

Identifisering av potensielle virulensfaktorer hos *Pasteurella atlantica* gv. *salmonicida*

Phillip Baug



Masteravhandling i fiskehelse – akvamedisin

Institutt for biovitenskap

Universitetet i Bergen

Juni 2024

© Phillip Baug

2024

Identifisering av potensielle virulensfaktorer hos *Pasteurella atlantica* gv. *salmonicida*

Universitetet i Bergen

Forord

Denne masteroppgaven ble gjennomført hos Fiskeimmunologigruppen hos Institutt for biovitenskap ved Universitetet i Bergen. Oppgaven markerer avslutningen på min mastergrad i fiskehelse.

Først og fremst ønsker jeg å uttrykke min takknemlighet til min hovedveileder, Dr. Anita Rønneseth, for uvurderlig veiledning gjennom både skriveprosessen og laboratoriarbeidet. Din støtte og de innsiktsfulle tilbakemeldingene har vært avgjørende for å oppnå dette arbeidet. En stor takk rettes også til medveileder Dr. Gyri Teien Haugland, for verdifulle skrivetips og praktisk hjelp på laboratoriet, samt medveileder Dr. Rebecca Marie Ellul som bistod meg i oppgavens innledende fase. Jeg vil videre takke Harald S. Lunde for hans tekniske assistanse gjennom prosjektet.

Videre ønsker jeg å takke mine medstudenter for fem flotte år. Dere har vært en fantastisk gjeng å dele studietiden sammen med. Til slutt vil jeg også takke familien min for all støtte og motivasjon dere har gitt meg gjennom utdanningen min.

Phillip Baug

Bergen, 1. juni 2024

Forkortelsesliste

Forkortelse	Fullt navn
ATG16L	Autofagi-relatert 16 lignende 1 protein
BcR	B-celle reseptor
BSA	Bovint serumalbumin
CLR	C-type lektin reseptor
CMI	Cellemediert immunitet
DAMP	Damage associated molecular pattern
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole
DC	Dendritiske celler
DNA	Deoksyribonukleinsyre
E	Ekstracellulær
FCS	Fetalt kalveserum
Fab	Fragment antigen binding
Fig	Figur
His-Tag	Polyhistidine tag
IF	Immunfluorescens
Ig	Immunoglobulin
IgG	Immunoglobulin G
IgM	Immunoglobulin M
IL-18	Interleukin 18
IL-1 β	Interleukin 1 beta
IPNV	Infeksiøs pankreasnekrose virus
IPTG	Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside
L	Liter
LB	Luria-Bertani
LPS	Lipopolysakkarid
M	Molar
MAC	Membrane attack complex
MDP	Muramyl dipeptid
MHC	Vevsforlikelighetsgenkompleks/major histocompatibility complex
MV	Molekylvekt
NaCl	Natriumklorid
NCBI	National Center for Biotechnology Information

NF-kB	Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
NLR	NOD-lignende reseptor
NOD-1	Nucleotide-binding oligomerization domain-containing protein 1
NOD-2	Nucleotide-binding oligomerization domain-containing protein 2
OD	Optisk tetthet
OM	Yttermembran
PAMP	Pathogen associated molecular pattern
PBS	Phosphate-buffered saline
PCR	Polymerase kjedereaksjon
PRR	Mønsterkjenningsreseptorer
RIG-I	Retinoic acid-inducible gene I
RLR	RIG-I-lignende reseptor
RNA	Ribonukleinsyre
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
SOB	Super optimal broth
SOC	Super optimal broth with catabolite repression
TBS	Tris-Buffered Saline
TAE	Tris-Acetate-EDTA
TcR	T-celle reseptor
TLR	Toll-lignende reseptor
TLR4	Toll-lignende reseptor 4
TLR5	Toll-lignende reseptor 5
T _m	Primer smeltetemperatur
TSB	Tryptic soy broth
TTBS	Tris-Buffered Saline med Tween 20
VFDB	Virulence Factor Database
VP2	Viral protein 2
V	Volt
WB	Western blot
YadA	Yersinia adhesin A
YopT	Yersinia outer protein T
g	Gram
gv	Genomvar
kDa	Kilodalton

kbp	Kilobasepar
mg	Milligram
ml	Milliliter
mm	Millimeter
ng	Nanogram
nm	Nanometer
rpm	Omdreiningen per minutt
x g	Ganger tyngdekraften
μM	Mikromolar
μg	Mikrogram
μl	Mikroliter
μm	Mikrometer

Sammendrag

Pasteurellose hos atlantisk laks (*Salmo salar*) forårsaket av *P. atlantica* genomvar *salmonicida* har siden 2018 blitt en betydelig trussel mot fiskevelferden og den bærekraftige produksjonen i norsk akvakultur. Det er derfor et stort behov for en kommersiell vaksine mot sykdommen. Til nå har man lite kunnskap om overflateproteiner, virulensfaktorer og immunogene komponenter hos denne bakterien. Denne kunnskapen er kritisk for valg av vaksineisolater og strategier, og for å forstå hvordan denne bakterien forårsaker sykdom.

I denne masteroppgaven ble potensielle virulensfaktorer og immunogene komponenter hos *P. atlantica* gv. *salmonicida* identifisert og produsert rekombinant i *Escherichia coli*. Antigenisitet av rekombinante proteiner ble undersøkt ved Western blotting. Ett rekombinant YopT-lignende protein ble undersøkt for funksjon ved transfeksjon av cellelinjen BK (en hittil ubeskrevet cellelinje ved Fiskeimmunologigruppen ved Universitetet i Bergen). Isolat av *P. atlantica* gv. *salmonicida* og *P. atlantica* gv. *cyclopteri* ble dyrket ved ulike temperaturer for å undersøke hvordan temperatur påvirket vekst og proteinuttrykk.

Studien avdekket at *P. atlantica* gv. *salmonicida* og *P. atlantica* gv. *cyclopteri* vokser best ved 20 - 30 °C. Videre ble *in silico* analyser benyttet for å etablere en liste over potensielle virulensfaktorer og immunogene komponenter hos *P. atlantica* gv. *salmonicida*. Basert på disse resultatene ble et YopT-lignende protein og et YadA-lignende protein valgt for å produseres rekombinant. Det YopT-lignende proteinet ble transfektert inn i BK-celler, for å undersøke cytotoksiske effekter gjennom ødeleggelse av aktinfilamentene i cellene.

Bare det YopT-lignende proteinet ble vellykket produsert rekombinant i *Escherichia coli* og bundet til 6xHisTag-antistoff. Dette proteinet viste ingen reaktivitet mot serum fra *P. atlantica* gv. *salmonicida* vaksinert fisk, noe som indikerer at dette proteinet ikke representerer de primære antigenene som gjenkjennes av fiskens immunforsvar. Resultatene kunne ikke vise destruksjon av aktin i BK-celler transfektert med rekombinant YopT-lignende protein, heller ikke påvirkning i cellenes evne til fagocytose. Utfordringene knyttet til å analysere preparatene gjør at denne effekten likevel ikke kan utelukkes. Videre analyser er nødvendig for å ytterligere undersøke funksjonen til YopT-lignende protein i *P. atlantica* gv. *salmonicida*.

Abstract

Pasteurellosis in Atlantic salmon (*Salmo salar*) caused by *P. atlantica* genomvar *salmonicida* has become a significant threat to fish welfare and sustainable production in Norwegian aquaculture since 2018. Therefore, there is a great need for a commercial vaccine against the disease. So far, there is limited knowledge about surface proteins, virulence factors, and immunogenic components of this bacterium. This knowledge is critical for the selection of vaccine isolates and strategies, and to understand how this bacterium causes disease.

In this master's thesis, potential virulence factors and immunogenic components in *P. atlantica* gv. *salmonicida* were identified and produced recombinantly in *Escherichia coli*. The antigenicity of recombinant proteins was investigated by Western blotting. One recombinant YopT-like protein was examined for function by transfection of the BK cell line (a so far undescribed cell line at the Fish Immunology Group at the University of Bergen). Isolates of *P. atlantica* gv. *salmonicida* and *P. atlantica* gv. *cyclopteri* were cultured at different temperatures to investigate how temperature affected growth and protein expression.

It was found that *P. atlantica* gv. *salmonicida* and *P. atlantica* gv. *cyclopteri* grow best at 20 - 30 °C. Furthermore, in silico analyses were used to establish a list of potential virulence factors and immunogenic components in *P. atlantica* gv. *salmonicida*. Based on these results, a YopT-like protein and a YadA-like protein were chosen to be produced recombinantly. The YopT-like protein was transfected into BK cells, to examine cytotoxic effects through the destruction of the actin filaments in the cells.

Only the YopT-like protein was successfully produced recombinantly in *Escherichia coli* and bound to the 6xHisTag antibody. This protein showed no reactivity against serum from vaccinated fish with *P. atlantica* gv. *salmonicida*, indicating that this protein does not represent the primary antigens recognized by the fish's immune system. We could not demonstrate destruction of actin in BK cells transfected with recombinant YopT-like protein, nor an effect on the cells' ability to phagocytize. However, challenges associated with analyzing the preparations cause that this effect cannot be ruled out. Further analyses are necessary to learn more about the function of the YopT-like protein in *P. atlantica* gv. *salmonicida*.

Figurliste

- Figur 1 Antall lokaliteter med påvist pateurellose forårsaket av *P.atlantica* gv. *salmonicida*.
- Figur 2 Illustrasjon av gjenkjenningsmekanismer i fisk sitt medfødte immunforsvar.
- Figur 3 Vekstkurve som viser den optiske tettheten bakteriekulturen
- Figur 4 Coomassiefarget SDS-polyakrylamid-gel som viser proteinprofilene til PaL-1 og *P. atlantica* gv. *cyclopteri* ved ulike temperaturer.
- Figur 5 Genomisk DNA (gDNA), plasmidrensede produkter analysert ved agarose og Coomassiefarget SDS-polyakrylamid-gel til *V. anguillarum*, atypisk *A. salmonicida*, *P. atlantica* gv. *cyclopteri* og PaL-1.
- Figur 6 PCR-screening og koloni-PCR.
- Figur 7 Coomassiefarget SDS-polyakrylamid-gel og Western blotting med rekombinante proteiner.
- Figur 8 YopT-lignende protein renset ved Chelating Sepharose eluert med imidazol.
- Figur 9 Coomassiefarget SDS-polyakrylamid-gel og Western blotting med vaksinert og uvaksinert serum mot PaL-1.
- Figur 10 Histogrammer og spredningsplott av BK-celler med ulike eksponeringsprosedyrer.
- Figur 11 Immunfargede cytospinpreparater analysert i fluorescensmikroskop.

Tabelliste

Tabell 1	Viser isolatene som blir inkludert i oppgaven.
Tabell 2	Blanding som benyttes til PCR.
Tabell 3	PCR-program for YopT-lignende protein.
Tabell 4	PCR-program for YadA-lignende protein.
Tabell 5	Blanding som kutter PCR-produktene.
Tabell 6	Blanding for ligering med T4 DNA Ligase for pET-21a og proteinene.
Tabell 7	Mastermiks for PCR-screening med Dreamtaq polymerase.
Tabell 8	PCR-program for screening med Dreamtaq polymerase.
Tabell 9	Forward- og reversprimer brukt til sangersekvensering.
Tabell 10	Konsentrasjoner av imidazol.
Tabell 11	Forholdet mellom BSA bruksløsning og H ₂ O for å lage standardkurve.
Tabell 12	Celletall/ml talt i CASY-celleteller for PaL-1 fra 2 til 24 timers inkubasjon i TSB+.
Tabell 13	Celletall og vekstforhold hos de ulike bakterieisolatene.
Tabell 14	Potensielle virulensfaktorer hos <i>P. atlantica</i> gv. <i>salmonicida</i> lokalisert ekstracellulært.
Tabell 15	Potensielle virulensfaktorer hos <i>P. atlantica</i> gv. <i>salmonicida</i> lokalisert på yttermembranen.
Tabell 16	Andel av BK-celler i de ulike eksponeringsgruppene som har tatt opp kuler, sammen med standardavvik.

Innholdsfortegnelse

Forord	I
Forkortelsesliste	II
Sammendrag	V
Abstract.....	VI
Figurliste	VII
Tabelliste.....	VIII
1 – Introduksjon.....	1
1.1 Pasteurellose hos fisk.....	1
1.2 Virulensfaktorer og immunogene komponenter	3
1.3 Gjenkjenningsmekanismer.....	4
1.4 Vaksinologi.....	8
1.5 Mål med oppgaven	11
2 – Materiale og metoder	12
2.1 Bakterieisolater	12
2.1.1 Dyrkning av bakterier	12
2.1.2 Frysing av glyserolstockløsninger	12
2.1.3 Vekstkurve.....	13
2.1.4 PaL-1, analyse av dyrkingstemperatur i forhold til vekst og uttrykk av proteiner	13
2.2 Sodium-dodecyl sulfat – polycrylamide gel elektroforese (SDS-PAGE) og Coomassiefarging.....	14
2.3 In silico analyse av PaL-1 proteom.....	14
2.4 Primer design	15
2.5 Plasmidrensing.....	15
2.5.1 Isolering av DNA.....	16
2.5.2 PCR og rensing av PCR-produkter.....	16
2.5.3 Kutting og ligering.....	17
2.5.4 Transformerings	18
2.5.5 PCR-screening/koloni-PCR.....	19
2.5.6 Plasmidrensing og sangersekvensering	20
2.5.7 Plasmid transformering i kjemisk kompetente Codon + celler	20
2.5.8 Uttrykking av rekombinante proteiner.....	21
2.5.9 Western Blotting	21
2.6 Dyrke bakterier i ZYP-autoinduksjonsmedium.....	22
2.6.1 Rensing av YopT-lignende protein ved Chelating Sepharose	23
2.6.2 Måling av proteinkonsentrasjon.....	24
2.6.3 Analyse av YopT-lignende protein som antigen	24
2.7 Dyrkning av BK-celler.....	25
2.7.1 In vitro eksponering.....	26
2.7.2 Immunfluorescens (IF)	26

2.7.3 Flow cytometry	28
3 – Resultater	29
3.1 Vekstkurver.....	29
3.2 PaL-1, Analyse av dyrkningstemperatur i forhold til vekst og uttrykk av proteiner	30
3.3 Isolering av gDNA og plasmidrensing	31
3.4 In silico analyser	32
3.5 Uttrykking av rekombinante proteiner.....	36
3.6 Proteinrensing ved chelating sepharose.....	37
3.7 Rekombinant YopT-lignende protein som antigen.....	38
3.8 Flow cytometry	39
3.9 Immunfluorescensanalyse.....	42
4 – Diskusjon	44
In silico-analyser av PaL-proteom.....	44
Analyse av virulensfaktorenes immunogenisitet	46
Bakteriell vekst og proteinuttrykk ved unike temperaturer	47
Effekt av YopT-lignende protein på BK-celler	47
Forslag til videre forskning.....	49
5 – Konklusjon	50
6 – Referanseliste	51
7 – Appendiks.....	56

1 – Introduksjon

Den norske akvakulturindustrien har siden dens begynnelse på 1970-tallet utviklet seg til å bli en verdensledende produsent av atlantisk laks (*Salmo salar* L.). I 2023 rapporterte Statistisk sentralbyrå at Norge produserte omtrent 1,2 millioner tonn laks til en samlet markedsverdi av 122,3 milliarder kroner. Samtidig står industrien ovenfor flere betydelige utfordringer som påvirker dyrevelferd og miljømessig bærekraft. I 2023 døde i underkant av 63 millioner laks i sjøfasen, noe som utgjør omtrent 20,5 % av den sjøsatte settefisken (Sommerset et al., 2024). Bakteriesykdommen pasteurellose blir ansett som ett av de ti viktigste helseproblemene for laks, både i matfiskanlegg og stamfiskanlegg (Sommerset et al., 2024). Det er derfor et stort behov for mer kunnskap om denne sykdommen og om bakterien som forårsaker sykdommen, *Pasteurella atlantica* genomvar *salmonicida*.

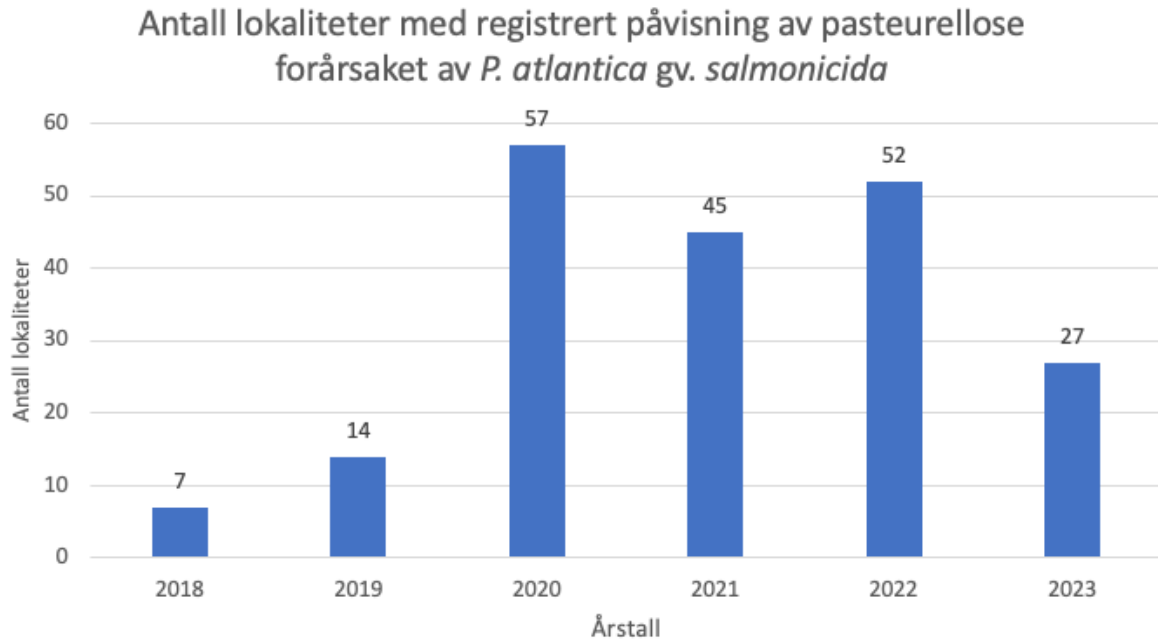
1.1 Pasteurellose hos fisk

Sykdom forårsaket av bakterier innenfor slekten *Pasteurella* kalles pasteurellose. Sykdommen ble først beskrevet hos fisk i 1963 i USA, hvor det oppstod høy dødelighet hos hvit havabbor og stripe abbor (Snieszko et al., 1964). Analyser av bakterier isolert fra de syke fiskene viste seg å være karakteristiske for slekten *Pasteurella* (Snieszko et al., 1964). Noen år senere ble det funnet ut at bakterien var ulik fra andre arter i slekten *Pasteurella*, og det ble foreslått nytt artsnavn: *Pasteurella piscicida* (Janssen & Surgalla, 1968). I 1995 gjennomførte Gauthier et al. en fylogenetisk analyse av 16S rRNA-genet, som viste at *P. piscicida* er nærmere beslektet til *Photobacterium damsela*. Derfor ble den taksonomiske statusen og navnet endret til *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*.

Den første påvisningen av pasteurellose på atlantisk laks i Norge var i 1989 (Valheim et al., 2000). Sykdommen fikk navnet «Varracalbmi», som er samisk for blodøye, ettersom den forårsaket hemoragiske og nekrotiske granulomatøse inflammasjoner i øynene (Valheim et al., 2000). Andre vanlige kliniske funn ved denne sykdommen var subdermale abscesser, puss i pseudobrankie og blødende lesjoner i indre organer. Sykdommen var assosiert med en fakultativ anaerob gram-negativ stavbakterie (Valheim et al., 2000). Etter 1989 har det bare vært sporadiske tilfeller av sykdommen (Legård & Strøm, 2020). Siden våren 2018 (Figur 1) har det vært betydelig økning i antall tilfeller med pasteurellose hos atlantisk laks (Sommerset et al., 2024). Veterinærintituttet har foreslått «*Pasteurella atlantica* gv. *salmonicida*» som en foreløpig arbeidsnomenklatur for denne bakterien. I 2012 ble pasteurellose for første gang

påvist hos rognkjeks (*Cyclopterus lumpus*), en art som det siste tiåret har blitt brukt som biologisk behandlingsmetode mot lakselus (Johansen, 2013; Alarcón *et al.*, 2016). Dette sykdomstilfellet i Sør-Norge var assosiert med en annen stamme av bakterien som har arbeidsnavnet *P. atlantica* gv. *cyclopteri*. Pasteurellose forårsaket av *Pasteruella skyensis* har vært et regelmessig problem i skotsk lakseoppdrett og har ført til høy dødelighet (Birkbeck *et al.*, 2002). *P. skyensis* ble påvist i Norge for første gang i 2020 ved én lokalitet, men har ikke vært påvist siden den gang.

I Gulla *et al.* (2023) kommer det imidlertid frem at *P. atlantica* og *P. skyensis* er nærmere beslektet med *Phocoenobacter uteri*, og det foreslås at disse derfor bør overføres til slekten *Phocoenobacter*. *P. uteri* er isolert fra nise (*Phocoena phocoena*), og det stilles spørsmålsteget ved hvorvidt marine pattedyr kan være reservoar for bakteriene (Gulla *et al.*, 2023). Hos atlantisk laks med pasteurellose forårsaket av *P. atlantica* gv. *salmonicia* viser de kliniske makroskopiske observasjonene purulent peritonitt, eksofalmi og blakket væske i hjertehulen (Legård & Strøm, 2020). Histopatologiske undersøkelser har påvist at bakterien eksisterer i blodårer i gjeller, pseudobranchier, hjerte, milt øyner og lever. I affisert vev observeres det også nekrose, epikarditt, granulomer, tromboser og blødninger (Legård & Strøm, 2020), som samsvarer med de makroskopiske observasjonene. Den histopatologiske klinikken viser tegn på både akutt og kronisk betennelse, med en høy forekomst av betennesceller og vevsvæske, i tillegg til tilstedeværelse av korte stavformede bakterier i de affiserte organene (Sommerset *et al.*, 2024).



Figur 1 – Antall lokaliteter med registrert påvisning av pasteurellose hos atlantisk laks forårsaket av *P. atlantica* gv. *salmonicida* for perioden 2018 til 2023. Tallene kan ikke sammenlignes direkte, ettersom de frem til 2019 er basert på prøver sendt til Veterinærinstituttet, mens fra og med 2020 inkluderer tallene også data fra private laboratorier, i tillegg til Veterinærinstituttet. Data hentet fra Sommerset et al. (2024).

1.2 Virulensfaktorer og immunogene komponenter

Virulensfaktorer er cellulære komponenter og strukturer med funksjoner som har som mål å unngå vertens immunforsvar og mediere patogenisitet (Sharma et al., 2017). Disse faktorene kan være membranassosierte, sekretorisk eller cytosol assosierte. Membranassosierte virulensfaktorer (som for eksempel endotoksiner, flageller, bakteriekapsel og fimbriller/pili) kan bidra til bakteriers evne til adhesjon og til å unnsnippe vertens immunresponser (Sharma et al., 2017). Sekretoriske virulensfaktorer (som eksotoksiner) er viktige komponenter som hjelper bakterien med å takle vertens medfødte og adaptive immunresponser etter hvert som de utvikles (Sharma et al., 2017). Toksiner produsert av bakterier kan generelt deles inn i to hovedkategorier: eksotoksiner og endotoksiner (Ekman, 2003). Eksotoksiner består av proteiner og har en virkningsmekanisme som ligner på enzymer. Ofte er disse svært potente, og har en spesifikk virkning på bestemte celler eller vev hos verten. Hver bakterieart produserer unike eksotoksiner, som ofte navngis etter vevet de affiserer (nevrotoksiner påvirker nervevev, enterotoksiner påvirker tarm). Når eksotoksiner mister sin giftige effekt blir det omtalt som toksoider. Toksoider kan benyttes til immunisering av mennesker og dyr, som eksemplifisert ved eksisterende vaksiner til mennesker mot stivkrampe (Ekman, 2003). Endotoksiner kan

aktivere antistoff responser, men gir som regel utilstrekkelig beskyttelse mot sykdom. Lipopolysakkarid (LPS) er et eksempel på et endotoksin som finnes i de fleste gram-negative bakterier, og har i noen tilfeller vist seg å være et potent beskyttende antigen (Welch & LaPatra, 2016). Eksotoksiner, i motsetning til endotoksiner, er ofte immunogene og kan utløse antistoffresponser (Casadevall & Pirofski, 2001). Dette er en egenskap som gjør eksotoksiner til mulige vaksinekandidater, ettersom de kan generere en beskyttende immunrespons hos verten (Abbasi et al., 2021).

