



## Sluttrapport «EPA-laks»

### Trenger laks fettsyren EPA for optimal immunrespons?

(EPA-laks, #901484) Sluttrapport 16.03.2021

Nina Liland, Nini H. Sissener, Tone-Kari K. Østbye, Tor Gjøen, Marta M. Bou, Elisabeth Holen, Bente Ruyter, Aleksei Krasnov, Esmail R. Lutfi, Marit Espe, Ingunn Stubhaug, Grethe Rosenlund

#### Innholdsfortegnelse:

1. Sammendrag-----	2
Project Summary in English-----	4
2. Innledning-----	6
2.1. Faglig bakgrunn for at prosjektet ble igangsatt -----	6
2.2 Prosjektets omfang -----	7
2.3 Prosjektorganisering -----	7
3. Problemstilling og formål-----	7
3.1. Prosjektets effektmål -----	7
3.2. Prosjektets resultatmål -----	7
4. Prosjektgjennomføring -----	8
4.1 Beskrivelse av metodikk -----	8
4.2 Gjennomføring av prosjektet -----	11
4.2.1 Cellemodeller høstet fra fisk føret med ulike EPA nivåer -----	11
4.2.2 Cellemodeller beriket med EPA via cellemidiet -----	13
5. Resultater og diskusjon -----	15
5.1 Fôringforsøk med økende EPA i fôr -----	15
5.1.1 Analyse av diettsammensetning -----	15
5.1.2 Vekst og fôrinntak -----	15
5.1.3 Analyse av vev fra fôringforsøk -----	15
5.2 Celleforsøk -----	20
5.2.1: Hodenyceller i monokultur fra fôringforsøk (modell 1) -----	20
5.2.2 Ko-kultur med hodenyre- og leverceller fra fôringforsøk (modell 2) -----	20
5.2.3 Kardiomyocytter fra fôringforsøk (modell 3) -----	25
5.2.4 Kardiomyocytter anriket med EPA (modell 4) -----	26
5.2.5 Adipocytter anriket med EPA (modell 5) -----	30
5.2.6 Leukocyt cellulinje fra hodenyre (ASK) (modell 6) -----	35
5.3 Oppsummering av resultater, sammenligning av modeller og drøfting av mulighetene for videre anvendelse av resultater fra prosjektet (implementering) -----	46
6. Hovedfunn -----	47
7. Leveranser -----	48
8. Referanser -----	49
Appendix -----	52



## 1. Sammendrag

Innhold av de langkjedede omega-3 fettsyrene i dietter blir ofte oppgitt som sum EPA + DHA, uten å ta spesielt hensyn til ratioen mellom de to fettsyrene. Laksens behov for DHA er velstudert. EPA omgjøres i stor grad til DHA og brukes til energi av cellene i større grad enn DHA. En har derfor lenge tenkt at DHA er mer essensiell enn EPA. Forsøk viser nå indikasjoner på at EPA har en unik og spesiell rolle i immunforsvaret til Atlantisk laks, spesielt når de er utsatt for virusinfeksjon. Dette prosjektet har sett nærmere på rollen til EPA i inflammatoriske prosesser og immunrespons til Atlantisk laks. Hovedvekten av arbeidet har blitt gjort ved hjelp av ulike cellemodeller. I tillegg til å gi kunnskap om EPA, har prosjektet også gitt nyttig kunnskap om hvordan ulike cellemodeller kan bli brukt i studier på interaksjoner mellom fettsyrer og inflammasjon-/immunrespons.

Et fôringsforsøk med smoltifisert laks (110 g – 446 g) ble utført med dietter med økende EPA nivå (0,9 , 1,3 , 2,2 , 5,3 og 10,4% EPA av totale fettsyrer) og stabil DHA, som resulterte i et stort spenn i ratio mellom DHA/EPA (5,2 , 3,5 , 2,2 , 0,9 og 0,5). Det var ingen forskjeller i vekst og fôrinntak mellom diettene, men store endringer i fettsyrer i vev (lever, hodenyre, hjerte, visceral fett og røde blodceller). EPA nivåene økte i alle analyserte vev, både i polare og nøytrale fettfraksjoner, mens DHA holdt seg stabilt. Spesielt interessant var en økning i ratio mellom EPA og ARA i polare lipider, som vil kunne være viktig for inflammatorisk respons grunnet mulige endringer i eikosanoid-produksjon i ulike vev. EPA og ARA er substrat for produksjon av anti-inflammatoriske og mer pro-inflammatoriske eikosanoider. En endring i denne balansen kan derfor endre den inflammatoriske statusen til fisken. Celler fra hodenyre, lever og hjerte ble høstet fra fisken ved slutten av fôringsforsøket. Disse cellene ble så brukt til celleforsøk hvor de ble eksponert for immunstimuli av bakterie- eller virus-mimikk (LPS eller PolyI:C, henholdsvis). I tillegg ble hodenyre og leverceller dyrket i ko-kultur, for å se på eventuelle interaksjoner mellom de to celletypene. Alle cellemodellene viste klare immunresponsen i henhold til tidligere studier, mens effekten av EPA i de ulike modellene ikke var like utpreget. EPA påvirket gener involvert i oksidativt stress (*catalase*), inflammasjon (*cox2*) samt det medfødte immunforsvaret (*tlr*). Alle disse genene viste en økning ved økt EPA i fôr og vev. Det var også EPA-effekter på mengden eikosanoider som ble målt i cellemedier fra studiene med leverceller, med en generell økning i nivå av eikosanoider av omega-3 og omega-6 opphav med økt EPA i fôret (PGE<sub>3</sub> og PGE<sub>2</sub>). Disse resultatene tyder derfor på en endring i inflammasjonsstatus ved økt EPA i fôret, men det er vanskelig ut ifra disse resultatene å vite om den går mot en mer pro- eller anti-inflammatorisk situasjon.

Forsøk ble også gjort med primærceller (hjerte- og fettceller) høstet fra fisk fôret med vanlig kommersielt fôr som så ble dyrket i medium med tilsatt EPA. Disse cellene nådde lignende eller høyere EPA-nivåer sammenlignet med cellene høstet fra fôringsforsøket. I fettcellene ble effekten av EPA sammenlignet med oljesyre, en en-umettet fettsyre som er vanlig i planteoljer. Disse studiene ga oss også informasjon om respons på ulike tidspunkt etter immunstimuli. I hjertecellene var det størst effekt av immunstimuli på genuttrykk etter 2 dager, mens den var størst i fettceller etter 4 dager. EPA har i tidligere forsøk vist seg å ha en effekt i fasen etter den første immunresponsen, i resolusjonsfasen, og denne informasjonen er derfor viktig for videre studier. I hjertecellene ga EPA ingen endring i respons på typiske immungener etter PolyI:C stimuli, men effekter av EPA ble sett på fettmetabolismen. Dette kan være knyttet til en økt energimobilisering i forbindelse med håndtering av virus. I fettcellene ga EPA generelt sett flere effekter på genuttrykk enn den en-umettede fettsyren oljesyre. I tillegg viste fettcellene med EPA generelt høyere uttrykk av gener relatert til adaptiv immunitet etter PolyI:C stimuli enn hva som ble sett i cellene tilsatt oljesyre. Det er derfor vist at det er mulig å finne effekter av EPA på inflammasjonsrespons også i celler som er dyrket med EPA. Med grunnleggende informasjon om



fettsyrer i ulike vev gitt ulike nivåer med EPA (som rapportert fra fôringsforsøket) er det derfor mulig å modellere inflammasjonseffekter av spesifikke nivå av EPA i diett uten å nødvendigvis måtte gjøre et fôringsforsøk av fisk i forkant.

Et siste modellsystem var en cellelinje (ASK), altså celler som deler seg i kultur og holdes i live i laboratorium. Fordeler med slike celler er at en ikke er avhengig av levende fisk for å skaffe celler ved nye forsøk og at forsøk i større grad blir sammenlignbare fra gang til gang grunnet fravær av individeffekter. Disse cellene ble også dyrket i cellemedium med tilsatt EPA og nådde høye nivåer av EPA i cellene, tilsvarende som sett i fisk fra fôringsforsøket og høyere. En gradient i EPA-nivå ble brukt her, noe som gjør det mulig å forutse hvilke nivåer av EPA en får i cellene ved ulike nivåer i cellemedier. Forsøk med cellelinjen viste at respons på PolyI:C og to levende virus (ISAV og SAV3) var relativt like og bekreftet at effektene av EPA var små sammenlignet med effekter av immunstimuli. Cellelinjen ga noe ulike resultater fra de øvrige cellemodellene ved at EPA her viste en generell immundempende effekt, og ikke en økning i slike gener som sett i primærcellene. Disse resultatene er mer i tråd med hva som er sett *in vivo* ved høy EPA i diett etter virusmitte. En immundempende effekt vil muligens være nyttig i situasjoner med virus-infeksjoner som gir høy inflammasjon i vev og redusert velferd og helse hos fisk grunnet denne virus-responsen. Grunnen til at en annerledes tendens er sett i cellelinjer enn i primærcellene kan være at RNA sekvensering ble brukt som metode for genuttrykk og dette viser et større bilde enn ved qPCR som er brukt i noen av de andre modellene.

Prosjektet har vist at EPA påvirker cellenes inflammasjonsrespons samt komponenter av både det medfødte og adaptive immunsystemet. EPA-effekter var allikevel små sammenlignet med responser på immunstimuli. Å kunne se effekter av EPA på inflammasjons- og immunrespons vil derfor være avhengig av å ha god oppløsning (altså optimalt forsøksdesign og nok replikater). Bruk av inflammasjonsstimuli som kan aktivere en mer målrettet og øyeblikkelig respons vil også kunne gi mindre variasjoner mellom de ulike cellenes respons. Eksempler på dette er modellstimuli som PolyI:C og LPS som aktiverer immunforsvaret uten å skade cellene. Bruk av metoder som gir en bredere oversikt over metabolismen og immunresponsen, slik som transkriptomanalyse, kan være essensielt sammenliknet med kun analyse av enkeltgener ved qPCR.



### Project summary in English:

The content of the long-chained omega-3 fatty acids in diets is often presented as the sum of EPA + DHA, without special regard to the ratio between the two fatty acids. The requirement for DHA is well-studied, this because EPA is largely converted to DHA and is also used more for energy than DHA. Due to this, it has long been thought that DHA is more essential than EPA. More recent research indicates that EPA might have a special and unique role in the immune system of Atlantic salmon, especially when exposed to viral infection. This project has looked closer at the role of EPA in inflammatory processes and immune response in Atlantic salmon. The majority of the work has focused on using different cell models. In addition to providing knowledge on EPA, this project has provided helpful knowledge on how different models function and has shown they can be used in studies on interactions between fatty acids and inflammatory-/immune-response.

A feeding trial with smoltified salmon (110-446 g) was performed with diets containing increasing EPA (0.9, 1.3, 2.2, 5.3 and 10.4% of total fatty acids) and stable DHA. This led to a large range in the ratio between DHA/EPA (5.2, 3.5, 2.2, 0.9 and 0.5). There were no differences between dietary treatments in growth or feed intake, but large changes were seen in fatty acid composition of the tissues (liver, head kidney, heart, visceral fat and red blood cells). The EPA levels increased in all analysed tissues, both in polar and neutral fractions, while DHA kept stable. Especially interesting was an increase in the ratio between EPA/ARA in the polar lipids, which could be important for inflammatory response due to effects on eicosanoids production. Cells from head kidney, liver and heart were harvested from the fish at the end of the feeding trial. These cells were exposed to immune stimuli in the form of bacterial- or viral mimics (LPS and PolyI:C, respectively). In addition, head kidney and liver cells were grown in co-culture, to study interactions between the cells. All cell models showed clear immune responses, in accordance to earlier studies, while the effects of EPA were smaller. EPA affected genes involved in oxidative stress (*catalase*), inflammation (*cox2*) in addition to the innate immune system (*tlr*). All these genes showed an increase with increased EPA in feed and tissues. There were also effects on the amount of eicosanoids measured in cell media of the liver cells. There was a general increase in eicosanoids of both omega-3 and omega-6 origin with increased EPA in the diets (PGE<sub>3</sub> and PGE<sub>2</sub>). We can therefore conclude that EPA might lead to a change in inflammatory status of the fish, but we cannot say for certain if it leads to fish in a more pro- or anti-inflammatory direction.

Trials were also done with primary cells (heart- and adipose cells) harvested from fish fed a normal commercial feed and then grown in media containing EPA. These cells reached similar levels of EPA, or higher, compared to the cells harvested from the feeding trial. In the adipose cells, the effect of EPA was compared to oleic acid, a mono-unsaturated fatty acid common in plant oils. These studies also gave us knowledge on the immune response in different times after an immune response. In the heart cells the largest effects on gene expression were seen two days after immune stimulation, while it in adipose cells was seen at finalization of the trial, four days after stimulation. EPA has in earlier trials indicated effects in the resolution phase after a viral infection, and this type of information is therefore important for future studies. In the heart cells, EPA gave no additional effect on the immune genes after the PolyI:C stimuli but affected genes in the lipid metabolism. This might be connected to an increased energy mobilization related to viral response. In the adipose cells, EPA gave more effects on gene expression than oleic acid. In addition, EPA led to a generally higher expression of genes related to adaptive immunity after PolyI:C stimuli, than what was seen in the cells grown with oleic acid. It is thus shown that it is possible to find effects of EPA on inflammatory response also in cells grown with EPA. With basic information on fatty acids in tissues given different EPA levels (as reported from the current feeding trial),



it is therefore possible to model dietary EPA/ inflammation interaction effects in cells without necessarily having to do a feeding trial with fish first.

A last model system was a cell-line (ASK), thus being cells that divide in culture and are held alive in a laboratory. Advantages with such cells is that you are not depending on live fish for obtaining cells for new trials. Another advantage is more comparable results between trials, due to lack of individual effects. These cells were also grown with EPA in the media and reached high EPA levels, comparable and also higher than in the cells harvested from the feeding trial. A gradient in EPA was used and it is therefore possible to use the produced information from this project to predict how different media EPA affects cell EPA content. This can be useful for future studies on EPA using ASK cells. Trials with the cell line showed that the response to PolyI:C and to live viruses (ISAV and SAV3) was relatively similar. This model also confirmed that the EPA-effects were quite small compared to the response to the immune stimuli. The results from this model deviated from the other models by showing a general immune-depressing effect of EPA, not an increase in immune-related genes, as seen in the other models. The results obtained in the cell line is in line with what has been seen *in vivo* with high EPA in diets after a viral challenge. The reason for these differences can be that RNA sequencing was used as a method for gene expression here and this will show a much wider picture of the response than qPCR, which was used in several other models.

This project has shown that EPA affects the inflammatory response of the cells as well as affecting components of both the innate- and adaptive immune system. The effects of EPA were, however, small compared to responses to immune stimuli. The ability to detect EPA-effects is therefore dependent on high resolution (i.e. optimal trial design and enough replicates). Also, the use of inflammatory responses that activates a more immediate and targeted response can help reduce variation in response between cells. Examples of stimuli with those properties are model stimuli like LPS and PolyI:C, which activate the immune response without harming the cells. Use of methods for a wider view of the metabolism and immune response, such as transcriptome analyses, might be essential compared to the analyses of single genes by qPCR.



## 2. Innledning

### 2.1. Faglig bakgrunn for at prosjektet ble igangsatt

Behovet for EPA+DHA for å ha en robust laks i sjøvannsfasen har vært studert i flere prosjekter hos NIFES (nå Havforskningsinstituttet), Nofima og Skretting ARC (Rosenlund et al. 2016, Sissener et al. 2016a, Sissener et al. 2016b, Bou et al. 2017), inkludert et stort felles prosjekt som startet i 2017 (Optihealth, FHF 901282). Et par nylige studier har imidlertid konkludert med at laksens behov for langkjedede omega-3 fettsyrer kan dekkes av DHA alene, og at det ikke er et spesifikt behov for EPA (Turchini et al. 2014, Emery et al. 2016). Denne konklusjonen baserer de på at DHA deponeres i fisken i mye større grad, mens EPA i stor grad blir  $\beta$ -oksidert, omdannet til DHA og i mindre grad deponert i vev, noe vi også har observert i våre prosjekter. Viktigheten av DHA for fisken er veldokumentert, mens det er usikkert om fisken faktisk har et spesifikt behov for EPA, eller om DHA alene er tilstrekkelig. Man vet at EPA og DHA har ulike fysiologiske funksjoner i kroppen. Mens DHA har en strukturell rolle, som gjør at vevsstatus/innhold i cellemembraner kan gi en pekepinn om behov, har EPA en mer bioaktiv rolle (eikosanoid-produksjon osv.), og det er kanskje økt behov i spesifikke utfordrende situasjoner som f.eks. ved inflammatoriske sykdommer. Kortvarige fôringsforsøk i landbaserte kar, der fisken er skjermet for smittestoffer og utfordrende betingelser, vil vanskelig kunne gi svar på dette.

Fôr med økt EPA reduserte hjerteskatte og dempet betennelsesreaksjoner hos laks i smittesøk med hjerte- og skjelettmuskelbetennelse (HSMB) (Martinez-Rubio et al. 2012, Martinez-Rubio et al. 2013) og kardio-myopatisyndrom (CMS) (Martinez-Rubio et al. 2014). Dette var imidlertid funksjonelle fôr som blant annet også hadde et redusert fettinnhold, noe som gjør det vanskelig å konkludere om effekten av EPA alene. I et vekstforsøk med laks under et naturlig HSMB-utbrudd med 10-50 % dødelighet, var det ett fôr som skilte seg ut med 100 % overlevelse, og dette hadde et forhøyet innhold av EPA (Nofima/Lerøy Seafood Group, upubliserte resultater). Dette ble fulgt opp med et kontrollert smittesøk der resultatene ikke var like tydelige da det ikke var dødelighet i forsøket, men EPA nedregulerte et stort antall inflammatoriske gener i hjertevev (Hatlen et al. 2016). Det er etter hvert veletablert kunnskap at EPA og DHA kan modulere immunresponser i både forsøksdyr og mennesker og hovedeffektene synes å være antiinflammatoriske (Calder 2013). Imidlertid kan man tenke seg situasjoner hvor disse effektene ikke alltid vil være like gunstige. Enkelte studier viser at både for lave og for høye nivåer av en eller begge av disse fettsyrene kan redusere immunresponser i celler og hos forsøksdyr (McMurray et al. 2011).

I de fleste forsøk gjort på behov av EPA og DHA har disse to fettsyrene blitt gitt sammen, og det er også tilfelle i dagens kommersielle fôr (der kildene er hovedsakelig fiskeolje og fiskemel). Imidlertid vil mange av fremtidens potensielle kilder til disse fettsyrene (som f.eks. alger eller genmodifiserte planteoljer) inneholde kun én av dem (oppsummert i siste versjon av FHF-rapporten Fett for Fiskehelse (Sissener et al. 2016c). Spørsmålet er da om det vil være tilstrekkelig å tilsette DHA fra disse kildene i føret til laksen, eller om dette kan få konsekvenser i form av redusert motstandsdyktighet mot sykdommer, gjennom å påvirke inflammasjons- og immunresponser.



## 2.2 Prosjektets omfang

Prosjektet startet 1.mars 2018 og ble avsluttet 31. desember 2020 med en total bevilgning på 6 613 100 NOK fra FHF i løpet av denne perioden. Prosjektet har inkludert et fôringsforsøk på Skretting ARC sin forsøksstasjon på Lerang, samt flere celforsøk ved Havforskningsinstituttet (HI), Nofima og Universitetet i Oslo (UiO). Celforsøkene gjort ved HI blir også inkludert i en pågående doktorgradsoppgave.

## 2.3 Prosjektorganisering

Prosjektet ble ledet av Nini Sissener (HI) frem til september 2019, da prosjektledelse ble overtatt av Nina S. Liland (HI). Prosjektgruppen har bestått av de to overnevnte og Elisabeth Holen fra HI; Bente Ruyter, Tone-Kari K. Østbye, Marta M. Bou, Aleksei Krasnov, Esmail R. Lutfi fra Nofima; Tor Gjøen fra Universitetet i Oslo; samt Grethe Rosenlund og Ingunn Stubhaug fra Skretting ARC. Referansegruppen har bestått av Ragna Heggebø (MOWI ASA, erstattet av Martin Røed, MOWI, fra november 2020), Tor Eirik Homme (Grieg Seafood ASA) og Ingebjørg Sævareid (Salmon Group). FHF-ansvarlig har vært Sven Martin Jørgensen.

## 3. Problemstilling og formål

### 3.1. Prosjektets effektmål

Begrenset tilgang på fiskemel og fiskeolje gjør at næringa, spesielt hvis den skal vokse, må se etter alternative kilder til omega-3 fettsyrene EPA og DHA, som f.eks. alger, gjær eller genmodifiserte planter. Disse kildene vil ofte hovedsakelig inneholde én av disse fettsyrene, og mens behovet for DHA er godt dokumentert, er det usikkert om fisken faktisk har et spesifikt behov for EPA. Spørsmålet er da om det vil være tilstrekkelig å tilsette DHA fra disse kildene i fôret til laksen, eller om lite EPA i fôret kan få konsekvenser i form av redusert motstandsdyktighet mot sykdommer, gjennom å påvirke inflammasjons- og immunresponser. Det er viktig å ha gode cellemodeller for slikt arbeid, for både å redusere bruk av forsøksdyr, og for å kunne gjøre raskere, mer detaljerte og kontrollerte studier knyttet til ernæring og immunitet/inflammasjon. Dette prosjektet vil gi nødvendig kunnskap for å benytte seg av fremtidens alternative kilder til EPA og DHA, samtidig som man ivaretar fiskens helse og robusthet.

### 3.2. Prosjektets resultatmål

**Hovedmål:** Avklare betydningen av EPA i fôr for inflammasjons- og immunrespons i laks ved hjelp av cellemodeller.

**Delmål:**

1. Beskrive i hvilken grad EPA-nivå i fôr/dyrkingsmedium (når DHA er konstant) påvirker EPA nivå i cellemembranene i ulike vev som hodenyre, lever, hjerte og fettvev og leukocytte cellelinjer.
2. Avklare hvilken betydning EPA-nivå i membraner til celler isolert fra hodenyre, lever, hjerte og fettvev og leukocytte cellelinjer har på cellenes immunrespons.
3. Sammenligne immunrespons til virusmimikken PolyI:C med levende virus; SAV og ILAV.



4. Undersøke om hodenyre- og leverceller i ko-kultur er et bedre modellsystem i denne sammenhengen enn hodenyreceller alene.
5. Undersøke om kardiomyocytter (hjerteceller) og adipocytter i kultur kan brukes som modell for infeksjoner som rammer hjertet (eks. CMS, HSMB) og muskelens fettvev (eks. PD, HSMB).
6. Undersøke om etablerte cellelinjer fra leukocytter kan være like egnede modellsystem som de mer arbeidskrevende primærcellene.

## 4. Prosjektgjennomføring

### 4.1 Beskrivelse av metodikk

Smitteforsøk er svært kostbare, og laks i sjø utsettes for et høyt antall ulike patogener, samtidig som det er usikkerhet rundt hvilke nivå av EPA som vil gi effekter. Derfor mener vi det er mest fornuftig å starte med å teste ut dette i cellemodeller. Vi har testet følgende modellsystem; 1) Primære kulturer med spesialiserte (modne) celler isolert fra fisk gitt fôr med økende EPA-nivå, 2) primære stamceller isolert fra laks (uspesialiserte celler som gjennomgår celledeling og differensieres (spesialiseres) i kultur) og dyrket i kultur med økende mengde EPA-nivå i dyrkingsmediet og 3) cellelinjer dyrket i kultur med økende EPA nivå i mediet. I begge de to sistnevnte modellene kan man styre fettsyresammensetning i cellene ved å endre sammensetningen av dyrkingsmediet (cellene deler seg i kultur og endrer derfor sammensetning avhengig av fettsyrer som tilsettes i dyrkingsmediet). Ved å analysere fettsyresammensetning i polare lipider i cellene og i tilsvarende vev fra fisk som har gått i fôringsforsøket, kunne vi si noe om hvilke fôrnivåer som er nødvendig for å oppnå tilsvarende EPA nivå i cellene i modellsystem der EPA blir tilsatt gjennom cellemediet. Lipopolysaccharide (LPS) og Polyinosinic: polycytidylysyre (PolyI:C) gir spesifikke inflammasjonsresponser i fiskens immunceller, og er velkjente og etablerte modeller for henholdsvis bakteriell- og virusinfeksjon. Disse er blitt benyttet i dette prosjektet, i tillegg til faktiske patogener som gir store utfordringer i laksenæringen: SAV og ILAV. Et mål har vært å vurdere verdien av disse modellene ved å sammenlikne immunresponsene ved LPS og PolyI:C med immunrespons ved faktiske patogener. Hva som vil være interessant å følge opp i senere smitteforsøk er da basert på kunnskap generert i alle celleforsøkene som er utført. Ved å ha gjort celleforsøk med mange ulike nivåer EPA, flere ulike stimuli av immunsystemet, samt forskjellige kombinasjoner av disse, vil en ha bedre grunnlag for å velge den videre veien for forskning på området med minimal bruk av forsøksdyr (noe som både vil spare penger og unødvendig bruk av dyr i forsøk som forårsaker smerte/sykdomsstress). En sammenligning av alle de ulike modellene brukt vil også gi verdifull kunnskap for fremtidige studier for å kunne mer om hvilke modeller som passer best til ulike formål.

