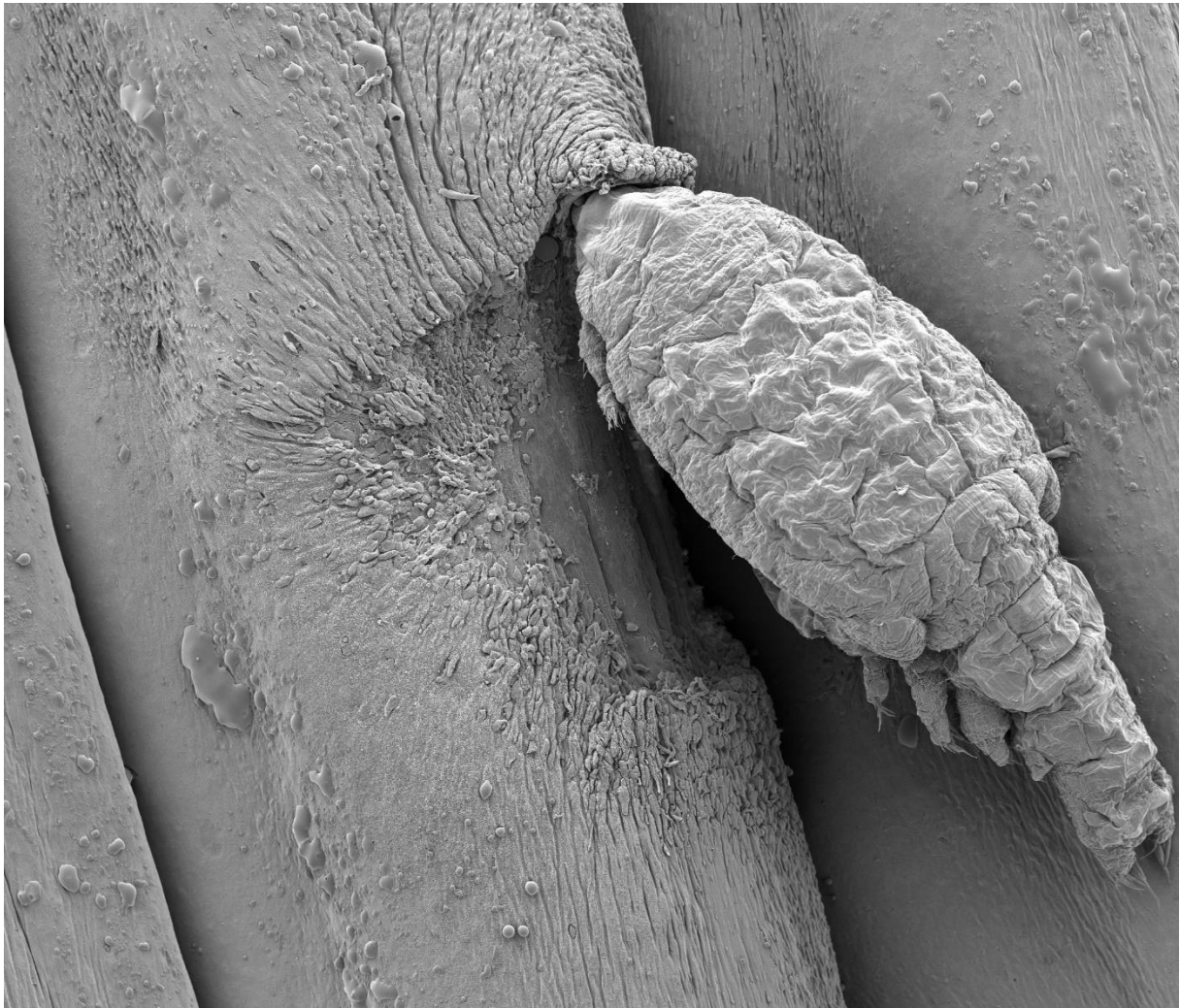


SLUTTRAPPORT - MODULUS

Samspill mellom lakselus og laks

Aina-Cathrine Øvergård og Lars Are Hamre (UiB)



En chalimus i lakselus på en laksefinne. Under lusen ser man erosjoner i laksens hud der lusen har spist. Man kan også skimte frontalfilamentet i forkant som fester lakselusen til laksens hud under hele chalimus fasen. Lusen sekrerer en rekke proteiner i dette såret for å dempe immunresponser samt inhibere blodkoagulasjon. Disse proteinene har vært i fokus i ModuLus.

FHF-prosjektnummer: 901564

Prosjekttittel: Samspill mellom lakselus og laks (ModuLus)

Rapportdato: 09.10.2023

Prosjektleder: Aina-Cathrine Øvergård, Førsteamanuensis, Universitetet i Bergen

1. Sammendrag

Å dempe immunresponser er essensielt for at lakselusen skal greie å etablere seg på en laks, og dette gjør den ved å sekretere substanser ned på laksens hud fra eksokrine kjertler – kjertler med en utførselskanal. I ModuLus har vi forsket på slike immunmodulerende substanser for å frembringe ny kunnskap om lakselusens vert-parasitt interaksjon og slik kunne skape innovasjon innen nye immunbaserte bekjempelsesstrategier. Vi har fokusert på en kjerteltype, spyttkjertelen, da denne sekreterer substanser på lakselusens mandibeltenner som lusen bruker for å introdusere laksehud inn i munnen. Lakselusens spytt var derfor trodd å bli avsatt direkte ned i såret, og i ModuLus har vi greid å vise at dette sekretet faktisk blir avsatt på laksens hud. I alt 15 proteiner som med høy sannsynlighet er en del av dette sekretet ble også identifisert. Både *in vivo* studier der vi har nedregulert uttrykket av disse proteinene i lusen (KD-lus) og analysert hvordan dette endret immunresponsen til laksen, samt *in vitro* studier der primære leukocytter eller blod har blitt behandlet med rekombinante spyttkjertelproteiner har blitt gjort for å få indikasjoner på deres funksjon. Med dette arbeidet har vi funnet at lakselusen sekreterer proteiner som indirekte eller direkte demper inflammasjon, et protein som dreper immunceller, enzymer som muligens er anti-mikrobielle og da indirekte demper immunresponser i sårflaten samt et protein som ser ut til å inhibere blodkoagulering. Disse proteinene er uttrykt allerede før lakselusen er infektiv, og understreker viktigheten av proteinene under den første etableringsfasen til lakselusen. Vi har også gjort komparative studier der vi har sammenlignet lakselusens vert-parasitt interaksjon med skottelusens, da denne i motsetning til lakselus er en generalist som infiserer mange fiskearter og i enkelte stadier irriterer laksen betydelig mere. Skottelusen viste seg å ha de samme kjerteltypene som lakselus, og skottelusens spyttkjertel sekreterer mange av de samme proteinene som lakselusen, men også egne proteiner ble funnet for begge artene. Det så også ut til at skottelusens evne til å dempe laksens immunrespons var overlegen lakselusens, og er muligens en evolusjonær tilpasning til det å være en generalist som kan infisere og modulere immunresponsen til en rekke fiskearter. Begge artene så imidlertid ikke ut til å ha et spyttkjertelprotein som kan ansees som en nøkkelfaktor, og i den videre utviklingen av immunbaserte behandlingsmetoder som vaksiner er dette et verdifullt resultat å ta med seg videre.

Dampening immune responses is essential to enable the salmon louse to establish on a salmonid host, and this is done by secreting substances onto the salmon's skin from exocrine glands that are glands with ducts. In ModuLus, we have investigated such immunomodulating substances in order to generate new knowledge about the salmon louse's host-parasite interaction to create innovation within new immune-based treatment strategies. We have focused on one gland type, the salivary gland, as they secrete substances onto the salmon louse mandibel teeth which the louse uses to introduce host skin into the mouth. The salmon louse's saliva was therefore believed to be deposited directly into the skin wound, and in ModuLus we have proved that this secretion is in fact deposited on the salmon's skin. A total of 15 proteins that are likely to be part of this secretion were also identified. Both *in vivo* studies where we have downregulated the expression of these proteins in the lice (KD lice) and analyzed how this changed the immune response of the salmon, as well as *in vitro* studies where primary leukocytes or blood have been treated with recombinant salivary gland proteins have been done to depict their function. With this work, we have found that the salmon louse secretes proteins that indirectly or directly suppress inflammation, a protein that kills immune cells, enzymes that are possibly anti-microbial and thus indirectly suppress immune responses in the wound, and a protein that can inhibit blood coagulation. These proteins are expressed even before the salmon louse is infective and emphasize the importance of the proteins during the first establishment phase of the lice. Comparative studies were also carried out to compare the host-parasite interaction of the salmon louse with that of *Caligus elongatus*, as *C. elongatus*, in contrast to the salmon louse, is a generalist that infects many fish species and induce more irritation in Atlantic salmon upon infestation. The *C. elongatus* was found to have the same gland types as the salmon louse, and also the salivary gland secretes contain many of the same proteins. Separate proteins were, however, found for both species. It also appeared that the *C. elongatus*'s ability to suppress the salmon's immune response was superior

to that of the salmon louse and is possibly an evolutionary adaptation to being a generalist that can infect and modulate the immune response of a variety of fish species. However, both species did not appear to have a salivary gland protein that could be considered a key factor, and in the further development of immune-based treatment methods such as vaccines, this is a valuable result to take forward.

2. Innledning

Når en lakselus infiserer en laks, vil den påføre laksen sår av varierende alvorlighetsgrad avhengig av hvor langt den er kommet i sin livssyklus. De små larvestadiene spiser hovedsakelig av den øvre delen av huden, mens de pre-adulte og adulte stadiene går dypere i huden for å komme ned til laksens blodtilførsel [1-4]. Men uansett hvilket lusestadie laksen er infisert med, så er immunresponsen den greier å aktivere mot lusen relativt moderat [2, 5-7], og lusen greier derfor å etablere seg der over tid til tross for de påførte skaden. For å dempe vertens immunresponser, sekreterer parasitter faktorer fra eksokrine kjertler – kjertler som har en utførselskanal. Lakselusen har en rekke eksokrine kjertler, men spesielt to kjerteltyper, spyttkjertler (også kaldt labial kjertler) samt tegumental type 3 (teg3) kjertler, er trodd å produsere et sekret som faktisk kan deponeres direkte på laksens hud [8]. Disse var dermed trodd å være viktig for å dempe immunresponser samt andre faktorer for å muliggjøre luseinfestasjonen. Noen spyttkjertelkomponenter var kjent forut for ModuLus, men deres funksjon var i stor grad ukjent. Det var også en høy sannsynlighet for at lusen sekreterte flere komponenter enn de som allerede var kjent. ModuLus ble dermed igangsatt for å øke vår grunnleggende forståelse av vert-parasitt interaksjonen i samspillet mellom laks og lakselus, da hovedsakelig ved å karakterisere lakselusens sekret fra spytt- og teg3-kjertelen.

Caligus elongatus (heretter referert til som skottelus) har også tidvis gitt problemer for oppdrett av laks, spesielt nord i landet. Denne parasitten er, i motsetning til lakselusen, en generalist rapportert fra mer enn 80 ulike fiskearter [9]. Skottelusen smitter og utvikler seg på laks med tilnærmet samme suksess som lakselus der også den påfører laksen hudskader, men skottelusen er imidlertid kjent for å irritere laksen betydelig mere. I sammenligningen mellom generalisten skottelus og laksespesialisten lakselus lå det derfor et stort potensial for å oppdage hvilke faktorer som er avgjørende for lakselusens vertsspesifisitet, og dermed for vert-parasitt interaksjonen. Komparative studier av luseartene kunne dessuten bidra til å avdekke potensielt viktige vaksine kandidater i kjertelsekret i begge luseartene, samt gi viktig funksjonell kunnskap om proteinene som kunne hjelpe under utviklingen av en lakselusvaksine.

Det letes iherdig etter gode vaksine kandidater mot lakselus også i lusens tarm, som i tillegg til å inneha et stort antall mulige vaksine kandidater, også produserer fordøyelsesenzymmer som potensielt kan inhibere en vaksine reaksjon [10, 11]. I hvilken grad en vaksine vil kunne virke i lusens tarm, vil derfor være avhengig av hvor fort antistoffer og andre immunkomponenter i laksens blod blir fordøyd. Nedbrytnings-hastigheten avgjør dermed om laksens immunsystem vil være i stand til å angripe og skade lusetarmen. Fra preliminnære studier visste vi at hele lakseceller, både røde blodceller og immunceller, kunne sees i lusens tarm rett etter at lusen er tatt fra fisk, og at mesteparten av disse cellene er fordøyd innen 24 timer av verten (Øvergård et al. upublisert data). Imidlertid hadde vi ikke kunnskap om i hvilken grad og i hvilket tempo antistoffene blir degradert, og hvorvidt de er virksomme når de er tatt opp i lusen. I det videre arbeidet med vaksineutvikling ville det derfor være et stort fortrinn å få oversikt over dette, samt hvorvidt laksens immunceller er virksomme i lusens tarm. Ved å belyse dette, ville man få kunnskap som kunne gi et bedre beslutningsgrunnlag for seleksjon av gode vaksine kandidater. Velger man strukturelle antigener (for eksempel proteiner som holder tarmcellene sammen), vil en effektiv vaksine være avhengig av at flere immunkomponenter enn bare antistoffer er virksomme i tilstrekkelig lang tid; velger man funksjonelle antigener vil man kunne forvente at binding av antistoffer alene vil kunne gi tilstrekkelig effekt ved å interferere med livsviktige prosesser. Det er også viktig å få belyst om tarmens proteiner muligens ikke er det beste vaksinemålet, og om alternative vaksine kandidater som spyttkjertelproteinene burde bli testet i større grad.