Adhesiner er en gruppe proteiner som har en viktig funksjon i hvordan patogene bakterier koloniserer og infiserer en vert (Klemm & Schembri, 2000). Disse finnes forankret i bakteriens yttermembran, og blir sett på som viktige virulensfaktorer. Proteinene tillater bakteriene å feste seg til vertscellen, som er et viktig første skritt i utviklingen av en infeksjon. Bakteriens kapsel (et beskyttende lag som omgir celleveggen) kan forsterke patogenisitet ved å bidra til motstand mot fagocytose, og til å forbedre bakteriens evne til å overleve innenfor fagosomer (Casadevall & Pirofski, 2001). Virulensfaktorer kan påvirke mikrobiell vekst både direkte og indirekte. Eksempelvis er virulensen til mikroorganismer med polyakkardikapsler forbundet med egenskapen der en unnslipper vertens immunresponser, og dermed har økt evne til replikasjon i verten. Dette kan igjen føre til skade eller sykdom, hovedsakelig som et resultat av vertens inflammatoriske respons på mikrobiell vekst (Casadevall & Pirofski, 2001).

For å oppnå beskyttelse mot infeksjose sykdommer må immunforsvaret klare å gjenkjenne bakterier, bakterielle produkter, sopp, parasitter og virus som immunogener (Goldsby et al., 2002). Immunsystemet kjenner igjen spesifikke makromolekyler av infeksjose agens, ofte er dette proteiner eller polysakkarider. Dette er kjent som immunogene komponenter. Noen virulensfaktorer kan også fungere som immunogene komponenter, som vil si at de kan fremme en immunrespons i en vert (Sharma et al., 2017). Det er imidlertid ikke alle virulensfaktorer som er immunogene, på samme måte som at ikke alle immunogene komponenter er virulensfaktorer (Friedlander et al., 1995).

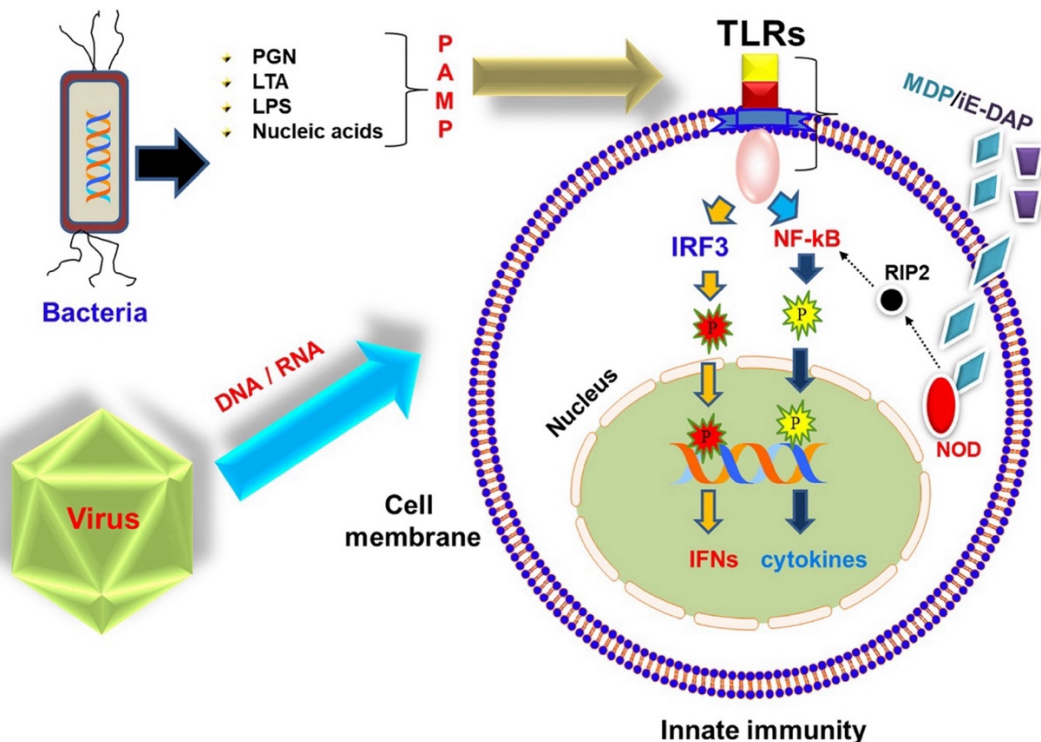
1.3 Gjenkjenningsmekanismer

Det medfødte immunforsvaret benytter seg av en rekke genetisk arvede mønstergjenkjenningsreseptorer (PRRer) for uspesifikk gjenkjenning av fremmede forbindelser (Magnadóttir, 2006). Dette illustrerer hvordan arters forsvarsstrategier har utviklet

seg, og hvordan de har tilpasset seg ulike miljøforhold (Magnadóttir, 2006). PRRer gjenkjenner molekylære strukturer og mønstre kjent som patogen assosierte molekylære mønstre (PAMP). PAMPene er vanligvis genetisk konserverte strukturer hos mikroorganismer som ofte er essensielle for deres struktur og overlevelse. PAMPene er dermed ikke spesifikke for patogene mikroorganismer, men generelle strukturer som finnes hos flere ulike mikroorganismer. Det er forskjellige typer PAMP, og immunogenisiteten bestemmes av faktorer som størrelse, struktur, kjemisk sammensetning og fremmedhet. Hovedsakelig blir immunogenisiteten til PAMP bestemt av deres evne til å binde seg til PRRer som befinner seg på plasmamembranen eller inni cellene (Zhong et al., 2006). Lipopolysakkarider (LPS), som finnes i celleveggen til gram-negative bakterier, er en av de mest potente PAMPene som kan utløse sterke inflammatoriske responser (Forlenza et al., 2011). Peptidoglykaner finnes i gram-positive bakterier, mens flagellin er hovedproteinene i bakterielle flageller, og er en kjent virulensfaktor som gjenkjennes av det medfødte immunsystemet (Hayashi et al., 2001). I tillegg gjenkjennes for eksempel mannoserike oligosakkarider og umetylert CpG-DNA, som er utbredt hos mange patogener (Murphy & Weaver, 2017). Disse mikrobielle komponentene har bevart strukturen gjennom evolusjonen. Ettersom de ikke endres, blir de ideelle mål for immunsystemets gjenkjenningmekanismer (Murphy & Weaver, 2017).

PRRene kan inndeles i signaliserende, sekreerte og fagocytiske reseptorer. Ved binding til signaliserende reseptorer utløses en kaskadereaksjon inne i cellen som kan medføre produksjon av interferoner, proinflammatoriske cytokiner og induksjon av apoptose avhengig av hvilken reseptor som er aktivert. Toll-lignende reseptorer (TLR) er en type signaliserings PRR som kan detektere PAMP fra ekstracellulære bakterier (ved binding til TLR forankret i yttermembran), eller strukturer som er tatt opp i vesikler gjennom for eksempel fagocytose (ved binding av TLRer forankret i endosomale membraner) (Murphy & Weaver, 2017), illustrert i Figur 2. Studier har vist at peptidoglykan, dobbeltrådet RNA, flagellin og LPS kan stimulere makrofager i fisk til økt produksjon av proinflammatoriske cytokiner og økt fagocytose (Forlenza et al., 2011). En bemerkelsesverdig detalj er at fisk viser seg å være betydelig mindre følsom for LPS-stimulert indusering sammenlignet med pattedyr, noe som kan indikere på forskjeller i LPS-deteksjon hos dyr som lever i vann med høy mikrobiell belastning (Castro & Tafalla, 2015). Eksempelvis gjenkjenner TLR4 LPS hos pattedyr, mens denne typen reseptorer viser seg å være manglende hos laksefisker (Rebl et al., 2010). TLR5 er essensiell for gjenkjenning av flagellin, primærproteinene som utgjør flagellene til mange bakterier (Tsoi et al., 2006).

NOD-lignende reseptorer (NLRer) er en annen familie signaliserings PRRer. Mens TLRer er transmembrane reseptorer, er NLRer cytoplasmatiske reseptorer og er essensielle for det medfødte immunsystemets evne til å indentifisere PAMP-er og skade-assosierte molekulære mønstre (DAMP) (Kim et al., 2016). Når NLRer aktiveres får de en rekke forskjellige funksjoner, som gjør at de kan deles inn i tre hovedkategorier basert på funksjon; etablering av inflammasomer, signaloverføring og autofagi (Kim et al., 2016). Inflammasomer er et sammensatt proteinkompleks som initierer aktiveringen av enzymet capase-1. Denne aktiveringen medfører videre prosessering og modning av de proinflammatoriske cytokinene IL-1 β og IL-18, samt induksjon av en inflammatorisk form for celledød kjent som pyroptose (Kim et al., 2016). NOD1 indentifiserer γ -D-glutamyl-meso-diaminopimelsyre (iE-DAP), en komponent i peptidoglykanet i gram-negative bakterier. NOD2 kan gjenkjenne muramyl dipeptid (MDP) fra både gram-negative og gram-positive bakterier. Begge disse reseptorene aktiverer nukleær faktor kappa B (NF- κ B), som er sentral i hvordan immunresponser reguleres i en vert (Kim et al., 2016). Autofagi kan bli aktivert av NOD1 og NOD2 for å eliminere patogener, ved at proteinet ATG16L1 rekrutteres til plasmamembranen ved bakteriens inntredelsepunkt (Kim et al., 2016).



Figur 2 – En forenklet illustrasjon av gjenkjenningsmekanismer i fiskens medfødte immunforsvar via TLRer og NLR-er. TLRer gjenkjenner PAMP-er fra patogener som bakterier, sopp og virus. Signaler overføres via TLRer, som fører til aktivering av cytokiner og interferoner. Intracellulære PAMP-er gjenkjennes av NLRer (NOD), som videre aktiverer effektormolekyler og omdanner pro-cytokiner til aktive cytokiner. Figur hentet fra Sahoo, 2020.

C-type lektin reseptorer (CLRer) binder sukkerstrukturer ved konserverte karbohydratgjennkjennelsesdomener (CRDer) (Figdor et al., 2002; Geijtenbeek & Gringhuis, 2009). CLRer har evnen til å binde seg til spesifikke ligander og deretter samhandle med fagocytiske reseptorer på celleoverflaten, for å fremme fagocytoseprosessen (Geijtenbeek & Gringhuis, 2009). Retinonic acid-inducible gene I (RIG-I)-lignende reseptorer (RLRer) er en type signaliserings PRR-er som viktige i deteksjonen av virusinfeksjoner, og spiller en sentral rolle induksjon av sekresjon av type I-interferoner (Rehwinkel & Gack, 2020). RLR-aktivering kan utløses av RNA som stammer fra virus. Slik aktivering er avgjørende for å etablere et robust antiviralt forsvar (Rehwinkel & Gack, 2020).

Proteiner i komplementsystemet er eksempler på sekrete reseptorer (eksempelvis mannosebindende lektin) (Murphy & Weaver, 2017). Disse reseptorene binder og opsoniserer patogener. Opsonisering er en viktig funksjon i komplementsystemet, da dette videre kan mediere til eliminering av patogener gjennom cellelysis, forårsaket av et membranangrepskompleks (MAC) eller fagocytose. I tillegg kan komplementreseptor bindinger bidra til inflammasjonsprosessen, ved å fremme frigjøring av proinflammatoriske cytokiner fra immunceller (Murphy & Weaver, 2017).

Binding til fagocytiske reseptorer på overflaten av fagocytiske celler (makrofager, monocytter, B-celler, dendritiske celler (DC) og nøytrofile granulocytter) stimulerer til fagocytose og intracellulær eliminering av mikroorganismer bundet til dem, i tillegg til å utløse reaksjoner som fører til cytokinproduksjon (Murphy & Weaver, 2017). Disse fagocytiske reseptorene inkluderer flere medlemmer av den C-type lektin-lignende familien. Dectin-1 blir sterkt uttrykket hos makrofager, nøytrofile granulocytter og DC, og gjenkjenner polymerer av glukose, en vanlig komponent i celleveggen til sopp. DC og makrofager uttrykker også mannose-reseptorer, som kan gjenkjenne mannose på mikrobers overflate (Murphy & Weaver, 2017). Scavenger reseptorer er en annen gruppe fagocytiske reseptorer som er kjent for å kunne binde til en rekke forskjellige ligander, og for å være involvert i fagocytose av patogener, både av gram-positive bakterier og gram-negative bakterier (Frøystad et al., 1998).

Det medfødte immunforsvaret representerer den første forsvarslinjen mot infeksjoner, gjennom fysiske barrierer som hud, slim og skjell, i tillegg til humorale og cellulære komponenter (Castro & Tafalla, 2015). Disse forsvarsmekanismene vil respondere umiddelbart, og innbefatter et omfattende forsvar mot et variert spekter av patogener (Jørgensen, 2014). For teleoster utfører

det medfødte immunforsvaret to fundamentale funksjoner: hindring og eliminering av patogener, og initiering til den mer avanserte og spesialiserte adaptive immunresponsen (Jørgensen, 2014).

Det adaptive immunforsvaret er karakteristisk for å kunne gjenkjenne spesifikke antigene strukturer. I motsetning til det medfødte immunforsvaret, er aktiveringstiden lenger (Murphy & Weaver, 2017). Denne delen av forsvaret er essensiell for langvarig beskyttelse mot patogener, ettersom det har en immunologisk hukommelse som innebærer at immunforsvaret reagerer raskere og kraftigere ved en senere infeksjon av samme smittestoff. I det adaptive immunforsvaret er det hovedsakelig to typer lymfocytter som spiller en viktig rolle, B- og T-celler. B-celler er ansvarlige for den adaptive humorale responsen, som innebærer produksjon og sekresjon av antistoffer, og T-celler bidrar til den adaptive cellemedierte immunresponsen (CMI) (Mutoloki et al., 2014). Disse cellene kan gjenkjenne antigener ved høyt spesialiserte gjenkjennelsesproteiner. Hos B-celler består disse proteinene av immunoglobuliner (Ig), som produseres i et bredt spekter av antigenspesifisiteter. Hver B-celle kan danne immunoglobuliner med en unik spesifisitet (Murphy & Weaver, 2017). En slik membranbundet variant av immunoglobuliner på B-cellens celleoverflate fungerer som reseptor for antigen, og er kjent som B-celle reseptorer (BcR) (Murphy & Weaver, 2017). Sekretoriske immunoglobuliner med lik antigenspesifisitet som produseres av terminalt differensierte B-celler er kjent som plasmaceller. Disse spiller en kritisk rolle i det adaptive immunforsvaret ved å produsere store mengder antistoffer som kan nøytralisere en infeksjon (Murphy & Weaver, 2017). T-celle reseptorer (TcR) er membranbundne på T-celler (Goldsby et al., 2002). T-celle reseptorene er spesifikke for antigen deriverte peptider, men må ha disse presentert via et vevsforlikelighetsantigen (major histocompatibility complex (MHC)).

1.4 Vaksinologi

Vaksinasjon er avgjørende for intensiv kommersiell oppdrett av fisk, og har vært en sentral faktor for suksessen med lakseoppdrett (Brudeseth et al., 2013; Sommerset et al., 2005). Vaksiner er biologiske produkter som, på en trygg måte, kan indusere en immunrespons, som gir beskyttelse mot infeksjoner og/eller sykdom ved senere eksponering for et patogen (Pollard & Bijker, 2021). For å oppnå dette må vaksinen inneholde antigener som stammer fra patogenet selv, eller bli syntetisk fremstilt for å etterligne strukturer fra patogenet. For de fleste vaksiner er proteinantigener primærkomponenten som utløser immunresponser som gir beskyttelse

(Pollard & Bijker, 2021). I akvakulturnæringen har den gode effekten av vaksiner mot en rekke bakterielle og virale sykdommer ført til betydelig nedgang i bruken av antibiotika, og samtidig en tredobling i produksjonen av fisk (Brudeseth et al., 2013; Sommerset et al., 2005).

Vaksiner til fisk har tradisjonelt vært basert på levende svekkede eller helcelle inaktiverede vaksiner (Maiti et al., 2020). Inaktiverede bakterievaksiner er vaksinetypene som globalt sett er mest kommersielt utbredt til oppdrettet fisk. Disse vaksinerne består som oftest av hele patogener som blir inaktivert/drept kjemisk (ved bruk av formalin) eller gjennom varmeinaktivering. Inaktiverede vaksiner anses som sikre ettersom mikroorganismene er døde, og derfor ikke smittsomme. Likevel er de mindre immunogene, og krever adjuvanser for å oppnå langvarig immunitet (Maiti et al., 2020). Disse vaksinerne inducerer primært humorale immunresponser i form av antistoffer, noe som gir en begrenset beskyttelse mot intracellulært replikerende patogener. Levende svekkede vaksiner, i motsetning til inaktiverede vaksiner, er svært immunogene og kan utløse både humorale og CMI responser, noe som er avgjørende for å bekjempe både ekstra- og intracellulære patogener (Maiti et al., 2020). Det er imidlertid en risiko for at mikroorganismene i disse vaksinerne kan gjenvinne sin virulens og/eller at de kan spres i det akvatiske miljøet.

DNA-vaksiner representerer en form for immunisering hvor man benytter et gen eller flere gener som koder for beskyttende antigener (Biering & Salonijs, 2014). DNA-vaksiner er plasmider som inneholder ett eller flere gener fra et patogen, og er utformet for å gjøre det mulig å produsere proteiner fra disse genene i den vaksinerte organismens egne celler, slik at man kan oppnå en beskyttende immunrespons (Biering & Salonijs, 2014). Bruk av DNA-vaksiner har fått utbredt oppmerksomhet for fremme beskyttende immunitet mot ulike fiskepatogene sykdommer, spesielt for intracellulære patogener (Mondal & Thomas, 2022; Thorarinsson et al., 2024).

Subenhetsvaksiner benytter rene antigene komponenter i vaksinerne, og ettersom de ikke har mulighet til å replikere i en vert er det ingen risiko for å utvikle patogenisitet (Ma et al., 2019). Subenhetsvaksiner kan produseres ved å isolere og rense immunogene komponenter direkte fra mikroorganismen eller ved å produsere spesifikke immunogene proteiner ved bruk av rekombinante uttrykksvektorer (rekombinant DNA-teknologi) (Ma et al., 2019). I rekombinant DNA-teknologi identifiserer man det genet som koder for det immunogene proteinet, og fører det inn i en vektor. Vektorer har evnen til å replikere innenfor en celle, slik at proteinet kan

masseproduseres før det høstes og renses. Evnen til å produsere store mengder av immunogene proteiner er en fordel med subenhetsvaksiner, men til tross for dette initierer ikke denne typen vaksiner sterke immunresponser, men har ofte lavere responser sammenlignet med levende svekkede vaksiner og inaktiverte vaksiner (Ma et al., 2019). En utfordring med subenhetsvaksiner er at det ikke er noen garanti for at det rekombinante proteinet er riktig foldet. Feilfolding kan føre til at de produserte antistoffene ikke gjenkjenner strukturer fra patogener.

Revers vaksineutvikling blir i økende grad benyttet for å kunne designe unike multi-epitop subenhetsvaksiner mot patogener. Revers vaksineutvikling benytter *in silico* analyser av hele genomet til patogener for å indentifisere gener som koder for proteiner med høy immunogenisitet (Zhang et al., 2023). Deretter kan disse proteinene produseres rekombinant og de rekombinante proteinene bli så undersøkt både *in vitro* og *in vivo*. Fordelen med å utvikle vaksiner basert på bioinformatriske analyser er at prosessen med å utvikle en vaksine blir fremskyndet betraktelig, sammenlignet med tradisjonell vaksineutvikling (He et al., 2010). For å predikere et beskyttende antigen ved bruk av revers vaksinologi blir subcellulær lokalisering sett på som et hovedkriterium. Etter hvert som denne teknologien har utviklet seg har en funnet flere kriterier, som antallet transmembrandomener, antallet transmembranhelixer i yttermembranproteiner og sannsynligheten for at proteiner fungerer som adhesiner (He et al., 2010).

1.5 Mål med oppgaven

Målet med denne masteroppgaven var å identifisere potensielle virulensfaktorer hos den laksepatoogene bakterien *Pasteurella atlantica* gv. *salmonicida* ved bruk av in silico analyser av proteom. Kunnskap om slike virulensfaktorer, spesielt dem med funksjon i tidlige stadier av infeksjonsforløpet, er kritisk for valg av vaksineisolater, profylaktiske tiltak, vaksinestrategier og dyrknings og høstingsbetingelser for antigen som inkorporeres i vaksine.

Spesifikke mål med oppgaven var:

- Å identifisere virulensfaktorer ved silico analyse av PaL-1 proteom.
- Å produsere virulensfaktorer som rekombinante proteiner.
- Å gjøre funksjonelle studier av utvalgte virulensfaktorer ved eksponering av BK-celler.
- Å sammenligne dyrkningstemperaturer for PaL-1 i forhold til vekst og proteinuttrykk.

2 – Materiale og metoder

2.1 Bakterieisolater

Denne studien setter søkelys på et isolat av *P. atlantica* gv. *salmonicida*, isolert fra syk laks. Isolattet vil i denne oppgave ha navnet PaL-1. I enkelte av analysene er andre bakterier også inkludert for sammenligning, et isolat av *P. atlantica* gv. *cyclopteri*, et isolat av atypisk *Aeromonas salmonicida* og et isolat av *Vibrio anguillarum* (Tabell 1), alle isolert fra syk rognkjeks. Bakterieisolatene ble oppbevart ved -80 °C hos Fiskeimmunologigruppen ved Universitetet i Bergen. En oversikt over isolatene er presentert i Tabell 1.

Tabell 1 – Oversikt over isolatene som er benyttet i denne studien.

Bakterie	Opprinnelse	Isolert fra	År
<i>P. atlantica</i> gv. <i>salmonicida</i>	Vestland fylke	Atlantisk laks (<i>Salmo salar</i>)	2019
<i>P. atlantica</i> gv. <i>cyclopteri</i>	Vestland fylke	Rognkjeks (<i>Cyclopteri lumpus</i>)	2013
Atypisk <i>A. salmonicida</i>	Vestland fylke	Rognkjeks (<i>Cyclopteri lumpus</i>)	2013
<i>V. anguillarum</i>	Vestland fylke	Rognkjeks (<i>Cyclopteri lumpus</i>)	2018

2.1.1 Dyrkning av bakterier

Isolat av *P. atlantica* gv. *salmonicida* (PaL-1) ble dyrket i 50 ml sentrifugerør (Nunc) tilsatt Tryptic Soy Broth (TSB) supplert med 1,5 % NaCl og 10 % Fetalt kalveserum (FCS) (TSB+). 1 ml bakterieissuspensjon i glyserolløsning ble hentet fra -80 °C fryser, tilsatt i 40 ml TSB+, og videre inkubert i en risteinkubator ved 20 °C og 200 rpm i 12 timer. For *P. atlantica* gv. *cyclopteri* ble isolat dyrket og inkubert på samme måte som PaL-1. Isolat av atypisk *A. salmonicida* ble dyrket i 50 ml sentrifugerør (Nunc) tilsatt TSB og inkubert på samme måte som nevnt ovenfor. Isolat av *V. anguillarum* ble dyrket i 50 ml sentrifugerør (Nunc) tilsatt TSB, supplert med 1,5 % NaCl. Lik inkubasjonstid og dyrkningsbetingelser som de andre nevnte bakteriene.