#### **Videre er begrunnelse for valg av cellemodeller:**

*Mono- og ko-kulturmodell (hodenyre og leverceller) – celler høstet fra fôringsforsøk:* Hodenyre er et av de viktigste immunologiske organene hos fisk, mens leveren er sentral i metabolismen, inkludert fettmetabolisme. Leveren er også et av de organene der fettsyresammensetningen i celle-membranene påvirkes av fôret i svært høy grad. Forsøk gjort på HI har vist at disse to celletypene i ko-kultur (ikke i direkte kontakt, men adskilt av en membran), «snakker sammen» via signalstoffer og påvirker hverandre. Hodenyreceller i ko-kultur med leverceller har vist seg å ha en generelt sterkere inflammasjons-respons til LPS enn hodenyreceller alene. Resultater fra tidligere forsøk tyder på at





levercellene skilte ut glukose som hodenyrecellene benyttet som energikilde i sin immunrespons (Holen et al. 2014). Immun- og inflammasjonsrespons i hodenyreceller eksponert for LPS har vist seg å i stor grad bli påvirket av fettsyre-sammensetningen i fôret fisken har fått (Holen et al. 2018).

Bruk av en slik ko-kulturmodell med hodenyre og lever-celler, som beskrevet over, med celler fra fisk som har blitt fôret med ulike nivåer EPA vil kunne:

- gi svar på om hodenyreceller, leverceller og/eller ko-kultur av disse er gode modeller for å lære mer om effekter av fettsammensetning i diett på immun- og inflammasjonsrespons
- indikere eventuelt et kritisk nivå av EPA i dietten for god immunrespons
- gi svar på om ko-kultur modeller gir ekstra eller bedre informasjon i slike forsøk enn celler i mono-kultur

*Kardiomyocytstudie (hjertecellestudie) (Nofima) – celler høstet fra fôringsforsøk + celler dyrket med EPA i mediet:* Hjertemuskel er et organ som kan rammes av flere ulike virus (slik som CMS og HSMB) og tidligere studier har vist at fôr med høyt EPA innhold kan beskytte fisken mot dødelighet knyttet til HSMB (Hatlen et al. 2016). Vi har tidligere vist at kardiomyocytter isolert fra laks gjennomgår celledeling og differensierer (spesialiseres) til bankende/kontraherende hjerteceller i kultur (Yi 2015). Siden cellene har evnen til å dele seg i kultur vil de potensielt kunne fungere som vert til virus som er avhengige av en vertscelle for å kunne replikere. Dette celleforsøket vil da kunne:

- gi svar på om kardiomyocytter i kultur kan brukes som modell for respons på patogeninfeksjoner som rammer hjertet.
- hjelpe med å vurdere om hjertecellenes sammensetning av EPA påvirker responsen på virus.
- indikere et eventuelt kritisk nivå av EPA i fôrene for motstand mot patogener.
- gi svar på om EPA påvirker ulike faser av hjertecellenes virusrespons slik observert i studien av Hatlen et al. (2016).

*Adipocytstudie (fettcellestudie) (Nofima) – anrikning av celler med EPA fra mediet:* Fettvevet er et endokrint organ som skiller ut ulike adipokiner involvert i metabolsk regulering og i inflammasjonsrespons. Vi har sett i tidligere studier at adipocytter fra laks igangsetter en immunrespons når de eksponeres for LPS (Škugor et al. 2010, Bou et al. 2020). Adipocytter dyrket med DHA og eksponert for LPS viste anti-inflammatoriske responser sammenliknet med adipocytter dyrket med den en-umettede fettsyren oljesyre (oleic acid, OA) (Bou et al. 2020). I dette forsøket ville vi derfor anrike adipocytter EPA og undersøke immunrespons ved flere tidspunkter etter stimuli med PolyI:C. Dette celleforsøket vil kunne:

- gi svar på om adipocytter i kultur kan brukes som modell for inflammasjonsrespons på patogener.
- gi oss mer kunnskap om immun og inflammasjonsrespons i EPA anrikede adipocytter over tid etter immunostimuli og effekten av ulike fettsyrer på denne responsen som måles.



*Leukocyt cellulinje fra hodenyre (ASK) (UiO)*; UiO har lang erfaring med infeksjonsstudier av cellulinjer fra laks (celler fra laksenyre, ASK). Disse cellene uttrykker en rekke reseptorer som er sentrale i fiskens immunforsvar (Schjøtz et al. 2008). Ved å inkubere slike celler med forskjellige nivåer av EPA forventer vi at endringer i disse cellenes lipidsammensetning, og følsomhet for agonister som PolyI:C og LPS kan kvantifiseres ved RNA sekvensering og qPCR. Vi har allerede data på at funksjonen av slike reseptorer påvirkes av lipider (Arnemo et al. 2014). Det er mye litteratur på relasjonen mellom makrofagers endringer i transkripsjon og immunresponser og vi vil derfor kunne lese ut av denne type data hvordan disse cellenes signalveier påvirkes av føret. Denne type analyser av laks var tidligere meget krevende, men med laksens genom tilgjengelig sammen med en ny versjon av KEGG databasen som nylig er blitt oppgradert med bl.a. Atlantisk laks, kan en koble sammen egne data med moderne analyseverktøy og dermed hente mye mer informasjon ut av disse analysene enn tidligere. I tillegg til modellstimuli skal det testes ut noen faktiske patogener som skaper problemer i oppdrettsnæringen i dag; SAV og ILAV. Vi har lang erfaring med dyrking av virus i disse cellene og har allerede data fra RNA sekvenseringforsøk når cellene dyrkes i standard medier. Dette celleforsøket vil kunne:

- la oss sammenligne resultater fra en cellulinje med primærceller
- RNA sekvensering gjør et større søk i mulige markører og kan hjelpe med å velge riktige metabolske prosesser å måle med qPCR, også i de andre celleforsøkene.
- vise om en leukocyt cellulinje dyrket med økende mengde EPA vil respondere annerledes på immunstimuli enn celler dyrket med standard cellemedium
- la oss sammenligne hvordan cellene responderer på levende virus (ISAV og SAV) sammenlignet med syntetisk immunstimuli som PolyI:C



## 4.2 Gjennomføring av prosjektet

### 4.2.1 Cellemodeller høstet fra fisk føret med ulike EPA nivåer

**Føringsforsøk (Skretting ARC):** Smoltifisert laks (500 totalt fordelt på 10 kar, 50 per kar, duplikate kar per diett) med startvekt på  $110 \text{ g} \pm 3 \text{ g}$  ble føret i 14 uker fram til  $446 \pm 22 \text{ g}$  på Skretting ARC Lerang forsøksstasjon (Stavanger, Norge). Vi hadde som mål å holde DHA konstant og tilstrekkelig høyt (5% av totale fettsyrer) i alle førene, for å ha relativt lav omdanning fra EPA til DHA. Dette var viktig fordi en ved for lave nivåer av DHA vil ha en relativt stor omdanning av EPA til DHA. EPA ble tilsatt i økende nivåer i fem forsøksfôr (planlagte verdier var 0,5%, 1%, 2%, 5% og 10% EPA av totale fettsyrer). Samtidig ga dette designet oss en reduksjon av DHA/EPA ratioer og økt sum DHA + EPA for de fem forsøksførene (se tabell 1). Ved å redusere omdannelse av EPA til DHA kunne vi være sikrere på at vi undersøkte effekten av økende EPA i vevene, og at ikke dette kunne bli forvekslet med en effekt av økende vevsmengde med DHA. Nivåene ble satt slik at minimumsbehov for EPA+DHA skulle være dekket i alle føringsgrupper (1,5 % av føret (5,5 % av fettsyrene) og så økte det opp til 4,2 % av føret (15% av fettsyrene)). Totale omega-6 og omega-3 fettsyrer skulle holdes konstant i alle førene. For å holde omega-3 fettsyrene konstant, ble 18:3n-3 hovedsakelig redusert ved høye verdier av EPA. Sammensetningen av førene er oppgitt i tabell 2.

Det ble tatt vevsprøver (lever, hjerte, hodenyre, visceralfett og røde blodceller) av 8 fisk per diett for fettsyreanalyser ved sluttuttaket. I hodenyre og lever ble polare og nøytrale lipider separert og fettsyresammensetning analysert i de to lipidfraksjonene. Det ble også tatt vevsprøver og gjort veiinger av fisken underveis. Katarakt ble målt i all fisk ved siste prøvetakning. I slutten av føringsforsøket ble celler høstet til studier av immun- og inflammasjons-responser. Det ble høstet hodenyreceller, leverceller og hjerteceller fra dette føringsforsøket. Utførelse av celleforsøkene er beskrevet i mer detaljer under.

Tabell 1. Målnivåer av EPA, DHA og EPA+DHA i % av fettsyrene, DHA/EPA-ratio og EPA+DHA i % av føret i de fem forsøksførene:

Fôr	EPA, % av fettsyrer	DHA, % av fettsyrer	EPA+DHA, % av FA	DHA/EPA ratio	% fett i diett	EPA+DHA i % av fôr
A	0,5	5,0	5,5	10,0	27	1,54
B	1,0	5,0	6,0	5,0	27	1,68
C	2,0	5,0	7,0	2,5	27	1,96
D	5,0	5,0	10,0	1,0	27	2,80
E	10,0	5,0	15,0	0,5	27	4,20



Tabell 2: Fôrsammensetning av de eksperimentelle fôrene (g/100g), Oppgitt for både 3 mm og 4 mm pellet størrelse.

Diett navn	3 mm pellet					4 mm pellet				
	EPA 0.5	EPA 1	EPA 2	EPA 5	EPA 10	EPA 0.5	EPA 1	EPA 2	EPA 5	EPA 10
Hvete	8,35	8,35	8,35	8,35	8,35	8,42	8,42	8,42	8,42	8,42
Hvete gluten	21,49	21,49	21,49	21,49	21,49	19,91	19,91	19,91	19,91	19,91
Faba bønner	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00
Soyaprotein konsentrat	30,00	30,00	30,00	30,00	30,00	30,00	30,00	30,00	30,00	30,00
Fiskemel <sup>1</sup>	10,00	10,00	10,00	10,00	10,00	10,00	10,00	10,00	10,00	10,00
Palmeolje <sup>2</sup>	2,71	2,57	2,11	1,41	0,36	2,81	2,64	2,21	1,49	0,33
Linfrøolje <sup>3</sup>	5,51	5,22	4,59	2,86	0,00	5,80	5,48	4,83	3,01	0,00
Rapsolje	11,45	11,42	11,07	11,11	11,39	12,28	12,20	11,93	12,00	12,21
DHA olje <sup>4</sup>	2,84	2,68	2,15	1,29	0,00	3,00	2,79	2,30	1,42	0,00
Fiskeolje <sup>5</sup>	0,00	0,43	2,06	4,00	6,64	0,00	0,58	2,03	4,00	7,03
EPA 500 <sup>6</sup>	0,00	0,18	0,45	1,67	3,79	0,00	0,18	0,50	1,79	3,98
Premiks <sup>7</sup>	5,18	5,18	5,18	5,18	5,18	5,07	5,07	5,07	5,07	5,07
Astaxanthin 10%	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04
Yttrium premix	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10
Vann	0,44	0,44	0,44	0,44	0,44	0,68	0,68	0,68	0,68	0,68

1 Scandinavian fish meal (Skretting, Stavanger, Norway)

2 AAK AB, Karlshamn, Sweden

3 Linas Agro, AB, Panevezys, Lithuania

4 DHA algae oil, DSM Human Nutrition and Health

5 Northern hemisphere fish oil (Skretting)

6 Incromega EPA 500 TG Croda Inc., Edison, NJ, USA

7 Inneholder vitaminer and mineraler (Trouw Nutrition), proprietary composition Skretting ARC, vitamin og mineral supplement som estimert for å dekke fiskens behov (National Research Council, 2011)

**Modell 1: Mono-kultur modell med hodenyreceller (HI):** Hodenyreceller ble isolert fra alle fem diettgruppene (4 fisk per diett, 20 fisk totalt) og eksponert for LPS eller PolyI:C. Cellene ble etter 24t høstet for analyse av genuttrykk ved qPCR. Det ble analysert typiske virus- og bakterie-responsive gener samt mer generelle immunforsvargener (*bcl2*, *caspase3*, *ifn $\gamma$* , *il8*, *il1b*, *mx*, *pgds*, *tlr3*, *viperine*, *tnfa*) i tillegg til gener relatert til eikosanoidsyntese (*5-lox*, *cox2*), oksidativt stress (*catalase*) og fettmetabolisme ( *$\delta$ 5desaturase*,  *$\delta$ 6desaturase*, *cd36*, *cd83*, *fas*, *ppara*).

**Modell 2: Ko-kultur modell med hodenyreceller (leukocytter) og leverceller (HI):** Her ble det brukt celler isolert fra diettgruppene 0.5%, 2% og 10% EPA (4 fisk per diett, 12 fisk totalt). Hodenyreceller og leverceller ble dyrket både alene (mono-kultur) samt i ko-kulturer. I ko-kultur oppsettet hadde vi



begge celletypene i samme brønn, men adskilt av en membran som kun lar mindre signalmolekyler passere. Cellene ble så eksponert for enten LPS eller PolyI:C i 24t. Det ble målt uttrykk av inflammasjons- og immungener i begge celletypene (både dyrket hver for seg i mono-kultur og sammen som ko-kultur) og gener relatert til fettmetabolisme i levercellene (se liste over gener over). Det ble også gjort målinger av eikosanoider i cellemediet til levercellene.

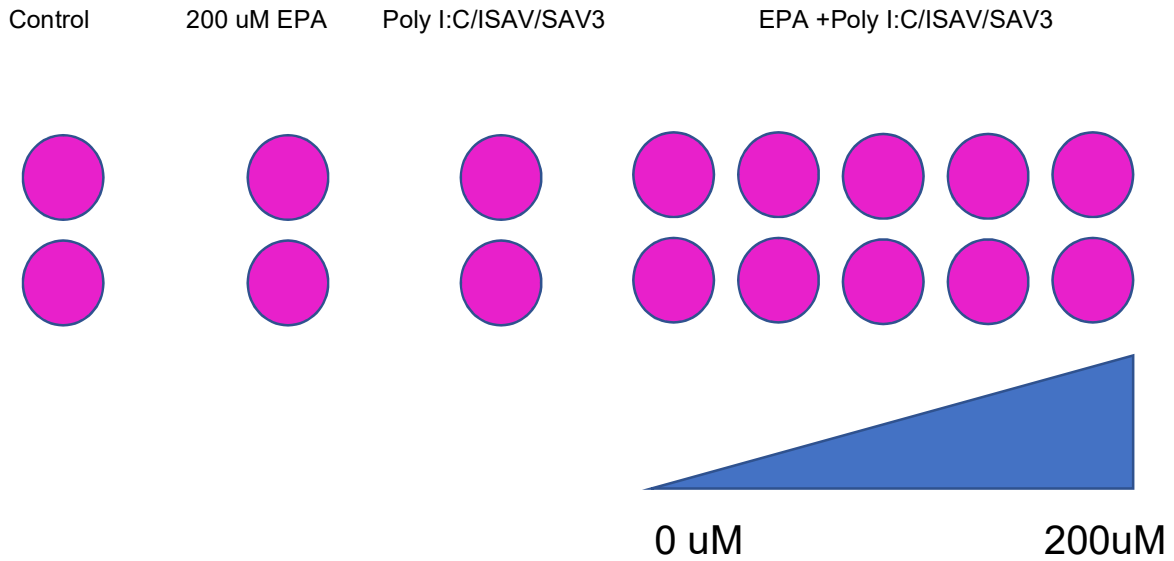
**Modell 3: Kardiomyocytstudie (hjertecellestudie)** (Nofima): I denne studien isolerte vi kardiomyocytter fra laks fra alle diettgruppene (25 fisk per diett, 125 fisk totalt). Celler fra hver diettgruppe ble slått sammen og sådd ut til henholdsvis genuttryksanalyse, fettsyresammensetning, og vitalitet. Cellene ble deretter eksponert for henholdsvis PolyI:C i 48t og SAV3 i 72t.

#### 4.2.2 Cellemodeller beriket med EPA via cellemediet

**Modell 4: Hjertecellestudie** (Nofima): I dette forsøket isolerte vi kardiomyocytter fra laks og anriket disse i kultur med EPA (20 uM). Cellene ble stimulert med PolyI:C og høstet ved fire ulike tidspunkter (2, 4, 7 og 9 dager etter stimuli). Cellene ble analysert med metoder beskrevet under Modell 3. Det ble valgt microarray som genuttryksanalyse for å få en bredere oversikt over responsen i cellene.

**Modell 5: Adipocytstudie (fettcellstudie)** (Nofima): I dette forsøket isolerte vi primære uspesialiserte mesenchymale stamceller fra fettvevet (pre-adipocytter) fra laks og differensierte disse i kultur til spesialiserte modne fettceller. Cellene ble i løpet av tidlig vekstfase inkubert med 20 uM av henholdsvis EPA eller oljesyre (oleic acid: OA, kontroll) i vekstmediet, mens de i differensieringsfasen ble tilsatt en økt konsentrasjon (100 uM) av samme fettsyrer. Når cellene var utviklet til modne adipocytter simulerte vi en infeksjon av virus ved å tilsette PolyI:C. Det ble høstet celler ved to tidspunkter (24t og 96t) etter PolyI:C stimulering. Responsen på denne simulerte infeksjonen ble undersøkt ved hjelp av metoder som beskrevet under Modell 3.

**Modell 6: Leukocyt-cellelinje fra hodenyre (ASK)** (UiO): ASK cellelinje fra nyre er en mye brukt *in vitro* modell for studier av virus som har laks som naturlig vert (Devold et al. 2000). Cellene dyrkes normalt i L-15 medium med 5% tilsatt kalveserum. For å redusere effekten av lipider i føtal kalveserum (FCS) ble cellene akklimatisert til 2% FCS i en uke før forsøkstart. I forsøkene med virus (ISAV, SAV-3) ble også temperaturen redusert til 15°C en uke før tilsetning av EPA. Ved forsøkstart ble noen av kulturene tilsatt 25-200 uM EPA bundet til bovin serum albumin (BSA). Etter en uke, ble så cellene eksponert for PolyI:C eller virus og inkubert videre i 24 (PolyI:C) eller 48 timer (virus) før prøvene ble høstet (Figur 1). Ved prøvetaking ble cellene lysert i buffer for isolering av RNA og prosessert for qPCR eller RNA sekvensering. De samme prøvene som ble analysert for enkeltgener ved hjelp av qPCR ble også innsendt for total mRNA analyse (RNAseq). Fastq filer fra sekvenseringen ble så «mappet» til referansegеноmet for Atlantisk laks (GCF\_000233375.1\_ICASG\_v2\_genomic.fna) med HISAT2 programvaren. Sammensetning av «treff» til transkripter ble utført med programvaren Stringtie. Forskjeller i ekspresjon ble så analysert med DEseq2 programvare (v 1.22.1) i R. Som en kvalitetskontroll på sekvenseringen ble først fordelingen av counts for hvert transkript plottet. Resultatet viser at det var sammenlignbar fordeling i alle prøvene fra PolyI:C forsøket samt i de virusinfiserte cellene (resultater ikke vist). En annen kvalitetskontroll på rådata er å foreta en såkalt «hierarchical clustering» analyse som vil samle transkripter i grupper med tilsvarende ekspresjonsprofil. Vi så at grupper av transkripter viste lik respons på behandlingene og kunne derfor grupperes.



*Figur 1. Eksperimentelt oppsett av ASK studie. ASK celler i 9 cm<sup>2</sup> kulturbrønner ble inkubert i en uke med stigende EPA nivåer i mediet før tilsetning av immunstimuli i form av PolyI:C eller virus (ISAV eller SAV3). Ikke-stimulerte celler ble også tilsatt høyeste konsentrasjon av EPA (200 uM) som intern kontroll.*



## 5. Resultater og diskusjon

### 5.1 Fôringforsøk med økende EPA i fôr

#### 5.1.1 Analyse av diettsammensetning

Ved analyse av fôrene kunne vi bekrefte at fettsyresammensetningen lå tett inntil det vi hadde planlagt (tabell 3). Vi hadde minst endringer i mettede og en-umettede samt i omega-6 fettsyrene, og de største endringene var som forventet i omega-3 fettsyrene. Arakidonsyre (20:4n-6, ARA) lå lavt i alle fôr, men økte med EPA i fôr, trolig grunnet økt innblanding av fiskeolje. Ved økning av EPA fra 0,9% til 10,4% av fettsyrene, ble 18:3n-3 redusert fra 14,6 % til 4,7% av fettsyrene. DHA lå relativt stabilt på mellom 4,7 og 5,5 % av fettsyrene og DHA/EPA ratioene ble på 5,2 , 3,5 , 2,2 , 0,9 og 0.5. Grunnet litt høyere EPA enn planlagt i det fôret som skulle ha lavest nivå (0,9% faktisk nivå mot planlagte 0,5% av fettsyrer), kom vi derfor ikke opp i DHA/EPA ratio på 10 som vi hadde planlagt. Det skyldes at DHA og EPA konsentratene inneholdt små mengder av henholdsvis EPA og DHA som gjorde det vanskelig å få til en nøyaktig balansering av alle oljer. Vi fikk allikevel god spredning i ratioene som viser at vi har store variasjoner i forholdet mellom DHA og EPA mellom fôrene.

Tabell 3: Kjemisk- og fettsyresammensetning av forsøksfôrene

	0.5% EPA	1% EPA	2% EPA	5% EPA	10% EPA
<i>Kjemisk sammensetning</i>					
Vann	7,5	7,4	7,4	7,6	7,5
Protein	43,0	44,3	44,1	44,1	43,7
Fett	29,1	28,8	29,0	28,1	28,5
Aske	5,4	5,1	5,2	5,4	5,7
<i>Fettsyresammensetning</i>					
Sum mettet	16,9	16,6	16,4	15,6	14,2
Sum en-umettet	43,4	43,3	44,1	45,2	46,9
20:4n-6 (ARA)	0,0	0,1	0,1	0,3	0,6
Sum n-6 FA	18,2	18,2	17,5	16,4	14,5
18:3n-3	14,6	14,3	13,3	10,1	4,7
<b>20:5n-3 (EPA)</b>	<b>0,9</b>	<b>1,3</b>	<b>2,2</b>	<b>5,3</b>	<b>10,4</b>
<b>22:6n-3 (DHA)</b>	<b>4,7</b>	<b>4,6</b>	<b>4,8</b>	<b>5,0</b>	<b>5,5</b>
Sum n-3 FA	20,5	20,7	20,9	21,7	23,0
<b>EPA+DHA</b>	<b>5,6</b>	<b>5,9</b>	<b>7,0</b>	<b>10,3</b>	<b>15,9</b>
<b>DHA/EPA</b>	<b>5,2</b>	<b>3,5</b>	<b>2,2</b>	<b>0,9</b>	<b>0,5</b>
n-3/n-6	1,1	1,1	1,2	1,3	1,6

#### 5.1.2 Vekst og fôrinntak

Ved slutten av fôringforsøket veide fisken  $446 \pm 22$  g (n=2, fisken var bulk-veid). Det var ingen forskjeller mellom gruppene og ingen lineær relasjon mellom sluttvekt, SGR ( $1,49 \pm 0,05$  %/dag), fôrfaktor ( $1,13 \pm 0,04$ ), EPA eller DHA/EPA ratio i fôret.



### 5.1.3 Analyse av vev fra fôringsforsøk

Vi så store forskjeller i fettsyresammensetning i vev fra fisken som var blitt fôret med de eksperimentelle fôrene med økende EPA nivå. Som forventet var der en økning i EPA i alle vev, både i polart og nøytralt fett. De to gruppene gitt lavest EPA nivå (0,9% og 1,3% EPA analysert i fôr) hadde stort sett lik fettsyresammensetning i vev, slik de også var ganske like i fôrets fettsyresammensetning. De polare og nøytrale vev og fraksjoner delte seg, som forventet, inn i to ganske like responser på diettene, så resultatene av fettsyreanalysene er delt opp i mer polare vev (røde blodceller) og mer nøytrale vev (visceralfett) som presenteres sammen med de polare og nøytrale fraksjonene av lever og hodenyre (Figurer 2 og 3). Hjerte inneholder mer en blanding av polart og nøytralt fett, men er presentert sammen med de nøytrale fettfraksjonene.

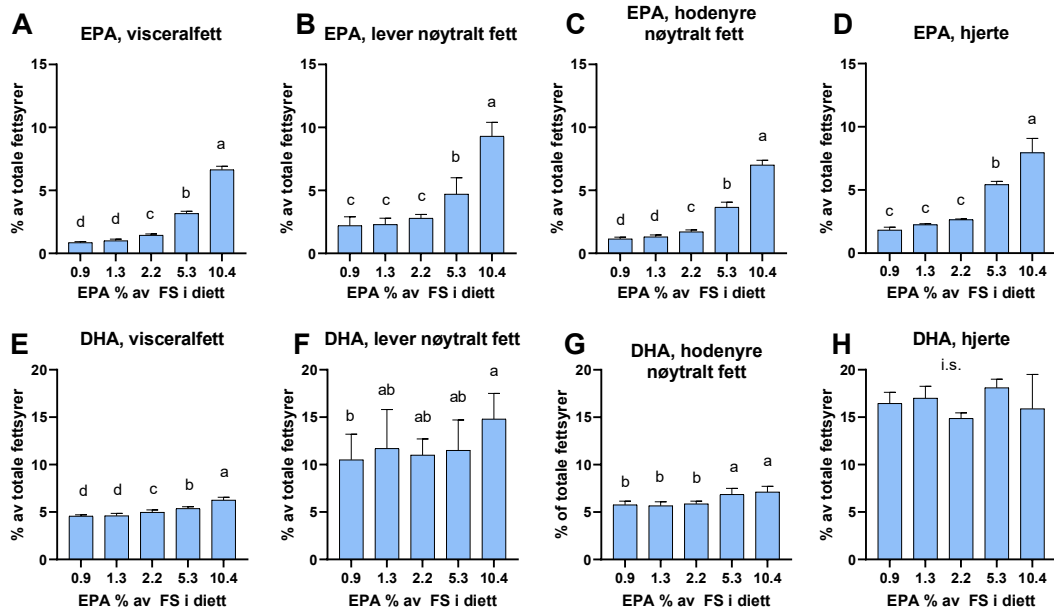
#### *-Nøytralt fett (lagringsfett)*

EPA økte i det nøytrale lagringsfettet i alle vev vi analyserte i takt med økt EPA i fôret (figur 2a - d). Det nøytrale fett i lever hadde generelt et litt høyere nivå av EPA i alle fôrgruppene enn i de to andre analyserte vevene. DHA holdt seg relativt stabilt med noe høyere nivå i noen fôrgrupper (figur 2e - h), mest sannsynlig på grunn av små variasjoner i fôret. DHA holdt seg nær konsentrasjonen i fôret, altså rundt 5% av totale fettsyrer i både visceralfett og den nøytrale fettfraksjonen i hodenyre, mens den i lever og hjerte var mye mer varierende med snitt over 10% av fettsyrene. DHA var aller høyest i hjerte. Dette er nok siden hele fettfraksjonen ble analysert her, og vil også inneholde en hel del polart fett som er mye høyere i DHA enn de nøytrale fraksjonene (figur 3).

