

**Funksjonell analyse av *Lepeophtheirus salmonis*
labial gland apyrase 1 (LsLGAp1) og dets evne
til å indusere antistoffrespons i atlantisk laks
(*Salmo salar*) etter DNA-vaksinering**

Ine Rysjedal



Masteroppgave i fiskehelse – akvamedisin

Institutt for biovitenskap

Universitetet i Bergen

Juni 2024

© Ine Rysjedal

2024

Funksjonell analyse av *Lepeophtheirus salmonis* labial gland apyrase 1 (LsLGAp1) og dets evne til å indusere antistoffrespons i atlantisk laks (*Salmo salar*) etter DNA-vaksinering.

Universitetet i Bergen, 2024

Forord

Denne masteroppgaven er en del av FHF-prosjektet (901760): DNA-vaksine rettet mot lakseluspytt (SaliVax). Studien ble utført i samarbeid med Sea Lice Research Center (SLRC) og Institutt for biovitenskap ved Universitetet i Bergen

Jeg vil først og fremst takke min hovedveileder Aina-Cathrine Øvergård for at jeg fikk ta del i et så spennende prosjekt, samt mye god hjelp og støtte gjennom masteren. Jeg vil også gjerne takke mine medveiledere Helena Marie Doherty Midtbø, for god veiledning til både masteren og livet, og Andreas Borchel, for mye god hjelp. En stor takk til Heidi Kongshaug, Christiane Trösse og Pavinee Nimmongkol for god opplæring, oppfølging og hjelp på laboratorier. Jeg vil også takke Patrick Alexander Nelson for all hjelp under vaksineringsprøveuttak og for å alltid være behjelpelig på mine mange spørsmål. Ellers vil jeg takke Per Gunnar Espedal for hjelp til å gjennomføre vaksineforsøk og prøvetaking, samt gjengen på lusesenteret, som alle stiller opp dersom det skulle være noe.

Jeg også takke klassen min for fem fine år sammen, for en god gjeng vi er. En ekstra takk til jentene i klassen for en nydelig mastertur, gjengen på lesesalen for en rekke faglige og mindre faglige samtaler og gode ispauser, og til slutt min partner in crime på lesesal Lea Hobæk Hovland, dere er alle fantastiske. Jeg vil også takke «lusejentene» på salivax-prosjektet, som har gjort lange dager på lab og lesesal litt lettere. Til slutt vil jeg takke min kjære samboer som har stilt med middag og gjennomlesning av gjennom innspurten på masteren.

Bergen 3. juni 2024

Ine Rysjedal

Sammendrag

Lakselus (*Lepeophtheirus salmonis*) er en marin ektoparasitt som beiter på hud, slim og blod hos vill- og oppdrettet laksefisk, og utgjør en av de største hindringene for videre vekst av oppdrettsnæringen. I tillegg til medfølgende økonomiske konsekvenser av lakselus fører lusen til en rekke lakselusbehandlinger, og økt dødelighet for laksen. Ikke-medikamentelle behandlinger mot lakselus er en av de viktigste årsakene til redusert fiskevelferd i næringen. Det er derfor behov for nye metoder for å kontrollere og bekjempe lakselus, slik som effektive vaksiner. Kartlegging av vertsparasittinteraksjonen mellom lakselus og laksefisker har vært essensielt for utvikling av bekjempelsesmetoder mot lakselus, og forskning indikerer at lakselusen har en immunmodulerende effekt på laksen. Flere spyttkjertelproteiner med immunmodulerende egenskaper har blitt identifisert, noe som har vist betydelig potensial som vaksineantigen. Ett av spyttkjertelproteinene fra lakselus kalt *Lepeophtheirus salmonis* labial gland apyrase 1 (LsLGAp1) er tenkt å ha slike immunmodulerende egenskaper, og er foreslått å hydrolysere nukleotidene ATP eller AMP, uten at dette er bekreftet. Å benytte et slikt spyttkjertelprotein i en DNA-vaksine gir også mulighet for å produsere vaksiner effektivt og billig. Videre kan vaksiner modifiseres for å stimulere en humoral immunrespons, som resulterer i utskillelse av antigenspesifikke antistoffer mot LsLGAp1.

I denne studien ble LsLGAp1 sin evne til å hydrolysere ATP eller AMP evaluert. En villtype LsLGAp1 og et mutert LsLGAp1 (LsLGAp Δ), hvor det aktive setet til LsLGAp1 ble mutert, ble også benyttet i en DNA-vaksine mot lakselussytt med adjuvans og påfølgende elektroporering. Målet var å kartlegge LsLGAp1 sin evne til å hydrolysere nukleotider, i tillegg til å vurdere apyrasens immunogenisitet gjennom et vaksineforsøk. Målinger gjort for å vurdere LsLGAp1 sin evne til å hydrolysere ATP eller AMP viste at ingen av nukleotidene ble hydrolysert. LsLGAp1 sin evne til å hydrolysere ATP, AMP eller andre nukleotider kan imidlertid ikke utelukkes. Måling av genuttrykk i muskulatur ved injeksjonsstedet etter to- og åtte uker etter vaksinerings viste at antigenet ble uttrykt i begge vaksinegruppene. Ved målt antistoffproduksjon åtte uker etter vaksinerings ble det derimot ikke vist noe antistoffrespons mot LsLGAp1 og LsLGAp Δ . Manglende hydrolysering av nukleotider og antistoffrespons mot LsLGAp1 er derimot tenkt at forekommer som et resultat av at et forurenset rekombinant LsLGAp1 ble brukt for å detektere eventuell hydrolysering, samt som coating i ELISA for måling av antistoffrespons. Videre forskning kreves derfor for å undersøke LsLGAp1 sin evne til å hydrolysere ATP eller AMP eller andre eventuelle nukleotider, samt undersøke om å benytte et annet eller renere rekombinant LsLGAp1 vil kunne gi reelle og høyere antistoffresponser.

Forkortelser

ADP:	Adenosindifosfat
AMP:	Adenosinmonofosfat
APC:	Profesjonelle antigenpresenterende celler
Apyrasebuffer:	Apyrase Reaction Buffer
AsEF1:	Atlantic salmon elongeringsfaktor 1
ATP:	Adenosintrifosfat
CD4:	Cluster of differentiation 4
CD8:	Cluster of differentiation 8
cDNA:	Komplementær DNA
CT-verdi:	Terskel-syklusverdi
CTL:	Cytotoksiske T-lymfocytter
DAMP	Fare-assosiert molekylært mønster
DNA:	Deoksyribonukleinsyre
Dnase:	Deoxyribonuclease
eATP	Ekstracellulært ATP
<i>E. coli:</i>	<i>Escherichia coli</i>
ELISA:	Enzyme-linked immunosorbent assay
Ig:	Immunoglobulin
IgA:	Immunoglobulin A
IgD:	Immunoglobulin D
IgM:	Immunoglobulin M
IgT:	Immunoglobulin T
IL:	Interleukin
IM:	Intramuskulært
K-Faktor:	Kondisjonsfaktor
LB:	Lysogen buljong
<i>L. salmonis</i>	<i>Lepeoptheierus salmonis</i>
LsLGAp1:	<i>Lepeoptheierus salmonis</i> labial gland apyrase 1
LsLGApA:	<i>Lepeoptheierus salmonis</i> labial gland apyrase mutant
LsLGP 1:	<i>Lepeoptheirus salmonis</i> labial gland protein 1
LsLGP 2:	<i>Lepeoptheirus salmonis</i> labial gland protein 2
LsLGP 3:	<i>Lepeoptheirus salmonis</i> labial gland protein 3

LsLGP 4:	<i>Lepeoptheirus salmonis</i> labial gland protein 4
LsLGP1L:	<i>Lepeoptheirus salmonis</i> labial gland protein 1 - like
MALT:	Mukosa-assosiert lymfoid vev
MHC:	Major Histocompatibility Complex
mRNA:	Messenger RNA
my32-Ls	<i>my32-Lepeoptheirus salmonis</i>
NTC:	None-template kontroll
OD:	Optisk tetthet
PAMP:	Pathogen associated molecular pattern
PBS:	Phosphate buffered saline
PCR:	Polymerasekjedereaksjon
pDNA:	plasmid-DNA
RekAp1:	Rekombinant LsLGAp1 produsert i Sf9 insektsceller
Rlu:	Relative lysenheter
RNA:	Ribonucleic acid
ROS	Reaktive oksygenforbindelser
-RT-kontroll:	Reverse transkriptase kontroll
SOC:	Superoptimal buljong med katabolittundertrykkelse
Teg 1:	Tegumental kjertel 1
Teg 2:	Tegumental kjertel 2
Teg 3:	Tegumental kjertel 3
TLRC5:	Toll-lignende reseptor 5

Innholdsfortegnelse

1.0 Introduksjon.....	1
Lakselus i norsk oppdrett	1
Lakselusens livssyklus	1
Lakselusens patogenese.....	3
Profylakse og behandling mot lakselus	4
Vaksiner mot lakselus.....	6
DNA- vaksiner.....	7
Immunresponser og adjuvans ved DNA-vaksine.....	9
Lakselusindusert immunrespons og immunmodulering.....	10
Spyttkjertelproteiner.....	11
Apyraser og LsLGAp1	11
Formål med studien	14
2.0 Material og metode	15
Funksjonelle analyser med LsLGAp1 <i>in vitro</i>	15
2.1 Deteksjon av hydrolysering av ATP med luminiscens	15
2.2 Deteksjon av hydrolysering av AMP med kolorimetri	16
<i>In vivo</i> vaksineforsøk med LsLGAp1	16
2.3 Produksjon av DNA-vaksine mot LsLGAp1	16
2.3.1 Plasmidtransformasjon og bakteriedyrking.....	16
2.3.2 DNA-isolering.....	17
2.4 Eksperimentelle dyreforsøk	17
2.4.1 Vaksinerings.....	17
2.4.2. Injeksjon og elektroporering	19
2.4.3 Prøveuttak	19
2.5 Kondisjonsfaktor (K-faktor)	20
2.6 Analyse av prøver.....	21
2.6.1 RNA-isolering.....	21
2.6.2 DNase behandling	21
2.6.3 cDNA-syntese	21
2.6.4 Sanntids PCR	22
2.6.5 ELISA.....	23
2.6.6 Histologi	24
3.0 Resultat.....	25
Funksjonelle analyser med LsLGAp1 <i>in vitro</i>	25

3.1 Deteksjon av hydrolysering av ATP med luminiscens	25
3.2 Deteksjon av hydrolysering av AMP med kolorimetri	27
<i>In vivo</i> vaksineforsøk med LsLGAp1	29
3.3 K-faktor	29
3.4 Genuttrykk av LsLGAp1 i muskel	31
3.5 Måling av spesifikke anti-LsLGAp1 i plasma	34
3.6 Histologi	36
4.0 Diskusjon.....	39
4.1 Substratspesifisitet hos LsLGAp1	39
4.2 Kondisjon ved vaksinerings mot LsLGAp1	42
4.3 Genuttrykk av LsLGAp1	43
4.4 Antistoffrespons mot LsLGAp1	44
4.5 Histologiske immunresponser.....	46
4.6 Immunogenisitet med flagellin	47
4.7 Etske vurderinger knyttet til vaksineforsøk med fisk.....	48
5.0 Videre arbeid.....	49
6.0 Konklusjon	51
7.0 Referanser.....	52
8.0 Vedlegg.....	62
8.1 Apyrase Reaction Buffer.....	62
8.2 Rekombinant LsLGAp1 (rekAp1)	62

1.0 Introduksjon

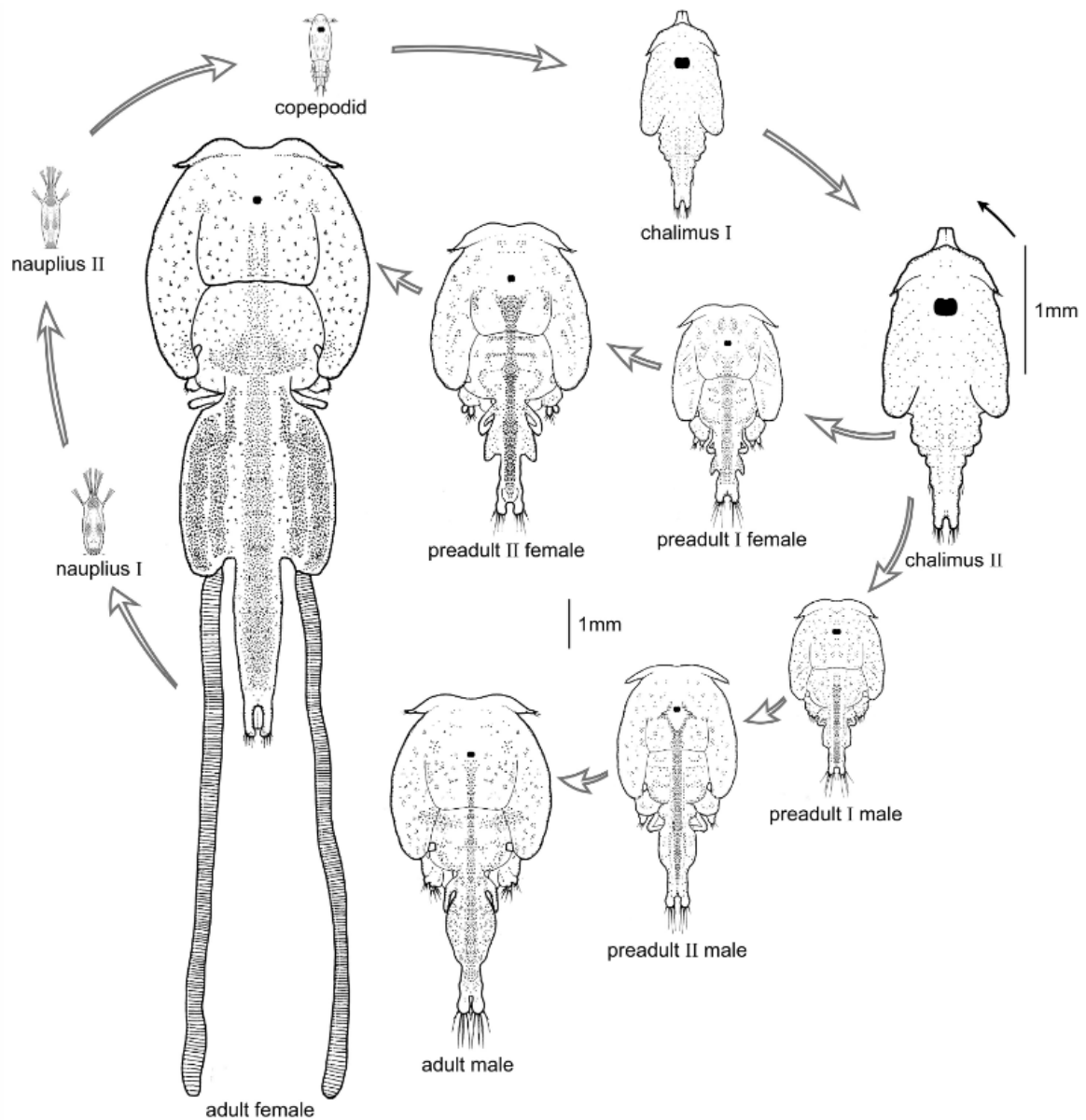
Lakselus i norsk oppdrett

Siden slutten av 1960-tallet har oppdretten av atlantisk laks (*Salmo salar*) i Norge økt enormt, noe som i dag blir hyllet som en suksesshistorie i landet (Hersoug, 2021). Norge står i dag for over halvparten av verdens samlet produksjon av atlantisk laks, med en produksjon på 1,2 millioner tonn laks som tilsvarer en verdi på 122,5 milliarder kroner i 2023 (Norges Sjømatråd, 2024). Den økende lakseproduksjonen har imidlertid ført til bærekrafts- og velferdsutfordringer. Intensiv lakseoppdrett fremmer parasittvekst og spredning av patogener, noe som skaper problemer for oppdrettsnæringen, og under visse forhold vill laksefisk (Torrissen et al., 2013). En spesielt problematisk parasitt er ektoparasitten lakselus (*Lepeophtheirus salmonis*) som utnytter den høye tettheten av oppdrettet laksefisk til å øke sin egen populasjon, noe som påvirker både oppdrettet og vill laksefisk negativt (Sommerset et al., 2024). Atlantisk laks er svært mottakelig for lakselus og ved infeksjon av lus har laksen begrenset evne til å kvitte seg med parasitten (Swain et al., 2020). Lakselus livnærer seg på blod, slim og hud hos verten, som kan gi erosjon og åpne sår (Kabata, 1974). Dette kan forstyrre den osmotiske balansen hos smolt og post-smolt (Grimnes and Jakobsen, 1996) samt lette inntreden av andre patogener, i tillegg til å indusere stress som indirekte kan øke mottakeligheten for andre patogener (Barker et al., 2019). Infeksjon med den lakselus representerer derfor en av de viktigste begrensningene for bærekraftig oppdrett av atlantisk laks. I tillegg har lakselus negative innvirkninger på helse og velferd på verten (Grimnes and Jakobsen, 1996), samt økonomiske konsekvenser for oppdretterne (Johny et al., 2024).

Lakselusens livssyklus

Livssyklusen til lakselus består av åtte utviklingsstadier som skilles av skallskifte (figur 1.1) (Hamre et al., 2013; Johnson and Albright, 1991). De to første stadiene er de planktoniske nauplii-stadiene I og II hvor lusen er frittlevende. Videre kommer kopepodittstadiet som er den første parasittiske fasen, hvor lusen kan detektere verter og feste seg til vertens epidermis (Bron et al., 1991). Dette gjør den ved hjelp av andre antenne og maxillipedene, og etter hvert fester den seg via et frontalfilament for å gjennomgå skallskifte og vokser gjennom chalimus I og II (Hamre et al., 2013; Johnson and Albright, 1991). Etter chalimus II vil lusen gå over i det første bevegelige preadult stadiet, preadult I, hvor lusen ikke lengre er permanent festet til verten via frontalfilamentet, men vil feste seg med frontalfilamentet kun når lusen er under skallskifte. De

preadulte og adulte lusene er mobile og fester seg til verten ved bruk av andre antenne, i tillegg til et vakuum skapt under forkroppen (cephalothorax). Denne mobiliteten gir lusen muligheten til å bevege seg fritt rundt på og mellom verter for å pare seg (Johnson and Albright, 1991).

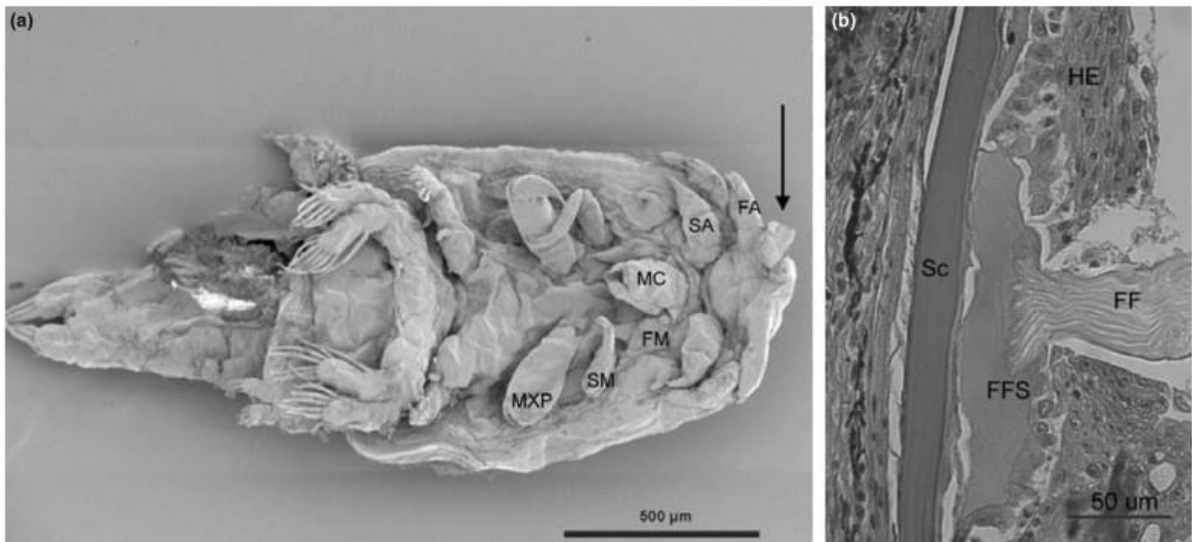


Figur 1.1: Lakselusens livssyklus med åtte livsstadier som skilles av skallskifte. På de tre siste stadiene er det tydelige forskjeller mellom hunnlus («female») og hannlus («male»). «Life cycle of the salmon louse (*Lepeophtheirus salmonis*)» (Sea Lice Research Centre, 2023).

Livssyklusen til lakselus er svært temperaturavhengig og kan ta så lite som 13 dager ved 21°C fra kopepoditt til adult, mens det ved 6°C kan ta så mye som 72 dager (Hamre et al., 2019). Lakselusen har et betydelig reproduksjonspotensial, og antall egg som forekommer i eggstrengene til hunnlusen varierer gjennom hele året, og baseres hovedsakelig på temperatur og salinitet. En hunnlus har eggstrenger som kan produsere opptil 1000 egg, som vil bli befruktet av en eller flere hannlus (Costello, 2006). I tidligere studier er det vist stor variasjon på hvor raskt eggene klekkes og at temperatur spiller en viktig rolle (Hamre et al., 2019). For eksempel vil eggene klekke 4,2 ganger raskere med en temperatur på 18 °C enn ved 6 °C.

Lakselusens patogenese

Huden til teleoster er dens ytre beskyttelse og er delt i tre lag: epidermis, dermis og hypodermis. Epidermis er det ytterste laget i huden og består av levende celler, og dermis ligger under epidermis med blant annet nerver, blodkar og skjell (Kryvi og Poppe, 2021). Kopepoditten er det første smittsomme stadiet til lus, og kan påføre noe skade på epidermis til verten (Mustafa et al., 2000). I den innledende festefasen av stadiet graver lusene de krokformede antennene sine (figur 1.2) inn i epidermis på fisken (Bron et al., 1991; Johnson and Albright, 1992). I tillegg kan epidermal erosjon forekomme av beiteskader fra lus i de fastsittende lusestadiene, som kan føre til sårdannelser i epidermis (Dalvin et al., 2020). Senere kan dermale sår (ulcerasjoner) oppstå under marginalmembranen fra mobile lus. De mobile lusene vil da bryte seg gjennom den epidermale basalmembranen, noe som fører til sårdannelser med blødninger i dermis, og det er da lusene spiser blod (Heggland et al., 2020). Marginalmembranen hos preadulte og adulte lakselus kan også gi et ovalt avtrykk på vertens hud, i tillegg til at den kan kile seg under skjellene på verten.



Figur 1.2: *Lepeophtheirus salmonis chalimus*. (a) ventral overflate med en pil som indikerer frontal-filamentet. (b) frontalfilamentsekresjon som fester chalimus til verten. Forkortelser: FA, første antenne; FF, frontalfilament; FFS, frontalfilamentsekret; FM, første maxilla; HE, vertsepidermis; MC, munnkjegle; MXP, maxilliped; SA, andre antenne; Sc, skjell; SM, andre maxilla. Bilde er hentet fra *Physiology and immunology of Lepeophtheirus salmonis infections of salmonids* (Wagner et al., 2008).

Generelle patologiske forandringer rundt beite- og festeområde inkluderer ødem, lett hyperplasi og cellulær betennelse. Ved grove lesjoner oppstår alvorlig skade på vertens epidermis med skjelltap og blødninger som vanlige trekk. De mest åpenbare endringene er assosiert med munntebulen til lusen, marginalmembranen, den andre antennen, maxilliped og sternal furca. Infeksjon av lakselus kan også hindre tilvekst av fisken, føre til elektrolyttforstyrrelser og trigge stressresponser og osmotisk ubalanse hos smolt og post-smolt (Grimnes and Jakobsen, 1996; Mustafa et al., 2000). Høye infeksjonsintensiteter, (>30 lakseluslarver per fisk) ser også ut til å kunne forårsake død av post-smolt like etter at lusen har nådd sitt preadult stadie (Bui et al., 2024; Grimnes and Jakobsen, 1996). Det er derfor viktig å holde lusetallene i oppdrettsnæringen nede for å redusere lusepresset for oppdrettet- og ville laksepopulasjoner.