2.1.2 Frysing av glyserolstockløsninger

Bakteriene ble dyrket som beskrevet i avsnitt 2.1.1. Deretter ble 16 ml av bakteriekulturen tilsatt 4 ml glyserol (86 %) og blandet godt. 1 ml av glyserolkulturen ble tilsatt merkede cryorør (Nunc) og fryst ved -80 °C for å sikre tilstrekkelig bakterier fra samme stockløsning til videre analyser.

2.1.3 Vekstkurve

I denne studien skulle PaL-1 bli høstet under den sen-eksponentielle vekstfasen. For å finne ut når denne fasen inntreffer, ble det lagd en vekstkurve for isolatet. Bakteriene ble dyrket som beskrevet i avsnitt 2.1.1, og optisk tetthet (OD) ble målt ved ved 600 nm over tid (2 til 24 timer) for å danne vekstkurven. OD beskriver tettheten av bakterier i en suspensjon og måles ved bruk av et spektrofotometer. Før målingen startet ble spektrofotometeret (Implen OD600 DiluPhotometer) nullstilt ved å bruke vekstmediet bakteriene ble dyrket i. Deretter ble 1,5 ml bakteriesuspensjon tilsatt en kyvette (VWR Cuvettes PS macro, VWR) og plassert i spektrofotometeret for måling. OD ble målt fra tidspunktet vekstmediet ble inokulert med bakterier og frem til kurven hadde flatet ut (stasjonær fase).

I tillegg ble en CASY-celleteller (The CASY® cell counter, OMNI Life Science) benyttet for å måle antall levende bakterieceller underveis i vekstfasen. CASY-celletelleren kvantifiserer celler og partikler som passerer en målepore utsatt for et lavspent elektrisk felt, og basert på cellens størrelse og konduktivitet vil et motstandssignal bli registrert. Levende celler vil generere høyere motstandssignaler på grunn av den intakte membranstrukturen og man får på bakgrunn av dette et mål på antall levende celler/ml. Før telling ble 10 µl bakteriesuspensjon tilsatt i 10 ml filtrert (0,2 µm) CASYton (OMNI Life Science). CASY-celleteller ble vasket med filtrert CASYton før og etter måling for å oppnå så nøyaktige målinger som mulig.

2.1.4 PaL-1, analyse av dyrkingstemperatur i forhold til vekst og uttrykk av proteiner

Det ble satt opp bakteriekulturer av PaL-1 og fra isolat av *P. atlantica* gv. *cyclopteri* for å sammenligne vekst og proteinuttrykk ved forskjellige dyrkingstemperaturer. Bakteriene ble dyrket på samme måte som beskrevet i avsnitt 2.1.1 og inkubert ved 10 °C, 20 °C og 30 °C. Videre ble bakteriene fra de ulike dyrkningsbetingelsene høstet og analysert på protein geler (avsnitt 2.2). Bakteriekulturene ble høstet i den sen-eksponentielle vekstfasen. 1 ml av hver bakteriesuspensjon ble tilsatt 2 stk 2,0 ml cryorør fra hvert isolat og sentrifugert ved hastighet på 13000 x g i 3 minutter. Supernatanten ble fjernet ved pipettering, bakteriepelleten ble resuspendert i 100 µl PBS. For å finne celletallet i løsningene ble CASY-celleteller benyttet.

2.2 Sodium-dodecyl sulfat – polycrylamid gel elektroforese (SDS-PAGE) og Coomassiefarging

For å sammenligne proteinprofilene til PaL-1, *P. atlantica* gv. *cyclopteri*, *V. anguillarum* og atypisk *A. salmonicida* ble sodium-dodecyl sulfat – polycrylamid gel electrophoresis (SDS-page) og Coomassiefarging utført. Pre-Cast SDS-page geler (12 %) fra BioRad ble montert i et Mini Protean Tetra Cell elektroforese kammer, og kammeret ble fylt med TGS buffer (Appendiks). Bakteriesuspensjonene ble tilsatt 10 µl prøvebuffer (Appendiks) med dithiothreitol (DTT) (Sigma) slik at man fikk et 1:1 forhold. Suspensjonene ble varmebehandlet ved 98 °C i 5 minutter i en varmeblokk. Deretter ble 10 µl av prøvene tilsatt brønnene, i tillegg til 6 µl av en 1:20 standardstige (Silver Stain SDS-PAGE Standards, Low Range. Bio-Rad). Gelene ble deretter elektroforesert ved 190V i 40 minutter.

Etter elektroforese ble gelene Coomassie-farget. Først ble gelene vasket i et bad med Milli-Q og deretter plassert i et kammer med Coomassie Brilliant Blue fargeløsning (Appendiks) for farging. Gelen ble inkubert over natten på en ristemaskin (IKA KS 260 basic) ved 50 rpm. Etter inkubasjonen ble Milli-Q brukt til å vaske gelen for overskytende fargestoff. Deretter ble det tilsatt en avfargingsløsning (Appendiks), og gelen ble plassert på en ristemaskin (IKA KS 260 basic) ved 50 rpm. Når gelen var ferdig avfarget, ble den forsiktig vasket i Milli-Q vann for å fjerne eventuelle rester fra avfargingsmiddelet. Gelen ble fotografert i en GelDoc Go Imaging System (BioRad) med en eksponeringstid på 0,5 sekunder.

2.3 In silico analyse av PaL-1 proteom

In silico analyser ble gjennomført for å avgjøre hvilke proteiner som skulle prioriteres for videre analyser i oppgaven. Proteomet til PaL-1 ble opplastet i en FASTA-fil, som videre ble analysert i databasen PSORTb (PSORTb version 3.0.3) for å predikere den subcellulære lokaliseringen til proteinene. En del av sekvensene var annotert som hypotetiske proteiner med ukjente funksjoner. Disse ble lastet opp i BLASTp databasen (BLAST® National Center for Biotechnology Information, NCBI) for å få identifisert de proteinene med størst likhet. Til slutt ble proteinsekvensene analysert ved bruk av «Virulence Factor Database» (VFDB) for å finne ut om proteinene kan være virulensfaktorer. Alle proteinene, også dem som ikke var annotert som hypotetiske proteiner, er analysert ved BLASTp.

2.4 Primer design

Vektoren pET-21a er utstyrt med flere kloningssteder, som gjør det mulig å sette inn DNA-sekvenser ved hjelp av bestemte restriksjonsenzymmer. Når primerne ble utformet ble restriksjonsenzymene valgt slik at de var forenelige med kloningsstedene i vektoren, uten at genene som koder for proteinene ble kuttet. Ved å bruke restriksjonsenzymene NdeI og XhoI unngikk man dette. NdeI gjenkjenner den spesifikke DNA-sekvensen 5'-CATATG-3'. XhoI gjenkjenner sekvensen 5'-CTCGAG-3'. I designet av primerne ble NdeI sitt kuttesete inkludert i forwardprimeren, mens XhoI sitt kuttesete ble lagt til reversprimeren. En sekvens som koder for en polyhistidintag, eller 6xHisTag, ble inkludert i reversprimerne. Dette gjorde det mulig å identifisere proteinene i Western blot-analyser (avsnitt 2.5.9) ved å bruke et spesifikt anti-His tag antistoff. His-tagen ble også benyttet til rensing av de rekombinante proteinene (avsnitt 2.6.1).

2.5 Plasmidrensing

PaL-1, isolatene av *P. atlantica* gv. *cyclopteri*, *V. anguillarum* og atypisk *A. salmonicida* ble dyrket som beskrevet i avsnitt 2.1.1. 10 ml fra hvert isolat ble overført til 10ml-rør (Falcon, Sigma) til videre bruk for plasmidrensing. Resten av bakteriesuspensjonene ble sentrifugert ved 2500 x g i 15 minutter ved 4 °C (Allegra® X-15R, Beckman Coulter). Supernatanten ble kastet, og bakteriepelleten ble lagret ved -20 °C for bruk til DNA-isolering. Til plasmidrensing ble GenElute™ Plasmid Miniprep Kit brukt, med mindre modifikasjoner av prosedyrene som beskrevet i protokollen, som økt sentrifugeringshastighet (16 000 x g) og bruk av H₂O til eluering.

For å analysere tilstedeværelse av plasmider ble prøvene analysert på en 1 % agarose-gel. Dette ble laget ved å tilsette 0,4 g agarose og 40 ml 1x TAE (Tris-acetat-EDTA), og varme løsningen i en mikrobølgeovn for å smelte agarosen. Løsningen ble overvåket for å unngå koking. Når agarosepulveret var helt oppløst ble løsningen avkjølt til den var mellom 50 og 60°C, slik at den ble lettere å håndtere og for å unngå skade på gelbrettet. Deretter ble det tilsatt 1 µl GelRed (Biotium) til løsningen, før den ble helt over i et gelbrett og montert med en kam som lager brønnene. Når gelen var stivnet, etter 30 minutter, ble kammen fjernet og gelen ble forsiktig overført til et elektroforesekammer. Gelen ble dekket med elektroforesebuffer og tilsatte 8µl prøve blandet med 2 µl 5x loading buffer i hver brønn. Som molekylvekt standard ble 2,5 µl Invitrogen 1 Kb Plus DNA Ladder brukt. Dette ble elektroforesert ved 70 volt i 40 minutter.

2.5.1 Isolering av DNA

For DNA-isolering ble de nedfryste bakteriepelletene beskrevet i avsnitt 2.5 brukt. Sigma Aldrich GenElute™ Bacterial Genomic DNA kit ble benyttet for å isolere genomisk DNA. Bakteriepelletene ble resuspendert i «Lysis solution T» ved å pipetere opp og ned frem til løsningen var homogen. Protokollen som medfølger kittet ble benyttet bortsett fra noen endringer fra prosedyren, som bruk av 2,5 µl alternativ proteinase K (Progene), 400 µl Lysis solution C, en ekstra vask på trinn 8 og en ekstra eluering på trinn 10. Etter elueringsbufferen var tilsatt ble kolonnen inkubert ved romtemperatur i 10 minutter i istedenfor 5 minutter før sentrifugering for å en mer effektiv elueringsprosess. gDNAet fra prøvene ble analysert på en 1 % agarose-gel, på samme måte som beskrevet i avsnitt i 2.5. For å måle renheten av DNAet i prøvene ble et NanoDrop-spektrofotometer (NanoDrop Technologies Inc., modell NanoDrop™ 1000 Spectrophotometer) benyttet. Kvaliteten på gDNAet ble også analysert på agarosegel.

2.5.2 PCR og rensing av PCR-produkter

Genene som koder for det YopT-lignende proteinet og det YadA-lignende proteinet ble amplifisert ved bruk av primere som er beskrevet i avsnitt 2.4 og PCR-programmene beskrevet i Tabell 3 og 4. Fortynningene til primerene er vist i Tabell 2. Applied Biosystems™ 2720 Thermal Cycler ble brukt for å utføre PCR-analyser.

For å kunne bekrefte om PCR-reaksjonen var vellykket ble PCR-produktene analysert på en 1 % agarose-gel i én time ved 70V. 5 µl fra hver prøve ble blandet med 2 µl 5x loading buffer før de ble tilsatt i brønnene. 2,5 µl 1kb+ ble brukt som molekylvekt standard. Etter elektroforese ble PCR-produktene rensert ved hjelp av GenElute™ PCR Clean-Up Kit (Sigma-Aldrich) og ved bruk av produsentens instruksjoner. De rensede PCR-produktene ble kvantifisert ved hjelp av et NanoDrop-spektrofotometer (NanoDrop Technologies Inc., modell NanoDrop™ 1000 Spectrophotometer). De rensede PCR-produktene ble lagret ved -20 °C celsius inntil videre analyser.

Tabell 2 – PCR-reaksjon.

	YopT-lignende	YadA-lignende
suH ₂ O	28 µl	28 µl
5xHF buffer	10 µl	10 µl
dNTP (10mM)	1 µl	1 µl
Forward primer (10µM)	2,5 µl	2,5 µl
Reverse primer (10µM)	2,5 µl	2,5 µl
Templat (100 ng totalt)	5 µl	5 µl
Phusion	1 µl	1 µl
Total	50 µl	50 µl
Ca. størrelse på produktet (bp)	800	1000
T _m	61,3 °C	63,0 °C

Tabell 3 – PCR-programmet for YopT-lignende protein.

	Temperatur	Tid	Sykluser
Innledende denaturering	98 °C	1 min og 30 sek	x1
Denaturering	98 °C	15 sek	x30
Hybridisering	59 °C	30 sek	
Elongering	72 °C	1 min og 30 sek	
Avsluttende elongering	72 °C	10 min	x1

Tabell 4 – PCR-programmet for YadA-lignende protein.

	Temperatur	Tid	Sykluser
Innledende denaturering	98 °C	1 min og 30 sek	x1
Denaturering	98 °C	15 sek	x30
Hybridisering	61 °C	30 sek	
Elongering	72 °C	2 min	
Avsluttende elongering	72 °C	10 min	x1

2.5.3 Kutting og ligering

PCR-produktene som koder for YopT-lignende protein, YadA-lignende protein og pET21a-plasmid ble kuttet ved bruk av restriksjonsenzymene Nde I og Xho I (Tabell 5). Prøvene ble inkubert ved 37 °C over natten, etterfulgt av varmeinaktivering på varmeblokk (Eppendorf) ved 65 °C i 20 minutter. Når kuttingen var fullført, ble prøvene rensset ved bruk av GenElute™ PCR

Clean-Up Kit (Sigma-Aldrich). NanoDrop ble brukt til å kvantifisere den nødvendige mengden kuttet DNA-insert og plasmid som skulle ligeres. Protokollen til T4 DNA Ligase by BioLabs Inc. ble brukt til liggeringen (Tabell 6).

Tabell 5 – Blandinger som skal kutte PCR-produktene som koder for pET21a-plasmidet, YopT og YadA.

	pET21a	YopT	YadA
DNA	25 µl	28 µl	28 µl
10x buffer (R3.1)	5 µl	5 µl	5 µl
BSA (1:10)	5 µl	5 µl	5 µl
NdeI	1 µl	1 µl	1 µl
XhoI	1 µl	1 µl	1 µl
H ₂ O	13 µl	10 µl	10 µl
Totalt	50 µl	50 µl	50 µl

Tabell 6 – Blandingen for liggering bestående av genet som koder for YopT-lignende protein, YadA-lignende protein og pET21a.

	YopT-lignende	YadA-lignende
H ₂ O	3,5 µl	-
pET-21a	12,5 µl	12,5 µl
PCR-produkt	1 µl	4,5 µl
10x reaksjonsbuffer	2 µl	2 µl
T4 DNA ligase	1 µl	1 µl
Totalt	20 µl	20 µl

2.5.4 Transformering

TOP10-kompetente celler (50 µl) ble tatt ut fra -80 °C fryseren og tint på is. Deretter ble 5 µl av liggeringsmiksen tilsatt de kompetente cellene. Blandingen ble inkubert på is i 10 minutter og deretter varmebehandlet i vannbad på 42 °C i 30 sekunder, før de ble satt tilbake på is. 250 µl SOC-medium (Invitrogen) ble tilsatt i hvert rør, og prøvene ble deretter inkubert horisontalt ved 37 °C i 30 minutter ved 225 rpm.

Etter inkubering ble 20 µl og 200 µl bakteriesuspensjon fra hver prøve strøket ut på LB-agarskåler tilsatt ampicillin (100 mg/ml). Skålene ble videre inkubert ved 37 °C til dagen etterpå. Fire kolonier av TOP10-celler transformert med plasmid som koder for det YopT-

lignende proteinet og det YadA-lignende proteinet ble overført til LB-medium og inkubert over natt ved 37 °C. Kulturene ble så analysert med koloni-PCR (avsnitt 2.5.5).

2.5.5 PCR-screening/koloni-PCR

For å vurdere om kloningen hadde lykket, ble det gjennomført PCR-screening. Det ble klargjort 8 Eppendorf-rør tilsatt 20 µl LB-medium + ampicillin (100 µg/ml). Det ble plukket én koloni fra hver enkelt underkultur som ble resuspendert i Eppendorf-rørene. Åtte 0,2 µl PCR-rør ble forberedt for prøvene. Som Tabell 7 viser, ble det klargjort en mastermiks for PCR-screeningen med DreamTaq, hvor 23 µl av denne miksen ble tilsatt hvert PCR-rør. 2 µl av bakteriesuspensjonen ble også tilsatt hvert rør, før PCR-programmet ble utført (Tabell 8).

Etter at PCR-reaksjonen var fullført, ble PCR-produktene visualisert på en 1 % agarosegel. Dette ble gjort for å sikre at PCR-reaksjonen og ligeringen var vellykket. 2 µl av PCR-produktet ble blandet med 5 µl 5x loading buffer (Appendiks), før 7 µl av blandingen ble tilsatt hver brønn. 2 µl Invitrogen 1 Kb Plus DNA Ladder ble brukt som standard molekylvekt. Gelen ble kjørt ved 80V i 40 minutter, før båndene ble visualisert i UV-lys (UVP Model M-20E UV Transilluminator).

Tabell 7 – Mastermiks for PCR-screening med DreamTaq DNA polymerase

	x 1	x 7
H ₂ O	17,4 µl	121,8 µl
10x buffer	2,5 µl	17,5 µl
dNTP	0,5 µl	3,5 µl
pET11-a forward primer	1,6 µl	7 µl
pET11-a reverse primer	0,5 µl	7 µl
DreamTaq	0,5 µl	3,5 µl
Total	23 µl	161 µl

Tabell 8 – PCR-program for screening med DreamTag DNA polymerase

	Temperatur	Tid	Sykluser
Innledende denaturering	95 °C	10 min	x 1
Denaturering	95 °C	30 sek	x 40
Hybridisering	57 °C	30 sek	
Elongering	72 °C	1 min og 30 sek	
Avsluttende elongering	72 °C	10 min	x 1

2.5.6 Plasmidrensing og sangersekvensering

To kolonier av celler med plasmid som koder for YopT-lignende protein og to som inneholder plasmid som koder for YadA-lignende protein ble valgt ut for videre oppdyrking. Koloniene ble suspendert i 10 ml LB-medium tilsatt 10 µl ampicillin (100 mg/ml), og deretter inkubert i en risteinkubator ved 37 °C og 225 rpm over natten. Plasmidene ble rensed ved bruk av GenElute™ Plasmid Miniprep Kit, på samme måte som beskrevet i avsnitt 2.5. NanoDrop ble brukt for å kvantifisere de rensede plasmidene. Til sangersekvensering ble fire PCR-rør forberedt, to til hvert gen. Det ene røret ble tilsatt 5 µl plasmid og 5 µl forward primer (Tabell 9). Det andre røret ble tilsatt 5 µl plasmid og 5 µl reverse primer (Tabell 9). Prøvene ble sendt til Azenta Life Sciences for sekvensering.

Tabell 9 – Primersekvenser for pET-11a.

Primer	Sekvens
pET-11a forward primer	5'-CGACTCACTATAGGGGAATTGTG-3'
pET11-a reverse primer	5'-CAAGGGGTTATGCTAGTTATTGC-3'

2.5.7 Plasmid transformering i kjemisk kompetente Codon + celler

BL21-Codon + kompetente celler ble tatt opp fra -80 °C fryser og tint på is. De rensede plasmidene som inneholder genene som koder for det YopT-lignende proteinet og det YadA-lignende proteinet ble hentet frem og lagt på is. Etter tiningen ble 5 µl fra hvert rensed plasmid tilsatt Eppendorf-rør med Codon+ celler og inkubert på is i 10 minutter. Deretter ble prøvene lagt i et vannbad på 42 °C i 30 sekunder, før de ble lagt tilbake på is i 2 minutter. Videre ble 250 µl SOC-medium tilsatt prøvene, før de deretter ble inkubert horisontalt ved 37 °C og 225 rpm i 40 minutter. Etter inkubering ble 25 µl fra hver transformasjon strøket ut på to agarskåler

med tilsatt ampicillin (100 mg/ml) og kloramfenikol (34 mg/ml), som ble inkubert ved 37 °C til neste dag.

2.5.8 Uttrykking av rekombinante proteiner

Som startkultur ble to 50 ml Falcon-rør forberedt, ett til Codon+ cellene med plasmidet som koder for det YopT-lignende proteinet, og ett til Codon+ cellene med plasmidet som koder for det YadA-lignende proteinet. Begge rørene ble tilsatt 5 ml LB-medium, 50 µl kloramfenikol (34 mg/ml) og 50 µl ampicillin (100 mg/ml). Én koloni fra hver agarskålene som hadde stått over natten ble tilsatt i vekstmediet og resuspendert. Kulturene ble inkubert over natten i en risteinkubator ved 37 °C og 200 rpm.

To Erlenmeyer-flasker ble så gjort klar for hver av de to Codon+ kulturene. Det ble tilsatt 100 ml LB-medium, 100 µl ampicillin og 100 µl kloramfenikol i hver flaske, før det ble tilsatt 1 ml fra hver startkultur. Disse kulturene ble inkubert i en risteinkubator ved 37 °C og 200 rpm i 2 til 3 timer, til OD₆₀₀ lå mellom 0,6 og 0,8. Deretter ble kulturene splittet i to, og det ble tilsatt Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) i én kultur med Codon+/YopT og i én kultur med Codon+/YadA. Videre ble kulturene inkubert i 3 timer. De negative kontrollene var Codon+/YopT og Codon+/YadA kulturer uten tilsatt IPTG.

Etter endt inkubering ble bakteriekulturene overført til fire nye 50 ml-rør og sentrifugert ved 4000 x g i 10 minutter (Allegra® X-15R, Beckman Coulter). Etter sentrifugering ble supernatanten kastet, og bakteriepelletene resuspendert i PBS med et forhold på 1:100 PBS. Dette ble regnet ut ifra våt pelletvekt. 100 µl fra hver av de resuspenderte pelletene ble blandet med 100 µl prøvebuffer tilsatt DTT, og videre analysert med SDS-PAGE og Coomassie-farging, på samme måte som er beskrevet i avsnitt 2.2, slik at en kan finne ut om en har tilstedeværelse av YopT-lignende protein og YadA-lignende protein i de ulike prøvene. Deretter ble det utført Western blot med antistoff mot 6xHis-tag for å finne ut om proteinet var uttrykt.

2.5.9 Western Blotting

For Western blotting (WB) ble to 12 % Pre-Cast SDS-page geler fra Bio-Rad montert i et Mini Protean Tetra Cell elektroforese kammer, på samme måte som beskrevet i avsnitt 2.2, med Kaleidoscope™ WB standard (Bio-Rad) som standardstige. Som forberedelse til blottingen ble

nitrocellulosemembran med 0,2 µl porer (Bio-Rad), filterpapir (Ahlstrom Falun) og svamper (Bio-Rad) lagt i en 1x blottebuffer (Appendiks) i 30 minutter. Deretter ble disse komponentene ordnet i rekkefølgen en svamp nederst mot den svarte siden av holderen, etterfulgt av tre filterpapir, SDS-polyakrylamid-gel, nitrocellulosemembran, tre filterpapir og svamp øverst, før det ble montert i en elektroforesecelle (Bio-Rad, Mini-PROTEAN II). Deretter ble gelen elektroblottet ved 100V i 60 minutter, for å få proteinene overført fra SDS-polyakrylamid-gel til nitrocellulosemembran.

De neste trinnene (blokkering, vasking og immundetektering) ble gjennomført i romtemperatur på en ristemaskin ved 50 rpm (IKA KS 260 basic). Etter elektroblotting ble membranen fuktet i TBS, før den ble overført i en blokkeringsløsning (Appendiks) i 60 minutter. Deretter ble membranen vasket i 5 minutter i TTBS (Appendiks) bad, før en primærantistoffløsning ble tilsatt. Dette ble inkubert til neste dag. Denne løsningen bestod av et 6x-HisTag monoklonalt antistoff (Thermo Fisher) og en antistoffbuffer (Appendiks) med et forhold på 1:1000. I tillegg ble en kontrollmembran inkludert, denne ble inkubert i 20 ml antistoffbuffer uten 6x-HisTag antistoff. Denne kontrollmembranen inneholder samme prøver som membranen som blottes mot 6xHisTag monoklonalt antistoff. Membranene ble vasket i TTBS bad i 2x5 minutter, før sekundærantistoffløsningen (1:2000 fortykning av geit anti-kanin Ig konjugert HRP (Dako)) ble tilsatt for inkubasjon i 90 minutter. Membranene ble så vasket i TTBS bad i 2x5 minutter, før de ble vasket i TBS i 5 minutter, like før farging. For å visualisere binding av antistoffene ble Clarity™ Western ECL Substrate (Bio-Rad) brukt. Membranene ble inkubert i fremkallingsløsningen i 5 minutter, før membranene ble fotografert (Bio-Rad ChemiDoc XRS+ System).