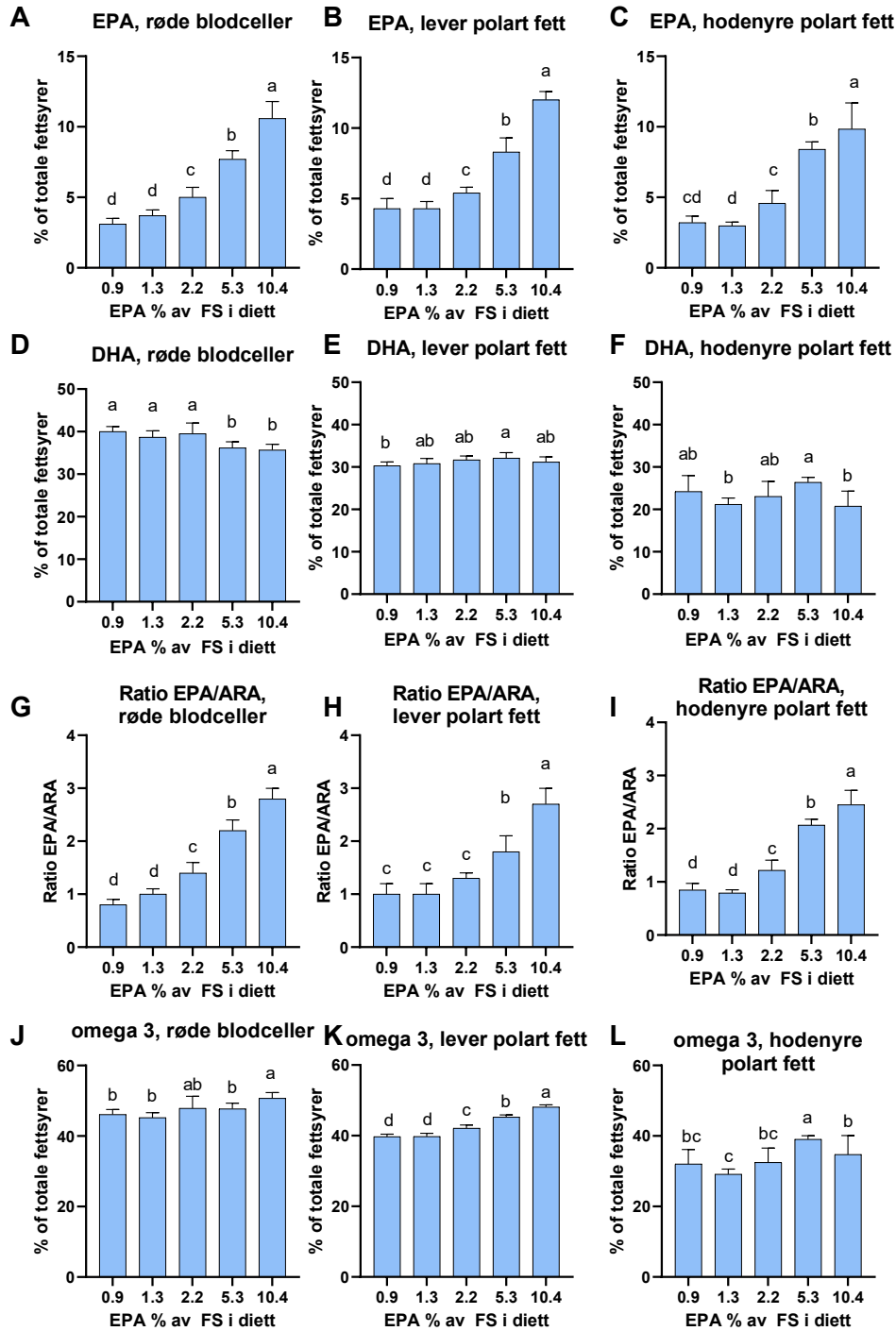
#### *-Polart fett (cellemembraner o.l.)*

EPA i de polare vev og fraksjoner fulgte også EPA nivåene i fôrene, og steg i takt med økning i fôrene (figur 3a - c). Nivåene av EPA i de polare vev og fraksjoner ble ikke så lave som i de nøytrale vevene, og gikk også generelt litt høyere enn det vi så i nøytralt fett. DHA holdt seg også relativt stabilt i polare vev og fraksjoner, men vi så noe nedgang i DHA nivåer i de røde blodcellene ved de to høyeste fôrnivåene av EPA (figur 3d - f). Mens nivåene av DHA i de nøytrale vevene lå nærmere det som var i fôrene, lå DHA i de polare vevene mye høyere, med de høyeste nivåene i de røde blodcellene (DHA ~40% av fettsyrene). For de polare vev og fraksjoner er også ratio mellom EPA og ARA presentert (figur 3g - i), siden dette er av interesse grunnet bruk av disse fettsyrene fra membraner inn i produksjon av EPA og ARA deriverte eikosanoider. ARA ligger relativt stabilt uten forskjeller mellom diettgruppene, mens det er EPA som øker og gir den endringen i ratio vi ser. Totale omega-3 fettsyrer holdt seg relativt stabilt, med kun en liten økning i dietten gitt mest EPA i lever polar fraksjon (figur 3j - l).





Figur 2: Innhold av EPA (A-D) og DHA (E-H) i nøytralt type vev (visceralfett), i nøytral fettfraksjon fra lever og hodenyre, samt i fett ekstrahert fra hjerte. Merk at y-aksen for hver fettsyre har samme skala for alle vev for lettere sammenligning. Bokstaver over kolonner viser signifikante forskjeller etter nested anova analyse med kar som nesting factor. i.s. = ikke signifikante forskjeller mellom diettgrupper.

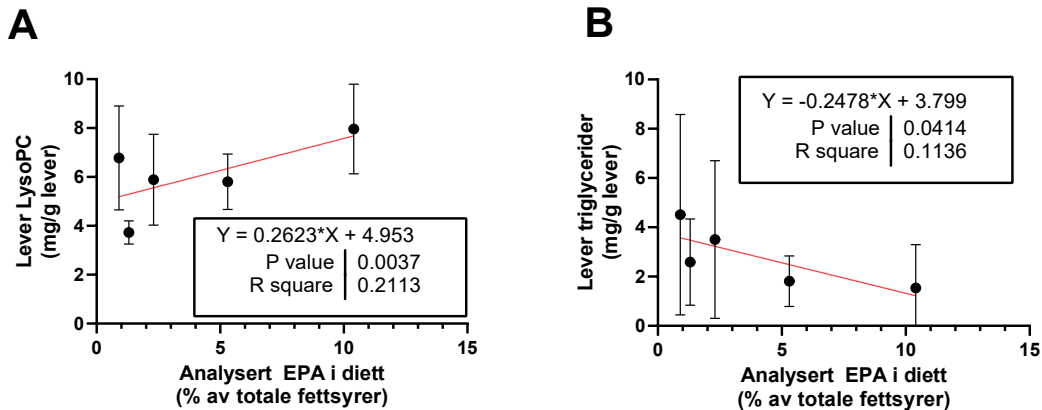


Figur 3: Innhold av EPA (A-C), DHA (D-F), ratio EPA/ARA (G-I) og omega-3 fettsyrer (J-L) i polare type vev (røde blodceller) og i polar fettfraksjon fra lever og hodenyre. Gjennomsnitt per diett  $\pm$  standardavvik. Merk at y-aksen for de ulike vevene har samme skala for hver fettsyre/ratio.



### -Lipidklassesammensetning i lever

Kun noen mindre endringer av lipidklassene i lever ble sett grunnet endringer i EPA. Den polare lipidklassen LysoPC viste noe høyere nivåer i fisk gitt mer EPA, med en signifikant positiv regresjon (Fig 4A), mens triglyseridene viste en negativ korrelasjon med EPA i diett (Fig 4B). LysoPC er sett på som en intermediær fettklasse og kan tyde på økt omsetning av polare lipider i leveren ved økt EPA i diett. Triglyserider er et typisk lagringsfett. Laksens lever er ikke primært et fettlagringsorgan slik den er i noen fiskearter, som torsk, og en redusert fettlagring i lever er sett på som et positivt helsetegn (Sissener et al. 2016c). EPA er tidligere sett å ha lipidreducerende effekt i leverceller fra laks (Kjær et al. 2008), så disse resultatene er spesielt interessante sett i lys av dette.



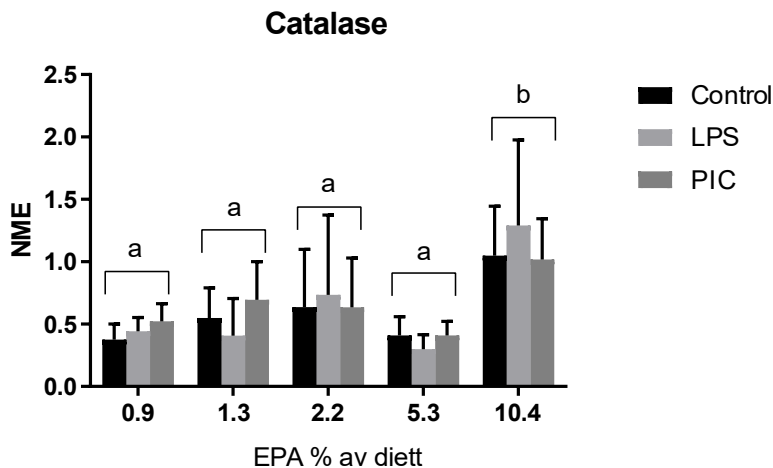
Figur 4: Endringer i lipidklasser, lysoPC (A) og triglyserider (B), i lever til laks føret med økende EPA i diett. LysoPC: Lysophosphatidylcholin. Analyserte verdier av EPA i fôr er brukt ved regresjonsanalysene.



## 5.2 Celleforsøk

### 5.2.1: Hodenyceller i monokultur fra fôringsforsøk (modell 1)

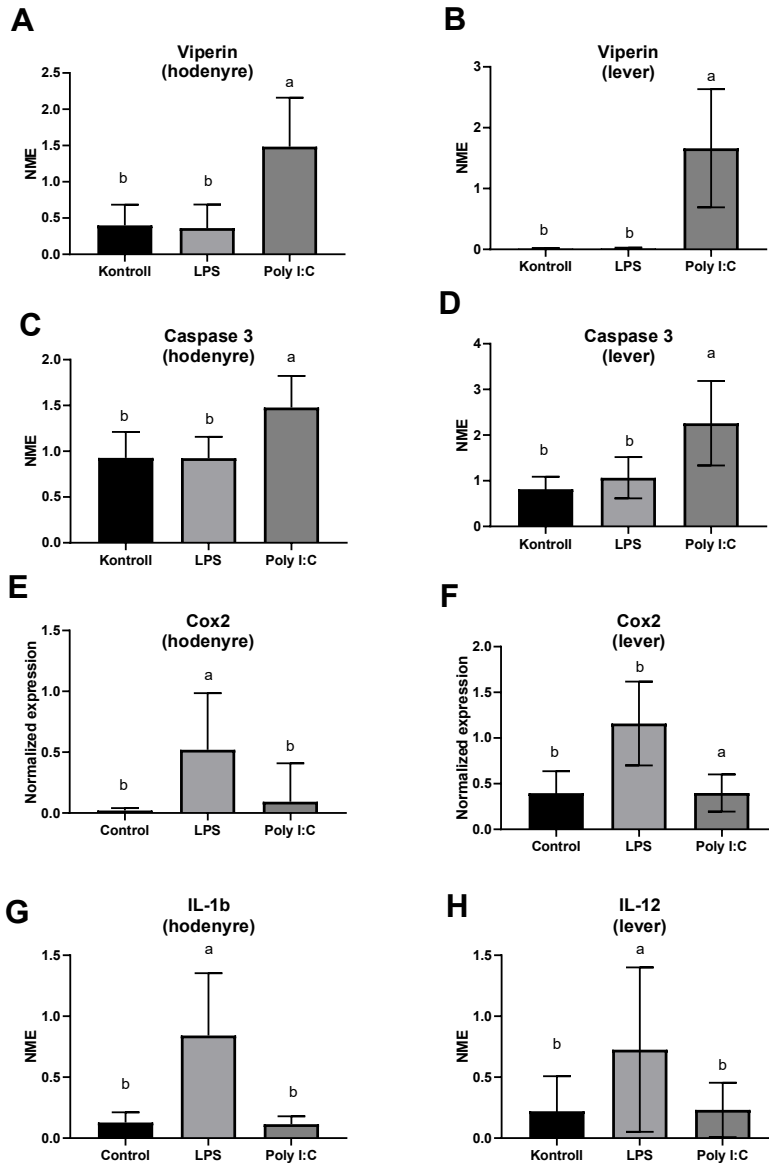
Der var ingen effekter av EPA på kontrollcellene av hodenyceller dyrket i monokultur hentet fra alle fem diettgruppene, utenom en økning i uttrykk av *catalase* i celler fra fisk gitt 10% EPA (Fig 5). Dette er et protein som gjør  $H_2O_2$  om til  $H_2O$  og dermed fungerer for å redusere oksidativt stress. Vi fikk bekreftet at modellen fungerte ved sterkt oppregulerte genuttrykk av gener typiske for respons på bakterier og virus i LPS- (*cox2*, *interferony*, *Il1 $\beta$* , *IL8*) og PolyI:C-induserte celler (*caspase3*, *viperine*, *MX*, *TLR3*) (data ikke vist).



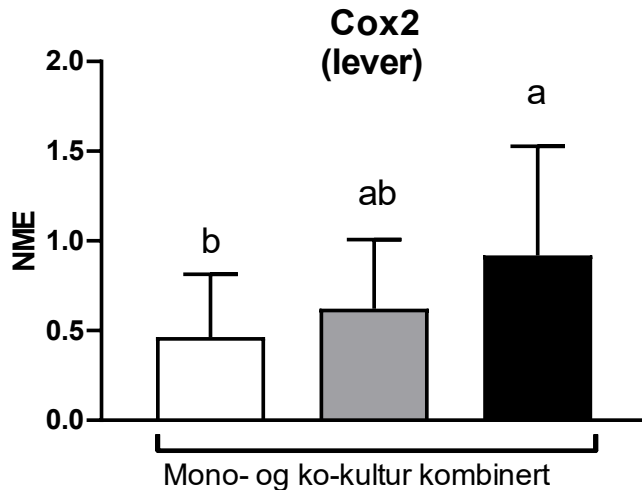
Figur 5: Genuttrykk av *catalase* i hodenyceller høstet fra fôringsforsøk. Diett 0.9-10.4% EPA er resultatene fra celler høstet fra fisk føret med disse EPA-nivåene i diett. PIC = PolyI:C.

### 5.2.2 Ko-kultur med hodenyre- og leverceller fra fôringsforsøk (modell 2)

Vi så også god respons i ko-kultur med hodenyre- og leverceller på flere gener etter stimuli med LPS (lever: *bcl2*, *cd83*, *cox2*, *il12*, hodenyre: *cox2*, *cd83*, *il1 $\beta$* , *il8*, *tnfa*) og PolyI:C (lever: *casp3*, *catalase3*, *cd36*, *cd83*, *sod*, hodenyre: *5-lox*, *casp3*, *mc*, *tlr3*, *viperin*). Et utvalg av disse genene er presentert i figur 6. Vi kunne også se forskjeller i respons mellom celler dyrket i ko-kultur og celler dyrket i mono-kultur. Dette viste seg i all hovedsak som endringer i styrke på genuttrykk, med flere gener med høyere uttrykk i de ko-kultur dyrkede hodenycellene. I levercellene var det motsatt, med en generelt lavere respons i genuttrykk i de ko-kultur dyrkede cellene, sammenlignet med de dyrket i mono-kultur (data ikke vist). For eksempel viste *cox2* i hodenyceller fra ko-kultur en noe kraftigere respons på LPS enn celler dyrket i mono-kultur og *viperin* viste en noe kraftigere PolyI:C respons i leverceller dyrket i ko-kultur. Disse forskjellene i respons var allikevel ikke signifikante og det er derfor usikkert om dette er reelle effekter eller om de også vil være tilstede om en hadde hatt flere replikater per behandling. Det er derfor mulig at interaksjoner mellom celletypene påvirker inflammasjonsresponsen i cellene. Av dietteffekter så vi respons i *cox2*, med høyere uttrykk i levercellene som kom fra fisk gitt de høyeste nivåene med EPA (Figur 7).



Figur 6: Genuttrykk påvirket av PolyI:C (A-D) og LPS (E-H) i hodenyre- og leverceller. Resultater fra ko-kultur og mono-kultur dyrkede celler fra modell 2 er her slått sammen. Diettgruppene er også slått sammen her for å presentere kun effekter av behandling (kontroll, LPS eller PolyI:C). Signifikante forskjeller mellom behandlinger etter nested multifaktoriell analyse med fisk som nesting faktor er indikert med ulike bokstaver over kolonnene.

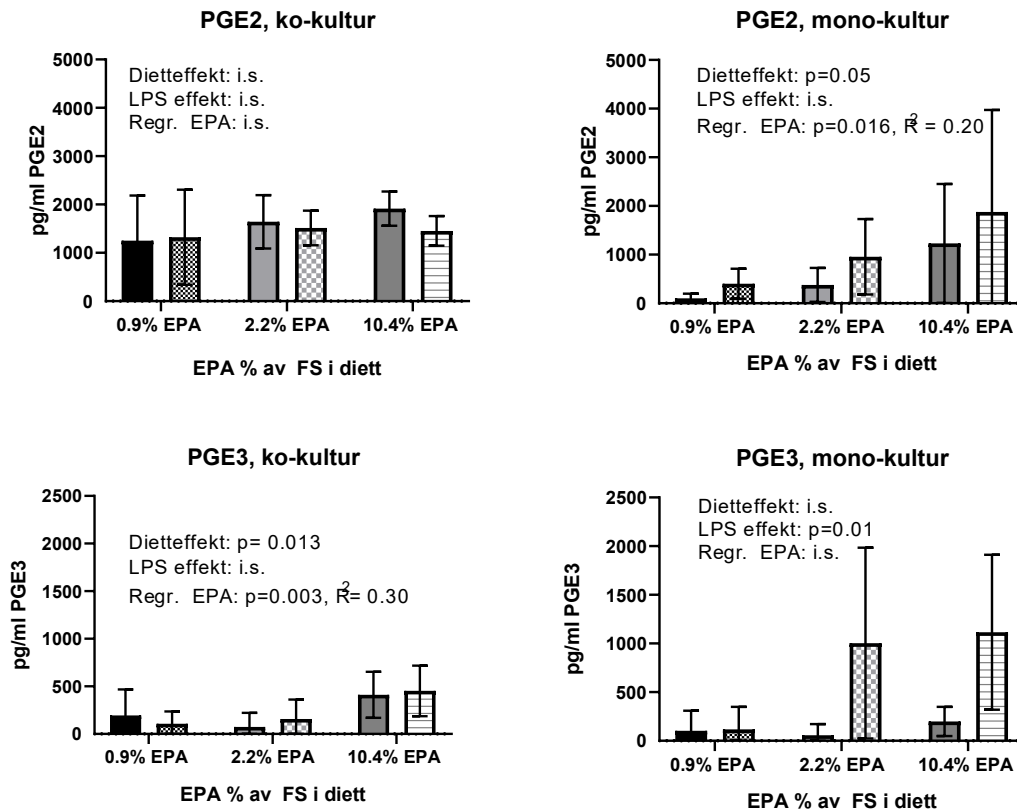


Figur 7: Genuttrykk av *cox2* i leverceller høstet fra fôringsforsøk og dyrket i enten mono- eller i ko-kultur sammen med hodenyreceller. Statistiske forskjeller er en multiple comparison etter signifikant effekt av diett fra nested multifaktoriell analyse (fisk som random factor). Ulike bokstaver over kolonnene viser signifikante forskjeller. Hvit, grå og svart kolonne er resultater fra celler høstet fra fisk gitt henholdsvis 0,9%, 2,3% og 10,4% EPA av totale fettsyrer i fôr.

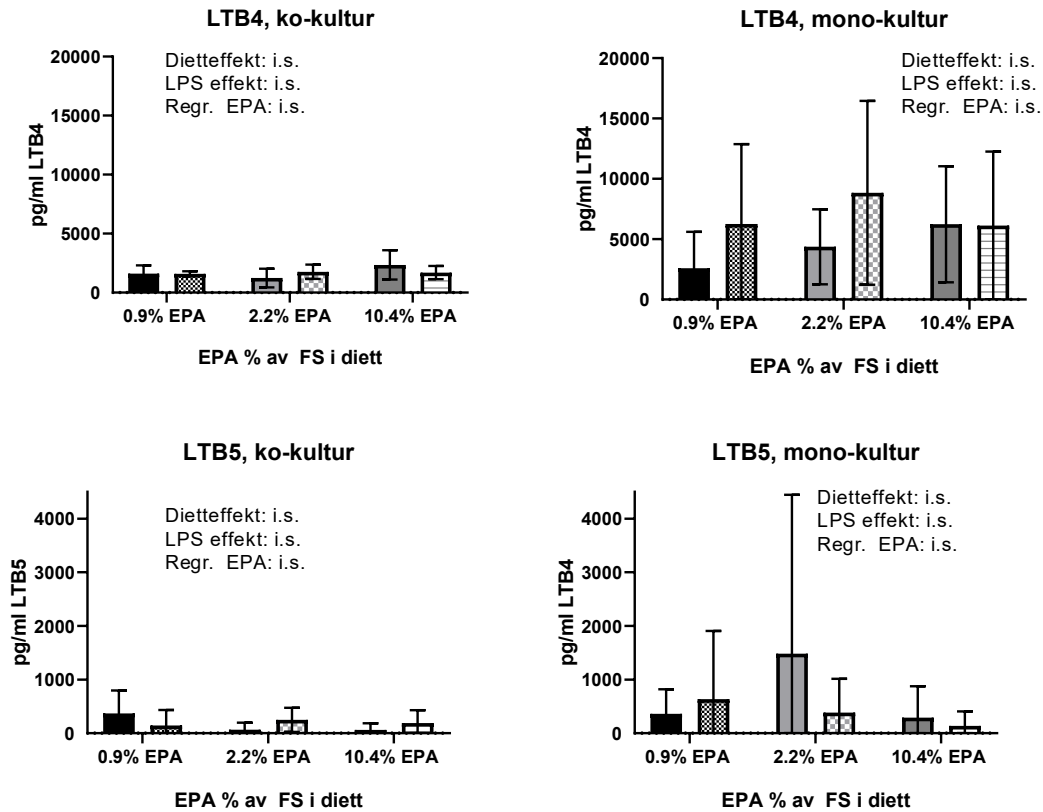
Grunnet begrensinger på metode-kapasitet for eikosanoider valgte vi ut de prøvene vi mente var mest relevante for denne analysen. Siden det var i lever vi så en EPA effekt på *cox2* valgte vi cellemediet fra leverceller for denne analysen. LPS var stimuli som ga sterkest respons på *cox2* i genuttryksanalyser. Cellemedier fra leverceller (mono- og ko-kultur dyrkede) fra kontroll- og LPS stimulerte grupper ble derfor brukt til eikosanoid analyse. Vi kunne se klare forskjeller mellom mono- og ko-kulturmodellene i hvordan eikosanoidene i cellemediene responderte på diett og LPS (Figur 8 og 9). Cellene dyrket i mono-kultur viste tydeligere LPS-effekter på eikosanoidene i cellemediene samt høyere nivåer av noen eikosanoider (Figurer 8 og 9). PGE<sub>2</sub> og LTB<sub>4</sub> var signifikant forskjellig i nivå mellom ko-kultur og mono-kulturdyrkede celler. Det er derfor mulig det er interaksjoner mellom hodenyre og leverceller som påvirker produksjon og nedbrytning av eikosanoider. Det var en signifikant effekt av LPS behandling på PGE<sub>3</sub> i cellemedier fra mono-kultur og en signifikant effekt av diett på PGE<sub>3</sub> i ko-kultur. Det er interessant å se at det laveste EPA nivået i diett førte til fravær av LPS-respons i PGE<sub>3</sub> i mono-kultur. En LPS-respons ble sett ved de to andre EPA-nivåene. Regresjonseffekter ble sett for PGE<sub>3</sub> i ko-kultur og for PGE<sub>2</sub> nivå i mono-kultur, med økende nivåer ved høyere nivåer av EPA. Disse resultatene er derfor i overensstemmelse med høyere uttrykk av *cox2* i behandlinger med høyere EPA, et enzym som er med på å produsere eikosanoider. En sterk økning i ratio mellom EPA/ARA ved høyere EPA i diett kan forklare hvorfor det er en økt mengde med PGE<sub>3</sub> i cellemediet, siden dette prostaglandinet er produsert fra EPA. En økt produksjon av både ARA og EPA deriverte eikosanoider ved økte nivå EPA i cellemembraner er i samsvar med tidligere resultater i Atlantisk laks (Sissener et al. 2020). Det er mulig at det økte genuttrykket til *cox2* i celler med høye nivå av EPA fører til en økt produksjon av flere ulike eikosanoider, ikke kun dem fra EPA. Leukotrienene LTB<sub>4</sub> og LTB<sub>5</sub> var ikke signifikant påvirket av hverken immun-stimuli eller dietter (Figur 9). Dette er også vist i tidligere forsøk



med bruk av samme modell, der leukotrienene responderte i mindre grad på endringer i n-3 fettsyrer enn prostaglandinene (Holen et al. 2018).