Profylakse og behandling mot lakselus

For å regulere produksjonen av laksefisk i havbruksnæringen benyttes trafikklyssystemet gjennom produksjonsområdeforskriften (lov av 25.01.17). Produksjonsområdene får farger ut ifra hvordan lakselusen påvirker vill laksefisk i området (Produksjonsområdeforskriften - Lovdata, 2017). Trafikklyssystemet avgjør om oppdretterne får tillatelse til å vokse (grønn), opprettholde eksisterende produksjonskapasitet (gul) eller redusere kapasiteten (rød). For å redusere forekomsten av lus slik at skadevirkningene på oppdrettet- og vill laksefisk minimeres

er luseforskriften gjeldende (Luseforskriften - Lovdata, 2011). Luseforskriften setter krav til ukentlig telling av lus, i tillegg til at oppdrettsanlegg fra Nord-Trøndelag og sørover har krav til behandling av lakselus ved påvisning av gjennomsnittlig mer enn 0,5 (uke 22-uke 15) og 0,2 (uke 16-uke 21) kjønnsmodne hunnlus. Ved behandling av laks mot lakselus kan medikamentell eller ikke-medikamentell behandling benyttes (Sommerset et al., 2024).

Tradisjonelt har tiltak mot lakselus vært bruk av legemidler (kjemoterapeutika) som brukes som medisinsk behandling mot lakselus for å minimalisere produksjonen av nye parasitter som kan spres til vill laksefisk (Sommerset et al., 2024). Bruken av kjemoterapeutika har gått kraftig ned etter 2015 som et resultat av at lusen har utviklet utbredt resistens mot flertallet av disse (Aaen et al., 2015; Overton et al., 2019). Det er også utbredt motstand mot disse medikamentene på grunn av miljøpåvirkning og forurensning (Aaen et al., 2015). Økning i resistens har ført til en økning i bruken av ikke-medikamentelle behandlingsmetoder og bruk av rensfisk (Sommerset et al., 2024). Ikke-medikamentelle metoder har hovedsakelig tre prinsipper; termisk (varmtvann), mekaniske (ulike vannspylere, og børster) og bruk av ferskvann. Det er også i økende grad vanlig å kombinere to prinsipper, i noen tilfeller benyttes også trippelmetoder. En fellesnevner for ikke-medikamentelle behandlinger er at de er håndteringskrevende og utgjør en stor velferdsrisiko. Fisken blir utsatt for mye stress tilknyttet håndtering og behandling, i tillegg til at det forekommer risiko for mekaniske skader på gjeller, finner, øyne, hud, m.m. Dette øker også risiko for sekundærinfeksjoner (Thorstad et al., 2015) og fører til utfordringer med produksjonskostnader (Costello, 2009). Det etiske aspektet ved bruk av rensfisk og økt dødelighet knyttet til behandling har ført til et stort og umiddelbart behov for nye bekjempelsestiltak, slik som vaksiner, funksjonelt fôr og fremavl av fisk som er resistent mot lus. Spesielt viktig er forebyggende metoder og vaksineutvikling, da det har potensialet til å redusere behovet for håndtering og avlusning og dermed forbedre fiskevelferd. I tillegg vil en vaksine mot lakselus øke produktivitet og bærekraft, samt være mindre belastende på miljøet tilknyttet oppdrettsanleggene i luseutsatte lakseoppdrettsregioner.

Vaksiner mot lakselus

Vaksiner mot bakterier og virus er svært utbredt i fiskeoppdrett, og i Norge er antibiotika nesten utelukkende erstattet av multikomponente oljebaserte injeksjonsvaksiner (Brudeseth et al., 2013). Det finnes ingen kommersielle vaksiner mot lakselus på markedet i dag, men en vaksine mot lakselus har potensiale til å være et kostnadseffektivt middel for å kontrollere infeksjonen av lakselus og unngå mange av ulempene knyttet til behandlinger. Til tross for at slike vaksiner er forsket på lenge er det fortsatt i en startfase og tilnærminger som er brukt så langt har hatt liten eller ingen suksess (Swain et al., 2020). Utvikling av vaksiner mot ektoparasitter er teknisk utfordrende, da de er langt mer komplekse enn bakterier og virus (Murray, 1989). De fleste strategier for vaksiner mot lakselus har tatt i bruk metoder som brukes for vaksiner mot andre ektoparasitter, slik som flått (Raynard et al., 2002). Storfeflått (*Rhipicephalus microplus*) som er en parasitt på storfe er den eneste ektoparasitten som det i dag finnes en effektiv vaksine mot (Stutzer et al., 2018). I motsetning til flått som spiser blod av verten gjennom hele livssyklusen (Parola and Raoult, 2001), spiser lakselus bare blod i dens mobile stadier (Heggland et al., 2020). Det er derfor nødvendig å utvikle en vaksine som også gir tilstrekkelig nivåer av antistoffer ut i slim, og ikke bare i blodet.

Tidligere studier på vaksiner mot lakselus har brukt både intracellulære og ekstracellulære lakselusprotein som antigen, i kombinasjon med oljeadjuvans som har blitt injisert intraperitonealt (Contreras et al., 2020). Det er kun én delvis effektiv vaksine mot lus på laksefisk i dag (*Caligus rogercresseyi*: Providean Aquatec Sea Lice, Tecnovax) (Barrett et al., 2020). I 2011 identifiserte Carpio et al. et nytt gen (betegnet som my32) fra *Caligus rogercresseyi* som har den høyeste identiteten med lakselusens akirin-2 gen (Carpio et al., 2011). Akiriner er proteiner som påvirker medfødte immunresponsgener hos virveldyr og virvelløse dyr, og er godt karakteriserte antigen (Goto et al., 2008; Macqueen and Johnston, 2009). Ved å benytte det rekombinante my32-proteinet i et vaksine- og smitteforsøk ble det vist 57% reduksjon i påslag av *C. rogercresseyi* 24 dager etter smitte for den vaksinerte gruppen (Carpio et al., 2011). Det ble også observert en forsinkelse i parasittens utvikling, noe som tyder på at den viktigste effekten av immunisering var på den andre generasjonen av lusen. Resultatene i forsøket antyder at my32-proteinet kunne være et lovende mål for vaksineutvikling også for lakselus. I 2013 ble derfor my32-proteinet også karakterisert i lakselus (my32-Ls), og forsøk med my32-Ls-proteinet fra lakselus i vaksine- og smitteforsøk på tilapia viste en signifikant antistoffrespons (Carpio et al., 2013). Carpio et al. hentydet at my32-proteinet kan brukes som

et antigen i vaksine til laks mot lakselus, og at administrering av boosterdose kan være nyttig for å forbedre antistoffresponsen.

Contreras et al. (2020) gjennomført en studie der fire kandidater av lakselusantigener fra tarmen ble identifisert (Contreras et al., 2020). Uttesting av antigenene i et vaksineforsøk viste at to av antigenene førte til reduksjon av infeksjon med lakselus i vaksinert fisk ved å redusere antall kjønnsmodne hunner og chalimus II. Den observerte vaksineeffektiviteten var derimot moderat for antigenene, sannsynligvis på grensen eller under det som er akseptabelt for kommersielt bruk. Vaksinasjon gir mange fordeler i forhold til administrering av medisiner mot lakselusen, slik som at en vaksine verken vil etterlate gjenværende medisiner i fisken eller føre til utslipp av medisiner i miljøet (Raynard et al., 2002). En annen fordel er at det er usannsynlig at resistens vil utvikle seg, og dersom det oppstår, kan det motvirkes gjennom modifikasjon eller inkludering av nye antigene komponenter. Kostnaden for vaksinasjon vil også være relativt lav dersom antigener kan uttrykkes ved bruk av DNA-vaksiner.

DNA- vaksiner

Nukleinsyrebaserte vaksiner er en relativt ny teknologi, hvor genetisk materiale blir brukt for å stimulere celler til å produsere et spesifikt protein, og på den måten indusere en immunrespons. Det finnes to kommersielle DNA-vaksiner som er godkjent til bruk på fisk på markedet i dag: Apex-IHN[®] (Aqua Health Ltd.) mot infeksjøs hematopoetisk nekrosevirus (IHNV) (Salonius et al., 2007) og CLYNAV (Elanco) mot salmonid alfavirus (SAV) i atlantisk laks (Authority (EFSA) et al., 2017).

DNA-vaksiner er basert på injeksjon av plasmid med antigen hvor antigenet blir tatt opp og uttrykt av muskelceller (Tonheim et al., 2008). Antigenet fra plasmidet transkribes til mRNA (messenger RNA) og translateres deretter til protein ved hjelp av cellens eget maskineri. Det produserte antigenet kan sekreseres fra cellen og fanges opp av antigenpresenterende celler (APC), slik som makrofager, dendrittiske celler og B-celler. Disse cellene binder antigenet via den eksogene veien og presenterer det på overflaten gjennom major histocompatibility complex (MHC) klasse-II-molekyler. Når antigenet er bundet til MHC-klasse-II, kan T-hjelpecellene Th1 og Th2 aktiveres. Th1 vil da skille ut cytokiner, som IFN- γ og TNF, som vil indusere betennelse og cellemidert immunrespons, mens Th2 skiller ut cytokiner, som interleukin-4 og -5 (IL-4 og IL-5), som hjelper B-celler til å profilere og differensiere, og induserer humorale immunresponser (Constant and Bottomly, 1997). Den endogene veien kan aktiveres dersom

antigenet ikke har signalpeptid og blir uttrykt inne i muskelcellene (Tonheim et al., 2008). Disse cellene kan transkribere mRNA og translaterer antigenet, som så uttrykkes på celleoverflaten via MHC-klasse-I-molekyler. Bindingen av MHC-klasse-I molekyler aktiverer cytotoksiske T-celler gjennom interaksjon med cluster of differentiation (CD)8⁺ T-hjelpeceller. Dendritiske celler har evnen til krysspresentasjon, hvor de kan presentere antigener fra den eksogene veien på MHC-klasse-I-molekyler (Joffre et al., 2012). Samtidig kan B-celler gjenkjenne antigener direkte gjennom deres B-celle-reseptorer (Banchereau and Steinman, 1998). På denne måten aktiverer DNA-vaksiner både den eksogene og endogene immunresponsen (Tonheim et al., 2008). Dette fører til aktivering av B-celler og produksjon av antistoffer, og cellemediert respons med aktivering av Th1-celler som kan skille ut pro-inflammatoriske cytokiner og cytotoksiske T-celler. For å få dannet antigen-spesifikke antistoffer må proteinet imidlertid bli sektrert ut av cellene, slik at hovedsakelig MHC-klasse-II blir aktivert. For å gjøre dette kan det et signalpeptid tilhørende proteinet inkluderes (Wang et al., 2011).

For å danne en DNA-vaksine blir genet som koder for antigenet av interesse satt inn i et plasmid under kontroll av en egnet eukaryot promotor (Cui, 2005). Et plasmid-DNA (pDNA) brukes ofte som en bærer for genlevering til både pattedyr og fisk. pDNA er et sirkulært molekyl som består av dobbelttrådet DNA som vanligvis er i stand til å replikere autonomt i prokaryoter (Tonheim et al., 2008). pcDNA 3.1⁽⁺⁾ er en godt egnet vektor da den har et stabilt og forbigående uttrykk i pattedyrverter. Vektoren har ampisillin-resistent gen for seleksjon i *E. coli* og en meget effektive cytomegalovirus (CMV) promotor. I tillegg har vektoren det bovine veksthormon-polyadenylerings-signalet (BHG-PolyA) som er en spesialisert terminerings-sekvens for proteinekspresjon i eukaryote celler (invitrogen, 2010).

En av de unike egenskapene til DNA-vaksiner er dermed deres evne til å stimulere både cellulære og humorale immunresponser (Weiner and Kennedy, 1999). I tillegg er DNA-vaksiner lette å manipulere, enkle og raske å konstruere og svært stabile (Liu, 2011). Konstruksjonene kan lages uten å måtte jobbe med levende patogen, da genene som koder for antigenene kan konstrueres kjemisk i stedet for at de må utledes fra den levende virulente organismen. Konstruktene kan også enkelt lages for å kode for proteiner med modifikasjoner eller mutasjoner for å endre funksjoner eller immunologiske og skadelige egenskaper ved proteinet.

Immunresponser og adjuvans ved DNA-vaksine

Utilstrekkelig immunogenisitet er en utfordring for praktisk bruk av DNA-vaksine (Li and Petrovsky, 2016). På grunn av den relativt lave effekten av DNA-vaksine for å indusere immunresponser, kan det være lurt å benytte seg av en adjuvans (Scheerlinck, 2001). Flagellin er et kuleformet protein som danner filamentet i bakterielle flageller og finnes i store mengder i nesten alle bakterier med flageller (Berg and Anderson, 1973; Fedorov and Kostyukova, 1984). Ved å benytte flagellin som en adjuvans kan man aktivere både det medfødte og det adaptive immunsystemet, da det medfødte immunsystemet gjenkjenner det som et patogen-assosiert molekylært mønster (PAMP) gjennom toll-lignende reseptor 5 (TLR5) (Cui et al., 2018; Honko and Mizel, 2005). Binding av flagellin til det ekstracellulære domenet til TLR5 induserer raskt en signalkaskade som stimulerer produksjonen av proinflammatoriske mediatorer som cytokiner, kjemokiner og kostimulatoriske molekyler, samt dendritiske celler, som dermed kobler medfødt og adaptiv immunitet. De strukturelle egenskapene til flagellin gir også effektiv og fleksibel adjuvansaktivitet. I tillegg er elektroporering av DNA-vaksiner en effektiv metode for å øke uttrykket i muskelvev som fører til markant forbedring av immunresponser, uten at det ser ut til å være et problem for dyrene (Widera et al., 2000). Ved elektroporering benyttes elektriske impulser som er funnet å øke opptaket av pDNA til celler (Aihara and Miyazaki, 1998). En studie gjort for å teste elektroporering ved injisering av DNA-vaksine av lakseparr viste at injeksjon med påfølgende elektroporering førte til en relativt høy antistoffrespons hos noen individer, som kan tyde på at elektroporering kan føre til økt immunogenisitet av en DNA-vaksine (Skiftesvik Høyvik, 2024).

For å lage en DNA-vaksine mot lakselus som beiter på hud og slim hos laksen må antistoffene mot lusen ut i slimet. Det er i slimet laksen har medfødte og adaptive immunresponser assosiert med slimhinneoverflater (Salinas, 2015). Slimhinne-assosierte lymfoide vev (MALT) hos teleoster inkluderer diffuse B- og T-celler, med spesifikke fenotyper som har utviklet seg sammen for å forsvare det mikroberike slimhinnemiljøet. Når et faresignal registreres i slimhinnebarrierene hos fisk, utløses en umiddelbar medfødt immunrespons. Dette første signalet er avgjørende for senere etablering av spesifikk adaptiv immunitet (Salinas, 2015), hvor B- og T-lymfocytter danner et dynamisk nettverk for induksjon og regulering av sekretotiske antistoffer og cytotoxiske T-lymfocytter (CTL) responser ved slimhinnebarrierene (Kunisawa og Kiyono, 2005).

Lakselusindusert immunrespons og immunmodulering

Immunmodulerende faktorer fra lakselus er antatt å være lovende vaksinekandidater (Raynard et al., 2002), og å benytte immunmodulerende spyttkjertelproteiner fra lakselus som antigen i en DNA-vaksine vil kunne ha et stort potensial (Øvergård et al., 2022). Ved infeksjon av lakselus oppstår en beskjeden, men tidlig immunrespons hos atlantisk laks, som kommer med en økning av hovedsakelig medfødte immuntranskripsjoner med responsen primært lokalisert til festestedet (Øvergård et al., 2023). Dette fører til at laksen heller ikke har muligheten til å redusere forekomsten av lakselus i forhold til andre laksefisk. Dette er et resultat av at lakselusen modulerer vertens immunrespons under de parasittiske stadiene for å unngå dens immunforsvar (Øvergård et al., 2022). I tillegg sekreseres anti-koagulerende faktorer fra lakselusen når den spiser blod fra verten. I motsetning til coho-laksen (*Oncorhynchus kisutch*) får den atlantiske laksen ikke noe betydelig immunrespons ved lakslusinfeksjon (Johnson and Albright, 1992). Atlantisk laks klarer derfor heller ikke å bekjempe lakselusen, mens den resistente coho-laksen har blitt sett å kunne drepe kopepoditter allerede ved syv til fjorten dager etter smitte (Fast et al., 2002). Dette viser hvor viktig det er for lusen å få dempet immunresponsen umiddelbart etter etablering på en vert.

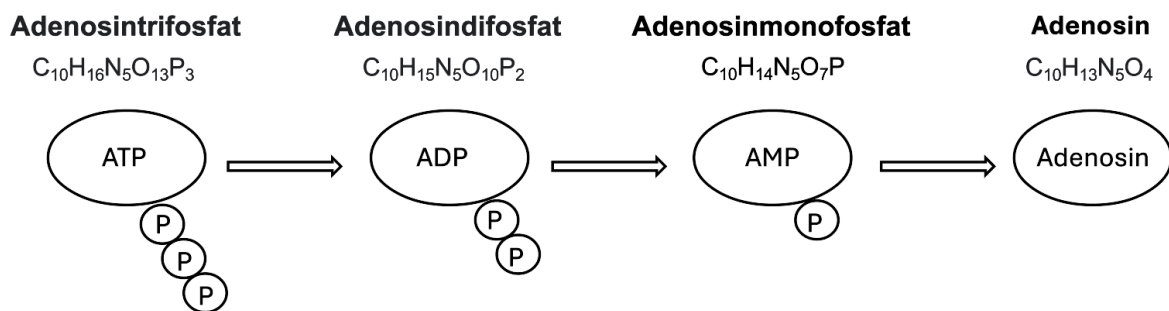
Eksokrine kjertler hos blodspisende parasitter, slik som lakselus, antas å være spesielt viktige i samspillet med verten ved utskillelse av stoffer som modulerer immunresponsen til verten og har en antikoagulerende effekt under føring (Sauer et al., 2000), noe som også er bekreftet i kjertelsekret fra lakselus (Øvergård et al., 2022). Det er funnet fire typer eksokrine kjertler hos lakselus, tre tegumentale (teg 1-3) kjertler og en labial kjertel (videre kalt spyttkjertel) (Øvergård et al., 2016). Teg 1- og teg 2-kjertler er de første kjertlene som dukker opp under utviklingen. De har kanaler som strekker seg både ventralt og dorsalt, og er antatt å ha funksjoner som er viktige for smøring av integumentet. Spyttkjertelen ble først identifisert i planktoniske kopepoditter, med reservoar som muliggjør lagring av kjertelprodukter. Teg 3-kjertler dukker ikke opp før preadult I-stadiet når lusen blir mer virulent. Den har kanaler som ender ventralt ved kontaktsområde mellom vert og parasitt og kan skille ut stoffer som er viktige for lakselusvirulensen. Det er derfor sannsynlig at teg 3 og spyttkjertelen vil være spesielt viktige i vert-parasitt-interaksjonen. De sekretoriske kanalene til spyttkjertlene finnes distalt i munnrøret nær mandibeltennene (Øvergård et al., 2016), og det er dermed sannsynlig at spyttkjertelens sekret har sin hovedeffekt direkte ved lusens beitested istedenfor inne i lusens tarm (Øvergård et al., 2022).

Spyttkjertelproteiner

Spyttkjertelproteiner ser ut til å være viktige i vert-parasitt interaksjonene, og fem proteiner assosiert med spyttkjertelfunksjon ble identifisert og kalt *Lepeophtheirus salmonis* labialt kjertelprotein (LsLGP) 1-4 og 1 like (LsLGP1L) som er predikert å være små ladede utskilte proteiner som ikke koder for noen kjente proteindomener. Enzymer lokalisert i spyttkjertelen er astaciner kalt *L. salmonis* labial kjertel astacin 1-8 (LsLGA 1-8), en serin protease kalt *L. salmonis* labial kjertel serin protease 1 (LsLGSP1) og en apyrase kalt *L. salmonis* labial kjertel apyrase 1 (LsLGAp1). De fleste av de identifiserte spyttkjertelproteinene oppreguleres i det infektive kopepodittstadiet før de fester seg til en vert og er ikke regulert av sult (Midtbø et al., 2024; Øvergård et al., 2022).

Apyraser og LsLGAp1

Apyraser tilhører en gruppe enzymer som kan hydrolysere nukleotider som blant annet adenosintrifosfat (ATP), adenosindifosfat (ADP) og adenosinmonofosfat (AMP), og er essensielle hos levende organismer (Partmann, 1957). Ved hydrolysering av adeninnukleotider skjer en kløying av en fosfatgruppe (figur 1.3) (Gao et al., 2005), og ATP blir da hydrolysert til ADP, videre til AMP og til slutt adenosin.



Figur 1.3: Reaksjonslikning av hydrolysering av adeninnukleotider (ATP, ADP, AMP og adenosin). Ved hydrolysering av adeninnukleotider skjer en kløying av en fosfatgruppe. ATP hydrolyseres til ADP, videre til AMP og til slutt adenosin.

Hydrolysering av ATP medierer bevegelse via muskelkontraksjoner og enzymet virker å være essensielt for overføring av energi hos prokaryote og eukaryote celler (Komoszynski and Wojtczak, 1996; Partmann, 1957). Hvor raskt apyraser kan hydrolysere nukleotider varierer mellom de ulike apyrasene. Ved celle- eller vevskade frigjør vertsceller ATP, ADP, AMP og adenosin til det ekstracellulære miljøet som vil stimulere ulike responser ved binding til den purinerge reseptoren (Burnstock et al., 2012). ATP som er en del av den proinflammatoriske prosessen hvor ekstracellulært ATP (eATP), blir klassifisert som et fare-assosiert molekylært

mønster (DAMP) (Trautmann, 2009). Dette virker via purinergiske signaler og vil direkte påvirke vertens immunforsvar ved å aktivere proliferasjon av T-hjelpeceller, frigjøring av cytokiner og betennelse (Antonioli et al., 2013). Storfeparasitten *Ostertagia ostertagi* skiller ut en Ca^{2+} -avhengig apyrase for å redusere nivåene av eATP lokalt, og på denne måten kontrollerer inflammasjon i magekjertlene til verten (Zarlenga et al., 2011). I tillegg reagerer også både keratinocytter og sensoriske nerveceller på ATP frigjort ved mekanisk stimulering i humane epidermale keratinocytter, hvor ATP er kjent for å inducere smerteresponser (Burnstock et al., 2012; Ulmann et al., 2007). Ekstracellulært ADP binder seg til purinerge reseptorer på blodplater og induserer tilførsel av blodplater og koagulasjon (Burnstock et al., 2012). Flere blødsugende leddyr påvirker derfor verts-purinerge-assosierte immunresponser ved å skille ut Ca^{2+} -avhengig apyrase gjennom spyttet som hydrolyserer ADP og dermed forhindre koagulering og tillater føring (Smith and Kirley, 2006; Valenzuela et al., 1998). Ekstracellulært AMP kan også hydrolyseres til adenosin som har immundempende effekter, som for eksempel i hud hos mennesker hvor adenosin hemmer nøytrofiltilstrømning og frigjøring av reaktive oksygenforbindelser (ROS), i tillegg til å redusere hudødem (Burnstock et al., 2012). Både ATP og adenosin er også funnet å være involvert i ulike deler av sårheling i hud.