2.6 Dyrke bakterier i ZYP-autoinduksjonsmedium

Etter WB ble det valgt å videre med det YopT-lignende proteinet. Det ble forberedt ett 50 ml-rør med 50 ml PA-0,5g medium (Appendiks), der det ble tilsatt 10 µl fra startkulturen for Codon+/YopT i avsnitt 2.5.8. Dette ble inkubert til neste dag i 37 °C ved 200 rpm. Deretter ble 10 ml fra pre-induksjonskulturen overført til en 2,5 liter Erlenmeyersflaske med én liter ZYP-5052 autoinduksjonsmedium (Appendiks), slik at en får induksjon av genuttrykk og produksjon av målproteiner uten å måtte tilsette induksjonsmidler. Dette ble inkubert ved 200 rpm og 37 °C i 24 timer. Videre ble kulturen overført til én liters polykarbonatflasker og sentrifugert ved

6216 rpm i 20 minutter ved 4 °C (Beckman Coulter, Avanti J-26S Series). Deretter ble supernatanten kastet og bakteriepelleten ble overført til 50 ml-rør og lagret i -80 °C fryser.

2.6.1 Rensing av YopT-lignende protein ved Chelating Sepharose

Den nedfrosne bakteriepelleten fra avsnitt 2.6 ble resuspendert i 10 ml Buffer A (Appendiks) per gram våt pellet (30,9 ml). Deretter ble prøven sonikert med en amplitude på 160 µm ved bruk av en 3 mm spiss i 3 minutter (SONICS, VCX 130PB). I mellomtiden ble en kolonne med tilsatt resin (Chelating Sepharose™ Fast Flow) vasket med Milli-Q, 1x Ni og buffer A (Appendiks). Etter sonikering ble prøven sentrifugert ved 4000 x g i 20 minutter. Supernatanten ble overført til et nytt 50 ml rør og pelleten ble lagret i -80 °C fryser. Videre ble resin overført fra kolonnen til røret med supernatanten, og inkubert på en flat ristemaskin (Heidolph Polymax 1040) ved 2 rpm i 90 minutter ved 4 °C. Deretter ble prøven sentrifugert ved 500 rpm i 1 minutt. Supernatanten med de ubundne proteinene ble fjernet, før det ble supplert med 25 ml buffer A. Dette ble forsiktig resuspendert, før det ble sentrifugert ved 500 rpm i 1 minutt. Dette trinnet ble repetert enda en gang. Supernatanten ble fjernet, og resin ble overført til kolonnen. Kolonnen med resin ble så vasket med 2x kolonnevolum buffer A (5 ml). Deretter startet elueringen fra 50 til 300 mM imidazol, som vises i Tabell 10. 10 ml fra hver fraksjon ble oppsamlet i to 15 ml falcon-rør. Etter eluering ble kolonnene vasket i 1x kolonnevolum buffer D (Appendiks), 1x kolonnevolum Milli-Q og 1x kolonnevolum 20 % etanol.

Tabell 10 – Viser konsentrasjonen av imidazol i de ulike elueringsbufferne.

Imidazol (mM)	Buffer B (500 mM imidazol)	Buffer A (0 mM imidazol)
50	1	9
100	2	8
150	3	7
200	4	6
250	5	5
300	6	4

Prøver fra celleekstrakt, supernatant og de ulike fraksjonene ble analysert ved SDS-PAGE. Resultatene viste at målproteinet ikke var til stede i supernatanten, og det ble antatt at de lå i pelleten (proteinet var uløselig). Derfor ble prosedyren repetert for pelleten som ble lagret i -80 °C fryser, med noen modifikasjoner. Pelleten ble re-suspendert i buffer A med 8M urea

(Appendiks). Inkuberingen med resin ble gjort i romtemperatur, ettersom at urea kan fryse ved lave temperaturer. Urea denaturerer proteiner. For renaturering ble proteinene overført til dialysekassetter, og inkubert i dialysebuffer med urea (Appendiks) i 2 timer. Deretter ble kassetten overført til dialysebuffer uten urea (Appendiks) over natt. Videre ble proteinene overført fra dialysekassetter til 15 ml-rør.

2.6.2 Måling av proteinkonsentrasjon

Proteinkonsentrasjon av rensset protein ble målt ved bruk av Bio-Rad Protein Assay. En standardkurve ble forberedt ved å lage serier av fortynnede proteinstandarder med kjente konsentrasjoner, som videre ble brukt til å sammenligne absorbansen av de ukjente prøvene og bestemme proteinkonsentrasjonen. Som Tabell 11 viser, ble ulike forhold mellom BSA bruksløsning (Appendiks) og H₂O brukt, slik at man fikk 0, 2, 5 og 10 µg BSA som standardkurve. 0,9 ml fortynnet fargekonsentrat (Appendiks) ble tilsatt 1 ml kyvetter, før 0,1 ml med BSA-stockløsning (20 mg/ml) og H₂O ble overført til kyvetten. Dette ble blandet ved å legge parafilm over kyvetten og invertere tre ganger. Absorbans ble målt ved 595 nm (Spectroquant® Pharo 300 Spectrophotometer).

Tabell 11 – Forholdet mellom BSA bruksløsning og H₂O til å lage BSA standardkurve.

Mengde BSA bruksløsning (µl)	Mengde H ₂ O	Total mengde BSA (µg)
0	100	0
10	90	2
25	75	5
50	50	10

For prøvene ble 1 ml fortynnet fargekonsentrat (0,2 ml fargekonsentrat + 0,8 ml H₂O) tilsatt to 1 ml kyvetter, én med 1 µl proteinprøve og én med 5 µl proteinprøve. Dette ble blandet ved å legge parafilm over kyvetten og invertere tre ganger. Det ble målt absorbans ved bølgelengde på 595 nm, før resultatene ble lest av på standardkurven.

2.6.3 Analyse av YopT-lignende protein som antigen

Det YopT-lignende proteinet ble uttrykt rekombinant på samme måte som beskrevet i avsnitt 2.5.8. Disse prøvene ble analysert på proteingeler ved SDS-PAGE og Coomassie-farging, slik som prosedyren er beskrevet i avsnitt 2.2, for å bekrefte at målproteinet ble produsert. WB ble

brukt for å finne ut om det rekombinante proteinet ble målrettet av antistoffer fra PaL-1-vaksinert laks. To nitrocellulosemembraner ble benyttet i analysen, én blottet mot serum fra vaksinert laks og én blottet med serum fra uvaksinert uvaksinert laks. Prosedyren fra avsnitt 2.5.9 ble brukt, med noen modifikasjoner. Serum fra laks ble brukt som primærantistoff, fortynnet 1:100 i antistoffbuffer. Serum fra uvaksinert laks ble brukt som primærantistoff for den andre membranen, med lik fortynning. Dette ble inkubert over natt. Membranene ble neste dag vasket i TTBS bad i 5 minutter to ganger, før kanin anti-laks IgM ble tilsatt som sekundærantistoff (fortynnet 1:1000 i antistoffbuffer) og inkubert i 2 timer. Deretter ble det vasket i TTBS bad i 2x5 minutter og membranene ble inkubert i geit anti-kanin Ig med konjugert HRP (Dako) i 90 minutter, fortynnet i 1:1000 i antistoffbuffer. Membranene ble vasket på lik måte som tidligere i TTBS. Videre ble membranene inkubert i TBS i 5 minutter, før de ble overført til en 1:1 løsning med Clarity Western ECL Substrate (Bio-Rad) og inkubert i 5 minutter. Membranene ble til slutt fotograferte (Bio-Rad ChemiDoc XRS+ System).

2.7 Dyrkning av BK-celler

BK-celler er en hittil ubeskrevet cellelinje, etablert hos Fiskeimmunologigruppen. Cellene er opprinnelig fra isolerte hodenyreleukocytter fra laks. Et cryorør med celler ble tatt opp fra en nitrogentank (The Thermo Scientific Locator 8 Liquid Nitrogen Storage Tank) og tint i romtemperatur til halvparten av innholdet var flytende. Deretter ble 1 ml BK-dyrkningsmedium (Appendiks) tilsatt til cryorøret. Når alt materialet var tint, ble cellene overført til et 10-ml-sentrifugerør som inneholdt 6 ml BK-dyrkningsmedium. Dette røret ble så sentrifugert ved 1000 rpm i 5 minutter ved 5 °C i en Beckman GS-15R sentrifuge. Etter sentrifugeringen ble supernatanten helt av. Cellene ble deretter resuspendert i 5 ml BK-medium og overført til en 25 cm² celledyrkningsflaske (Nunc). Flasken ble inkubert ved 20°C i inkubator uten CO₂. Dyrkningsmediet ble skiftet ut hver 3. til 7. dag for å fjerne metabolske avfallsstoffer og tilføre ferske næringsstoffer. Etter én uke ble cellene splittet i 1:2 ratio. Behovet for å gjøre dette ble vurdert ved regelmessige inspeksjoner under mikroskop hvor konfluens ble estimert og eventuell kontaminering kontrollert. Cellene ble løsnet fra bunnen av flasken ved å tilsette 500 µl trypsin (Lonza™ BioWhittaker™ Trypsin Reagent), og resuspendert i BK-dyrkningsmedium (Appendiks) før halvparten av suspensjonen ble overført til ny celledyrkningsflaske. Deretter ble 10 ml BK-dyrkningsmedium tilsatt til hver av flaskene.

Når ønsket tetthet av BK-celler var oppnådd ble celler fra en dyrkningsflaskeoverført til fire lufttette 24-brønnsplater (Nunc). Dette ble gjort ved at cellene ble trypsinert og resuspendert i BK-dyrkningsmedium uten tilsatt gentamicin, vellingene ble talt i en CASY-celleteller og 500 µl cellesuspensjon ble tilsatt hver brønn (1×10^6 celler/brønn). 24-brønns brettene med BK-celler ble inkubert ved 20 °C til neste dag slik at cellene fikk feste seg til bunnen og gjenoppta vekst.

2.7.1 In vitro eksponering

I brett 1 ble cellene eksponert for PaL-1 isolatet. Denne bakteriesuspensjonen ble dyrket på samme måte som beskrevet i avsnitt 2.1.1. Fra en 12 timers kultur av PaL-1 ble 10 ml av bakteriesuspensjonen sentrifugert ved 2500 rpm i 10 minutter, før pelleten ble resuspendert i BK-vekstmediet og celletall målt i en CASY celleteller og fortynnet til. 24-brønns brettet ble sentrifugert ved 2500 rpm i 5 minutter og vekstmediet ble forsiktig fjernet ved pipettering. Det ble tilsatt 500 µl av bakteriesuspensjonen (1×10^8 bakterier/ml) til hver brønn, og brettet ble satt til inkubasjon ved 20 °C til neste dag. Brett 2 var negativ kontroll og ble satt til inkubasjon ved 20 °C. For brett 3 ble Lipofectamine 3000 sin protokoll brukt for å transfektere rekombinant YopT-lignende protein (0,56 µg/µl) eller rekombinant virusprotein 2 (VP2) (0,13 µg/µl) fra infeksjøs pankreas nekrose virus (IPNV) i BK-cellene. Dette ble gjort når cellene var blitt 70 til 90 % konfluente. Vekstmediumet ble så byttet til antibiotikafritt medium, og 6 µl Lipofectamine 3000 reagens ble fortynnet i et rør med 125 µl EMEM (Thermo Fisher). I et annet rør ble 2 µg protein og 4 µl P3000 reagens fortynnet i 125 µl EMEM. Etter dette var blandet godt ble rørene kombinert og inkubert i ca. 20 minutter ved romtemperatur. Blandingen ble tilsatt dråpevis i hver brønn, mens platen ble beveget forsiktig for å få en jevn distribusjon, før brettet ble satt til inkubasjon over natt ved 20 °C. Brett 4 ble tilsatt de samme transfeksjonsreagensene som i brett 3, men man erstattet rekombinante proteiner med RNase-fritt vann. Dette ble inkubert ved 20 °C over natt.

2.7.2 Immunfluorescens (IF)

BK-celler ble høstet etter 24 timers eksponering og etter 48 timers eksponering. Cellene ble høstet fra brønnene ved å forsiktig pipetere av vekstmediet, og deretter tilsette 150 µl trypsin til hver brønn og la det virke i 3 minutter. Deretter ble cellene resuspendert i 150 µl smitte-medium, og løsningen ble sentrifugert ved 400 x g i 4 minutter ved 4 °C. Supernatanten ble fjernet, og celle pelleten ble resuspendert i 250 µl PBS+E (Appendiks) og overført til eppendorfrør. Cellene ble talt i CASY-celleteller og konsentrasjonen av celler justert til 1×10^6 celler/ml for å sikre god spredning av enkeltceller på objektglasset. For montering av cytopspin preparatene ble

objektglass festet i en Cytoclip sammen med et filter og et prøvekommer. Kammeret ble tilsatt 100 µl leukocyttuspensjon, før det ble sentrifugert ved 1000 rpm i 4 minutter (Thermo Scientific Cytospin 4 Centrifuge). Preparatene ble plassert i en mørk skuff for tørking i to dager. For resterende brønner med de ulike eksponeringene ble noen brønner videre inkubert til neste dag, mens noen brønner ble tilsatt 0,55 µl fortynnete fluoriserende kuler (Fluoresbrite® YG Carboxylate Microspheres) slik at man fikk 1×10^7 kuler/ml.

Ved dag to ble brønnene både med og uten fluoriserende kuler høstet på samme måte som beskrevet i avsnittet ovenfor. Celler tilsatt fluoriserende kuler ble analysert i et flow cytometer (BD FACSCalibur™ Flow Cytometer), for å få en presis kvantifisering av fagocytose ved å måle andel av cellene som har inntatt fluoriserende kuler. Celler som ikke var tilsatt fluoriserende kuler ble også målt ved flow cytometry. Det ble også montert cytopspin preparater på tilsvarende måte som nevnt ovenfor.

Cytospin preparatene fra både dag én og dag to (med og uten kuler) ble IF-farget. Først ble PAP-penn (Sigma) brukt til å markere rundt området med BK-celler på preparatene, før de ble fiksert i formaldehyd (3,7 %) i 10 minutter. Cellene ble videre permeabilisert ved inkubasjon med 0,1 % Triton x-100 i 5 min. Deretter ble prøvene vasket i et coplin-kar med PBS i 5 minutter. For å forhindre uspesifikk binding av antistoff til ledige områder på preparatet, ble PBS med BSA (2 %) brukt til blokkering i 30 minutter. Deretter ble preparatene tilsatt primært antistoff (kanin anti-*P. atlantica* (1:10000) og mus anti-VP2 (1:500) (Ango)) fortynnet i PBS med 0,5 % BSA i én time. Etter endt inkubasjon ble preparatene vasket 3x5 minutter i PBS bad. Preparatene ble inkubert i løsning med sekundærtantistoffer i en time. De sekundære antistoffene var konjugert med fluorokrom, Alexa Fluor 555 F(ab')₂ fragmenter av geit anti-kanin IgG (H+L) (Invitrogen) (1:400 i PBS med 0,5 % BSA) ble tilsatt preparater tilsatt kanin anti-*P. atlantica* mens Alexa Fluor 555 F(ab')₂ fragmenter av kanin anti-mus 555 IgG (H+L) (Invitrogen) (1:2000 i PBS med 0,5 % BSA) ble tilsatt preparater tilsatt preparater tidligere inkubert med mus anti-VP2. Videre ble Phalloidin (Alexa Fluor™ 488 Phalloidin) fortynnet 1:40 i PBS med 1 % BSA tilsatt preparatene og inkubert i 45 min, før de ble vasket i PBS i 3x5 minutter. Deretter ble DAPI (Thermo Scientific) fortynnet 1:1000 i PBS tilsatt i 10 minutter, etterfulgt av vask, før dekkglass ble montert med Invitrogen ProLong Glass Antifade Mountant. Cytospin preparatene ble plassert i en mørk skuff inntil de ble analysert i fluorescensmikroskop (Carl Zeiss AxioScope 2 Plus) og fotografert med Nikon Digital Sight DS-5M.

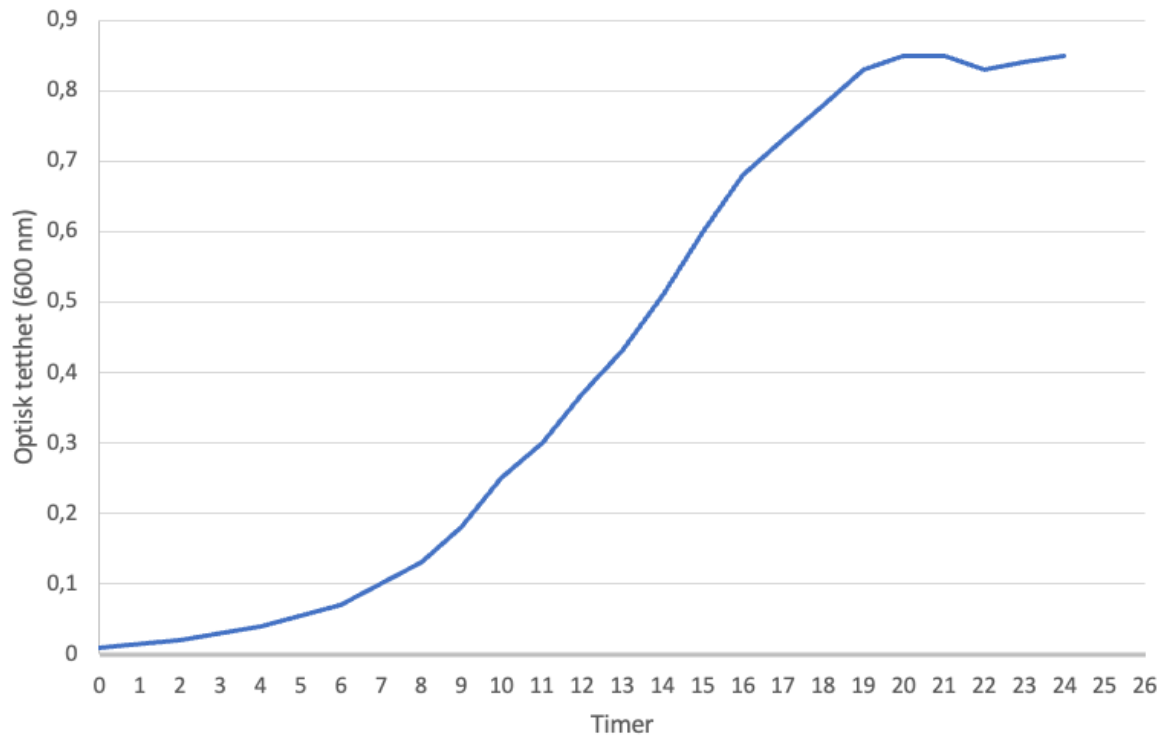
2.7.3 Flow cytometry

BK-cellene fra de ulike eksponeringsprosedyrene ble trypsinert, vasket og resuspendert i PBS+E som beskrevet i seksjon 2.7.2. Cellene ble overført til flow cytometry rør (Falcon® 5 mL Round Bottom Polystyrene Test Tube) og analysert i et BD FACScalibur Flow cytometer. Det ble laget en protokoll som var tilpasset BK-cellene i forhold til størrelse og granularitet samt intensitet av fluorescens fra celler som hadde tatt opp kuler, analysene ble utført i programvaren CellQuestPro versjon 3.1 (Becton Dickinson). Fra hver prøve ble 10 000 celler analysert for lysspredning fremover (størrelse) og spredning av lys (granularitet), samt fluorescens fra kuler (grønn fluorescens) detektert med 530/30 nm FL1 bandpassfilter. Resultatene ble videre behandlet i programmet Floreada.io.

3 – Resultater

3.1 Vekstkurver

Vekstkurven til bakterieisolatet PaL-1 er illustrert i Figur 3. Grafen viser at den eksponentielle vekstfasen startet etter 8 timer, og sen-eksponentielle vekstfasen var nådd etter 16 timer. Den stasjonære fasen ble nådd etter 20 timer.



Figur 3 – Viser vekstkurven til *P. atlantica* sp. *salmonicida* (*PaL-1*). X-akse viser antall timer etter inokulering og y-akse optisk tetthet ved 600 nm.

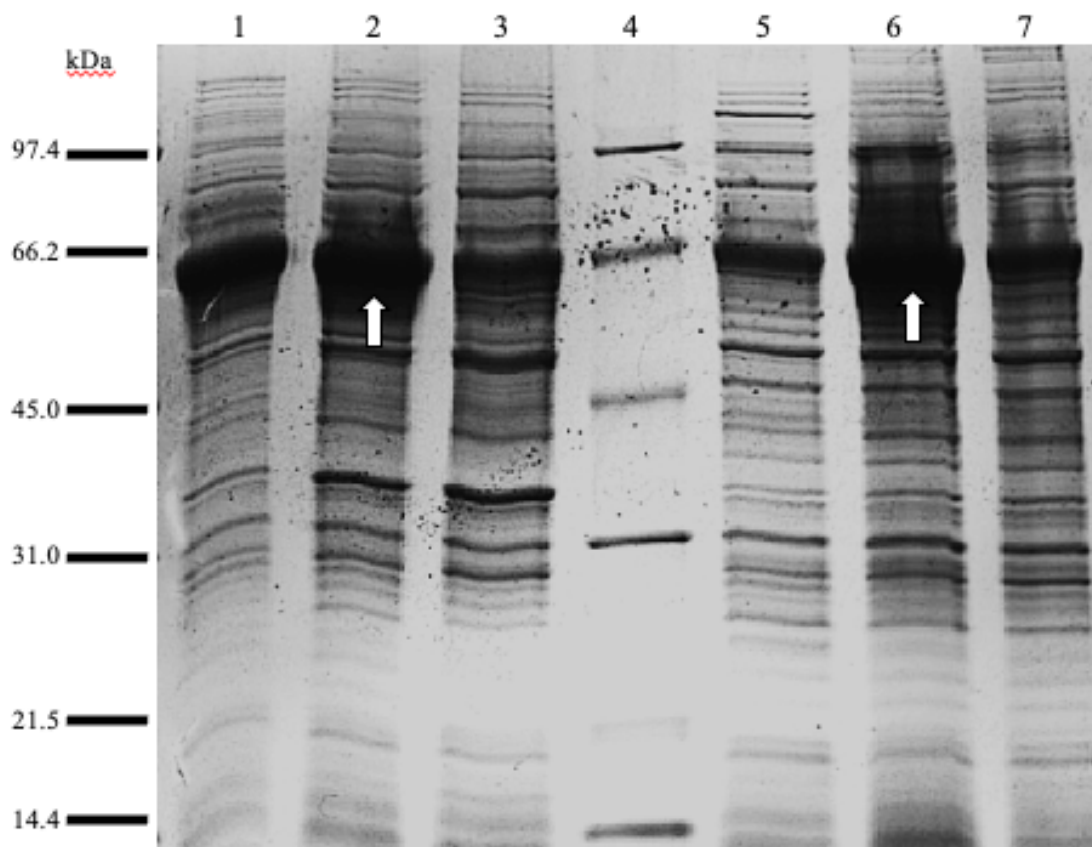
I Tabell 12 vises celletallet/ml ved de ulike målingene. Telling av celler i CASY celletelleren bekrefter at eksponentiell vekstfase nås etter 8 timer og at stasjonær fase nås etter 20 timer.