Figur 8: Prostaglandiner (PGE2 og PGE3) i cellemedie fra leverceller dyrket enten i ko-kultur med hodenyreceller eller i mono-kultur. Kolonner med skravert bakgrunn er cellemedier fra celler eksponert for LPS, mens heldekkende farge er ubehandlede celler fra de respektive diettgruppene. Statistiske resultater presentert er fra nested multifaktoriell analyse med dietter (som faktorer) og behandling (kontroll/LPS) som variabler. Fisk var brukt som random factor. Det ble også gjort en regresjonsanalyse med analysert EPA nivå i diettene som variabel og med fisk som nesting factor. i.s.: ikke-signifikant.



Figur 9: Leukotriener (LTB4 og LTB5) i cellemedie fra leverceller dyrket enten i ko-kultur med hodenyreceller eller i mono-kultur. Kolonner med skravert bakgrunn er cellemedie fra celler eksponert for LPS, mens heldekkende farge er ubehandlede celler fra de respektive diettgruppene. Statistiske resultater presentert er fra nested multifaktoriell analyse med dietter (som faktorer) og behandling (kontroll/LPS) som variabler. Det ble også gjort en regresjonsanalyse med analysert EPA nivå i diettene som variabel og med fisk som nesting factor. i.s.: ikke-signifikant.





### 5.2.3 Kardiomyocytter fra fôringsforsøk (modell 3)

#### -Kardiomyocytter stimulert med PolyI:C

Både i et pilotforsøk (resultater ikke vist) og i kardiomyocytfforsøket med celler isolert fra fôringsforsøket var det en tydelig oppregulering av virus-responsive gener slik som *mx*, *isg15* og *infa* etter stimulering med PolyI:C. Dette viser at kardiomyocytter i kultur kan benyttes i studier av immunrespons. Uttrykk av enkelte gener i kardiomyocytter stimulert med PolyI:C viste moderat korrelasjon med EPA nivå i hjerte (Tabell 4); *tlr7* (0.66), *gpx3* (0.62) og *aif* (0.64) (korrelasjonsfaktor i parentes etter hvert gen). *tlr7* er involvert i virus respons, mens *gpx* er relatert til oksidativ stress respons og *aif* apoptose. Økt uttrykk av *tlr7* med økende EPA i hjertet kan tyde på en funksjon av EPA knyttet til virus respons, slik indikert i Hatlen et al. (2016). I Hatlen et al. (2016) ble det funnet bedre recovery etter virusinfeksjon i laksen som fikk høyt innhold av EPA i dietten. I vår kardiomyocytst studie undersøkte vi imidlertid genuttrykket ved kun et tidspunkt etter stimulering med PolyI:C. Studien til Hatlen et al. (2016) kan tyde på at effekten av EPA kan sees i bestemte faser etter en virusinfeksjon. Det ble derfor gjennomført et nytt kardiomyocytfforsøk med prøver fra flere tidspunkter etter PolyI:C stimulering, for dermed å simulere en recovery fase, og videre inkludere microarray analyser for å få en bredere oversikt over alle gener som uttrykkes ved de ulike tidspunktene. Resultater fra dette er presentert under.

#### -Kardiomyocytter stimulert med SAV3

Stimulering av kardiomyocytter med SAV3 viste i et pilotforsøk kraftig oppregulering av virusresponsive gener som *mx*, *isg15*, og *infa* (resultater ikke vist), og bekrefter at kardiomyocytter i kultur responderer på virusinfeksjon. Samme virusbatch ga imidlertid svak respons i cellene isolert fra fôringsforsøket med manglende respons på virusresponsive gener slik vi så i pilotforsøket. Det kan skyldes at virus batchen vi benyttet var blitt mindre virulent. Uttrykk av både *gpx* og *aif* i kardiomyocytterne viste likevel moderat korrelasjon med EPA nivå i hjertet (Tabell 4).

Tabell 4. Sammenhengen mellom EPA nivå i hjertet og genuttrykk i polyIC og SAV3 stimulte kardiomyocytter.  $R^2$  viser styrken i sammenheng mellom EPA og genuttrykk, med p-verdi i parentes. Ikke signifikante sammenhenger merket i.s.

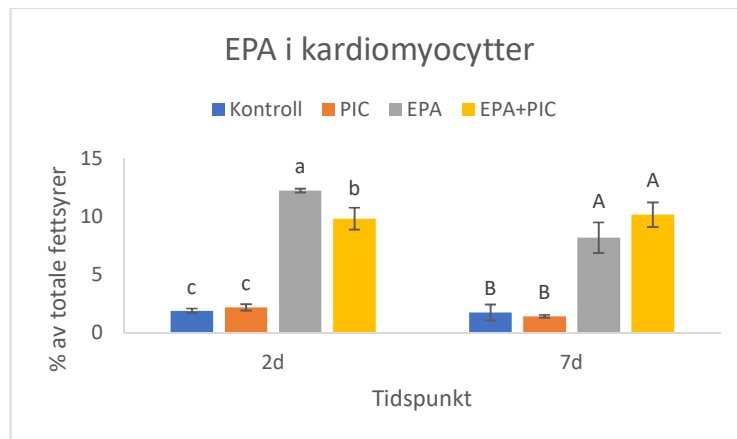
	PolyI:C ( $R^2$ )	SAV3 ( $R^2$ )
<i>mx</i>	i.s.	i.s.
<i>tlr3</i>	i.s.	i.s.
<i>tlr7</i>	0,66 (0,01)	i.s.
<i>isg15</i>	i.s.	i.s.
<i>infa</i>	0,57 (0,03)	i.s.
<i>mhci</i>	i.s.	i.s.
<i>mhcii</i>	i.s.	i.s.
<i>illb</i>	i.s.	i.s.
<i>tnfa</i>	i.s.	i.s.
<i>smac/diablo</i>	i.s.	i.s.
<i>gpx3</i>	0,62 (0,01)	0,76 (<0,01)
<i>casp3</i>	i.s.	i.s.
<i>sod1s</i>	i.s.	i.s.
<i>aif</i>	0,64 (0,01)	0,76 (<0,01)



#### 5.2.4 Kardiomyocytter anriket med EPA (modell 4)

*-Fettsyresammensetning i kardiomyocytter dyrket med EPA og stimulert med PolyI:C*

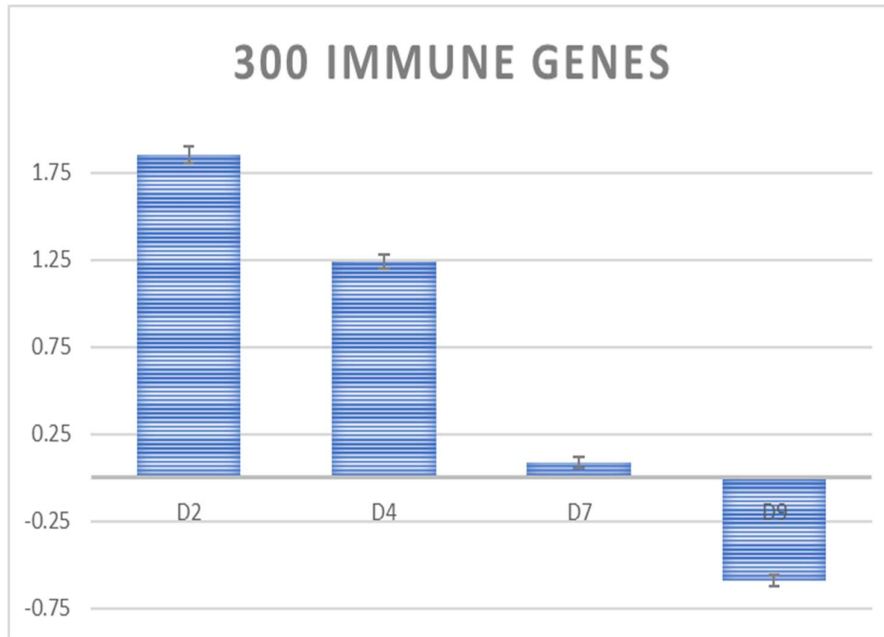
Analyse av fettsyresammensetningen i kardiomyocytter viste ca. 5 ganger høyere nivå av EPA i cellene anriket med EPA enn i cellene som ikke var tilsatt EPA i vekstmediet (Figur 10). Dette så vi både ved 2 og 7 dager etter stimulering med PolyI:C. Innhold av EPA i cellene var liknende det vi så i hjertevev fra fisk føret med det høyeste nivået EPA i fôringsforsøket. Ulik nivå av EPA i cellene vil da kunne forklare ulike forskjeller i genuttrykk og om EPA påvirker immunrespons etter PolyI:C stimulering.



Figur 10. EPA i kardiomyocytter (% av totale fettsyrer) ved 2 og 7 dager etter PolyI:C stimulering. Data er gjennomsnitt ( $n=2$ ) og med standardavvik. Statistiske forskjeller er vist med ulike bokstaver, små bokstaver for 2 dager og store bokstaver for 7 dager. PIC = PolyI:C.

*-Microarray analyse av kardiomyocytter dyrket med EPA og stimulert med PolyI:C*

Microarray-analyse av kardiomyocytene stimulert med PolyI:C viste høyest antall differensielt uttrykte gener to dager etter stimulering, med 1468 gener i gruppen stimulert med PolyI:C og 1577 gener i gruppen anriket med EPA og stimulert med PolyI:C. Effekten av PolyI:C stimulering var sterkest ved dag 2, forble sterk, men var noe lavere ved dag 4. Ved dag 7 var effekten på genuttrykket ytterligere redusert og tilbake på basisnivå ved dag 11 (Figur 11). Resultatene viser sterk immunrespons i *in vitro* dyrkede kardiomyocytter fra laksehjerte som respons på virusmimikken PolyI:C i likhet med tidligere studier av virus stimulerte 3D dyrkede primære kardiomyocytter fra laks (Noguera et al. 2017).



Figur 11. Temporal endring i genuttrykk i kardiomyocytter stimulert med PolyI:C illustrert med gjennomsnittlig genuttrykk av 300 opp-regulerte immungener. D2-D9 = dag 2 til dag 9 etter stimuli med PolyI:C. Data er  $\log_2\text{-ER} \pm \text{SE}$ .

Et lite antall gener responderte på EPA innhold i cellene (Tabell 5). Sammenlikning av genuttrykket i kontrollgruppen med EPA anrikede kardiomyocytter ga 10 differensielt uttrykte gener (differentially expressed genes, DEG) inkludert de lipid relaterte genene *perilipin* og *carnitin palmitoyl transferase 1b*. *Perilipin* var også differensielt uttrykt i PolyI:C stimulerte kardiomyocytter, med økt genuttrykk i celler anriket med EPA. Microarray-analysen ved de ulike tidspunktene viste ingen effekt av EPA på virusresponsive gener, slik som ble sett i Modell 3. Imidlertid viste resultatene at EPA påvirker sentrale fettrelaterte gener, slik som *cpt1* involvert i transport av fettsyrer inn i mitokondriene for oksidasjon og *perilipin* knyttet til lipid-dråper og modulering av lipid metabolisme. Effekten av EPA på virusinfeksjon kan være indirekte ved endring i energimobilisering. I tidligere studier med lakseleverceller har vi sett at EPA induserer mitokondriell proliferering og reduserer intracellulært lipid (Kjær et al. 2008). I tillegg er det vist i pattedyr at EPA stimulerer fettsyreoksidasjon (Guo et al. 2005).

I denne *in vitro* kardiomyocyt-studien ble det identifisert et lite antall differensielt uttrykte gener som respons på EPA ved PolyI:C stimulering, mens *in vivo* studier har vist et større antall differensielt uttrykte gener, redusert hjerteskaade og dempet betennelsesreaksjoner i laks gitt fôr med økt EPA i smitteforsøk med hjerte- og skjelettmuskelbetennelse (HSMB) (Martinez-Rubio et al. 2012, Martinez-Rubio et al. 2013, Hatlen et al. 2016) og kardio-myopatisyndrom (CMS) (Martinez-Rubio et al. 2014). Den observerte interaksjonen mellom lipid metabolismen og immunrespons under virusinfeksjon som påvirker laksehjertet kan indikere en viktig immunmodulerende effekt av EPA.



Tabell 5. Effekt av EPA på relativt genuttrykk ( $\log_2$ -ER) i kontrollceller og celler stimulert med PolyI:C. Rød/oransje farge indikerer gener som er høyere uttrykt etter EPA og/eller PolyI:C stimulering, mens grønne celler er nedregulert av EPA og/eller PolyI:C. Tall i fet tekst og understreket markerer signifikante effekter på dette genet av gitt behandling.

Prosess	Gen	Effekt EPA i kontroll celler	Effekt EPA i PolyI:C stimulerede celler
Fettmetabolisme	<i>Carnitine palmitoyl transferase 1B (Muscle)</i>	<b><u>1,02</u></b>	0,63
Fettmetabolisme	<i>Perilipin</i>	<b><u>1,15</u></b>	<b><u>1,23</u></b>
Celledød (apoptose)	<i>CASP8 and FADD-like apoptosis regulator</i> <i>CASP8 and FADD-like apoptosis regulator</i>	<b><u>0,83</u></b>	0,61
Cell Folding, protein modifikasjoner	<i>heat shock protein 30-like</i>	<b><u>-0,84</u></b>	-0,34
Celle ubiquitin	<i>F-box only protein 41</i>	<b><u>1,62</u></b>	-0,32
Immun akutfase	<i>Antimicrobial peptide 2 (LEAP2)</i>	<b><u>1,12</u></b>	<b><u>0,97</u></b>
Immun protease	<i>collagenase 3-like</i>	<b><u>-0,84</u></b>	-0,11
Vev vekstfaktor	<i>Angiopoietin-related protein 4</i>	<b><u>1,05</u></b>	<b><u>1,33</u></b>
Vev Hematopoiesis	<i>Kruppel-like factor 11b</i>	<b><u>1,06</u></b>	<b><u>0,85</u></b>
Vev plasma	<i>Fibroleukin</i>	<b><u>-0,89</u></b>	-0,70

En rekke funksjonelle grupper viste koordinerte endringer i genuttrykk som respons på PolyI:C stimulering i kardiomyocytter og viser at kardiomyocytene har en funksjon i immunrespons. De fleste genene var enten opp- eller nedregulert slik at gjennomsnittlig  $\log_2$ -ER var signifikant forskjellig fra 0 (Tabell 6A og B). PolyI:C stimulering av kardiomyocytter påvirket gener involvert i immunsvær, apoptose og protein-degradering via proteasomer og ubiquitin. De største endringene ble observert i to grupper; antigen presentasjon og medfødte antivirale responser med hhv. 53 og 185 differensielt uttrykte gener. I likhet med betennelse forårsaket av bakterielle og virale patogener, var mobilisering av immunrespons mobilisert parallelt med suppresjon av en rekke metabolske veier og biotransformasjon, kontraktile apparat og prosesser assosiert med vedlikehold og differensiering av celler og vev. De tjue mest differensielt uttrykte genene er vist som illustrasjon i figur 8B. Alle de mest oppregulerte DEG er immungener, fem av dem er spesifikke antivirale effektorer, og resten er kjent som markører for akutt betennelse i atlantisk laks. De ti mest nedregulerte genene inkluderer tre komponenter av ekstracellulær matriks (ECM); ECM (*laminin*, *decorin* og *clq tnf related*), to ECM-modifiserende enzymer (*procollagen 4-dioxygenase* og *prolyl 3-hydroxylase 3*), en stress mediator *sestrin*, et enzym av xenobiotisk metabolisme *udp glucuronosyltransferase 5d1* og *id-2*, en utviklingsregulator med brede funksjoner.



Tabell 6: A: Funksjonelle grupper av gener med koordinert endring i genuttrykk etter stimulering med PolyI:C. Antall gener som er signifikant forskjellige fra 0 i gjennomsnitt  $\log_2$ -ER. B: De 20 genene med høyeste ekspresjonsendring som respons på PolyI:C stimulering i kardiomyocytter. Rød farge indikerer gener som er høyere uttrykt etter PolyI:C stimulering, mens grønne celler er nedregulert av PolyI:C.

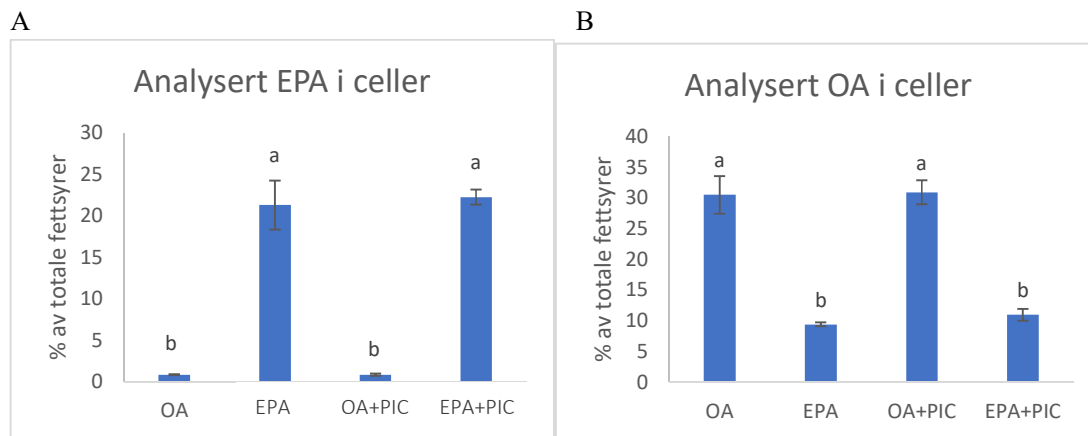
A			B		
Group	Number	Fold	Gene	D2	D4
<b>Immune &amp; related</b>			CXCL10-like chemokine	268.0	374.6
Acute phase	5	30.3	Gig2	198.1	197.8
Antigen presentation	53	3.2	Gig2-4	93.9	99.5
Antiviral	185	8.8	Gig2-7	149.8	141.0
Apoptosis	29	1.8	Interferon-induced protein 44-1	97.0	96.6
Chemokines	19	4.1	L-amino-acid oxidase	144.5	141.3
Complement	7	2.5	Viperin	172.9	184.4
Cytokine receptors	14	2.8	Serum amyloid A	127.6	120.9
Effectors	12	2.6	Ubiquitin protein ligase E3A	60.3	66.7
Hematopoiesis	9	2.1	Urokinase plasminogen activator	57.2	69.6
Immune regulators	39	2.0	C1q TNF-related protein 5	-6.7	-7.6
Plasma	11	2.9	Decorin	-6.4	-8.0
Proteasome	19	3.1	DNA-binding protein inhibitor ID-2	-5.3	-7.0
TNF-related	27	2.2	Laminin, beta 2	-4.8	-6.5
Ubiquitin	52	2.1	Membrane-spanning 4-domains	-6.5	-7.1
<b>Cells &amp; tissue</b>			Procollagen 4-dioxygenase	-5.9	-6.5
Chromosome maintenance	14	-1.6	Prolyl 3-hydroxylase 3	-6.7	-7.0
Myofiber	16	-1.8	Selenium-binding protein 1	-6.6	-6.9
Mitochondria	19	-1.8	Sestrin-1	-5.3	-6.4
Lipid metabolism	42	-1.5	UDP glucuronosyltransferase 5d1	-22.6	-28.0
Xenobiotic metabolism	27	-1.7			
Endothelium, angiogenesis	6	-1.7			
Calcium metabolism	15	-1.7			
ECM, extracellular	17	-2.0			
Bone, cartilage	5	-2.6			



### 5.2.5 Adipocytter anrikt med EPA (modell 5)

#### *-Fettsyresammensetning i cellene dyrket med EPA eller OA*

Analyse av fettsyresammensetning i adipocytterne viste økt cellulært nivå av henholdsvis EPA og oljesyre (OA) i adipocytter anrikt med de respektive fettsyrene (Figur 12). EPA (som prosent av fettsyrer) i adipocytter tilsatt EPA i cellemediet var høyere enn analyserte verdier for visceralfett (adipocytter nådde ~20% EPA av fettsyrer, mens i visceralfett nådde ikke EPA 10% av fettsyrer). EPA nivået i cellene tilsatt OA var mer likt nivåene målt i visceralfett fra fôringsforsøket og lå der på rundt 10%. Dette kan skyldes at fisken som ble brukt til å hente celler fra hadde fått en diett med relativt høyt nivå fiskeolje. Ratioene mellom OA og EPA var allikevel veldig forskjellige mellom OA og EPA gruppen med spesielt god anriking av OA inn i cellene. Det var ingen forskjell i cellulært nivå av EPA og OA i adipocytter som var stimulert med PolyI:C og de som ikke var stimulert med PolyI:C.



Figur 12. Nivå av a) EPA og b) oljesyre (OA) (% av totale fettsyrer) i adipocytter anrikt med OA eller EPA i vekstmedium, med og uten simulering av virusrespons med PolyI:C (PIC).

#### *-Microarray analyse av adipocytter dyrket med EPA eller OA og stimulert med PolyI:C*

Microarray analysen viste et større antall differensielt uttrykte gener (differentially expressed genes, DEG) i EPA-anrikede adipocytter sammenliknet med OA-anrikede adipocytter (Tabell 7). Forskjellen i genuttrykk mellom de to gruppene var stor og økte over tid, fra 409 DEG ved 24 timer til 1316 DEG ved 96 timer. Responsen på PolyI:C var liknende i OA- og EPA-anrikede celler med 400-600 DEG, men med noe svakere respons ved 96 t enn ved 24 t.

Tabell 7. Antall differensielt uttrykte gener (DEG).

Sammenlikning	DEG
EPA vs OA, 24 t, kontroll grupper	409
EPA vs OA, 96 t, kontroll grupper	1316
Poly-I:C EPA, 24 t versus EPA, 24 h	586
Poly-I:C EPA, 96 t versus EPA 96 h	505
Poly-I:C OA, 24 t versus OA 24 h	536
Poly-I:C OA, 96 t versus OA 96 h	434



### -Effekter av EPA på genuttrykk

Adipocytter stimulert med EPA viste høyt uttrykk av immunrelaterte gener (Tabell 8A og B). Mange DEG er spesifikke for adaptiv immunitet: komponenter i MHCII-systemet uttrykt på antigenpresenterende celler, regulatorer av lymfocyttdifferensiering (*hematopoietic lineage specific protein, fermitin family, mafb*) markører for B og T celler (*igh, b cell linker protein, plastin, cd4*). Mest sannsynlig var lymfocytter til stede i fettvevet cellene ble isolert fra, og tilsetning av EPA til kulturene kan ha stimulert proliferasjon og / eller differensiering. EPA induerte i tillegg proteinrelatert stress ved oppregulering av chaperoner, metabolisme av jern, aminosyrer, transport og flere andre signalveier. OA ser ut til å favorisere proliferering av celler og etablering av ECM. Gener med markert oppregulering i adipocytter anrikt med OA (Tabell 8C) tilhører forskjellige grupper av gener inkludert cellyklus og nukleotidmetabolisme. Transkripsjonsfaktor *id2* er en hovedregulator som hindrer differensiering. Tabell 8 viser også endringer i proteiner involvert i cytoskjelettet, et hormon, sekretorisk protein og glykaner.

Tabell 8. Genuttrykk i adipocytter anrikt med EPA eller OA. Data er ratio mellom gruppene. A) Funksjonelle grupper, antall DEG er angitt i den første kolonnen. Data er ratio mellom EPA og OA. Positive og negative verdier betyr høyere eller lavere uttrykk i gruppene med henholdsvis EPA og OA. B-C: gener med høyere uttrykk i kulturer med EPA (B) og OA (C). Data er henholdsvis EPA til OA (B) og OA til EPA (C) ratio. Differensielt uttrykk (> 1,75 ganger,  $p < 0,05$ ) er markert med understreket fet kursiv.

