyme» bryter ned chorionproteiner og gjør skallet permeabelt for vann slik at det sveller opp. Deretter bryter «low choriolytic enzyme» det videre ned slik at larven kan klekkes.

LsLGA5 viser også likhet med embryo protein UVS. 2 i afrikansk klofrosk (*Xenopus laevis*). UVS. 2 blir uttrykt under utviklingen av embryoet (Sato & Sargent, 1990). Dette proteinet er eksklusivt lokalisert i klekkekjertelene i den anteriore nevralfolden av embryoet og er lite karakterisert (Katagiri et al., 1997). Det er antatt at UVS.2 er en metalloprotease i astacin familien og er en av flere klekkeenzymer hos *X. laevis*. Selv om det er nok er usannsynlig at LsLGA5 fra spyttkjertelen også skal være uttrykt i luseegg, kan det grunnet at LsLGP5 viser likhet til disse sekvensene være hensiktsmessig å utføre nærmere analyser for å utelukke en lignende funksjon som vist fra «high/low choriolytic enzyme» og UVS.2. Det relativt lave mRNA nivået av LsLGA5 i egg ble vist gjennom sanntids PCR og indikerer at LsLGA5 ikke har en overlappende funksjon med disse enzymene. Samtidig var eggene som ble brukt i sanntids PCR ikke nær klekking, og dermed kunne det med fordel ha blitt gjennomført analyser på egg nærmere klekking for å utelukke dette. Men det kan nevnes at disse enzymene ikke har ShK domener, noe som videre underbygger at LsLGA5 ikke har lignende funksjon.

Ved et begrenset BLAST søk kun mot *C. elegans*, viser LsLGA5 størst likheten med nas-2 «nematode astacin-2». Dette enzymet er 1 av 16 astaciner på tvers av subgrupper som er antatt å fungere som fordøyelsesenzym (Park et al., 2010). Kjente astaciner som antas å være fordøyelsesenzymer har typisk ikke andre domener enn protease domenet (Titani et al., 1987). Fordi LsLGA5 blir uttrykt i spyttkjertelen som har utførselskanal i labium, og signalpeptidet indikerer at det sekreses ut av cellen, er det ikke utenkelig at LsLGA5 er involvert i fordøyelsen ettersom den kan starte allerede på vertens hud. Da kunne det vært interessant å behandle hud og kanskje epitelceller alene med rekombinant LsLGA5 for å observere virkningen. Men, ettersom fordøyelsesproteaser som tidligere nevnt typisk ikke har andre domener slik som nas-2, i tillegg til at LsLGA5 ikke er uttrykt gjennom alle stadiene lakselusen spiser av fisken, er det lite trolig at LsLGP5 er et enzym som starter nedbrytningen av vertens hud.

Analysen av LsLGA5 predikerte i tillegg til astacin domenet, fire ShK domener i C-terminal ende av aminosyresekvensen. Som nevnt tidligere har subgruppe II (nas-6 til 15) et eller flere ShK domener (Park et al., 2010). Men overraskende nok viste LsLGA5 en lavere sekvenslikhet med disse enn nas-2. Ved sammenstilling av nas-15 og LsGA5 ble det imidlertid funnet at cysteinene var konserverte i ShK domene til LSLGA5. Dessverre er det bare noen få nas i subgruppe II som er funksjonelt karakterisert. Park et al. (2010) fant at nas-6 og -7 mutanter hadde påfallende treg vekst og defekt spiserør (Park et al., 2010). Det ble da antatt at disse to astacinene har en funksjon i utviklingen av spiserøret, men det er lite trolig at LsLGA5 har sammenfallende egenskaper som nas-6 og -7. Fra figur 13 ser man at LsLGA5 er uttrykt i kopepoditter som har sittet på verten i 4 dager, og lakselusens spiserør er ferdig utviklet innen lusen når det fastsittende stadiet (personlig kommunikasjon, Aina-Cathrine Øvergård). Videre avkreftes dette av *in situ* hybridiseringen ved at epitelet som sekreerer kutikulaen som spiserøret består av ikke ble farget (Figur 11 og 12). Det ble heller ikke observert noen synlig forskjell i vekst i RNAi knock down forsøket mellom dsCPY- og dsLsLGA5-gruppen. I tillegg kan det spekuleres om dsRNA behandlet lus med nedregulert LsLGA5 ville falt av verten hvis den ikke beiter på 3 dager, noe det ikke er indikasjoner på (Figur 15). Videre antar Park et al. (2010) at nas-9 og 11 hovedsakelig er uttrykt i hypodermis i det tredje larvestadiet og har derfor foreslått en rolle for disse i stadie-spesifikk prosessering av kutikula komponenter. Om LsLGA5 kan ha en funksjon innen stadie-spesifikt skallskifte er også lite trolig. Dette baseres på hvor LsLGA5 er funnet uttrykt i tillegg til at *in situ* hybridiseringen ikke gav utslag i epidermis som er det vevet som sekreerer kutikula. Hvilken funksjon ShK domeneene i astacinene i subgruppe II har dessuten ikke blitt kartlagt.

Det er identifisert flere astaciner med tre ShK domener, blant annet fra parasittisk rundorm (*Nematoda*), men det er foreløpig gjort få funksjonelle studier angående disse proteinene. Et astacin med ShK domene er funnet i *Strongyloides ratti* som er en rundorm som infiserer rotter og lever i tarmen. I en studie som sammenliknet parasittiske og frittlevende stadier blant flere *Strongyloides*, deriblant *S. ratti*, så en at astaciner var et av de mest oppregulerte genene i de parasittiske stadiene sammenliknet med frittlevende (Hunt et al., 2018).

ShK proteiner uten astacin domene er imidlertid funnet i mange arter, og deriblant mistenkes det å være viktig for helminters immunmodulering. Helminter er en suksessfull gruppe med parasitter som har utviklet spennende tilpasninger for å unngå immunforsvaret (Allen & Maizels, 2011). Til tross for at de er relativt store endoparasitter som migrerer gjennom verten, induserer de bare en begrenset inflammasjon lokalt, da de immunmodulering er strengt

nødvendig for deres overlevelse. Dette foregår ved å begrense T-celle responser og tilhørende sekresjon av cytokiner, induisert apoptose i immunceller og manipulering av PRR (pattern recognition receptors) (Finlay et al., 2014; Oliveira et al., 2016; Zakeri, 2017; Zakeri et al., 2016). «Helminth-derived products» (HDP) er dermed sentral i forskning for å finne behandlinger mot autoimmune sykdommer ettersom det ikke er aktuelt med levende helminter som en del av behandlingen. Og gjennom dette er det funnet at noen HDP'er kan kontrollere funksjonen til T-celler ved å blokkere spenningsstyrte kaliumkanaler (Kv1.3) som er bredt uttrykt og involvert i aktivering av T-celler i mennesker (Zakeri et al., 2018). Dette er egenskaper som overlapper med *Ancylostoma ceylanicum* K1 (AceK1) og *Brugia malayi* K1 (BmK1) som tilhører ShK familien (Chhabra et al., 2014). Det spekuleres derfor om det er ShK-proteiner i disse aktuelle HDP'ene (Zakeri et al., 2018). Fra ShK i blant annet *S.helianthus* er det sett at cysteinene danner disulfidbindinger mellom seg som da gir ShK domene en kulestruktur med eksponerte områder som kan interagere med kaliumkanalene i celler (Tudor et al., 1996). Basert på dette kan det spekuleres i at ShK domene i LsLGA5 danner en kulerekke som kan fasilitere ligand binding slik at astacinet blir riktig posisjonert til substrater. Om bindingssetene for ShK domene er kalium kanaler f.eks på T-celler trenger man videre forskning for å bekrefte.

Det ble videre analysert om LsLGA5 er en immunmodulerende faktor ved å gjennomføre et RNAi knock down forsøk på lakselus med påfølgende infestasjon av laks der utvalgte immungener ble analysert lokalt i laksens hud under knock down lus. Det ble tatt også tatt hudprøve fra områder uten lus for å kunne sammenligne den lokale og systemiske effekten av infestasjonen. Da en dsRNA induert nedregulering av spyttkjertelproteiner har vist seg å avta relativt raskt etter at lusen har satt seg på laksen (Øvergård et al., 2022), ble prøver tatt 3 dager etter smitte med kopepoditter. LsLGA5 er dessuten tydelig uttrykt i fastsittende kopepoditter (Figur 13), samt at laksen viser en oppregulering av immungener når den er infisert med kopepoditter (Øvergård et al., 2018).

Den gjennomsnittlige k-faktoren ble målt til $1,143 \pm 0,07$ som er regnet som god kondisjon på fisk (personlig kommunikasjon, Aina-Cathrine Øvergård). Forsøksfisken ble observert og fôret hver dag, og adferden ble vurdert. Samlet sett viste den interesse ved fôringstart, hadde god appetitt og stod fint i strømmen. Det ble ikke observert fisk som var uegnet til forsøket. Etter statistiske analyser ble det heller ikke funnet indikasjoner på at bruk av nellikolje under transport hadde immundempende effekt på de utvalgte immungenene i denne studien. Dette tyder på at 54 mg/l Aqual-S® (MSD Animal Health) med virkestoff isoeugenol (nellikolje)

under transport som varte i 6 minutter og 21 sekunder ikke har påvirkning på disse utvalgte immungenene som er observerbare ved prøveuttak 3 uker senere. Det vurderes som usannsynlig at eksponering for nellikolje i et så kort tidsrom skal ha påvirkning på prøver som tas ut etter så lang tid. I den videre analysen ble derfor nellik og ikke-nellik gruppene slått sammen, ettersom det ble vurdert til at det ikke var forskjell mellom gruppene.