Tabell 12 – Celletall/ml talt i CASY-celleteller for PaL-1 ved målinger fra 2 til 24 timers inkubasjon i TSB+.

Tid (timer)	Celletall (celler/ml)
2	9,94E+07
4	4,05E+07
6	1,44E+08
8	2,35E+08
9	3,40E+08
10	4,02E+08
11	5,55E+08
12	7,08E+08
13	9,00E+08
14	1,20E+09
15	1,60E+09
16	1,84E+09
17	1,94E+09
18	2,50E+09
19	2,70E+09
20	3,10E+09
21	2,90E+09
22	2,10E+09
23	2,80E+09
24	3,00E+09

3.2 PaL-1, Analyse av dyrkningstemperatur i forhold til vekst og uttrykk av proteiner

Isolater av *P. atlantica* gv. *cyclopteri* og PaL-1 ble dyrket ved 10, 20 og 30 °C. Dette ble gjort for å se om temperatur påvirket proteinuttrykket. Som Figur 4 viser, hadde de sterkeste uttrykkede proteinene en molekylvekt på ca. 66,2 kDa for både *P. atlantica* gv. *cyclopteri* (brønn 1 til 3) og PaL-1 (brønn 5 til 7) ved 10, 20 og 30 °C. Proteinene ble uttrykket kraftigst for kulturene dyrket ved 20 °C for både *P. atlantica* gv. *cyclopteri* og PaL-1 (brønn 2 og 6, hvite piler). Celletallet til prøvene var forskjellig, og ble ikke justert. Som Tabell 13 viser, er celletallet høyest ved 20 °C for begge isolatene, som samsvarer med funnene i Figur 4.



Figur 4 – *P. atlantica* gv. *cyclopteri* i brønn 1-3 dyrket ved henholdsvis 10, 20 og 30 °C. I brønn 5-7 er PaL-1 dyrket ved henholdsvis 10, 20 og 30 °C. Hvite piler: Proteinprofiler ved ca. 66,2 kDa.

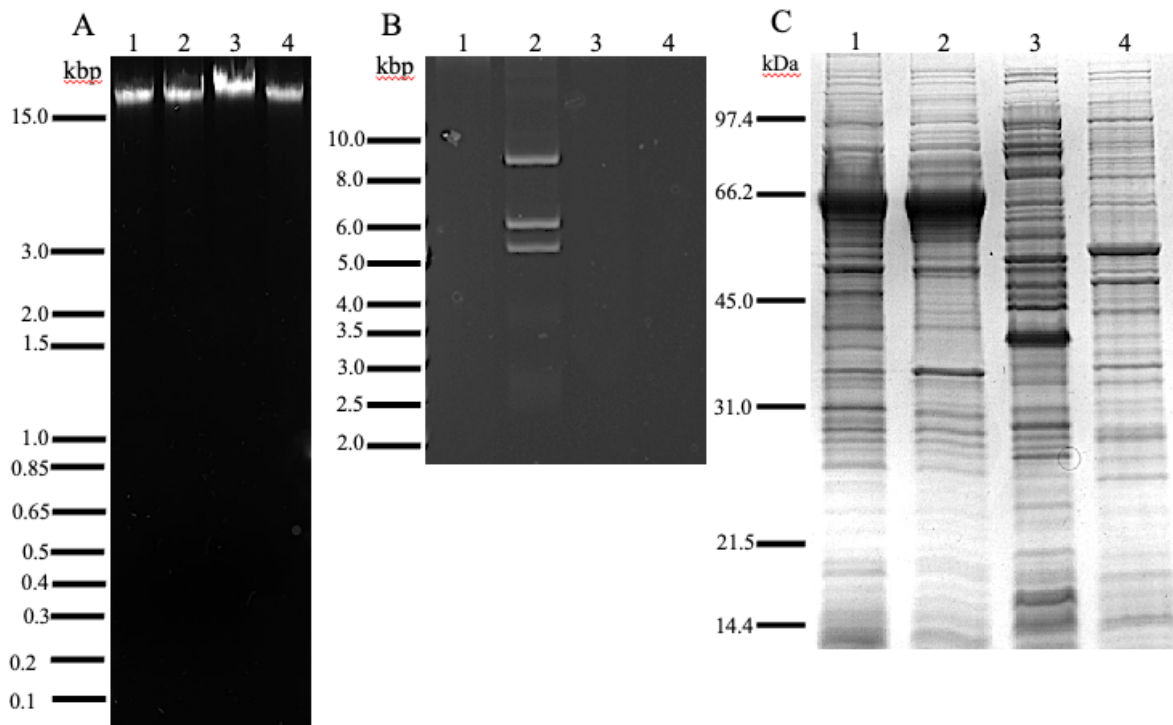
Tabell 13 – Celletall og vekstforhold hos de ulike bakterieisolatene.

Bakterier	Vekstforhold	Celler per ml
<i>P. atlantica</i> gv. <i>cyclopteri</i>	200 rpm og 20 °C	1,4E+09
Subkultivert <i>P. atlantica</i> gv. <i>cyclopteri</i>	200 rpm og 10 °C	1,3E+08
	200 rpm og 30 °C	1,5E+09
PaL-1	200 rpm og 20 °C	2,3E+09
Subkultivert PaL-1	200 rpm og 10 °C	4,6E+08
	200 rpm og 30 °C	1,3E+09
<i>V. anguillarum</i>	200 rpm og 20 °C	2,5E+09
Atypisk <i>A. salmonicida</i>	200 rpm og 20 °C	1,4E+09

3.3 Isolering av gDNA og plasmidrensing

gDNA fra *V. anguillarum*, atypisk *A. salmonicida*, *P. atlantica* gv. *cyclopteri* og PaL-1 ble analysert på agarosegel for å bekrefte vellykket DNA-ekstraksjon (Figur 5A). Plasmidrensing ble utført fra de samme bakteriene for å demonstrere mulig tilstedeværelse og størrelse på eventuelle plasmidene. Som Figur 5B viser har ikke PaL-1, *V. anguillarum* isolatet eller isolatet

av *P. atlantica* gv. *cyclopteri* plasmider (brønn 1, 3 og 4). Isolatet av atypisk *A. salmonicida* har tre plasmider med størrelse på om lag 9, 6 og 5,5 kbp (Fig. 5B). Som Figur 5C viser, ble proteinprofilene fra PaL-1 (brønn 1), *P. atlantica* gv. *cyclopteri* (brønn 2), *V. anguillarum* (brønn 3) og atypisk *A. salmonicida* (brønn 4) analysert på en Coomassiefarget SDS-polyakrylamid-gel. Det er tydelige forskjeller mellom de ulike bakterieisolatene, men at det er likheter i proteinprofilen til PaL-1 og *P. atlantica* gv. *cyclopteri*.



Figur 5 – **A:** gDNA. Brønn 1: *V. anguillarum*. Brønn 2: atypisk *A. salmonicida*. Brønn 3: *P. atlantica* gv. *cyclopteri*. Brønn 4: PaL-1. **B:** Plasmidrensede prøver analysert på agarosegel. Brønn 1: *V. anguillarum*. Brønn 2: atypisk *A. salmonicida*. Brønn 3: *P. atlantica* gv. *cyclopteri*. Brønn 4: PaL-1. **C:** Coomassie-farget SDS-polyakrylamid-gel. Proteinprofilene til henholdsvis PaL-1, *P. atlantica* gv. *cyclopteri*, *V. anguillarum* og atypisk *A. salmonicida*.

3.4 In silico analyser

In silico analyser ble utført for å predikere proteiner med virulensfunksjon. Tabell 14 viser ekstracellulære proteiner som potensielt kan være virulensfaktorer, mens Tabell 15 viser yttermembranproteiner som kan være virulensfaktorer. Ved bruk av PSORTb ble den subcellulære lokaliseringen til proteinene identifisert, og en kunne innskrenke proteinutvalget til ekstracellulære proteiner (E) og yttermembranproteiner (OM), med en angitt sannsynlighet for korrekt lokalisering fra 0 til 100. Virulence Factor Database (VFDB) ble brukt for å fastslå om proteinene var like andre kjente bakterielle virulensfaktorer. Proteinnummer 5 og proteinnummer 22 i Tabell 15, ble basert på dette valgt ut som aktuelle kandidater å studere

videre (fet skrift). Disse proteinene var henholdsvis et YopT-lignende protein og et YadA-lignende protein.

Tabell 14 – Ekstracellulære proteiner hos *P. atlantica* sortert etter *e*-verdi i VFDB fra lav til høy. Lav *e*-verdi indikerer at sekvensen samsvarer godt med en kjent sekvens.

#	Protein	Lokalisering	MV [kDa]	Virulensfaktor database	E-verdi	Identitet	BLASTp	Access nr.
1	hypothetical protein	E (60)	501,1	(MCR_RS02830) YadA-like family protein [Hemagglutinin (Hag)/ <i>M. catarrhalis</i> IgD binding protein (MID) - Effector delivery system] [<i>Moraxella catarrhalis</i> RH4]	4,00E-80	23 %	YadA-like family protein [Pasteurella atlantica]	WP_306346588.1
2	Secretory immunoglobulin A-binding protein EsiB	E (84)	38,6	(lidL) Dot/Icm type IV secretion system effector LidL [Enh loci - Others] [<i>Legionella pneumophila</i> estr. Corby]	3,00E-56	37 %	tetratricopeptide repeat protein [Pasteurella atlantica]	WP_306347127.1
3	hypothetical protein	E (96)	245,1	(emaA) EmaA [EmaA - Adherence] [Actinobacillus actinomycetemcomitans VT1169]	2,00E-53	23 %	YadA-like family protein [Pasteurella atlantica]	WP_322631693.1
4	hypothetical protein	E (63)	114,4	(upaG/ehaG) YadA-like family protein [UpaG adhesin, trimeric AT - Adherence] [<i>Escherichia coli</i> O83:H1 str. LF82]	2,00E-46	25 %	YadA-like family protein [Pasteurella atlantica]	WP_306347562.1
5	Secretory immunoglobulin A-binding protein EsiB	E (97)	24,0	(LPL_RS05310) SEL1-like repeat protein [Enh loci - Others] [<i>Legionella pneumophila</i> str. Lens]	9,00E-46	49 %	tetratricopeptide repeat protein [Pasteurella atlantica]	WP_306346643.1
6	hypothetical protein	E (96)	16,2	(APL_RS04595) prepilin-type N-terminal cleavage/methylation domain-containing protein [Type IV pili - Adherence] [Actinobacillus pleuropneumoniae serovar 5b str. L20]	4,00E-29	42 %	prepilin-type N-terminal cleavage/methylation domain-containing protein [Pasteurella atlantica]	WP_306346856.1
7	Nucleoside diphosphate kinase	E (95)	15,5	(ndk) nucleoside diphosphate kinase [Nucleoside diphosphate kinase - Immune modulation] [<i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37Rv]	1,00E-26	45 %	nucleoside-diphosphate kinase [Pasteurella atlantica]	WP_306346853.1
8	hypothetical protein	E (95)	35,6	(oapA) opacity associated protein (oapA) [OapA - Adherence] [<i>Haemophilus ducreyi</i> 35000HP]	8,00E-23	28 %	LysM-like peptidoglycan-binding domain-containing protein [Pasteurella atlantica]	WP_306346647.1
9	hypothetical protein	E (96)	51,4	(sdrD) Ser-Asp rich fibrinogen-binding bone sialoprotein-binding protein [SDr - Adherence] [<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. aureus N315]	5,00E-14	22 %	hypothetical protein [Pasteurella atlantica]	WP_306355447.1
10	Toxin CdiA	E (96)	30,0	(cdiA) contact-dependent inhibition effector tRNA nuclease [Contact-dependent inhibition CDI system - Effector delivery system] [<i>Escherichia coli</i> UTI89]	1,00E-13	23 %	hypothetical protein [Pasteurella atlantica]	WP_306347845.1
11	hypothetical protein	E (96)	25,7	(APJL_RS08060) transferrin-binding protein-like solute binding protein [TbpAB - Nutritional/Metabolic factor] [Actinobacillus pleuropneumoniae serovar 3 str. JL03]	3,00E-08	28 %	transferrin-binding protein-like solute binding protein [Pasteurella atlantica]	WP_306346275.1
12	hypothetical protein	E (95)	56,9	(rhsP2) ADP-ribosyltransferase toxin [HSI-2 T6SS secreted effectors - Effector delivery system] [<i>Pseudomonas fluorescens</i> Pf0-1]	7,00E-05	27 %	hypothetical protein [Pasteurella atlantica]	WP_306354326.1

Tabell 15 – Yttermembran proteiner hos *P. atlantica* sortert etter e-verdi i VFDB fra lav til høy. Lav e-verdi indikerer at sekvensen samsvarer godt med en kjent sekvens.

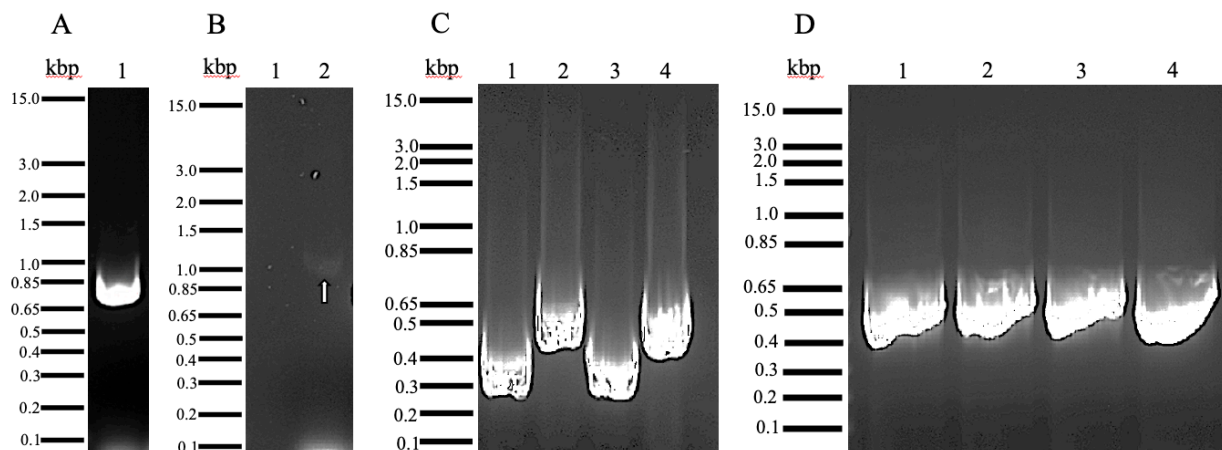
#	Protein	Lokalisering	MV [kDa]	Virulensfaktor database	E-verdi	Identitet	BLASTp	Access nr.
1	putative hemoglobin and hemoglobin-haptoglobin-binding protein 3	OM (100)	121,6	(hgpB) TonB-dependent hemoglobin/transferrin/lactoferrin family receptor [Hgp - Nutritional/Metabolic factor. Haemophilus influenzae PittGG.	0,0	40 %	TonB-dependent receptor [Pasteurella atlantica]	WP_306346579.1
2	Hemoglobin and hemoglobin-haptoglobin-binding protein A	OM (99)	124,7	(hgpB) TonB-dependent hemoglobin/transferrin/lactoferrin family receptor [Hgp - Nutritional/Metabolic factor [Haemophilus influenzae Rd KW20]	0,0	40 %	TonB-dependent receptor [Pasteurella atlantica]	WP_306346438.1
3	hypothetical protein	OM (100)	117,7	(M3Q_RS06195) TonB-dependent receptor [HemO cluster - Nutritional/Metabolic factor] [Acinetobacter baumannii TYTH-1]	1,00E-170	36 %	TonB-dependent receptor [Pasteurella atlantica]	WP_306346307.1
4	Putitative protein	OM (95)	97,7	(mam7) multivalent adhesion molecule MAM7 [MAM7 - Adherence] [Vibrio parahaemolyticus RIMD 2210633]	1,00E-137	32 %	MlaD family protein [Pasteurella atlantica]	WP_306347287.1
5	hypothetical protein (YopT-lignedne)	OM (100)	30,7	(HD_RS04750) YopT-type cysteine protease domain-containing protein [LspA2-LspB - Effector delivery system] [Haemophilus ducreyi 35000HP]	1,00E-114	23 %	YopT-type cysteine protease domain-containing protein [Pasteurella atlantica]	WP_306371731.1
6	hypothetical protein	OM (100)	67,1	(hrpB) two-partner secretion system transporter HrpB [HrpA-HrpB - Effector delivery system] [Neisseria meningitidis MC58]	1,00E-104	36 %	ShlB/FhaC/HecB family hemolysin secretion/activation protein [Pasteurella atlantica]	WP_306353493.1
7	hypothetical protein	OM (100)	68,1	(hrpB) two-partner secretion system transporter HrpB [HrpA-HrpB - Effector delivery system] [Neisseria meningitidis MC58]	1,00E-101	37 %	ShlB/FhaC/HecB family hemolysin secretion/activation protein [Pasteurella atlantica]	WP_306347399.1
8	Type IV pilus biogenesis and competence protein PilQ	OM (100)	39,6	(comE/pilQ) type IV pilus secretin PilQ [Type IV pili - Adherence] [Haemophilus ducreyi 35000HP]	1,00E-98	55 %	type IV pilus secretin PilQ [Pasteurella atlantica]	WP_306346336.1
9	Outer membrane protein P5	OM (100)	39,2	(pomA) outer membrane protein PomA [OmpA - Adherence] [Mannheimia haemolytica str. 89010807N]	3,00E-96	54 %	porin OmpA [Pasteurella atlantica]	WP_306346760.1
10	hypothetical protein	OM (100)	574,7	(hecA) hemolysin/hemagglutinin-like protein HecA [HecA-HecB - Effector delivery system] [Erwinia chrysanthemi EC16]	1,00E-81	21 %	hemagglutinin repeat-containing protein [Pasteurella atlantica]	WP_306347779.1
11	Outer membrane protein assembly factor BamA	OM (100)	89,6	(omp89) outer membrane protein assembly factor BamA [Omp89 - Adherence] [Bartonella quintana str. Toulouse]	9,00E-76	26 %	outer membrane protein assembly factor BamA [Pasteurella atlantica]	WP_306347077.1
12	TPR repeat-containing protein	OM (95)	57,5	(ACICU_RS04590) porin family protein [HemO cluster - Nutritional/Metabolic factor] [Acinetobacter baumannii ACICU]	7,00E-54	28 %	surface lipoprotein assembly modifier [Pasteurella atlantica]	WP_306346309.1
13	hypothetical protein	OM (100)	231,9	(cdiA) contact-dependent inhibition effector tRNA nuclease [Contact-dependent inhibition CDI system - Effector delivery system] [Escherichia coli UT189]	4,00E-49	24 %	HNH endonuclease [Pasteurella atlantica]	WP_322631686.1
14	hypothetical protein	OM (98)	165,7	(espP) autotransporter, serine protease [EspP - Effector delivery system] [Escherichia coli O157:H7 str. EDL933]	4,00E-40	24 %	S6 family peptidase [Pasteurella atlantica]	WP_306346618.1

15	Outer membrane protein P.IIC	OM (100)	22,4	(nspA) neisserial surface protein A [NspA - Immune modulation] [Neisseria meningitidis 053442]	2,00E-29	40 %	opacity family porin [Pasteurella atlantica]	WP_306346229.1
16	hypothetical protein	OM (100)	35,6	(ompP2) outer membrane protein P2 (ompP2), laminin binding protein [P2 protein - Immune modulation] [Haemophilus influenzae PittEE]	2,00E-23	27 %	porin [Pasteurella atlantica]	WP_306346189.1
17	Outer membrane protein A	OM (100)	28,8	(ompA) outer membrane protein A [OmpA - Invasion] [Escherichia coli O18:K1:H7 str. RS218]	1,00E-20	43 %	OmpA family protein [Pasteurella atlantica]	WP_306346589.1
18	TPR repeat-containing protein	OM (95)	55,0	(BJAB0715_RS05250) porin family protein [HemO cluster - Nutritional/Metabolic factor] [Acinetobacter baumannii BJAB0715]	2,00E-20	20 %	surface lipoprotein assembly modifier [Pasteurella atlantica]	WP_306346273.1
19	Toxin and drug export protein A	OM (100)	52,0	(mtrE) multidrug efflux pump channel protein MtrE [MtrCDE - Antimicrobial activity/Competitive advantage] [Neisseria gonorrhoeae NCCP11945]	3,00E-20	19 %	TolC family protein [Pasteurella atlantica]	WP_306347092.1
20	hypothetical protein	OM (99)	21,6	(tapF) type IV pilus biogenesis/stability protein, pilW-like [Tap type IV pili - Adherence] [Aeromonas hydrophila ML09-119]	1,00E-19	35 %	type IV pilus biogenesis/stability protein PilW [Pasteurella atlantica]	WP_211599132.1
21	Peptidoglycan-associated lipoprotein	OM (100)	16,5	(ompA) outer membrane protein OmpA [OmpA - Invasion] [Anaplasma marginale str. Florida]	8,00E-16	35 %	peptidoglycan-associated lipoprotein Pal [Pasteurella atlantica]	WP_306346547.1
22	hypothetical protein (YadA-lignende)	OM (95)	38,2	(sab) autotransporter adhesin Sab [Sab - Effector delivery system] [Escherichia coli O113:H21 str. EH41]	3,00E-11	33 %	YadA-like family protein [Pasteurella atlantica]	WP_306346676.1
23	Murein hydrolase activator EnvC	OM (100)	45,4	(lepB) Dot/Icm type IV secretion system effector LepB, Rab1 GTPase activating protein (GAP) [Dot/Icm T4SS secreted effectors - Effector delivery system] [Legionella pneumophila str. Paris]	1,00E-09	23 %	murein hydrolase activator EnvC [Pasteurella atlantica]	WP_306347595.1
24	Translocation and assembly module subunit TamA	OM (100)	66,1	(omp89) outer membrane protein assembly factor BamA [Omp89 - Adherence] [Bartonella quintana str. Toulouse]	6,00E-08	32 %	autotransporter assembly complex family protein [Pasteurella atlantica]	WP_306346823.1
25	hypothetical protein	OM (99)	39,7	(ROD_RS25695) M23 family metalloproteinase [Colonization factor Citrobacter (CFC) type IV fimbriae - Adherence] [Citrobacter rodentium ICC168]	1,00E-06	32 %	peptidoglycan DD-metalloendopeptidase family protein [Pasteurella atlantica]	WP_306347764.1
26	hypothetical protein	OM (95)	43,2	(EF3023) polysaccharide lyase, family 8 [Hyaluronidase - Exoenzyme] [Enterococcus faecalis D32]	4,00E-06	32 %	hypothetical protein [Pasteurella atlantica]	WP_322631698.1
27	hypothetical protein	OM (95)	44,5	(SPR_RS06970) G5 domain-containing protein [PcIA spr1403 - Adherence] [Streptococcus pneumoniae R6]	5,00E-05	23 %	hypothetical protein [Pasteurella atlantica]	WP_306373349.1
28	hypothetical protein	OM (95)	61,7	(upaH) EntS/YbdA MFS transporter [UpaH, AIDA-I type - Biofilm] [Escherichia coli ABU 83972]	2,00E-04	28 %	hypothetical protein [Pasteurella atlantica]	WP_306346751.1
29	Protein Ycel	OM (95)	121,4	(mrp) hypothetical protein [Muramidase-released protein - Adherence] [Streptococcus suis 98HAH33]	3,00E-04	23 %	autotransporter outer membrane beta-barrel domain-containing protein [Pasteurella atlantica]	WP_306347677.1

30	Translocation and assembly module subunit TamB	OM (95)	142,9	(ompB) outer membrane protein OmpB [ROmpB/Sca5 - Invasion] [Rickettsia bellii RML369-C]	0,003	21 %	translocation/assembly module TamB domain-containing protein [Pasteurella atlantica]	WP_306346822.1
31	hypothetical protein	OM (95)	90,0	(hgpB) TonB-dependent hemoglobin/transferrin/lactoferrin family receptor [Hgp - Nutritional/Metabolic factor] [Haemophilus influenzae PitTEE]	0,008	25 %	TonB-dependent receptor [Pasteurella atlantica]	WP_306347348.1