A	B			C			
	DEG	EPA 24h	EPA 96h	Gene	Gene		
Antiviral response	64	-1.06	1.92	C1q and TNF related	1.52 <u>1.77</u>	C1q TNF-related protein 5	3.04 <u>6.19</u>
Effector	21	1.18	1.81	Apolipoprotein C-I	1.44 <u>4.01</u>	C1q and TNF domain	4.03 <u>1.88</u>
protease	5	-1.29	1.00	MHCII Q10 alpha chain-like	1.10 <u>1.80</u>	72 kDa type IV collagenase	2.13 <u>4.76</u>
regulator	27	1.10	1.55	C-C motif chemokine 13-like	<u>2.25</u> <u>2.33</u>	Cyclin E1	2.83 <u>5.12</u>
Ig receptor	7	1.35	2.41	Neutrophil cytosolic factor 1	1.28 <u>5.11</u>	G1/S-specific cyclin-E1	2.43 <u>4.34</u>
TNF	17	-1.03	1.49	Macrophage receptor MARCO	1.64 <u>3.48</u>	Cell division cycle associated 7a	2.87 <u>3.24</u>
Antigen presentation	9	1.09	1.55	Neutrophil cytosolic factor 4	1.02 <u>2.25</u>	Plectin	1.92 <u>3.14</u>
Lymphocyte	27	1.12	2.22	Sacsin	1.68 <u>2.93</u>	Adenosine monophosphate deaminase 3a	2.36 <u>9.41</u>
Tissue Hematopoiesis	9	1.48	2.25	TNFAIP3-interacting	1.57 <u>2.29</u>	Thymidine kinase, cytosolic	2.12 <u>6.07</u>
T cell	15	1.06	1.71	Cathepsin 5	1.38 <u>2.36</u>	Ribonucleotide reductase M2 polypeptide	1.70 <u>4.42</u>
Protein folding	32	1.64	1.99	Tribbles homolog 3	<u>5.61</u> <u>10.91</u>	Cellular retinoic acid binding 2, b	3.08 <u>4.75</u>
Lysosome	16	1.37	1.95	B-cell linker protein-like	1.73 <u>2.37</u>	Cytosolic sulfotransferase 4	4.22 <u>8.35</u>
Transport	13	1.74	1.81	IgH-locus	1.46 <u>1.98</u>	Beta-ureidopropionase	3.09 <u>5.03</u>
Amino acid metabolism	38	1.33	1.46	Hematopoietic lineage cell-specific	<u>2.03</u> <u>3.66</u>	Microfibrillar-associated 4	2.73 <u>3.00</u>
Iron & heme metabolism	11	1.67	1.79	Fermitin family	<u>2.00</u> <u>3.82</u>	Inhibitor of DNA binding 2	3.13 <u>4.02</u>
Chromosome	40	-1.45	-2.16	Transcription factor MafB [Maf-B]	<u>1.97</u> <u>3.09</u>	Brain natriuretic peptide-like	3.09 <u>3.56</u>
Cell cycle	79	-1.35	-1.97	Plastin-2 lymphocyte cytosolic	1.67 <u>3.67</u>	Epithelial membrane protein 2-like	2.31 <u>3.82</u>
DNA repair	16	-1.37	-2.02	CD4-like	1.33 <u>2.41</u>	Glycophorin-C	3.35 <u>6.95</u>
DNA replication	33	-1.45	-2.29	B-cell lymphoma 3 protein	<u>8.33</u> <u>10.38</u>	Unconventional myosin-Ib	2.18 <u>4.38</u>
Collagen	13	-1.24	-1.88	Heat shock protein beta-11	<u>27.10</u> <u>27.59</u>	Lectin-like proteoglycan	2.70 <u>2.66</u>
ECM	20	-1.21	-1.45	Heat shock protein family b7	<u>3.68</u> <u>3.11</u>	Thrombospondin 1	2.56 <u>5.74</u>
Growth factor	19	-1.33	-1.52	Amino acids decarboxylase-like	<u>35.34</u> <u>21.22</u>	Dentin sialophosphoprotein-like	8.01 <u>7.17</u>

### -Effekter av PolyI:C på genuttrykk

Det var liknede respons på PolyI:C i EPA og OA anrikede celler. Av 837 DEG var det flest immunrelaterte gener (362), og av disse var 292 gener oppregulert. Gruppen med størst antall gener (175 DEG) og med sterkeste respons var relatert til medfødt antiviral immunitet. De mest oppregulerte genene var *reseptortransporterende protein 3 (rtp3)*, *viperin*, *isg15*, *ifit5*, fire medlemmer av *gig2*-familien, *ifn-indusert 44*, *sacsin*, *cxcl10* chemokine og barrier-to- *autointegreringsfaktor (banf)*. Ved 24 timer var det 53 gener som var ulikt uttrykt i EPA og OA anrikede celler stimulert med PolyI:C (Tabell 9). Antall gener med høyere uttrykk i EPA- eller OA-anrikede celler var like, og bare ti gener var knyttet til en immunfunksjon. Ved 96 timer var 273 gener som var ulikt uttrykt mellom EPA og OA anrikede



PolyI:C stimulerte celler. Inkludert i disse var 125 immungener, og de fleste av dem viste høyere nivåer i kulturer med EPA. Resultatene bekrefter at fettvevet har en viktig funksjon i immunrespons, slik vi har sett i tidligere studier (Škugor et al. 2010, Bou et al. 2020).

Tabell 9. Antall gener som var forskjellig uttrykt i adipocytter anrikt med enten EPA eller OA og stimulert med poly(I:C) etter 24t og 96t. DEG: differensielt uttrykte gener.

	24 t	96 t
<b>Alle</b> DEG	53	273
Høyere i EPA	28	208
Høyere OA	25	65
<b>Immun</b> relaterte DEG	10	125
Høyere i EPA	3	112
Høyere i OA	7	13

#### -Effekt av tid på genuttrykk

De fleste av de immunrelaterte genene viste forskjell i uttrykk kun ved 96 t (Tabell 10). Det er verdt å bemerke at EPA induserte høyere uttrykk av de tre nøkkelregulatorene av medfødt antiviral respons: *stat1*, *jak* og *irf1*. Blant de 51 genene i denne gruppen med sterkest respons på PolyI:C i EPA anrikede celler, er 14 medlemmer *trim – tripartite motive proteins* multigene familie. Gener med høyere uttrykk i OA anrikede adipocytter inkluderer *tnfa* og tre gener med *tnf* og *clq* (*complement factor 1q*) domener. Dette er en lite studert multigenfamilie som har høy immun aktivitet i laks. Sammenliknet med gener relatert til medfødt immunitet var lymfocytt-spesifikke transkripter lavere uttrykt ved 24 t. Etter recovery ved 96 t var genuttrykket igjen høyere i adipocyttene anrikt med EPA som før behandlingen (Tabell 10). Gruppene viste også sterkere stressrespons ved begge tidspunkter som vist ved DEG som chaperones (hovedsakelig *heat shock proteins* og *cognates*), gener knyttet til glutathion og xenobiotisk metabolisme. Noen av disse var markert nedregulert i celler med OA ved 96 t.





Tabell 10. Gener som var ulikt uttrykt i adipocytter anrikt med EPA eller OA og stimulert med PolyI:C (PIC i tabell). Kolonne 1 & 2: ratio mellom genuttrykk i EPA og OA anrikede adipocytter stimulert med PolyI:C. Kolonne 3-6: Ratio mellom genuttrykk i PolyI:C behandlede adipocytter og de respektive kontrollene. Signifikante forskjeller fra kontrollcellene (>1.75-fold,  $p < 0.05$ ) er understreket og i kursiv. Rødt viser høyere uttrykte gener, mens grønt indikerer en nedregulering sammenlignet med kontrollceller.

Gene	PIC(EPA-OA)24	PIC(EPA-OA)96	PIC-EPA24	PIC-EPA96	PIC-OA24	PIC-OA96
C-C motif chemokine 4-like	1.7	<b><u>6.6</u></b>	<b><u>3.0</u></b>	1.0	<b><u>4.5</u></b>	-1.1
interferon regulatory factor 1	1.1	<b><u>2.7</u></b>	<b><u>15.0</u></b>	<b><u>4.4</u></b>	<b><u>11.8</u></b>	<b><u>2.7</u></b>
STAT1a	1.1	<b><u>3.0</u></b>	<b><u>29.6</u></b>	<b><u>9.7</u></b>	<b><u>31.0</u></b>	<b><u>4.5</u></b>
Jak1	1.1	<b><u>1.8</u></b>	1.2	1.4	<b><u>1.9</u></b>	1.5
Sacsin	-1.1	<b><u>2.3</u></b>	<b><u>47.2</u></b>	<b><u>20.4</u></b>	<b><u>0.0</u></b>	<b><u>26.0</u></b>
Gig1-2	1.0	<b><u>2.3</u></b>	<b><u>43.6</u></b>	<b><u>18.0</u></b>	<b><u>56.3</u></b>	<b><u>11.0</u></b>
Fish virus induced TRIM-7	1.1	<b><u>2.3</u></b>	<b><u>4.9</u></b>	<b><u>4.5</u></b>	<b><u>5.0</u></b>	<b><u>2.5</u></b>
Poly (ADP-ribose) polymerase family 14	1.2	<b><u>2.4</u></b>	<b><u>9.9</u></b>	<b><u>4.5</u></b>	<b><u>10.1</u></b>	<b><u>2.5</u></b>
Very large inducible GTPase 1-2	1.1	<b><u>2.5</u></b>	<b><u>16.9</u></b>	<b><u>14.7</u></b>	<b><u>20.4</u></b>	<b><u>7.2</u></b>
PPARA-interacting complex 285 kDa-2	1.0	<b><u>2.6</u></b>	<b><u>34.4</u></b>	<b><u>17.0</u></b>	<b><u>43.1</u></b>	<b><u>8.8</u></b>
TRIM 35	-1.3	<b><u>3.1</u></b>	<b><u>19.5</u></b>	<b><u>13.4</u></b>	<b><u>28.4</u></b>	<b><u>4.6</u></b>
IgM receptor	1.3	<b><u>2.6</u></b>	<b><u>2.8</u></b>	<b><u>2.3</u></b>	<b><u>2.7</u></b>	<b><u>2.2</u></b>
C-type lectin M4, cd209l	-1.4	<b><u>3.8</u></b>	<b><u>-2.1</u></b>	<b><u>1.9</u></b>	1.0	1.1
Tyrosine-protein kinase SYK	-1.1	<b><u>2.4</u></b>	<b><u>-1.9</u></b>	1.3	-1.4	1.0
Fermitin family	1.2	<b><u>3.4</u></b>	<b><u>-2.4</u></b>	1.0	-1.4	1.1
Hematopoietic lineage cell-specific	1.6	<b><u>3.6</u></b>	<b><u>-2.0</u></b>	-1.7	-1.6	-1.6
Transcription factor MafB [Maf-B]	1.1	<b><u>4.3</u></b>	<b><u>-2.9</u></b>	<b><u>1.9</u></b>	-1.5	1.4
Plastin-2 lymphocyte cytosolic protein	1.3	<b><u>4.5</u></b>	<b><u>-1.9</u></b>	-1.4	-1.5	-1.7
C1q TNF-related protein 5	<b><u>-3.1</u></b>	<b><u>-4.8</u></b>	-1.1	-1.5	-1.1	<b><u>-2.0</u></b>
C1q and TNF domain	<b><u>-3.1</u></b>	<b><u>-3.2</u></b>	1.5	<b><u>-2.1</u></b>	1.2	-1.2
C1q-like protein 2	<b><u>-2.1</u></b>	<b><u>-2.2</u></b>	-1.4	<b><u>-1.8</u></b>	-1.6	<b><u>-2.2</u></b>
TNF $\alpha$	<b><u>-2.4</u></b>	<b><u>-2.1</u></b>	<b><u>2.3</u></b>	1.0	<b><u>1.9</u></b>	1.4
Heat shock protein beta-11	<b><u>13.9</u></b>	<b><u>34.6</u></b>	<b><u>1.9</u></b>	1.2	<b><u>3.8</u></b>	-1.1
Heat shock cognate 70	<b><u>3.7</u></b>	<b><u>4.4</u></b>	<b><u>2.2</u></b>	1.6	1.1	1.1
Glutathione reductase, mitochondrial	<b><u>2.3</u></b>	<b><u>3.3</u></b>	1.0	1.0	-1.2	<b><u>-1.9</u></b>
Glutathione peroxidase type 2	<b><u>1.8</u></b>	<b><u>2.1</u></b>	-1.1	-1.6	-1.3	<b><u>-2.6</u></b>
Glutathione peroxidase 1-like	1.7	<b><u>2.0</u></b>	1.0	-1.3	-1.2	<b><u>-2.1</u></b>
Glutathione S-transferase A	<b><u>2.2</u></b>	<b><u>3.5</u></b>	1.1	-1.1	-1.2	<b><u>-1.8</u></b>
Glutathione S-transferase P	<b><u>2.0</u></b>	<b><u>2.2</u></b>	-1.2	<b><u>-1.8</u></b>	-1.3	<b><u>-2.8</u></b>
UDP glucuronosyltransferase 5d1	-1.1	<b><u>2.5</u></b>	<b><u>-3.5</u></b>	-1.5	<b><u>-1.9</u></b>	-1.3



*-Effekt av fettsyrer (OA vs EPA) på gener med metabolsk funksjon.*

Effekt av fettsyre på metabolisme av lipider, steroider, galle, vitaminer og retinol økte over tid med høyest uttrykk ved 96 t (Tabell 11). Sammenliknet med OA viste EPA anrikede adipocytter høyere uttrykk av lipid relaterte gener som *perilipin*, *fettsyre bindeprotein*, *carnitin palmitoyl transferase 1b*, og *apolipoproteiner*. Vi har også tidligere sett at omega-3 fettsyrer slik som DHA kan modulere immunrespons og mitokondriefunksjon i adipocytter ved simulering av bakteriell infeksjon med LPS (Bou et al., 2020).

*Tabell 11. DEG involvert i metabolisme av lipider, steroider, galle, vitaminer og retinol. Data er gjennomsnittlig ratio EPA til OA. Signifikante forskjeller fra kontrollcellene (>1.75-fold, p<0.05) er understreket og i kursiv. Rødt viser høyere uttrykte gener, mens grønt indikerer en nedregulering sammenliknet med kontrollceller.*

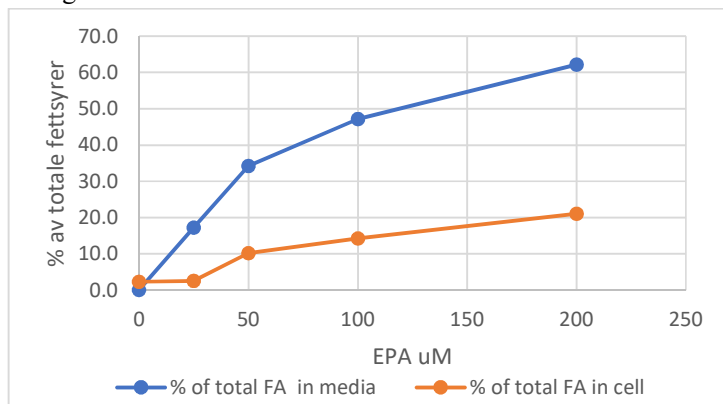
Gene	EPO:OA 24h	EPO:OA 96h	Gene	EPO:OA 24h	EPO:OA 96h
Perilipin	<u>2.42</u>	<u>2.32</u>	Short-chain dehydrogenase/reductase 3	-1.65	<u>-4.82</u>
Fatty acid binding protein	<u>2.23</u>	<u>3.28</u>	3-hydroxyacyl-CoA dehydratase 4	<u>-1.94</u>	<u>-2.84</u>
Apolipoprotein Eb [Apo-Eb]	<u>1.93</u>	<u>2.35</u>	Retinoid-binding protein 7-like	<u>7.55</u>	<u>10.84</u>
Glycerophosphodiester phosphodiesterase 1	1.61	<u>2.17</u>	Gprc5c protein	<u>2.15</u>	<u>2.64</u>
Cholesteryl ester hydrolase (lipa)	1.58	<u>2.01</u>	Epidermal retinol dehydrogenase 2	1.62	<u>1.91</u>
Carnitine palmitoyltransferase 1B	1.51	<u>2.24</u>	Beta-carotene dioxygenase 1	1.57	<u>2.38</u>
Long-chain-fatty-acid--CoA ligase	1.51	<u>2.19</u>	Glycerol-3-phosphate acyltransferase 3	-1.15	<u>-2.09</u>
Serine incorporator 5	1.47	<u>2.12</u>	C-1-tetrahydrofolate synthase	-1.24	<u>-1.80</u>
Serine palmitoyltransferase 1	1.46	<u>1.75</u>	Lysophosphatidylcholine acyltransferase 2	-1.47	<u>-2.08</u>
Apolipoprotein C-I	1.43	<u>5.89</u>	Glycerate kinase	-1.59	<u>-2.32</u>
Low density lipoprotein receptor	1.42	<u>1.94</u>	fatty acid-binding protein	<u>-2.16</u>	<u>-2.20</u>
Phospholipase D4-like	1.27	<u>1.96</u>	transcobalamin-2-like	1.20	<u>1.88</u>
Phosphoethanolamine phosphatase	-1.71	<u>-2.91</u>	Alpha-tocopherol transfer protein	<u>2.42</u>	<u>3.17</u>
Dihydrofolate reductase	-1.39	<u>-2.22</u>	Lipid phosphate phosphohydrolase 1-like	1.22	<u>1.89</u>
25-hydroxyvitamin D-1 alpha hydroxylase	-1.44	<u>-2.39</u>	Retinol dehydrogenase 11	-1.23	<u>-2.07</u>
retinol dehydrogenase 7-like	-1.47	<u>-2.00</u>	Aldehyde dehydrogenase 6A1	-1.37	<u>-1.80</u>
Mid1-interacting protein 1-like	-1.58	<u>-1.79</u>	Peroxisomal 2,4-dienoyl-CoA reductase	-1.41	<u>-1.81</u>
3-ketoacyl-CoA thiolase	-1.58	<u>-2.45</u>	Cellular retinoic acid binding protein 2, b	<u>-3.08</u>	<u>-4.75</u>
Cytochrome P450 27C1	-1.63	<u>-1.92</u>	Beta-ureidopropionase	<u>-3.09</u>	<u>-5.03</u>



### 5.2.6 Leukocyt cellelinje fra hodenyre (ASK) (modell 6)

#### -Fettsyresammensetning i celler dyrket med EPA

For å verifisere at cellene tok opp EPA fra mediet ble celler og medier analysert for total fettsyresammensetning etter en ukes inkubasjon i 0-200 uM EPA. Figur 13 viser at cellene tok opp det tilsatte EPA og at nivået steg fra 2% til 20% av totale fettsyrer i cellene som var dyrket en uke i 200 uM EPA. Dette nivået er høyere enn det som normalt oppnås i celler ved fôring med høyt nivå av EPA i diett (der oppnås nivåer opp mot ~15% av fettsyrer). Vi kan derfor konkludere at EPA tilsatt i mediet på denne måten blir tatt opp og inkorporert i cellens forskjellige lipidfraksjoner. Cellene tilsatt det nest høyeste nivået EPA i dette forsøket tilsvarer nivået i de høyeste nivåene EPA i fôr brukt i fôringsforsøket.



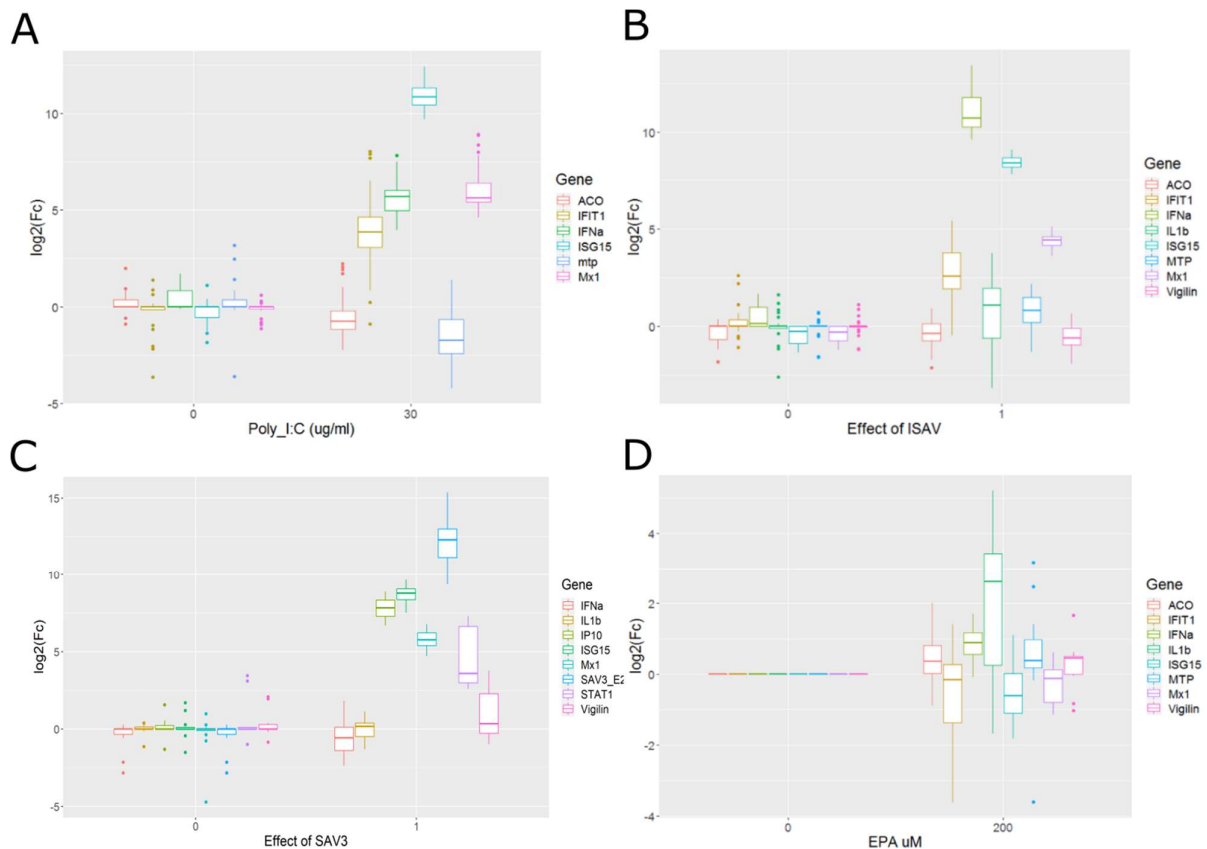
Figur 13. EPA i cellemediet og ASK-celler etter 1 ukes inkubasjon med 0-200 uM ekstra tilsatt EPA.

#### -qPCR analyse av celler dyrket med EPA eller stimulert med PolyI:C, ISAV eller SAV3

Effekten av PolyI:C eller virusinfeksjon (ISAV) ble først verifisert ved qPCR analyse av et lite utvalg transkripter involvert i immunresponser (Tabell 12). Disse analysene viste at behandlingene hadde den forventede effekten på cellene (oppregulering av immungener som *ISG15* og *Mx*) (Figur 14A og 14B). Uttrykk av *aco* og *mtp* ble ikke påvirket av PolyI:C eller ISAV behandlingene og ble erstattet med *SAV3\_E2* og *STAT1* i analysene av *SAV3* effekter (Figur 14C). En ukes inkubasjon i høyeste EPA konsentrasjon (200 uM), uten immunstimuli hadde ikke effekt på transkripsjonen av de samme genene (Figur 14D).

Tabell 12. Liste av gener analysert ved QPCR i ASK celler stimulert med PolyI:C og ISAV.

- ACO – acyl coA oxidase
- MTP - Microsomal triglyceride transfer protein
- IFN $\alpha$  – interferon alpha
- ISG15 – interferon stimulated gene 15
- Mx1 – interferon induced GTP binding protein Mx1
- IFIT1 - Interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 1
- Vigilin – HDL binding protein
- IL1b – interleukin 1 beta
  
- 18s – ribosomal gene (reference)
- EF1a – elongation factor 1 alpha (reference)



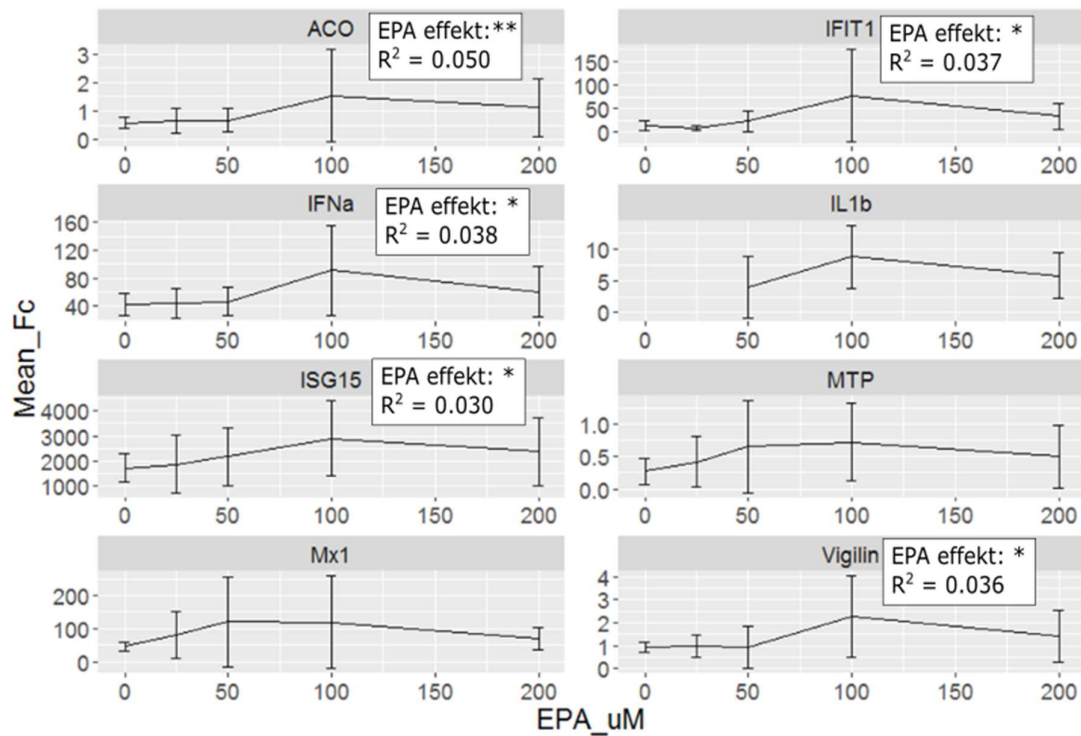
Figur 14. qPCR analyse av immungener og gener relater til lipidmetabolisme etter stimulering med A: PolyI:C (24 t); B: ISAV (48 t); C: SAV3 (48t) eller D: 200uM EPA (1 uke).