I ModuLus har vi dermed undersøkt om laks har en iboende resistensmekanisme som er dempet/modulert av bestanddeler i lakselusens sekreter, for å kunne gi indikasjoner om disse kjertelfaktorene vil kunne være aktuelle angrepspunkt. Identifikasjon av immunmodulatoriske faktorer og kunnskap om deres virkningsmekanisme og anvendelse har blitt innhentet i tre arbeidspakker. I arbeidspakke 1 (AP1) ble flere proteiner som produseres i lakselusens spyttkjertler identifisert, og hvordan disse manipulerer laksens responser ble analysert. I denne arbeidspakken har vi også forsøkt å avdekke om faktorer i laksens hud og/eller slim aktiverer produksjon av spyttkjertelsekret, og om dette blir produsert når lakselusen sitter på de resistente fiskeartene pukkellaks og coho-laks. I AP2 har vi sammenlignet de eksokrine kjertlene hos laksespesialisten lakselus med kjertlene til generalisten skottelus, samt undersøkt forskjeller i laksens immunrespons mot disse to luseartene. I AP3 ble nedbrytning av laksens immunkomponenter i lusens tarm studert, for å kunne gi indikasjoner på hvilke komponenter i tarmen som er de beste vaksinekandidatene, om noen.

Prosjektet startet 01.09.2019 og skulle opprinnelig avsluttes 31.08.2022. Men grunnet pandemien og en rekke følger av denne, ble prosjektet forlenget med et år til 31.08.2023, da med det opprinnelige budsjettet på 13 678 000 kr. Prosjektet var ledet av førsteamanuensis Aina-Cathrine Øvergård, og ble i all hovedsak utført ved forskningsgruppen SLRC ved Institutt for biovitenskap (BIO), Universitetet i Bergen (UiB), med bruk av eksperimentelle fasiliteter her. Her har spesielt Lars Are Hamre, Helena Marie Doherty Midtbø, Christiane Eichner, Andreas Borchel og Heidi Kongshaug vært involvert. Det har dessuten vært tett samarbeide med Gyri Teien Haugland fra forskningsgruppen Fiskeimmunologi (BIO, UiB) og Gro Elin Kjæreng Bjerga ved NORCE, i tillegg til noe samarbeid med Københavns Universitet (DK) og University of Sterling (UK). Prosjektet hadde også et aktivt samarbeid og delte referansegruppe med INFEST prosjektet ledet av Sussie Dalvin ved Havforskningsinstituttet. Det siste året ble prosjektet dessuten knyttet til FHF prosjektet CrispResist, ledet av Nicholas Robinson ved NOFIMA. Referansegruppen bestod av Aoife Westgård (Emilsen Fisk), Bjarne Reinert (Lerøy Seafood Group), og Karl Fredrik Ottem/Tiril Slettjord (Cermaq Norway). FHF ansvarlig var Kjell Maroni.

3. Problemstilling og formål

I Norge representerer lakselus i dag oppdrettsnæringens hovedproblem, da den gir en rekke sykdoms- og velferdsutfordringer som følge av et intensivt lusebehandlingsregime [12], og er til hinder for videre vekst i næringen. Lusemidler som fremdeles er virksomme har en negativ effekt på det marine økosystemet, samt at ikke-medikamentelle behandlingsmetoder gir økt stressbelastning, mekaniske skader, bakterielle problemer med sårproblematikk og påfølgende økt dødelighet hos oppdrettsfisk. Man er også kommet inn på et meget uheldig spor der store økonomiske ressurser og mye forskningskapasitet settes inn på å håndtere konsekvensene av lusebehandlingen fremfor at ressurser bli brukt til å løse luseproblemet direkte. Nye bekjempelsesstrategier mot lus har et potensiale til å redusere dette betydelig og kan muliggjøre videre vekst i næringen. Dette kan også lette de store fiskehelse- og velferdsutfordringene for oppdrettsfisk knyttet til dagens metoder for lusebekjempelse, og kanskje gjøre det mulig å pensjonere rensefiskene og dermed kvitte seg med et etisk betent problem som gir laksenæringen negativt omdømme.

Nye og bedre tiltak mot lakselus kan være treffsikre vaksiner, funksjonelt fôr som styrker laksens immunforsvar og utvikling av resistent laks gjennom avl eller genteknologiske metoder som CRISPR. ModuLus ble dermed igangsatt for å forsøke å skape innovasjon innen slike bekjempelsesstrategier, ved å øke vår grunnleggende forståelse av vert-parasitt interaksjonen. Hovedmålet med prosjektet var dermed å frembringe grunnleggende kunnskap om samspillet mellom lakselus og laks, for slik å kunne bidra til å legge grunnlag for utviklingen av effektive immunbaserte bekjempelsesmetoder. I tillegg til at kjertlene uttrykker potensielle vaksinekandidater, vil kunnskapen om hvordan lus modulerer sin vert kunne være behjelpelig med å utvikle en resistent fisk da man kan unngå å interferere med responser som uansett vil bli dempet av lusens sekret. Prosjektet anvendte også

skottelusens i komparative studier for å øke forståelsen av laks-lakselus interaksjonen, og med dette ble også skottelusens egen strategi for å parasittere laksen belyst. Slik kunnskap vil kunne bidra til å avdekke skottelusvaksinekandidater, i tillegg til potensielt å identifisere kandidater felles for begge luseartene.

For å oppnå dette ble både lakselusens og skottelusens vert-parasitt interaksjon studert, der følgende delmål ble utformet:

Delmål, AP1:

- D1.1: Identifisere og karakterisere proteiner som er viktig i lakselus-laks interaksjonen.
- D1.2: Kartlegge gener hos laks som blir regulert av lakselusens spyttkjertelproteiner.
- D1.3: Identifisere hvilke immunceller lakselusens kjertelproteiner modulerer.
- D1.4: Påvise hva som aktiverer produksjonen av lakselusens spytt.

Delmål, AP2:

- D2.1: Identifisere parasittære vertstilpasningsstrategier hos lakselus ved å sammenligne lakselusens eksokrine kjertler og deres sekreter med skottelusens.
- D2.2: Avklare hvorvidt lakselus gjør laksen mer mottagelig for skottelus.

Delmål, AP3:

- D3.1: Utrede hvor lenge immunkomponenter og immunceller i laksens blod er funksjonelle i lusens tarm.
- D3.2: Identifisere den optimale type vaksinekandidat i lusens tarm, strukturelle eller funksjonelle.

Delmål, alle arbeidspakker

- D4: Identifisere mulige kandidater i lusespytt som kan bli brukt i utviklingen av nye strategier for bekjempelse av lakselus.

4. Prosjektgjennomføring

Prosjektet ble gjennomført i tre arbeidspakker, der alle hadde fokus på å øke kunnskapen om hvordan samspillet mellom lakselus og vert ble modulert.

4.1 AP1: Lakselusens eksokrine kjertler

D1.1: Identifisering og karakterisering av proteiner som er viktig i lakselus-laks interaksjonen.

I dette delmålet skulle gen fra de to kjerteltypene trodd å være viktig i vert-parasitt interaksjonen bli identifisert fra lakselus, spytt- og teg3-kjertelen, ved hjelp av data fra RNA-sekvensering (RNAseq). For å identifisere mulige spyttkjertelgen ble først RNAseq data fra prøver med en høy andel spyttkjertel fra adulte lus ble sammenlignet med prøver som ikke inneholdt spyttkjertel (ovarie, testis, føtter) samt alle utviklingsstadiene til lakselus. Vi analyserte også RNAseq data fra kopepoditter, ettersom noen spyttkjertelgener kun er uttrykt i dette stadiet. Men da det er utfordrende å dissekere ut kopepodittens spyttkjertel, ble en annen fremgangsmåte brukt på dette stadiet. I kopepoditter har vi identifisert et gen som styrer produksjonen av andre spyttkjertelproteiner. Når ekspresjon av dette genet nedreguleres eksperimentelt ved bruk av en etablert metode for RNA-interferens (RNAi) [13], avtar også ekspresjonen av alle andre kjente gener som koder for spyttkjertelprodukter. Ved å RNA-sekvensere knock-down kopepoditter, og sammenligne de med kontrollkopepoditter, vil flere nedregulerte gener kunne bli identifisert som med høy sannsynlighet er uttrykt i spyttkjertelen.

For Teg3-kjertlene som ligger dypt i lusens forkropp [8], var det tenkt å anvende laser-mikrodiseksjon for å få rene prøver av kjertelvev til RNAseq. Snitt fra pre-adulte og adulte lus ble planlagt brukt, som skulle bli produsert i Stirling da der var nødvendig utstyr. Covid pandemien satte imidlertid en stopper

for dette, da vi ikke fikk mulighet til å reise over tidlig nok i prosjektet, samt tekniske problemer da det viste seg å være vanskelig å skulle skille mellom teg3 og den mere tallrike teg1 kjertelen i frysesnitt. Vi besluttet dermed å re-analysere RNAseq data vi hadde med prøver fra området med teg3 kjertler i flere utviklingsstadier og kjønn, og sammenligne disse med områder uten teg3 kjertler fra den samme lusens samt med utviklingsstadiet før teg3 var utviklet (chalimus II).

Genene skulle så bli videre karakteriserte, da først etter at de hadde blitt bekreftet å være uttrykt i de respektive kjerteltypene med *in situ* hybridisering (ISH). De genene som var uttrykt i ønsket kjerteltype ble videre fullsekvensert, og ontogenetiske prøver av alle utviklingsstadiene til lakselusen ble analysert for å kartlegge når i livssyklusen genene er uttrykt. Genekspresjonen ble også analysert i kopepoditter tatt fra coho- og pukkellaks, som er resistente mot lakselus; dette for å se om spyttsekresjonen vil aktiveres når lakselusen slår seg ned på disse artene. I tillegg ble genekspresjonen av kjertelgenene nedregulert eksperimentelt i lusens ved hjelp av RNAi (KD-lus), for å kunne evaluere effekten av nedsatt konsentrasjon av et bestemt protein i kjertelsekretet når lusens smitter laksen. Fra smittet laks ble det tatt prøver for å kartlegge immunreaksjoner fra hud (med og uten fastsittende KD-lus), og sammenlignet med reaksjonen mot kontrollus. Andre data, som lusens overlevelse og eventuell økt kløe/irritasjon hos laksen, ble også overvåket.

D1.2: Kartlegging av gener hos laks som blir regulert av lakselusens spyttkjertelproteiner.

Prøvene fra laks som var smittet med lus med nedregulert spyttkjertelgener ble videre RNA-sekvensert etter at qPCR analyser hadde bekreftet at de hadde immunmodulatoriske egenskaper. Både laksehud omkring infeksjonsstedet samt hudprøver uten lus, ble analysert og sammenlignet med tilsvarende prøver fra laks smittet med kontrollus og ubehandlet fisk. Dette ville gi oss en utvidet forståelse for den immunmodulerende egenskapen til hvert enkelt protein.

D1.3: Identifisere hvilke immunceller lakselusens kjertelproteiner modulerer.

For å kunne identifisere hvilke immunceller som blir påvirket av kjertelproduktene, skulle flere av kjertelproteinene bli forsøkt uttrykt rekombinant i *E. Coli* i et etablert system for protein produksjon [14]. I innledende forsøk hadde rekombinante proteiner blitt uttrykt fra lakselussyttkjertelen i dette systemet, der noen ble uttrykt i løselig form noe som er nødvendig for funksjonelle studier. I dette prosjektet skulle det arbeides videre med noen av disse kandidatene. Kandidater som ikke lot seg uttrykkes i løselig form i det opprinnelige systemet skulle dessuten følges opp ved to strategier for å øke løselighet: proteinene skulle bli testet som ulike genetiske fusjoner [15, 16], og i spesialtilpassede cellelinjer (for eksempel Shuffle og Arctic Express celler). Produksjonen av proteiner som uttrykkes i løselig form skulle så oppskaleres, og videre renses med affinitetskromatografi for å oppnå en renere proteinfraksjon for anvendelse i immunologiske studier. Det viste seg imidlertid å være vanskelig å uttrykke de fleste spyttkjertelproteinene rekombinant i *E. coli*, og fire proteiner ble derfor produsert kommersielt (et som syntetisk peptid og tre i insektceller).

Videre skulle proteinenes effekt på immunceller bli analysert, både direkte på hele cellefraksjoner fra blod/hodenyre, men også på immunceller sortert i ulike typer ved bruk av antistoffer og magnetiske kuler i kombinasjon med cellostering på flow cytometer. Cellene ble stimulert med immunstimulatorer som LPS, samtidig som vi behandlet med rekombinante kjertelproteiner. Ved å sammenligne effekten av immunstimulatorer alene med effekten av rekombinante proteiner i kombinasjon med immunstimulatorer, hadde vi et system for å undersøke om kjertelproteinene har en immundempende virkning på immuncellene. Total-RNA fra immuncellene ble opparbeidet, og regulering av utvalgte immungener ble analysert med sanntids-RT-PCR. Vi så også på cellemorforlogien ved hjelp av scanning elektron mikroskopi (SEM). Og siden vi har pukkellaks og torsk i våre laboratorier, ble også primære immunceller isolert fra disse artene for å undersøke effekten av de rekombinante proteinene på resistente laksearten samt en ikke-vert. Da et av proteinene viste seg å ikke ha en immundempende funksjon, ble en analyse utarbeidet for å teste om dette proteinet i stedet inhiberte blodkoagulasjonen.

D1.4: Påvise hva som aktiverer produksjonen av lakselusens spytt.