Lakselusens apyrase LsLGAp1 som uttrykkes av spyttkjertelen ser ut til å ha et konstitutivt uttrykk gjennom alle de parasittiske livsstadiene til lusen (Midtbø et al., 2024). Sekresjon av apyraser for å kontrollere immunresponser knyttet til frigjøring av cellulære nukleotider vil være fordelaktige. Kopepoditten fester seg på laksen ved å grave andre antenne ned i huden, i tillegg til å sette ned et frontalfilament før videre skallskifte, noe som kan skape mekaniske skader i epidermis (Johnson and Albright, 1991; Jones et al., 1990). Dette vil trigge immunresponser i laksen, og for å unngå disse immunresponsene trenger kopepoditten immunmodulerende faktorer. Basert på at LsLGAp1 uttrykkes gjennom alle de parasittiske livsstadiene er det en mistanke om at LsLGAp1 kan hydrolysere ATP eller AMP og har en slik immundempende funksjon på verten (Midtbø et al., 2024). Ettersom hvert nukleotid signaliserer gjennom forskjellige reseptorer vil epitel- og endotelresponsen til de forskjellige nukleotidene variere, og funksjonen til LsLGAp1 vil derfor avhenge av dens nukleotidspesifisitet (Burnstock et al., 2012). Uttrykksmønsteret til LsLGAp1 indikerer derimot at det ikke har noe anti-koagulerende funksjon, da LsLGAp1 uttrykkes gjennom alle de parasittiske livsstadiene, også når lusene hovedsakelig lever av epidermal overflate i kopepodittstadiet og chalmus I og II (Midtbø et al., 2024). LsLGP4 som er anti-koagulerende kommer derimot hovedsakelig til uttrykk i preadulte og adulte lus (Øvergård et al., 2022), da lusene bryter seg

gjennom den epidermale basalmembranen og lager sår i dermis og spiser blod (Jónsdóttir et al., 1992). Til tross for eksisterende mistanker om at LsLGAp1 kan hydrolysere ATP eller AMP, kan LsLGAp1 mulig hydrolysere helt andre nukleotider som for eksempel GTP eller GDP. Hovedeffekten til LsLGAp1 er imidlertid uklar og kan være mange. Forskning på å belyse substratspesifisiteten til LsLGAp1 er derfor nødvendig for å gi en ytterlig indikasjon om dens funksjon på beitestedet til lakselus.

Formål med studien

En vaksine mot lakselus vil kunne være svært kostnadseffektivt, og være et forebyggende tiltak mot lakselus som gir økt fiskevelferd og bærekraft. Å benytte et antigen som virker i kontaktflaten mellom verten og lusen vil kunne være et aktuelt angrepspunkt, dersom man kan indusere en sekresjon av antistoffer ut i slim og epitel hvor lusen er i direkte kontakt med laksen (Øvergård et al., 2016). Antistoffene i slim vil da trolig kunne nøytralisere det gjeldende antigenet ved utskillelse fra spyttkjertelen (Forthal, 2014). En god antigen-kandidat for et slikt angrepspunkt kan være ulike spyttkjertelproteiner fra den labiale kjertelen hos lakselus (Midtbø et al., 2024; Øvergård et al., 2022, 2016). Da LsLGAp1 er trodd å kunne hydrolysere ekstracellulært ATP til ADP eller AMP til adenosin for å virke immundempende på laksen, er dette en god kandidat i en DNA-vaksine mot lakselus (Midtbø et al., 2024). For å teste apyrasens evne til å hydrolysere ATP eller AMP skal dette testet ved bruk av biokjemiske metoder. Videre skal apyrasen benyttes som antigen i DNA-vaksine med flagellin som adjuvans og påfølgende elektroporering. Dersom LsLGAp1 har immundempende egenskaper er det derimot utfordrende å benytte det som vaksineantigen. Det skal derfor inkluderes en villtype LsLGAp1 og en mutert LsLGAp1 (LsLGAp Δ), hvor LsLGAp Δ skal ha mutasjoner i det aktive setet, for at det ikke skal virke immundempende ved uttrykk og produksjon av apyrasen i cellene.

Målet med studiet er å evaluere funksjonen til LsLGAp1 og muligheter til å benytte apyrasen som antigen i DNA vaksine:

1. Evaluere LsLGAp1 sin evne til å hydrolysere ATP eller AMP ved bruk av biokjemiske metoder.
2. Benytte en villtype LsLGAp1 og en mutert LsLGAp1 (LsLGAp Δ) i DNA-vaksine med flagellin som adjuvans og elektroporering for å undersøke om det gir økt immunrespons.
3. Bekrefte om antigenet blir uttrykt i muskulaturen to og åtte uker etter injeksjon ved bruk av sanntids PCR.
4. Vurdere om LsLGAp1 og LsLGAp Δ gir antistoffrespons åtte uker etter vaksinerings ved bruk av ELISA.
5. Utføre en enkel evaluering av bivirkninger knyttet til vaksinerings ved å se på histologiske forandringer ved stikkstedet.

2.0 Material og metode

Funksjonelle analyser ble gjennomført for å undersøke substratspesifisiteten hos LsLGAp1 *in vitro* ved å evaluere om LsLGAp1 kan hydrolysere ATP eller AMP. Dette ble gjort ved bruk av biokjemiske metoder og et rekombinant LsLGAp1 produsert i Sf9 insektsceller (rekAp1) (Thermo Fisher).

Videre ble LsLGAp1 sin evne til å indusere antistoffrespons i atlantisk laks etter DNA-vaksinering evaluert *in vivo*. En villtype LsLGAp1 og en mutert LsLGAp1 (LsLGAp Δ) ble derfor brukt som vaksineantigen i DNA-vaksine med flagellin som adjuvans og påfølgende elektroporering. Vaksineforsøket gikk over 12 uker med to prøveuttak (figur 2.1).

Funksjonelle analyser med LsLGAp1 *in vitro*

For å undersøke substratsspesifisiteten hos LsLGAp1 ble biokjemiske metoder brukt for å evaluere om LsLGAp1 kan hydrolysere ATP eller AMP.

2.1 Deteksjon av hydrolysering av ATP med luminiscens

For å undersøke om LsLGAp1 fra lakselus kan hydrolysere ATP ble Luminescent ATP Detection kit (Abcam) benyttet i kombinasjon med rekAp1. Deteksjonen ble gjennomført i henhold til produsentens protokoll, med følgende modifikasjoner: rekAp1 erstattet cellekultur, og apyrasebuffer (Apyrase Reaction Buffer, se vedlegg 8.1) erstattet cellekultur-medium da apyrasebufferen inneholder Ca^+ , og LsLGAp1 ser ut til å være et kalsiumavhengig enzym (Midtbø et al. 2023). Som negativ kontroll ble 0,5 μM ATP-standard brukt. Positiv kontroll, apyrase fra potet (A766-100UN, Sigma), ble brukt i to ulike mengder (6,15 μg og 2,05 μg) i kombinasjon med 0,5 μM ATP-standard, inkubert ved 15 °C i 60 min. For å undersøke mulig hydrolysering av ATP ble to ulike mengder recLGAp1 (6,15 μg og 2,05 μg) i kombinasjon 0,5 μM med ATP-standard inkubert ved 15 °C i 60 minutter. Luminiscensen ble målt med EnSpire 2300 Multilabel Reader (PerkinElmer), hvor det ble gjort fem målinger med ett sekund mellom målingene. Rlu (relative lysenheter) for hver enkelt prøve ble regnet ut ved å ta gjennomsnittet av de fem parallellene for hver prøve og trekke fra verdien av blank. Rlu ble satt inn som y i standardkurvens formel ($y = 501945x - 1981,5$) og ble brukt for å regne ut ATP-konsentrasjonen for de ulike reaksjonene. Endelig rlu, ATP-konsentrasjon og standardkurve ble visualisert i Prism10.

2.2 Deteksjon av hydrolysering av AMP med kolorimetri

For å undersøke om LsLGAp1 fra lakselus kan hydrolysere AMP til adenosin, ble AMP Assay Kit (Abcam) benyttet i kombinasjon med rekAp1. Forsøket ble gjort i henhold til produsentens protokoll, med følgende modifikasjoner: apyrasebuffer, som inneholder Ca^+ , ble brukt i kombinasjon med Assaybuffer, og 1 μL (0,041 μg og 0,200 μg) rekAp1 ble brukt som prøve. RekAp1 og AMP-standard ble testet hver for seg som negative kontroller, og rekAp1 og 0,0267 mM AMP-standard ble testet i kombinasjon. Prøvene ble inkubert ved 15 °C i 60 minutter. Absorbansen (OD-verdi) ble lest av ved 570 nm i spektrofotometer Spark® (Tecan). OD-verdi for hver enkelt prøve ble regnet ut ved å trekke fra verdien av blank. OD-verdi ble satt inn som y i standardkurvens formel ($y = 0,0875x + 5E - 05$) og ble brukt til å regne ut AMP-konsentrasjonen for de ulike reaksjonen. For å bekrefte resultatene ble prosedyren gjentatt. Endelig OD-verdi, AMP-konsentrasjon og standardkurve ble visualisert i Prism10.

In vivo vaksineforsøk med LsLGAp1

For å evaluere LsLGAp1 sin evne til å indusere antistoffrespons etter DNA-vaksinering ble et vaksineforsøk gjennomført.

2.3 Produksjon av DNA-vaksine mot LsLGAp1

2.3.1 Plasmidtransformasjon og bakteriedyrking

Plasmid med pcDNA 3.1⁽⁺⁾ vektor og insert som ble brukt til DNA-vaksine ble kommersielt produsert (GenScript). Plasmid med insert som var transformert inn i *E. coli* ble dyrket fra glyserolstock. Plasmid uten insert ble brukt som kontroll og transformert inn i *E. coli* ved å først tilsette 0,5 μL plasmid til 25 μL Invitrogen One Shot TOP10 Chemically Competent *E. coli* (Invitrogen). Løsningen ble inkubert på is i 5 min, etterfulgt av heat shock i 30 sekunder på 42°C. Etter transformasjonen ble 250 μL SOC outgrowth medium (BioLabs) tilsatt og bakteriene ble inkubert ved 37°C, 650 rpm, i 60 min. Bakteriene ble videre fortynnet 1:10 med SOC.

Bakterier med plasmid fra transformering og glyserolstock ble strøket ut på lysogen-buljong (LB) agarplate med ampicillin (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, Sigma-Aldrich), og inkubert ved 37°C over natt. Fra hver skål ble en koloni plukket og tilsatt i 5 mL LB medium tilsatt 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ampicillin, og inkubert ved 37°C i 6 timer på 250 rpm (Multitron Standard, Infors). *E. coli* bakteriene med plasmid ble tilsatt i 400 mL LB medium sammen med 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ampicillin og inkubert ved 37

°C og 250 rpm over natt. Celletettheten ble målt ved bruk av Fisherbrand Cell Dencity Meter (Fisher Scientific). Videre ble bakteriene i LB medium sentrifugert ved 4°C og 5000 x g i 30 minutter. En pellet av bakterier ble dannet som ble fryst ned ved -20°C og som videre ble brukt til DNA-isolering. Plasmid med flagellin-insert, et protein fra *Moritella viscosa*, ble også dyrket fra glyserolstock for påfølgende DNA-isolering.

2.3.2 DNA-isolering

Bakteriepelletten fra alle plasmidene ble isolert med EndoFree Plasmid Maxi Kit (Qiagen) i henhold til produsentens protokoll, og løst i 400 µl RNase fritt vann (Qiagen). Konsentrasjonen til plasmidene ble målt på Nanodrop ND-1000 spektrofotometer. Plasmidene ble lagret ved -20 °C.

2.4 Eksperimentelle dyreforsøk

De eksperimentelle dyreforsøkene ble utført på lakseparr (*Salmo salar*) på våtlaboratoriet på Høyteknologisenteret ved ILAB. Fisken gikk i 500L kar med ferskvann (0,0ppt) ved 12 °C og belysningen var satt på 12-timers intervall med lys/mørke. Fisken ble røktet daglig og ble foret gjennom et automatisk fôringssystem med settefiskfôr fra Skretting. Forsøket ble gjennomført i henhold til dyrevelferdsloven, samt godkjent av mattilsynet (Fots ID26020).

2.4.1 Vaksinerings

Et vaksineforsøk med to ulike vaksiner og en kontroll ble gjennomført, hvor Ktr (kontroll) med plasmid uten insert, villtypen LsLGAp1 og mutert LsLGAp1 (LsLGApΔ) var de respektive injiseringsgruppene som alle var tilsatt plasmid med flagellin-insert (tabell 2.1). Videre blir gruppene injisert med LsLGAp1 og LsLGApΔ omtalt som vaksinegrupper, og kontrollgruppen som injeksjonsgruppe. Dersom alle tre gruppene omtales, inkludert kontrollgruppen, omtales gruppene som injeksjonsgrupper. LsLGApΔ hadde tre mutasjoner på proteinnivå i det aktive setet til apyrasen: H112D, D115N og R379Q. Dette ble gjort for at enzymet ikke skulle virke immundempende ved uttrykk og produksjon av apyrasen i cellene. I etterkant av vaksineforsøket ble total RNA fra en fisk fra hver vaksinegruppe (LsLGAp1 og LsLGApΔ) sanger-sekvensert (Genewiz), for å sjekke at riktig vaksineantigen ble gitt til riktig gruppe.

Tabell 2.1: oversikt over injeksjonsgruppene: Ktr (Kontroll med plasmid uten insert), LsLGAP1 (villtypen av spyttkjertelproteinet LsLGAP1), LsLGApΔ (mutert LsLGAP1). Alle gruppene ble tilsatt lik mengde plasmid med flagellin insert. Alle plasmid med insert er kodonoptimalisert mot laks.

Injeksjonsgruppe	Spyttkjertel-protein	Mutasjon	Flagellin	Kodon-optimalisert	Genlengde	Antall fisk
Ktr (kontroll)	-	-	+	+	-	15
LsLGAp1	LsLGAp1	-	+	+	1671 bp	17
LsLGApΔ	LsLGAp1	+	+	+	1671 bp	15

I forkant av all håndtering ble all fisk bedøvet med 1,2 g Finquel Vet. (MSD Animal Health) per 10 L ferskvann (12 °C), samt lik mengde natriumhydrogen-karbonat (NaHCO₃) som buffer i ca. 3 minutter under tilsyn.

Fisken ble PIT-tagget to uker før vaksinerings for å skille hvert enkelt individ/fiskegruppene fra hverandre (figur 2.1). Et skalpellblad ble brukt for å lage et snitt på ca. 7 mm cranialt for bukfinnene, og PIT-tag ble forsiktig satt inn i bukhulen på fisken. Etter å ha blitt PIT-tagget ble fisken flyttet tilbake til felles kar med ferskvann, hvor de ble observert under oppvåkning fra anestesi.



Figur 2.1: tidslinje for vaksineforsøk uke -3 til uke 8. Fisk ankom kar tre uker før vaksinerings og ble akklimatisert ca. en uke før PIT-tagging. Etter PIT-tagging gikk det to uker før fisken var klar for vaksinerings. Etter vaksinerings gikk fisken to- og åtte uker i kar før prøveuttak for å indukere en antistoffrespons.

2.4.2. Injeksjon og elektroporering

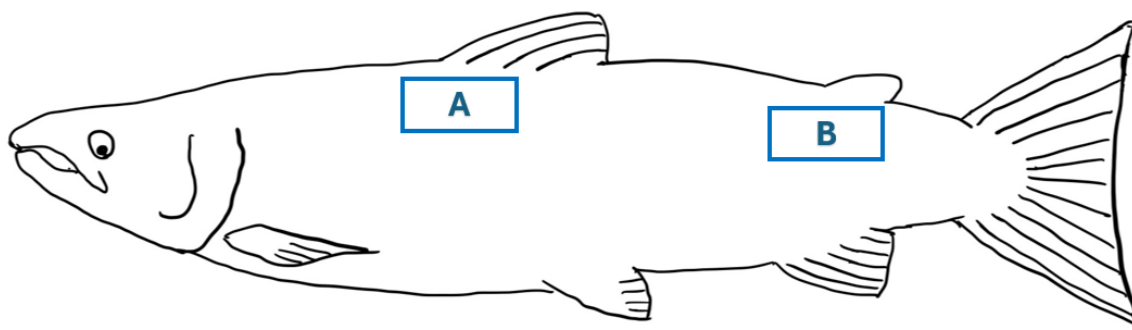
Ved vaksinerings hadde lakseparrene en snittvekt på $37,3 \text{ g} \pm 3,4 \text{ g}$ og snittlengde $14,4 \text{ cm} \pm 0,4 \text{ cm}$. Til sammen 47 fisk ble vaksinert, hvor 15 fisk ble vaksinert med kontrollvaksinen, 17 fisk ble vaksinert med LsLGAp1 og 15 stykk ble vaksinert med LsLGAp Δ (tabell 2.1). Intramuskulær (IM) injeksjon ble gjort med en 1 mL sprøyte med en 29G insulinkanyle, hvor 50 μL vaksine med 20 μg plasmid med insert ble injisert. IM injeksjon ble gjort ventralt for fettfinnen, i cranial retning (figur 2.3.3 B). Vaksinedosen ble sprøytet sakte inn, kanylen ble dradd sakte ut, og injeksjonsstedet ble strøket over. Elektroporering av stikkstedet ble gjort umiddelbart etter IM injeksjon ved bruk av elektroporator NEPA21 (Nepagene), for å øke mengde transfektert plasmid inn i cellene. Fisken ble overført til en form designet for å gi god stabilitet for fisken under elektroporeringen. Deretter ble fisken elektroporert med 50V ved injeksjonsstedet, de to elektrodene på elektroporatoren ble holdt inntil fisken og startknappen ble trykket på for å utføre elektroporeringen (tabell 2.2). Elektrodeplatene ble holdt i samme stilling i ca. 5 sekunder, før elektroporeringen ble gjentatt.

Tabell 2.2: Innstillinger for elektroporator NEPA21 (Nepagene) for elektroporering med 50V.

Set Parameters											
Poring Pulse						Transfer pulse					
V	Lengde (ms)	Intervall	No.	D. rate (%)	Polaritet	V	Lengde (ms)	Intervall	No.	D. rate (%)	Polaritet
50	50	50	3	10	+/-	10	50	50	3	40	+/-

2.4.3 Prøveuttak

Det ble gjennomført to prøveuttak, to- og åtte uker etter vaksinerings. Lengde og vekt ble målt for begge prøveuttakene i tillegg til at blodprøver ble tatt, etterfulgt av et slag mot hodet som avlivning. Blodprøvene, 1 mL, ble tatt fra caudalåren ved bruk av heparinbelagte sprøyter med 25G kanyle og oppbevart kjølig på is frem til fullført prøveuttak. Blodprøvene ble spunnet ned ved $2000 \times g$ i 10 min ved $4 \text{ }^\circ\text{C}$ til plasma som ble overført til nye rør og lagret ved $-20 \text{ }^\circ\text{C}$. Prøver fra hud og muskel, $10\text{mm} \times 10\text{mm} \times 10\text{mm}$, ble tatt ut for sanntids-PCR analyse og histologi. Prøver fra injeksjonsstedet (figur 2.2 B) og prøver for kontroll (ikke-injisert) ble tatt ventralt for dorsalfinnen (figur 2.2 A) for all fisk. For vevsbitene til sanntids-PCR ble det brukt sterile skalpellblad for hver fisk og vevsbit lagret på RNAlater (ThermoFisher) i minimum et forhold på 1:10, og ble oppbevart ved $4 \text{ }^\circ\text{C}$ i minimum 24 timer før de ble oppbevart ved $-20 \text{ }^\circ\text{C}$.



Figur 2.2: Injeksjonssted ved vaksineforsøk og sted for uttak av muskelprøver vist på illustrasjon av atlantisk laks. B viser sted for injisering av vaksine og sted for uttak av muskelprøver til sanntids PCR og histologi. A viser sted for uttak av kontroll-muskelprøver til sanntids PCR og histologi.

Ved to-ukers prøveuttaket ble fem fisk per gruppe tatt ut, totalt 15 fisk. Muskelprøver ble tatt til histologi (en fisk per gruppe) og sanntids PCR (fire fisk per gruppe). Ved åtte-ukers prøveuttak ble resterende fisk tatt ut, totalt 32 fisk (ti fisk Ktr, tolv fisk LsLGAp1 og ti fisk LsLGApΔ). Slimprøve ble tatt (syv fisk per gruppe), samt muskelprøver til histologi (2 fisk per gruppe) og sanntids PCR (åtte fisk per gruppe for Ktr og LsLGApΔ, ti fisk for LsLGAp1).

Prøver til histologi ble fiksert etter Karnovsky-metoden, 1:10 blandingsforhold bestående av 4% formaldehyd fremstilt av paraformaldehyd og 5% glutaraldehyd, og oppbevart ved 4 °C.

2.5 Kondisjonsfaktor (K-faktor)

Fultons kondisjonsfaktor (K) ble brukt for å undersøke om fisken hadde hatt en normal tilvekst gjennom vaksineforsøket, og ble beregnet på all fisk i henhold til Froese (2006) sin formel basert på vekt (gram) og lengde (cm):

$$K = 100 \frac{\text{Vekt}}{\text{Lengde}^3}$$

Lengde, vekt og k-faktor ble analysert ved bruk av enveis-ANOVA og visualisert i Prism10.

2.6 Analyse av prøver

2.6.1 RNA-isolering

RNA-rensing ble gjennomført i henhold TRIzol® Reagent (Thermo Fisher) sin protokoll basert på vev som prøvetype. Følgende modifikasjoner ble gjennomført ved RNA-rensingen: prøvene ble homogenisert ved bruk av en 5mm stålkule (Qiagen) og TissueLyser II (Qiagen) ved 30 Hz. RNA-pelleten ble vasket med 1 mL 75% etanol, vortexet og sentrifugert ved 12,000 x g i 5 min, to ganger. RNA-pelleten ble resuspendert i 100 µL RNase-fritt vann (Qiagen). For å forbedre RNA-renheten ble RNA-løsningen felt ut i 0,1 volum 3M natriumacetat (pH 5,2) og 2,5 volum 100% etanol, blandet og lagret ved -80 °C. RNA-prøvene ble sentrifugert i 30 min og 12 000 x g ved 4 °C. Deretter vasket med 1 mL 75% etanol, vortexet, og sentrifugert ved 12,000 x g i 5 min, to ganger. RNA-pelleten ble løst i 50 µL RNase-fritt vann (Qiagen). Nanodrop One (ThermoFisher) spektrofotometer ble brukt for å sjekke konsentrasjon og renhet av prøvene før de igjen ble lagret ved -80 °C. For hver RNA-rensing ble prøver uten tilsatt vev ble brukt som negativ kontroll (rensek kontroll/-RT).

2.6.2 DNase behandling

DNase behandling ble gjennomført for å fjerne resterende DNA molekyler fra total-RNA, ved bruk av TURBO DNA-free Kit (Thermo Fisher). RNA-prøvene ble fortynnet til en konsentrasjon på 500 ng/µL, tilsatt 1 X Turbo DNase Buffer og 4 U Turbo DNase Enzym og inkubert ved 37 °C i 30 min. Prøvene ble resuspendert og tilsatt 0,2 volum resuspendert DNase inaktiveringsreagens, blandet og inkubert i romtemperatur i 5 min. I løpet av inkubasjonstiden ble prøvene blandet to-tre ganger. Videre ble prøvene sentrifugert ved 10 000 x g i 1,5 min, pellet ble dannet og supernatanten ble forsiktig overført til nytt rør og lagret i -20 °C for korttidsoppbevaring.

2.6.3 cDNA-syntese

cDNA-syntese er en metode for å revers transkribere RNA til komplementært DNA (cDNA) og ble gjort ved bruk av AffinityScript QPCR cDNA Synthesis Kit (Agilent). DNase behandlet RNA (3 µL DNase behandlet RNA, som tilsvarer 960 ng) ble tilsatt 1 X First strand master mix, 100 ng oligo (dT) primer, 50 ng random primer og 0,5 µL Affinity Script RT/RNase Block Enzyme. Prøven ble inkubert i Miniamp Thermal Cycler (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific) ved 25 °C i 5 min, 42 °C i 15 min og 95 °C i 5 min før de ble lagret i -80 °C.

For negativ kontroll ble Affinity Script RT/RNase Block Enzyme erstattet med RNase-fritt vann (Qiagen).

2.6.4 Sanntids PCR

Sanntids-polymerase kjedereaksjon (Sanntids-PCR) er en metode for å følge amplifiseringen av DNA i sanntid ved at det tilsettes det fluoriserende fargestoffet SYBR®Green (Thermo Fisher) i dsRNA reaksjonen. SYBR®Green binder uspesifikt til dsDNA, slik at amplifiseringen av DNA i sanntid kan detekteres. Økningen av fluoriscens vil være proporsjonal med mengde dsDNA som amplifiseres.