For å kunne se eventuelle avvik i et RNAi knock down forsøk er det vesentlig at immunresponsen til kontrollgruppen stemmer overens med det som er observert i tidlige studier. Interleukin 4 (IL4) er et cytokin som er viktig i den tidlige responsen og inflammasjon. Det er produsert av aktiverte T-celler som igjen induserer differensiering av naive T-hjelpeceller. IL4 stimulerer også eosinofile- og mast-cellers vekst og funksjon, øker proliferasjon av B-celler og deres uttrykking av MHC II (Zhang & An, 2007). I en studie med infestasjon av lakselus ble uttrykking av IL4 sammenliknet i coholaks, regnbueørret og atlantisk laks, ble det observert at IL4 var høyere uttrykt i coholaks (Braden et al., 2015). Samme studie viste at coholaks er mer resistent mot lakselus og derfor kan eventuell immunmodulering av IL4 være interessant å kartlegge.

Interleukin 1 β (IL1 β) og interleukin 8 (IL8) er i likhet med IL4 viktig i den tidlige immunresponsen og inflammasjon. IL-1 β tilhører interleukin 1 familien og det er funnet at interleukin 1 i fisk er viktig for å aktivere lymfocytter og fagocytter (Kono et al., 2002). IL8 også kalt CXCL8 produseres i store mengder i områder med inflammasjon og induserer rekruttering av leukocytter fra blodårene til det betente vevet. Det er funnet gjennom flere studier at det er signifikant økning av IL8 og IL1 β mRNA lokalt under lusen sammenliknet med skinnprøver uten lus (Braden et al., 2012; Braden et al., 2015; Dalvin et al., 2021; Øvergård et al., 2018; Øvergård et al., 2022).

CCL20 også kalt Chemokine ligand 20, «liver activation regulated chemokine» og «Macrophage Inflammatory Protein-3». Hos mennesker er CCL20 stort sett uttrykt av T-celler og makrofager, og interagerer med CC chemokine receptor 6 (CCR6) (White et al., 2013). Det er et kjemokin som er involvert i inflammasjon, der det tiltrekker lymfocytter og dendritiske celler til den mukosale immuniteten (Liu et al., 2020). Det har blitt identifisert flere CC-lignende kjemokiner i teleoster som man antar er viktig for den mukosale immuniteten, men det er foreløpig lite informasjon om funksjon og rolle i immunforsvaret til teleoster (Peatman & Liu, 2007; White et al., 2013).

Matrix metalloproteinase 13 (MMP13) bryter ned casein, kollagen, fibrinogen og gelatin. Det tilhører peptidase M10 familien i matrix metalloproteinaser, forkortet MMP. I fisk har man sett

en oppregulering av MMP13 ved luseinfestasjoner lokalt, dette fordi MMP13 fungerer som et vevsreparerende enzym (Braden et al., 2015). Kortisol er et kjent stress hormon, dette og luseinfestasjon har en oppregulerende effekt på MMP13 hos atlantisk laks (Krasnov et al., 2012). Noe lignende er også observert i regnbueørret (Krasnov et al., 2005).

Komplementsystemet er en viktig del av det medfødte immunforsvaret og er godt utviklet i teleoster (Holland & Lambris, 2002). Tidlig i inflammasjonen vil dette systemet bli trigget og utløse en kaskade av reaksjoner, dette kan bli aktivert av bakterier eller parasitter (Dang et al., 2016; Yin et al., 2016). Den mest sentrale komponenten i komplementsystemet er C3a som aktiverer de ulike veiene; lektin-, klassiske- og den alternative veien. Dette fører til opsonisering, kjemotaksis, økt fagocytose, inflammasjon og «Membran attack» komplekset (MAC) som kan lysere og dermed drepe patogener. Funksjonen til C3a er ikke fullt ut beskrevet for teleoster, men det er vist at C3a kan trigge respiratorisk utbrudd i leukocytter (Kato et al., 2004; Rotllant et al., 2004). Det er vist at regnbueørret infisert med *Ichthyophthirius multifiliis*, også kalt «ich» får en kraftig komplement reaksjon på grunn av skadene påført i huden (Zhang et al., 2018). Dalvin et al (2021) fant at C3a var oppregulert i hud under lus sammenliknet med hud uten lus fra nærliggende område.

I fisk er det funnet tre ulike immunoglobulin (Ig) isotyper; IgM, IgD og IgT/Z. De sekreses fra B-celler og bindes til antigener på patogener ved opsonisering for å fremme fagocytose og lysis. Høye nivåer av IgT kan derfor indikere tilstedeværelse av B-celler. IgT er antatt å være viktig for mukosal immunitet og var derfor interessant å undersøke (Xu et al., 2013; Zhang et al., 2010). Det er også vist at lakselus kan ha en immunmodulerende effekt på IgT ved at det er lavere uttrykt i hud under lus sammenliknet med nærliggende hud prøver uten lus fra ubehandlet fisk (Dalvin et al., 2021). IgDs rolle og funksjon i fisk er enda ikke kartlagt, og sekretoriske former ikke funnet foreløpig (Hordvik, 2015; Salinas, 2015). Hos regnbueørret er det funnet at IgD er høyere uttrykt hos fisk infisert med lakselus sammenliknet med uinfisert fisk (Dalvin et al., 2021). Høye nivåer av IgD tyder på tilstedeværelse av B-celler som er IgD+.

T-celler kan deles inn i cytotoksiske T-celler og T-hjelper celler. De cytotoksiske T-cellene har membranbundet CD8 på celleoverflaten, mens T-hjelper celler har CD4. CD4 T-celler i fisk øker den cellemedierte immuniteten, stimulerer makrofager til mikrobiell aktivitet og B-celler til å produsere immunoglobuliner (Ashfaq et al., 2019; Robertsen, 2006). I tillegg tiltrekker de granulocytter ved inflammasjon, antigen-spesifikk proliferasjon og regulering av immunrespons (Yoshiura et al., 2003). Ved infestasjon av lakselus er det sett 3 dpi en økning i CD4 tilstedeværelse i intakt hud som tyder på rask infiltrering av T-celler etter at fisken er

eksponert for kopepoditter (Skugor et al., 2008). I samme studie ble det sett en ny bølge av CD4 oppregulering etter 33 dpi i områder med hud skadet av lus. CD8 t-celler drepe virus infiserte celler ved å sekreere TNF-alfa og IFN- γ , frigjøre granuler med perforin og granzymmer, og ved å destruere celler via Fas/FasL. CD8 t-celler har i studier med atlantisk laks og regnbueørret vist en lokal nedregulering under adulte lus, noe som kan tyde på immunmodulering fra lakselus (Braden et al., 2015; Dalvin et al., 2020). Dette blir delvis underbygget av et forsøk med kopepoditter på atlantisk laks der ved 24 ddpi var en lokal oppregulering, og deretter en signifikant nedregulering ved 72 ddpi (Øvergård et al., 2018).

Fra RNAi knock down forsøket ble det observert normal immunrespons mot luseinfestasjon som er sett i tidligere studier, i uttrykkningen av IL4, IL8, IL1 β , MMP13, CCL20 og IgD (Braden et al., 2012; Braden et al., 2015; Dalvin et al., 2021; Dalvin et al., 2020; Krasnov et al., 2005; Krasnov et al., 2012; Skugor et al., 2008; Øvergård et al., 2018; Øvergård et al., 2022). I forsøket ble det ikke observert respons fra verten mot lusinfestasjon ved regulering av C3a, IgT, CD4 og CD8.

Derfor kan man gå ut ifra at forsøket ble korrekt utført, i tillegg til at RNAi knock down effektiviteten ble målt til 93,6 % som anses som vellykket. Det ble ikke observert noen signifikant forskjell mellom dsCPY- og dsLsLGA5-behandlet gruppe, noe som antyder at LsLGA5 ikke påvirker uttrykket av dette utvalget av immungener hos laks. Det ble heller ikke observert signifikant forskjell i antall lus på infisert laks, noe som indikere at LsLGA5 ikke er sentral i den tidlige etableringsfasen. Det viser også at nedregulert LsLGA5 ikke fører til en alvorlig endring i fenotypen. Det er imidlertid funnet flere astaciner som er uttrykt i spyttkjertelen (personlig kommunikasjon, Aina-Cathrine Øvergård) og disse er relativt like LsLGA5, og det er mulig at disse kompenserer for nedreguleringen av LsLGA5.

4.1 Konklusjon og videre arbeid

Basert på denne studien kan nellikolje brukes som beroligende middel under transport når det er 3 uker fra fisken ble eksponert til prøveuttak. Om dette er nok dokumentasjon på at nellikolje kan brukes under transport av forsøksfisk bør vurderes for hvert tilfelle. Det burde gjøres flere undersøkelser med lengre eksponeringstid og kortere intervall til prøveuttak. Dette bør gjøres for å kartlegge når nellikolje eventuelt kan påvirke forsøk som ser på immunforsvaret.