Preliminære studier indikerte at lakselusen induiserte produksjonen av spytt rett etter de hadde etablert seg på en vert. For å starte kartleggingen av hva som aktiverer ekspresjonen av lakselusens spyttkjertelgener, skulle planktoniske kopepoditter inkuberes i slim, med skjell, samt serum og blod da vi har sett at lakseluskoepoditter som etablerer seg på gjellene og drikker blod tidlig viser dårligere tilvekst [3]. I tillegg skulle vi eksponere lus for syntetisk CATH-2 løst i saltvann. Men for å ha en positiv kontroll, ble laks også smittet med kopepoditter som ble samlet med korte tidsintervall etter oppsmitte, samt kopepoditter holdt i rent saltvann i tilsvarende tid som negativ kontroll. Total RNA fra disse prøvene ble isolert, og ekspresjonen av spyttkjertelgenene ble målt med sanntids-RT-PCR.

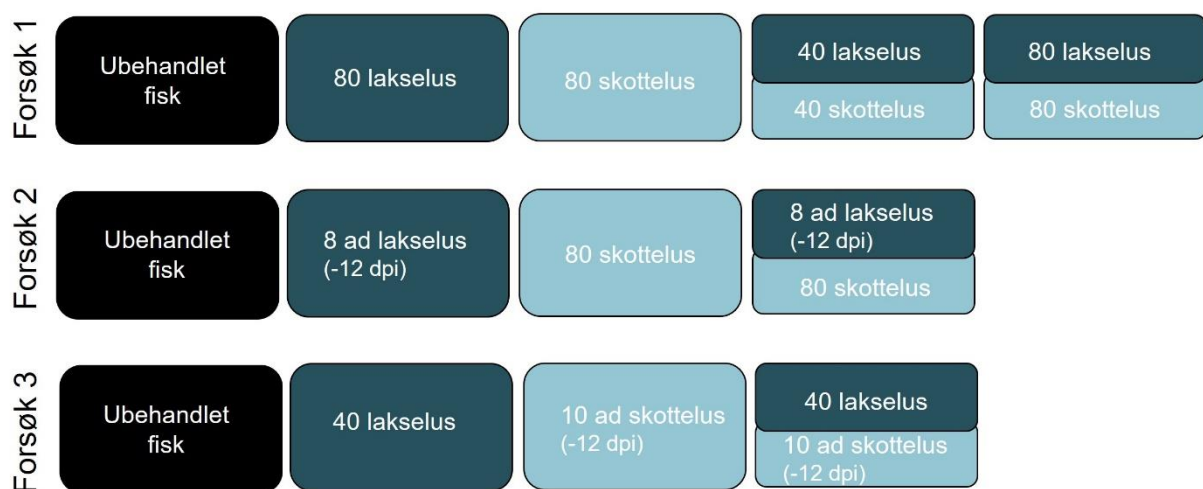
4.2 AP2: Sammenligning av lakse-spesialisten (lakselusen) med generalisten (skottelus).

D2.1: Identifisere parasittære vertstilpasningsstrategier hos lakselus ved å sammenligne lakselusens eksokrine kjertler og deres sekreter med skottelusens.

For å identifisere proteiner som spiller en avgjørende rolle i vertstilpasningen hos den spesialiserte lakselusen, ble de eksokrine kjertlene til generalisten skottelus først karakterisert. Plastsnitt farget med toluidin blått ble opparbeidet, og disse ble anvendt for å identifisere forskjellige kjerteltyper. Vi preparerte dessuten skottelus for SEM for å analysere utførselskanaler i forbindelse med teg3 kjertler da disse viste seg å være vanskelig å identifisere på snitt. RNAseq av skottelusens spyttkjertel ble videre utført i adulte lus for å identifisere gener uttrykt her. Identifiserte gener ble karakterisert (ISH, ontogeni og fullsekvensering), og deres immun-modulerende egenskaper ble evaluert gjennom knock-down-studier som beskrevet i D1.1 for lakselus.

D2.2: Avklare hvorvidt lakselus gjør laksen mer mottagelig for skottelus.

Eksperimentelle koinfeksjoner med lakselus og skottelus ble utført for å sammenligne immunresponsene mot disse to luseartene samt for å avklare hvorvidt lakselusen, gjennom sin modulasjon av laksens immunsystem, gjør laksen mer mottagelig for smitte med skotteluskoepoditter. Tre forsøk ble satt opp (Fig 1), der det første var tenkt å gi svar på om lakseluskoepodittene vil gjøre laksen mere mottakelig for skottelus, mens det andre forsøket fokuserte på adulte lakselus da disse muligens er bedre i å dempe immunresponser [2]. I det tredje forsøket ble lakseluskoepoditter gitt til fisk som allerede var smittet med skottelus, da vi så i de to foregående forsøkene at skottelusen faktisk så ut til å være flinkere å dempe responser enn lakselusen.



Figur 1. Viser forsøksgruppene ved forsøk 1-3. Fiskene blir smittet med kopepoditter om ikke annet er nevnt. -12 dpi angir når en luseart er gitt forut for den andre lusearten.

I forsøk 1 ble 60 fisk fordelt i fem grupper (N=6): en ubehandlet gruppe, en infisert med lakselus (80 kopepoditter/fisk), en med skottelus (80 kopepoditter/fisk) og to grupper med koinfisert laks der den ene fikk 40 skottelus og 40 lakselus per fisk (80 kopepoditter/fisk) og den andre fikk 80 skottelus og 80 lakselus per fisk (160 kopepoditter/fisk). Prøver ble tatt 12 dager post smitte (dps). I forsøk 2 ble 36 fisk fordelt i fire grupper (N=9): en ubehandlet gruppe, en gruppe infisert med 8 adulte lakselus (5♀+3♂), en med 80 skottelus/fisk og en gruppe smittet både med 8 adulte lakselus/fisk samt 80 skottelus/fisk. De adulte lakselusene ble satt på 12 dager før skotteluskopepodittene ble gitt, og prøver ble tatt 24 og 12 dager etter smitte med henholdsvis lakselus og skottelus. I det siste forsøket, forsøk 3, ble totalt 54 fisk fordelt i seks grupper (N=9): en ubehandlet gruppe, en gruppe infisert med 40 lakselus/fisk, en med 40 skottelus/fisk, en med 10 adulte skottelus/fisk samt to ko-infestasjonsgrupper; en med 40/40 lakselus og skottelus kopepoditter og en med 40 lakseluskopepoditter og 10 adulte skottelus. Skottelusen ble gitt 12 dager før smitte med lakselus, og samlet 12 dager etter smitte med lakselus. Forsøkene ble utført i enkeltkar (12 °C), der prøver ble tatt av hud (med og uten lus) for total-RNA-isolering med påfølgende sanntids-PCR-analyse av gener identifisert som viktige i immunresponsen. Smitte suksess ble også registrert.

4.3 AP3: Nedbrytning av laksens immunkomponenter i lakselusens tarm.

D3.1: Utrede hvor lenge immunkomponenter og immunceller i laksens blod er funksjonelle i lusens tarm og D3.2: Identifisere den optimale type vaksinekandidat i lusens tarm, strukturelle eller funksjonelle.

For å analysere hvor fort laksens immunkomponenter blir brutt ned i lakselusens tarm ble blod fra lusetarm samlet ved å lage et snitt nederst ved endetarmen med et skalpellblad, for deretter å pipetere ut tarminnholdet. Fordøyelse av antistoffer ble forsøkt analysert med forskjellige metoder: Western blott for å evaluere degradering av antistoffer, ELISA for å evaluere konsentrasjonen av antistoffer både spesifikk og total-konsentrasjonen, samt proteomikk av tarminnhold fra lus med forskjellig grad av blodfylling i tarmen ble anvendt som en mere sensitiv metode for deteksjon av IgM. Tarminnholdet til lus 0, 4 og 24 timer etter den ble tatt av verten ble også analysert med proteomikk.

Overlevelse av immunceller ble undersøkt med farging av døde celler og celletelling i heamocytometer. Et forsøk med manuell føring av blod til lusen ble også utført ved bruk av en etablert protokoll (Barbosa et al. upublisert data). Blodet lusen ble føret med ble farget med en fluorescensfarge før det ble matet til sultet lakselus, og immunceller i lusens tarm ble fulgt i fluorescensmikroskop.

5. Oppnådde resultater, diskusjon og konklusjon

5.1 Immunmodulering – lakselus

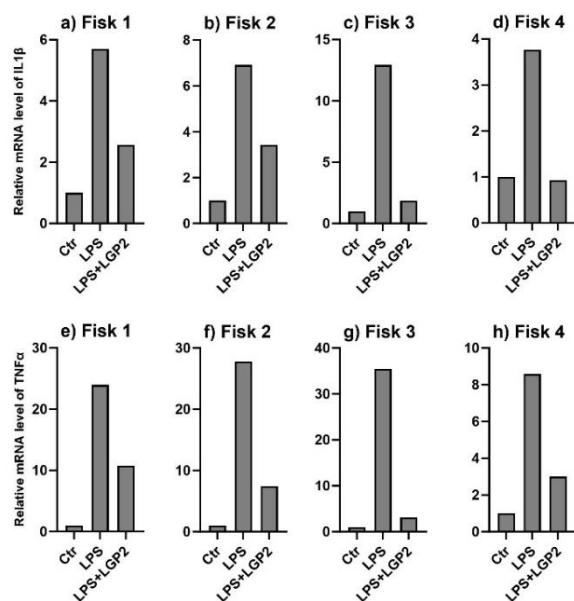
To kjerteltyper fra lakselus ble analysert i dette prosjektet, spytt- og teg3-kjertelen, da begge disse kjerteltypene så ut til å kunne sekrere faktorer som er involvert i lakselusens vert-parasitt interaksjon. Men mens vi i spyttkjertelen har kunnet bekrefte uttrykk av en rekke proteiner, har vi til tross for en nøye evaluering av RNAseq data fortsatt ikke greid å identifisere gen uttrykt i teg3-kjertler. Spyttkjertelen har derfor vært i fokus i ModuLus. Ved oppstart av ModuLus var 10 gen bekreftet uttrykt i lakselusens spyttkjertel. Ytterligere åtte gen ble imidlertid identifisert i Modulus, og nå har vi indikasjoner på at til sammen 15 av disse genene på en eller annen måte er involvert i vert-parasitt interaksjonen. Vi har dessuten greid å bevise at spyttkjertelsekretet faktisk blir deponert på laksens hud, og at noen av de sekretede proteinene her er direkte involvert i å dempe immunresponser, mens noen regulerer andre funksjoner som koagulasjon som også er viktig for at lakselusen skal greie å etablere seg på verten.

Det ble identifisert til sammen fem gener uten kjente proteindomener kaldt *Lepeophtheirus salmonis* labial gland proteiner (LsLGPs) [17], der selve proteinsekvensen til disse genene ga lite informasjon om

hvilken funksjon disse proteinene kunne inneha. De var alle ganske små proteiner, der to så ut til å ha en overvekt av negative ladninger (LsLGP1 og LsLGP1-lignende, LsLGP1L), mens de resterende var basiske proteiner med positive ladninger (LsLGP2-4). Disse ladningene er tenkt å kunne være involvert i bindinger til for eksempel vertspoteiner eller ladede molekyler som kalsium, og slik inhibere deres virkning. Dette er imidlertid ikke bevist.

De to av disse små proteinene som var tidligst uttrykt i lakselusen var LsLGP1 og LsLGP1L. Disse to proteinene lot seg ikke produseres i en form der foldingen var korrekt, og de så dessuten ut til å være relativt ustabile proteiner. Funksjonen kunne derfor ikke analyseres ved hjelp av rekombinante proteiner. Knock-down (KD) studier viste imidlertid at enten begge eller et av disse to relativt like proteinene så ut til å regulere mRNA nivået til de andre spyttkjertelproteinene som var uttrykt i kopepoditter. KD studier i pre-adulte og adulte lus viste ingen regulering, slik at dette er trodd å kun påvirke den initiale induksjonen av lakselusens spytt, og det er derfor trolig at disse to proteinene har andre funksjoner i tillegg til å regulere lakselusens spyttproduksjon. Videre forsøk med å prøve å produsere disse to proteinene i gjærceller har dermed blitt initiert.

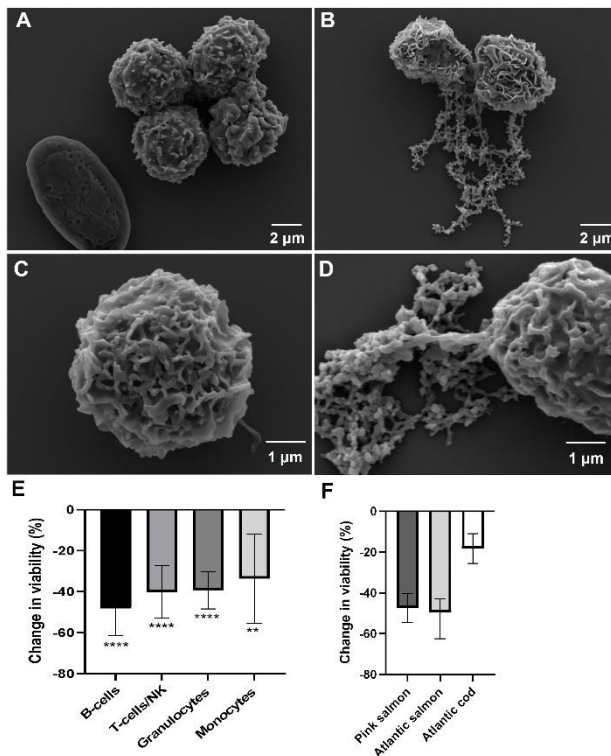
Både LsLGP2 og 3 har vist seg og ha en immundempende funksjon. LsLGP2 ser ut til å dempe inflammatoriske responser, da gen som koder for proinflammatoriske cytokiner og reseptorer, kjemokiner viktig for attraksjon av immunceller, celledhesjonsmolekyler for interaksjon mellom forskjellige immunceller, og proteiner fra fagosomet hadde en høyere ekspresjon under lus som mest sannsynlig hadde lavere konsentrasjoner av LsLGP2 i spyttet (KD-lus). Rekombinant LsLGP2 dempet nivået av de pro-inflammatoriske cytokinene IL1 β og TNF α i LPS-stimulerte primære blodleukocytter, spesielt i prøver som hadde et høyt antall neutrofile granulocytter (Fig 2). Dette støttet opp under RNAi-resultatene, og videre styrker konklusjonen om at LsLGP2 virker på inflammasjonsresponsen.