Sanntids PCR ble utført med 2 X PowerUp SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems, Thermo Fisher) i henhold til produsentens protokoll med 2 µL fortennet cDNA og 25 nM forward og reverse primere, opplistet i tabell 2.3. I tillegg ble 2 µL RNase-fritt vann (Qiagen) tilsatt til hver PCR-reaksjon med et totalvolum på 12 µL. Prøvene ble kjørt i QuantStudio 3 (Applied Biosystems) termosyklus Real-time PCR med standard cycling mode (primer $T_m \geq 60^\circ\text{C}$), under parameterne opplistet i tabell 2.4. Prøvene ble kjørt i duplikater og amplifisert mot målgenet (LsLGAp1), flagellin og et referansegene (Atlantic salmon Elongeringsfaktor, AsEF1) (tabell 2.3). En CT-verdi på 37 og prøver med CT-verdi over 35 hvor det ene duplikatet var ubestemt (undetermined) er satt som negative prøver. Negativ kontroll (NTC), hvor cDNA erstattet med RNase-fritt vann (Qiagen), ble brukt for hver kjøring. Negative kontroller (-RT, NTC) ble ikke kjørt som duplikater.

Tabell 2.3: Oversikt over primere og primersekvens brukt til sanntids PCR. Prøver fra alle injeksjonsgruppene ble amplifisert mot referansegene, i tillegg til insertspesifikke primere for LsLGAp1 og flagellin.

Primer	Retning	Sekvens
LsLGAp1	Forward	TACGGAGGAGGTGGAGGCTA
	Reverse	TGGGATCTTCCTTGCGATCT
Flagellin	Forward	GATAGGGTGGCTCTCGACAA
	Reverse	CAGAAGATTCATCCCGCCGA
AsEF1a	Forward	CACCACCGGCCATCTGATCTACAA
	Reverse	TCAGCAGCCTCCTTCTCGAACTTC

Tabell 2.4: Standard cycling mode (primer $T_m \geq 60^\circ\text{C}$) parametere for sanntids-PCR.

Temperatur i °C	Tid	Sykluser
50°C	2 minutter	1
95°C	2 minutter	1
95°C	15 sekunder	40
60°C	1 minutt	

CT-verdiene ble analysert ved bruk av enveis-ANOVA for gruppene som ikke gav signifikante forskjeller, og Kruskal-Wallis-analyse for prøvene hvor parametriske analyse gav signifikant forskjell. Prøvene ble visualisert i Prism10.

2.6.5 ELISA

Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) er en metode som brukes for å detektere og kvantifisere proteiner og antistoff, hvorav det i dette forsøket ble brukt til å detektere og kvantifisere antistoff mot målgenet LsLGAp1 og flagellin. Prosedyren ble gjennomført ved at rekAp1 og flagellin (antigen) ble fortynnet til 5 µg/mL i bikarbonatbuffer (coating buffer), hvor 100 µL ble tilsatt hver brønn i en 96-brønnsplate. Platen ble inkubert ved 4 °C over natt. Brønnene ble vasket med 250 µL 1X fosfat bufret saltvann (PBS) (Sigma-Aldrich) tilsatt 0,05% Tween20 (Sigma-Aldrich) (videre omtalt som PBS/T), tre ganger, etterfulgt av at 250 µL blokkeringsbuffer (5% fettfri melk i PBS/T) ble tilsatt i hver brønn som ble inkubert i romtemperatur i 2 timer. Brønnene ble vasket med 250 µL PBS/T, tre ganger, og tilsatt 100 µL 1:50 blodplasma fortynnet i fortynningsbuffer (1% fettfri melk i PBS/T) i duplikater, samt et duplikat uten tilsatt plasma (blank) som negativ kontroll, og inkubert i 4 °C over natt.

Brønnene ble vasket med 250 µL PBS/T, tre ganger, og tilsatt 100 µL mus-anti-laks antistoff tilkoblet HRP (Immunoprecise) i en 1:2000 fortynning med fortynningsbuffer, og inkubert i romtemperatur i 1 time. Brønnene ble igjen vasket med 250 µL PBS/T, tre ganger, og tilsatt 100 µL substratløsning (1-step Ultra TMB- ELISA substrat solution, 34028, Thermo Scientific) og inkubert i mørke ved romtemperatur i 20 min, før det ble tilsatt 50 µL stopp-løsning (1M svovelsyre, H₂SO₄). Absorbansen (OD 450 nm) ble lest av i spektrofotometer Spark® (Tecan). OD-verdi for hver enkelt prøve ble regnet ut ved å trekke fra gjennomsnittet av blank-duplikatet, fra gjennomsnittet av duplikatene for hver enkelt prøve. Endelig OD-verdi for hver enkelt prøve ble regnet ut med følgende formel:

$$OD - verdi = \frac{\text{replik 1} + \text{replik 2}}{2} - \frac{\text{blank 1} + \text{blank 2}}{2}$$

OD-verdiene ble analysert ved bruk av enveis-ANOVA og visualisert i Prism10.

2.6.6 Histologi

Fikserte hud/muskelpøver for innstøping ble vasket med PBS i 35 min, to ganger, dehydrert etanol i økende konsentrasjon (60%, 70%, 96%, 96%) i 15 min, før det ble preinfiltret i 1:1 blanding av Technovit®7100 (Kulzer) og etanol (96%) i 6 timer. Vevsbitene ble infiltrert med infiltreringsløsning (Technovit7100 og Technovit7100 hardener 1 (Kulzer) (10µg/mL)) over natt. For innstøping av vevsbitene ble Technovit®7100 hardener 1 og Technovit®7100 hardener 2 (Kulzer) (1:15) (polymeriseringsaktivator) blandet og tilsatt vevsbitene i histoform innstøpningshulrom, og inkubert i 2 timer. Microtom (Leica RM 125) ble brukt for å snitte snitt (2µm), som ble lagt på objektglass. Snittene ble farget med toluidineblå (2%) i 1 min, vasket i springvann og dekkglass montert med DPX new (Merck) når snittene var tørket. Farging med toluidineblå er en vanlig fargemetode for plastsnitt, og som vil farge alle celler og vevskomponenter blå.

3.0 Resultat

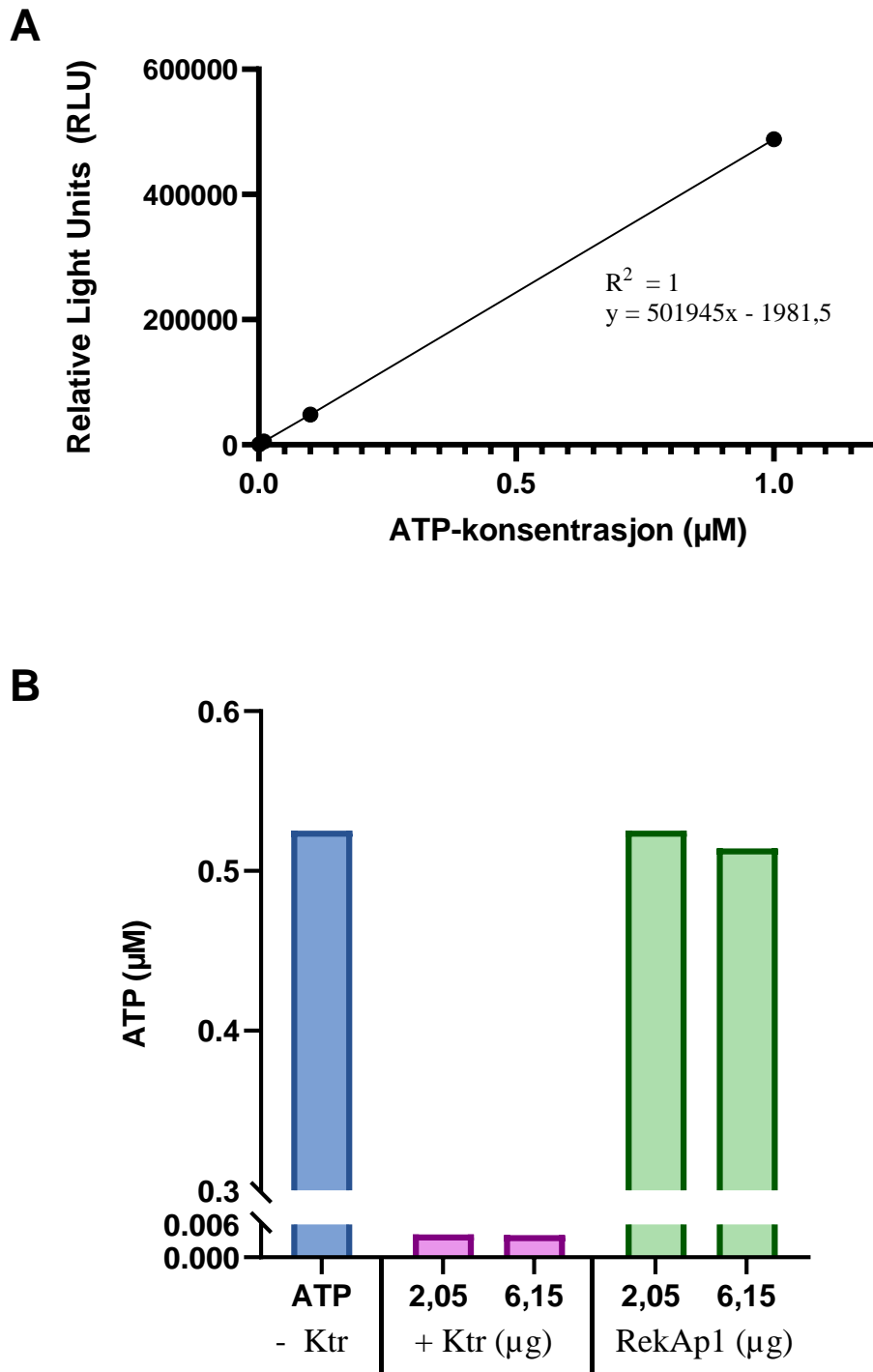
Funksjonelle analyser med LsLGAp1 *in vitro*

Funksjonelle analyser ble gjennomført for å undersøke substratspesifisiteten hos LsLGAp1 *in vitro* ved å evaluere om LsLGAp1 kan hydrolysere ATP eller AMP.

3.1 Deteksjon av hydrolysering av ATP med luminiscens

For å detektere om LsLGAp1 kan hydrolysere ATP ble to ulike mengder (6,15 µg og 2,05 µg) rekombinant LsLGAp1 (rekAp1) tilsatt ATP i Luminescent ATP Detection kit (Abcam), og relativ lysenhet (rlu) ble målt med luminiscens.

ATP (0,5 µM) i prøver uten tilsatt rekAp1 ble brukt som negativ kontroll, og ATP (0,5 µM) i prøver tilsatt apyrase fra potet ble brukt som positiv kontroll. Ved måling av ATP i prøver tilsatt rekAp1 (6,15 µg og 2,05 µg) inkubert ved 15 °C var det ikke noe målbar nedgang i ATP-konsentrasjon, i motsetning til positiv kontroll som viste svært lave ATP-konsentrasjoner. Standardkurven tilhørende forsøket gav verdiene $R=1$ og $y = 501945x - 1981,5$ (Figur 3.1 A). Rlu-verdiene ble plottet inn som y i standardkurvens formel og ATP-konsentrasjonene (µM) ble regnet ut (Figur 3.1 B). Det var ingen betydelig forskjell mellom negativ kontroll og ATP tilsatt rekAp1. Det var en stor forskjell mellom negativ kontroll og positiv kontroll.

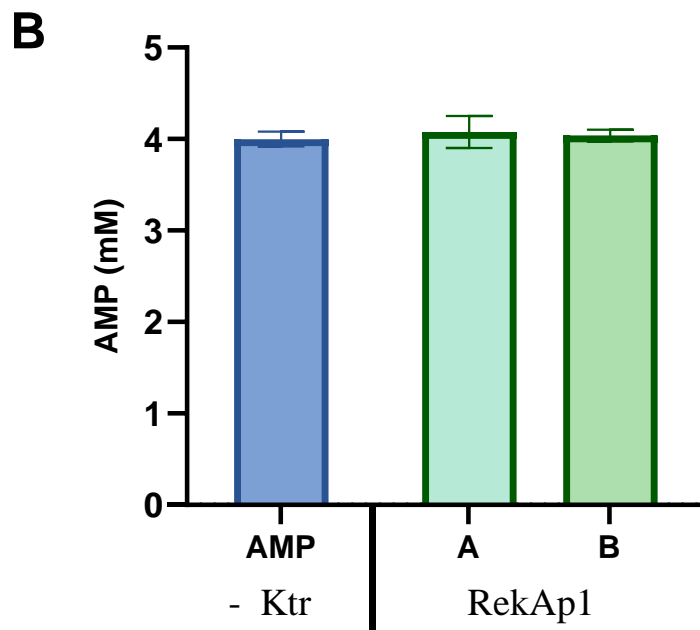
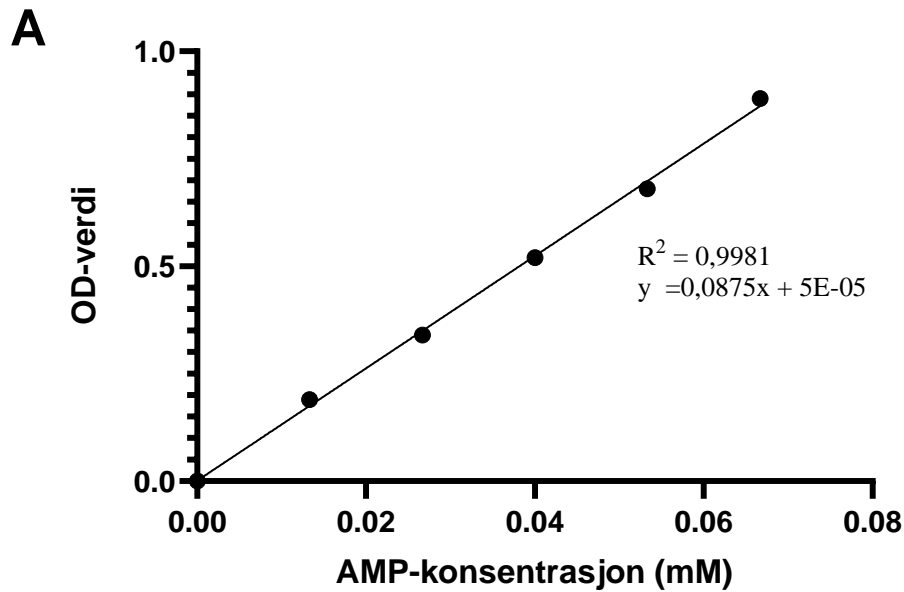


Figur 3.1: ATP-konsentrasjon (μM) med og uten tilsatt *RekAp1*. Forsøket ble målt med luminiscens og oppgitt i relativ lysenhet (rlu). Standardkurven (A) viser sammenhengen mellom rlu og ATP-konsentrasjon, samt verdien for R^2 og standardkurvens formel. Standardkurvens formel ble brukt med rlu som y-verdi og ATP-konsentrasjonene ble regnet ut og presentert i figur B. Negativ kontroll (- Ktr) viser ATP-konsentrasjoner i prøver uten rekAp1 (blå). Positiv kontroll (+Ktr2,05 og +Ktr6,15), viser ATP-konsentrasjon i prøver tilsatt to ulike konsentrasjoner apyrase fra potet (2,05 og 6,15 μg) (lilla). *RekAp1*(2,05 μg) og *rekAp1* (6,15 μg) viser ATP tilsatt to ulike mengder *rekAp1* (grønn). Alle prøvene ble inkubert i 60 minutter ved 15°C.

3.2 Deteksjon av hydrolysering av AMP med kolorimetri

For å detektere om LsLGAp1 kan hydrolysere AMP ble rekombinant rekAp1 brukt i kombinasjon med AMP, og absorbans (OD_{450nm}) ble målt.

AMP ($40 \mu M$) uten tilsatt rekAp1 ble brukt som negativ kontroll. For AMP tilsatt rekAp1 (A og B) var det ingen målbar nedgang i AMP konsentrasjonen. Standardkurven tilhørende forsøket gav verdiene $R = 0,9981$ og $y = 0,0875x + 5E - 05$ (figur 3.2 A), og OD-verdiene ble plottet inn som y i standardkurvens formel ($y = 0,0875x + 5E - 05$) (figur 3.2 B). Absorbans for rekAp1 ble også målt uten tilsatt AMP for å undersøke om apyrasen gav bakgrunn, men den ble målt til endelig OD-verdi på 0. Det var ingen forskjell mellom negativ kontroll og AMP tilsatt rekAp1 for verken A eller B.



Figur 3.2: AMP-konsentrasjon (mM) i prøver tilsatt to ulike batcher rekAp1 (rekAp1A og rekAp1B). Forsøket ble målt med absorbans og oppgitt i OD-verdi. Standardkurven (A) viser sammenhengen mellom OD-verdi og AMP-konsentrasjon, samt verdien for R^2 og standardkurvens formel. Standardkurvens formel ble brukt med OD som y-verdi og AMP-konsentrasjonene ble regnet ut og presentert i figur B. Negativ kontroll (- Ktr) viser gjennomsnitt av fem brønner med AMP uten tilsatt rekAp1 (blå). RekAp1A og rekAp1B Er to ulike batcher av rekAp1. Hver av batchene rekAp1 ble tilsatt AMP i tre brønner under samme forhold, og gjennomsnittet ble presentert (grønn). Vertikale streker representerer standardavviket for de tre stolpene. Alle prøvene ble inkubert i 60 minutter ved 15°C.

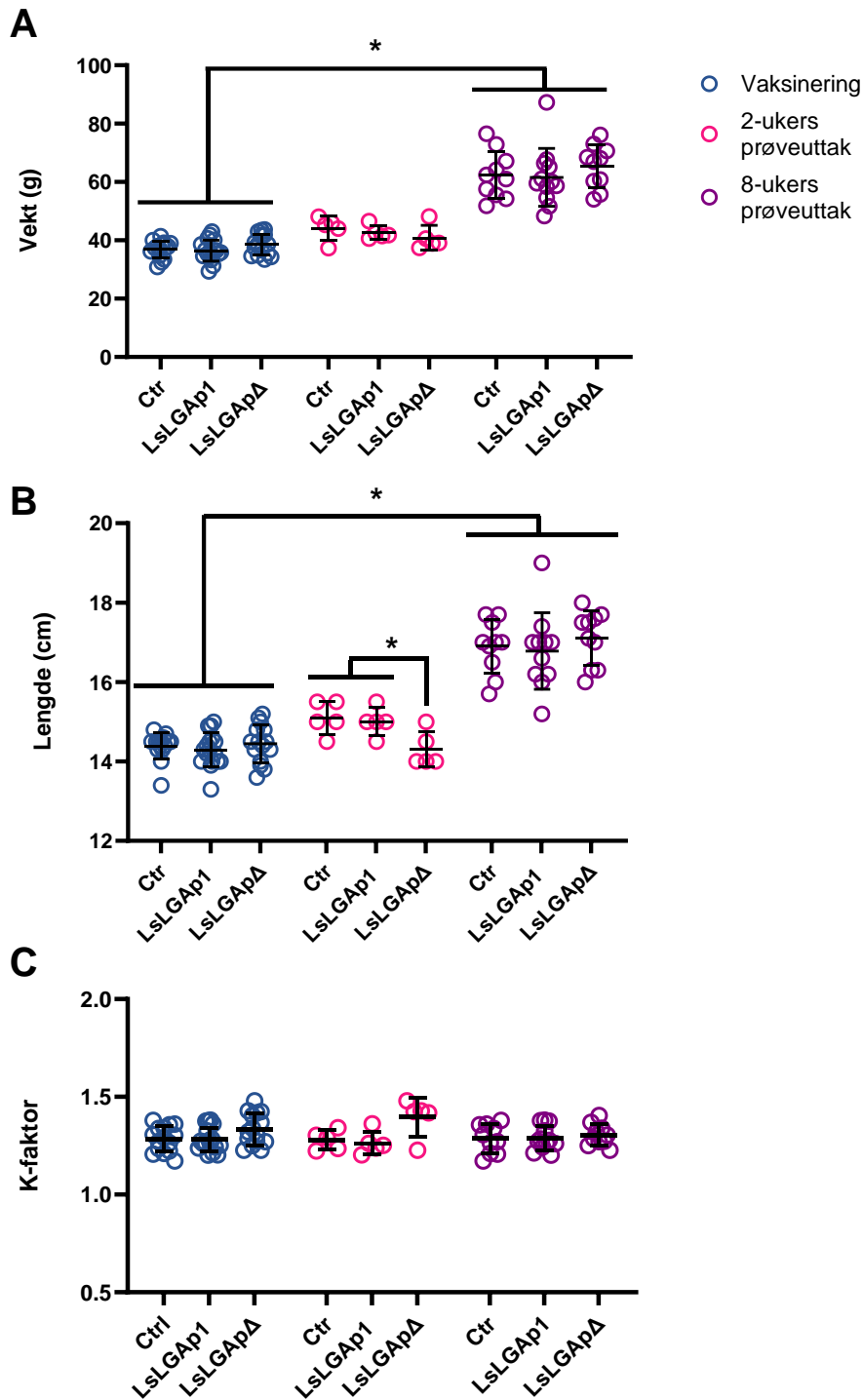
In vivo vaksineforsøk med LsLGAp1

LsLGAp1 sin evne til å indusere antistoffrespons i atlantisk laks etter DNA-vaksinering ble evaluert i *in vivo* vaksineforsøk.

3.3 K-faktor

For å undersøke om fisken hadde en god tilvekst gjennom forsøket ble lengde og vekt målt for hver fisk ved vaksinering og ved begge prøveuttakene. Ved vaksinering hadde fisken en snittvekt på $37,3 \text{ g} \pm 3,4 \text{ g}$ (figur 3.3 A) og snittlengde $14,4 \text{ cm} \pm 0,4 \text{ cm}$ (figur 3.3 B). For å undersøke om fisken hadde en god kondisjon gjennom vaksineforsøket, ble kondisjonsfaktor (k-faktor) beregnet fra lengde og vekt (figur 3.3 C). Alle fiskene viste til en gjennomgående k-faktor på over 1.

Det ble detektert en signifikant forskjell i lengde for fisk i vaksinegruppe LsLGAp Δ sammenlignet med fisk i kontrollgruppen og LgLGAp1 ved to-ukers prøveuttak (merket med *), hvor LsLGAp Δ hadde en signifikant lavere lengde-verdi enn de andre gruppene (figur 3.3 A). Det ble også detektert en signifikant forskjell for alle gruppene ved vaksinering sammenlignet med alle gruppene ved åtte-ukers prøveuttak for lengde og vekt. For k-faktor ble ingen signifikant forskjell detektert mellom de ulike injeksjonsgruppene. LsLGAp Δ har en gjennomsnittlig høyere k-faktor ved to-ukers prøveuttak sammenlignet med kontrollgruppen og LsLGAp1, som et resultat av en signifikant lavere lengde-verdi.



Figur 3.3: Kondisjonsfaktor (K-faktor) (A), lengde(cm) (B) og vekt(g) (C) ved vaksinerings (rosa), 2-ukers prøveuttak (lilla) og 8-ukers prøveuttak (blå). Ctr (kontroll) representerer fisk vaksinert med plasmid uten insert, LsLGAp1 representerer fisk vaksinert med plasmid med villtype LsLGAp1 og LsLGApΔ representerer fisk vaksinert med plasmid med mutert LsLGAp1. Hver ring representerer K-faktor, lengde eller vekt for hver enkelt fisk i hver gruppe. Horisontal strek er gjennomsnittlig verdi, og vertikal strek viser standardavvik. Signifikante forskjeller mellom gruppene og prøveuttakene er merket med *. Det var ingen signifikante forskjeller mellom gruppene for k-faktor eller vekt. Det var signifikant forskjell på lengde mellom fisk i Ctr og LsLGApΔ for 2-ukers prøveuttak. All fisk i forsøket hadde en k-faktor på over 1.