LsLGA5 ble bekreftet uttrykt i spyttkjertelen, og det koder for et astacin med et sink-bindende aktivt sete. I tillegg koder det for 4 ShK domener med konserverte cysteiner. Videre analyser

av sekvensen kunne ikke bekrefte eller avkrefte om LsLGA5 har en funksjon i vert-parasitt interaksjonen. For å avklare rollen til LsLGA5 burde det gjøres *in situ* hybridisering på luseegg som er nær klekking for å utelukke lignende funksjon som nevnte chorion-proteiner. Og det hadde vært interessant å gjøre *in vitro* studie på hud og epitelceller med rekombinant protein for å undersøke om LsLGA5 kan være involvert i å bryte ned epitelet. LsLGA5 ble uttrykt når kopepoditten etablerte seg på verten og avtok etter chalimus stadiene, dette kan antyde at det har noe med den sårbare etableringsfasen å gjøre. Fra RNAi knock down forsøket ble det ikke funnet antydninger som viser at LsLGA5 har immunmodulerende effekt på de utvalgte immungenene fra laks. Det må derfor flere forsøk med andre immungener til før dette eventuelt kan videre konkluderes.

Referanser

- Allen, J. E., & Maizels, R. M. (2011). Diversity and dialogue in immunity to helminths. *Nature Reviews Immunology*, 11(6), 375-388. <https://doi.org/10.1038/nri2992>
- Ashfaq, H., Soliman, H., Saleh, M., & El-Matbouli, M. (2019). CD4: a vital player in the teleost fish immune system. *Veterinary Research*, 50(1). <https://doi.org/10.1186/s13567-018-0620-0>
- Bányai, L., Tordai, H., & Patthy, L. (1994). The gelatin-binding site of human 72 kDa type IV collagenase (gelatinase A). *Biochemical Journal*, 298(2), 403-407. <https://doi.org/10.1042/bj2980403>
- Barbaro, K. C., Knysak, I., Martins, R., Hogan, C., & Winkel, K. (2005). Enzymatic characterization, antigenic cross-reactivity and neutralization of dermonecrotic activity of five *Loxosceles* spider venoms of medical importance in the Americas. *Toxicon*, 45(4), 489-499. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2004.12.009>
- Barker, S. E., Bricknell, I. R., Covello, J., Purcell, S., Fast, M. D., Wolters, W., & Bouchard, D. A. (2019). Sea lice, *Lepeophtheirus salmonis* (Krøyer 1837), infected Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) are more susceptible to infectious salmon anemia virus. *PLoS One*, 14(1), e0209178. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0209178>
- Bell, S., Bron, J. E., & Sommerville, C. (2000). The distribution of exocrine glands in *Lepeophtheirus salmonis* and *Caligus elongatus* (Copepoda: Caligidae). *Contributions to Zoology*, 69(1-2), 9-20. <https://doi.org/10.1163/18759866-0690102001>
- Bond, J. S., & Beynon, R. J. (1995). The astacin family of metalloendopeptidases. *Protein Sci*, 4(7), 1247-1261. <https://doi.org/10.1002/pro.5560040701>
- Braden, L. M., Barker, D. E., Koop, B. F., & Jones, S. R. (2012). Comparative defense-associated responses in salmon skin elicited by the ectoparasite *Lepeophtheirus salmonis*. *Comp Biochem Physiol Part D Genomics Proteomics*, 7(2), 100-109. <https://doi.org/10.1016/j.cbd.2011.12.002>
- Braden, L. M., Koop, B. F., & Jones, S. R. (2015). Signatures of resistance to *Lepeophtheirus salmonis* include a TH2-type response at the louse-salmon interface. *Developmental & Comparative Immunology*, 48(1), 178-191. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.dci.2014.09.015>
- Bron, J. E., Sommerville, C., Jones, M., & Rae, G. H. (1991). The settlement and attachment of early stages of the salmon louse, *Lepeophtheirus salmonis* (Copepoda: Caligidae) on the salmon host, *Salmo salar*. *Journal of Zoology*, 224(2), 201-212. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7998.1991.tb04799.x>
- Bron, J. E., Sommerville, C., & Rae, G. H. (1993). The functional morphology of the alimentary canal of larval stages of the parasitic copepod *Lepeophtheirus salmonis*.

- Journal of Zoology*, 230(2), 207-220. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1469-7998.1993.tb02683.x>
- Bullock, A. M., Marks, R., & Roberts, R. J. (1978). The cell kinetics of teleost fish epidermis: Epidermal mitotic activity in relation to wound healing at varying temperatures in plaice (*Pleuronectes platessa*). *Journal of Zoology*, 185(2), 197-204. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1469-7998.1978.tb03321.x>
- Carthew, R. W. (2001). Gene silencing by double-stranded RNA. *Curr Opin Cell Biol*, 13(2), 244-248. [https://doi.org/10.1016/s0955-0674\(00\)00204-0](https://doi.org/10.1016/s0955-0674(00)00204-0)
- Castañeda, O., Sotolongo, V., Amor, A. M., Stöcklin, R., Anderson, A. J., Harvey, A. L., Engström, Å., Wernstedt, C., & Karlsson, E. (1995). Characterization of a potassium channel toxin from the Caribbean sea anemone *Stichodactyla helianthus*. *Toxicon*, 33(5), 603-613. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0041-0101\(95\)00013-C](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0041-0101(95)00013-C)
- Chaieb, K., Hajlaoui, H., Zmantar, T., Kahla-Nakbi, A. B., Rouabhia, M., Mahdouani, K., & Bakhrouf, A. (2007). The chemical composition and biological activity of clove essential oil, *Eugenia caryophyllata* (*Syzygium aromaticum* L. *Myrtaceae*): a short review. *Phytother Res*, 21(6), 501-506. <https://doi.org/10.1002/ptr.2124>
- Chhabra, S., Chang, S. C., Nguyen, H. M., Huq, R., Tanner, M. R., Londono, L. M., Estrada, R., Dhawan, V., Chauhan, S., Upadhyay, S. K., Gindin, M., Hotez, P. J., Valenzuela, J. G., Mohanty, B., Swarbrick, J. D., Wulff, H., Iadonato, S. P., Gutman, G. A., Beeton, C., . . . Chandy, K. G. (2014). Kv1.3 channel-blocking immunomodulatory peptides from parasitic worms: implications for autoimmune diseases. *The FASEB Journal*, 28(9), 3952-3964. <https://doi.org/10.1096/fj.14-251967>
- Costello, M. J. (1993). Review of methods to control sea lice (Caligidae: Crustacea) infestations on salmon (*Salmo salar*) farms. In *Pathogen of wild and farmed fish: Sea Lice* (pp. 392). CRC Press.
- Dalvin, S., Eichner, C., Dondrup, M., & Øvergård, A.-C. (2021). Roles of three putative salmon louse (*Lepeophtheirus salmonis*) prostaglandin E2 synthases in physiology and host–parasite interactions. *Parasites & Vectors*, 14(1). <https://doi.org/10.1186/s13071-021-04690-w>
- Dalvin, S., Jørgensen, L. v. G., Kania, P. W., Grotmol, S., Buchmann, K., & Øvergård, A.-C. (2020). Rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* skin responses to salmon louse *Lepeophtheirus salmonis*: From copepodid to adult stage. *Fish & Shellfish Immunology*, 103, 200-210. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.fsi.2020.05.014>
- Dang, Y., Xu, X., Shen, Y., Hu, M., Zhang, M., Li, L., Lv, L., & Li, J. (2016). Transcriptome Analysis of the Innate Immunity-Related Complement System in Spleen Tissue of *Ctenopharyngodon idella* Infected with *Aeromonas hydrophila*. *PLoS One*, 11(7), e0157413. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0157413>
- Davis, D. J., Klug, J., Hankins, M., Doerr, H. M., Monticelli, S. R., Song, A., Gillespie, C. H., & Bryda, E. C. (2015). Effects of Clove Oil as a Euthanasia Agent on Blood