#### -qPCR analyse av celler dyrket med EPA og stimulert med PolyI:C, ISAV eller SAV3

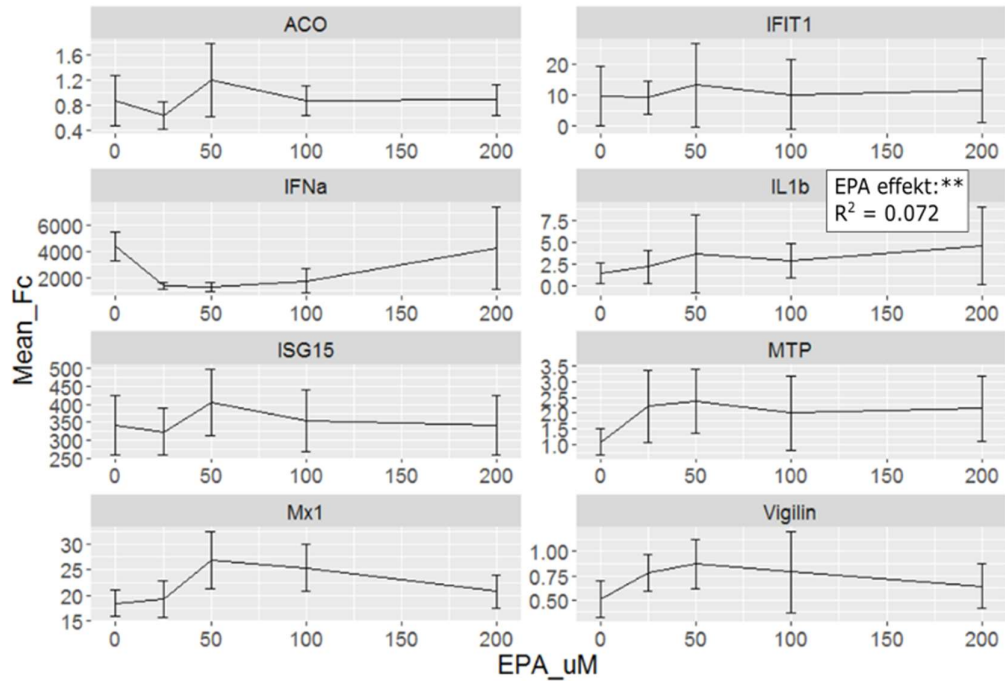
De samme genene ble så analysert i celler som før immunstimuli var blitt dyrket i forskjellige nivåer av EPA (0-200 uM). Noen av genene i cellene stimulert med PolyI:C viser en svak positiv korrelasjon med EPA konsentrasjonen, men effekten var svak (Figur 15). Det var en tendens til hemmende effekt av den høyeste konsentrasjonen. Et lignende bilde ble observert i ISAV infiserte celler, bortsett fra interferon alfa, som synes å bli redusert i celler som ble dyrket i nærvær av 25-100 uM EPA (Figur 16). Det er derfor mulig at EPA har en immun-hemmende effekt i dette konsentrasjonsområdet, men effektene av EPA på ISAV-respons var generelt liten. Inkubasjon med EPA hadde heller ingen effekt på transkripsjon av ISAV gen segmenter (en alternativ parameter på virusreplikasjon, figur 17). Få effekter av EPA ble også sett på SAV3 i ASK cellene (Figur 18). En foreløpig konklusjon på qPCR analysene av immungener i immun-stimulerte celler som ble dyrket i forskjellige nivåer av EPA, synes å være at EPA har en liten effekt på de analyserte genene. PolyI:C viste allikevel flere effekter av EPA enn de to levende virusene, muligens fordi PolyI:C inducerer en immun-respons uten å ødelegge cellene, slik levende virus gjør. De små effektene dietten har sammenlignet med inflammatoriske responser, kan derfor gjøre det vanskelig å se noen effekter når en bruker levende virus. PolyI:C gir også en ganske umiddelbar respons i alle cellene i en brønn, mens en virusinfeksjon vil ta lenger tid å utvikle seg og



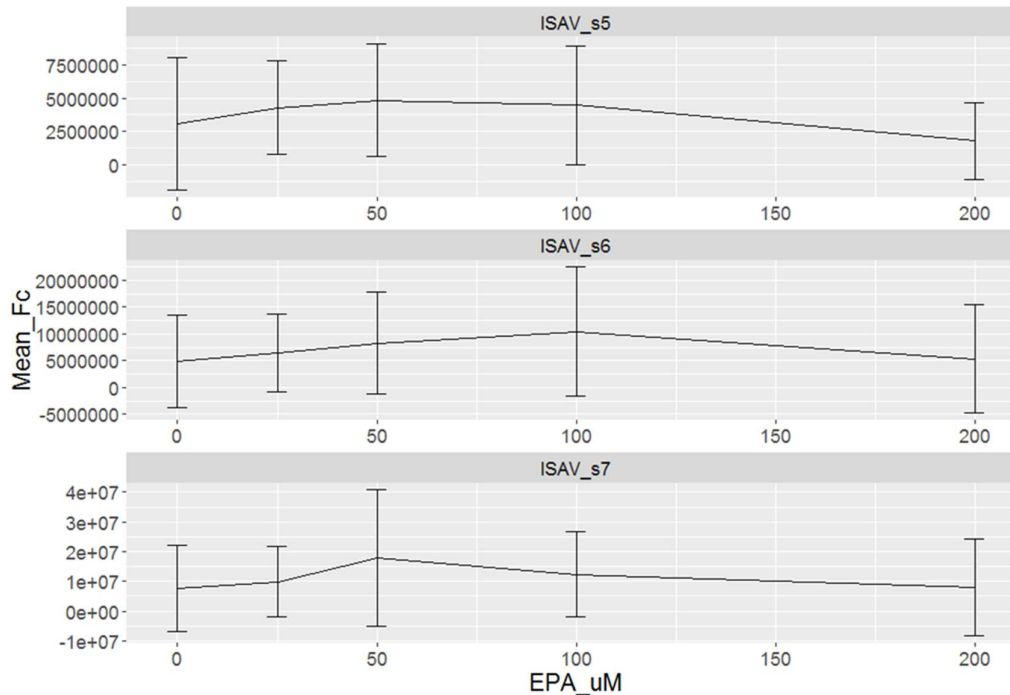
kan variere fra celle til celle mens virusinfeksjonen sprer seg. Det kan derfor være at PolyI:C og andre modellstimuli er bedre egnet for å studere diett:inflammasjon responser enn levende patogener.



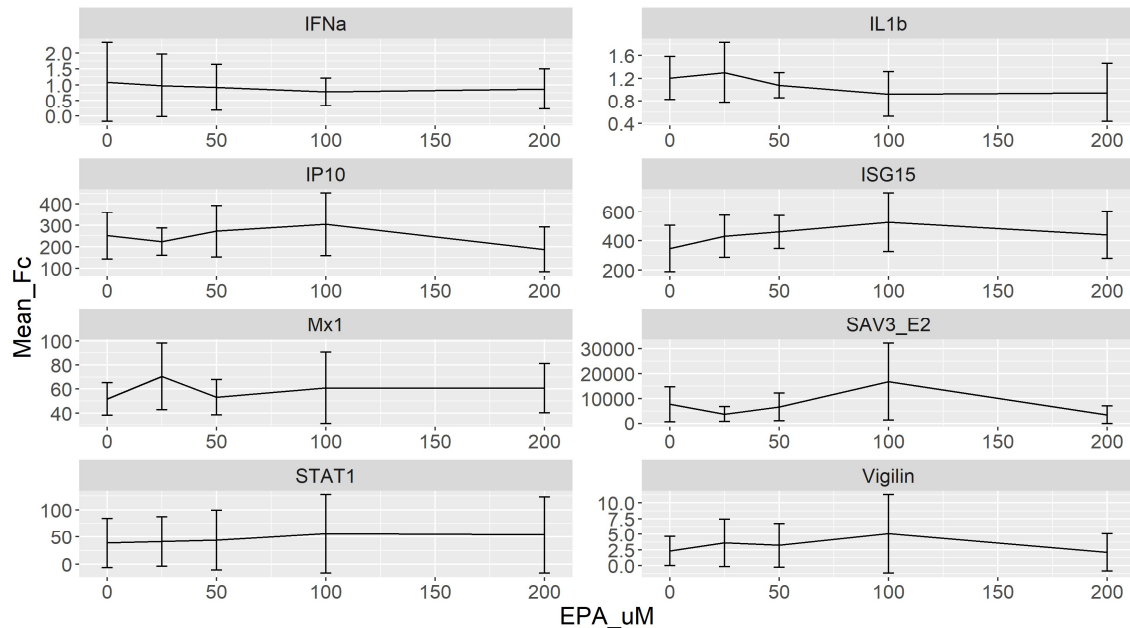
Figur 15. Effekt av EPA på PolyI:C-indusert transkripsjon av immungener og gener relater til lipidmetabolisme i ASK celler. Korrigerte R<sup>2</sup> oppgitt sammen med p-verdier indikert med stjerner: p<0.05 \* og p<0.01 \*\*.



Figur 16. Effekt av EPA på ISAV-induserte immungener og gener relater til lipidmetabolisme i ASK celler. Korrigerede  $R^2$  oppgitt sammen med p-verdier indikert med stjerner:  $p < 0.01$  \*\*.



Figur 17. Det var ingen signifikant effekt av EPA på ISAV replikasjon i ASK celler.



Figur 18. Effekt av EPA på SAV-induserte immungener og gener relater til lipidmetabolisme i ASK celler. Ingen signifikante effekter ble funnet av EPA på virusresponsen.

*-RNA sekvensering: Effekter av EPA og PolyI:C alene*

For å estimere effekten av EPA alene ble prøver av celler som ble inkubert med den høyeste EPA konsentrasjonen (200 uM men uten PolyI:C) analysert. Tabell 13 viser de 22 genene som ble signifikant påvirket av EPA alene. Kun 22 signifikante transkripter er svært lite i denne sammenheng, men noe er knyttet til stress og immunfunksjoner (*mip2a*, *il8* og *komplement C3*) så vi kan ikke helt utelukke at den høyeste EPA konsentrasjonen har en effekt på cellene. I celler tilsatt 30 ug/ml PolyI:C i 24 timer (men ikke EPA) ble totalt 4829 gener påvirket, noe som er sammenlignbart med tidligere studier av PolyI:C i disse cellene (Andresen et al. 2020). Tabell 14 viser de 20 mest oppregulerte genene. Analyser av anrikede gener (ontology analysis) viste at disse genene er knyttet til cellulære immunresponser (Appendix figurer 1-3).



Tabell 13. Fullstendig liste over transkripter i ASK celler som ble signifikant ( $p_{\text{adjust}} < 0.01$ ) påvirket av en ukes inkubasjon i 200  $\mu\text{M}$  EPA.

Gen ID	Gen navn	Beskrivelse	log2Fold Change	P adj
106604696	LOC106604696	saxitoxin and tetrodotoxin-binding protein 2-like	3,79	6,3E-30
100306751	ddt4l	DNA-damage-inducible transcript 4-like protein	3,94	8,3E-24
106560707	LOC106560707	carnitine O-palmitoyltransferase 1, liver isoform-like	3,34	2,9E-22
100136446	LOC100136446	C type lectin receptor A	2,82	1,0E-17
100196393	mip2a	Macrophage inflammatory protein 2-alpha	3,77	1,3E-10
106583687	LOC106583687	protein APCDD1-like	-2,69	7,2E-10
100526765	LOC100526765	vascular cell adhesion molecule-like protein	2,23	4,3E-09
100195681	il8	interleukin 8	3,56	6,0E-07
100194912	angl4	Angiopoietin-related protein 4	2,86	5,2E-06
106595495	LOC106595495	complement C3	2,31	1,4E-05
100136439	LOC100136439	cathelicidin antimicrobial peptide	1,99	1,4E-05
106604987	LOC106604987	complement C3	2,29	2,0E-05
106605127	LOC106605127	complement C3-like	2,22	2,0E-05
106599165	LOC106599165	alpha-tocopherol transfer protein-like	1,87	6,8E-05
106565484	LOC106565484	sodium- and chloride-dependent GABA transporter 2-like	2,77	1,1E-04
106607400	LOC106607400	protein FAM196A-like	2,39	1,7E-04
106597357	LOC106597357	complement C3-like	2,25	6,1E-04
100380740	LOC100380740	perilipin-2	2,65	9,3E-04
106606823	LOC106606823	CD97 antigen-like	-1,74	1,2E-03
100195918	plk2	polo like kinase 2	2,36	1,2E-03
106609174	LOC106609174	ADP-ribosylation factor 4-like	1,95	1,6E-03
100286490	hbegf	Proheparin-binding EGF-like growth factor	2,32	5,3E-03





Tabell 14. De 20 mest oppregulerte transkripter etter 24 h PolyI:C stimuli av ASK celler i standard medium (uten EPA tilsatt).

Gen ID	Navn gen	Beskrivelse	log2Fold Change	P adj
106570889	LOC106570889	C-X-C motif chemokine 11-like	14,46	2,1E-109
100196194	scyb7	Platelet basic protein	14,00	0,0E+00
106595579	LOC106595579	radical S-adenosyl methionine domain-containing protein 2	13,42	4,8E-122
106593068	LOC106593068	protein asteroid homolog 1-like	13,06	1,2E-166
106565178	LOC106565178	interferon-induced protein 44-like	12,59	3,8E-69
106608297	LOC106608297	transforming growth factor beta-3-like	12,52	6,6E-108
106608979	LOC106608979	E3 ubiquitin-protein ligase TRIM39-like	12,38	2,9E-133
100195910	rsad2	radical S-adenosyl methionine domain containing 2	12,36	2,8E-194
106593784	LOC106593784	protein asteroid homolog 1-like	12,21	2,7E-190
106604607	LOC106604607	endonuclease domain-containing 1 protein-like	12,04	9,9E-84
106582229	LOC106582229	serine-aspartate repeat-containing protein I-like	11,70	3,0E-58
106588384	LOC106588384	uncharacterized LOC106588384	11,65	1,9E-175
100194727	LOC100194727	nebulin	11,60	9,0E-58
106592323	LOC106592323	ABC transporter F family member 4-like	11,47	1,2E-56
106594285	LOC106594285	uncharacterized LOC106594285	11,41	1,5E-149
106598879	LOC106598879	uncharacterized LOC106598879	11,33	5,0E-256
100195999	cx110	C-X-C motif chemokine 10	11,09	1,6E-148
106611611	LOC106611611	smoothelin-like protein 2	11,04	1,4E-53
106597100	LOC106597100	E3 ISG15--protein ligase HERC5-like	10,99	1,6E-243
106599956	LOC106599956	hemagglutinin/amebocyte aggregation factor-like	10,96	1,7E-109

*-RNA sekvensering: Effekt av økende konsentrasjon av EPA på PolyI:C induerte immunresponser i ASK celler*

Hovedideen med denne studien var å se på effekter av forskjellige nivåer av EPA på cellulære immunresponser. ASK celler ble inkubert i en uke med EPA i cellemediet (0-25-50-100-200 ug/ml) og deretter stimulert med PolyI:C i 24 timer. EPA-induserte endringer i gen transkripsjon ble så analysert ved hjelp av en lineær modell med EPA som kontinuerlig uavhengig variabel. En slik analyse vil fange opp gener som endres i en opp/ned trend med stigende mengder EPA, men overse gener som endres i et konkavt/konvekst forløp (størst effekt ved midlere konsentrasjon). Totalt 790 gener ble identifisert med et lineært dose-respons forløp på denne måten. Selv om flere gener var påvirket av EPA i denne modellen enn når kun EPA var tilsatt i én dose, så var styrken på responsen ganske liten, spesielt sammenlignet med PolyI:C respons i cellene. De 50 mest signifikant endrede genene er listet i tabell 15. GO og KEGG pathway analyse viste at lysosomale transportveier (protein degradering) var en av de mest påvirkede metabolske prosesser i cellene. Dette skyldes primært oppregulering av en vakuolær ATPase i EPA-behandlede celler (Appendix figurer 4 og 5). I tillegg ble PPAR pathway identifisert som påvirket metabolsk reaksjonsvei pga. dose relatert respons i reguleringen av FATP, FABP3, SCD1 (Stearoyl-CoA desaturase ( $\Delta$ -9-desaturase) and ACS (Acetyl-CoA syntetase) (Appendix Figur 6).



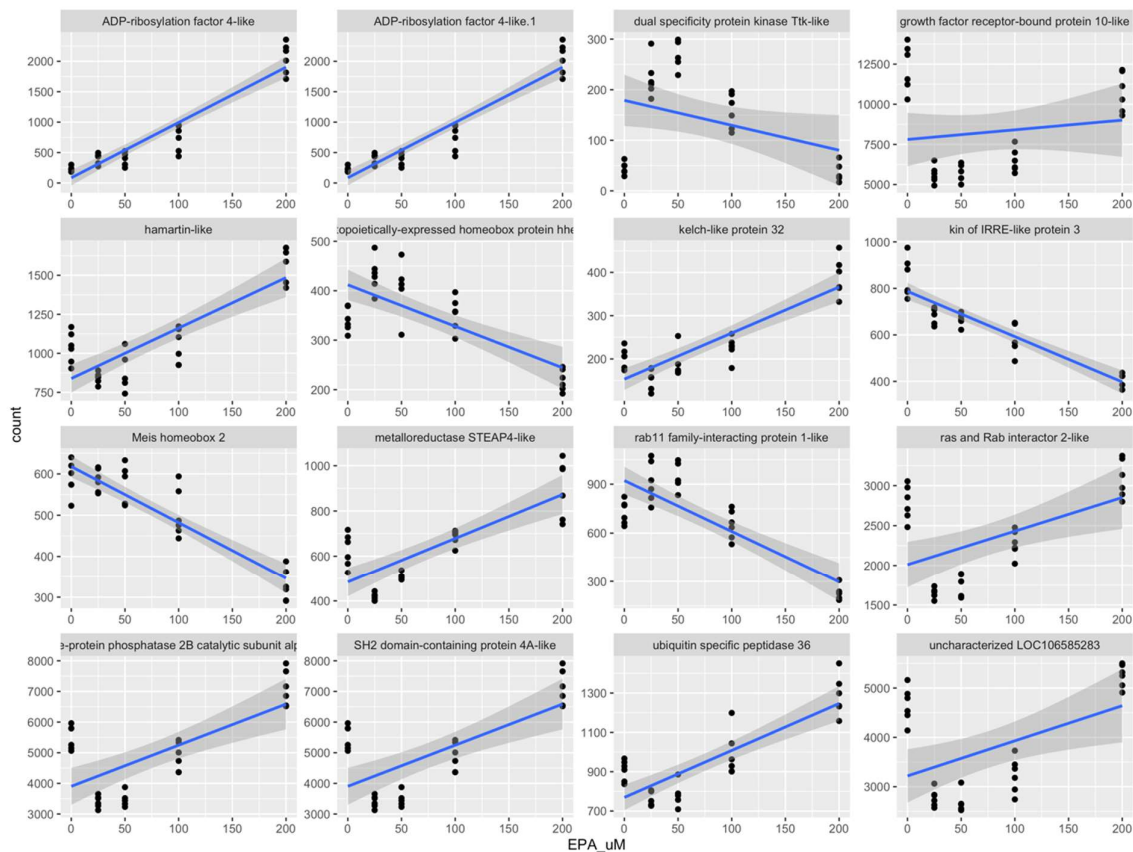
Tabell 15. De 30 mest signifikante transkripter hvor en lineær dose-respons effekt av EPA på PolyI:C induerte endringer ble observert. Endringen i transkripsjon er uttrykt som log<sub>2</sub> fold endring pr uM endring i EPA. En endring i -0.0025 tilsvarer derfor en endring fra 1 til 0.7 (- 30%) i genuttrykk når EPA øker fra 0 til 200 uM.

GeneID	Gen navn	Beskrivelse	log <sub>2</sub> Fold Change	P adj
106561706	LOC106561706	endoplasmin-like	-0,0025	1,00E-04
106601896	LOC106601896	palmitoleoyl-protein carboxylesterase notum1a-like	-0,0067	1,05E-04
106602003	LOC106602003	bromodomain adjacent to zinc finger domain protein 1A-like	0,0015	1,07E-04
106590611	LOC106590611	semaphorin-5A-like	-0,0054	1,07E-04
106590133	mrc1	mannose receptor C-type 1	-0,0071	1,08E-04
106572551	casp9	caspase 9	0,0023	1,08E-04
100306766	s38a2	Sodium-coupled neutral amino acid transporter 2	0,0023	1,12E-04
106602029	LOC106602029	peripheral myelin protein 22-like	0,0022	1,16E-04
106600640	LOC106600640	rab11 family-interacting protein 5-like	-0,0047	1,18E-04
106609976	LOC106609976	ras-related C3 botulinum toxin substrate 1	0,0019	1,22E-04
106573775	LOC106573775	repulsive guidance molecule A-like	-0,0029	1,23E-04
106605397	LOC106605397	epithelial discoidin domain-containing receptor 1-like	0,0027	1,24E-04
106604751	LOC106604751	sodium/hydrogen exchanger 6-like	0,0024	1,28E-04
106579093	LOC106579093	squalene monooxygenase-like	0,0023	1,33E-04
106587346	LOC106587346	transcription factor 12-like	-0,0023	1,43E-04
106602899	LOC106602899	BRCA1-A complex subunit BRE-like	0,0021	1,53E-04
106609270	LOC106609270	transmembrane protein 110-like	0,0026	1,57E-04
106578074	LOC106578074	polyadenylate-binding protein-interacting protein 2B-like	0,0016	1,57E-04
106604481	Gsr	glutathione-disulfide reductase	-0,0039	1,62E-04
100136484	LOC100136484	glutathione S-transferase P	-0,0037	1,64E-04
106588785	LOC106588785	growth factor receptor-bound protein 10-like	-0,0025	1,64E-04
100196547	Pir	pirin	-0,0134	1,65E-04
100195002	mic1	MIC1 protein	0,0032	1,69E-04
106608277	LOC106608277	stathmin-4-like	-0,0056	1,69E-04
106573072	LOC106573072	shaker-related potassium channel tsha2-like	0,0039	1,72E-04
106584576	LOC106584576	ladderlectin-like	0,0066	1,75E-04
106590758	LOC106590758	caspase-14-like	-0,0075	1,76E-04
106574519	LOC106574519	zinc finger protein 708-like	0,0042	1,79E-04
106571741	trmt6	tRNA methyltransferase 6	-0,0019	1,82E-04
106576706	mmer2	multimerin 2	-0,0060	1,87E-04

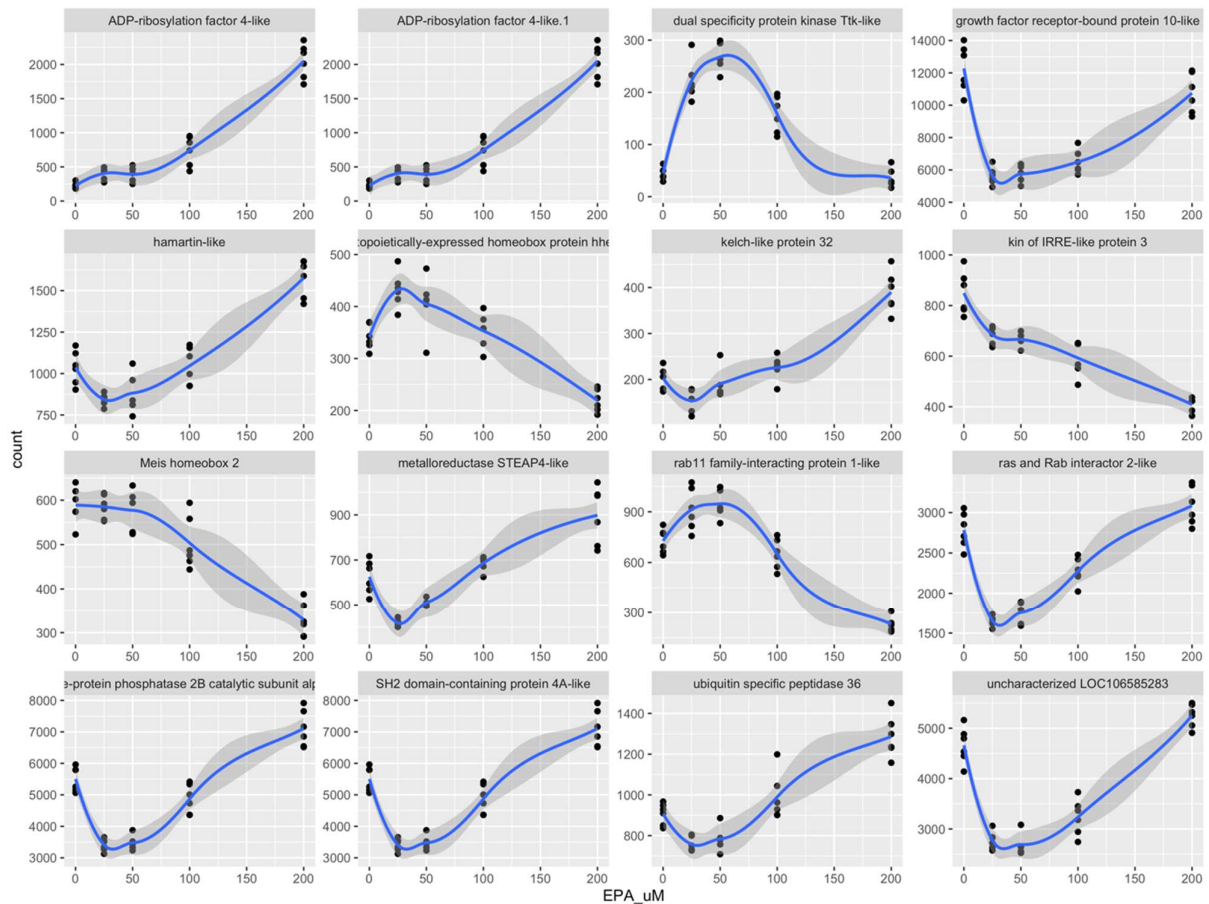


-RNA sekvensering: Effekt av økende konsentrasjon av EPA på ISAV induerte immunresponser i ASK celler.

En doserelatert effekt av EPA på ISAV induerte gener ble også observert. Totalt 402 transkripter var signifikant påvirket ( $p$  adjust  $< 0.01$ ) av EPA konsentrasjon. Gener responderte både med lineær og ikke-lineær respons på økende EPA i cellemediet (Figurer 14 og 15). Antall gener som ble påvirket i dette forsøket var for lavt til å gi informative GO og KEGG analyser og det er derfor vanskelig å si akkurat hvilke metabolismeveier som blir mest påvirket av EPA i celler tilsatt ISAV.