3.4 Genuttrykk av LsLGAp1 i muskel

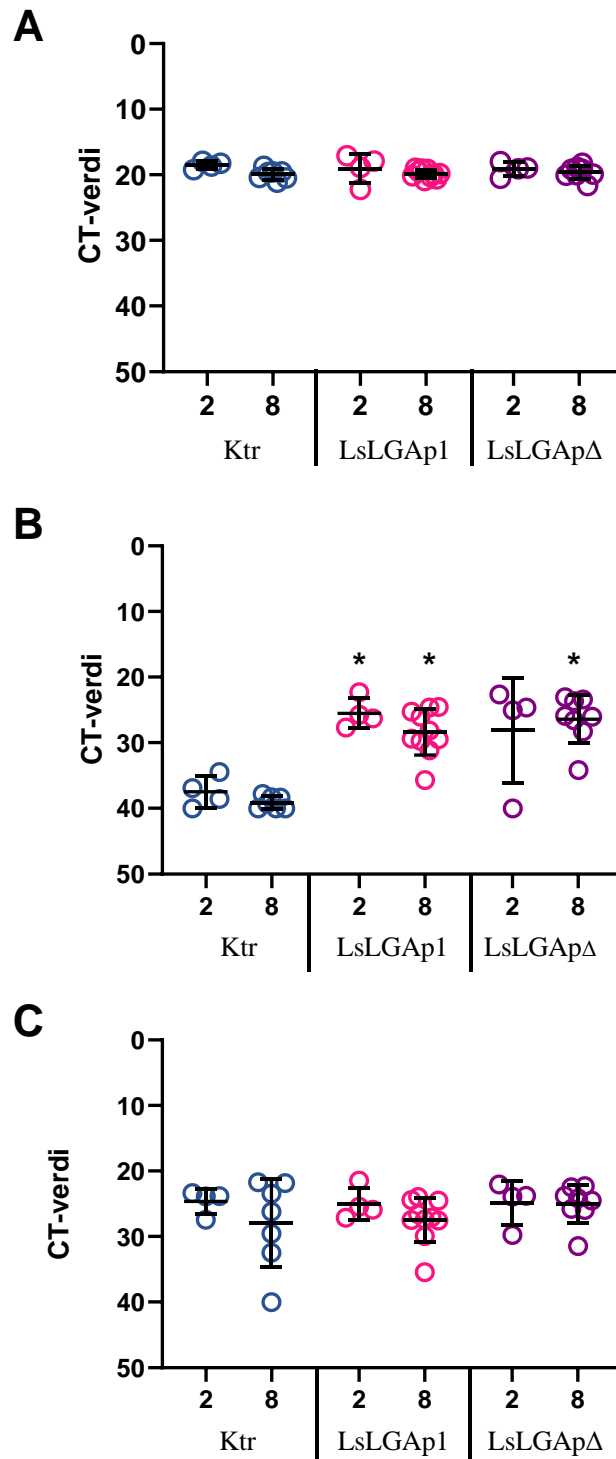
For å undersøke om antigenet ble transkribert i muskulaturen etter vaksinerings ble muskelprøver tatt to- og åtte uker etter vaksinerings. Fra muskelprøvene ble RNA isolert, DNase behandlet og syntetisert til cDNA, før genuttrykket ble målt med sanntids PCR (figur 3.4). For hver kjøring ble det inkludert en NTC, hvor alle NTC-prøvene var negative. Det ble også inkludert -RT-kontroller for alle kjøringene, hvor alle RT-kontroller var negative, samt rensekontroller (RK), hvor en av åtte ble svakt positive (34,225 AsEF1). Alle kontroll-muskelprøver som var inkludert for hver gruppe var negative.

Genuttrykk for AsEF1 ble målt for alle grupper, og injeksjonsgruppene og prøveuttakene ble sammenlignet (figur 3.4 A). Ingen signifikante forskjeller ble detektert for AsEF1 mellom gruppene eller prøveuttakene.

Genuttrykk for LsLGAp1 ble målt for alle grupper, og genuttrykket ble sammenlignet mellom alle tre injeksjonsgruppene. Med utgangspunkt i at en CT-verdi på 37 er negativ og $CT < 37$ er positive prøver fremgår følgende resultater; for kontrollgruppen ble genet uttrykt svakt hos to fisk (34,44 og 36,89) etter to uker, mens genet ikke ble uttrykt i noen fisk etter åtte uker. For LsLGAp1 var genet uttrykt i alle fiskene etter to- og åtte uker, hvor en var svakt positiv (35,67), og antigenet ble gjennomsnittlig mindre uttrykt etter åtte uker enn etter to uker etter vaksinerings. For LsLGAp Δ ble genet uttrykt for tre av fire fisk etter to uker, og alle fiskene etter åtte uker, hvor en er svakt positiv (34,15). I tillegg ble LsLGAp Δ gjennomsnittlig uttrykt mindre to uker etter vaksinerings, da ett individ i gruppe LsLGAp Δ ikke uttrykte antigenet, noe som gjorde at gruppens gjennomsnitt CT-verdien og standardavvik ble noe høyere. For muskelprøver tatt to uker etter vaksinerings var det en signifikant forskjell mellom kontrollgruppen og LsLGAp1 ($P=0,02$). Det ble ikke detektert noe signifikant forskjell mellom kontrollgruppen og LsLGAp Δ ($P=0,05$) etter to uker. For muskelprøvene tatt åtte uker etter vaksinerings var det signifikante forskjeller mellom kontrollgruppen og injeksjonsgruppene LsLGAp1 ($P>0,01$) og LsLGAp Δ ($P>0,01$). Ingen signifikant forskjell ble detektert mellom injeksjonsgruppene LsLGAp1 og LsLGAp Δ etter hverken to- eller åtte uker (Figur 3.4 B).

Alle injeksjonsgruppene var tilsatt plasmid med flagellin som insert, og flagellin er derfor uttrykt i alle gruppene etter to og åtte uker. For kontrollgruppen ble flagellin uttrykt for alle fiskene, med unntak av en fisk etter åtte uker (37,00). For LsLGAp1 ble genet uttrykt i alle fiskene, hvor en var en svak positiv (35,404) etter åtte uker. For LsLGAp Δ ble genet uttrykt i

alle fisk, etter både to og åtte uker. Ingen signifikante forskjeller ble detektert mellom de tre injeksjonsgruppene (Figur 3.4 C).



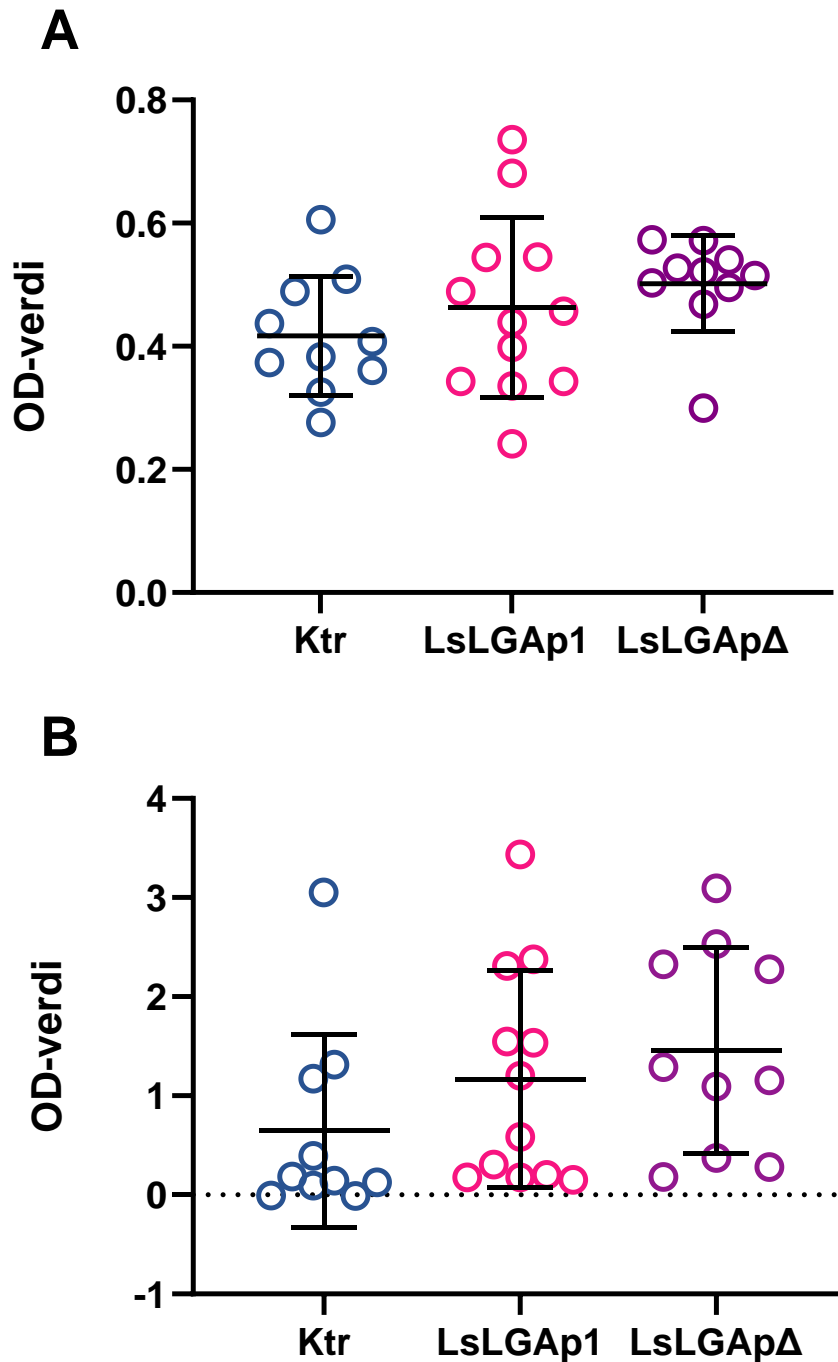
Figur 3.4: Genuttrykk vist som CT-verdier for målgen (LsLGAp1). Genuttrykk ble målt for referanseggen; Atlantic salmon elongeringsfaktor (AsEF1) (A), LsLGAp1(B) og flagellin (C), for muskelprøver tatt 2 og 8 uker etter vaksinerings. Gjennomsnittlig CT-verdi av tekniske duplikater er vist for hver fisk som en ring. Genuttrykket ble målt for injeksjonsgruppene: kontroll (Ktr) hvor fisk ble vaksinert med plasmid uten insert, injisert plasmid med villtypen LsLGAp1 (LsLGAp1) og mutert LsLGAp1 (LsLGApΔ), og sammenlignet. En CT-verdi på 40 og prøver med CT-verdi over 35 hvor det ene duplikatet var ubestemt (undetermined) er satt som negative prøver. Signifikante forskjeller mellom gruppene og prøveuttakene er merket med *.

3.5 Måling av spesifikke anti-LsLGAp1 i plasma

Antistoffrespons mot LsLGAp1 og flagellin ble målt med ELISA med plasmaprøver tatt åtte uker etter vaksinerings, hvor rekombinant LsLGAp1 (rekAp1) (figur 3.5 A) og flagellin (figur 3.5 B) ble brukt som coating. OD-verdi ble målt ved absorbans 450 nm.

OD-verdi målt ved coating med rekAp1 var generelt lav, og henvises derfor videre som OD-verdi istedenfor antistoffrespons. Gjennomsnittlig OD-verdien var litt høyere for vaksinegruppene LsLGAp1 og LsLGAp Δ sammenlignet med kontrollgruppen. Gjennomsnittlig OD-verdi var også litt høyere for LsLGAp Δ sammenlignet med for LsLGAp1. Dersom en noe forhøyet OD-verdi defineres som en OD-verdi over gjennomsnittlig OD-verdi for den aktuelle injiseringsgruppen fremgår følgende resultater: for LsLGAp1 gav fem fisk en noe forhøyet OD-verdi og for LsLGAp Δ gav seks fisk en noe forhøyet OD-verdi (figur 3.5 A). For kontrollgruppen gav også fire fisk en noe forhøyet OD-verdi. Det er imidlertid bare to individer vaksinert med LsLGAp1 som har OD-verdi (OD 0,681 og 0,736) høyere enn den høyeste OD-verdien i kontrollgruppen (OD 0,606).

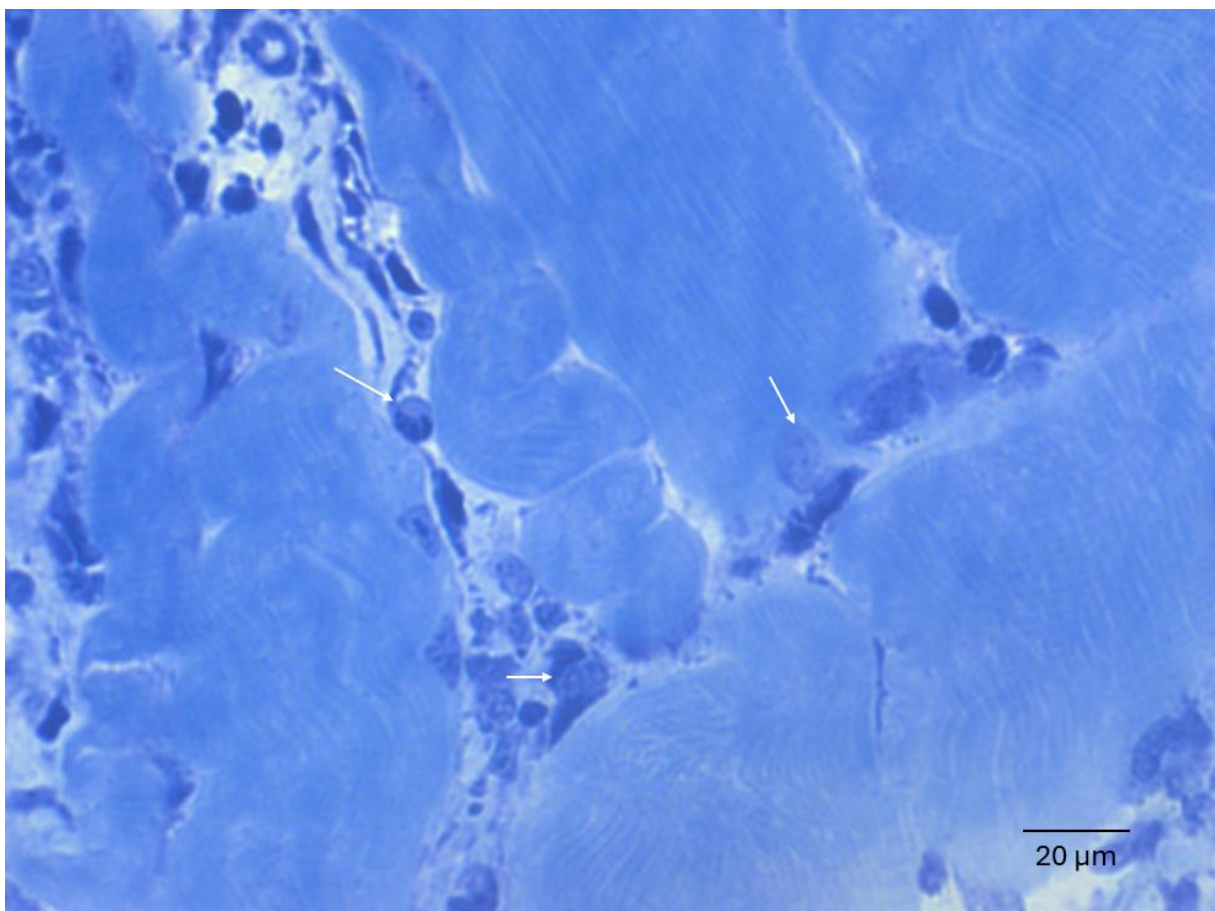
Alle injeksjonsgruppene var tilsatt plasmid med flagellin som insert, og for coating med flagellin var også den gjennomsnittlige antistoffresponsen høyere for vaksinegruppene LsLGAp1 og LsLGAp Δ sammenlignet med kontrollgruppen (figur 3.5 B). Også her var det en noe høyere gjennomsnittlig antistoffrespons for LsLGAp Δ sammenlignet med LsLGAp1. For injeksjonsgruppene LsLGAp1, LsLGAp Δ og kontrollgruppen gav henholdsvis seks, syv og tre fisk betydelig forhøyet antistoffrespons mot flagellin. Ingen signifikante forskjeller ble detektert mellom injeksjonsgruppene kontrollgruppen, villtypen LsLGAp1 (LsLGAp1) og mutert LsLGAp1 (LsLGAp Δ) ved coating med rekAp1 (5 μ g/mL) eller flagellin (5 μ g/mL). Gjennomsnittlig gav coating med flagellin betydelig høyere OD-verdier enn coating med rekAp1, coating med flagellin gav imidlertid også betydelig høyere standardavvik enn coating med rekAp1.



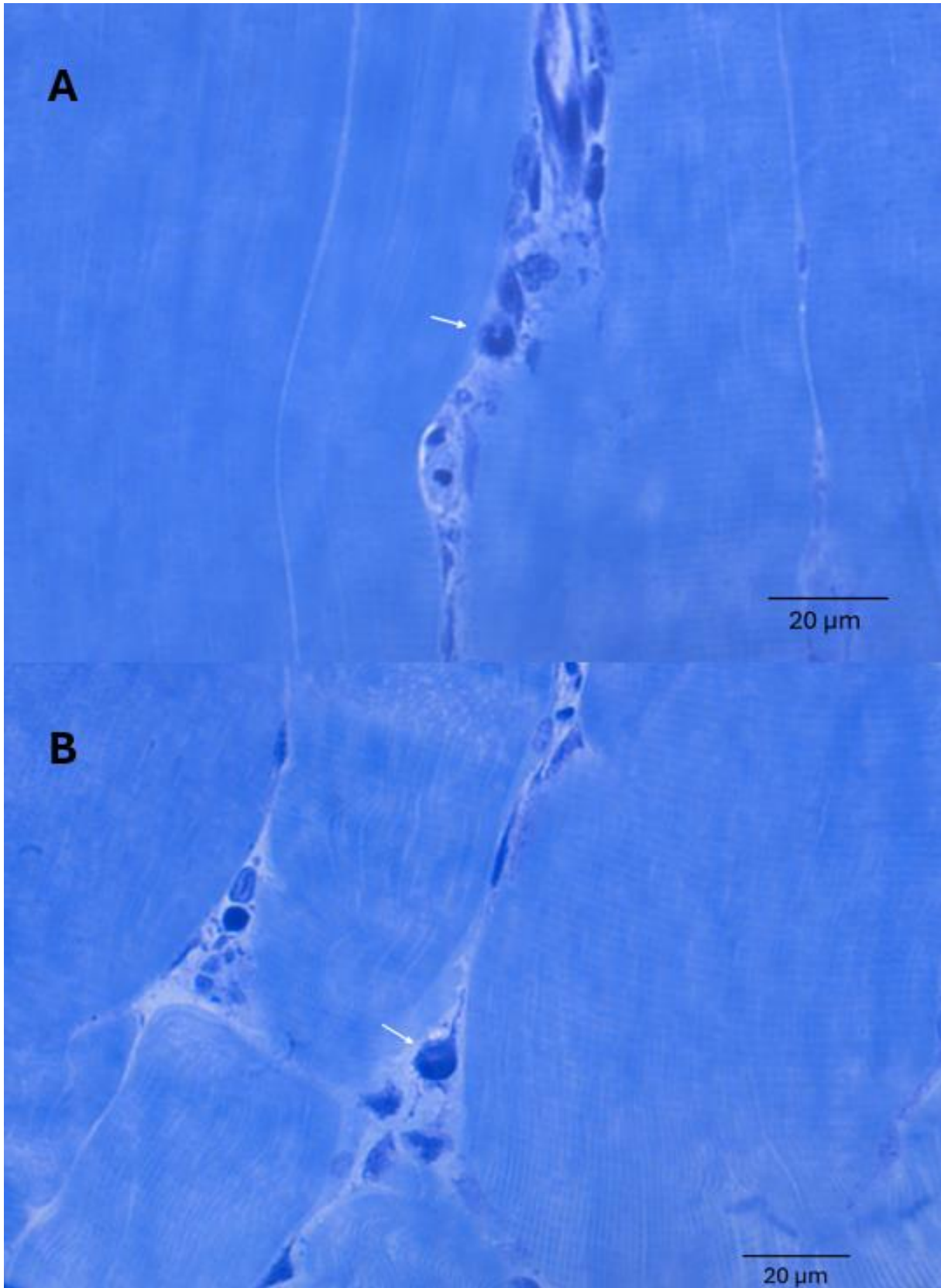
Figur 3.5: Deteksjon av spesifikk antistoffer mot LsLGAp1 og flagellin i plasma. Rekombinant LsLGAp1 (*rekAp1*) (5 $\mu\text{g/mL}$) ble brukt som coating for deteksjon av antistoffer mot LsLGAp1 i plasma (A). Flagellin (5 $\mu\text{g/mL}$) ble brukt som coating for deteksjon av antistoff mot flagellin i plasma (B). Hver OD-verdi er gjennomsnittet av to tekniske replikater, hvor bakgrunnsstøy er trukket fra. En ring representerer en fisk. Gjennomsnittlig OD-verdi er vist med en tjukk horisontal strek, og standardavviket er vist med en vertikal strek.

3.6 Histologi

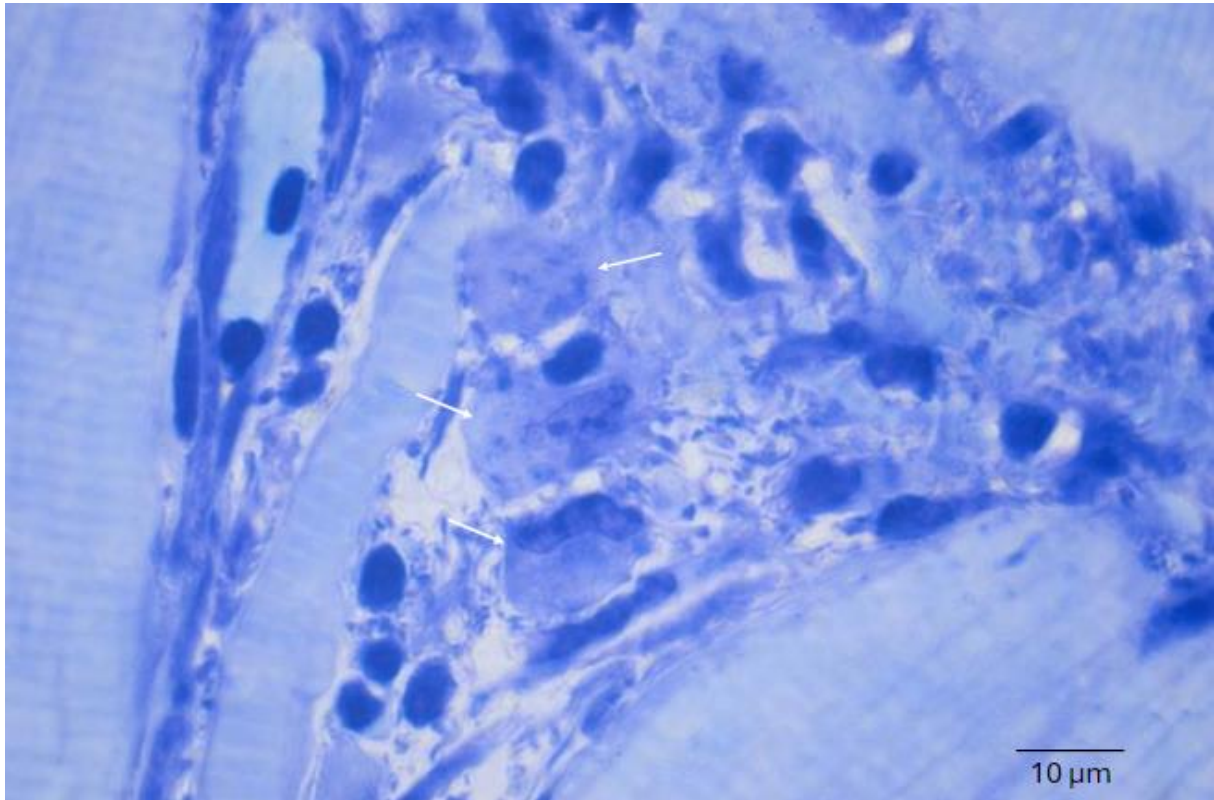
For å kunne visualisere eventuelle immunresponser knyttet til vaksinasjonen ble muskelprøver fra fisk i alle injeksjonsgruppene fra to uker etter vaksinerings støpt inn i plast og farget med toluidinblått. Toluidinblått farger alt blått, som kan gjøre det utfordrende å skille ulike celler fra hverandre. Rundt 100 snitt fra hver injeksjonsgruppe ble undersøkt, og immunceller ble hovedsakelig detektert i kontrollgruppen med flagellin som adjuvans i form av enkelte immunceller i muskulaturen. Ulike immunceller ble detektert i snittene (figur 3.6-3.8), særlig var det en forekomst av monocytytter mellom i muskulaturen (figur 3.7). Det ble ikke detektert immunceller i snitt fra vaksinegruppene LsLGAp1 og LsLGApΔ.