3.5 Uttrykking av rekombinante proteiner

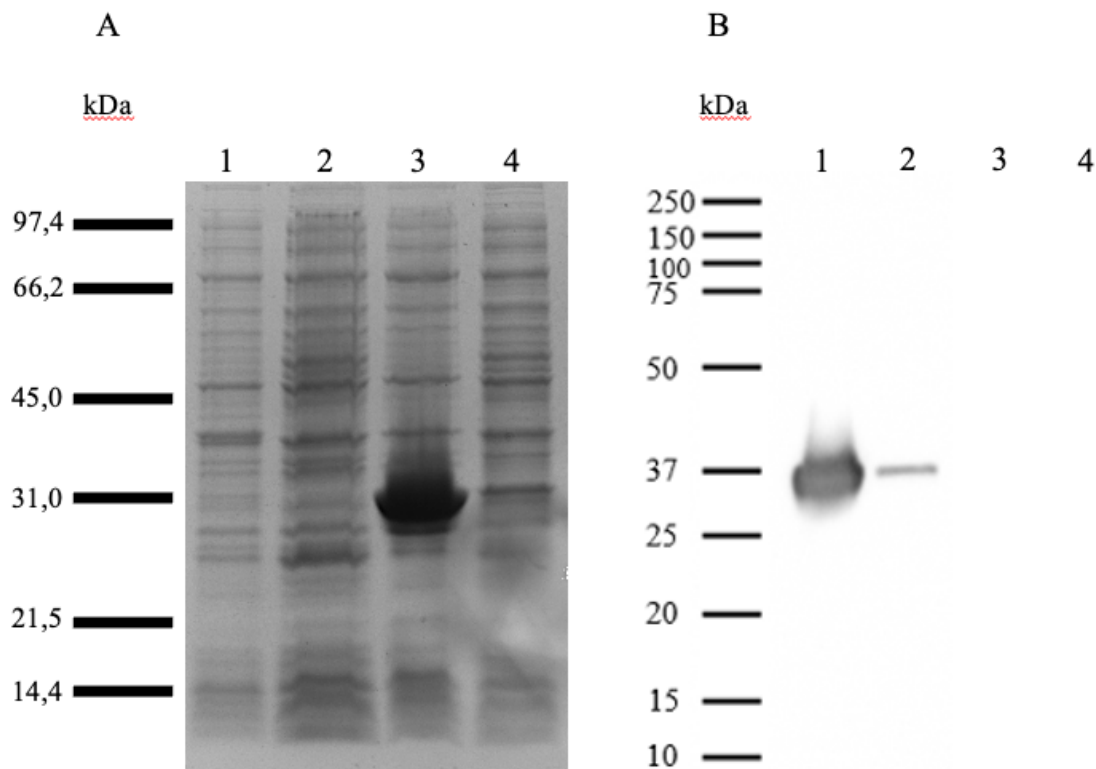
For å gjøre funksjonelle studier, ble YopT-lignende protein og YadA-lignende protein uttrykt som rekombinante proteiner. Først ble genene som koder for proteinene amplifisert ved PCR. Figur 6A viser uttrykk av genet som koder for YopT-lignende protein, analysert på agarosegel. Figur 6B viser et svakt bånd (indikert med hvit pil) som bekrefter at genet som koder for YadA-lignende protein ble uttrykt, men i lavere grad enn genet som koder for det YopT-lignende proteinet. Videre ble pET-21a kuttet med restriksjonsenzymmer og PCR-produktene ble ligert inn i plasmidet. Det ligerte plasmidet ble transformert inn i kompetente TOP10-celler, og ved koloni-PCR kunne vi vise at genene ble uttrykt for både det YadA-lignende proteinet (Fig. 6C) og det YopT-lignende proteinet (Fig. 6D). Ved sangersekvensering ble det bekreftet at dette var de korrekte sekvensene.



Figur 6 – PCR. **A:** Prøve av YopT-lignende protein som bekrefter vellykket PCR. **B:** Svakt bånd for YadA-lignende protein (hvit pil) bekrefter vellykket PCR. **C:** Fire prøver av YadA-lignende proteinet analysert ved koloni-PCR for å bekrefte vellykket insert i pET-21a. **D:** Fire prøver av YopT-lignende proteinet analysert ved koloni-PCR for å bekrefte vellykket insert i pET-21a.

Videre ble YopT-lignende protein og YadA-lignende protein transformert og uttrykt i kompetente Codon+ celler. Proteinuttrykk ble indusert ved tilsetning av IPTG. Som vist i Figur 7A, gir YopT-lignende protein et kraftig bånd (brønn 3), mens proteinuttrykket for YadA-

lignende protein ikke blir induisert i like stor grad (brønn 1). Teoretiske størrelser var 30,7 kDa for YopT-lignende protein, og 38,2 kDa for YadA-lignende protein. Begge proteinene ble blottet mot 6xHisTag monoklonalt antistoff, og man fikk en tydelig antistoffbinding til YopT-lignende protein i brønn 1 og 2 (Figur 7B). Antistoffet bant ikke til 6xHisTag på det YadA-lignende proteinet, og av den grunn ble kun YopT-lignende protein brukt videre i studien.

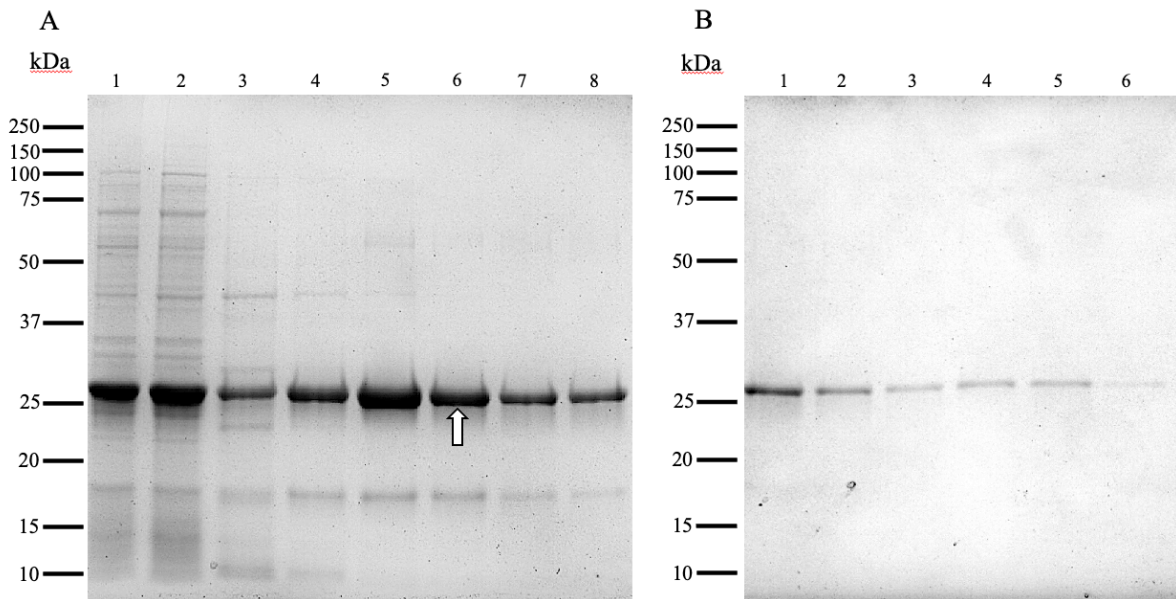


Figur 7 – Coomassiefarget SDS-polyakrylamid-gel med Codon+/IPTG og Western Blot mot 6xHisTag-antistoff. **A:** Brønn 1: Codon+/YadA med IPTG. Brønn 2: Codon+/YadA uten IPTG. Brønn 3: Codon+/YopT med IPTG. Brønn 4: Codon+/YopT uten IPTG. **B:** Brønn 1: Codon+/YopT med IPTG. Brønn 2: Codon+/YopT uten IPTG. Brønn 3: Codon+/YadA med IPTG. Brønn 4: Codon+/YadA uten IPTG.

3.6 Proteinrensing ved chelating sepharose

For å rense proteinene etter modifisering med 6xHisTag ble chelating sepharose benyttet, før de ble eluert med ulike konsentrasjoner av imidazol. Som Figur 8A og B viser, ser man en progressiv økning i renheten av målproteinet i fraksjonene eluert med økende konsentrasjon av imidazole. Hver etterfølgende fraksjon viser reduksjon av andre proteiner, og forsterkning av båndene som tilsvarer målproteinet. I Figur 8A vises prøve fra celleekstrakt (brønn 1), prøve fra supernatant (brønn 2) og rekombinant YopT-lignende protein eluert med imidazol (brønn 3 til 8). Figur 8B viser rekombinant YopT-lignende protein eluert med imidazol (brønn

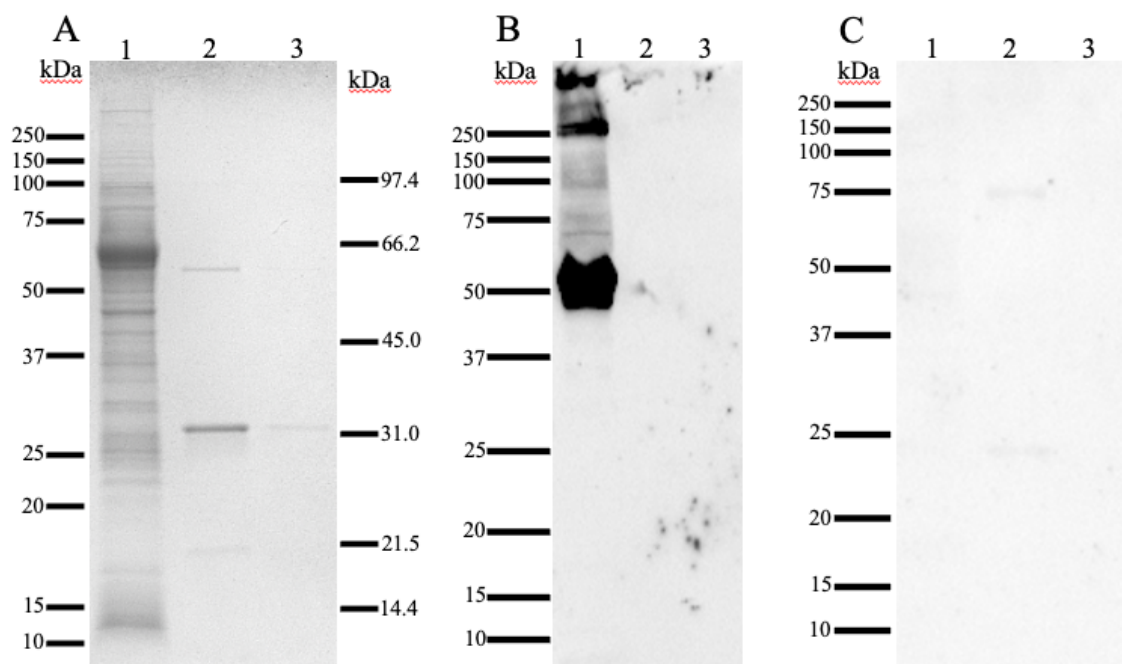
1 til 6). Andre fraksjon eluert med 100 mM imidazol ble brukt videre i studien (Figur 8A, indikert med hvit pil).



Figur 8 – YopT-lignende protein produsert rekombinant i Codon+. **A:** Brønn 1: Prøve fra celleekstrakt. Brønn 2: Prøve fra supernatant. Brønn 3: Første fraksjon eluert i 50 mM imidazol. Brønn 4: Andre fraksjon eluert i 50 mM imidazol. Brønn 5: Første fraksjon eluert i 100 mM imidazol. Brønn 6: Andre fraksjon eluert i 100 mM imidazol. Brønn 7: Første fraksjon eluert i 150 mM imidazol. Brønn 8: Andre fraksjon eluert i 150 mM imidazol. **B:** Brønn 1: første fraksjon eluert i 200 mM imidazol. Brønn 2: Andre fraksjon eluert i 200 mM imidazol. Brønn 3: Første fraksjon eluert i 250 mM imidazol. Brønn 4: Andre fraksjon eluert i 250 mM imidazol. Brønn 5: Første fraksjon eluert i 300 mM imidazol. Brønn 6: Andre fraksjon eluert i 300 mM imidazol.

3.7 Rekombinant YopT-lignende protein som antigen

Rekombinant YopT-lignende protein ble analysert ved SDS-PAGE og Coomassie farget for å bekrefte tilstedeværelse av proteinet i prøven (Figur 9A). WB med serum fra laks vaksinert med PaL-1 ble utført for å undersøke om den vaksinerte laksen hadde dannet antistoffer som kunne bindes til det rekobinante YopT-lignende proteinet (Figur 9B). Som kontroll ble tilsvarende prøver blottet med serum fra uvaksinert laks (Figur 9C). Som Figur 9B viser, fikk man ikke antistoffbinding der man ville forventet å få utslag dersom det var antistoffer bundet til det rekombinante YopT-lignende proteinet hverken i brønn med PaL-1 (brønn 1) eller i brønner med ulike konsentrasjoner av det rekombinante YopT-lignende proteinet (brønn 2 og 3). Proteinene som ble bundet av antistoffer produsert i vaksinert fisk var av en størrelse på ca. 60 kDa og større.

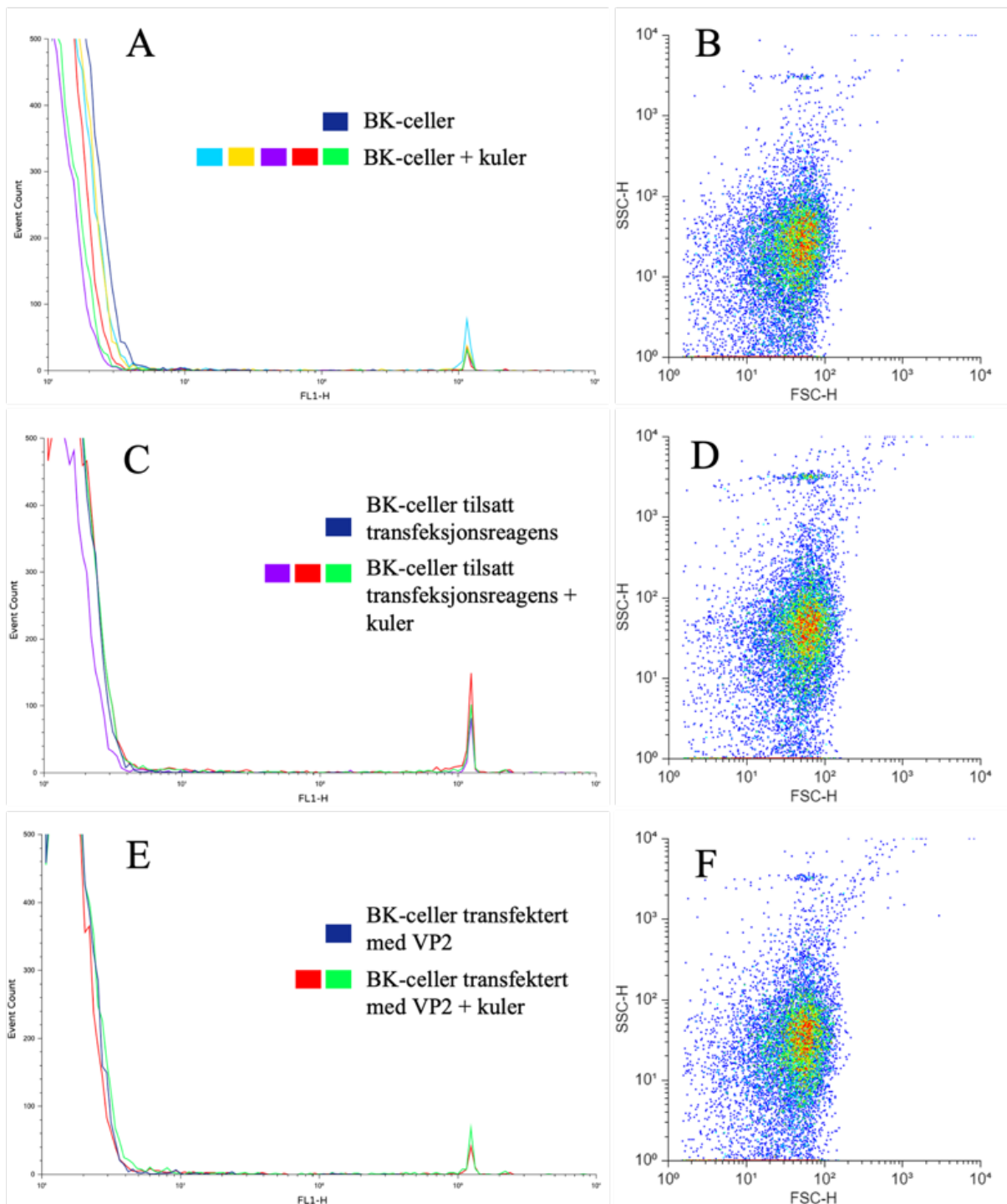


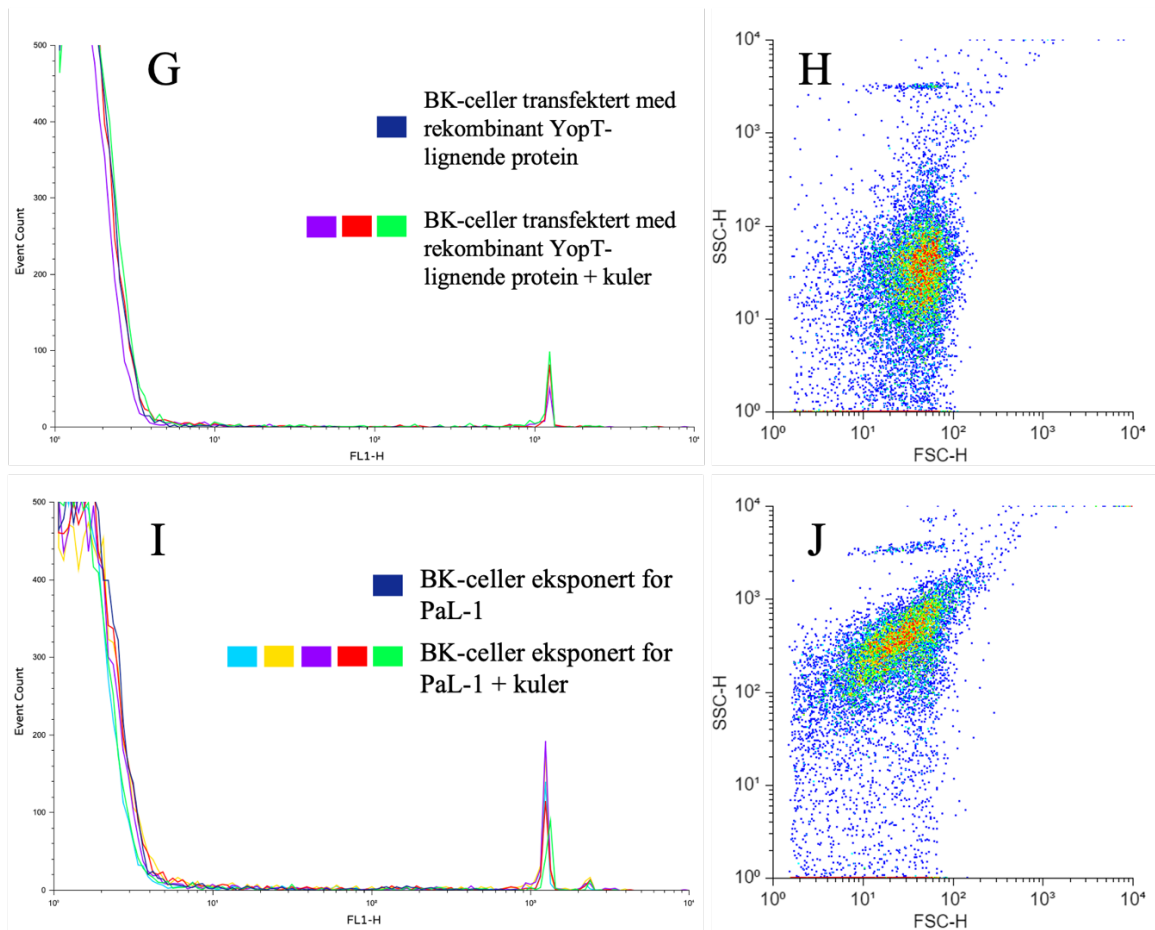
Figur 9 – Coomassiefarget SDS-polyakrylamid-gel og Western blot. **A:** Coomassiefarget SDS-polyakrylamid-gel. Brønn 1: Proteinprofil til PaL-1. Brønn 2: Rekombinant YopT-lignende protein fortynnet 1:10. Brønn 3: Rekombinant YopT-lignende protein fortynnet 1:50. **B:** WB med serum fra vaksinert laks. Brønn 1: Proteinprofil til PaL-1. Brønn 2: Rekombinant YopT-lignende protein fortynnet 1:10. Brønn 3: Rekombinant YopT-lignende protein fortynnet 1:50. **C:** WB med serum fra uvaksinert laks. Brønn 1: Proteinprofil til PaL-1. Brønn 2: Rekombinant YopT-lignende protein fortynnet 1:10. Brønn 3: Rekombinant YopT-lignende protein fortynnet 1:50.

3.8 Flow cytometry

BK-celler inkubert med fluoriserende kuler ble analysert ved flow cytometry. BK-celler (kontroller) vises i Figur 10A og 10B. I Figur 10C og 10D vises BK-celler eksponert for reagensene som ble brukt for transfeksjon. BK-celler transfektert med VP2 vises i Figur 10E og 10F, og BK-celler transfektert med rekombinant YopT-lignende protein vises i Figur 10G og 10H. BK-celler smittet med PaL-1 vises i Figur 10I og 10J. Andel av BK-celler i de ulike gruppene (tilsatt kuler, tilsatt transfeksjonsmedium og kuler, tilsatt transfeksjonsmedium og rekombinant YopT-lignende protein, tilsatt transfeksjonsmedium og VP2, eksponert for PaL-1 og tilsatt kuler) som har tatt opp kuler vises i Tabell 16 sammen med standardavvik. Resultatene viser at andelen av BK-celler som har tatt opp kuler er høyest i gruppen av celler som er tilsatt transfeksjonsmedium og kuler (Fig. 11A og 11B), samt i BK-cellene som er eksponert for PaL-1 og tilsatt kuler (Fig. 14A og 14B). Spredningsplottet viser tydelig at disse gruppene har økt granularitet, og at cellene har blitt større. Opptak av kuler er lavest i gruppen av BK-celler som bare er tilsatt kuler (Fig. 10A og 10B). Cellene transfektert med VP2 med kuler (Fig. 12A og 12B) og rekombinant YopT-lignende protein med kuler (Fig. 13A og 13B) ser ut til å ha

fagocyttert relativt like mengder kuler, og spredningsplottene viser tilsynelatende lik granularitet.