Figur 2. Relativt mRNA nivå ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) av a-d) Interleukin 1 beta (IL1 β) og e-h) tumor nekrose faktor alfa (TNF α) i blodleukocytter isolert fra fire forskjellige fisk. Leukocytene er behandlet enten med PBS (Ctr), lipopolysakkarid (LPS) eller en kombinasjon av LPS og rekombinant labial gland protein 2 (LGP2). Man ser at i cellene som har fått både LPS og LGP2, er både nivåene av IL1 β og TNF α mye lavere enn i cellene som kun har fått LPS for å simulere en inflammatorisk respons. Det vil si at LGP2 demper den inflammatoriske responsen.

LsLGP3, på den andre siden, så ut til å mere generelt dempe cellulære responser ved å indusere en spesiell form for apoptose i alle typer immunceller (Fig 3). Denne formen for apoptose er kalt «apoptotic beads on a string», og er trodd å være en mekanisme for at immunceller kan dø uten å indusere inflammatoriske responser [18]. Det er dermed en fredelig måte å dø på, noe som vil være en fordel hvis du som lus skal indusere celledød i vertens immunceller. Epitelcellene i epidermis samt røde blodceller så ikke ut til å bli affisert, og proteinet så ut til å være funksjonelt også mot immunceller fra pukkellaks, mens torskeimmunceller ble i liten grad affisert av LsLGP3. For å bekrefte disse *in vitro* resultatene, ble *in vivo* KD studier med påfølgende analyser av immunresponser i laksens hud under forskjellige lusestadier også utført ved forskjellige lakselusstadier (chalmus I 5 og 7 dps, adulte 14 dps).

Det var imidlertid få immunrelaterte gen som var forskjellig regulert under KD og kontrollusene, slik at det er nærliggende å tro at LsLGP3 ikke er dypt-virkende og dermed vanskeliggjør en slik *in vivo* KD studie der en relativt stor del av huden analyseres. De *in vitro* resultatene ansees imidlertid som relativt sikre, da de er konsentrasjonsavhengige, og spesifikt til salmoniders immunceller.



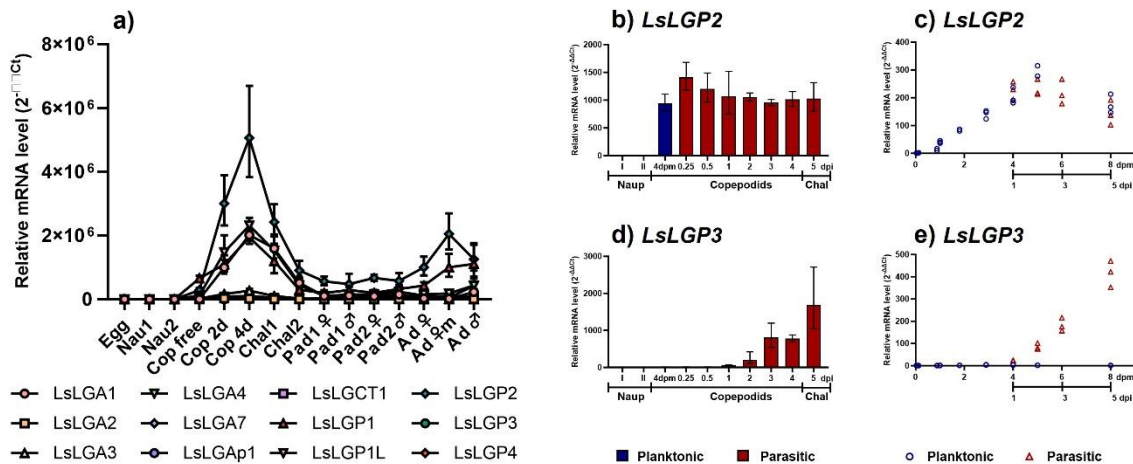
Figur 3. A-D) Scanning elektronmikroskopiske (SEM) bilder av leukocytter tilsatt PBS (A og C) eller rekombinant LsLGP3 (B og D) i 2 timer. Trådlignende formasjoner sees fra LGP3-behandlede celler, noe som sannsynligvis er en spesiell form for apoptose kalt «beads on a string». E) Anrikede cellepopulasjoner av atlantisk laks leukocytter fra blod stimulert med LsLGP3 i 6 timer. Celleviabiliteten ble målt med CASY, og angitt som den prosentvise nedgangen relatert til kontrollceller behandlet med PBS (N=5). F) *In vitro* forsøk med leukocytter isolert fra pukkellaks, atlantisk laks og atlantisk torsk behandlet med LsLGP3 i 6 timer. Celledød ble målt, og angitt som den prosentvise nedgangen i celleviabilitet relatert til kontrollceller behandlet med PBS.

Videre har vi også testet funksjonen til det siste proteinet uten kjente proteindomener, LsLGP4. Dette er det korteste av de 5 LGPene, og syntetisk LsLGP4 hadde ingen effekt på celledødelighet eller målte immunrelaterte gener. Det viste seg imidlertid kun å være uttrykt i de mobile pre-adult og adulte stadiene til lakselus [17], og er dermed ikke induisert før lusens vanligvis begynner å spise blod fra laksen [3]. En test for å måle koaguleringsstid ble derfor utarbeidet, og viste at LsLGP4 hadde en anti-koagulerende effekt på plasma til atlantisk laks [17]. Da KD av dette proteinet ikke hadde noe effekt på vekst og koagulering av blod i lusens tarm, indikerer dette at proteinet har sin viktigste funksjon i å forhindre koagulering i selve såret.

I tillegg til disse relativt små proteinene uten kjente proteindomener ble det også bekreftet uttrykking av 10 gener som koder for enzymer i lakselusens spyttkjertel. Dette var en apyrase (LsLGAp1), et chymotrypsin (LsLGCT1) og åtte astaciner (LsLGA1-8). Både trypsiner og astaciner er metalloproteinaser som spalter og bryter ned proteiner, mens apyraser bryter ned nukleotider som ATP, ADP og AMP. I andre blodsugende organismer som mygg og flått kan både apyraser og trypsiner bli sekretet for å inhibere blodkoagulasjonen, trypsiner ved å degradere koagulasjonsfaktorer og apyraser ved å bryte ned ADP da det binder seg til og får blodplater til å danne et koagel [19]. Men verken LsLGAp1 og LsLGCT1 var utelukkende uttrykt i de blodspisende lusestadiene slik som LsLGP4, noe som indikerer at disse to enzymene har andre funksjoner. Da LsLGCT1-KD lus induiserte en høyere inflammatorisk respons enn kontrollus, ble en anti-inflammatorisk funksjon foreslått for LsLGCT1, enten direkte muligens ved å spalte pro-inflammatoriske faktorer, eller indirekte ved å f.eks. interferere med sårhealingsresponsen. LsLGAp1-KD lus induiserte ingen endringer i immunresponsen, men var da også et relativt lavt uttrykt gen, slik at den biologiske betydningen av å nedregulere dette alene er muligens ikke mulig å detektere. Det vil imidlertid bli jobbet videre med å analysere hvilke nukleotider denne apyrasen bryter ned, da dette vil gi oss videre indikasjoner på enzymets funksjon.

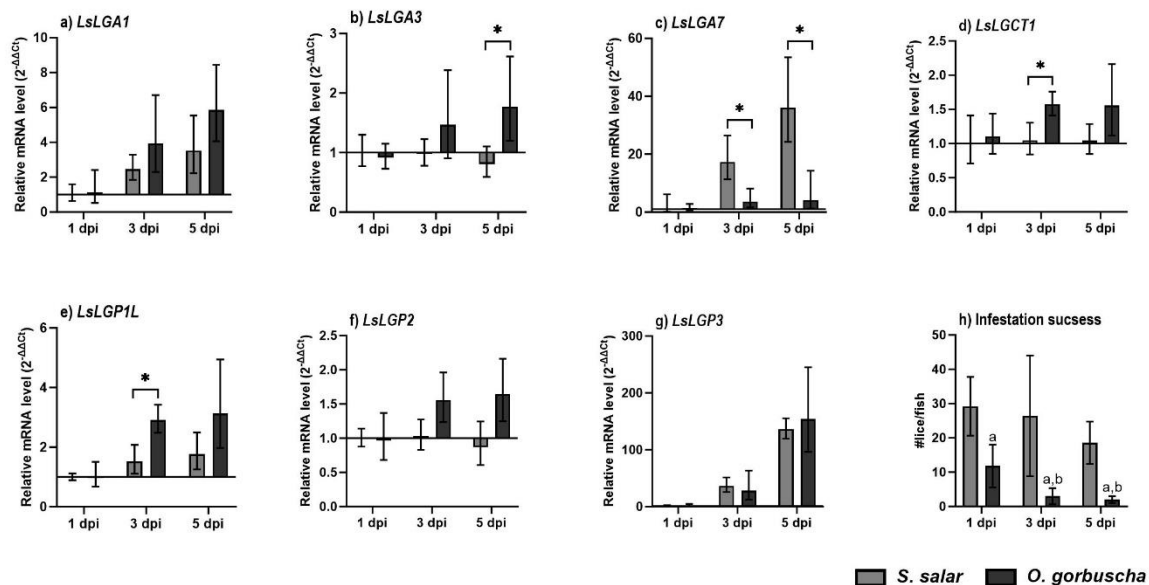
Teg 1-kjertler er den mest tallrike kjerteltypen funnet i lakselus, da den finnes i alle lusens kroppsdeler og livsstadier, og antas å skille ut et slimlag som dekker lusen med anti-mikrobielle faktorer som hindrer begroing av lusens tegument [8, 20-22]. I teg1 kjertelen uttrykkes i hvert fall ett og muligens flere astaciner, som her er antatt å ha en anti-mikrobiell effekt [8]. Da flere lignende astaciner også ble funnet i spyttkjertelen, er det nærliggende å tenke at også disse har en slik funksjon. Det vil ikke bare være en fordel å holde den mikrobielle veksten på luseintegumentet på et minimum, det vil også være fordelaktig å redusere risikoen for sekundære infeksjoner i huden der lusen påfører verten skader. Dette er trolig viktig for å opprettholde et langt og sunt vert-parasittforhold. Den høye ekspansjonen av astacin-gener i lakselusgenomet støtter en slik hypotese, ettersom astacinene vil måtte feste seg til og ødelegge ulike typer mikroorganismer som sannsynligvis krever et arsenal av litt forskjellige bindings- og enzymspesifisiteter. To av astacinene som var uttrykt av spyttkjertelen, LsLGA1 og 4, viste seg også å være uttrykt av en spesiell subtype av teg 1 kjertler som har relativt store porer rett i nærheten av der de spisse tuppene til lusens andre antennen trenger inn i laksens hud [4, 8]. Dermed kan en bredere distribusjon av astaciner enn de andre spyttkjertelgenene forventes under lusene, noe som gir et større potensial for antimikrobiell støtte. Det bør imidlertid understrekes at andre funksjoner ikke bør utelukkes, og selv om analysene utført i ModuLus antyder at astacinene ikke har en immundempende rolle, kan KD-effekter maskeres dersom astacinene har komplementære immundempende funksjoner eller degraderer faktorer som ikke har en direkte effekt på genene analysert i immunstudiene. For å konkludere angående deres funksjon er det nødvendig å utføre funksjonelle studier ved å bruke rekombinante LsLGAer som analyserer ytterligere immunfunksjoner, nevroimmun signalisering og celleproliferasjon, i tillegg til å adressere vertsmikrobiomet i lignende KD-studier som presentert her. Dette kunne ikke bli utført i ModuLus da proteinene ikke lot seg produsere rekombinant i de systemene tilgjengelig i prosjektet. Dette jobbes det imidlertid videre med.

Kopepodittstadiet er den mest sårbare fasen under lakselusens parasittiske fase, da den ikke er like sterkt knyttet til laksen som i de påfølgende stadiene som enten festes via et frontalfilament (chalinus) eller en kombinasjon av vakuum under en sugekoppformet overkropp og den andre antennen som stikkes ned i vertens hud som et anker (pre-adult og adult) [23]. Kopepodittene fester seg også ved å begrave den andre antennen ned i vertens hud og forårsaker her overflatiske sår [24], og uten så mange andre festepunkt er de mer sårbare for løsrivelse som følge av fiskens antiluseadferd og immunrespons. Derfor er det viktig å dempe vertsresponser umiddelbart etter etablering, og det kan derfor være avgjørende for kopepoditten å produsere spyttkjertelsekretet allerede før de treffer på en vert. I tråd med dette ble det i ModuLus funnet at de fleste spyttkjertelgenene ble uttrykt i planktoniske kopepoditter, og ikke etter at lusen hadde etablert seg på en laks slik som først trodd (Fig 4a). Vi fant at spyttkjertelsekretet bli produsert allerede rundt 1-2 dager etter skallskifte (9 °C), og økte ytterligere til den flatet ut ved rundt 4 dpm, og nesten alle gener viste ingen påfølgende økning i ekspresjon selv om lusen fikk infisere en laks (Fig 4b,c). I andre studier har lakselusen vist seg å trenge 1-2 dagers modning ved 10 °C etter skallskifte til kopepoditt før de blir infektive [25], og aktiveringen av spyttkjertelsekretproduksjonen ser dermed ut til å være en del av denne modningen. Videre etter at lusen har infisert en fisk, opprettholdes nivåene av de fleste spyttkjertelgenene i den første etableringsfasen før de synker litt, mens noen få oppreguleres som en respons på at lusen har funnet en vert (Fig 4e,f). Og videre i det adulte stadiet når lusen øker i størrelse og spiser mere, ser spyttkjertelekspressjonen også ut til å øke (Fig 4a), i tråd med at immunresponsen ser ut til å være mere dempet mot adulte lus enn i foregående stadier [2, 7]. Dessuten ble ingen av spyttkjertelgenene funnet å være regulert av sult. Dette understreker ytterligere viktigheten av spyttkjertelsekretet, da en seleksjon mot lus som sparer energi ved å nedregulere spyttproduksjonen hvis den faller av verten ikke har oppstått gjennom evolusjon. I stedet ser det ut til at produksjonen av spyttet opprettholdes i tilfelle lusene kan reetablere seg på en vert, hvor en umiddelbar immundemping trolig er viktig.