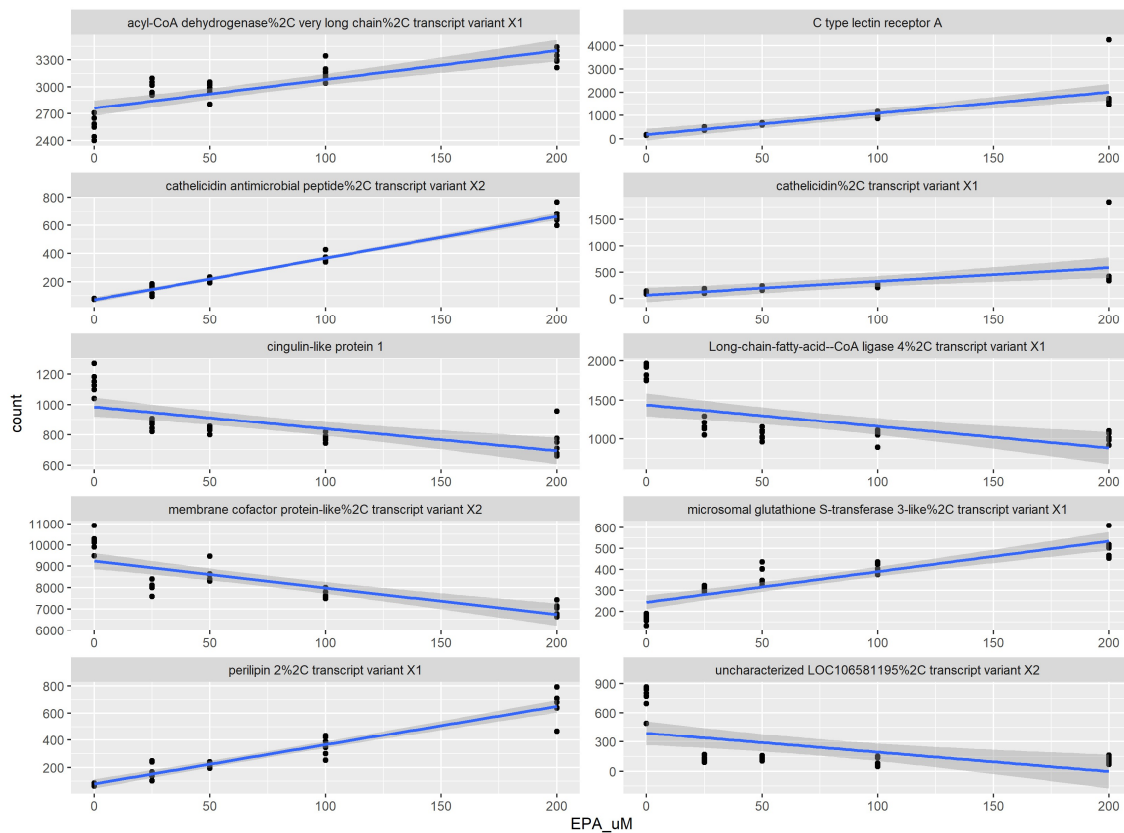
Figur 14: Effekt av økende EPA i cellemediet på ISAV stimulte Ask celler, presentert er eksempler på gener som ble påvirket i en lineær respons av EPA i cellemediet.



Figur 15: Effekt av økende EPA i cellemediet på ISAV stimulerte ASK celler, presentert er eksempler på gener som ble påvirket i en ikke-lineær respons av EPA i cellemediet.

*-RNA sekvensering: Effekt av økende konsentrasjon av EPA på SAV3 induerte immunresponser i ASK celler.*

Et forsøk tilsvarende som beskrevet for ISAV ble også gjennomført med SAV3 virus. Clusteranalyse viste at infeksjonen klart påvirket en rekke genes transkripsjon og det ser derfor ut som 48 timer var tilstrekkelig for å oppnå virus-induserte ekspresjonsforandringer (data ikke vist). Nesten 3000 transkripter viste en effekt av EPA på SAV3 induerte endringer i ekspresjon (Appendix Tabell 2). Et utvalg er presentert i figur 16. Ut fra de foreliggende analysene finner vi at antibakterielle transkripter som type-C lectiner og cathelicidiner har en økt ekspresjon ved høyere EPA nivåer, mens cytokiner som CCL21 og CXCL14 synes å ha en redusert ekspresjon ved høye EPA nivåer. Dette kan tyde på en immundependende effekt av økt EPA.



Figur 16. Effekt av økende EPA i cellemediet på SAV3 stimulerte ASK celler.

-Konklusjon fra modell 6: nivået av EPA i mediet påvirker direkte konsentrasjonen av EPA i Ask-cellene og det er mulig å nå lignende nivåer, og høyere, som i fisk fôret med høye nivåer EPA. Cellulært EPA nivå har målbare effekter på cellulære immunresponser etter PolyI:C stimulering og virusinfeksjoner med ISAV eller SAV3. Responsene kan ikke uten videre klassifiseres som pro- eller anti- inflammatoriske men ytterligere analyser som tar hensyn til ikke-lineære responser vil forhåpentligvis kunne avdekke mer om dette. Basert på funn fra denne modellen er det mulig å spekulere i om svært lave nivåer av EPA kan resultere i en tilstand hvor celler fra laks responderer på immunstimuli fra f.eks virusinfeksjoner på en måte som kan fremkalle immunpatogenese. Dette er velkjent fra mange typer virusinfeksjoner i pattedyr hvor immunresponsen er en medvirkende årsak til patogenesen (Snell and Brooks 2015). Også hos atlantisk lase er det påvist sammenhenger mellom fôr, virussykdommer og klinisk sykdom (Martinez-Rubio et al. 2012, Martinez-Rubio et al. 2014, Hatlen et al. 2016).



### 5.3 Oppsummering av resultater, sammenligning av modeller og drøfting av mulighetene for videre anvendelse av resultater fra prosjektet (implementering)

Resultater fra fôringsforsøket viser at å variere EPA fra 0.9% til 10.4% av fettsyrene med store variasjoner i DHA/EPA ratio ikke påvirker vekst og fôrinntak hos fisk i denne størrelsesordenen i kar under kontrollerte eksperimentelle forhold i et kortvarig forsøk. Dette forsøket inkluderte ikke en detaljert måling av helsetilstanden til fisken, men ingen negative observasjoner var gjort av fiskens helse (kataraktmåling og generell visuell inspeksjon ved prøvetakning og røktning). En reduksjon i det nøytrale lagringsfettet triglyserider i lever ble sett ved økt EPA i diett, noe som er ansett som positivt for fiskens generelle helse. Økt lagring av fett i lever er også knyttet til dårligere håndtering av virusinfeksjoner i fisken.

Vi oppnådde store forskjeller i EPA i vevene ved å variere EPA fra 0.9 til 10.4% av fettsyrene. Det viser at selv om EPA i noen grad blir omgjort til DHA så vil en stor økning i diett også føre til økt EPA i alle vev. Dette bekrefter tidligere funn som også har sett det samme. De to laveste nivåene med EPA (0,9% og 1,3% av fettsyrene) hadde like nivåer av EPA i vev og indikerer at fisken ved disse nivåene muligens kompenserer med økt omdanning fra 18:3n-3 og/eller økt retensjon av EPA. Omfattende fettsyreanalyser fra ulike vev gir oss godt datagrunnlag for fremtidige studier som ønsker å vite EPA nivå i fisk gitt ulike nivåer med EPA i diett og for å gjøre målrettede studier på celler.

Lever- og hodenyreceller høstet fra fiskene fra fôringsforsøket (modell 1 og 2) ga oss indikasjoner på at de økte EPA nivåene i vevene har evne til å påvirke fiskens inflammatoriske nettverk. Eksempler på dette er observerte sammenhenger mellom EPA i diett og inflammatoriske markører som *cox2*. *Cox2* er et viktig enzym for produksjon av eikosanoider og med et økt genuttrykk av *cox2* i fisk gitt mer EPA i førene ser vi også økt produksjon av eikosanoider. Resultater fra leverceller viste høyere nivåer av noen eikosanoider i cellemediet til celler gitt mest EPA. Vi så en økning i både PGE<sub>2</sub> og PGE<sub>3</sub>, som blir produsert fra henholdsvis ARA og EPA. Spesielt en mangel på LPS respons i PGE<sub>3</sub> i cellene fra fisk gitt det aller laveste EPA-nivået er interessant. Dette kan være et tegn på at en diett med så lave nivåer av EPA kan påvirke fiskens respons på inflammasjonsstimuli. Mer detaljerte studier på effekter av EPA på eikosanoid-metabolismen behøves for å kunne forstå bedre hvordan EPA påvirker den generelle inflammatorisk status i fisken. Det vil også være nyttig å lære mer om det inflammatoriske systemet i laks og dens rolle i bekjempelse av patogener,

Forsøk på hjerteceller isolert fra fôringsforsøket (modell 3) viste effekter av EPA på immunrespons etter PolyI:C stimuli gjennom økt *tlr7* og *mhcII*. En økning i EPA i føret kan derfor muligens påvirke immunresponsen til fisken både gjennom det medfødte og adaptive immunforsvaret. *Tlr7* er en type toll-like receptor, som er essensielle komponenter i det medfødte immunforsvaret og som kjenner igjen konserverte deler av cellestrukturen på patogener. *MhcII* er en del av det adaptive immunforsvaret og har som oppgave å presentere komponenter fra eksterne faktorer for immunforsvaret. Fettceller dyrket med EPA (modell 5) viste også høyere uttrykk av *mhcII* enn fettceller dyrket med oljesyre. Med tanke på at det i forsøk med fisk føret høye nivåer med EPA er vist massiv immunsuppresjon i hjerte etter HSMB infeksjon kan disse resultatene som er relatert til immunfunksjon være interessante å følge opp. Hjertecellene som ble dyrket med EPA (modell 4) viste ikke like klare koblinger med EPA/immunrespons som cellene høstet fra fôringsforsøket, men viste EPA-effekter i form av endringer i gener involvert i lipidmetabolismen. Grunnen til at noe ulike responser og interaksjoner mellom EPA/PolyI:C ble sett i de to hjertecellemodellene, er ikke klart. Genuttryksanalyse gir



et øyeblikksbilde, og det kan ha vært noe forskjell i inkubasjonstid med polyI:C. I tillegg kan det skyldes sammensetning av andre fettsyrer enn EPA i cellene og eventuelt også ulik genetiske bakgrunn og alder/størrelse av fisken cellene ble hentet fra.

Når det gjelder effekter av forskjellige EPA nivåer i cellelinjen ASK (modell 6) viser resultatene klart at cellulære immunresponser både mot et kjemisk stimuli som PolyI:C og reelle virusinfeksjoner med ISAV og SAV3, påvirkes av EPA nivået i cellene. En rekke immungener ble påvirket av EPA nivået i cellene, og det var en klar tendens til at cellulære immunresponser var redusert i cellene som ble inkubert med EPA. Av i alt 3346 gener som var signifikant påvirket av EPA i minst et av dosenivåene, var <10% oppregulert, mens resten var nedregulert i forhold til celler som ble dyrket uten ekstra EPA. Resultatene fra denne modellen bekrefter altså tidligere studier med effekter av EPA som viser at denne fettsyren kan ha en immundempende effekt. Om en sammenligner cellelinjen (originalt fra nyre fra laks) med hodenyrecellene brukt i modell 1 og 2, så kan en se at begge modeller responderer sterkt og relativt likt på immunstimuli med PolyI:C. Den generelle immundempende effekten av EPA sett i cellelinjen ble ikke sett i hodenyrecellene. Dette kan være grunnet valg av metoder, da RNAseq analyse (brukt i cellelinje, modell 6) kan gi et større bilde av hvilke metabolske prosesser som endrer seg, enn et lite utvalg av gener analysert ved qPCR (brukt i hodenyrecellene i modell 1 og 2).

## 6. Hovedfunn

- EPA har gjennomgående effekter på inflammasjons- og immunrespons i celler. Effektene er som forventet ikke like sterke som respons på immunstimuli.
- I leverceller ble det sett indikasjoner på en høyere inflammasjonsrespons ved økt EPA. Det ble her sett en økning i både *cox2* uttrykk og prostaglandin produksjon.
- Det ble sett tydelige immunresponser i både hjerte- og fettceller. Dette viser at de helt klart er mulige modeller for virusinfeksjoner som rammer disse organene. Effekten av EPA på virusrespons i hjerteceller kan være knyttet til endring i energimobilisering ved en virusinfeksjon, mens effekten i fettceller var direkte relatert til immunrespons og tyder på en sterkere antiviral respons med EPA enn med oljesyre. Disse studiene viser at celler fra begge disse vev kan benyttes som modeller for å se på interaksjonseffekter mellom fettsyrer og immunrespons.
- I kulturer av permanente cellelinjer fra laks (ASK) viste økende nivåer av EPA i dyrkingsmediet en signifikant immunmodulerende rolle på respons ved virusinfeksjoner med ISAV og SAV3. Høyere nivåer av EPA reduserte responsen på de aller fleste gener som endret uttrykk ved infeksjonen. Dette indikerer en immundempende effekt av EPA. Det var lignende mønster i respons på levende virus og PolyI:C. Mange av de samme metabolske veiene ble påvirket i cellelinjen som i primærcellene, men retningen på responsen var en annen enn den sett i primærcellene. Hvorvidt dette er på grunn av metodikk (RNAseq vs qPCR) eller forskjeller i cellenes egenskaper er ikke klart.
- EPA i fôr øker klart EPA i vevene til fisken. Spesielt i lagringsfett (nøytralt fett) ligger nivået veldig likt fôrene. Ved å dyrke celler med EPA er det også mulig å oppnå lignende og til og med høyere nivå med EPA i cellene sammenlignet med nivå i vev fra fôringsforsøk.
- Resultatene fra dette prosjektet har produsert viktig kunnskap om forskjeller og likheter mellom bruk av ulike cellemodeller i analyse av immunrespons når ulike nivåer av EPA benyttes. Vi har erfart at



det er fullt mulig å la både primærceller samt cellelinjer vokse i cellemedier med EPA og nå lignende nivåer EPA som i celler høstet fra fisk føret med EPA. Med gode data fra fettsyresammensetning i ulike vev og fettfraksjoner fra føringforsøket vil det derfor være mulig å gjøre forsøk i fremtiden med celler tilsatt EPA og kunne diskutere dette opp mot gitte nivåer EPA i føret.

- Respons på PolyI:C var lignende den til SAV og ILAV i ASK cellelinjen og vil derfor være et nyttig verktøy ved studier om generelle virus-effekter. Det virker også som om PolyI:C kan synliggjøre flere samspillseffekter mellom EPA:inflammasjon enn levende virus, muligens grunnet mer støy i resultatene ved bruk av levende virus.
- En ko-kultur modell med lever og hodenyre gir annerledes inflammasjonsrespons enn de samme cellene i mono-kultur, spesielt i metabolitter som eikosanoider. Det er imidlertid ingen entydig tendens til at resultatene fra forsøk med ko-kultur modellene gir bedre informasjon enn hva som er sett i mono-kultur i dette forsøket.

## 7. Leveranser

Presentasjoner på vitenskapelige konferanser:

Nina Liland, Tone-Kari Østbye, Marta Bou, Tor GjØen, BjØrg Kristine Hundal, Elisabeth Holen, Marit Espe, Sofie RemØ, Ingunn Stubhaug, Grethe Rosenlund, Nini Sissener (2020) *Har laksen et behov for EPA?* FHF dialogmØte fett for fiskehelse, 16. september, digital konferanse.

Nina Liland, Tone-Kari Østbye, Marta Bou, Tor GjØen, BjØrg Kristine Hundal, Elisabeth Holen, Marit Espe, Sofie RemØ, Ingunn Stubhaug, Grethe Rosenlund, Nini Sissener (2020) *Har laksen et behov for EPA?* En oppsummering av foreløpige resultater fra celle-forsøk gjort i EPA-prosjektet. HAVBRUK 2020, 10. juni, digital konferanse.

Nina S. Liland, BjØrg-Kristine Hundal, Elisabeth Holen, Marit Espe, Sofie RemØ, Ingunn Stubhaug, Grethe Rosenlund, Nini Sissener (2019) Trenger laks fettsyren EPA for optimal immunrespons? 14. Fiskeernæringsseminar, 14. november, Os, Norway.

Tone-Kari Østbye m.fl. (2019) Simulering av virusinfeksjon i in vitro dyrkede kardiomyocytter anrikt med ulike nivåer EPA. 14. Fiskeernæringsseminar, 14. november, Os, Norway.

Tone-Kari K. Østbye, Marta Bou, Esmail Lutfi, Aleksei Krasnov, Tor GjØen, Vibeke Voldvik, Marianne S. Hansen, Nina Liland, Nini Sissener, Grethe Rosenlund, Ingunn Stubhaug og Bente Ruyter. Betydning av EPA i før for inflammasjon og immunrespons – in vitro cellemodeller. FHF dialogmØte fett for fiskehelse, 16. september 2020, digital konferanse.





## 8. Referanser

Andresen AMS, Boudinot P, Gjoen T. Kinetics of transcriptional response against poly (I:C) and infectious salmon anemia virus (ISAV) in Atlantic salmon kidney (ASK) cell line. *Dev Comp Immunol.* 2020;110:103716. Epub 2020/05/04. doi: 10.1016/j.dci.2020.103716. PubMed PMID: 32360383.

Arnemo M, Kavaliauskis A, Gjoen T. Effects of TLR agonists and viral infection on cytokine and TLR expression in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Dev Comp Immunol.* 2014;46(2). Epub 145. doi: 10.1016/j.dci.2014.03.023. PubMed PMID: 24736205.

Andresen, A. M. S., P. Boudinot and T. Gjoen (2020). "Kinetics of transcriptional response against poly (I:C) and infectious salmon anemia virus (ISAV) in Atlantic salmon kidney (ASK) cell line." *Dev Comp Immunol* **110**: 103716.

Arnemo, M., A. Kavaliauskis and T. Gjoen (2014). "Effects of TLR agonists and viral infection on cytokine and TLR expression in Atlantic salmon (*Salmo salar*)." *Dev Comp Immunol* **46**(2): 139-145.

Bou, M., G. M. Berge, G. Baeverfjord, T. Sigholt, T.-K. Østbye, O. H. Romarheim, B. Hatlen, R. Leeuwis, C. Venegas and B. Ruyter (2017). "Requirements of n-3 very long-chain PUFA in Atlantic salmon (*Salmo salar* L): effects of different dietary levels of EPA and DHA on fish performance and tissue composition and integrity." *Br J Nutr* **117**(1): 30-47.

Bou, M., G. M. Berge, G. Baeverfjord, T. Sigholt, T.-K. Østbye and B. Ruyter (2017). "Low levels of very-long-chain n-3 PUFA in Atlantic salmon (*Salmo salar*) diet reduce fish robustness under challenging conditions in sea cages." *J Nutr Sci* **6**.

Bou, M., J. S. Torgersen, T. K. Østbye, B. Ruyter, X. Wang, S. Škugor, I. Kristiansen and M. Todorčević (2020). "DHA Modulates Immune Response and Mitochondrial Function of Atlantic Salmon Adipocytes after LPS Treatment." *Int J Mol Sci* **21**(11).

Calder, P. C. (2013). "n-3 fatty acids, inflammation and immunity: new mechanisms to explain old actions." *Proceedings of the Nutrition Society* **72**: 326-336.

Devold, M., B. Krossoy, V. Aspehaug and A. Nylund (2000). "Use of RT-PCR for diagnosis of infectious salmon anaemia virus (ISAV) in carrier sea trout *Salmo trutta* after experimental infection." *Diseases of Aquatic Organisms* **40**(1): 9-18.

Emery, J. A., F. Norambuena, J. Trushenski and G. M. Turchini (2016). "Uncoupling EPA and DHA in Fish Nutrition: Dietary Demand is Limited in Atlantic Salmon and Effectively Met by DHA Alone." *Lipids* **51**(4): 399-412.

Guo, W., W. Xie, T. Lei and J. A. Hamilton (2005). "Eicosapentaenoic acid, but not oleic acid, stimulates beta-oxidation in adipocytes." *Lipids* **40**(8): 815-821.

Hatlen, B., S. M. Jørgensen, B. Ruyter and Ø. Evensen (2016). Kan fettsyresammensetning i fôr styres for å forebygge utbrudd av HSMB?

Holen, E., P. Araujo, N. H. Sissener, G. Rosenlund and R. Waagbø (2018). "A comparative study: Difference in omega-6/omega-3 balance and saturated fat in diets for Atlantic salmon (*Salmo salar*)



affect immune-, fat metabolism-, oxidative and apoptotic-gene expression, and eicosanoid secretion in head kidney leukocytes." Fish & Shellfish Immunology **72**: 57-68.

Holen, E., M. Espe, S. M. Andersen, R. Taylor, A. Aksnes, Z. Mengesha and P. Araujo (2014). "A co culture approach show that polyamine turnover is affected during inflammation in Atlantic salmon immune and liver cells and that arginine and LPS exerts opposite effects on p38MAPK signaling." Fish & Shellfish Immunology **37**(2): 286-298.

Kjær, M. A., A. Vegusdal, T. Gjøen, A. C. Rustan, M. Todorovic and B. Ruyter (2008). "Effect of rapeseed oil and dietary n-3 fatty acids on triacylglycerol synthesis and secretion in Atlantic salmon hepatocytes." BBA - Molecular and Cell Biology of Lipids **1781**(3): 112-122.

Martinez-Rubio, L., Ø. Evensen, A. Krasnov, S. M. Jørgensen, S. Wadsworth, K. Ruohonen, J. L. Vecino and D. R. Tocher (2014). "Effects of functional feeds on the lipid composition, transcriptomic responses and pathology in heart of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) before and after experimental challenge with Piscine Myocarditis Virus (PMCV)." BMC Genomics **15**(1): 1-20.

Martinez-Rubio, L., S. Morais, O. Evensen, S. Wadsworth, K. Ruohonen, J. L. G. Vecino and J. G. Bell (2012). "Functional feeds reduce heart inflammation and pathology in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) following experimental challenge with Atlantic salmon reovirus (ASRV)." PLoS ONE **7**.

Martinez-Rubio, L., S. Morais, O. Evensen, S. Wadsworth, J. G. Vecino, K. Ruohonen, J. G. Bell and D. R. Tocher (2013). "Effect of functional feeds on fatty acid and eicosanoid metabolism in liver and head kidney of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) with experimentally induced heart and skeletal muscle inflammation." Fish Shellfish Immunol **34**(6): 1533-1545.

McMurray, D. N., D. L. Bonilla and R. S. Chapkin (2011). "n-3 Fatty acids uniquely affect anti-microbial resistance and immune cell plasma membrane organization." Chemistry and Physics of Lipids **164**: 626-635.

Noguera, P. A., B. Grunow, M. Klinger, K. Lester, B. Collet and J. del-Pozo (2017). "Atlantic salmon cardiac primary cultures: An in vitro model to study viral host pathogen interactions and pathogenesis." PLoS ONE **12**(7): e0181058.

Rosenlund, G., B. E. Torstensen, I. Stubhaug, N. Usman and N. H. Sissener (2016). "Atlantic salmon require long-chain n-3 fatty acids for optimal growth throughout the seawater period." J Nutr Sci **5**, e19: 1-13.

Schiøtz, B. L., S. M. Jørgensen, C. Rexroad, T. Gjøen and A. Krasnov (2008). "Transcriptomic analysis of responses to infectious salmon anemia virus infection in macrophage-like cells." Virus Research **136**(1-2): 65-74.

Sissener, N.H., P. Araujo, Ø. Sæle, G. Rosenlund, I. Stubhaug and M. Sanden (2020) "Dietary 18:2n-6 affects EPA (20:5n-3) and ARA (20:4n-6) content in cell membranes and eicosanoid production in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.)." Aquaculture **522**: 735098.

Sissener, N. H., B. E. Torstensen, I. Stubhaug and G. Rosenlund (2016a). "Long-term feeding of Atlantic salmon in seawater with low dietary long-chain n-3 fatty acids affects tissue status of brain, retina and red blood cells." Br J Nutr **115** 19191-11929.



Sissener, N. H., R. Waagbø, G. Rosenlund, T. Tvenning, S. Susort, T. B. Lea, Ø. Oaland, L. Chen and O. Breck (2016b). "Reduced n-3 long chain fatty acid levels in feed for Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) do not reduce growth, robustness or product quality through an entire full scale commercial production cycle in seawater." Aquaculture **464**: 236-245.

Sissener, N. H., B. Ruyter, B. E. Torstensen, T.-K. Østbye, R. Waagbø, S. M. Jørgensen, B. Hatlen, N. S. Liland, E. Ytteborg, Ø. Sæle, I. Rud, S. C. Remø, T. Mørkøre, J.-E. Dessen, K. Skjerven, T. Ytrestøyl, E. Holen, A. C. Adam and G. Berge (2016c). Oppdatering av utredningen: Effekter av endret fettsyresammensetning i fôr til laks relatert til fiskens helse, velferd og robusthet "Fett for fiskehelse - 2016". <http://www.fhf.no/prosjektdetaljer/?projectNumber=901250>, FHF- report.

Škugor, S., A. Škugor, M. Todorčević, J. Torgersen, B. Ruyter and A. Krasnov (2010). "Exposure to lipopolysaccharide induces immune genes in cultured preadipocytes of Atlantic salmon." Fish & Shellfish Immunology **29**(5): 817-824.