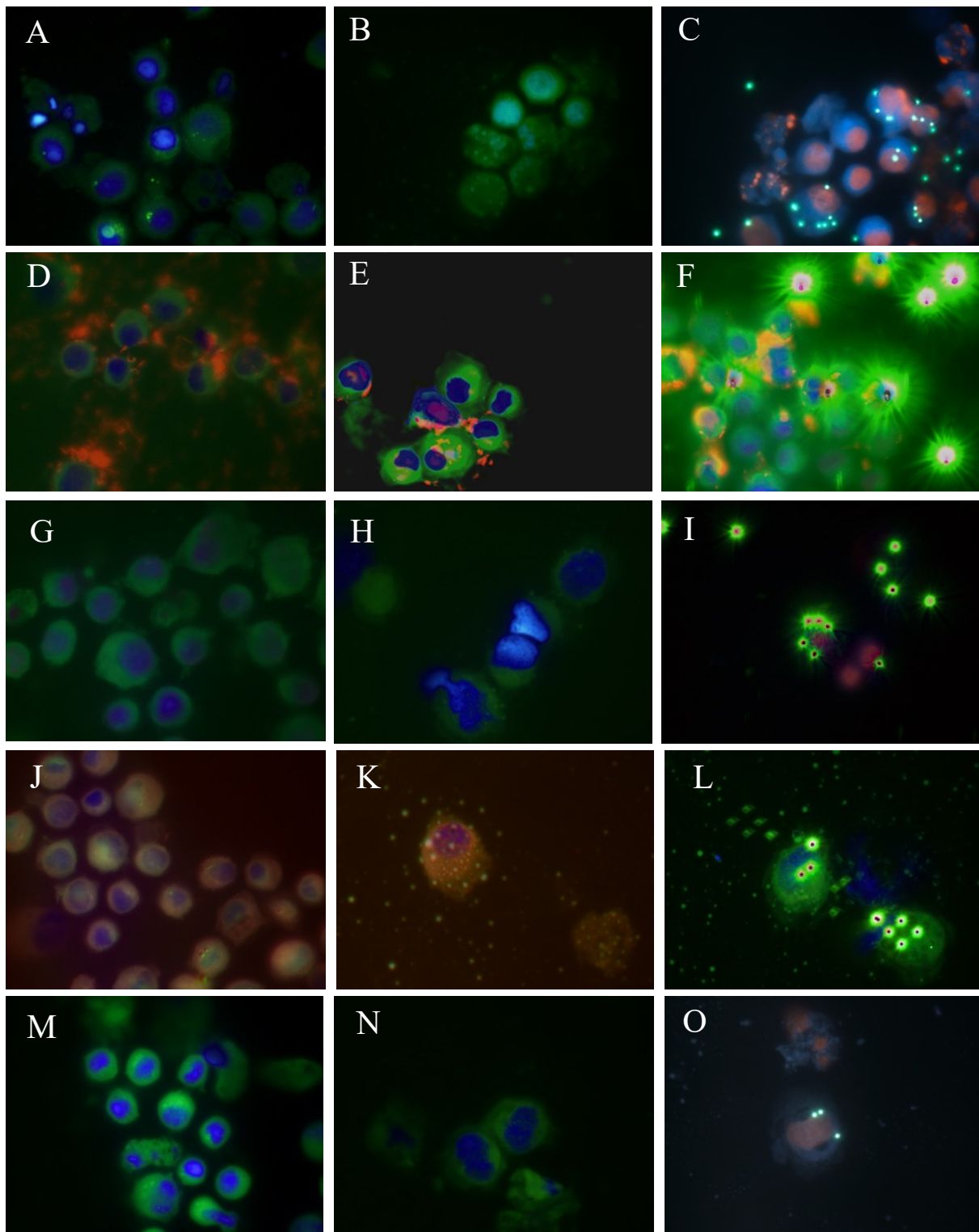
Figur 10 – Flow cytometry. **A:** Histogram av BK-celler med og uten fluoriserende kuler. **B:** Spredningsplott av BK-celler tilsatt fluoriserende kuler. **C:** Histogram av BK-celler eksponert for transfeksjonsreagenser med og uten fluoriserende kuler. **D:** Spredningsplott av BK-celler eksponert for transfeksjonsreagenser tilsatt fluoriserende kuler. **E:** Histogram av BK-celler transfektert med VP2 med og uten fluoriserende kuler. **F:** Spredningsplott av BK-celler transfektert med VP2 tilsatt fluoriserende kuler. **G:** Histogram av BK-celler transfektert med rekombinant YopT-lignende protein med og uten fluoriserende kuler. **H:** Spredningsplott av BK-celler transfektert med rekombinant YopT-lignende protein tilsatt fluoriserende kuler. **I:** Histogram av BK-celler eksponert for PaL-1 med og uten fluoriserende kuler. **J:** Spredningsplott av BK-celler eksponert for PaL-1 tilsatt fluoriserende kuler.

Tabell 16 – Oversikt over gjennomsnittscelletall hos de ulike gruppene med standardavvik

	Gjennomsnitt % celler + SD
BK-celler m/kuler	1,175±0,060
Trans. medium m/ kuler	3,223±0,013
VP2 m/kuler	2,135±0,004
YopT m/kuler	2,377±0,006
PaL-1 m/kuler	2,854±0,008

3.9 Immunfluorescensanalyse

Cytospin preparatene ble analysert i et fluorescensmikroskop. Grønne celler (Phalloidin 488 farger actinet grønt) og blå cellekjerner (av DAPI) ble visualisert hos alle fem gruppene. I tillegg ble PaL-1 og VP2 undersøkt for tilstedeværelse i form av rød fluorescens. Figur 11A, D, G, J og M (kolonnen til venstre) representerer de ulike prøvene etter 24 timer. Figur 11B, E, H, K og N (kolonnen i midten) illustrerer prøvene etter 48 timer. Figur 11C, F, I, L og O (kolonnen til høyre) viser prøvene etter 48 timer, hvor fluoriserende kuler ble tilsatt etter 24 timer. Preparatene var dessverre av noe dårlig kvalitet, så det var vanskelig å få klare og tydelige resultater. Det var ikke mulig å se ulikheter i forhold til mengde aktin i BK-celler i de ulike behandlingsgruppene. Det var tydelig at BK-celler fra alle behandlingsgruppene hadde tatt opp kuler, men det var vanskelig å differensiere i forhold til mengde kuler per celle og andel celler som har tatt opp kuler.



Figur 11 – Cytospinpreparater analysert ved immunfluorescens. **A, B og C:** BK-celler uten eksperimentell behandling etter 24 timer, 48 timer, og 48 timer med tilsatt fluoriserende kuler etter 24 timer. **D, E og F:** BK-celler eksponert for PaL-1 etter 24 timer, 48 timer og 48 timer med tilsatt fluoriserende kuler etter 24 timer. **G, H og I:** BK-celler tilsatt transfeksjonsreagens etter 24 timer, 48 timer og 48 timer med tilsatt fluoriserende kuler etter 24 timer. **J, K og L:** BK-celler transfektert med VP2 etter 24 timer, 48 timer og 48 timer med tilsatt fluoriserende kuler etter 24 timer. **M, N og O:** BK-celler transfektert med rekombinant YopT-lignende protein etter 24 timer, 48 timer og 48 timer med tilsatt fluoriserende kuler etter 24 timer.

4 – Diskusjon

Pasterurellose forårsaket av *P. atlantica* gv. *salmonicida* forårsaker betydelige tap og velferdsproblemer i norsk oppdrett. Med bakgrunn i dette var hensikten med denne studien å identifisere potensielle virulensfaktorer hos den laksepatogene bakterien *P. atlantica* gv. *salmonicida* ved bruk av in silico-analyser av proteomet, og produsere disse ved rekombinante teknikker. Effekten av virulensfaktorer ble analysert ved å eksponere dem mot BK-celler. I tillegg ble dyrkningstemperaturene for PaL-1 sammenlignet for å se om det påvirket bakteriell vekst og proteinuttrykk.

In silico-analyser av PaL-proteom

Yttermembranproteiner og ekstracellulære proteiner har et stort potensial til å fungere som virulensfaktorer i bakterier. En genomisk analyse av *P. atlantica* gv. *cyclopteri* har tidligere identifisert potensielle virulensfaktorer og immunogene komponenter i bakterien (Ellul et al., 2021). Slike in silico analyser er avgjørende for å forstå biologien til bakterier, som er vesentlig for å utvikle effektive forebyggingsstrategier. For å predikere virulensfaktorer er en kritisk nøkkelfaktor å fastslå den subcellulære lokasjonen av bakterieproteinene. Proteiner med tilstedeværelse på bakterieoverflaten eller som utskilles ekstracellulært har høy sannsynlighet for å være involvert i bakteriell virulens (Ellul et al., 2021). I den studien er det blitt identifisert en rekke proteiner som kan være mulige virulensfaktorer, ved å sammenligne dem med andre kjente virulensfaktorer fra bakterier. Basert på gitte kriterier ble det valgt YopT-lignende protein og YadA-lignende protein for videre analyser i denne studien.

YopT-lignende protein er med 100 % sikkerhet fastslått at er et overflateprotein, med en molekylvekt på 30,7 kDa. YadA-lignende protein er med 95 % sikkerhet et overflateprotein, og har en molekylvekt på 38,2 kDa. Ved bruk av BLASTp ble YopT-lignende protein identifisert som YopT-type cysteine protease domain-containing protein i *P. atlantica*. I virulensfaktordatabasen (VFDB) viste YopT-lignende protein å ha 23 % samsvar med et YopT-type cysteine protease domain-containing protein i *Haemophilus ducreyi*, som er en kjent virulensfaktor. YopT er et effektor protein som også produseres av *Yersinia spp.*, der effekten går ut på å indusere en cytotoxisk effekt og forstyrrelser/ødeleggelse av aktinfilamentene i cytoskjelettet til eukaryote celler (Iriarte & Cornelis, 1998). For translokasjon av YopT over vertscellers cellemembran kreves i tillegg translokasjonsproteinene YopB. Effektor Yop-proteiner i *Y. pseudotuberculosis* (YopE, YopH og YpkA/YopO) har også en funksjon knyttet

til virulens ved å indusere en cytotoxisk effekt i eukaryote celler. YopT-lignende proteiner kan ha lignende funksjoner i andre bakterier.

YadA-lignende protein ble ved BLASTp identifisert som et YadA-like family protein i *P. atlantica*. I VFDB viste proteinet å være 33 % samsvarende med et Sab-adhesin, som er et autotransporterprotein. Disse Sab-adhesinene medierer adhesjon til vertsceller, og spiller dermed en viktig rolle i bakteriell virulens. YadA er kjent som et adhesjonsprotein hos *Yersinia*-bakteriene *Y. pestis*, *Y. pseudotuberculosis* og *Y. enterocolitica*. Hos sistnevnte er YadA beskrevet som en virulensfaktor (El Tahir & Skurnik, 2001). YadA er et multifunksjonelt protein med ulike biologiske egenskaper. YadA-positive bakterier kan binde seg til ulike komponenter som kollagen, laminin, fibronectin, tarmens submukosa, slim og hydrofobe overflater (El Tahir & Skurnik, 2001). Videre fungerer YadA som en potent serumresistensfaktor ved å hemme den klassiske komplementveien.

En utfordring i denne studien er mangelen på tilgjengelig sekvenseringsdata fra akvatiske *Pasteurellaceae*, noe som påvirker i hvilken grad vi kan ha tillit til resultatene. Til tross for dette har det blitt laget en tentativ liste over potensielle virulensfaktorer hos *P. atlantica* gy. *salmonicida* basert på proteomet fra PaL-1 isolatet. De identifiserte proteinene er lokalisert på yttermembranen og ekstracellulært, og kan derfor fungere både som immunogene komponenter og virulensfaktorer. Immunogene komponenter kan bli brukt som utgangspunkt i revers vaksinologi.

Revers vaksinologi er en datadrevet metode benyttet for å identifisere vaksinekandidater ved in silico analyser. Dette er en omvendt tilnærming til vaksineutvikling, der patogenets genom blir benyttet for å lete etter aktuelle vaksineantigener. Genomanalysene gir mulighet for å lage en omfattende katalog over alle proteinantigener patogenet kan uttrykke til enhver tid, og kan anslå hvilke antigener som mest sannsynlig er de beste vaksinekandidatene (Rappuoli, 2000). Ved revers vaksinologi dyrkes ikke patogenet for ulike analyser i laboratorium, in silico analyser muliggjør derimot en mer effektiv og presis vaksineutvikling. En studie utført av Ellul *et al.* (2021) fremhevet blant annet potensialet for bruk av revers vaksinologi for utvikling av vaksine for å forebygge pasteurellose hos rognkjeks (*Cyclopterus lumpus*). Gjennom en kombinasjon av in silico analyser og funksjonelle studier ble de mest lovende vaksine antigenene indentifisert, og kan dermed prioriteres i utviklingen av vaksine for å forhindre sykdomsutbrudd.

Analyse av virulensfaktorenes immunogenisitet

YopT-lignende protein og YadA-lignende protein ble produsert og uttrykt rekombinant i Codon+ *E. coli*, dyrket med og uten IPTG. Disse rekombinante proteinene har blitt lagt til en 6xHis-Tag, som gjør deteksjon og rensing enklere. Et monoklonalt 6xHis-Tag-antistoff ble benyttet i WB-analysene for å identifisere proteinene. Det YopT-lignende rekombinante proteinet ble vellykket uttrykt med 6xHisTag, og antistoffet bandt seg til 6xHisTag. Det YadA-lignende rekombinante proteinet bandt seg derimot ikke mot 6xHisTag-antistoffet. At antistoffet ikke bandt seg til proteinet kan være grunnet feil i primerdesignet.

Det ble brukt serum fra fisk vaksinert mot PaL-1 i WB-analyser for å undersøke om vaksinert laks danner antistoffer rettet mot rekombinant YopT-lignende protein. Resultatene viste at antistoffene produsert i vaksinert laks ikke var rettet mot det rekombinante YopT-lignende proteinet. I brønnen tilsatt PaL-1 (som også var vaksineantigen) var det heller ikke antistoffbinding der man ville forventet å få utslag for YopT-lignende protein. Det var ingen spesifikk binding til det vaksinerte lakseserumet, noe som kan forklares av flere årsaker. En tidligere masteroppgave (Skaar, 2023) identifiserte at laks vaksinert mot PaL-1 danner antistoffer mot proteiner av størrelse på 60 kDa. I denne studien fant man ut at antistoff bindes mot proteiner som har en molekylvekt på ca. 60 kDa, som kan stemme overens med funnene til Skaar (2023). Ettersom det YopT-lignende proteinet har en molekylvekt på ca. 30 kDa er det heller ikke forventet at proteiner på denne størrelsen vil få antistoffbinding. Proteiner viser forskjellig grad av immunogenisitet, og disse resultatene kan tyde på at YopT-lignende protein ikke er en immunogen komponent. Dersom YopT-lignende protein hadde vært av riktig størrelse, kunne feil folding av proteinet vært en årsak til hvorfor man ikke fikk antistoffbinding. Proteinfolding er kritisk for at et protein skal oppnå sin funksjonelle konformasjon, inkludert eksponering av epitoper som kan gjenkjennes av antistoffer (Colman, 1988). Hvis proteinet ikke er korrekt foldet, kan de relevante epitopene være skjult eller endret, noe som forhindrer effektiv binding av antistoffer. YadA-lignende rekombinant protein ble ikke analysert i denne WB-analysen, ettersom det ikke fikk antistoffbinding mot 6xHisTag og dermed ikke kunne renses.

Bakteriell vekst og proteinuttrykk ved unike temperaturer

Innledningsvis ble det laget en vekstkurve for PaL-1, for å kunne høste bakteriene når de oppnår den sen-eksponentielle vekstfasen. Den eksponentielle vekstfasen ble nådd etter 8 timer, og den stasjonære vekstfasen ble nådd etter 20 timer. Dette stemmer overens med funnene i en tidligere masteroppgave (Ottesen, 2021). PaL-1 og isolat av *P. atlantica* gv. *cyclopteri* ble dyrket ved 10, 20 og 30 °C for å undersøke om temperatur påvirket bakterienes vekst og proteinuttrykk. Som Figur 4 viser, ble proteinene hos både PaL-1 og *P. atlantica* gv. *cyclopteri* uttrykt kraftigst ved 20 °C, selv om man ser også at proteinene uttrykkes ved 10 og 30 °C. Et viktig aspekt i dette funnet er at antallet tilsatte bakterier ikke ble justert, noe som kan ha påvirket resultatene ved å gi en skjevhet i mengden proteinuttrykk målt. Det er viktig å vurdere denne faktoren i videre analyser for å sikre at det proteinuttrykket som observeres, gjenspeiles i cellenes naturlige respons til temperatur og ikke kun endringer i celletetthet. I en artikkel av Gulla et al. (2023) foreslås det at *P. atlantica* sin tilhørighet i nåværende slekt *Pasteurella* er svært tvilsom, og gjennom deres resultater antydes det at den tilhører slekten *Phocoenobacter*. Videre antyder de at det er en nær slektskap mellom *P. atlantica* og *Pasteurellaceae* funnet på slimhinnene til forskjellige hvalarter verden over, som gjør at de ser på marine pattedyr som et potensielt reservoar for bakterien, og foreslår *Phocoenobacter* som ny slekt for *P. atlantica*. Marine pattedyr har en kroppstemperatur på overkant av 30 °C, så for at *P. atlantica* skal kunne ha disse som et reservoar må det kunne overleve i disse temperaturene. Proteiner uttrykkes hos både PaL-1 og *P. atlantica* gv. *salmonicda* ved 30 °C, som kan indikere på at bakteriene overlever ved denne temperaturen.

Effekt av YopT-lignende protein på BK-celler

For å kunne analysere effekten rekombinant YopT-protein har som virulensfaktor, ble det transfektert inn i BK-celler. Som nevnt tidligere, er YopT avhengig av YopB for translokasjon over den eukaryote cellemembranen (Iriarte & Cornelis, 1998). Denne naturlige translokasjonsprosessen er ikke mulig å etterligne in vitro uten tilstedeværelse av alle Yersinia-infeksjonsmekanismer, inkludert YopB. Transfeksjon blir derfor benyttet som en kunstig metode for å overføre YopT inn i vertsceller. BK-cellene ble også eksponert for PaL-1 og VP2 (transfektet), som kontroller. I tillegg hadde man en gruppe BK-celler som ikke var utsatt for eksperimentell behandling (annet enn å bli tilsatt fluoriserende kuler) og en gruppe som ble eksponert for transfeksjonsreagensene, der proteiner var erstattet med RNase-fritt vann. BK-celler er, som nevnt tidligere, en hittil ubeskrevet cellelinje hos Fiskeimmunologigruppen ved UiB, der cellene er isolerte hodenyreleukocytter fra atlantisk

laks. Cellene er tidligere blitt vist å ha fagocytisk aktivitet (upubliserte data). Analyser ble gjennomført ved immunfluorescens mikroskopi etter 24 og 48 timer, hvor fluoriserende kuler ble tilsatt etter 24 timer, og ved flow cytometri etter 48 timer.

For å vurdere om BK-cellenes aktinfilament ble affisert av rekombinant YopT-lignende protein, ble cellene farget for aktin ved bruk av Phalloidin 488, som farger aktinet i cellene grønt. Dersom intensiteten på denne grønnfargen ble svakere, sammenlignet med kontrollgruppene, ville dette indikere en nedbrytning av aktin. Hos BK-cellenes transfektert med rekombinant YopT-lignende protein forventet man derfor at Phalloidinen ville bli svakere, ettersom YopT opprinnelig har en cytotoxisk effekt på vertsceller (Shao et al., 2002). Det ble derimot ikke observert en tydelig reduksjon av grønnfargen, noe som indikerer at aktinfilamentet til cellene ikke er blitt brutt ned. Likevel kan vi med bakgrunn i dårlige preparater ikke dra noen konklusjoner fra disse resultatene. Immunfargingen kan ikke sies å være spesielt vellykket, da det blant annet var utfordringer med at preparatene mistet fluorescens underveis ved mikroskopiering. Dette gjorde det utfordrende å visualisere og analysere resultatene. I tillegg var det vanskelig å få fluorescensmikroskopet til å fokusere på ett punkt. Dette kan være fordi limet som ble brukt til å feste dekkglasset til objektglasset var gammelt.

BK-cellenes med de ulike eksponeringsprosedyrene ble videre analysert ved flow cytometry. Det ble telt 10 000 celler fra hver prøve, hvor størrelse, granularitet og fluorescens fra kuler ble analysert. Dette blir illustrert ved spredningsplott og histogrammer, som vist i avsnitt 3.8. BK-celler som ble tilsatt transfeksjonsreagenser ser ut til å ha fagocyttert flere fluoriserende kuler sammenlignet med de andre eksponeringsgruppene. Dette er en indikasjon på at transfeksjonsreagensene har en effekt på BK-cellenes evne til opptak. Gruppene som er eksponert for PaL-1 ser man at det er flere celler som fagocytterer, i tillegg til at cellene fagocytterer mer. I spredningsplottet ser man også en større spredning hos denne gruppen, sammenlignet med de andre. Årsaken til dette er vanskelig å si, men det kan virke som at BK-cellenes blir mer aktivert når de eksponeres bakterieceller. Ideelt sett burde BK-cellenes vært tilsatt en høyere konsentrasjon av fluoriserende kuler, da dette kunne gjort resultatene mer tydelig. Valgt konsentrasjon av kuler var basert på tidligere studier (Øverland *et al.*, 2010) og for å forsikre oss om at cellene ikke skulle ødelegges.

Cellene som bare ble eksponert for kuler uten ekstra behandling viste lavest opptak av kuler, som tyder på at cellene ikke ble stimulert til fagocytisk aktivitet, i motsetning til gruppene med PaL-1 og transfeksjonsreagens. Transfeksjonsreagenser har trolig gjort at kuler har blitt transfektert inn i celler, sammenliknet med gruppen som bare er blitt tilsatt kuler. Det er vanskelig å dra en konklusjon basert på hvordan proteinene påvirket BK-cellenes evne til fagocytose. Det kunne vært lettere å analysere om konsentrasjonen av kuler hadde vært høyere. Rekombinant YopT-lignende protein ser ikke ut til å ha påvirkning på BK-cellenes evne til fagocytose. Selv om høyere andel av BK-celler transfektert med rekombinant YopT-lignende protein har tatt opp kuler sammenliknet med BK-celler tilsatt kuler uten transfeksjonsmedium, er andelen BK-celler som har tatt opp kuler like høy i BK-celler som er transfektert med VP2. Dette indikerer at det er transfeksjonsmediet i seg selv og ikke YopT-lignende protein som stimulerer til høyere opptak av kuler i disse gruppene.

Forslag til videre forskning

I fremtidig forskning kan det være en fordel å analysere YopT-lignende protein ved proteinkrystallografi, og sammenligne konformasjonen opp mot kjent struktur hos YopT isolert fra *Yersinia spp.* For YadA-lignende protein kan det lages nye primere for proteinet. Videre kan det velges ut andre virulensfaktorer identifisert i denne studien, og utføre funksjonelle analyser ved eksponering mot cellelinjer eller leukocytter.

5 – Konklusjon

- Flere potensielle virulensfaktorer hos *P. atlantica* gv. *salmonicida* har blitt identifisert ved in silico analyser.
- YopT-lignende protein, som er en virulensfaktor, ble uttrykt rekombinant i *E. coli*-celler.
- Det YopT-lignende proteinet viste ikke immunogenisitet testet ved WB-analyser.
- Basert på resultatene i denne studien kan vi ikke konkludere med at rekombinant YopT-lignende protein har cytotoxisk effekt ved å ødelegge aktin hos BK-celler, men utfordringer knyttet til analyse av preparatene gjør at denne funksjonen likevel ikke kan utelukkes.
- *P. atlantica* gv. *salmonicida* vokser best ved temperaturer over 10 °C og i denne studien er det vist god vekst opp til 30 °C.