Figur 3.6: Vevssnitt av muskulatur fra lakseparr ved injeksjonsstedet ved intramuskulær injeksjon med plasmid uten insert og flagellin to uker etter vaksinerings. Enkeltimmunceller i muskulaturen tilknyttet til injiseringen. Pilene peker på et utvalg av mononukleære immunceller ved injeksjonsstedet.



Figur 3.7: Monocytter i muskulatur fra lakseparr ved injeksjonsstedet ved intramuskulær injeksjon med plasmid uten insert og flagellin to uker etter vaksinerings. Pilene i A og B peker på monocytter i muskulaturen.



Figur 3.8: Immunceller i muskulatur fra lakseparr ved injeksjonsstedet ved intramuskulær injeksjon med plasmid uten insert og flagellin to uker etter vaksinering. Pilene peker på immunceller i muskulaturen.

4.0 Diskusjon

Til tross for flere tiår med forskning og utvikling av avlusningsmetoder er lakselus fortsatt en stor utfordring i oppdrett av atlantisk laks (Barrett et al., 2020). Metoder for å forhindre luseninfeksjon er derimot mindre forsket på, men kan likevel gi betydelige fordeler sammenlignet med metoder som fokuserer på behandling. En vaksine mot lakselus vil kunne være en viktig og kostnadseffektiv metode for å kontrollere infeksjon med lakselus, og vil kunne støtte en videre vekst for oppdrettsnæringen. Å benytte spyttkjertelproteiner fra lakselus i en DNA-vaksine vil kunne ha et stort potensial da spyttkjertelproteiner virker å ha immundempende egenskaper (Midtbø et al., 2024; Øvergård et al., 2022). I tillegg er DNA-vaksiner trygg med tanke på bivirkninger, samtidig som den induserer både en humoral- og en cellulær immunrespons (Liu, 2011; Tonheim et al., 2008). Spyttkjertelproteinene LsLGAp1 er tenkt å hydrolysere ATP eller AMP og på den måten ha en immundempende funksjon (Midtbø et al., 2024). LsLGAp1 sin evne til å hydrolysere ATP og AMP ble derfor evaluert ved bruk av biokjemiske metoder.

For å undersøke om LsLGAp1 kan være immunogent ble det benyttet i et vaksineforsøk. Å benytte LsLGAp1 som vaksineantigen kan føre til immundemping ved uttrykk av proteinet i cellene dersom det har en immundempende effekt. Det ble derfor inkludert en vaksinegruppe som ble injisert med en mutert type LsLGAp1 (LsLGAp Δ), hvor det aktive setet til apyrasen ble mutert. Målet med studien var å finne ut om LsLGAp1 kan hydrolysere ATP eller AMP, i tillegg til å undersøke om antigenet ble uttrykt av cellene i fisken og en antistoffrespons forekommer. Antistoffresponser tilknyttet flagellin som adjuvans ble også undersøkt.

4.1 Substratspesifisitet hos LsLGAp1

Lakselusens apyrase LsLGAp1 som uttrykkes av spyttkjertelen ser ut til å ha et konstitutivt uttrykk gjennom alle de parasittiske livsstadiene til lusen (Midtbø et al., 2024). Når kopepoditten fester seg på laksen kan det oppstå mekaniske skader i epidermis som vil trigge immunresponser hos laksen (Johnson and Albright, 1991; Jones et al., 1990). Sekresjon av apyraser for å kontrollere immunresponser knyttet til frigjøring av cellulære nukleotider vil da være fordelaktige. Selv om det ikke er bekreftet, forekommer det en mistanke om at LsLGAp1 kan hydrolysere ATP og på denne måten virke immundempende (Midtbø et al., 2024). LsLGAp1 sin evne til å hydrolysere ATP ble derfor undersøkt ved bruk av et luminescense kit. Det var ingen forskjell i ATP-konsentrasjon mellom negativ kontroll og prøver med ATP tilsatt

rekAp1, mens det var en tydelig forskjell i ATP-konsentrasjon mellom negativ kontroll og positiv kontroll, apyrase fra potet. Dette tyder på at ATP ikke ble hydrolysert av LsLGAp1 i dette forsøket. Luminescent ATP Detection Kit (abcam) som ble brukt har utgangspunkt i celler som prøvetype, som i forsøket ble erstattet med rekAp1. Imidlertid ble apyrase fra potet benyttet som positiv kontroll, noe som viste seg å hydrolysere ATP i kitet. At det rekombinante proteinet ikke var kompatibelt med kitet er derfor svært lite trolig, men kan ikke utelukkes.

LsLGAp1 viser en stor likhet med 5'-nukleotidase/CD73-enzymfamilien av apyraser hvor AMP er det foretrukne substratet (Heuts et al., 2012; Midtbø et al., 2024). Ekstracellulært AMP kan hydrolyseres til adenosin som har immundempende effekter. Eksempelvis kan adenosin hemme nøytrofiltilstrømming og frigjøring av reaktive oksygenforbindelser (ROS), og reduserer hudødem i hud hos mennesker (Burnstock et al., 2012). Det er altså fordelaktig for lakselusen å bryte ned AMP til adenosin for å virke immunmodulerende (Midtbø et al., 2024). LsLGAp1 sin evne til å hydrolysere AMP til adenosin ble derfor testet ved bruk av kolorimetri. Det ble derimot ikke vist noen forskjell i AMP-konsentrasjon i prøver med og uten tilsatt LsLGAp1, altså ble AMP ikke hydrolysert av rekAp1.

Atlantisk laks forekommer naturlig fra Nord-Spania i sør til Svalbard i nord, og opplever derfor vanntemperaturer fra under 3 til over 20 °C (Horreo et al., 2011; Jensen et al., 2014). Da atlantisk laks er naturlig vert for lakselus, vil lakselusen også oppleve de samme temperaturvariasjonene (Hamre et al., 2019). ATP og AMP ble derfor inkubert sammen med rekAp1 ved 15 °C, som reflekterer lakselusens naturlige beitetemperatur på laks. Det antas altså at 15 °C er innenfor den aksepterte temperaturoverfølelsesområdet til enzymet, og kan muligens også være temperaturoptimumet til LsLGAp1. Etersom det er usikkert om LsLGAp1 kan hydrolysere ATP er det stor usikkerhet rundt hvilken konsentrasjon av LsLGAp1 som burde benyttes for forsøket. For begge forsøkene ble det derfor testet ut to ulike konsentrasjoner av rekombinant LsLGAp1 (rekAp1), som ikke viste seg å utgjøre noe forskjell. To ulike batcher av det rekombinante proteinet ble benyttet for forsøkene (rekAp1A og rekAp1B). RekAp1A ble benyttet for å detektere eventuell hydrolysering av ATP og AMP, i tillegg til at rekAp1B ble benyttet for å detektere eventuell hydrolysering av AMP. RekAp1A og rekAp1B hadde ulike konsentrasjoner, henholdsvis 0,41 mg/mL og 2,00 mg/mL, og da det ble tilsatt 1 µL av rekAp1A og rekAp1B i løsningene med apyrasen, var konsentrasjonen for rekAp1A og rekAp1B i forsøkene ulike. Tilhørende SDS-PAGE og Western Blot til begge batchene levert av produsenten (ThermoFisher) viste derimot til en del urenheter med andre proteiner av rekAp1A og rekAp1B (se vedlegg 8.2). Det er derfor ingen sikkerhet knyttet til den faktiske

konsentrasjonen av rekAp1, og den reelle konsentrasjonen rekAp1 vil trolig være mye lavere enn konsentrasjonen som er oppgitt for forsøkene. At konsentrasjonen av rekAp1 er for lav i løsningen kan derfor være en mulig grunn til at ATP eller AMP ikke ble hydrolysert. Det skulle imidlertid tenkes at å inkubere prøvene i en time skulle være tilstrekkelig tid for at noe ATP skulle bli hydrolysert, selv med lite rekAp1 i løsningen. Da dette ikke var tilfelle og det er derfor usikkert om å øke konsentrasjonen vil kunne hjelpe, men det kan ikke utelukkes.

pH-optimumet til ethvert protein er individuelt og må analyseres (Tipton and Dixon, 1979). Optimal pH for lakselusens LsLGAp1 er ukjent, men det kan derimot tenkes at den optimale pH for LsLGAp1 er tilsvarende pH-en i hud og muskulatur til laksefisk. Sjøvann har en varierende pH mellom 7,95 og 8,35, som kan påvirkes av blant annet temperatur og geografisk lokasjon, (Haugan and Drange, 1996; Wang et al., 2023), mens muskulaturen til atlantisk laks vanligvis har en pH på rundt 7,5 hos frisk fisk (Erikson and Misimi, 2008). Det kan derfor antas at huden til atlantisk laks har pH på rundt 7,5-8,3, og det vil derfor være naturlig at dette er pH optimumet til LsLGAp1. Da apyraser er Ca^{2+} avhengige enzymer ble apyrase reaction buffer tilsatt i begge kitene, med en pH på litt over 6,1. Oppskriften som ble fulgt for å lage apyrasebufferen antydte at bufferen skulle ha en pH på 6,5, noe som ikke var tilfellet da bufferen ble laget, og det ble derfor tilsatt noe NaOH, som gav den endelige pH-verdien på litt over 6,1. pH er ikke oppgitt for kitene eller noen av løsningene i kitene, så endelig pH-verdi på løsningene kan bare antas til være noe nærmere 6,1. Da pH i hud og muskel hos laksefisk er noe høyere enn antatt pH for løsningene i forsøkene, kan antatt pH i løsningene i forsøkene mulig være for lave for apyrasen. Dette er derimot vanskelig å konkludere med da pH ikke er oppgitt, men det kan heller ikke utelukkes at pH kan ha påvirket apyrasens eventuelle hydrolysering.

RekAp1 er produsert i eukaryote insektsceller, og det er en mulighet for at det ikke er foldet riktig da det inneholder cysteiner som danner intramolekylære disulfidbroer (Midtbø et al., 2024) som bidrar til å opprettholde proteiners tredimensjonale struktur (Brocchini et al., 2008). Strukturen til LsLGAp1 i lakselus er derimot fortsatt ukjent, noe som gjør at man ikke har noe å ta utgangspunkt i. Dersom proteinet ikke er foldet korrekt, vil det imidlertid trolig miste de enzymatiske egenskapene sine, og vil ikke kunne hydrolysere ATP eller AMP. I dette forsøket ble det altså ikke vist at rekombinant LsLGAp1 kan hydrolysere ATP eller AMP. Mistanken om at LsLGAp1 er immundependende er derimot ikke til å utelukke. Humane blodplater inneholder apyrase (EC 3.6.1.5) som er Ca^{2+} -avhengig og som i tillegg til å hydrolysere ATP og ADP også hydrolyserer GTP, ITP, CTP, GDP, IDP og CDP, mens det ikke hydrolyserer AMP (Pilla et al., 1996). Det er derfor mulig at LsLGAp1 hydrolyserer noe annet enn ATP eller AMP, og på den

måten virker immundempende på verten. Da egenskapene til LsLGAp1 er ukjent kan hovedeffekten være mange, og forskning på å belyse substratspesifisiteten til LSLGAp1 er derfor nødvendig for å gi ytterligere indikasjoner om dets funksjon på beitestedet til lakselus.

4.2 Kondisjon ved vaksinerings mot LsLGAp1

Gjennom vaksineforsøket ble fiskens velferd og vekst fulgt opp, særlig tilknyttet elektroporeringen, da dette ser ut til å bare ha blitt gjennomført på lakseparr en gang tidligere (Skiftesvik Høyvik, 2024).

Gjennom vaksineforsøket er det tydelig at fiskene har økt i vekt, noe som indikerer en god appetitt. Kondisjonsfaktor (K-faktor) er et standardmål som indikerer fiskens velferd gjennom å vurdere dens kondisjon- og ernæringsstatus (Bolger and Connolly, 1989). Generelt vil k-faktor $< 0,9$ indikere avmagret fisk med dårlig kondisjon (Stien et al., 2013). Gjennom vaksineforsøket hadde alle fiskegrupper en gjennomsnittlig k-faktor > 1 , som indikerer god kondisjon, og ingen av individene hadde k-faktor $< 0,9$. Ekstremt høy k-faktor ($> 1,6$) er nødvendigvis heller ikke bra for fisken, og kan også tyde på misdannelser. Det var ingen signifikante forskjeller i k-faktor mellom gruppene eller mellom målingene. For vekt og lengde var det en signifikant forskjell fra vaksinerings til åtte-ukers prøveuttak for alle gruppene, som indikerer en god tilvekst for fisken. I tillegg var det en signifikant forskjell mellom LsLGAp Δ og de to andre gruppene i lengde ved to-ukers prøveuttak, hvor LsLGAp Δ har en signifikant lavere gjennomsnittslengde sammenlignet med de to andre gruppene. Tilsvarende kommer ikke frem i vekt, noe som tyder på at fisken har økt i vekt uten å øke tilsvarende i lengde. Dette fører til en økt gjennomsnittlig k-faktor for LsLGAp Δ sammenlignet med de andre gruppene ved to-ukers prøveuttak, men viste ingen signifikant forskjell. Den begrensede veksten fra vaksinerings til to-ukers prøveuttak for gruppe LsLGAp Δ kan komme av stress ved håndtering av fisken eller som bivirkning av vaksinen. Ingen medisinsk behandling er uten ugunstige risikoer, og injeksjonsvaksinerings krever at fisken håndteres, bedøves og injiseres med ulike substanser, f.eks. adjuvans (Midtlyng, 1997), noe som kan føre til stress hos fisken. Stress kan hindre vekst ved å utskille metabolske effekter og ved å påvirke de endokrine veiene som regulerer vekst (Lockridge, 1981). Dersom det derimot er et resultat av stress knyttet til håndtering, bedøvelse eller selve vaksinstykket, ville det sannsynligvis gjeldd alle gruppene, noe som ikke er tilfellet her. Den begrensede veksten kan komme som et resultat av injisert LsLGAp Δ , men ettersom veksten øker betydelig til åtte-ukers prøveuttak, er dette mindre sannsynlig, selv om det ikke kan utelukkes. Lengde

blir bare lest av på hele eller halve cm, og målingene av lengde er derfor ikke like nøyte som av vekt, noe som fører til at det relativt fort kan gi utslag på k-faktor hos små fisk. Da det er bare tre individer som har en mindre lengde enn de andre gruppene, og det bare ble samlet fem individer totalt for den gruppen etter to uker, er det en stor sannsynlighet for at dette bare er basert på tilfeldigheter.

Kondisjonsfaktor er som nevnt en standard målenhet for ernæringsstatus, og sier noe om forholdet mellom lengde og vekt hos fisken (Stien et al., 2013). Det sier derimot lite om fiskens kondisjon ellers. Ved håndtering av fisken ble den undersøkt og det ble ikke observert noen tydelige skader, sår eller tegn til begrenset kondisjon.

4.3 Genuttrykk av LsLGAp1

For at en DNA-vaksine skal være effektiv, er det en forutsetning at antigenet som plasmidet koder for uttrykkes av vertscellene i laksemuskulaturen. Total-RNA ble isolert fra muskelprøvene, syntetisert til cDNA og det relative uttrykket av LsLGAp1 ble målt med sanntids PCR. At genet er uttrykt av vertens muskelceller indikerer at plasmidet som ble injisert har kommet inn til cellekjernen og det kodede antigenet har blitt transkribert av laksens egne celler både etter to og åtte uker etter injeksjon. LsLGAp1 og LsLGAp Δ ble sterkt uttrykt i flere av prøvene fra injisert muskel med en CT-verdi tilnærmet lik referansegenet. To av fire prøver fra kontrollgruppen som ikke ble injisert med vaksineantigen ble imidlertid svakt positive ved to uker, noe som trolig indikerer kontaminering under prosessen fra vevsbit til ferdig kjørt sanntids PCR. Grunnet to svake positive rensekontroller, ble negativ prøve satt til å være CT 37 for dette forsøket, for å utelukke eventuelle bakgrunnsstøy og forurensinger som kan gi svakt positive prøver. Signalpeptidet tilhørende proteinet ble også inkludert i selve konstruktet i pDNAet for å øke utskillelsen av plasmidkodet antigen fra cellene, hvor de kan tas opp av profesjonelle APC. Det kan da fremkalle en bedre antigenspesifikk-antistoffrespons sammenlignet med cytosolsk antigen (Wang et al., 2011).

I en studie hvor uttrykket for pDNA ble testet over lengre tid ble pDNA funnet uttrykt i injisert muskel hos atlantisk laks hele 535 dager etter injisering (Tonheim et al., 2007). Selv om uttrykket av pDNA var vedvarende, ble mengden pDNA generelt redusert i alle vev gjennom studien. Denne nedgående trenden kommer også frem for LsLGAp1 mellom to og åtte uker, da det forekommer en reduksjon i genuttrykk. For LsLGAp Δ forekommer derimot en liten gjennomsnittlig økning i genuttrykk fra to til åtte uker etter vaksiner. Dette er trolig et resultat

av at én fisk i gruppen LsLGAp Δ etter to uker ikke uttrykker genet, noe som dro den gjennomsnittlige CT-verdien veldig ned. Ser man derimot bort i fra fisken som ikke uttrykker genet, har fisken generelt en lavere CT-verdi ved to uker enn ved åtte uker, og genet uttrykkes mer ved to uker, slik som forventet. Ved prøveuttak kan det også være utfordrende å treffe nøyaktig ved stikkstedet av muskelen. Det er derfor mulig at mRNA-et kan være uttrykt sterkere hos flere fisk enn det som kommer frem for dette forsøket.

For at uttrykt LsLGAp1 og LsLGAp Δ skal indusere antistoffproduksjon må det kodede antigenet translateres til immunogene proteiner etter transkripsjon. Da sanntids PCR bare bekrefter om mRNA til proteinet uttrykkes, kan det ikke bekreftes at selve proteinet er uttrykt hos fisken. For å teste om selve proteinet blir uttrykt kan andre biokjemiske metoder benyttes, som for eksempel Western blot (Eaton et al., 2013). På grunn av mangel på primære antistoffer mot LsLGAp1 ble Western blot imidlertid ikke gjennomført.

4.4 Antistoffrespons mot LsLGAp1

Å få en antistoffproduksjon ved vaksinerings er essensielt for at vaksinen skal gi beskyttelse mot antigenet (Cui, 2005). Ved prøveuttak ble det derfor tatt prøver av plasma åtte uker etter vaksinerings, og antistoffkonsentrasjonen for LsLGAp1 og flagellin ble målt med ELISA. Antistoffkonsentrasjonen mot LsLGAp1 var lav for begge vaksinegruppene, selv om det var noen individer som viste en noe forhøyet OD-verdi sammenlignet med kontrollgruppen. Likevel forekommer en liten økning i antall individer med en forhøyet antistoffkonsentrasjon mot LsLGAp Δ sammenlignet med LsLGAp1. LsLGAp1 er tenkt å ha en immundempende effekt på laksen (Midtbø et al., 2024). Når villtypen LsLGAp1 ble injisert kan proteinet som translateres være immundempende, og dermed hindre den humorale adaptive immunresponsen som er ønsket med DNA-vaksine. LsLGAp1 ble derfor mutert i det aktive setet for å hindre en eventuell immundempende effekt, noe som mulig kan forklare den lille økningen i gjennomsnittlig antistoffkonsentrasjon for den muterte LsLGAp1. Antistoffkonsentrasjonen mot flagellin var høyere for alle gruppene sammenlignet med antistoffkonsentrasjonen mot LsLGAp1. Det var store variasjoner i antistoffkonsentrasjon innad i gruppene, med en liten økning i antall individer med en forhøyet antistoffkonsentrasjon mot LsLGAp1 og LsLGAp Δ sammenlignet med kontrollgruppen. Antistoffkonsentrasjon mot flagellin vil ofte korrelere med antistoffproduksjonen av antigenet som injiseres ved vaksinerings (pers. kommentar, Aina-Cathrine Øvergård), noe som også gjenspeiles i dette forsøket.

For å få en god immunrespons ved vaksinerings er høy immunogenisitet av antigenet nødvendig (Zhang and Tao, 2015). Størrelse på antigenet er en viktig faktor for at det skal være immunogent (Gomes et al., 2017). LsLGAp1 er et relativt lite protein med molekylvekt på 60,2 kDa (Midtbø et al., 2024), noe som kan gjøre det mindre immunogent. I vaksineforsøket forekommer en lav antistoffproduksjon mot LsLGAp1, til tross for at genet uttrykkes i muskulaturen hos de fleste individene injisert med LsLGAp1 og LsLGAp Δ , noe som kan tyde på at antigenet er lite immunogent. Det er derimot ikke tenkt at det er dette som er hovedgrunnen til den manglende antistoffresponsen.

Rekombinant LsLGAp1 (rekAp1) ble benyttet som coating ved gjennomføring av ELISA, og som tidligere nevnt er dette et svært urent protein med flere ukjente proteiner til stede. Dette kan trolig påvirke den indirekte målingen av antistoffresponsen ved at andre proteiner binder seg uspesifikt til antistoffene med lav affinitet, noe som kan føre til den manglende antistoffmålingen mot LsLGAp1. Det ble detektert høye antistoffresponser for alle injeksjonsgruppene mot flagellin, noe som tyder på at plasmidene har blitt transkribert og translatert og at det har blitt dannet antistoffer. Dette kan forsterke mistanken om at det forurensede rekAp1 ikke ville kunne binde spesifikt til potensielle antistoffer mot LsLGAp1 ved ELISA og måle en reell antistoffrespons. Til tross for at det også kan komme som et resultat av forskjeller i immunogenisitet mellom flagellin og LsLGAp1. Det er også usikkert om å øke konsentrasjonen av rekAp1 vil hjelpe, da konsentrasjonen av de forurensende proteinene også vil øke. En økt konsentrasjon av rekAp1 burde derfor testes videre som coating i ELISA, og ikke utelukkes før det er forsøkt. Å rense rekAp1 eller benytte et mindre forurenset rekombinant LsLGAp1 som coating i ELISA kan trolig føre til at mer av rekAp1 bindes spesifikt til antistoffene mot LsLGAp1, som da trolig vil gi en forhøyet og reell antistoffrespons. På grunn av den ukjente strukturen til LsLGAp1 og utfordringer knyttet til å produsere det, er DNA-vaksine et godt utgangspunkt da vertscellen selv transkriberer og translaterer proteinet, noe som forhåpentligvis vil føre til riktig folding av proteinet. Dette er derimot ikke sikkert, og det er stor usikkerhet i hvordan proteinet foldes. Fisken ble også elektroporert umiddelbart etter vaksinerings, noe som skal øke uttrykket i muskelvev og som mulig kan øke immunresponsen mot antigenet (Widera et al., 2000). Da alle injeksjonsgruppene ble elektroporert og det ikke ble inkludert en kontrollgruppe uten elektroporering, er det vanskelig å si noe om elektroporeringen har gitt økt immunrespons mot LsLGAp1. Elektroporeringen i seg selv var derimot ikke nok til å indusere en betydelig immunrespons for dette forsøket.