Figur 4. Viser det relative mRNA nivået av spyttkjertelgenene $\pm$ SD i a) alle lusestadiene. Her var de planktoniske copepodittene mest sannsynlig samlet 1 dag etter klekking, slik at man ser at mRNA nivået går opp i parasittiske copepoditter. mRNA nivået til mange av genene er høy i den første etableringsfasen, og noen går opp igjen i adulte lus. b og d) viser henholdsvis mRNA nivået til to gen, *Lepeophtheirus salmonis* labial gland protein (LsLGP) 2 og 3, i nauplius I og II samt i planktoniske copepoditter samlet 4 dager etter klekking (dpm) og ved en rekke tidspunkt rett etter de har etablert seg på en laks (dager post infeksjon, dpi). Man kan se at for *LsLGP2* starter ekspresjonen allerede i de planktoniske copepodittene og viser ikke en spesielt stor økning etter dette, mens *LsLGP3* uttrykkes etter at lusen har etablert seg på en fisk. De fleste gen følger mønsteret til *LsLGP2*, mens *LsLGP3* er et av to gener som oppreguleres rett etter de har entret den parasittiske fasen. c og d) viser forskjellen mellom planktoniske og parasittiske copepoditter som har den samme relative alderen. For *LsLGP2* kan man se at nivået stiger jevnt og trutt til rundt 4 dpm, og mRNA nivået øker ikke selv om copepoditten er på fisk. Dette ser man for de fleste av genene som er uttrykt i copepoditter. *LsLGP3* oppreguleres som følge av at lusen får sette seg på en fisk, og er ikke oppregulert i planktoniske copepoditter med samme relative alder.

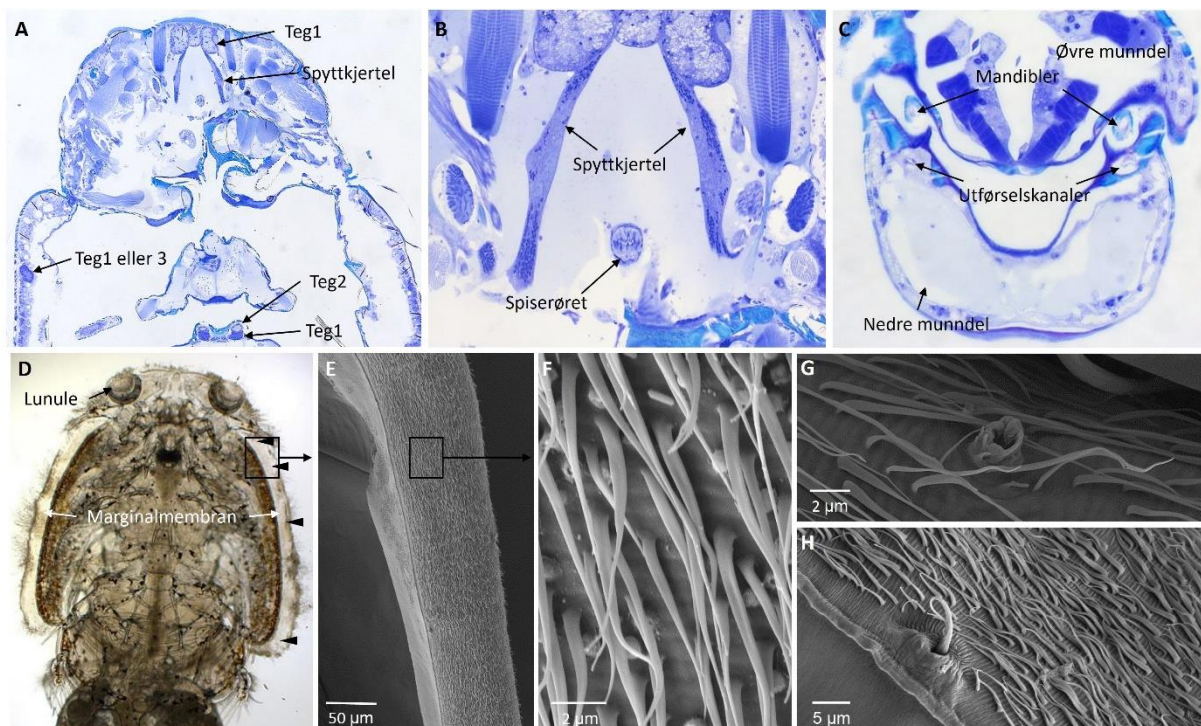
Lakselusen klarer ikke å overleve på alle typer laksefisk, og spesielt pukkellaks og coho-laks er motstandsdyktige mot lus [26]. Hvorfor disse artene er resistente gjøres det nå mye forskning på, da dette kan brukes inn mot å lage en resistent atlantisk laks enten ved avl eller genmodifisering. Det er derfor av interesse å analysere om spyttkjertelgenene produseres i lus som infiserer resistente arter, som et første skritt mot å undersøke om lakselusens spytt er funksjonelt i møte med huden til resistente arter. Og siden det viste seg at de fleste spyttkjertelgenene er produsert allerede før lakselusen møter en vert, var det ikke overraskende å finne at de fleste spyttkjertelgenene ble uttrykt på lik linje i lus som infiserte pukkellaks sammenlignet med lus som infiserte atlantisk laks (Fig 5). Mange gen viste imidlertid noe høyere transkripsjonsnivå hos lus på pukkellaks enn de som hadde etablert seg på atlantisk laks. Dette kan være en kompenserende effekt til et fiendtlig miljø, eller kanskje har lusene som faktisk klarer å holde seg på en pukkellaks i fem dager et noe høyere transkripsjonsnivå av spyttkjertelgen sammenlignet med gjennomsnittsnivået i lus som etablerer seg på atlantisk laks. Antallet lus som klarte å holde seg på pukkellaksen gikk markant ned mellom dag 1 og 3 (Fig 5h), noe som understøtter dette. Videre så vi at uttrykket av et av astacingenene, *LsLGA7*, ikke ble induisert i lus som infiserte pukkellaks (Fig 5c). Slik som ekspresjonen av *LsLGP3* blir *LsLGA7*-ekspresjon oppregulert etter at lusen har etablert seg på en vert, og dette skjedde altså ikke i lus som etablerte seg på pukkellaks. *LsLGP3* ble imidlertid uttrykt på samme nivå i lus som infiserte både atlantisk og pukkellaks. Dermed er signalet som aktiverer gennuttrykket til disse to genene forskjellig, og peker videre i retning av ulike funksjoner. Og alt i alt viste dette at nivået av de fleste spyttkjertelgenene opprettholdes når lus infiserer pukkellaks, og videre analyse bør gjøres for å se om spyttet faktisk virker slik det skal når det møter pukkellaksens hud. Dette blir det forsket videre på, da en manglende evne til å dempe pukkellaksens immunrespons kan forklare dens resistentmekanisme og gi oss verdifulle hint til målgene for videre immunbaserte behandlingsmetoder.



Figur 5. a-g) Relativt mRNA nivå $\pm$ SD i lus som smitter atlantis laks (*S. salar*) og pukkellaks (*O. gorbuscha*), 1, 3 og 5 dager etter infestasjon (dpi). Signifikant forskjell ($p < 0,05$) er angitt med *. h) gjennomsnittlig antall lus per fisk $\pm$ SD. En a angir statistisk signifikans mellom atlantisk og pukkellaks, mens b angir signifikant forskjell mellom de ulike tidspunktene.

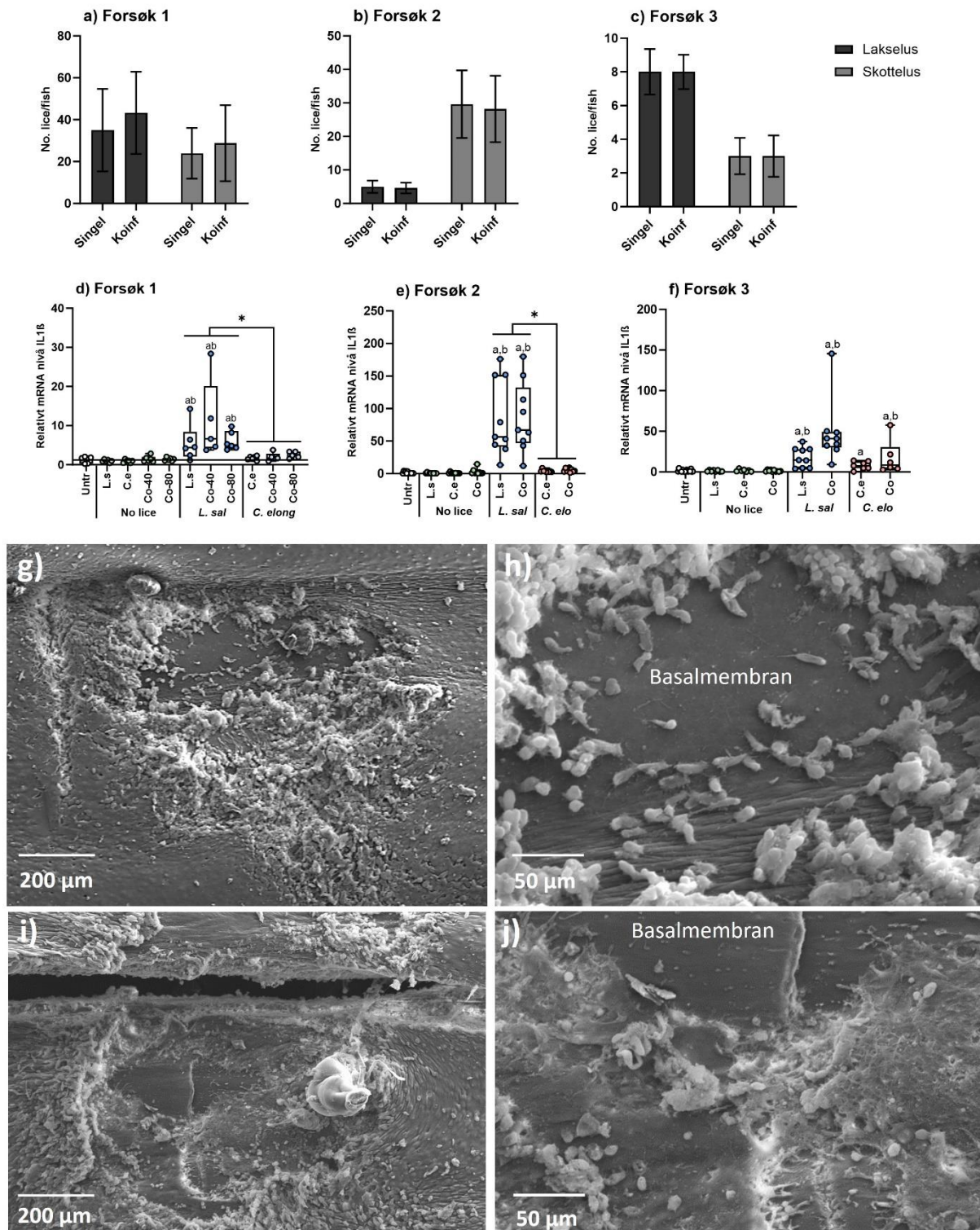
5.2 Sammenligning mellom spesialisten lakselus og generalisten skottelus

Det første som ble gjort for å sammenligne generalisten med spesialisten var å undersøke om de samme kjerteltypene som funnet i lakselus også kunne identifiseres i skottelus. Både teg1 og 2 kjertlene kunne lett identifiseres, det samme gjaldt spyttkjertelen (Fig 6a-c). Spyttkjertelen viste seg å ha et noe annerledes utseende i skottelus, men har både samme plassering som lakselusus spyttkjertel samt at utførselskanalene også i skottelus går langt ut i den nedre munndelen og inn i munntebulen langt nede ved mandibeltennene. Lusene bruker disse mandibeltennene for å skrape deler av vertens hud inn i munnen [27]. Det er derfor sannsynlig at spyttet til skottelus blir avsatt direkte på vertens hud og har sin funksjon her, slik som trodd i lakselus. For å identifisere teg 3 kjertler i skottelus måtte vi analysere skottelusens marginalmembran for å se om det samme systemet av innerverte hår og utførselskanaler kunne sees her. Marginalmembranen både til lakselus og skottelus er viktig for at de skal greie å skape et vakuum under overkroppen sin noe som gjør at de kan sitte fast til verten uten å bruke masse energi. Og i denne marginalmembranen går altså utførselskanalene til teg3 kjertlene til lakselus ut, og deres produkt blir dermed avsatt direkte på vertens hud [8]. Det samme ble funnet i skottelus, da bare fire kanaler på hver side mens det i lakselus er funnet 5 (Fig 6 d-h). En annen interessant forskjell mellom disse to lusene var også at skottelusens marginalmembran viste seg å være dekket av masse små utvekster. Dette visste vi fra før av at ikke er funnet på lakselusus marginalmembran, men vi kunne heller ikke se dette i to andre lusearter som er nærmere beslektet med skottelus, *C. brevipedis* og *C. centrodonti*, og som da også har de distinkte lunulene framme på overkroppen som hjelper de å skape dette vakuemet mellom overkropp og vert. Disse to caligidene er slik som lakselus spesialister, slik at det da er nærliggende å tro at disse utvekstene har blitt utviklet som følge av den generelle livsstilen til skottelus som kan infisere mange forskjellige fiskearter. Men nøyaktig hva disse utvekstene har å si for skottelusens festemekanisme er usikkert, dog det kan muligens gi et bedre mekanisk feste inn i vertens slim som forhindrer den å skli av fisken. Dette vil i så fall være en fordel for en generalist da forskjellige fiskearter vil ha forskjellige hudtyper og forskjeller i slimets konsistens og innhold.