- Collection Efficiency and Serum Cortisol Levels in *Danio rerio*. *J Am Assoc Lab Anim Sci*, 54(5), 564-567.
- Davis, M. W., Birnie, A. J., Chan, A. C., Page, A. P., & Jorgensen, E. M. (2004). A conserved metalloprotease mediates ecdysis in *Caenorhabditis elegans*. *Development*, 131(23), 6001-6008. <https://doi.org/10.1242/dev.01454>
- Dumermuth, E., Sterchi, E. E., Jiang, W. P., Wolz, R. L., Bond, J. S., Flannery, A. V., & Beynon, R. J. (1991). The astacin family of metalloendopeptidases. *Journal of Biological Chemistry*, 266(32), 21381-21385. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)54648-2](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)54648-2)
- Eichner, C., Nilsen, F., Grotmol, S., & Dalvin, S. (2014). A method for stable gene knock-down by RNA interference in larvae of the salmon louse (*Lepeophtheirus salmonis*). *Exp Parasitol*, 140, 44-51. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2014.03.014>
- Fast, M. D., Johnson, S. C., Eddy, T. D., Pinto, D., & Ross, N. W. (2007). *Lepeophtheirus salmonis* secretory/excretory products and their effects on Atlantic salmon immune gene regulation. *Parasite Immunology*, 29(4), 179-189. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3024.2007.00932.x>
- Finlay, C. M., Walsh, K. P., & Mills, K. H. G. (2014). Induction of regulatory cells by helminth parasites: exploitation for the treatment of inflammatory diseases. *Immunological Reviews*, 259(1), 206-230. <https://doi.org/10.1111/imr.12164>
- Finstad, B., Bjørn, P. A., Grimnes, A., & Hvidsten, N. A. (2000). Laboratory and field investigations of salmon lice [*Lepeophtheirus salmonis* (Krøyer)] infestation on Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) post-smolts. *Aquaculture Research*, 31(11), 795-803. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2109.2000.00511.x>
- Generell biologi*. (2017, 17.02.2020). Havforskningsinstituttet. Retrieved 19.05 from <https://www.hi.no/hi/temasider/arter/lakselus/generell-biologi>
- Gomez Gallego, S., Loukas, A., Slade, R. W., Neva, F. A., Varatharajalu, R., Nutman, T. B., & Brindley, P. J. (2005). Identification of an astacin-like metallo-proteinase transcript from the infective larvae of *Strongyloides stercoralis*. *Parasitology International*, 54(2), 123-133. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.parint.2005.02.002>
- Gomis-Rüth, F. X., Trillo-Muyo, S., & Stöcker, W. (2012). Functional and structural insights into astacin metallopeptidases. *Biol Chem*, 393(10), 1027-1041. <https://doi.org/10.1515/hsz-2012-0149>
- Gonzalez-Alanis, P., Wright, G. M., Johnson, S. C., & Burka, J. F. (2001). Frontal Filament Morphogenesis in the Salmon Louse (*Lepeophtheirus salmonis*). *Journal of Parasitology*, 87(3), 561-574. [https://doi.org/10.1645/0022-3395\(2001\)087\[0561:ffmits\]2.0.co;2](https://doi.org/10.1645/0022-3395(2001)087[0561:ffmits]2.0.co;2)
- Grimnes, A., & Jakobsen, P. J. (1996). The physiological effects of salmon lice infection on post-smolt of Atlantic salmon. *Journal of Fish Biology*, 48(6), 1179-1194. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.1996.tb01813.x>

- Hamre, L. A., Eichner, C., Caipang, C. M., Dalvin, S. T., Bron, J. E., Nilsen, F., Boxshall, G., & Skern-Mauritzen, R. (2013). The Salmon Louse *Lepeophtheirus salmonis* (Copepoda: Caligidae) life cycle has only two Chalimus stages. *PLoS One*, 8(9), e73539. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0073539>
- Harasimczuk, E., Øvergård, A.-C., Grotmol, S., Nilsen, F., & Dalvin, S. (2018). Characterization of three salmon louse (*Lepeophtheirus salmonis*) genes with fibronectin II domains expressed by tegumental type 1 glands. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 219, 1-9. <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2017.12.002>
- Hedgecock, E. M., Culotti, J. G., Hall, D. H., & Stern, B. D. (1987). Genetics of cell and axon migrations in *Caenorhabditis elegans*. *Development*, 100(3), 365-382. <https://doi.org/10.1242/dev.100.3.365>
- Heggland, E. I., Dondrup, M., Nilsen, F., & Eichner, C. (2020). Host gill attachment causes blood-feeding by the salmon louse (*Lepeophtheirus salmonis*) chalimus larvae and alters parasite development and transcriptome. *Parasites & Vectors*, 13(1). <https://doi.org/10.1186/s13071-020-04096-0>
- Heuch, P. A., Nordhagen, J. R., & Schram, T. A. (2000). Egg production in the salmon louse [*Lepeophtheirus salmonis* (Krøyer)] in relation to origin and water temperature. *Aquaculture Research*, 31(11), 805-814. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2109.2000.00512.x>
- Hiroi, J., Maruyama, K., Kawazu, K., Kaneko, T., Ohtani-Kaneko, R., & Yasumasu, S. (2004). Structure and developmental expression of hatching enzyme genes of the Japanese eel *Anguilla japonica* : an aspect of the evolution of fish hatching enzyme gene. *Development Genes and Evolution*, 214(4), 176-184. <https://doi.org/10.1007/s00427-004-0397-1>
- Hishida, R., Ishihara, T., Kondo, K., & Katsura, I. (1996). hch-1, a gene required for normal hatching and normal migration of a neuroblast in *C. elegans*, encodes a protein related to TOLLOID and BMP-1. *Embo j*, 15(16), 4111-4122.
- Holland, M. C., & Lambris, J. D. (2002). The complement system in teleosts. *Fish Shellfish Immunol*, 12(5), 399-420. <https://doi.org/10.1006/fsim.2001.0408>
- Hordvik, I. (2015). Immunoglobulin Isotypes in Atlantic Salmon, *Salmo Salar*. *Biomolecules*, 5(1), 166-177. <https://doi.org/10.3390/biom5010166>
- Huang, X., Liu, Y., Lu, Y., & Ma, C. (2015). Anti-inflammatory effects of eugenol on lipopolysaccharide-induced inflammatory reaction in acute lung injury via regulating inflammation and redox status. *Int Immunopharmacol*, 26(1), 265-271. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2015.03.026>
- Hui, Q., Ammeter, E., Liu, S., Yang, R., Lu, P., Lahaye, L., & Yang, C. (2020). Eugenol attenuates inflammatory response and enhances barrier function during lipopolysaccharide-induced inflammation in the porcine intestinal epithelial cells. *Journal of Animal Science*, 98(8). <https://doi.org/10.1093/jas/skaa245>

- Hunt, V. L., Hino, A., Yoshida, A., & Kikuchi, T. (2018). Comparative transcriptomics gives insights into the evolution of parasitism in *Strongyloides* nematodes at the genus, subclade and species level. *Scientific Reports*, 8(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-018-23514-z>
- Iversen, M., Eliassen, R. A., & Finstad, B. (2009). Potential benefit of clove oil sedation on animal welfare during salmon smolt, (*Salmo salar* L.) transport and transfer to sea. *Aquaculture Research*, 40(2), 233-241. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2008.02091.x>
- Jacobson, K. C., Arkoosh, M. R., Kagley, A. N., Clemons, E. R., Collier, T. K., & Casillas, E. (2003). Cumulative Effects of Natural and Anthropogenic Stress on Immune Function and Disease Resistance in Juvenile Chinook Salmon. *Journal of Aquatic Animal Health*, 15(1), 1-12. [https://doi.org/10.1577/1548-8667\(2003\)015<0001:ceonaa>2.0.co;2](https://doi.org/10.1577/1548-8667(2003)015<0001:ceonaa>2.0.co;2)
- Johnson, S. C., & Albright, L. J. (1991). The developmental stages of *Lepeophtheirus salmonis* (Krøyer, 1837) (Copepoda: Caligidae). *Canadian Journal of Zoology*, 69, 929-950.
- Jones, M. W., Sommerville, C., & 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), 303-310. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1365-2761.1990.tb00786.x>
- Jones, S. (2011). Mechanisms of resistance among salmon to the parasitic copepod *Lepeophtheirus salmonis*. *Journal of Aquaculture Research and Development*, 01. <https://doi.org/10.4172/2155-9546.s2-003>
- Jönsdóttir, H., Bron, J. E., Wotten, R., & Turnbull, J. F. (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*, 15(6), 521-527. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1365-2761.1992.tb00684.x>
- Kabata, Z. (1974a). *Lepeophtheirus cuneifer* sp. nov. (Copepoda: Caligidae), a Parasite of Fishes from the Pacific Coast of North America. *Journal of the Fisheries Research Board of Canada*, 31(1), 43-47. <https://doi.org/10.1139/f74-006>
- Kabata, Z. (1974b). Mouth and Mode of Feeding of Caligidae (Copepoda), Parasites of Fishes, as Determined by Light and Scanning Electron Microscopy. *Journal of the Fisheries Research Board of Canada*, 31(10), 1583-1588. <https://doi.org/10.1139/f74-199>
- Katagiri, C., Maeda, R., Yamashika, C., Mita, K., Sargent, T. D., & Yasumasu, S. (1997). Molecular cloning of *Xenopus* hatching enzyme and its specific expression in hatching gland cells. *Int J Dev Biol*, 41(1), 19-25.
- Kato, Y., Nakao, M., Shimizu, M., Wariishi, H., & Yano, T. (2004). Purification and functional assessment of C3a, C4a and C5a of the common carp (*Cyprinus carpio*)