Lakselusen fester seg på huden til fisken og beiter på epitel og slim (Johnson and Albright, 1992), og det er derfor ønskelig at en DNA-vaksine mot LsLGAp1 skal sekretere antistoffer ut i den mukosale overflaten til fisken. Tre klasser immunoglobulin (Ig) er identifisert i teleoster: IgM, IgD og IgT, hvor IgM er den mest utbredte Ig i plasma, men har også vist seg å være involvert i slimhinneresponser (Xu et al., 2013). IgT forekommer i større grad i slim enn i serum og anses som et slimhinneantistoff, i tillegg til at det virker å være analogt med IgA hos pattedyr (Zhang et al., 2010). Antistoffreagenser for å måle IgT-responser er derimot manglende, noe som har ført til at de fleste studier har basert seg på IgM-responser (Parra et al., 2016). I dette forsøket ble også bare IgM-responsen målt, og en antistoffrespons mot IgT kan derfor ikke utelukkes. Nivåer av IgM i slim hos laks er vist å ha en signifikant positiv korrelasjon med tilsvarende IgM-verdier i serum hos samme fisk (Tartor et al., 2020). Effekten av vaksiner som er ment å gi antistoffrespons i slim avhenger altså ikke bare av immunogenisiteten til selve antigenet, men også tilgjengeligheten av dette antigenet for slimhinneimmunceller (Muñoz-Atienza et al., 2021). Dette tyder på at det kreves en veldig høy antistoffkonsentrasjon mot LsLGAp1 i plasma for at en tilstrekkelig antistoffkonsentrasjon i slim oppnås. Ettersom antistoffkonsentrasjonen mot LsLGAp1 viste seg å være svært lav i plasma, ble det ikke gjort noen målinger av antistoffrespons i slim i forsøket.

4.5 Histologiske immunresponser

Fra de histologiske snittene to uker etter vaksinerings ble det ikke observert mange immunceller, noe som kan tyde på at det ikke har oppstått en stor immunrespons tilknyttet vaksinerings. Det er imidlertid vanskelig å treffe muskulaturen akkurat ved stikkstedet under prøveuttaket, i tillegg til at bare liten bit av muskelen snittes når histologiske snitt prepareres. Det er derfor stor sannsynlighet for at stikkstedet ikke ble tatt prøver av eller snittet i, som fører til at den reelle immunresponsen ikke kommer tilstrekkelig frem. I tillegg ble snittene fra vaksinegruppene LsLGAp1 og LsLGAp Δ snittet vertikalt gjennom hud og muskel. Snittene fra kontrollgruppen ble derimot snittet horisontalt over huden og nedover i muskulaturen, noe som vil gjøre det lettere å dekke en større overflate av muskulaturen rundt injeksjonsstedet. Det er trolig dette som er grunnen til det er blitt observert immunceller i snitt fra kontrollgruppen sammenlignet med vaksinegruppene.

Snittene var også noe hullete, og huden har løftet seg fra muskelen ved preparering av snittene. Muskulaturen har trolig ikke blitt tilstrekkelig preservert, enten som et resultat av at

muskelbitene var for stor da de ble fiksert i karnovsky-løsningen, eller at de ikke har blitt tilstrekkelig infiltrert i Technovit 7100, til tross for at protokollen ble fulgt. På grunn av at snittene var skjøre og lett ble ødelagt ble de farget med toluidinblått, som er en mer skånsom fargemetode enn hematoxylin-eosin (HE) farging som trolig ville gjort mer skade på de allerede hullede snittene. HE-farging er den grunnleggende histologiske fargingen for generell vurdering av celle- og vevsmorfologi og distribusjon, og farger cellekjerner blå-lilla og bruskmatriks rosa, med et blåaktig utseende i områdene med høyt proteoglykaninnhold (Schmitz et al., 2010). I motsetning er toluidinblått et kationisk fargestoff som farger proteoglykaner og glykosaminoglykaner blått, noe som gjøre det vanskeligere å skille de ulike komponentene enn ved bruk av HE-farging. Det ble altså observert lite immunrespons hos individene injisert med LsLGAp1 og LsLGAp Δ , mens det for kontrollgruppen med flagellin var enklere å se immunresponsene.

4.6 Immunogenisitet med flagellin

Utilstrekkelig immunogenisitet er en utfordring ved bruk av DNA vaksine (Li and Petrovsky, 2016), og det kan derfor være lurt å benytte adjuvans i vaksinen for å indusere sterkere immunresponser (Scheerlinck, 2001). Flagellin ble derfor benyttet som adjuvans da det kan virke som et patogen-assosiert molekylært mønster (PAMP) og aktivere både det medfødte og det adaptive immunforsvaret (Cui et al., 2018; Honko and Mizel, 2005). Flagellin ble brukt som adjuvans for vaksine med LsLGAp1 og LsLGAp Δ , i tillegg til at det ble tilsatt i kontrollgruppen for å undersøke om det vil gi en forskjell i immunrespons i kombinasjon med og uten et antigen. I histologiske snitt fra kontrollgruppen kommer immuncellene i muskulaturen tydelig frem, altså har flagellin trolig induert en immunrespons, noe som kan forventes. Bruken av adjuvans har vist seg å kunne gi en humoral respons både i plasma og slim hos tilapia (Grabowski et al., 2004), og flagellin har vist seg å være en effektiv systemisk- og mukosal adjuvans i mus (McEwen et al., 1992), noe som støtter opp bruken av flagellin som adjuvans. I vaksineforsøket var det imidlertid ikke en kontrollgruppe uten flagellin som for sammenligning, og det er en mulighet for at enkelte immunceller kan forekomme i muskulaturen uten at en immunrespons er induert.

Som tidligere nevnt ble flagellin uttrykt i alle tre injeksjonsgruppene, med den samme nedgangen i genuttrykk fra to til åtte uker som vist i Tonheim et. al., 2007. Antistoffkonsentrasjonen mot flagellin var derimot noe mer varierende, hvor ett til flere individer per injeksjonsgruppe har en tilstrekkelig antistoffrespons mot flagellin, som ikke

gjenspeiles for LsLGAp1 og LsLGAp Δ . Som tidligere nevnt vil antistoffkonsentrasjonen mot flagellin i noen tilfeller korrelere med antistoffproduksjonen av antigenet som injiseres ved bruk av enkelte antigen (pers. kommentar, Aina-Cathrine Øvergård). Dette gjenspeiles for de ulike injeksjonsgruppene i vaksineforsøket, i tillegg til noen enkeltindivider; eksempelvis har fisken med høyest antistoffrespons mot LsLGAp Δ også høyest antistoffrespons flagellin. Ett av individene med svakt forhøyet antistoffkonsentrasjon mot LsLGAp1 har også svært forhøyet antistoffkonsentrasjon mot flagellin. I motsetning har individet med høyest antistoffkonsentrasjon mot LsLGAp1 svært lav antistoffkonsentrasjon mot flagellin. Det er imidlertid vanskelig å argumentere om dette er tilfellet da antistoffkonsentrasjonene mot LsLGAp1 og LsLGAp Δ ikke er tilstrekkelige og mulig heller ikke reelle. Sammenhengen hadde trolig enklere å observere dersom antistoffkonsentrasjonen av LsLGAp1 og LsLGAp Δ hadde vært tilstrekkelig.

Det er ikke noen sammenheng mellom LsLGAp1 og LsLGAp Δ uttrykt i cellene og antistoffkonsentrasjon mot LsLGAp1 og LsLGAp Δ , noe som trolig kan påvirkes av manglende antistoffkonsentrasjon. Det er derimot heller ikke sett noen sammenheng mellom flagellin uttrykt i cellene og antistoffkonsentrasjon mot flagellin.

4.7 Ethiske vurderinger knyttet til vaksineforsøk med fisk

Fisk brukes i et bredt spekter av vitenskapelige studier, fra forskning med potensielle fordeler for arten som brukes i forskningen, til forskning med potensielle menneskelige fordeler (Sloman et al., 2019). Forsøk på fisk kan foregå både i laboratorier og feltmiljø, og metodene som benyttes kan variere fra ikke-invasive observasjoner, håndtering og eksperimentell manipulasjon. Det er nå et økende press på det vitenskapelige miljøet om å ta mer ansvar for dyrene som jobbes med gjennom å maksimere fordelene av forskning, samt å ta hensyn til helse og velferd for forsøksdyrene som brukes. Dette forsøket ble derfor gjennomført i henhold til dyrevelferdsloven, samt godkjent av mattilsynet. Å gjennomføre vaksineforsøk med formål om å en dag forbedre oppdrettet fisks helse og velferd går i dag på bekostning av livene til forsøksfisk. Det er derfor viktig at det ikke benyttes flere forsøksdyr enn det som er nødvendig for å få tilstrekkelige resultater. Ideelt sett ville et større vaksineforsøk gitt et mer representativt resultat, noe som begrenses av antall forsøksfisk som må gå tapt. Det ble derfor vaksinert 15-17 lakseparr per injeksjonsgruppe, og brukt totalt 47 lakseparr for dette forsøket.

5.0 Videre arbeid

I denne studien ble lakselusens spyttkjertelprotein LsLGAp1 sin evne til å hydrolysere ATP eller AMP testet uten at dette ble bevist. Videre arbeid med LsLGAp1 kreves for å kartlegge blant annet substratspesifisitet og egenskaper, noe som trolig vil gi videre indikasjoner om LsLGAp1 sin funksjon ved lusens beitestet på verten. Det var ingen sikkerhet knyttet til den faktiske konsentrasjonen av det urene rekAp1 som ble brukt i forsøkene, og en for lav konsentrasjonen av rekAp1 kan derfor være en grunn til at ATP eller AMP ikke ble hydrolysert. Å gjenta forsøkene med en betydelig høyere konsentrasjon rekAp1 vil derfor være en mulighet, for å undersøke om LsLGAp1 ville kunne hydrolysere ATP eller AMP. Å gjenta forsøkene med et renere rekombinant LsLGAp1 for disse forsøkene kan også være en mulighet. Å gjenta forsøkene med rekAp1 med en pH nærmere det som forekommer i hud og muskel hos laks, er også en mulighet for å undersøke om apyrasen begrenses av pH. I tillegg er det mulig å benytte andre kanskje mer kompatible kit for å undersøke den eventuelle hydrolysen av ATP eller AMP. På denne måten kan det undersøkes om det er rekAp1 som begrenser hydrolyseringen av ATP eller AMP. Å undersøke substratspesifisiteten til LsLGAp1 ved å teste om det kan hydrolysere andre nukleotider er også relevant for videre arbeid med apyrasen. Basert på om rekombinant LsLGAp1 da vil hydrolysere ATP, AMP eller noen helt andre nukleotider vil nye vurdering kunne tas for veien videre.

I vaksineforsøket gav vaksinene mot LsLGAp1 og LsLGAp Δ (mutert LsLGAp1) ingen antistoffrespons i plasma, som trolig er et resultat av at rekAp1 ble brukt som coating ved ELISA. Da rekAp1 er forurenset kan dette trolig påvirke målingen av antistoffrespons ved at andre proteiner binder seg uspesifikt til antistoffene, noe som kan føre til den manglende antistoffmålinger mot LsLGAp1. Å benytte et renere rekombinant LsLGAp1 som coating ved ELISA vil dermed kunne gi mer reelle antistoffmålinger. På denne måten kan det undersøkes om det er rekAp1 som coating som hindrer antistoffmålinger, eller om det er mangel på immunogenisitet hos LsLGAp1 som ikke induserer antistoffrespons ved vaksinerings. Ved sanntids PCR ble det bekreftet at genet for både LsLGAp1 og LsLGAp Δ ble uttrykt av muskelcellene til laksen, men dette bekrefter bare at mRNA ble transkribert, og ikke at proteinet ble translert. For å undersøke om proteinet, og ikke bare mRNA, i DNA-vaksinen ble uttrykt i muskulaturen kan biokjemiske metoder som for eksempel Western blot benyttes (Eaton et al., 2013). Med denne kunnskapen vil man kunne gjøre nye vurderinger for veien videre for LsLGAp1 som vaksineantigen.

Flagellin ble benyttet som adjuvans da det kan virke som et patogen-assosiert molekylært mønster (PAMP) og aktivere både det medfødte og det adaptive immunforsvaret (Cui et al., 2018; Honko and Mizel, 2005). Plasmid med flagellin og plasmid med LsLGAp1 ble blandet sammen for å danne vaksinen, noe som er ment å gi økt immunrespons. Ved å fusjonere flagellin sammen med antigenet er imidlertid vist å gi en enda bedre immunrespons ved å stimulere antigenpresenterende celler, noe som resulterer i modning av APC og utskillelse av proinflammatoriske cytokiner (Cuadros et al., 2004). Antigen fusjonert med flagellin er også vist å bli presentert av APC effektivt, i tillegg til at dyr immunisert med dette utviklet spesifikke T-celleponser, som det ikke var mulig å stimulere for antigen uten fusjonert flagellin. Å fusjonere flagellin sammen med LsLGAp1 vil kunne øke immunresponsen, noe som vil være aktuelt å teste ved et senere vaksineforsøk.

6.0 Konklusjon

Med mangel på en kommersiell vaksine mot lakselus på markedet, er potensialet for en DNA-vaksine mot spyttkjertelproteiner som har immundependende egenskaper absolutt stort. Resultatene fra denne studien indikerer at det kreves mer forskning på spyttkjertelproteinet LsLGAp1 og dets funksjoner. Til tross for begrensningen knyttet til antistoffmåling mot LsLGAp1, som trolig kommer av det urene rekAp1 som coating ved ELISA, kan denne studien konkludere med følgende hovedpoeng:

- i. Det kan ikke bekreftes at LsLGAp1 kan hydrolysere ATP eller AMP, men det kan heller ikke utelukkes. Flere forsøk med et renere rekombinant LsLGAp1 vil kunne gi en sterkere indikasjon om hvorvidt dette er reelt. Å benytte en høyere pH og en eventuell høyere konsentrasjon av rekombinant LsLGAp1 vil også kunne gi indikasjoner på om LsLGAp1 kan hydrolysere ATP eller AMP.
- ii. Ved sanntids-PCR ble LsLGAp1 og LsLGAp Δ uttrykt i muskulatur ved injeksjonsstedet hos nesten alle individene to- og åtte uker etter vaksinerings, noe som indikerer at pDNA ble tatt opp av omkringliggende celler og ble transkribert etter injeksjon.
- iii. LsLGAp1 og LsLGAp Δ gav ingen antistoffrespons, til tross for at flagellin ble brukt som adjuvans og fisken ble elektroporert umiddelbart etter vaksinerings. Dette kommer trolig av at et kontaminert rekombinant LsLGAp1 ble brukt som coating ved ELISA og som førte til mangelfull antistoffmåling, uten at dette kan bekreftes. Det kan derimot heller ikke utelukkes at LsLGAp1 ikke er immunogen, og videre forskning kreves derfor for å kunne konkludere.
- iv. Flagellin ble brukt som adjuvans i alle injeksjonsgruppene og ble uttrykt for alle injeksjonsgruppene to- og åtte uker etter vaksinerings. Dette indikerer at pDNA ble tatt opp av omkringliggende celler og ble transkribert etter injeksjon. Flagellin gav svært varierende antistoffrespons i alle injeksjonsgruppene, med en gjennomsnittlig økning i antistoffrespons for LsLGAp1 og LsLGAp Δ sammenlignet med kontroll.
- v. Manglende antistoffrespons mot LsLGAp1 fører til at det ikke kan bekreftes om flagellin som adjuvans vil øke immunresponsen, samt korrelere med immunresponsen til LsLGAp1.

7.0 Referanser

- Aaen, S.M., Helgesen, K.O., Bakke, M.J., Kaur, K., Horsberg, T.E., 2015. Drug resistance in sea lice: a threat to salmonid aquaculture. *Trends Parasitol.* 31, 72–81.
<https://doi.org/10.1016/j.pt.2014.12.006>
- Aihara, H., Miyazaki, J., 1998. Gene transfer into muscle by electroporation in vivo. *Nat. Biotechnol.* 16, 867–870. <https://doi.org/10.1038/nbt0998-867>
- Antonioli, L., Pacher, P., Vizi, E.S., Haskó, G., 2013. CD39 and CD73 in immunity and inflammation. *Trends Mol. Med.* 19, 355–367.
<https://doi.org/10.1016/j.molmed.2013.03.005>
- Authority (EFSA), E.F.S., Houston, R., Moxon, S., Nogué, F., Papadopoulou, N., Ramon, M., Waigmann, E., 2017. Assessment of the potential integration of the DNA plasmid vaccine CLYNAV into the salmon genome. *EFSA J.* 15, e04689.
<https://doi.org/10.2903/j.efsa.2017.4689>
- Banchereau, J., Steinman, R.M., 1998. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 392, 245–252. <https://doi.org/10.1038/32588>
- Barker, S.E., Bricknell, I.R., Covello, J., Purcell, S., Fast, M.D., Wolters, W., Bouchard, D.A., 2019. Sea lice, *Lepeophtheirus salmonis* (Krøyer 1837), infected Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) are more susceptible to infectious salmon anemia virus. *PLOS ONE* 14, e0209178. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0209178>
- Barrett, L.T., Oppedal, F., Robinson, N., Dempster, T., 2020. Prevention not cure: a review of methods to avoid sea lice infestations in salmon aquaculture. *Rev. Aquac.* 12, 2527–2543. <https://doi.org/10.1111/raq.12456>
- Berg, H.C., Anderson, R.A., 1973. Bacteria Swim by Rotating their Flagellar Filaments. *Nature* 245, 380–382. <https://doi.org/10.1038/245380a0>
- Brocchini, S., Godwin, A., Balan, S., Choi, J., Zloh, M., Shaunak, S., 2008. Disulfide bridge based PEGylation of proteins. *Adv. Drug Deliv. Rev., Peptide and Protein PEGylation III: Advances in Chemistry and Clinical Applications* 60, 3–12.
<https://doi.org/10.1016/j.addr.2007.06.014>
- Bron, J.E., Sommerville, C., Jones, M., Rae, G.H., 1991. The settlement and attachment of early stages of the salmon louse, *Lepeophtheirus salmonis* (Copepoda: Caligidae) on the salmon host, *Salmo salar*. *J. Zool.* 224, 201–212.
<https://doi.org/10.1111/j.1469-7998.1991.tb04799.x>

- 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>
- Bui, S., Fjellidal, P.G., Hvas, M., Karlsen, Ø., Dalvin, S., 2024. Louse-induced mortality thresholds in Atlantic salmon of wild-origin. *Conserv. Sci. Pract.* 6, e13079. <https://doi.org/10.1111/csp2.13079>
- Burnstock, G., Knight, G.E., Greig, A.V.H., 2012. Purinergic Signaling in Healthy and Diseased Skin. *J. Invest. Dermatol.* 132, 526–546. <https://doi.org/10.1038/jid.2011.344>
- Carpio, Y., Basabe, L., Acosta, J., Rodríguez, A., Mendoza, A., Lisperger, A., Zamorano, E., González, M., Rivas, M., Contreras, S., Haussmann, D., Figueroa, J., Osorio, V.N., Asencio, G., Mancilla, J., Ritchie, G., Borroto, C., Estrada, M.P., 2011. Novel gene isolated from *Caligus rogercresseyi*: A promising target for vaccine development against sea lice. *Vaccine* 29, 2810–2820. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2011.01.109>
- Carpio, Y., García, C., Pons, T., Haussmann, D., Rodríguez-Ramos, T., Basabe, L., Acosta, J., Estrada, M.P., 2013. Akirins in sea lice: First steps towards a deeper understanding. *Exp. Parasitol.* 135, 188–199. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2013.06.018>
- Constant, S.L., Bottomly, K., 1997. INDUCTION OF TH1 AND TH2 CD4+ T CELL RESPONSES: The Alternative Approaches. *Annu. Rev. Immunol.* 15, 297–322. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.15.1.297>
- Contreras, M., Karlsen, M., Villar, M., Olsen, R.H., Leknes, L.M., Furevik, A., Yttredal, K.L., Tartor, H., Grove, S., Alberdi, P., Brudeseth, B., de la Fuente, J., 2020. Vaccination with Ectoparasite Proteins Involved in Midgut Function and Blood Digestion Reduces Salmon Louse Infestations. *Vaccines* 8, 32. <https://doi.org/10.3390/vaccines8010032>
- Costello, M.J., 2009. The global economic cost of sea lice to the salmonid farming industry. *J. Fish Dis.* 32, 115–118. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2761.2008.01011.x>
- Costello, M.J., 2006. Ecology of sea lice parasitic on farmed and wild fish. *Trends Parasitol.* 22, 475–483. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2006.08.006>
- Cuadros, C., Lopez-Hernandez, F.J., Dominguez, A.L., McClelland, M., Lustgarten, J., 2004. Flagellin Fusion Proteins as Adjuvants or Vaccines Induce Specific Immune Responses. *Infect. Immun.* 72, 2810–2816. <https://doi.org/10.1128/iai.72.5.2810-2816.2004>

- Cui, B., Liu, X., Fang, Y., Zhou, P., Zhang, Y., Wang, Y., 2018. Flagellin as a vaccine adjuvant. *Expert Rev. Vaccines* 17, 335–349.
<https://doi.org/10.1080/14760584.2018.1457443>
- Cui, Z., 2005. DNA Vaccine, in: *Advances in Genetics, Non-Viral Vectors for Gene Therapy, Second Edition: Part 2*. Academic Press, pp. 257–289. [https://doi.org/10.1016/S0065-2660\(05\)54011-2](https://doi.org/10.1016/S0065-2660(05)54011-2)
- Dalvin, S., Jørgensen, L. v. G., Kania, P.W., Grotmol, S., Buchmann, K., Øvergård, A.-C., 2020. Rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* skin responses to salmon louse *Lepeophtheirus salmonis*: From copepodid to adult stage. *Fish Shellfish Immunol.* 103, 200–210. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2020.05.014>
- Erikson, U., Misimi, E., 2008. Atlantic Salmon Skin and Fillet Color Changes Effected by Perimortem Handling Stress, Rigor Mortis, and Ice Storage. *J. Food Sci.* 73, C50–C59. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2007.00617.x>
- Fast, M.D., Ross, N.W., Mustafa, A., Sims, D.E., Johnson, S.C., Conboy, G.A., Speare, D.J., Johnson, G., Burka, J.F., 2002. Susceptibility of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*, Atlantic salmon *Salmo salar* and coho salmon *Oncorhynchus kisutch* to experimental infection with sea lice *Lepeophtheirus salmonis*. *Dis. Aquat. Organ.* 52, 57–68.
<https://doi.org/10.3354/dao052057>
- Fedorov, O.V., Kostyukova, A.S., 1984. Domain structure of flagellin. *FEBS Lett.* 171, 145–148. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(84\)80476-7](https://doi.org/10.1016/0014-5793(84)80476-7)
- Forskrift om bekjempelse av lus i akvakulturanlegg (luseforskriften) - Lovdata [WWW Document], 2011. URL <https://lovdata.no/dokument/LTI/forskrift/2009-08-18-1095> (accessed 5.6.24).
- Forskrift om produksjonsområder for akvakultur av matfisk i sjø av laks, ørret og regnbueørret (produksjonsområdeforskriften) - Lovdata [WWW Document], n.d. URL <https://lovdata.no/dokument/SF/forskrift/2017-01-16-61> (accessed 5.8.24).
- Forthal, D.N., 2014. Functions of Antibodies. *Microbiol. Spectr.* 2, 10.1128/microbiolspec.aid-0019–2014. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.aid-0019-2014>
- Gao, Y.Q., Yang, W., Karplus, M., 2005. A Structure-Based Model for the Synthesis and Hydrolysis of ATP by F1-ATPase. *Cell* 123, 195–205.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.10.001>
- Gomes, A.C., Flace, A., Saudan, P., Zabel, F., Cabral-Miranda, G., Turabi, A.E., Manolova, V., Bachmann, M.F., 2017. Adjusted Particle Size Eliminates the Need of Linkage of

- Antigen and Adjuvants for Appropriated T Cell Responses in Virus-Like Particle-Based Vaccines. *Front. Immunol.* 8, 226. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00226>
- Goto, A., Matsushita, K., Gesellchen, V., Chamy, L.E., Kutteneuler, D., Takeuchi, O., Hoffmann, J.A., Akira, S., Boutros, M., Reichhart, J.-M., 2008. Akirins are highly conserved nuclear proteins required for NF- κ B-dependent gene expression in drosophila and mice. *Nat. Immunol.* 9, 97–104. <https://doi.org/10.1038/ni1543>
- Grabowski, L.D., LaPatra, S.E., Cain, K.D., 2004. Systemic and mucosal antibody response in tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.), following immunization with *Flavobacterium columnare*. *J. Fish Dis.* 27, 573–581. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2761.2004.00576.x>
- Grimnes, A., Jakobsen, P. j., 1996. The physiological effects of salmon lice infection on post-smolt of Atlantic salmon. *J. Fish Biol.* 48, 1179–1194. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.1996.tb01813.x>
- Hamre, L.A., Bui, S., Oppedal, F., Skern-Mauritzen, R., Dalvin, S., 2019. Development of the salmon louse *Lepeophtheirus salmonis* parasitic stages in temperatures ranging from 3 to 24°C. *Aquac. Environ. Interact.* 11, 429–443. <https://doi.org/10.3354/aei00320>
- Hamre, L.A., Eichner, C., Caipang, C.M.A., Dalvin, S.T., Bron, J.E., Nilsen, F., Boxshall, G., Skern-Mauritzen, R., 2013. The Salmon Louse *Lepeophtheirus salmonis* (Copepoda: Caligidae) Life Cycle Has Only Two Chalimus Stages. *PLOS ONE* 8, e73539. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0073539>
- Haugan, P.M., Drange, H., 1996. Effects of CO₂ on the ocean environment. *Energy Convers. Manag., Proceedings of the International Energy Agency Greenhouse Gases: Mitigation Options Conference* 37, 1019–1022. [https://doi.org/10.1016/0196-8904\(95\)00292-8](https://doi.org/10.1016/0196-8904(95)00292-8)
- Heggland, E.I., Dondrup, M., Nilsen, F., Eichner, C., 2020. Host gill attachment causes blood-feeding by the salmon louse (*Lepeophtheirus salmonis*) chalimus larvae and alters parasite development and transcriptome. *Parasit. Vectors* 13, 225. <https://doi.org/10.1186/s13071-020-04096-0>
- Hersoug, B., 2021. Why and how to regulate Norwegian salmon production? – The history of Maximum Allowable Biomass (MAB). *Aquaculture* 545, 737144. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2021.737144>
- Honko, A.N., Mizel, S.B., 2005. Effects of flagellin on innate and adaptive immunity. *Immunol. Res.* 33, 83–101. <https://doi.org/10.1385/IR:33:1:083>
- invitrogen, 2010. pcRNA 3.1 (+), pcDNA3.1 (-).