6 – Referanseliste

- Abbasi, M., Kafilzadeh, F., Tanomand, A., Zolghadri, S., Hosainzadegan, H., 2021. Gold Nanoparticles Conjugating Recombinant Nontoxic *Pseudomonas* Exotoxin A as a Vaccine Candidate for *Pseudomonas aeruginosa* Infections. *Mol. Genet. Microbiol. Virol.* 36, S7–S12. <https://doi.org/10.3103/S0891416821050025>
- Alarcón, M., Gulla, S., Røsæg, M.V., Rønneseth, A., Wergeland, H., Poppe, T.T., Nilsen, H., Colquhoun, D.J., 2016. Pasteurellosis in lump sucker *Cyclopterus lumpus*, farmed in Norway. *J. Fish Dis.* <https://doi.org/doi:10.1111/jfd.12366>
- Biering, E., Salonijs, K., 2014. DNA Vaccines, in: Gudding, R., Lillehaug, A., Evensen, Ø. (Eds.), *Fish Vaccination*.
- Birkbeck, T.H., Laidler, L.A., Grant, A.N., Cox, D.I., 2002. *Pasteurella skyensis* sp. nov., isolated from Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 52, 699–704. <https://doi.org/10.1099/00207713-52-3-699>
- Brudeseth, B.E., Wiulsrød, R., Fredriksen, B.N., Lindmo, K., Løkling, K.-E., Bordevik, M., Steine, N., Klevan, A., Gravningen, K., 2013. Status and future perspectives of vaccines for industrialised fin-fish farming. *Fish Shellfish Immunol.* 35, 1759–1768. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2013.05.029>
- Casadevall, A., Pirofski, L., 2001. Host-Pathogen Interactions: The Attributes of Virulence. *J. Infect. Dis.* 184, 337–344. <https://doi.org/10.1086/322044>
- Castro, R., Tafalla, C., 2015. 2 - Overview of fish immunity, in: Beck, B.H., Peatman, E. (Eds.), *Mucosal Health in Aquaculture*. Academic Press, San Diego, pp. 3–54. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-417186-2.00002-9>
- Colman, P.M., 1988. Structure of Antibody-Antigen Complexes: Implications for Immune Recognition, in: Dixon, F.J. (Ed.), *Advances in Immunology*, *Advances in Immunology*. Academic Press, pp. 99–132. [https://doi.org/10.1016/S0065-2776\(08\)60364-8](https://doi.org/10.1016/S0065-2776(08)60364-8)
- Ekman, H., 2003. Bakteriella virulensfaktorer [WWW Document]. URL <https://stud.epsilon.slu.se/11207/> (accessed 5.22.24).
- El Tahir, Y., Skurnik, M., 2001. YadA, the multifaceted *Yersinia* adhesin. *Int. J. Med. Microbiol.* 291, 209–218. <https://doi.org/10.1078/1438-4221-00119>
- Ellul, R.M., Kalatzis, P.G., Frantzen, C., Haugland, G.T., Gulla, S., Colquhoun, D.J., Middelboe, M., Wergeland, H.I., Rønneseth, A., 2021. Genomic Analysis of *Pasteurella atlantica* Provides Insight on Its Virulence Factors and Phylogeny and

- Highlights the Potential of Reverse Vaccinology in Aquaculture. *Microorganisms* 9, 1215. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9061215>
- Figdor, C.G., van Kooyk, Y., Adema, G.J., 2002. C-type lectin receptors on dendritic cells and langerhans cells. *Nat. Rev. Immunol.* 2, 77–84. <https://doi.org/10.1038/nri723>
- Forlenza, M., Fink, I.R., Raes, G., Wiegertjes, G.F., 2011. Heterogeneity of macrophage activation in fish. *Dev. Comp. Immunol.*, Special issue on Teleost Fish Immunology 35, 1246–1255. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2011.03.008>
- Friedlander, A.M., Welkos, S.L., Worsham, P.L., Andrews, G.P., Heath, D.G., Anderson, G.W., Jr., Pitt, M.L.M., Estep, J., Davis, K., 1995. Relationship Between Virulence and Immunity as Revealed in Recent Studies of the F1 Capsule of *Yersinia pestis*. *Clin. Infect. Dis.* 21, S178–S181. https://doi.org/10.1093/clinids/21.Supplement_2.S178
- Frøystad, M.K., Rode, M., Berg, T., Gjøen, T., 1998. A role for scavenger receptors in phagocytosis of protein-coated particles in rainbow trout head kidney macrophages. *Dev. Comp. Immunol.* 22, 533–549. [https://doi.org/10.1016/S0145-305X\(98\)00032-9](https://doi.org/10.1016/S0145-305X(98)00032-9)
- Geijtenbeek, T.B.H., Gringhuis, S.I., 2009. Signalling through C-type lectin receptors: shaping immune responses. *Nat. Rev. Immunol.* 9, 465–479. <https://doi.org/10.1038/nri2569>
- Goldsby, R.A., Kindt, T.J., Osbourne, B.A., Kubly, J., 2002. *Immunology Fifth Edition*. W. H. Freeman and Company.
- Gulla, S., Colquhoun, D.J., Olsen, A.B., Spilsberg, B., Lagesen, K., Åkesson, C.P., Strøm, S., Manji, F., Birkbeck, T.H., Nilsen, H.K., 2023. Phylogeography and host specificity of Pasteurellaceae pathogenic to sea-farmed fish in the north-east Atlantic. *Front. Microbiol.* 14. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1236290>
- Hayashi, F., Smith, K.D., Ozinsky, A., Hawn, T.R., Yi, E.C., Goodlett, D.R., Eng, J.K., Akira, S., Underhill, D.M., Aderem, A., 2001. The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5. *Nature* 410, 1099–1103. <https://doi.org/10.1038/35074106>
- He, Y., Xiang, Z., Mobley, H.L.T., 2010. Vaxign: The First Web-Based Vaccine Design Program for Reverse Vaccinology and Applications for Vaccine Development. *BioMed Res. Int.* 2010, e297505. <https://doi.org/10.1155/2010/297505>
- Iriarte, M., Cornelis, G.R., 1998. YopT, a new *Yersinia* Yop effector protein, affects the cytoskeleton of host cells. *Mol. Microbiol.* 29, 915–929. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1998.00992.x>

- Janssen, W.A., Surgalla, M.J., 1968. Morphology, Physiology, and Serology of a Pasteurella Species Pathogenic for White Perch (*Roccus americanus*). J. Bacteriol. 96, 1606–1610. <https://doi.org/10.1128/jb.96.5.1606-1610.1968>
- Johansen, R., 2013. Farmed fish health report 2012.
- Jørgensen, J.B., 2014. The Innate Immune Response in Fish, in: Gudding, R., Lillehaug, A., Evensen, Ø. (Eds.), Fish Vaccination.
- Kim, Y.K., Shin, J.-S., Nahm, M.H., 2016. NOD-Like Receptors in Infection, Immunity, and Diseases. Yonsei Med. J. 57, 5–14. <https://doi.org/10.3349/ymj.2016.57.1.5>
- Klemm, P., Schembri, M.A., 2000. Bacterial adhesins: function and structure. Int. J. Med. Microbiol. 290, 27–35. [https://doi.org/10.1016/S1438-4221\(00\)80102-2](https://doi.org/10.1016/S1438-4221(00)80102-2)
- Legård, B.K., Strøm, S.B., 2020. Pasteurellosis in Atlantic salmon (*Salmo salar*) in Western Norway. Bull Eur Fish Pathol 40.
- Ma, J., Bruce, T.J., Jones, E.M., Cain, K.D., 2019. A Review of Fish Vaccine Development Strategies: Conventional Methods and Modern Biotechnological Approaches. Microorganisms 7, 569. <https://doi.org/10.3390/microorganisms7110569>
- Magnadóttir, B., 2006. Innate immunity of fish (overview). Fish Shellfish Immunol., Reviews in Fish Immunology 20, 137–151. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2004.09.006>
- Maiti, B., Dubey, S., Munang'andu, H.M., Karunasagar, Iddya, Karunasagar, Indrani, Evensen, Ø., 2020. Application of Outer Membrane Protein-Based Vaccines Against Major Bacterial Fish Pathogens in India. Front. Immunol. 11. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.01362>
- Mondal, H., Thomas, J., 2022. A review on the recent advances and application of vaccines against fish pathogens in aquaculture. Aquac. Int. 30, 1971–2000. <https://doi.org/10.1007/s10499-022-00884-w>
- Murphy, K., Weaver, C., 2017. Immunobiology: Janeway's 9th edition. Garland Science.
- Mutoloki, S., Jørgensen, J.B., Evensen, Ø., 2014. The Adaptive Immune Response in Fish, in: Gudding, R., Lillehaug, A., Evensen, Ø. (Eds.), Fish Vaccination.
- Ottesen, E., 2021. Immunrespons mot Pasteurella spp. hjå rognkjeks (*Cyclopterus lumpus* L.) og Atlantisk laks (*Salmo salar* L.). Masteroppgave, Universitetet i Bergen. <https://bora.uib.no/bora-xmlui/handle/11250/2759437>.
- Øverland, H.S., Pettersen, E.F., Rønneseth, A., Wergeland, H.I., 2010. Phagocytosis by B-cells and neutrophils in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) and Atlantic cod (*Gadus morhua* L.). Fish Shellfish Immunol. 28, 193–204. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2009.10.021>

- Pollard, A.J., Bijker, E.M., 2021. A guide to vaccinology: from basic principles to new developments. *Nat. Rev. Immunol.* 21, 83–100. <https://doi.org/10.1038/s41577-020-00479-7>
- Rappuoli, R., 2000. Reverse vaccinology. *Curr. Opin. Microbiol.* 3, 445–450. [https://doi.org/10.1016/S1369-5274\(00\)00119-3](https://doi.org/10.1016/S1369-5274(00)00119-3)
- Rebl, A., Goldammer, T., Seyfert, H.-M., 2010. Toll-like receptor signaling in bony fish. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 134, 139–150. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2009.09.021>
- Rehwinkel, J., Gack, M.U., 2020. RIG-I-like receptors: their regulation and roles in RNA sensing. *Nat. Rev. Immunol.* 20, 537–551. <https://doi.org/10.1038/s41577-020-0288-3>
- Sahoo, B.R., 2020. Structure of fish Toll-like receptors (TLR) and NOD-like receptors (NLR). *Int. J. Biol. Macromol.* 161, 1602–1617. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.07.293>
- Shao, F., Merritt, P.M., Bao, Z., Innes, R.W., Dixon, J.E., 2002. A Yersinia Effector and a Pseudomonas Avirulence Protein Define a Family of Cysteine Proteases Functioning in Bacterial Pathogenesis. *Cell* 109, 575–588. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(02\)00766-3](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(02)00766-3)
- Sharma, A.K., Dhasmana, N., Dubey, N., Kumar, N., Gangwal, A., Gupta, M., Singh, Y., 2017. Bacterial Virulence Factors: Secreted for Survival. *Indian J. Microbiol.* 57, 1–10. <https://doi.org/10.1007/s12088-016-0625-1>
- Skaar, H., 2023. Identification of immunogenic surface proteins of *Pasteurella atlantica* genomovar *salmonicida*. Masteroppgave, Universitetet i Bergen. <https://bora.uib.no/bora-xmlui/handle/11250/3071245>
- Snieszko, S.F., Bullock, G.L., Hollis, E., Boone, J.G., 1964. *PASTEURELLA* SP. FROM AN EPIZOOTIC OF WHITE PERCH (*ROCCUS AMERICANUS*) IN CHESAPEAKE BAY TIDEWATER AREAS. *J. Bacteriol.* 88, 1814–1815. <https://doi.org/10.1128/jb.88.6.1814-1815.1964>
- Sommerset, I., Krossøy, B., Biering, E., Frost, P., 2005. Vaccines for fish in aquaculture. *Expert Rev. Vaccines* 4, 89–101. <https://doi.org/10.1586/14760584.4.1.89>
- Sommerset, I., Wiik-Nilsen, J., Mordal, T., Silva de Oliveira, V.H., Svendsen, J.C., Haukaas, A., Brun, E., 2024. Fiskehelsesrapporten 2023.
- Thorarinsson, R., Ramstad, A., Wolf, J.C., Sindre, H., Skjerve, E., Rimstad, E., Evensen, Ø., Rodriguez, J.F., 2024. Effect of pancreas disease vaccines on infection levels and virus

- transmission in Atlantic salmon (*Salmo salar*) challenged with salmonid alphavirus, genotype 2. *Front. Immunol.* 15. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2024.1342816>
- Tsoi, S., Park, K.C., Kay, H.H., O'Brien, T.J., Podor, E., Sun, G., Douglas, S.E., Brown, L.L., Johnson, S.C., 2006. Identification of a transcript encoding a soluble form of toll-like receptor 5 (TLR5) in Atlantic salmon during *Aeromonas salmonicida* infection. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 109, 183–187.
<https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2005.05.013>
- Valheim, M., Håstein, T., Myhr, E., Speilberg, L., Ferguson, H.W., 2000. Varracalbmi: a new bacterial panophthalmitis in farmed Atlantic salmon, *Salmo salar* L. *J. Fish Dis.* 23, 61–70. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2761.2000.00209.x>
- Welch, T.J., LaPatra, S., 2016. *Yersinia ruckeri* lipopolysaccharide is necessary and sufficient for eliciting a protective immune response in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum). *Fish Shellfish Immunol.* 49, 420–426.
<https://doi.org/10.1016/j.fsi.2015.12.037>
- Zhang, T., Zhang, M., Xu, Z., He, Y., Zhao, X., Cheng, H., Chen, X., Xu, J., Ding, Z., 2023. The Screening of the Protective Antigens of *Aeromonas hydrophila* Using the Reverse Vaccinology Approach: Potential Candidates for Subunit Vaccine Development. *Vaccines* 11, 1266. <https://doi.org/10.3390/vaccines11071266>
- Zhong, B., Tien, P., Shu, H.-B., 2006. Innate immune responses: Crosstalk of signaling and regulation of gene transcription. *Virology* 352, 14–21.
<https://doi.org/10.1016/j.virol.2006.04.029>

7 – Appendiks

Oppskrifter på løsninger som er blitt brukt i oppgaven.

7.1 TSB-medium

1000 ml:

Tropic soy broth (TSB) – BD	30 g
Milli-Q® – Merck Millipore, model Milli-Q® Advantage A10® System	1000 ml

7.2 – Flytende vekstmedium (TSB+)

1000 ml:

Tropic soy broth (TSB) – BD	30 g
NaCl – Honeywell International	15 g
Fetalt kalveserum (FCS) – Gibco	105 g
Milli-Q® – Merck Millipore, model Milli-Q® Advantage A10® System	1000 ml

7.3 SOB-medium

950 ml:

Bacto™ Tryptone – Thermo Fisher	20 g
Bacto™ Yeast Extract – Thermo Fisher	5 g
NaCl – Honeywell International	0,5 g
Milli-Q® – Merck Millipore, model Milli-Q® Advantage A10® System	950 ml

7.4 SOC-medium

100 ml:

SOB-medium – Appendiks 7.3	98 ml
20 % glukose – Thermo Fisher	2 ml

7.5 10M NaOH

100 ml:

NaOH – Sigma-Aldrich	4 g
Milli-Q® – Merck Millipore, model Milli-Q® Advantage A10® System	100 ml totalt volum

7.6 LB-medium

1000 ml:

Bacto™ Tryptone – Thermo Fisher	20 g
Bacto™ Yeast Extract – Thermo Fisher	5 g

NaCl – Honeywell International	0,5 g
10M NaOH – Appendiks 7.5	7,0 pH
Milli-Q® – Merck Millipore, model Milli-Q® Advantage A10® System	1000 ml totalt volum

7.7 0,5M Tris-HCl

100 ml:

Tris base – Sigma-Aldrich	6 g
12M HCl – Sigma-Aldrich	6,8 pH
Milli-Q® – Merck Millipore, model Milli-Q® Advantage A10® System	100 ml totalt volum

7.8 – 10x TGS buffer

1000 ml:

Tris base – Sigma-Aldrich	30,3 g
Glycine – Sigma-Aldrich	144 g
Sodium dodecyl sulfate – Sigma-Aldrich	10 g
Milli-Q® – Merck Millipore, model Milli-Q® Advantage A10® System	1000 ml totalt volum

7.9 – 1x TGS buffer

1000 ml:

10x TGS buffer – Appendiks 7.8	100 ml
Milli-Q® – Merck Millipore, model Milli-Q® Advantage A10® System	900 ml

7.10 – 50x TAE buffer

1000 ml:

Tris base – Sigma-Aldrich	242 g
0,5 M EDTA – Life Technologies Corporation	100 ml
Acetic acid – Honeywell International	57,1 ml
Milli-Q® – Merck Millipore, model Milli-Q® Advantage A10® System	1000 ml totalt volum

7.11 – 1x TAE buffer

1000 ml:

50x TAE buffer – Appendiks 7.10	20 ml
Milli-Q® – Merck Millipore, model Milli-Q® Advantage A10® System	980 ml

7.12 4x Prøvebuffer for SDS-PAGE

600 ml:

0,5M Tris-HCl – Appendiks 7.7	5 ml
-------------------------------	------

Glycerol – Sigma-Aldrich	10 ml
Sodium dodecyl sulfate – Sigma-Aldrich	800 mg
0,5 % bromfenolblå – Merck	800 µl
β-mercaptoethanol – Sigma-Aldrich	2 ml
Milli-Q® – Merck Millipore, model Milli-Q® Advantage A10® System	14,2 ml

7.13 Prøvebuffer med DTT

250 µl:

4x prøvebuffer for SDS-PAGE – Appendiks 7.12	245 µl
Dithiothreitol (DTT) – Sigma-Aldrich	5 µl

7.14 1 % Agarosegel

40 ml:

1x TAE – Appendiks 7.11	40 ml
SeaKem® LE Agarose (agarosepulver) – Lonza	0,4 g
GelRed – Biotium	4 µl

7.15 5x loading buffer

40 ml:

Bromfenolblå – Merck	125 g
0,5M EDTA – Life Technologies Corporation	10 ml
Glyserol – Sigma-Aldrich	17,24 ml
Milli-Q® – Merck Millipore, model Milli-Q® Advantage A10® System	22,75 ml

7.16 Coomassiefargingsløsning

1000 ml:

Coomassie Brilliant Blue R-250 – Bio-Rad	1 g
Metanol – Honeywell International	300 ml
Acetic acid – Honeywell International	50 ml
Milli-Q® – Merck Millipore, model Milli-Q® Advantage A10® System	650 ml

7.17 Avfargingsløsning Coomassie

250 ml:

Metanol – Honeywell International	125 ml
Acetic acid – Honeywell International	25 ml
Milli-Q® – Merck Millipore, model Milli-Q® Advantage A10® System	100 ml

7.18 10x blottebuffer

250 ml:

Tris base – Sigma Aldrich	7,57 g
Glycin – Sigma Aldrich	36 g
Milli-Q® – Merck Millipore, model Milli-Q® Advantage A10® System	250 ml totalt volum

7.19 1x blottebuffer

1000 ml:

10x blottebuffer – Appendiks 7.18	100 ml
Metanol – Sigma Aldrich	200 ml
Milli-Q® – Merck Millipore, model Milli-Q® Advantage A10® System	700 ml

7.20 10x TBS-løsning

500 ml:

Tris base – Sigma Aldrich	12,11 g
NaCl – Honeywell International	146,1 g
5M HCl – Sigma-Aldrich	7,5 pH
Milli-Q® – Merck Millipore, model Milli-Q® Advantage A10® System	500 ml totalt volum

7.21 TBS-løsning

500 ml:

HCl 12M – Sigma Aldrich	14,61 g
Tris base – Sigma Aldrich	1,21 g
Milli-Q® – Merck Millipore, model Milli-Q® Advantage A10® System	500 ml totalt volum

7.22 TTBS-løsning

700 ml:

Tween-20 – Sigma-Aldrich	350 µl
TBS – Appendiks 7.21	700 ml

7.23 Blokkeringsbuffer

100 ml:

Tørrmelk – Sigma Aldrich	5 g
TBS – Appendiks 7.21	100 ml

7.24 Antistoffbuffer

200 ml:

Tørrmelk – Sigma-Aldrich	2 g
TTBS – Appendiks 7.22	200 ml

7.25 20x NPS

1000 ml:

Milli-Q® – Merck Millipore, model Milli-Q® Advantage A10® System	900 ml
(NH ₄) ₂ SO ₄ – Bio-Whittaker	66 g
KH ₂ PO ₄ – Fluka	136 g
Na ₂ HPO ₄ – Sigma-Aldrich	142 g
Tilsett i riktig rekkefølge	

7.26 50x 5052

200 ml:

Glyserol – Sigma-Aldrich	50 g
20 % glukose – Thermo Fisher	5 g
α-laktose – Sigma-Aldrich	20 g
Milli-Q® – Merck Millipore, model Milli-Q® Advantage A10® System	146 ml

7.27 ZY

1000 ml:

N-Z Case Plus – Sigma-Aldrich	20 g
Gjærekstrakt – Thermo Fisher	10 g
Milli-Q® – Merck Millipore, model Milli-Q® Advantage A10® System	925 ml

7.28 PA-0,5g-medium

50 ml:

1M MgSO ₄ – Sigma-Aldrich	50 µl
20x NPS – Appendiks 7.25	2,5 ml
40 % glukose – Sigma-Aldrich	0,625 ml
suH ₂ O – Thermo Fisher	46,1 ml
Ampicillin (100 mg/ml)	25 µl
Kloramfenikol (25 mg/ml)	50 µl

7.29 ZYP-5052-medium

1000 ml:

ZY – Appendiks 7.27	928 ml
1M MgSO ₄ – Sigma-Aldrich	1 ml
20x NPS – Appendiks 7.25	50 ml
Ampicillin (100 mg/ml)	0,5 ml
Kloramfenikol (25 mg/ml)	1 ml

7.30 Buffer A (vaksebuffer/lysisbuffer)

200 ml:

Tris base – Sigma-Aldrich	10 ml
5M NaCl – Honeywell International	20 ml
Glyserol – Sigma-Aldrich	46,5 ml
Milli-Q® – Merck Millipore, model Milli-Q® Advantage A10® System	123,5 ml

7.31 Buffer B (elueringsbuffer)

100 ml:

Tris base – Sigma-Aldrich	5 ml
Glyserol – Sigma-Aldrich	23,25 ml
5M NaCl – Honeywell International	10 ml
Milli-Q® – Merck Millipore, model Milli-Q® Advantage A10® System	61,75 ml
Imidazol – Sigma-Aldrich	3,4 g

7.32 Buffer C (8x Ni-buffer)

1000 ml:

NiSO ₄ 6H ₂ O	3,2M
-------------------------------------	------

7.33 Buffer D (strippebuffer)

10ml:

0,5 EDTA – Life Technologies Corporation	2 ml
NaCl – Honeywell International	1 ml
Tris base – Sigma-Aldrich	0,2 ml
Milli-Q® – Merck Millipore, model Milli-Q® Advantage A10® System	6,8 ml

7.34 Buffer A med 8M urea

200 ml:

Tris base – Sigma-Aldrich	10 ml
---------------------------	-------

5M NaCl – Honeywell International	20 ml
Glyserol – Sigma-Aldrich	46,5 ml
Milli-Q® – Merck Millipore, model Milli-Q® Advantage A10® System	123,5 ml
8M Urea – Merck	

7.35 Dialysebuffer

4000 ml:

1M Tris, pH 7,5	80 ml
86 % glyserol – Sigma-Aldrich	465 ml
NaCl – Honeywell International	23,38 g
Milli-Q® – Merck Millipore, model Milli-Q® Advantage A10® System	3455 ml

7.36 Dialysebuffer med urea

4000 ml:

1M Tris, pH 7,5	80 ml
86 % glyserol – Sigma-Aldrich	465 ml
NaCl – Honeywell International	23,38 g
Urea – Merck	961 g
Milli-Q® – Merck Millipore, model Milli-Q® Advantage A10® System	4000 ml totalt volum

7.37 1x Ni

20 ml:

suH2O – Thermo Fisher	17,5 ml
8x Ni-buffer – Appendix 7.32	2,5 ml

7.38 BSA-bruksløsning

300 µl:

BSA-stock – Bio-Rad	3 µl
Milli-Q® – Merck Millipore, model Milli-Q® Advantage A10® System	297 µl

7.39 5x Fortynnet fargeløsning

4,5 ml:

Fargekonsentrat – Bio-Rad	1 ml
Milli-Q® – Merck Millipore, model Milli-Q® Advantage A10® System	3,5 ml

7.40 BK-dyrkningsmedium

200 ml:

NEAA – Bio Whittaker	2 ml
Fetalt kalveserum – Bio Whittaker	10 ml
L-Glutamin – Bio Whittaker	2 ml
Gentamicin (50mg/ml) – Bio Whittaker	200 µl
HMEM – Bio Whittaker	200 ml totalt volum

7.41 PBS+E

500 ml:

EDTA – Titriplex® III	4,65 g
BSA – Sigma-Aldrich	5 g
PBS – Lonza™ BioWhittaker™	500 ml