- complement. *Dev Comp Immunol*, 28(9), 901-910.
<https://doi.org/10.1016/j.dci.2004.01.006>
- Kawaguchi, M., Nakagawa, M., Noda, T., Yoshizaki, N., Hiroi, J., Nishida, M., Iuchi, I., & Yasumasu, S. (2008). Hatching enzyme of the ovoviviparous black rockfish *Sebastes schlegelii* - environmental adaptation of the hatching enzyme and evolutionary aspects of formation of the pseudogene. *FEBS Journal*, 275(11), 2884-2898.
<https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2008.06427.x>
- Kawaguchi, M., Yasumasu, S., Hiroi, J., Naruse, K., Inoue, M., & Iuchi, I. (2006). Evolution of teleostean hatching enzyme genes and their paralogous genes. *Development Genes and Evolution*, 216(12), 769-784. <https://doi.org/10.1007/s00427-006-0104-5>
- Kawaguchi, M., Yasumasu, S., Hiroi, J., Naruse, K., Suzuki, T., & Iuchi, I. (2007). Analysis of the exon–intron structures of fish, amphibian, bird and mammalian hatching enzyme genes, with special reference to the intron loss evolution of hatching enzyme genes in Teleostei. *Gene*, 392(1-2), 77-88. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2006.11.012>
- Kawaguchi, M., Yasumasu, S., Shimizu, A., Hiroi, J., Yoshizaki, N., Nagata, K., Tanokura, M., & Iuchi, I. (2005). Purification and gene cloning of *Fundulus heteroclitus* hatching enzyme. A hatching enzyme system composed of high choriolytic enzyme and low choriolytic enzyme is conserved between two different teleosts, *Fundulus heteroclitus* and medaka *Oryzias latipes*. *FEBS Journal*, 272(17), 4315-4326.
<https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2005.04845.x>
- Keene, Noakes, Moccia, & Soto. (1998). The efficacy of clove oil as an anaesthetic for rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Aquaculture Research*, 29(2), 89-101. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2109.1998.00927.x>
- Kono, T., Fujiki, K., Nakao, M., Yano, T., Endo, M., & Sakai, M. (2002). The immune responses of common carp, *Cyprinus carpio* L., injected with carp interleukin-1beta gene. *J Interferon Cytokine Res*, 22(4), 413-419.
<https://doi.org/10.1089/10799900252952190>
- Krasnov, A., Koskinen, H., Pehkonen, P., Rexroad, C. E., Afanasyev, S., & Mölsä, H. (2005). Gene expression in the brain and kidney of rainbow trout in response to handling stress. *BMC Genomics*, 6(1). <https://doi.org/10.1186/1471-2164-6-3>
- Krasnov, A., Skugor, S., Todorovic, M., Glover, K. A., & Nilsen, F. (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), 130. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-13-130>
- Kryvi, H., & Poppe, T. (2021). *Fiskeanatomi* (2. utgave. ed.). Fagbokforlaget.
- Kuo, M. M. C., Haynes, W. J., Loukin, S. H., Kung, C., & Saimi, Y. (2005). Prokaryotic K⁺ channels: From crystal structures to diversity. *FEMS Microbiology Reviews*, 29(5), 961-985. <https://doi.org/10.1016/j.femsre.2005.03.003>
- Liu, F., Wang, T., Hu, Y., Tian, G., Secombes, C. J., & Wang, T. (2020). Expansion of fish CCL20_{like} chemokines by genome and local gene duplication: Characterisation and

- expression analysis of 10 CCL20_like chemokines in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Developmental & Comparative Immunology*, 103, 103502. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2019.103502>
- Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*, 25(4), 402-408. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>
- Medved, L., Tsurupa, G., & Yakovlev, S. (2001). Conformational changes upon conversion of fibrinogen into fibrin. The mechanisms of exposure of cryptic sites. *Ann N Y Acad Sci*, 936, 185-204. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2001.tb03505.x>
- Mustafa, A., Speare, D. J., Daley, J., Conboy, G. A., & Burka, J. F. (2000). Enhanced susceptibility of seawater cultured rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), to the microsporidian *Loma salmonae* during a primary infection with the sea louse, *Lepeophtheirus salmonis*. *Journal of Fish Diseases*, 23(5), 337-341. <https://doi.org/https://doi.org/10.1046/j.1365-2761.2000.00235.x>
- Möhrlen, F., Hutter, H., & Zwilling, R. (2003). The astacin protein family in *Caenorhabditis elegans*. *European Journal of Biochemistry*, 270(24), 4909-4920. <https://doi.org/10.1046/j.1432-1033.2003.03891.x>
- Mørkved, B. J. (2020). Karakterisering av LsLGP5 i lakselus (*Lepeophtheirus salmonis*) og dens rolle i vertparasitt interaksjonen mellom lakselus og atlantisk laks (*Salmo salar*) [Master, Universitetet i Bergen]. Bergen.
- Nigam, A. K., Kumari, U., Mittal, S., & Mittal, A. K. (2012). Comparative analysis of innate immune parameters of the skin mucous secretions from certain freshwater teleosts, inhabiting different ecological niches. *Fish Physiology and Biochemistry*, 38(5), 1245-1256. <https://doi.org/10.1007/s10695-012-9613-5>
- Novelli, J., Ahmed, S., & Hodgkin, J. (2004). Gene interactions in *Caenorhabditis elegans* define DPY-31 as a candidate procollagen C-proteinase and SQT-3/ROL-4 as its predicted major target. *Genetics*, 168(3), 1259-1273. <https://doi.org/10.1534/genetics.104.027953>
- Okada, A., Sano, K., Nagata, K., Yasumasu, S., Ohtsuka, J., Yamamura, A., Kubota, K., Iuchi, I., & Tanokura, M. (2010). Crystal Structure of Zebrafish Hatching Enzyme 1 from the Zebrafish *Danio rerio*. *Journal of Molecular Biology*, 402(5), 865-878. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2010.08.023>
- Oliveira, S. C., Figueiredo, B. C., Cardoso, L. S., & Carvalho, E. M. (2016). A double edged sword: *Schistosoma mansoni* Sm29 regulates both Th1 and Th2 responses in inflammatory mucosal diseases. *Mucosal Immunology*, 9(6), 1366-1371. <https://doi.org/10.1038/mi.2016.69>
- Overton, K., Dempster, T., Oppedal, F., Kristiansen, T. S., Gismervik, K., & Stien, L. H. (2019). Salmon lice treatments and salmon mortality in Norwegian aquaculture: a review. *Reviews in Aquaculture*, 11(4), 1398-1417. <https://doi.org/10.1111/raq.12299>

- Paesen, G. C., Adams, P. L., Harlos, K., Nuttall, P. A., & Stuart, D. I. (1999). Tick Histamine-Binding Proteins. *Molecular Cell*, 3(5), 661-671. [https://doi.org/10.1016/s1097-2765\(00\)80359-7](https://doi.org/10.1016/s1097-2765(00)80359-7)
- Park, J.-O., Pan, J., Möhrle, F., Schupp, M.-O., Johnsen, R., Baillie, D. L., Zapf, R., Moerman, D. G., & Hutter, H. (2010). Characterization of the astacin family of metalloproteases in *C. elegans*. *BMC Developmental Biology*, 10(1), 14. <https://doi.org/10.1186/1471-213x-10-14>
- Peatman, E., & Liu, Z. (2007). Evolution of CC chemokines in teleost fish: a case study in gene duplication and implications for immune diversity. *Immunogenetics*, 59(8), 613-623. <https://doi.org/10.1007/s00251-007-0228-4>
- Pykkö, P., Suomalainen, L. R., Tirola, M., & Valtonen, E. T. (2006). Evidence of enhanced bacterial invasion during *Diplostomum spathaceum* infection in European grayling, *Thymallus thymallus* (L.). *J Fish Dis*, 29(2), 79-86. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2761.2006.00683.x>
- Quilhac, A., & Sire, J. Y. (1999). Spreading, proliferation, and differentiation of the epidermis after wounding a cichlid fish, *Hemichromis bimaculatus*. *Anat Rec*, 254(3), 435-451. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1097-0185\(19990301\)254:3<435::Aid-ar15>3.0.Co;2-d](https://doi.org/10.1002/(sici)1097-0185(19990301)254:3<435::Aid-ar15>3.0.Co;2-d)
- Readman, G. D., Owen, S. F., Murrell, J. C., & Knowles, T. G. (2013). Do Fish Perceive Anaesthetics as Aversive? *PLoS One*, 8(9), e73773. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0073773>
- Ream, R. A., Theriot, J. A., & Somero, G. N. (2003). Influences of thermal acclimation and acute temperature change on the motility of epithelial wound-healing cells (keratocytes) of tropical, temperate and Antarctic fish. *J Exp Biol*, 206(Pt 24), 4539-4551. <https://doi.org/10.1242/jeb.00706>
- Ribeiro, J. M. (1995). Blood-feeding arthropods: live syringes or invertebrate pharmacologists? *Infect Agents Dis*, 4(3), 143-152.
- Ribeiro, J. M. C., & Mather, T. N. (1998). *Ixodes scapularis*: Salivary Kininase Activity Is a Metallo Dipeptidyl Carboxypeptidase. *Experimental Parasitology*, 89(2), 213-221. <https://doi.org/https://doi.org/10.1006/expr.1998.4296>
- Ricard-Blum, S., & Ballut, L. (2011). Matricryptins derived from collagens and proteoglycans. *Front Biosci (Landmark Ed)*, 16(2), 674-697. <https://doi.org/10.2741/3712>
- Richardson, R., Slanchev, K., Kraus, C., Knyphausen, P., Eming, S., & Hammerschmidt, M. (2013). Adult zebrafish as a model system for cutaneous wound-healing research. *J Invest Dermatol*, 133(6), 1655-1665. <https://doi.org/10.1038/jid.2013.16>
- Roberts, S. D., & Powell, M. D. (2004). The viscosity and glycoprotein biochemistry of salmonid mucus varies with species, salinity and the presence of amoebic gill disease. *Journal of Comparative Physiology B*. <https://doi.org/10.1007/s00360-004-0453-1>