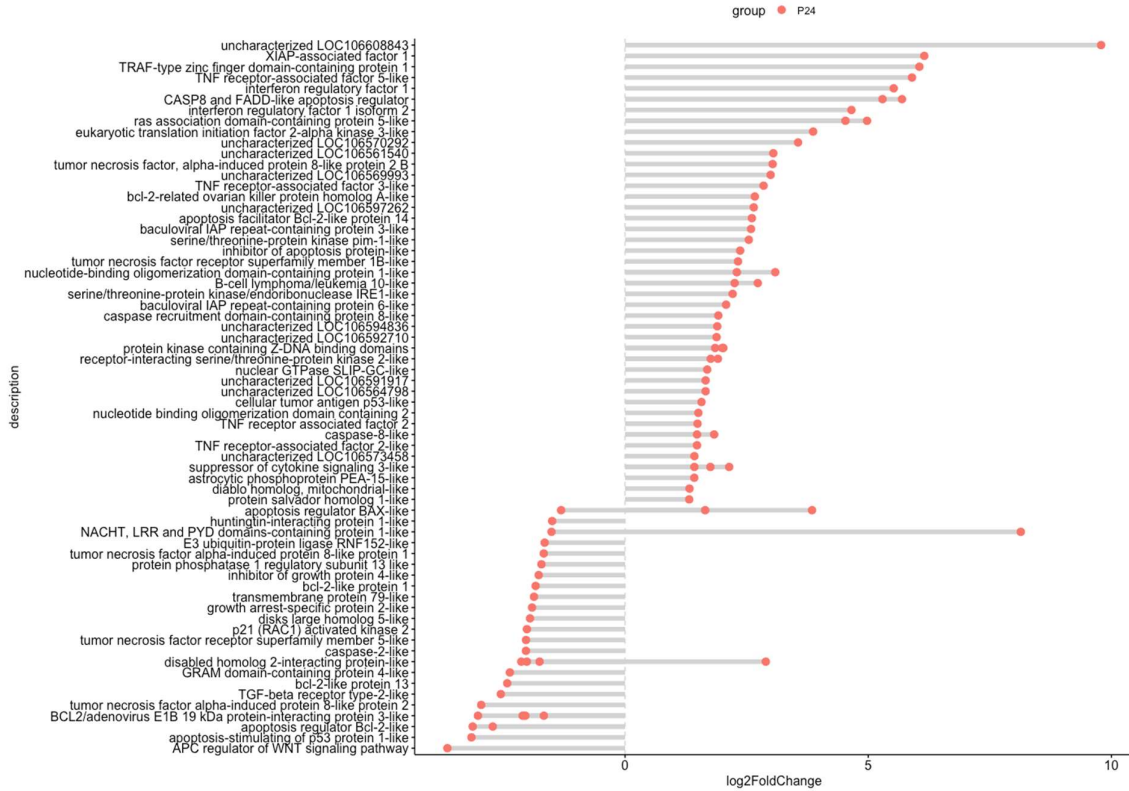
Snell, L. M. and D. G. Brooks (2015). "New insights into type I interferon and the immunopathogenesis of persistent viral infections." Current Opinion in Immunology **34**: 91-98.

Turchini, G. M., J. A. Emery, J. Trushenski and F. Norambuena (2014 ). "Distinguishing the nutritional requirements and physiological fate of dietary EPA and DHA in Atlantic salmon " Journal of Nutrition & Intermediary Metabolism **1**: 9-10.

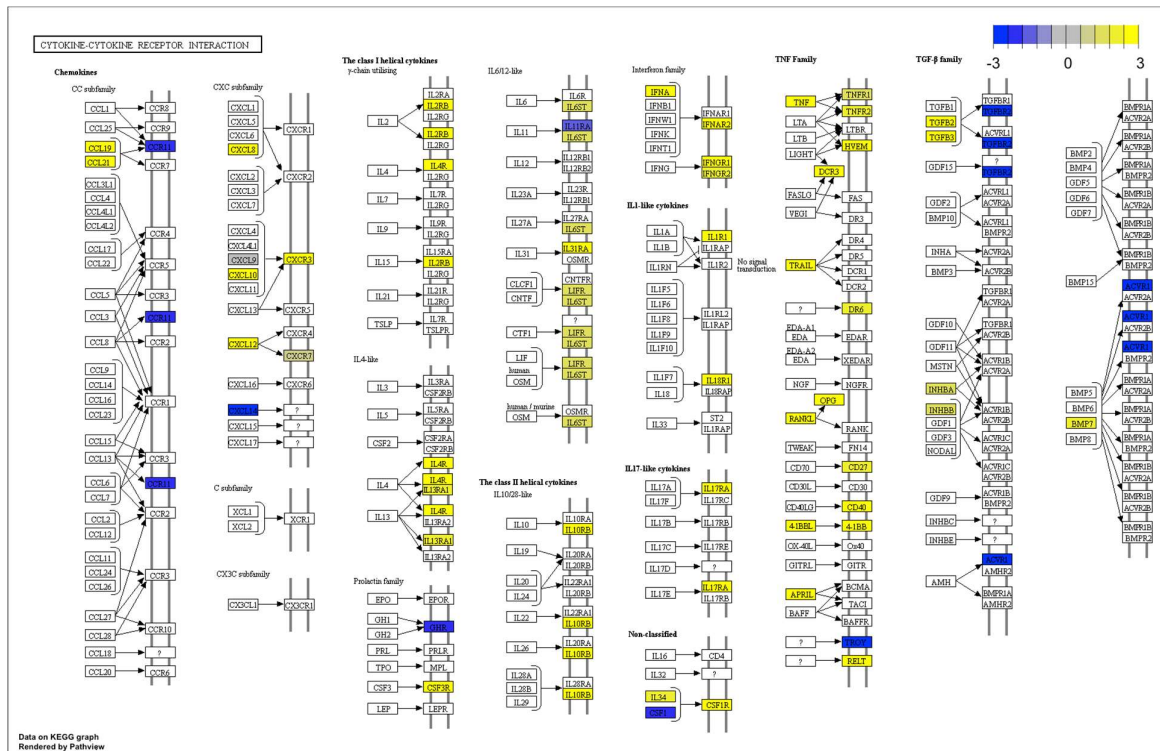
Yi, K. (2015). Optimizing methods for isolation and in vitro cultivation of primary cardiomyocytes from Atlantic salmon (*Salmo salar* L.)-A study of cellular responses to hydrogen peroxide, lipopolysaccharide and docosahexaenoic acid, Norwegian University of Life Sciences, Ås.



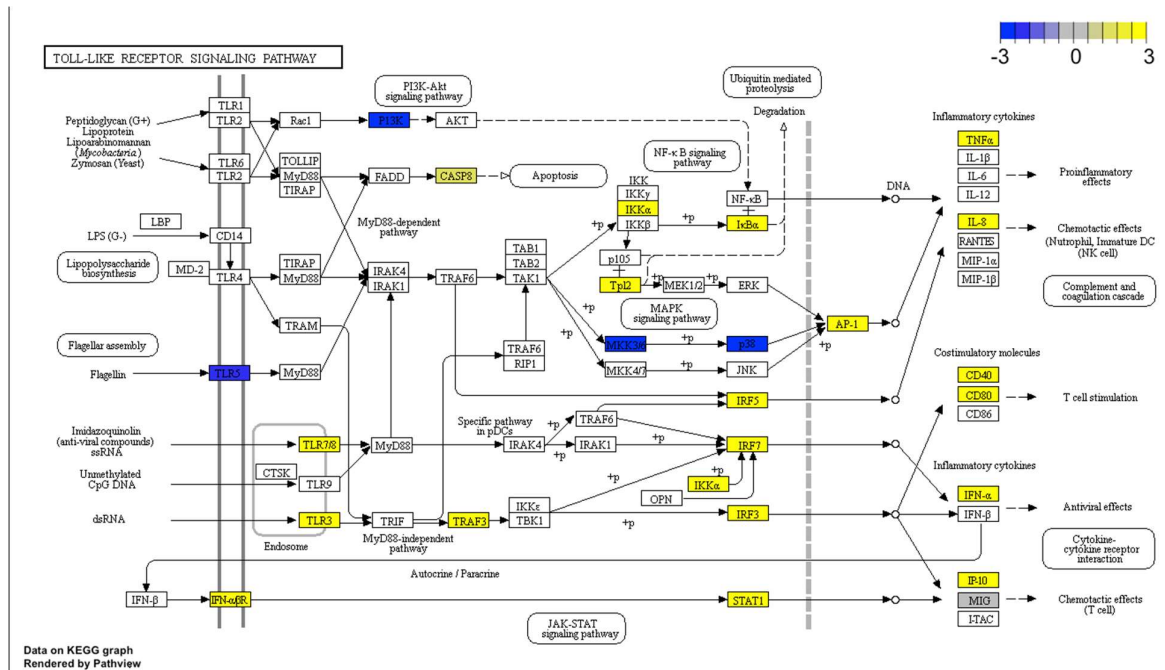
# Appendix



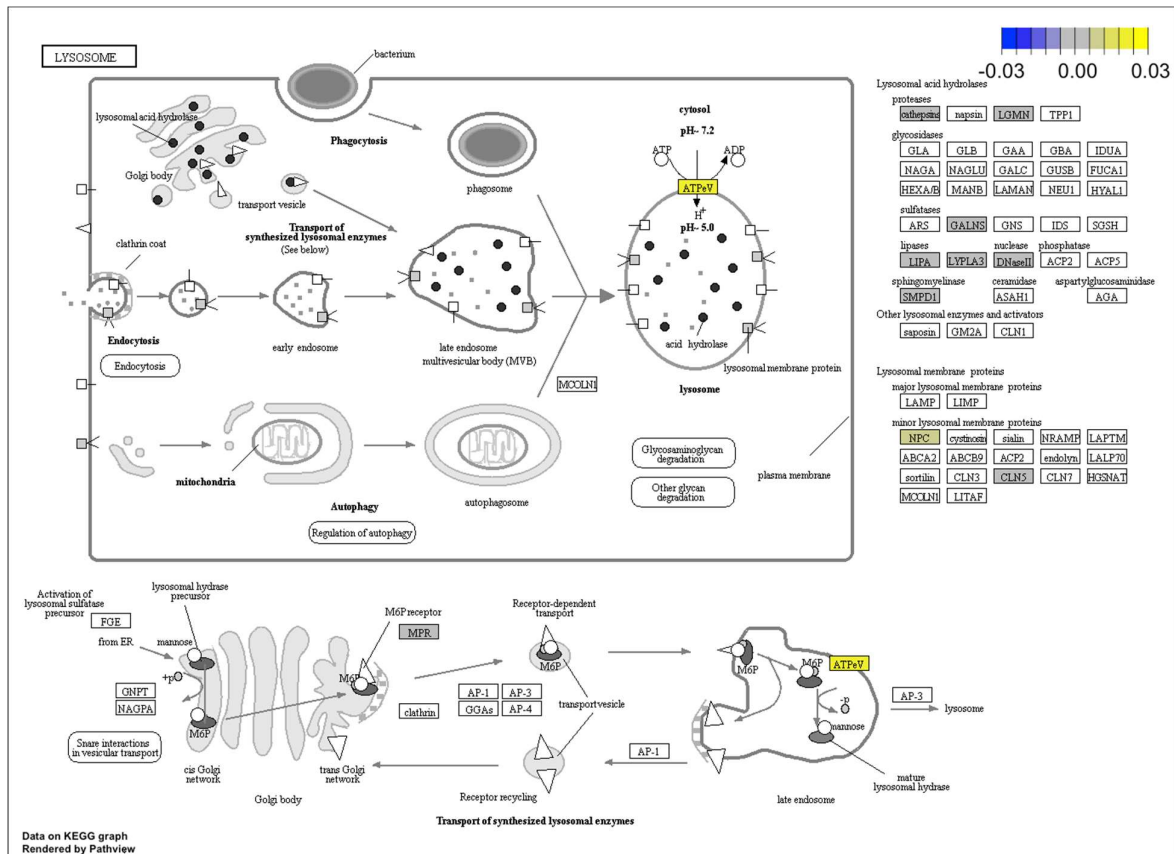
Figur A1: GO analyse av data fra ASK celler inkubert med 30 ug/ml PolyI:C i 24 timer.



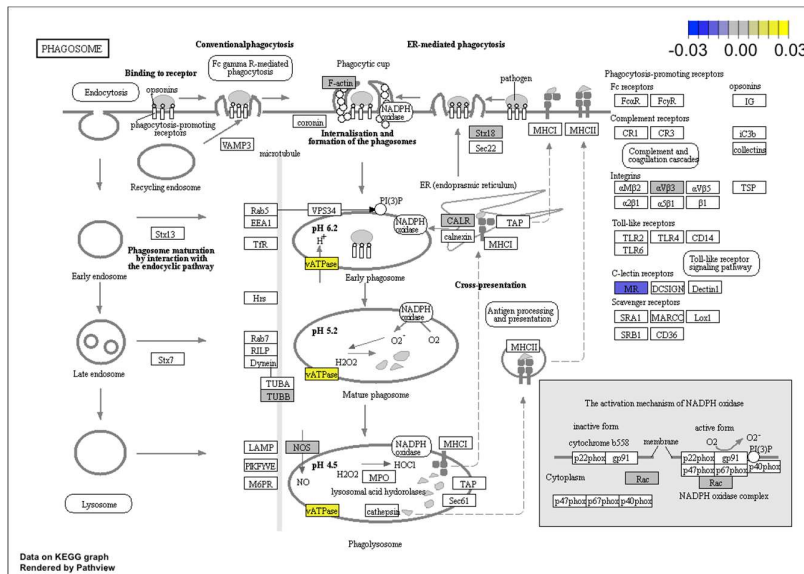
Figur A2: KEGG pathway analyse (cytokin nettverk) av data fra ASK celler inkubert med 30 ug/ml PolyI:C i 24 timer.



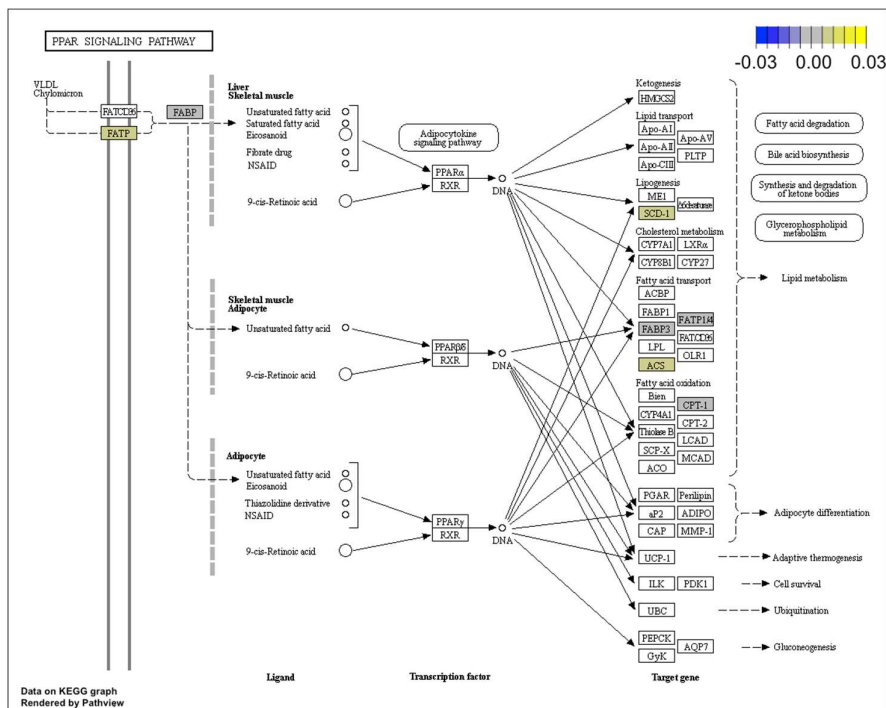
Figur A3. KEGG pathway (TOLL lignende reseptorer) analyse av data fra ASK celler inkubert med 30 ug/ml PolyI:C i 24 timer.



Figur A4. KEGG pathway analyse av gener i ASK celler stimulert med PolyI:C 24 timer under forskjellige nivåer av EPA.



Figur A5. KEGG pathway analyse av gener i ASK celler stimulert med PolyI:C 24 timer under forskjellige nivåer av EPA.



Figur A6. KEGG pathway analyse av gener i ASK celler stimulert med PolyI:C 24 timer under forskjellige nivåer av EPA.





Tabell A1. De 50 mest påvirkede transkripter med dose-relatert respons på EPA konsentrasjon under en ISAV infeksjon av ASK celler. Log<sub>2</sub> fold endring er beregnet pr uM endring i EPA konsentrasjon.

GeneID	gene name	description	log2FoldChange	padj
106583729	LOC106583729	microtubule-actin cross-linking factor 1, isoforms 1/2/3/5-like	0,0038	1,05E-04
100196229	ci023	Alba-like protein C9orf23	0,0041	1,05E-04
106574794	LOC106574794	ribonuclease P protein subunit p25-like protein	0,0041	1,05E-04
100194977	upp	Uracil phosphoribosyltransferase	-0,0026	1,08E-04
106582196	LOC106582196	von Willebrand factor D and EGF domain-containing protein-like	-0,0044	1,10E-04
106603382	LOC106603382	neuroigin-3-like	-0,0172	1,22E-04
100380743	scfd1	sec1 family domain containing 1	0,0014	1,23E-04
106600946	ehd4	EH domain containing 4	-0,0027	1,24E-04
106571334	depdc1b	DEP domain containing 1B	-0,0095	1,36E-04
106594671	arf6	ADP ribosylation factor 6	-0,0019	1,39E-04
100195612	swi5	SWI5 homologous recombination repair protein	-0,0053	1,54E-04
106601085	LOC106601085	inactive rhomboid protein 1	0,0021	1,60E-04
106604456	tim8a	translocase of inner mitochondrial membrane 8A	-0,0033	1,69E-04
106572866	LOC106572866	uncharacterized LOC106572866	0,0035	1,71E-04
106560568	setd9	SET domain containing 9	-0,0038	2,47E-04
106603067	LOC106603067	MAP7 domain-containing protein 2-like	-0,0052	2,52E-04
106606229	LOC106606229	monocarboxylate transporter 6-like	-0,0082	2,72E-04
106603466	trim37	tripartite motif containing 37	-0,0028	2,80E-04
106573947	LOC106573947	trafficking kinesin-binding protein 1-like	0,0029	2,80E-04
106593639	LOC106593639	nucleus accumbens-associated protein 1-like	-0,0025	2,86E-04
106606462	LOC106606462	platelet-derived growth factor subunit A-like	0,0018	3,00E-04
106605340	LOC106605340	GA-binding protein subunit beta-1-like	-0,0044	3,02E-04
106603481	LOC106603481	zinc finger protein 346-like	-0,0028	3,05E-04
106602003	LOC106602003	bromodomain adjacent to zinc finger domain protein 1A-like	0,0022	3,10E-04
106578696	LOC106578696	carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 20-like	0,0066	3,17E-04
106606293	LOC106606293	zinc finger protein OZF-like	-0,0042	3,35E-04
106612905	hps1	HPS1 biogenesis of lysosomal organelles complex 3 subunit 1	0,0017	3,37E-04
106570374	LOC106570374	multiple epidermal growth factor-like domains protein 9	0,0026	3,42E-04
106605503	LOC106605503	brain-specific angiogenesis inhibitor 1-like	0,0034	3,70E-04
100195531	elic2	chloride intracellular channel 2	-0,0016	3,94E-04
106578191	LOC106578191	uncharacterized LOC106578191	-0,0025	3,94E-04
106567581	LOC106567581	protein LAP2-like	-0,0016	3,95E-04
106568903	LOC106568903	ectoderm-neural cortex protein 1-like	-0,0017	4,30E-04



106602254	LOC106602254	zinc finger protein 2 homolog	0,0040	4,36E-04
106600871	LOC106600871	KAT8 regulatory NSL complex subunit 1-like	0,0019	4,68E-04
106604468	LOC106604468	zinc finger protein 513-like	0,0021	5,07E-04
106609990	LOC106609990	NHP2-like protein 1	0,0034	5,51E-04
106604462	LOC106604462	ecto-NOX disulfide-thiol exchanger 2-like	0,0018	5,93E-04
106613225	LOC106613225	WASH complex subunit FAM21-like	0,0019	5,95E-04
106601440	spred1	sprouty related EVH1 domain containing 1	-0,0025	5,98E-04
106613168	LOC106613168	methylcytosine dioxygenase TET2-like	0,0021	6,14E-04
106601852	LOC106601852	striatin-3-like	0,0017	6,30E-04
106606667	LOC106606667	serine/threonine-protein kinase LMTK2-like	0,0040	6,48E-04
106609976	LOC106609976	ras-related C3 botulinum toxin substrate 1	-0,0013	6,57E-04
106575183	LOC106575183	uncharacterized LOC106575183	0,0017	6,71E-04
106599084	LOC106599084	T-cell acute lymphocytic leukemia protein 1-like	-0,0022	6,97E-04
106603845	LOC106603845	SH3 and PX domain-containing protein 2B-like	-0,0014	7,09E-04
106605815	LOC106605815	DNA-directed RNA polymerase III subunit RPC3-like	0,0041	7,14E-04
106580288	LOC106580288	CREB-regulated transcription coactivator 2-like	0,0021	7,21E-04
106605167	LOC106605167	pleckstrin homology-like domain family B member 3	-0,0026	7,25E-04

Tabell A2. De 50 mest påvirkede transkripter med dose-relatert respons på EPA konsentrasjon under en SAV3 infeksjon.

gene_id	P adj	gene_name	gene_description
1001364 39	1.45E- 175	LOC100136 439	cathelicidin antimicrobial peptide%2C transcript variant X2
1066086 47	1.34E- 104	plin2	perilipin 2%2C transcript variant X1
1065886 40	4.68E- 103	LOC106588 640	endothelin-2-like
1001364 46	2.47E- 97	LOC100136 446	C type lectin receptor A
1066004 07	2.04E- 82	LOC106600 407	microsomal glutathione S-transferase 3-like%2C transcript variant X1
1065725 44	6.75E- 82	LOC106572 544	membrane cofactor protein-like%2C transcript variant X2
1065811 95	4.81E- 63	LOC106581 195	uncharacterized LOC106581195%2C transcript variant X2
1065870 91	6.00E- 60	LOC106587 091	gamma-butyrobetaine dioxygenase-like%2C transcript variant X3
1066128 31	1.26E- 53	LOC106612 831	elastin-like%2C transcript variant X12
1065735 54	1.39E- 51	LOC106573 554	C-C motif chemokine 21-like



1065873	1.96E-22	LOC106587	322	cingulin-like protein 1
1065887	3.60E-97	LOC106588	797	rap guanine nucleotide exchange factor 5-like%2C transcript variant X2
1065735	8.62E-51	LOC106573	551	excitatory amino acid transporter 1-like%2C transcript variant X2
1003804	3.34E-05	acsl4		Long-chain-fatty-acid--CoA ligase 4%2C transcript variant X1
1066028	6.42E-20	acadvl		acyl-CoA dehydrogenase%2C very long chain%2C transcript variant X1
1001953	1.57E-48	aidb		AIDB protein
1001962	2.96E-35	plcd		1-acyl-sn-glycerol-3-phosphate acyltransferase delta
1065766	3.57E-83	LOC106576	683	uncharacterized LOC106576683
1001364	4.50E-53	LOC100136	453	cathelicidin%2C transcript variant X1
1065865	5.81E-14	LOC106586	514	transcription cofactor vestigial-like protein 3
1065618	3.61E-56	LOC106561	856	von Willebrand factor-like
1065828	9.31E-85	LOC106582	885	protein FAM110C-like
1066010	2.77E-43	LOC106601	043	receptor activity-modifying protein 1-like%2C transcript variant X1
1065643	5.80E-43	LOC106564	343	protein phosphatase Slingshot homolog 1-like%2C transcript variant X1
1003807	1.02E-40	LOC100380	740	perilipin-2%2C transcript variant X1
1065607	2.82E-07	LOC106560	707	carnitine O-palmitoyltransferase 1%2C liver isoform-like%2C transcript variant X1
1066049	1.02E-35	LOC106604	935	C-X-C motif chemokine 14-like%2C transcript variant X2
1001967	4.66E-01	tgm2		transglutaminase 2%2C C polypeptide
1066129	4.90E-97	LOC106612	997	vacuole membrane protein 1-like%2C transcript variant X4
1065747	1.83E-75	LOC106574	775	target of Nesh-SH3-like%2C transcript variant X18
1065732	5.47E-31	wt1		Wilms tumor 1%2C transcript variant X3
1065608	5.54E-42	LOC106560	842	transcription cofactor vestigial-like protein 2
1065665	6.36E-77	LOC106566	577	DNA-binding protein inhibitor ID-2-like



1065834	1.34E-68	LOC106583	
		32 468	solute carrier family 25 member 34-like%2C transcript variant X2
1001954	3.38E-61		
		32 marcs	Myristoylated alanine-rich C-kinase substrate
1065812	6.18E-19	LOC106581	
		32 219	collagenase 3-like
1065740	1.61E-21	LOC106574	
		31 021	cytospin-A-like%2C transcript variant X4
1066031	3.26E-09	LOC106603	
		31 109	interleukin-13 receptor subunit alpha-2-like%2C transcript variant X5
1001966	1.75E-89		
		30 cite2	Cbp/p300-interacting transactivator 2
1066009	5.87E-50	LOC106600	
		29 950	ferritin%2C middle subunit-like
1065859	8.13E-39	LOC106585	
		29 939	endothelial lipase-like
1065732	5.45E-39	LOC106573	
		28 239	neuron navigator 2-like%2C transcript variant X9
1065668	1.26E-14	LOC106566	
		27 814	short-chain dehydrogenase/reductase 3-like%2C transcript variant X1
1065861	1.10E-30	LOC106586	
		26 130	sterol 26-hydroxylase%2C mitochondrial-like
1066086	1.34E-26	LOC106608	
		26 626	nuclear factor 1 B-type-like%2C transcript variant X2
1065981	7.00E-17		
		26 anxa13	annexin A13
1066093	1.45E-30	LOC106609	
		25 330	chondroadherin-like protein
1065997	6.99E-06	LOC106599	
		25 706	cadherin-2-like
1001966	9.68E-92		
		25 cndp1	Beta-Ala-His dipeptidase%2C transcript variant X1
1066078	3.30E-25	LOC106607	
		24 825	cyclic AMP-dependent transcription factor ATF-3-like