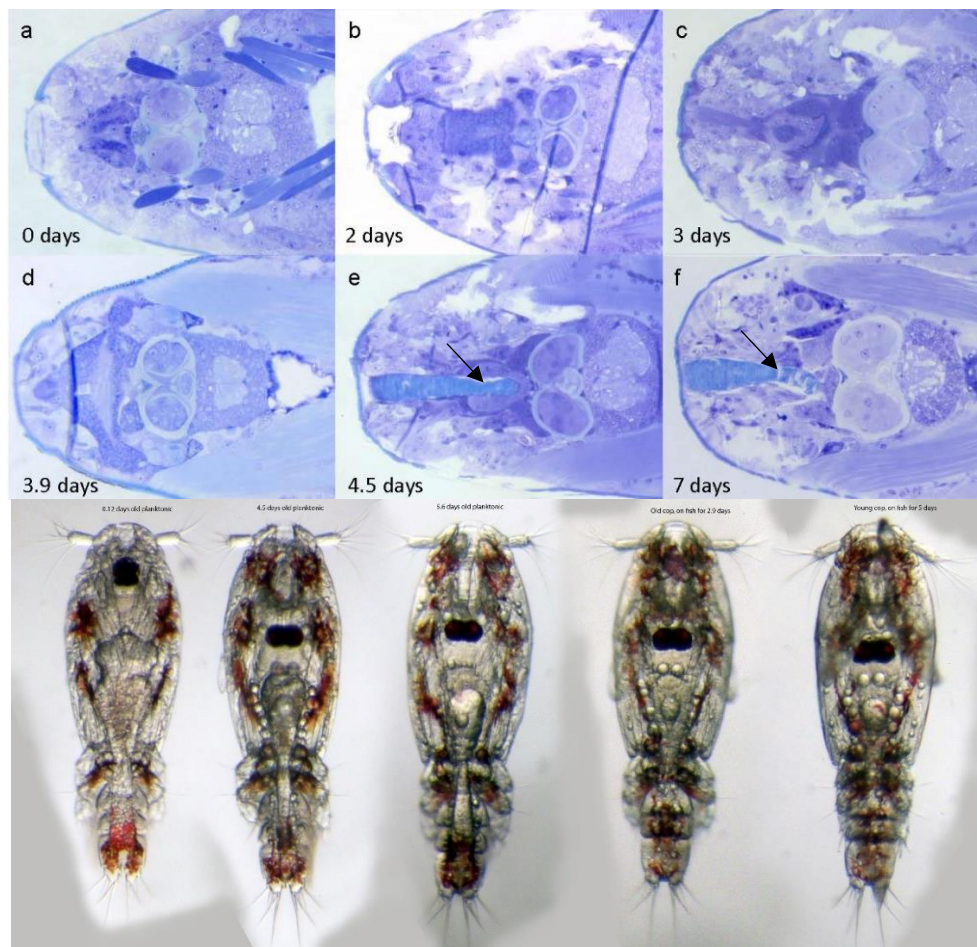
Figur 6. A) Viser en oversikt over skottelusens overkropp, der teg 1, 2 og muligens en teg3 kjertel kan sees i tillegg til de to spyttkjertlene. B) Viser en større forstørrelse av lakselusens spyttkjertel der spiserøret kan sees mellom, noe som indikerer at de har samme plassering som lakselusens spyttkjertler. C) Viser et tverrsnitt av skottelusens munntubule. Her kan man på venstre side se spyttkjertelens utførselskanal i selve den nedre munndelen, mens det på høyre side er på tur ut gjennom kutikula i nærheten av mandiblene. Også dette er likt som det man ser i lakselus, og indikerer at spyttet som sekreses av spyttkjertlene blir avsatt på selve mandiblene og dermed på vertens hud når lusene spiser av epidermisen her. D) Oversiktsbilde av undersiden av en skottelus. Her er lunuler og marginalmembranen markert, samt plasseringen til de fire porene funnet i skottelusens marginalmembran er markert med pilhoder. F) Viser en høyere forstørrelse av utvektene som dekker hele skottelusens marginalmembran. Disse ligger alle i samme retning og peker posteriort, altså nedover. G) Viser en teg3 pore i marginalmembranen. H) Viser en innerverte sensilla som sees i overgangen mellom kropp og marginalmembranen i nærheten av der teg3 poren går ut. I lakselus følger nerven og kjertelen hverandre bakover i kroppen før de går ut mot marginalmembranen, men det er uvisst om selve kjertelen er forbundet med nerver og kan frigi sekret f.eks når lusene beveger seg over huden til verten.

Vi gikk så videre med koinfestasjonsstudiene, for å analysere om immunresponsen mot disse to luseartene var forskjellige og om de kunne påvirke hverandres infestasjonssuksess. I forkant ble det utarbeidet en smittemetode for skottelus i enkeltkar, da det vist seg nødvendig. Ved å la skottelusen komme inn med vannet i karet der laksen sto i strømmen istedenfor å tilføre lusene i vannsjiktet over fisken, fikk vi en mye bedre smittesuksess og de planlagte forsøkene kunne så utføres. Og under de gitte forhold som var i disse studiene ble verken infestasjonssuksessen eller immunresponsen mot noen av lusene påvirket av koinfestasjon (Fig 7a-f). Vi så imidlertid at immunresponsen mot skottelusen var lavere en responsen mot lakselus, selv når adulte skottelus ble sammenlignet med chalimus II lakselus var responsen noe mere dempet mot skottelus. Vi sammenlignet derfor skadene lakselus og skottelus påfører fisken etter 12 dager når de var henholdsvis chalimus II og IV (Fig 7 g-j). Begge luseartene påførte laksen hovedsakelig bare erosjoner, det vil si overfladiske sår som ikke bryter ned til lærhuden, og disse sårene så ut til å ha en noenlunde lik omkrets. Dette til tross for at skottelusen er noe mindre, og er dermed ventet å lage litt mindre sår. Dette kunne ha forklart den lavere immunresponsen, men da sårene så noenlunde like ut, er det mere nærliggende å tro at skottelusen er en mere potent immunmodulator enn lakselus når de infiserer laks. Dette vil muligens være en nødvendighet for å kunne være en generalist som kan infisere og modulere immunresponsen til en rekke fiskearter.



Figur 7. a-c) Viser antall lus/fisk $\pm$ SD i forsøkene, der ingen signifikant forskjell ble funnet mellom fisk infisert med bare en luseart (singel) eller begge luseartene samtidig (koinf). d-f) Viser mRNA nivået til interleukin 1 beta (IL1 β) i laks som var ubehandlet (untr) eller smittet med lus, enten lakselus (L.s) eller skottelus (C.e) eller begge (Co). Responsen var lokal, altså rett under lusen, og det ble ikke sett signifikante forskjeller mellom singel og koinfisert fisk. Immunresponsen var imidlertid høyere i respons til lakselus enn til skottelus, spesielt i forsøk 1 og 2 der chalimus IV skottelus ble sammenlignet med henholdsvis chalimus II og adulte lakselus. g-j) Viser skanning elektronmikroskopibilder (SEM) av sårene påført av lakselus chalimus II (g, h) og skottelus chalimus IV (i, j) 12 dager etter smitte. Begge ser ut til å kun påføre overfladiske sår som i all hovedsak ikke bryter igjennom basalmembranen i særlig stor grad. Omkretsen av såret er også noenlunde like.

For å komme til bunns i om skottelusen faktisk er flinkere til å dempe laksens immunrespons, så var det sentralt å se videre på spyttkjertelproteinene til skottelusen og sammenligne disse med hva lakselusen så ut til å spytte ut på laksen. Men etter hvert som vi jobbet med skottelusen ble det klart at den tidlige utviklingen av skottelusen på fisken avviker fra det man ser i lakselusen, og det var nødvendig å først få klarhet i dette før vi kunne gjøre videre KD studier med spyttkjertelproteiner for å sammenligne vertsresponsene til disse to lusene. Vi fant da ut at skottelusens kopepoditter utvikler seg og bygger hele frontalfilamentet sitt basert på maternelle resurser fra egget, uansett om den er planktonisk eller parasittisk på en vert. Tre faser ble identifisert i skotteluskopepodittens utvikling: **Fase 1:** Øynene migrerer raskt bakover og det etableres nøkkelfaktorer for at kopepoditten skal bli infektiv. Når denne fasen er over viser kopepoditten interesse for verten, og er fullt infektiv. Grupper av celler som skal danne filamentet utvikles foran øynene, men filamentet er ikke synlig enda (Fig 8 a,b). På 9 °C varer fase 1 rundt 2 dager.



Figur 8. Histologiske snitt av planktoniske skotteluskopepoditter med økende alder (a-f). Piler angir frontalfilamentet i e og f. Nedre seksjon viser bilder av skotteluskopepoditter, fra ung planktonisk kopepoditt til gammel kopepoditt like før skallskifte til chalimus på verten. Bildene fra venstre til høyre viser kopepoditter 0.12, 4.5, og 5.6 dager i planktonisk fase, og 2.9 og 5 dager gammel kopepoditt som har vært på en laks.

Fase 2: Kopepoditten er nå blitt infektiv men den er enda ikke ferdig utviklet. Øynene migrerer fortsatt bakover (Fig. 8), og frontalfilamentet blir synlig og dannes ferdig mot slutten av fasen som varer totalt 3 dager ved 9 grader (Fig 8 e). Veksten er uavhengig av om den sitter på verten eller befinner seg i plankton. Sitter den på verten spiser den antagelig ikke av vertens hud, noe som vil gi en lavere immunrespons enn det vi har målt mot lakselusen i denne fasen. **Fase 3:** Parasittisk fase, varer i to dager ved 9 °C der en innvendig utvikling forbereder skallskiftet til chalimus 1. Hva denne utviklingen består

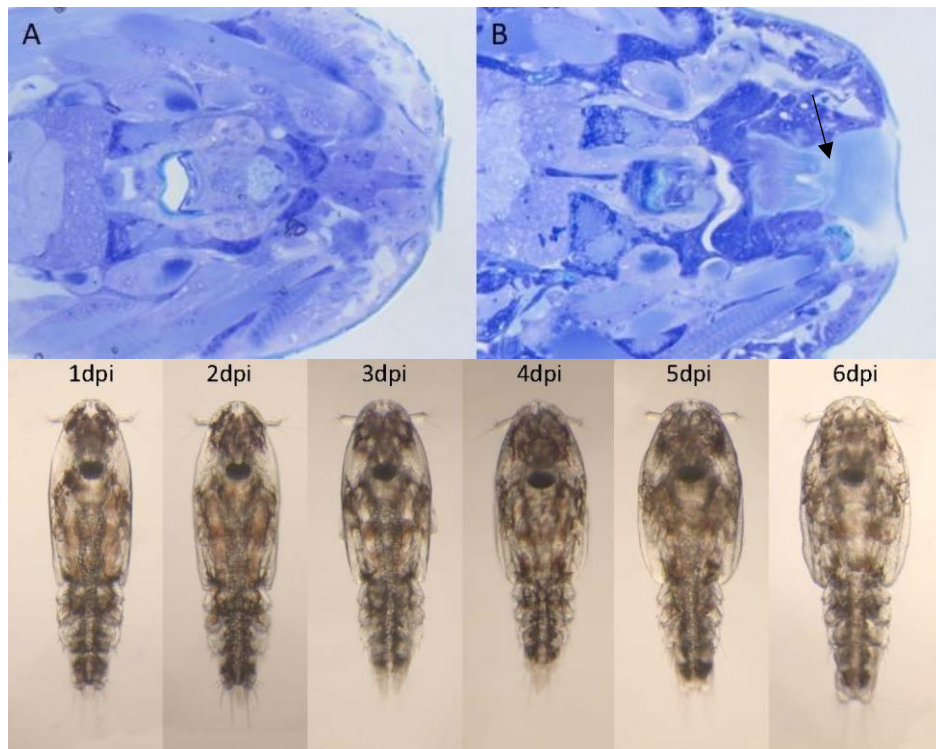
i vet vi ikke. Kopepoditten spiser antageligvis litt av verten, men kopepoditten vokser ikke, og like før de skifter skall til chalimus 1 er både størrelse og utseende fremdeles identisk likt med planktoniske kopepoditter på samme alder.

Lakselusens planktoniske utvikling ble så studert nærmere for å sammenligne disse to slektene, og for å se om lakselusen utvikler seg gjennom tilsvarende faser. Også i lakselusen ser vi at øynene vandrer bakover kort tid etter skallskiftet, men her er utviklingen fullført i løpet av 3 dager ved 9 °C (Fig. 9). Analyse av tidligere publisert infeksjonsdata indikerer at kopepodittene er blitt fullt infektive ved fullført øyemigrasjon, og dette sammenfaller med da vi ser en økning i spyttkjertelproteiner (Fig 4c). Dermed har vi en morfologisk markør for når fase 1 utviklingen er fullført i lakselus.