- Robertsen, B. (2006). The interferon system of teleost fish. *Fish Shellfish Immunol*, 20(2), 172-191. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2005.01.010>
- Rodriguez, M. H., & Hernández-Hernández, F. d. l. C. (2004). Insect–malaria parasites interactions: the salivary gland. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 34(7), 615-624. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2004.03.014>
- Ross, L., Ross, B., & Ross, B. (2008). Anaesthetic and Sedative Techniques for Aquatic Animals. <https://doi.org/10.1002/9781444302264.ch7>
- Rotllant, J., Parra, D., Peters, R., Boshra, H., & Sunyer, J. O. (2004). Generation, purification and functional characterization of three C3a anaphylatoxins in rainbow trout: role in leukocyte chemotaxis and respiratory burst. *Dev Comp Immunol*, 28(7-8), 815-828. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2003.11.001>
- Salinas, I. (2015). The Mucosal Immune System of Teleost Fish. *Biology*, 4(3), 525-539. <https://doi.org/10.3390/biology4030525>
- Samsing, F., Oppedal, F., Dalvin, S., Johnsen, I., Vågseth, T., & Dempster, T. (2016). Salmon lice (*Lepeophtheirus salmonis*) development times, body size, and reproductive outputs follow universal models of temperature dependence. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 73(12), 1841-1851. <https://doi.org/10.1139/cjfas-2016-0050>
- Sato, S. M., & Sargent, T. D. (1990). Molecular approach to dorsoanterior development in *Xenopus laevis*. *Developmental Biology*, 137(1), 135-141.
- Sauer, J. R., Essenberg, R. C., & Bowman, A. S. (2000a). Salivary glands in ixodid ticks: control and Sauer, J. R., Essenberg, R. C., & Bowman, A. S. (2000). Salivary glands in ixodid ticks: control and mechanism of secretion. *Journal of Insect Physiology*, 46(7), 1069-1078. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0022-1910\(99\)00210-3](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0022-1910(99)00210-3)
- Shimell, M. J., Ferguson, E. L., Childs, S. R., & O'Connor, M. B. (1991). The *Drosophila* dorsal-ventral patterning gene tolloid is related to human bone morphogenetic protein 1. *Cell*, 67(3), 469-481. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(91\)90522-z](https://doi.org/10.1016/0092-8674(91)90522-z)
- Silveira, R. B., Wille, A. C., Chaim, O. M., Appel, M. H., Silva, D. T., Franco, C. R., Toma, L., Mangili, O. C., Gremski, W., Dietrich, C. P., Nader, H. B., & Veiga, S. S. (2007). Identification, cloning, expression and functional characterization of an astacin-like metalloprotease toxin from *Loxosceles intermedia* (brown spider) venom. *Biochem J*, 406(2), 355-363. <https://doi.org/10.1042/bj20070363>
- Sitjà-Bobadilla, A. (2008). Living off a fish: A trade-off between parasites and the immune system. *Fish & Shellfish Immunology*, 25(4), 358-372. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.fsi.2008.03.018>
- Sitjà-Bobadilla, A., Pujalte, M. J., Macián, M. C., Pascual, J., Alvarez-Pellitero, P., & Garay, E. (2006). Interactions between bacteria and *Cryptosporidium molnari* in gilthead sea bream (*Sparus aurata*) under farm and laboratory conditions. *Vet Parasitol*, 142(3-4), 248-259. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2006.07.002>

- Skern-Mauritzen, R., Malde, K., Eichner, C., Dondrup, M., Furmanek, T., Besnier, F., Komisarczuk, A. Z., Nuhn, M., Dalvin, S., Edvardsen, R. B., Klages, S., Huettel, B., Stueber, K., Grotmol, S., Karlsbakk, E., Kersey, P., Leong, J. S., Glover, K. A., Reinhardt, R., . . . Nilsen, F. (2021). The salmon louse genome: Copepod features and parasitic adaptations. *Genomics*, 113(6), 3666-3680. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2021.08.002>
- Skugor, S., Glover, K., Nilsen, F., & Krasnov, A. (2008). Local and systemic gene expression responses of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) to infection with the salmon louse (*Lepeophtheirus salmonis*). *BMC Genomics*, 9(1), 498. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-9-498>
- Sommerset, I., Walde, C. S., Bang, J. B., Wiik-Nielsen, J., Bornø, G., Oliveira, V., Haukaas, A., & Brun, E. (2022). *Fiskehelserapporten 2021*. www.vetinst.no/fiskehelserapporten/
- Sonneborn, H. H., Zwilling, R., & Pfeleiderer, G. (1969). [Evolution of endopeptidases. X. Cleavage specificity of low molecular weight protease from *Astacul leptodactylus* Esch]. *Hoppe Seylers Z Physiol Chem*, 350(9), 1097-1102. (Zur Evolution der Endopeptidasen, X. Die Spaltungsspezifität der niedermolekularen Protease aus *Astacus leptodactylus* Esch.)
- Stöcker, W., Sauer, B., & Zwilling, R. (1991). Kinetics of nitroanilide cleavage by astacin. *Biol Chem Hoppe Seyler*, 372(6), 385-392. <https://doi.org/10.1515/bchm3.1991.372.1.385>
- Suzuki, M., Sagoh, N., Iwasaki, H., Inoue, H., & Takahashi, K. (2004). Metalloproteases with EGF, CUB, and thrombospondin-1 domains function in molting of *Caenorhabditis elegans*. 385(6), 565-568. <https://doi.org/doi:10.1515/BC.2004.069>
- Sveen, L. R., Timmerhaus, G., Krasnov, A., Takle, H., Handeland, S., Ytteborg, E. (2019). Wound healing in post-smolt Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Scientific Reports (Nature Publisher Group)*, 9(1). <https://doi.org/https://doi.org/10.1038/s41598-019-39080-x>
- Takle, H. R., Ytteborg, E., Nielsen, K. V., Karlsen, C. R., Nilsen, H. K., Sveen, L., Colquhoun, D. J., Olsen, A. B., Sørum, H., & Nilsen, A. (2015). Sårproblematikk og hudhelse i laks- og regnbueørrettoppdrett. *Nofima rapportserie*, 108. <https://nmbu.brage.unit.no/nmbu-xmlui/handle/11250/283471>
- Tallant, C., Marrero, A., & Gomis-Rüth, F. X. (2010). Matrix metalloproteinases: Fold and function of their catalytic domains. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1803(1), 20-28. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2009.04.003>
- Titani, K., Torff, H. J., Hormel, S., Kumar, S., Walsh, K. A., Rodl, J., Neurath, H., & Zwilling, R. (1987). Amino acid sequence of a unique protease from the crayfish *Astacus fluviatilis*. *Biochemistry*, 26(1), 222-226. <https://doi.org/10.1021/bi00375a029>

- Tort, L. (2011). Stress and immune modulation in fish. *Dev Comp Immunol*, 35(12), 1366-1375. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2011.07.002>
- Trevisan-Silva, D., Gremski, L. H., Chaim, O. M., da Silveira, R. B., Meissner, G. O., Mangili, O. C., Barbaro, K. C., Gremski, W., Veiga, S. S., & Senff-Ribeiro, A. (2010). Astacin-like metalloproteases are a gene family of toxins present in the venom of different species of the brown spider (genus *Loxosceles*). *Biochimie*, 92(1), 21-32. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.biochi.2009.10.003>
- Tudor, J. E., Pallaghy, P. K., Pennington, M. W., & Norton, R. S. (1996). Solution structure of ShK toxin, a novel potassium channel inhibitor from a sea anemone. *Nature Structural & Molecular Biology*, 3(4), 317-320. <https://doi.org/10.1038/nsb0496-317>
- Tysseland, H. K. (2020). Karakterisering av LsApy1 i lakselus (*Lepeophtheirus salmonis*) og dens rolle i vert-parasitt interaksjonen mellom lakselus og atlantisk laks (*Salmo salar*) [Master, Universitetet i Bergen]. Bergen.
- Van Der Marel, M., Caspari, N., Neuhaus, H., Meyer, W., Enss, M. L., & Steinhagen, D. (2010). Changes in skin mucus of common carp, *Cyprinus carpio* L., after exposure to water with a high bacterial load. *Journal of Fish Diseases*, 33(5), 431-439. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2761.2010.01140.x>
- White, G. E., Iqbal, A. J., & Greaves, D. R. (2013). CC Chemokine Receptors and Chronic Inflammation—Therapeutic Opportunities and Pharmacological Challenges. *Pharmacological Reviews*, 65(1), 47-89. <https://doi.org/10.1124/pr.111.005074>
- Williamson, A. L., Lustigman, S., Oksov, Y., Deumic, V., Plieskatt, J., Mendez, S., Zhan, B., Bottazzi, M. E., Hotez, P. J., & Loukas, A. (2006). *Ancylostoma caninum* MTP-1, an Astacin-Like Metalloprotease Secreted by Infective Hookworm Larvae, Is Involved in Tissue Migration. *Infection and Immunity*, 74(2), 961-967. <https://doi.org/10.1128/iai.74.2.961-967.2006>
- Wong, D., Von Keyserlingk, M. A. G., Richards, J. G., & Weary, D. M. (2014). Conditioned Place Avoidance of Zebrafish (*Danio rerio*) to Three Chemicals Used for Euthanasia and Anaesthesia. *PLoS One*, 9(2), e88030. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0088030>
- Wootten, R., Smith, J. W., & Needham, E. A. (1977). Studies on the salmon louse, *Lepeophtheirus* [*Caligus elongatus*, Scotland]. *Bulletin de l'Office International des Epizooties (France)*, 87(5-6).
- Wynne, J. W., O'Sullivan, M. G., Cook, M. T., Stone, G., Nowak, B. F., Lovell, D. R., & Elliott, N. G. (2008). Transcriptome Analyses of Amoebic Gill Disease-affected Atlantic Salmon (*Salmo salar*) Tissues Reveal Localized Host Gene Suppression. *Marine Biotechnology*, 10(4), 388-403. <https://doi.org/10.1007/s10126-007-9075-4>
- Xu, Z., Parra, D., Gómez, D., Salinas, I., Zhang, Y.-A., Jørgensen, L. v. G., Heinecke, R. D., Buchmann, K., LaPatra, S., & Sunyer, J. O. (2013). Teleost skin, an ancient mucosal