- Joffre, O.P., Segura, E., Savina, A., Amigorena, S., 2012. Cross-presentation by dendritic cells. *Nat. Rev. Immunol.* 12, 557–569. <https://doi.org/10.1038/nri3254>
- Johnson, S., Albright, L., 1992. Comparative susceptibility and histopathology of the response of naive Atlantic Chinook and coho salmon to experimental infection with *Lepeophtheirus salmonis* (Copepoda: Caligidae). *Dis. Aquat. Organ.* 14, 179–193. <https://doi.org/10.3354/dao014179>
- Johnson, S.C., Albright, L.J., 1991. The developmental stages of *Lepeophtheirus salmonis* (Krøyer, 1837) (Copepoda: Caligidae). *Can. J. Zool.* 69, 929–950. <https://doi.org/10.1139/z91-138>
- Johny, A., Ilardi, P., Olsen, R.E., Egelanddal, B., Slinde, E., 2024. A Proof-of-Concept Study to Develop a Peptide-Based Vaccine against Salmon Lice Infestation in Atlantic Salmon (*Salmo salar* L.). *Vaccines* 12, 456. <https://doi.org/10.3390/vaccines12050456>
- Jones, M.W., Sommerville, C., Bron, J., 1990. The histopathology associated with the juvenile stages of *Lepeophtheirus salmonis* on the Atlantic salmon, *Salmo salar* L. *J. Fish Dis.* 13, 303–310. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2761.1990.tb00786.x>
- Jónsdóttir, H., Bron, J.E., Wootten, R., Turnbull, J.F., 1992. The histopathology associated with the pre-adult and adult stages of *Lepeophtheirus salmonis* on the Atlantic salmon, *Salmo salar* L. *J. Fish Dis.* 15, 521–527. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2761.1992.tb00684.x>
- Kabata, Z., 1974. Mouth and Mode of Feeding of Caligidae (Copepoda), Parasites of Fishes, as Determined by Light and Scanning Electron Microscopy. *J. Fish. Res. Board Can.* 31, 1583–1588. <https://doi.org/10.1139/f74-199>
- Komoszynski, M., Wojtczak, A., 1996. Apyrases (ATP diphosphohydrolases, EC 3.6.1.5) : function and relationship to ATPases. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Res.* 1310, 233–241. [https://doi.org/10.1016/0167-4889\(95\)00135-2](https://doi.org/10.1016/0167-4889(95)00135-2)
- Kryvi, Poppe, 2021. *Fiskeanatomi*, 2. utgave. ed. Fagbokforlaget, Bergen.
- Kunisawa, J., Kiyono, H., 2005. Intestinal epithelial barrier and mucosal immunity. *Cell. Mol. Life Sci.* 62, 1308–1321. <https://doi.org/10.1007/s00018-005-5035-1>
- Li, L., Petrovsky, N., 2016. Molecular mechanisms for enhanced DNA vaccine immunogenicity. *Expert Rev. Vaccines* 15, 313–329. <https://doi.org/10.1586/14760584.2016.1124762>
- Liu, M.A., 2011. DNA vaccines: an historical perspective and view to the future. *Immunol. Rev.* 239, 62–84. <https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2010.00980.x>

- Macqueen, D.J., Johnston, I.A., 2009. Evolution of the multifaceted eukaryotic akiringene family. *BMC Evol. Biol.* 9, 34. <https://doi.org/10.1186/1471-2148-9-34>
- McEwen, J., Levi, R., Horwitz, R.J., Arnon, R., 1992. Synthetic recombinant vaccine expressing influenza haemagglutinin epitope in *Salmonella* flagellin leads to partial protection in mice. *Vaccine* 10, 405–411. [https://doi.org/10.1016/0264-410X\(92\)90071-Q](https://doi.org/10.1016/0264-410X(92)90071-Q)
- Midtbø, H.M.D., Eichner, C., Hamre, L.A., Dondrup, M., Flesland, L., Tysseland, K.H., Kongshaug, H., Borchel, A., Skoge, R.H., Nilsen, F., Øvergård, A.-C., 2024. Salmon louse labial gland enzymes: implications for host settlement and immune modulation. *Front. Genet.* 14. <https://doi.org/10.3389/fgene.2023.1303898>
- Muñoz-Atienza, E., Díaz-Rosales, P., Tafalla, C., 2021. Systemic and Mucosal B and T Cell Responses Upon Mucosal Vaccination of Teleost Fish. *Front. Immunol.* 11. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.622377>
- Murray, P.K., 1989. Molecular vaccines against animal parasites. *Vaccine* 7, 291–299. [https://doi.org/10.1016/0264-410X\(89\)90188-6](https://doi.org/10.1016/0264-410X(89)90188-6)
- Mustafa, A., Speare, D.J., Daley, J., Conboy, G.A., Burka, J.F., 2000. Enhanced susceptibility of seawater cultured rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), to the microsporidian *Loma salmonae* during a primary infection with the sea louse, *Lepeophtheirus salmonis*. *J. Fish Dis.* 23, 337–341. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2761.2000.00235.x>
- Norges Sjømatråd, 2024. Prisvekst og svak krone ga eksportrekord for norsk sjømat i 2023 [WWW Document]. URL <https://seafood.no/aktuelt/nyheter/prisvekst-og-svak-krone-ga-eksportrekord-for-norsk-sjomat-i-2023/> (accessed 5.10.24).
- Overton, K., Dempster, T., Oppedal, F., Kristiansen, T.S., Gismervik, K., Stien, L.H., 2019. Salmon lice treatments and salmon mortality in Norwegian aquaculture: a review. *Rev. Aquac.* 11, 1398–1417. <https://doi.org/10.1111/raq.12299>
- Parola, P., Raoult, D., 2001. Ticks and Tickborne Bacterial Diseases in Humans: An Emerging Infectious Threat. *Clin. Infect. Dis.* 32, 897–928. <https://doi.org/10.1086/319347>
- Parra, D., Korytář, T., Takizawa, F., Sunyer, J.O., 2016. B cells and their role in the teleost gut. *Dev. Comp. Immunol.*, Special Issue: Intestinal Immunity 64, 150–166. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2016.03.013>
- Partmann, W., 1957. EFFECT OF LOW TEMPERATURE, SODIUM NITRITE, SODIUM CHLORIDE, AND FORMALDEHYDE ON THE APYRASE SYSTEM OF THE

- MUSCULAR TISSUEa. J. Food Sci. 22, 51–62.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1957.tb16982.x>
- Pilla, C., Emanuelli, T., Frassetto, S.S., Battastini, A.M.O., Dias, R.D., Sarkis, J.J.F., 1996. ATP diphosphohydrolase activity (apyrase, EC 3.6.1.5) in human blood platelets. Platelets 7, 225–230. <https://doi.org/10.3109/09537109609023582>
- Raynard, R.S., Bricknell, I.R., Billingsley, P.F., Nisbet, A.J., Vigneau, A., Sommerville, C., 2002. Development of vaccines against sea lice. Pest Manag. Sci. 58, 569–575. <https://doi.org/10.1002/ps.474>
- Salinas, I., 2015. The Mucosal Immune System of Teleost Fish. Biology 4, 525–539. <https://doi.org/10.3390/biology4030525>
- Salonius, K., Simard, N., Harland, R., Ulmer, J.B., 2007. The road to licensure of a DNA vaccine. Curr. Opin. Investig. Drugs Lond. Engl. 2000 8, 635–641.
- Sauer, J.R., Essenberg, R.C., Bowman, A.S., 2000. Salivary glands in ixodid ticks: control and mechanism of secretion. J. Insect Physiol. 46, 1069–1078. [https://doi.org/10.1016/S0022-1910\(99\)00210-3](https://doi.org/10.1016/S0022-1910(99)00210-3)
- Scheerlinck, J.-P.Y., 2001. Genetic adjuvants for DNA vaccines. Vaccine 19, 2647–2656. [https://doi.org/10.1016/S0264-410X\(00\)00495-3](https://doi.org/10.1016/S0264-410X(00)00495-3)
- Schmitz, N., Laverty, S., Kraus, V.B., Aigner, T., 2010. Basic methods in histopathology of joint tissues. Osteoarthritis Cartilage, OAC Histopathology Supplement 18, S113–S116. <https://doi.org/10.1016/j.joca.2010.05.026>
- Sea Lice Research Centre, 2023. SLRC - Life cycle of the salmon louse (*Lepeophtheirus salmonis*). <https://doi.org/10.18710/GQTYYL>
- Skiftesvik Høyvik, A.K., 2024. Ulike administreringsmetoder for DNA-vaksine rettet mot lakselus (*Lepeophtheirus salmonis*) hos atlantisk laks (*Salmo salar*). Univ. Bergen.
- Sloman, K.A., Bouyoucos, I.A., Brooks, E.J., Sneddon, L.U., 2019. Ethical considerations in fish research. J. Fish Biol. 94, 556–577. <https://doi.org/10.1111/jfb.13946>
- Smith, T.M., Kirley, T.L., 2006. The calcium activated nucleotidases: A diverse family of soluble and membrane associated nucleotide hydrolyzing enzymes. Purinergic Signal. 2, 327–333. <https://doi.org/10.1007/s11302-005-5300-7>
- Sommerset, I., Wiik-Nielsen, J., Moldal, T., Silva De Oliveira, V.H., Svendsen, J., Haukaas, A., Brun, E., 2024. Fiskehelsesrapporten 2023.
- Stutzer, C., Richards, S.A., Ferreira, M., Baron, S., Maritz-Olivier, C., 2018. Metazoan Parasite Vaccines: Present Status and Future Prospects. Front. Cell. Infect. Microbiol. 8. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2018.00067>

- Swain, J.K., Carpio, Y., Johansen, L.-H., Velazquez, J., Hernandez, L., Leal, Y., Kumar, A., Estrada, M.P., 2020. Impact of a candidate vaccine on the dynamics of salmon lice (*Lepeophtheirus salmonis*) infestation and immune response in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). PLOS ONE 15, e0239827. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0239827>
- Tartor, H., Luis Monjane, A., Grove, S., 2020. Quantification of Defensive Proteins in Skin Mucus of Atlantic salmon Using Minimally Invasive Sampling and High-Sensitivity ELISA. Animals 10, 1374. <https://doi.org/10.3390/ani10081374>
- Thorstad, E., Todd, C., Uglem, I., Bjørn, P., Gargan, P., Vollset, K., Halttunen, E., Kålås, S., Berg, M., Finstad, B., 2015. Effects of salmon lice *Lepeophtheirus salmonis* on wild sea trout *Salmo trutta*—a literature review. Aquac. Environ. Interact. 7, 91–113. <https://doi.org/10.3354/aei00142>
- Tipton, K.F., Dixon, H.B.F., 1979. [9] Effects of pH on enzymes, in: Methods in Enzymology. Elsevier, pp. 183–234. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(79\)63011-2](https://doi.org/10.1016/0076-6879(79)63011-2)
- Tonheim, T.C., Bøgwald, J., Dalmo, R.A., 2008. What happens to the DNA vaccine in fish? A review of current knowledge. Fish Shellfish Immunol. 25, 1–18. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2008.03.007>
- Torrissen, O., Jones, S., Asche, F., Guttormsen, A., Skilbrei, O.T., Nilsen, F., Horsberg, T.E., Jackson, D., 2013. Salmon lice – impact on wild salmonids and salmon aquaculture. J. Fish Dis. 36, 171–194. <https://doi.org/10.1111/jfd.12061>
- Trautmann, A., 2009. Extracellular ATP in the Immune System: More Than Just a “Danger Signal.” Sci. Signal. 2, pe6. <https://doi.org/10.1126/scisignal.256pe6>
- Ulmann, L., Rodeau, J.-L., Danoux, L., Contet-Audonneau, J.-L., Pauly, G., Schlichter, R., 2007. Trophic effects of keratinocytes on the axonal development of sensory neurons in a coculture model. Eur. J. Neurosci. 26, 113–125. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2007.05649.x>
- Valenzuela, J.G., Charlab, R., Galperin, M.Y., Ribeiro, J.M.C., 1998. Purification, Cloning, and Expression of an Apyrase from the Bed Bug *Cimex lectularius*: A NEW TYPE OF NUCLEOTIDE-BINDING ENZYME *. J. Biol. Chem. 273, 30583–30590. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.46.30583>
- Wagner, G.N., Fast, M.D., Johnson, S.C., 2008. Physiology and immunology of *Lepeophtheirus salmonis* infections of salmonids. Trends Parasitol. 24, 176–183. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2007.12.010>

- Wang, G., Pan, L., Zhang, Y., 2011. Approaches to improved targeting of DNA vaccines. *Hum. Vaccin.* 7, 1271–1281. <https://doi.org/10.4161/hv.7.12.17983>
- Wang, Jie, Yao, P., Liu, J., Wang, X., Mao, J., Xu, J., Wang, Jiarui, 2023. Reconstruction of Surface Seawater pH in the North Pacific. *Sustainability* 15, 5796. <https://doi.org/10.3390/su15075796>
- Weiner, D.B., Kennedy, R.C., 1999. Genetic Vaccines. *Sci. Am.* 281, 50–57.
- Widera, G., Austin, M., Rabussay, D., Goldbeck, C., Barnett, S.W., Chen, M., Leung, L., Otten, G.R., Thudium, K., Selby, M.J., Ulmer, J.B., 2000. Increased DNA Vaccine Delivery and Immunogenicity by Electroporation In Vivo. *J. Immunol.* 164, 4635–4640. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.164.9.4635>
- Xu, Z., Parra, D., Gómez, D., Salinas, I., Zhang, Y.-A., von Gersdorff Jørgensen, L., Heinecke, R.D., Buchmann, K., LaPatra, S., Sunyer, J.O., 2013. Teleost skin, an ancient mucosal surface that elicits gut-like immune responses. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 110, 13097–13102. <https://doi.org/10.1073/pnas.1304319110>
- Zarlenga, D.S., Nisbet, A.J., Gasbarre, L.C., Garrett, W.M., 2011. A calcium-activated nucleotidase secreted from *Ostertagia ostertagi* 4th-stage larvae is a member of the novel salivary apyrases present in blood-feeding arthropods. *Parasitology* 138, 333–343. <https://doi.org/10.1017/S0031182010001241>
- Zhang, J., Tao, A., 2015. Antigenicity, Immunogenicity, Allergenicity, in: Tao, A., Raz, E. (Eds.), *Allergy Bioinformatics*. Springer Netherlands, Dordrecht, pp. 175–186. https://doi.org/10.1007/978-94-017-7444-4_11
- Zhang, Y.-A., Salinas, I., Li, J., Parra, D., Bjork, S., Xu, Z., LaPatra, S.E., Bartholomew, J., Sunyer, J.O., 2010. IgT, a primitive immunoglobulin class specialized in mucosal immunity. *Nat. Immunol.* 11, 827–835. <https://doi.org/10.1038/ni.1913>
- Øvergård, A.-C., Eichner, C., Nuñez-Ortiz, N., Kongshaug, H., Borchel, A., Dalvin, S., 2023. Transcriptomic and targeted immune transcript analyses confirm localized skin immune responses in Atlantic salmon towards the salmon louse. *Fish Shellfish Immunol.* 138, 108835. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2023.108835>
- Øvergård, A.-C., Hamre, L.A., Harasimczuk, E., Dalvin, S., Nilsen, F., Grotmol, S., 2016. Exocrine glands of *Lepeophtheirus salmonis* (Copepoda: Caligidae): Distribution, developmental appearance, and site of secretion. *J. Morphol.* 277, 1616–1630. <https://doi.org/10.1002/jmor.20611>
- Øvergård, A.-C., Midtbø, H.M.D., Hamre, L.A., Dondrup, M., Bjerga, G.E.K., Larsen, Ø., Chettri, J.K., Buchmann, K., Nilsen, F., Grotmol, S., 2022. Small, charged proteins in

salmon louse (*Lepeophtheirus salmonis*) secretions modulate Atlantic salmon (*Salmo salar*) immune responses and coagulation. *Sci. Rep.* 12, 7995.
<https://doi.org/10.1038/s41598-022-11773-w>

8.0 Vedlegg

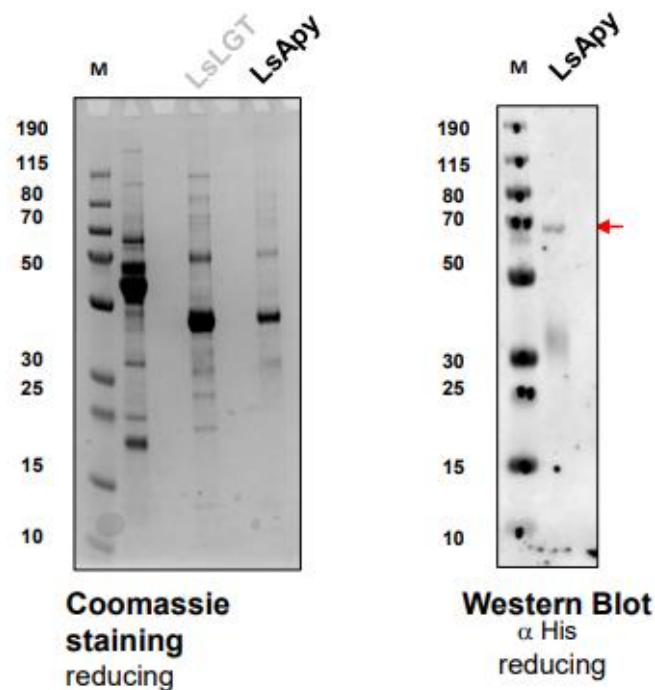
8.1 Apyrase Reaction Buffer

Apyrase reaction buffer ble laget for bruk i funksjonelle analyser med LsLGAp1 *in vitro*, da bufferen inneholder Ca^{2+} som apyrasen er avhengig av. Følgende stoffer ble blandet sammen og tilsatt Milli-Q vann: 20 mM MES, 50 mM NaCl, 5mM CaCl_2 , 1mM DTT og 0,05% Tween 20. Bufferen skulle då ha pH på 6,5, men da pH var betydelig lavere ble det tilsatt 0,6 mM NaOH noe som økte pH-verdien til å være mellom 6,1-6,5 (noe nærmere pH 6,1).

8.2 Rekombinant LsLGAp1 (rekAp1)

RekAp1A (ThermoFisher):

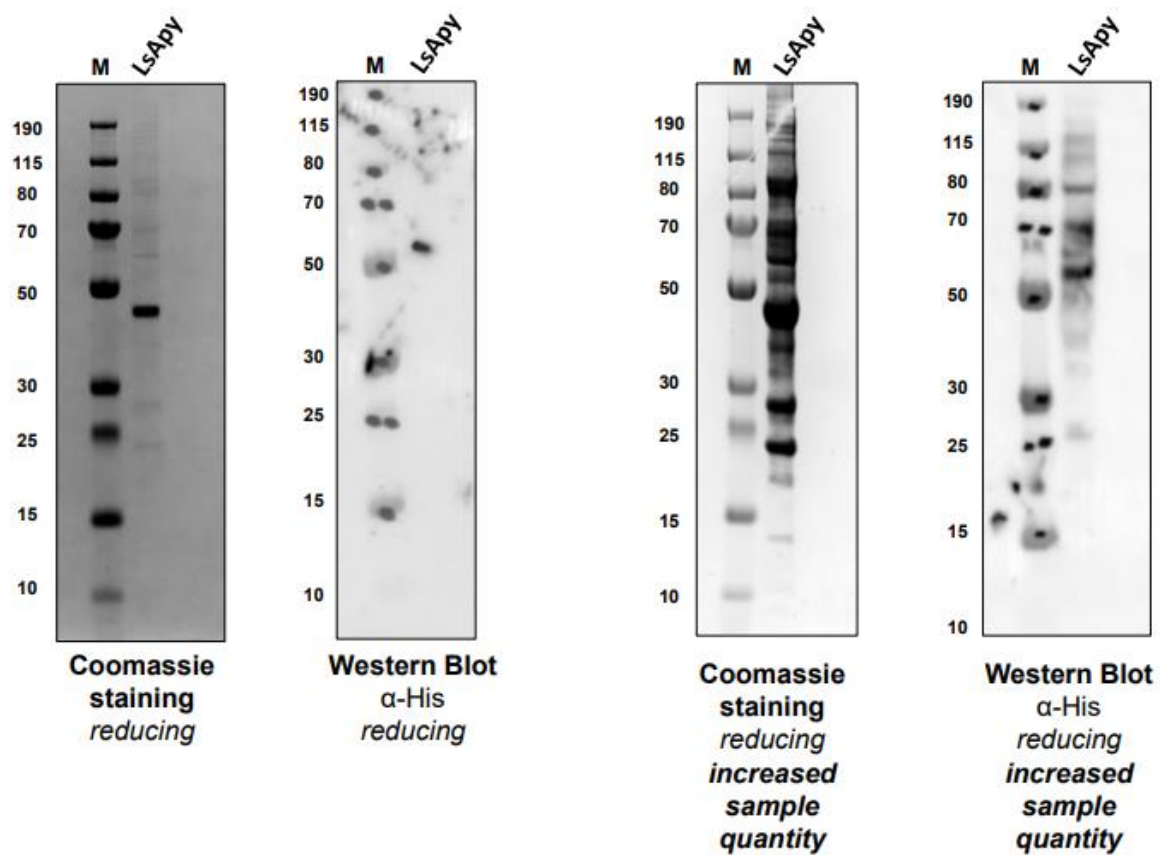
Analysesertifikat av rekAp1A. SDS-PAGE og Western Blot viser et svært urent rekombinant LsLGAp1.



Figur 8.1: Analysesertifikat av rekAp1A. SDS-PAGE og Western Blot viser et svært urent rekombinant LsLGAp1.

RekAp1B (ThermoFisher):

Analysesertifikat av rekAp1B. SDS-PAGE og Western Blot viser et svært urent rekombinant LsLGAp1.



Figur 8.2: Analysesertifikat av rekAp1B. SDS-PAGE og Western Blot viser et svært urent rekombinant LsLGAp1.