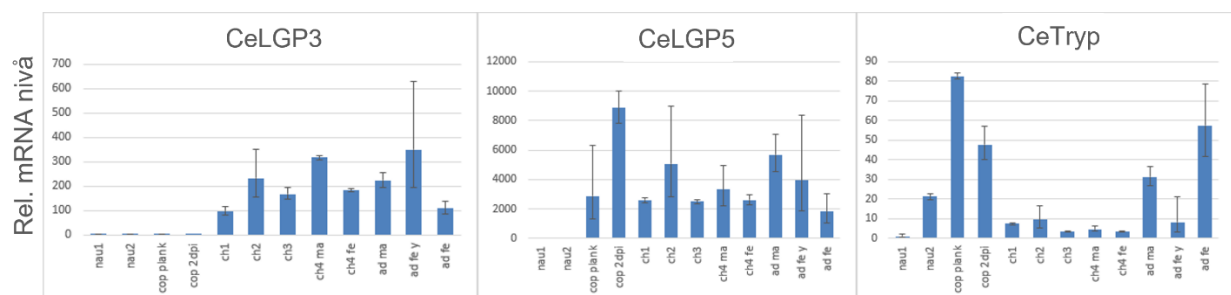
Figur 9. Planktoniske lakselus kopepoditter. Fra høyre: 2 timer gammel, 0.8 dager, 1.06 dager og 1.8 dager gammel.

Lakselusen ser imidlertid ikke ut til å ha noen fase 2 utvikling siden den planktoniske utviklingen stanser når fase 1 er over. Dette ser vi og i histologiske snitt som viser at lakselusen ikke utvikler frontalfilament i den planktoniske fasen (Fig 10 A,B). Dette dannes ca. 4 dager etter at lakselusen har satt seg på en vert ved 9 °C, og er basert på vertesressurser, og ikke materielle ressurser slik som hos skottelusen. Og i motsetning til skottelusen, så vokser lakselusen betydelig etter den har blitt parasittisk (Fig. 10), og i motsetning til skottelusen induserer den ganske kjapt synlige vertsreaksjoner i huden til verten (pigmentflekker) samt at man kan måle en økning i uttrykket av pro-inflammatoriske gen lokalt under lusen [7]. På ørret er det også vist at lakselus kopepoditten spiser av epidermis [2]. Det synes dermed å være grunnleggende biologiske forskjeller mellom skottelusen og lakselusen med hensyn til hvilke evolusjonære strategier de har for å etablere seg på verten og overleve frem til første skallskifte. Skottelusens kopepoditter bruker viktige ressurser fra egget til å bygge frontalfilamentet slik at den kan minimere spising og oppholdstid på verten før første skallskifte. Dette på bekostning av planktonisk overlevelsestid og dermed sjansen til å møte en vert. Hos lakselusen er det motsatte tilfelle, de utvikler seg minimalt i plankton og bruker vertesressurser på videre vekst og utvikling frem mot første skallskifte. At vi nå har nøstet opp i dette muliggjør komparative studier som kan øke vår forståelse av hvilke mekanismer som modulerer vert-parasitt interaksjoner hos disse to lusene. Dette gjør også at det potensielt kan være knyttet noe usikkerhet til forsøk 1 og 2 av koinfeksjonstudiene beskrevet over, men da prøvene ble tatt hele 12 dager etter smitte anser vi denne usikkerheten som minimal. Takket være ny kunnskap om den tidlige utviklingen har vi kunnet gjennomføre eksperimenter der vi har sett nærmere på skottelusens spyttkjertelgen på en skikkelig måte, uten artefakter som kunne vært tilført om vi hadde brukt skottelus-kopepoditter fra fase 2, evt en blanding mellom fase 2 og 3 kopepoditter.



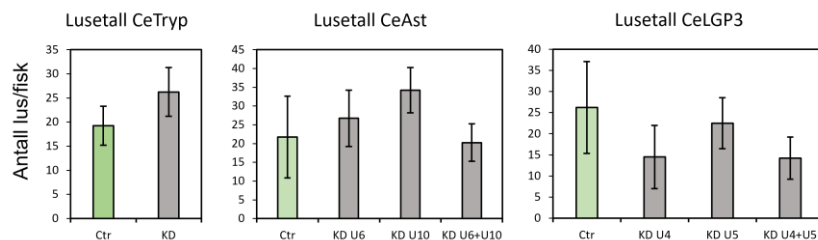
Figur 10. Lakselus-kopepoditt på fisken (fase 3). A) 1 dag etter smitte: dannelsen av frontalfilamentet har ikke startet. B) dannelsen av filamentet er i gang og er synlig 4 dager etter smitte (pil). Nederst: Lakselus kopepoditter på laks fra 1-6 dpi (dager post infeksjon). I løpet av perioden de er på fisken vokser kopepoditten gjennomsnittlig 18 % i bredden og 38 % i lengden.

Ved å analysere transkriptomet til skottelusens spyttkjertler, har vi i ModuLus greid å identifisere seks gener som er uttrykt i spyttkjertelen. De identifiserte genene er i hovedsak ortologe gener til lakselusens spyttkjertelgen, da LGP3 (2 stk), astaciner (2 stk) og et trypsin (1 stk). Et gen uten kjente domener som ikke er funnet i lakselus har også blitt identifisert (CeLGP5). De bekreftede genene er fullsekvensert, og vi har analysert ekspresjonen av genene under skottelusens utvikling. I forkant av dette, har vi imidlertid identifisert og analysert en rekke referansegener, det vil si gener som er stabilt uttrykt gjennom skottelusens livssyklus, for å muliggjøre en sikker qPCR analyse av skottelusens utviklingsstadier [28]. To av genene herifra ble så brukt for å normalisere ekspresjonsdataen på de forskjellige spyttkjertelgenene. Og man ser her en litt lignende ekspresjon som i lakselus (Fig 11), med en økning i ekspresjon i de parasittiske stadiene, der noen ser ut til å være mindre viktig i de fastsittende chalimus stadiene.



Figur 11. Ekspresjonsnivå av skottelusens spyttkjertelgen i forskjellige utviklingsstadier angitt som relativt mRNA nivå $\pm$ SD.

Vi har også utført KD-studier med påfølgende analyser av immunresponser, der vi har nedregulert til sammen 5 av genene vi har identifisert i spyttkjertelen; to LGP3 ortologer, to astaciner og et trypsin. Verken smittesuksessen (Fig 12) eller immunresponsen mot disse kopepodittene viste noen signifikante forskjeller, dog en reduksjon i antall lus etter KD ble sett i de gruppene der den ene av de to LGP3 ortologen ble nedregulert, altså det genet som vi i lakselus har vist kan indukere apoptose i immunceller (Fig 3). Ingen av LsLGP3-KD studiene i lakselus viste en reduksjon i antall lus, og dette gjaldt også da de andre spyttkjertelgenene fra lakselus ble nedregulert. Dette tyder på at lakselusen er avhengig av at flere spyttkjertelproteiner virker sammen og har ikke et nøkkelprotein som er viktigere enn alle andre. Da skottelusetallet bare ble marginalt lavere ved CeLGP3 KD, indikerer dette at det er en lignende kollektiv effekt av spyttet til skottelus også. I videre utvikling av immunbaserte behandlingsmetoder er dette et verdifullt resultat å ta med seg videre.



Figur 12. Viser lusetallet per fisk (N=4) ved avslutning av RNA interferens forsøk. Her har vi nedregulert et trypsin (CeTryp), to astaciner (CeAst; U6 og U10) og to LGP3 ortologer (CeLGP3; U4 og U5). De to sistnevnte ble nedregulert både hver for seg og i kombinasjon (U6+U10 og U4+U5).

5.3 Vaksineutvikling: veien videre

Selv om resultatene oppnådd i ModuLus på sikt vil være viktig generelt i utviklingen av immunbaserte behandlingsstrategier, er disse resultatene av spesiell interesse med tanke på vaksineutvikling. Forut for ModuLus har det vært en rekke forsøk på å lage lusevaksiner, da spesielt ved bruk av tarmantigener. Ingen er per dags dato kommersialisert noe som indikerer at disse antigenene nok ikke er de beste. Dette ville vi forsøke å se nærmere på i ModuLus ved å analysere hvor lenge antistoffer og andre immunkomponenter/celler var virksomme i lusens tarm. I forhold til en vaksine er antistoffer av spesiell interesse, og vi startet dermed der. Vi greide imidlertid ikke å detektere lakseantistoffer i tarminnholdet til lus med en høy grad av blodfylling i tarmlumen, verken med western blott, ELISA eller proteomikk. I prøvene ble det generelt funnet en rekke lusetrysiner og andre proteiner involvert i fordøyelse, slik at denne uten tvil foregår i lusens tarmlumen. Lakseproteinene som ble identifisert inkluderer blant annet en rekke komplement- og koagulasjonsfaktorer, MHC I og II, IgGfC-bindende protein og et fåtalls andre immunrelaterte proteiner, samt muciner, hemoglobin og heme-bindende proteiner samt noen epitel spesifikke proteiner da både slim, blod og hud er en del av lakselusens diett. Da disse innledende analysene indikerte at enten var konsentrasjonen av lakseantistoffer i lusens tarminnhold under deteksjonsgrensen, eller at antistoffene veldig raskt blir brutt ned i tarmlumen, gikk vi ikke videre med å analysere nedbrytningen av andre immunkomponenter. Det kan imidlertid nevnes at i dette arbeidet har vi funnet ut at adulte lakselusen bruker ca et døgn på å lysere de fleste blodcellene etter et måltid, samt at lusen bruker ca to dager før den drikker blod igjen etter en periode av verten.

Hvis det faktisk er slik at antistoffene som ender opp i lusens tarm relativt raskt blir brutt ned vil en annen vaksinestrategi være nødvendig. Og da vi i ModuLus har funnet at mange proteinene fra spyttkjertelen har immundempende funksjoner, enten direkte eller indirekte, taler dette for å teste

disse ut som vaksineantigen. En slik vaksine vil basere seg på induksjon og sekresjon av antistoffer ut i laksens slim som her vil binde seg til og inhibere virkningen til de immundempende komponentene i lakselusens spytt. Å inhibere de immundempende spyttkjertelproteinene vil forhåpentligvis gjøre laksen i stand til å sette i gang en adekvat immunrespons mot lakselusen, slik at den vil bli helt eller delvis motstandsdyktig mot lakselusinfestasjoner. Det at lusen velger å bruke energi på å produsere spyttkjertelsekretet i forkant av at den har etablert seg på en vert samt at den ikke nedregulerer spyttproduksjonen selv om den faller av verten viser viktigheten av dette sekretet, og at de vil være høyst aktuelle vaksinekandidater. De ontogenetiske studiene viser dessuten at spyttkjertelproteinene er viktige i den første etableringsfasen når lusen er på sitt mest sårbare og antagelig enklest å angripe med en vaksine. KD studiene har imidlertid vist at flere spyttkjertelgenen er nødt til å bli inkludert i en slik vaksine, da infestasjonssuksessen var tilnærmet lik mellom KD og kontrollus i alle forsøk. Og det at vi nå vet nøyaktig hvilke gener som er høyt uttrykt i den tidlige fasen samtidig som vi har noe informasjon om deres funksjon, gjør at vi enklere kan velge ut den riktige kombinasjonen av disse spyttkjertelgenene for uttesting. Da proteinene virker immundempende vil de imidlertid ikke være ideelt for laksen og få injisert *in vivo*, da man kan ende opp med en immunsupprimert fisk eller i beste fall bare en lav vaksineeffekt. Fullsekvensering av alle genene har derimot identifisert viktige aminosyrer som kan muteres for å gjøre de ikke-funksjonell. Her har dessuten arbeidet med skottelus gjort prosessen med å mutere proteinene uten kjente enzymdomener letter, da vi her mangler kunnskap om hvilken del av proteinet som vil være viktig f. eks for binding til immunkomponenter eller celler. Områder på genene som er konserverte mellom lakselus og skottelus har antagelig høyere sannsynlighet for å være funksjonelt viktig, og ved å sammenligne disse har vi nå blant annet funnet ut hvilke aminosyrer i LsLGP3 som må muteres for å få et protein som ikke dreper immunceller men som forhåpentligvis har samme form som villtype LsLGP3. Alt i alt har ModuLus gjort at vi nå stiller sterkere i utviklingen av en vaksine basert på lakselusens spytt, noe som er tatt videre i to nye FHF prosjekt, SaliVax (prosjektnummer [901760](#)) og SaliFilaVax (prosjektnummer [901868](#)). Prosjektet har dessuten anvendt skottelus i komparative studier for å øke forståelsen av laks-lakselus interaksjonen, med dette har vi også belyst skottelusens egen strategi for å parasittere laksen. Denne kunnskapen kan bidra til å avdekke skottelusvaksinekandidater, i tillegg til potensielt å identifisere kandidater felles for begge luseartene.