- surface that elicits gut-like immune responses. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(32), 13097-13102. <https://doi.org/doi:10.1073/pnas.1304319110>
- Yasumasu, S., Iuchi, I., & Yamagami, K. (1989). Isolation and Some Properties of Low Choriolytic Enzyme (LCE), a Component of the Hatching Enzyme of the Teleost, *Oryzias latipes*. *The Journal of Biochemistry*, 105(2), 212-218. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jbchem.a122641>
- Yasumasu, S., Yamada, K., Akasaka, K., Mitsunaga, K., Iuchi, I., Shimada, H., & Yamagami, K. (1992). Isolation of cDNAs for LCE and HCE, two constituent proteases of the hatching enzyme of *Oryzias latipes*, and concurrent expression of their mRNAs during development. *Dev Biol*, 153(2), 250-258. [https://doi.org/10.1016/0012-1606\(92\)90110-3](https://doi.org/10.1016/0012-1606(92)90110-3)
- Yin, F., Gao, Q., Tang, B., Sun, P., Han, K., & Huang, W. (2016). Transcriptome and analysis on the complement and coagulation cascades pathway of large yellow croaker (*Larimichthys crocea*) to ciliate ectoparasite *Cryptocaryon irritans* infection. *Fish Shellfish Immunol*, 50, 127-141. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2016.01.022>
- Yoshiura, Y., Kiryu, I., Fujiwara, A., Suetake, H., Suzuki, Y., Nakanishi, T., & Ototake, M. (2003). Identification and characterization of Fugu orthologues of mammalian interleukin-12 subunits. *Immunogenetics*, 55(5), 296-306. <https://doi.org/10.1007/s00251-003-0582-9>
- Zakeri, A. (2017). Helminth-induced apoptosis: a silent strategy for immunosuppression. *Parasitology*, 144(13), 1663-1676. <https://doi.org/10.1017/s0031182017000841>
- Zakeri, A., Borji, H., & Haghparast, A. (2016). Interaction Between Helminths and Toll-Like Receptors: Possibilities and Potentials for Asthma Therapy. *International Reviews of Immunology*, 35(3), 219-248. <https://doi.org/10.3109/08830185.2015.1096936>
- Zakeri, A., Hansen, E. P., Andersen, S. D., Williams, A. R., & Nejsum, P. (2018). Immunomodulation by Helminths: Intracellular Pathways and Extracellular Vesicles. *Front Immunol*, 9, 2349. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02349>
- Zhang, J.-M., & An, J. (2007). Cytokines, Inflammation, and Pain. *International Anesthesiology Clinics*, 45(2), 27-37. <https://doi.org/10.1097/aia.0b013e318034194e>
- Zhang, X., Ding, L., Yu, Y., Kong, W., Yin, Y., Huang, Z., Zhang, X., & Xu, Z. (2018). The Change of Teleost Skin Commensal Microbiota Is Associated With Skin Mucosal Transcriptomic Responses During Parasitic Infection by *Ichthyophthirius multifiliis*. *Frontiers in immunology*, 9, 2972-2972. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02972>
- Zhang, Y.-A., Salinas, I., Li, J., Parra, D., Bjork, S., Xu, Z., Lapatra, S. E., Bartholomew, J., & Sunyer, J. O. (2010). IgT, a primitive immunoglobulin class specialized in mucosal immunity. *Nature Immunology*, 11(9), 827-835. <https://doi.org/10.1038/ni.1913>
- Øvergård, A.-C., Hamre, L. A., Grotmol, S., & Nilsen, F. (2018). Salmon louse rhabdoviruses: Impact on louse development and transcription of selected Atlantic

salmon immune genes. *Developmental & Comparative Immunology*, 86, 86-95.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.dci.2018.04.023>

Øvergård, A.-C., Hamre, L. A., Harasimczuk, E., Dalvin, S., Nilsen, F., & Grotmol, S. (2016). Exocrine glands of *Lepeophtheirus salmonis* (Copepoda: Caligidae): Distribution, developmental appearance, and site of secretion. *J Morphol*, 277(12), 1616-1630.
<https://doi.org/10.1002/jmor.20611>

Øvergård, A.-C., Midtbø, H. M. D., Hamre, L. A., Dondrup, M., Bjerga, G. E. K., Larsen, Ø., Chettri, J. K., Buchmann, K., Nilsen, F., & Grotmol, S. (2022). Small, charged proteins in salmon louse (*Lepeophtheirus salmonis*) secretions modulate Atlantic salmon (*Salmo salar*) immune responses and coagulation. *Scientific Reports*, 12(1).
<https://doi.org/10.1038/s41598-022-11773-w>

Aaen, S. M., Helgesen, K. O., Bakke, M. J., Kaur, K., & Horsberg, T. E. (2015). Drug resistance in sea lice: a threat to salmonid aquaculture. *Trends Parasitol*, 31(2), 72-81.
<https://doi.org/10.1016/j.pt.2014.12.006>

Appendiks A – In situ hybridisering

Acetic Anhydride (Sigma 320102)

Anti-DIG-AP (Sigma (Roche) 000000011207741910)
Lagret ved +4°C

LiCl, 4M (Sigma L9650)
17g LiCl i 100ml DEPC vann. Lagret i -20°C.

Proteinase K, 2mg/ml (Sigma P2308)
100mg Proteinase K fortynnet i DEPC vann. Lagret i -20°C.

EDTA, 0,2M (Sigma 03690)
Fortynnet lager løsning 0,5M EDTA (40µl 0,5M EDTA + 60µl DEPC vann)

Blokkeringsløsning 10% (Sigma 11096176001)
10% Blokkeringsløsning (10 g i 100 ml) i maleic buffer. (1x maleic buffer = 100 mM maleic syre pH 7,5 og 150 mM NaCl)

Formamide, deionisert (Sigma F9037)

DEPC behandlet vann (Sigma D5758)

1 ml Diethylpyrocarbonate (DEPC) i 1000 ml MilliQ vann inkubert og autoklavert.

Hybridiseringsløsning (totalt 20 ml)

DEPC H₂O og 2,5 g dextran sulphate (Sigma D8906) til 5 ml. Dextran sulphate oppløses ved å varme løsning til 70 °C. Deretter tilsettes:

250 µl 1M Tris HCl pH 7,5
50 µl 0,5 M EDTA
1,5 ml 5 M NaCl
0,7 ml DEPC H₂O
12,5 ml deionisert RNase fri-formamide

Maleate buffer (5x) 1 liter

58g Maleic syre (Sigma M0375) i 850 ml milli-Q vann, med pH 7.5 justert ved bruk av NaOH pellets (ca. 35-40g. til 1 L.).

Tilsatt 43,8 g NaCl

Tilsatt opptil 1L milli-Q vann

Arbeids (1x) konsentrasjon:

0,10 M malic acid
0,15 M NaCl

MgCl₂ stock (Sigma M1028)

PBS (1x) - Phosphate Buffered Saline (Sigma P4417)

En tablett med Phosphate Buffered Saline i 200 mL milli-Q vann.

4% Paraformaldehyde løsning in PBS (Santa Cruz Biotech, sc-281692)

Processing buffer, 1 liter

100 mM Tris-NaCl pH 9,5
50 mM MgCl₂
Milli-Q vann opp til 1 liter

RNase buffer, 1 liter

0,5 M NaCl (29,23 g NaCl)
10 mM Tris, pH 7,5 (10 ml 1 M Tris pH 7,5)
1 mM EDTA (2 ml 0,5 M EDTA)

RNase A, 4mg/ml (Sigma R4875)

25ml DEPC vann tilsatt 100mg RNaseA.

SSC (20x) (Sigma, S6639)

175,3 g NaCl

88,2 g sodiumcitrate•2H₂O (Trisodiumcitrate) (294 g/mol) (Phil 1.06448)800 ml DEPC dH₂O justert til pH 7 med NaOH og justert volum til 1000 ml med DEPC.**Tris HCl pH 7,5 1 liter**

(10x = 1 M, Endelig konsentrasjon: 0,1 M)

121,1 g Tris base oppløst i 800 ml DEPC dH₂O

pH justert til 7,5 med HCl.

Tris NaCl stock pH 9,5 500 ml

(10x = 1 M Tris HCl, 1 M NaCl)

29 g NaCl.

pH justert til 9,5 med HCl.

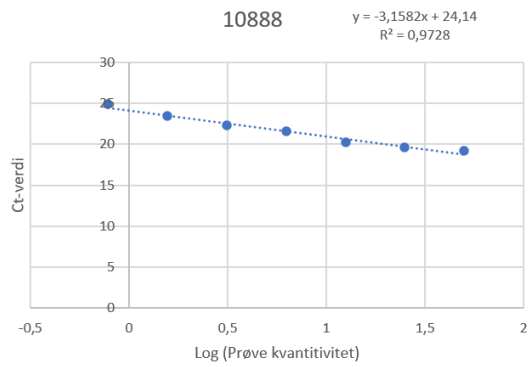
Justert til 500 ml

Tris HCl pH 8 (10x=1M, endelig konsentrasjon; 0,1 M)

Appendiks B – Primereffektivitet og smeltekurve

Primereffektivitet og smeltekurve for primer par til LsLGA5 for bruk i sanntids PCR.