6. Hovedfunn

- Hele 15 spyttkjertelgenen er nå identifisert og karakterisert i lakselus, der flere ser ut til å være viktig i vert-parasitt interaksjonen ved å indirekte eller direkte modulere immunresponser
- En rekke aktuelle vaksinekandidater, spesielt da fra lakselus, men også for skottelus er dermed identifisert
- Ny kunnskap om den første etableringsfasen til både skottelus og lakselus vil gjøre at fremtidig forskning på disse to artenes vert-parasitt interaksjon kan bli utført med større nøyaktighet og uten utviklingsrelaterte artefakter

7. Referanser

1. Bron, J.E., et al., *The settlement and attachment of early stages of the salmon louse, Lepeophtheirus salmonis (Copepoda, Caligidae) on the salmon host, Salmo salar*. J Zool, 1991. **224**: p. 201-212.
2. Dalvin, S., et al., *Rainbow trout Oncorhynchus mykiss skin responses to salmon louse Lepeophtheirus salmonis: From copepodid to adult stage*. Fish Shellfish Immunol, 2020. **103**: p. 200-210.
3. Heggland, E.I., et al., *Host gill attachment enables blood-feeding by the salmon louse (Lepeophtheirus salmonis) chalmus larvae and alters parasite development and transcriptome*. Parasites Vectors, 2020. **13**(225).
4. Jonsdottir, H., et al., *The histopathology associated with the preadult and adult stages of Lepeophtheirus salmonis on the Atlantic Salmon, Salmo salar L.* J Fish Dis, 1992. **15**(6): p. 521-527.
5. Braden, L.M., B.F. Koop, and S.R. Jones, *Signatures of resistance to Lepeophtheirus salmonis include a TH2-type response at the louse-salmon interface*. Dev Comp Immunol, 2015. **48**(1): p. 178-91.
6. Skugor, S., et al., *Local and systemic gene expression responses of Atlantic salmon (Salmo salar L.) to infection with the salmon louse (Lepeophtheirus salmonis)*. BMC Genomics, 2008. **9**: p. 498.

7. Øvergård, A.C., et al., *Transcriptomic and targeted immune transcript analyses confirm localized skin immune responses in Atlantic salmon towards the salmon louse*. Fish Shellfish Immunol, 2023. **138**: p. 108835.
8. Øvergård, A.C., et al., *Exocrine glands of Lepeophtheirus salmonis (Copepoda: Caligidae): Distribution, developmental appearance, and site of secretion*. J Morphol, 2016. **277**(12): p. 1616-1630.
9. Kabata, Z., *Parasitic copepoda of British fishes* London : Ray Society, 1979.
10. Kvamme, B.O., et al., *Molecular characterisation of five trypsin-like peptidase transcripts from the salmon louse (Lepeophtheirus salmonis) intestine*. International Journal for Parasitology, 2004. **34**(7): p. 823-832.
11. Skern-Mauritzen, R., et al., *The salmon louse genome: Copepod features and parasitic adaptations*. Genomics, 2021. **113**(6): p. 3666-3680.
12. Sommerset, I., et al., *Fiskehelserapporten 2022*, in *Veterinærinstituttet rapportserie nr 5a/2023*. 2023: Veterinærinstituttet.
13. Eichner, C., et al., *A method for stable gene knock-down by RNA interference in larvae of the salmon louse (Lepeophtheirus salmonis)*. Exp Parasitol, 2014. **140**: p. 44-51.
14. Bjerga, G.E., et al., *A rapid solubility-optimized screening procedure for recombinant subtilisins in E. coli*. J Biotechnol, 2016. **222**: p. 38-46.
15. Esposito, D. and D.K. Chatterjee, *Enhancement of soluble protein expression through the use of fusion tags*. Curr Opin Biotechnol, 2006. **17**(4): p. 353-8.
16. de Marco, A., *Strategies for successful recombinant expression of disulfide bond-dependent proteins in Escherichia coli*. Microb Cell Fact, 2009. **8**: p. 26.
17. Øvergård, A.C., et al., *Small, charged proteins in salmon louse (Lepeophtheirus salmonis) secretions modulate Atlantic salmon (Salmo salar) immune responses and coagulation*. Sci Rep, 2022. **12**(1): p. 7995.
18. Atkin-Smith, G.K., et al., *A novel mechanism of generating extracellular vesicles during apoptosis via a beads-on-a-string membrane structure*. Nat Commun, 2015. **6**: p. 7439.
19. Smith, T.M. and T.L. Kirley, *The calcium activated nucleotidases: A diverse family of soluble and membrane associated nucleotide hydrolyzing enzymes*. Purinergic Signal, 2006. **2**(2): p. 327-33.
20. Bell, S., *Exocrine glands of the caligid copepod Lepeophtheirus Salmonis (Krøyer, 1837)*. Dissertation. University of Stirling, Stirling,, 2001. Available from: Stirling Online Research Repository, Faculty of Natural Sciences, Aquaculture, Aquacultural eTheses <http://hdl.handle.net/1893/21866>.
21. Bron, J.E., A.P. Shinn, and C. Sommerville, *Ultrastructure of the cuticle of the chalumna larva of the salmon louse Lepeophtheirus salmonis (Kroyer, 1837) (Copepoda : Caligidae)*. Contributions to Zoology, 2000. **69**(1-2): p. 39-49.
22. Harasimczuk, E., et al., *Characterization of three salmon louse (Lepeophtheirus salmonis) genes with fibronectin II domains expressed by tegumental type 1 glands*. Mol Biochem Parasitol, 2017.
23. Kabata, Z., *Copepoda (Crustacea) parasitic on fishes - problems and perspectives*. Advances in Parasitology, 1982. **19**: p. 1-71.
24. Jones, M.W., C. Sommerville, and J. Bron, *The histopathology associated with the juvenile stages of Lepeophtheirus salmonis on the Atlantic salmon, Salmo salar L*. J Fish Dis, 1990. **13**(4): p. 303-310.
25. Skern-Mauritzen, R., et al., *Parasite development affect dispersal dynamics; infectivity, activity and energetic status in cohorts of salmon louse copepodids*. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology, 2020. **530**.
26. Jones, S.R.M., *Mechanisms of resistance among salmon to the parasitic copepod Lepeophtheirus salmonis*. Aquaculture Research & Development, 2011. **S2**: p. 003.
27. Kabata, Z., *Mouth and Mode of Feeding of Caligidae (Copepoda), Parasites of Fishes, as Determined by Light and Scanning Electron-Microscopy*. Journal of the Fisheries Research Board of Canada, 1974. **31**(10): p. 1583-&.
28. Borchel, A., C. Eichner, and A.C. Overgard, *Mining Lepeophtheirus salmonis RNA-Seq data for qPCR reference genes and their application in Caligus elongatus*. Exp Parasitol, 2023. **248**: p. 108511.

8. Leveranser

Dette prosjektet har som hovedmål å øke vår grunnleggende forståelse av samspillet mellom laks og lakselus for å skape innovasjon i utviklingen av nye immunbaserte behandlingsmetoder. Den viktigste leveransen i prosjektet var derfor kunnskapsformidling gjennom vitenskapelige og populærvitenskapelige artikler samt presentasjoner på nasjonale og internasjonale konferanser (se liste under). I tillegg til de publiserte/leverte artiklene har prosjektet også frembragt nok kunnskap til ytterligere 6 vitenskapelige publikasjoner som vil komme ut fortløpende i løpet av 2023-24. Prosjektet har også hatt 4 fiskehelsestudenter som har tatt oppgaven sin på lakselusens spyttkjertelsekret og ko-infestasjoner med skottelus/lakselus. Prosjektet har dermed bidratt til at disse studentene sto bedre rustet til å forstå lakselusen når de kom ut i arbeid som fiskehelsebiologer, der kontroll av lakselus er en viktig arbeidsoppgave. Prosjektet har også som nevnt over gitt nye vaksinekandidater samt gitt kunnskap som er viktig for utarbeidelse av en vaksinestrategi som vil bli tatt videre i to nye FHF finansierte prosjekt; SaliVax og SaliFilaVax.

Publiserte artikler:

1. Øvergård, A. C., H.M.D. Midtbø, L.A. Hamre, M. Dondrup, G.E.K. Bjerga, O. Larsen, J.K. Chettri, K. Buchmann, F. Nilsen, and S. Grotmol (2022). "Small, charged proteins in salmon louse (*Lepeophtheirus salmonis*) secretions modulate Atlantic salmon (*Salmo salar*) immune responses and coagulation." *Sci Rep* **12**(1): 7995.
2. Borchel, A., Eichner C., and Øvergård, A.C. (2023). "Mining *Lepeophtheirus salmonis* RNA-Seq data for qPCR reference genes and their application in *Caligus elongatus*." *Exp Parasitol* **248**: 108511.
3. Øvergård, A. C., Eichner C., Nunez-Ortiz, N., Kongshaug, H., Borchel, A., and Dalvin, S. (2023). "Transcriptomic and targeted immune transcript analyses confirm localized skin immune responses in Atlantic salmon towards the salmon louse." *Fish Shellfish Immunol* **138**: 108835.

Manuskript levert for fagfelleevaluering:

1. Midtbø H.M.D, Eichner C, Hamre, L.A., Dondrup, M., Flesland, L., Tysseland, K.H., Kongshaug, H., Borchel, A., Nilsen, F., and Øvergård, A.C. Enzymes expressed by salmon louse (*Lepeophtheirus salmonis*) labial glands: characterization and modulation of Atlantic salmon (*Salmo salar*) immune responses.

Populærvitenskapelige artikler:

1. Aina-Cathrine Øvergård og Lars Are Hamre (2020). Lakselus/vert-interaksjoner. Naturen nr 5. 199-206.
2. Aina-Cathrine Øvergård og Lars Are Hamre (2020). Skottelusen: en kilde til viktig kunnskap, men også en mulig fremtidig trussel?. Norsk Fiskeoppdrett 2020; Volum 5.

Orale presentasjoner på konferanser:

1. Helena Marie Doherty Midtbø, Gyri Teien Haugland, Andreas Borchel, Craig Morton, Aina-Cathrine Øvergård. LsLGP3 from Salmon Louse (*Lepeophtheirus salmonis*) Causes Cell Death in Atlantic salmon (*Salmo salar*) Leukocytes. 4th congress of the International Society of Fish & Shellfish Immunology 2022; Bodø, Norge 12.-15. Desember.
2. Aina-Cathrine Øvergård. Fra grunnforskning til vaksineutvikling: Lakselusens spytt! FHF Lusekonferansen 2022; Trondheim 6. – 7. april.
3. Aina-Cathrine Øvergård, Christiane Eichner, Helena Marie Doherty Midtbø, Andreas Borchel and Lars Are Hamre. Immune modulation – a comparison between the generalist *Caligus elongatus* and the specialist *Lepeophtheirus salmonis*. SeaLice conference international 2022; Færøyene 9.-13. April.
4. Helena Marie Doherty Midtbø, Gyri Teien Haugland, Aina-Cathrine Øvergård (2022). Does salmon louse have an immune dampening effect on Atlantic salmon?. SeaLice conference international 2022; Færøyene 9.-13. April
5. Christiane Eichner, Aina-Catherine Øvergård. Alteration of the gene expression in the skin of Atlantic salmon after experimental down-regulation of a salmon louse salivary gland protein. SeaLice conference international 2022; Færøyene 9.-13. April.
6. Lars A. Hamre, Christiane Eichner, Aina-Cathrine Øvergård, Hanne Log Person and Egil Karlsbakk. Frontal filament formation in copepodids of the salmonid specialist *Lepeophtheirus salmonis* and

the generalist *Caligus elongatus*: trade-offs and impact on the rate of parasitic development. SeaLice conference international 2022; Færøyene 9.-13. April.

7. Aina-Cathrine Øvergård, Christiane Eichner, Helena Marie Doherty Midtbø, Andreas Borchel og Lars Are Hamre. Immunmodulering – hva kan generalisten *Caligus elongatus* lære oss om spesialisten lakselus (*Lepeophtheirus salmonis*)? Frisk Fisk 2022; Bergen 30.-31. Mai.
8. Helena Marie Doherty Midtbø, Gyri Teien-Haugland, Craig Morton, Gro E. K. Bjerga, Øivind Larsen og Aina-Cathrine Øvergård. Har lakselusa en immundempende virkning på laksen? Frisk Fisk 2022; Bergen 30.-31. Mai.
9. Christiane Eichner, Aina-Catherine Øvergård. Nedregulering av et lakselus-spyttkjertelprotein forandrer genuttrykket i laksens hud og fremkaller en forsterket immunrespons. Frisk Fisk 2022; Bergen 30.-31. Mai.
10. Aina-Cathrine Øvergård, Sindre Grotmol, Sol Hollekim, Christiane Eichner, Frank Nilsen og Lars Are Hamre. En sammenligning mellom generalistens og spesialistens vert-parasitt interaksjoner: lakselus versus skottelus. HAVBRUK 2020; Digital konferanse 9. og 10. juni.
11. Aina-Cathrine Øvergård. Grunnleggende lusebiologi – hva vet vi, og hva skal studeres. FHF Lusekonferansen 2020; Trondheim 21. – 22. januar.
12. Helena MD Midtbø, Gyri Teien Haugland, Andreas Borchel, Craig Morton, Aina-Cathrine Øvergård. LsLGP3 from Salmon Louse (*Lepeophtheirus salmonis*) Causes Cell Death in Atlantic salmon (*Salmo salar*) Leukocytes. 15th congress of the international society for developmental and comparative immunology (ISDCI) 2023; Wageningen, Nederland 28. August – 1. September.

Masteroppgaver

1. Sol Hollekim (2020): Immungener regulert hos atlantisk laks ved enkle- og koinfestasjoner med ektoparasittene *Caligus elongatus* og *Lepeophtheirus salmonis*.
2. Kristoffer Helland Tysseland (2021): Karakterisering av LsApy1 i lakselus (*Lepeophtheirus salmonis*) og dens rolle i vert-parasitt interaksjonen mellom lakselus og atlantisk laks (*Salmo salar*).
3. Jøel Bertil Gjertz Mørkved (2021): Karakterisering av LsLGP5 i lakselus (*Lepeophtheirus salmonis*) og dens rolle i vert-parasitt interaksjonen mellom lakselus og atlantisk laks (*Salmo salar*).
4. Linn Flesland (2022): Karakterisering av et astacin i lakselus (*Lepeophtheirus salmonis*) og dets rolle i vert-parasitt interaksjonen mellom lakselus og atlantisk laks (*Salmo salar*).