Fortynning	Para1 Ct	Para2 Ct	Gjennomsnitt Ct	Prøve mengde	Log (mengde)
1	19,279	19,360	19,319	100,000	2
2	19,323	19,208	19,265	50,000	1,698970004
3	19,523	19,705	19,614	25,000	1,397940009
4	20,273	20,259	20,266	12,500	1,096910013
5	21,881	21,313	21,597	6,250	0,795880017
6	22,324	22,275	22,299	3,125	0,494850022
7	23,359	23,482	23,420	1,563	0,193820026
8	25,214	24,633	24,923	0,781	-0,10720997



qPCR Efficiency Calculator

This calculator gives the amplification efficiency of a qPCR reaction based on the slope of the standard curve.

Enter the slope of your standard curve into one of the two calculators below (depending on whether Ct is on the x- or y-axis of your graph).

For a graph where log (DNA copy#) is on the x-axis and Ct on the y-axis:

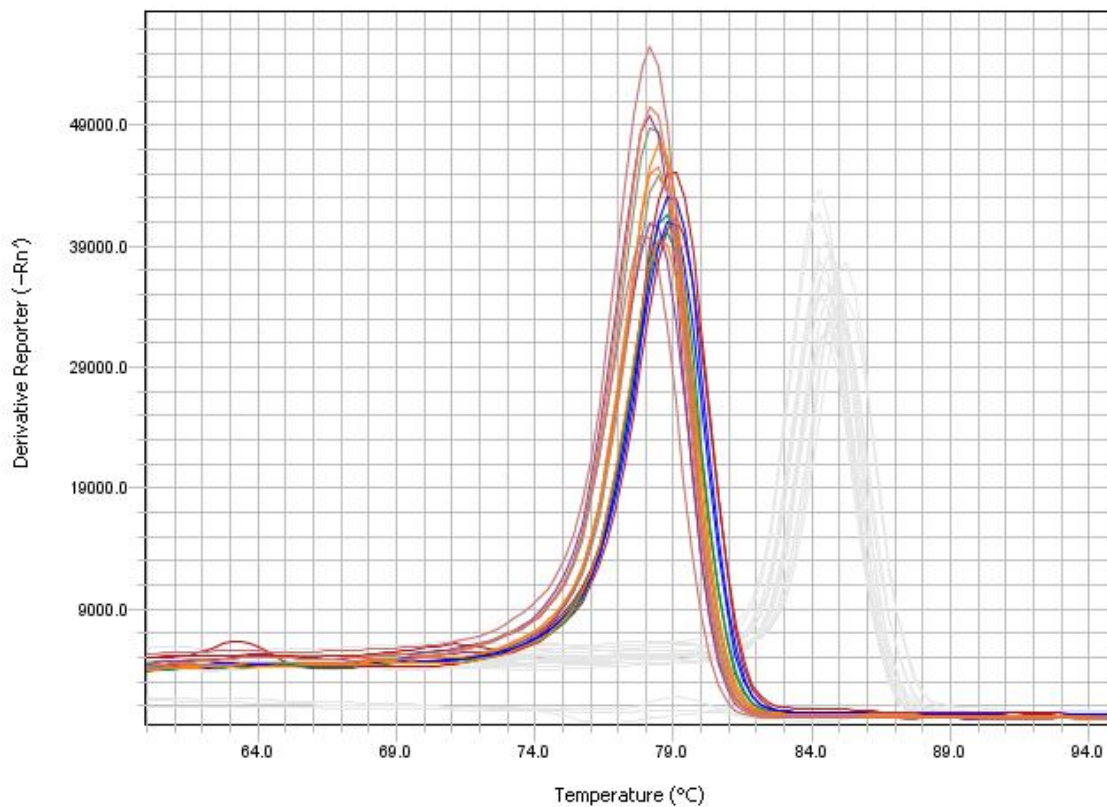
Slope =

Amplification factor = 2.07

Efficiency = 107.33%

ThermoFisher
 SCIENTIFIC

Melt Curve Plot



Appendiks C – Sekvenser

Nukleotidsekvens

ATAATCATTT	GTAAGATGTG	GAACATATAC	ATTGTCTTAT	TTCTTTTAAC	AGTATTTGAA	60
GGAGCATATT	CCGAACTGAG	CCATGCTCAA	TGTAGAATCA	TCCATGATAA	GTATAGCTAC	120
GAGGGAATGG	GATCCAGAAA	TCTATTAGGA	GGAAAAGTGT	GGCCCAACAA	TACTGTTCCC	180
TATATATTAG	CTGGAGGATT	CAGTAAGGAT	GATTTGAGTT	TAATCCAATC	TGCTATGGAT	240
GGAATAGAAA	AGAAAACATG	TGTGCGATGG	GTTCTTAGGA	ATGGAGAAAA	AAGTTATGTT	300
TACATAAAAA	ACGATGAGTC	AGGATGTTTT	GCTGTGCTTG	GTTATAATGA	GTATAGAGGA	360
AAGCATGTAT	TGAATTTGCA	AAGAAGCAAT	GGATTTTCCA	CTTGATGAT	CTTTGGAATT	420
GCACAACACG	AAATGCTTCA	TATTCTTGGG	TATGGTCATG	AGCAAACACG	ACCTGACCGA	480
GATAGTTATG	TCAGAATACA	TTGGGATATG	ATTCAGAGAG	ATGCCATAAG	CAATTATTTT	540
AAAAGCATTT	ATGATAATAC	CACTATCGTA	CCACCCCAAT	GCAGACCCAG	GTCAACTGCA	600
ACAACCTTTG	ATGATTGTTA	TTCAGGTTTT	ACAACCGACA	CTTTTGGGTA	TCCTTACGAR	660
TATGGATCTG	TGATGCATTA	TGGACTRGAT	GATTTTCAAA	CGTCAGATAA	AAATACAATG	720
GATGTACTGA	GACCTGTACC	GTTTGGGAATT	CGAATTGGTC	AAAGAATAGG	AATGACAGAA	780
TTGGATGCAT	TGAAAGTTAA	AGCCRAATAT	AATTGCGATC	AATTATCAAC	TCTTTCTACA	840
ACATCCCCAA	CAAATGCTTC	AACATCACCG	ACAAATGCTA	CAACAACAGT	TTCAGTTTGT	900
GAAGATAAAT	GGATATACTG	TCAAAGCATG	CCAGAATGGT	GTTCTAATAA	AGATACTAGT	960
AAGAATTGTC	AAAAAACATG	TAAGCTGTGT	CCAGAAGACA	TTAATACTAC	AACAACAAC	1020
TTCACCACAC	CTAATACAAC	CACTTCAGTT	TGCGAAGATA	AATGGATATA	TTGTGACAGC	1080
ATGAGAGAAT	GGTGTCCCTT	TAAATATACT	AGCCAGAACT	GTCGAAAAAC	ATGTAAGCTG	1140
TGTCCAGAAG	ACATTAATAC	TACAACAACA	ACAACCTTCA	CCACAGCTAA	TACAACCACT	1200
TCAGATTGCT	TTGACAAGTT	CGATACGTGC	GGGGAGTATT	TATCTTATTG	TTCCGATAAG	1260
ATGATCGCCG	ATAATTGTCC	AAGATCATGT	CAGTTGTGCC	CTGGGCAAGG	ACAAACCACA	1320
ACYAAAAAGC	CCGACACAAA	CTGTGTTGAC	TCAAGCTCAA	ATTGTGAGGG	TCTGAAGGAC	1380
TTTTGTTATC	ATTCTTATTT	AAAAGAGAAT	TGTAAAGCCA	CTTGTGGCAT	TTGTTAAATC	1440

CAGATTGAAA ACAACAAAAA TGGGCATATA CAATCTTTTG GAAATAAGGA TGATGGATTT 1500
ACAATTTAAA TAATTATATG TTTATAATTT AAATATGATA AATTATTCAT AGCTTATTCT 1560
GTCTGTTTCG ATTTGTACAT AGAGTATAGC TAATGTTCAA ATAAATACAA TTATTAACGC 1620
ATCATAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA A 1661

Aminosyresekvens

MWNIYIVLFLLVFEGAYSELSHAQCRIIHDKYSYEGMGSRNLLGGKVWPNNTVPYILAGGFSKDDLSLIQSAMDGI
EKKTCVRWVPRNGEKSYVIKNDSESGFAVLGYNEYRGKHLNLQRSNGFSTCMIFGIAQHEMLHILGYGHEQTRP
DRDSYVRIHWDMIQRDAISNYFKSIYDNTTIVPPQCRPRSTATTFDDCYSGFTTDTFGYPYEGSVMHYGLDDFQTS
DKNTMDVLRPVFPGIRIGQRIGMTELDALKVKAXYNCQLSTLSTTSPTNASTSPTNATTTVSVCEDKWIYCQSMPE
WCSNKDTSKNCQKTKLCPEDINTTTTTFTTPNTTTSVCEKWIYCDMSREWCPFKYTSQNCRKTKLCPEDINTTT
TTFTTANTTTSDCFDKFDTTCGEYLSYCSDKMIADNCPRSCQLCPGQGQTTTKPDTNCVDSSSNCEGLKDFCYHSY
LKENCKATCGIC