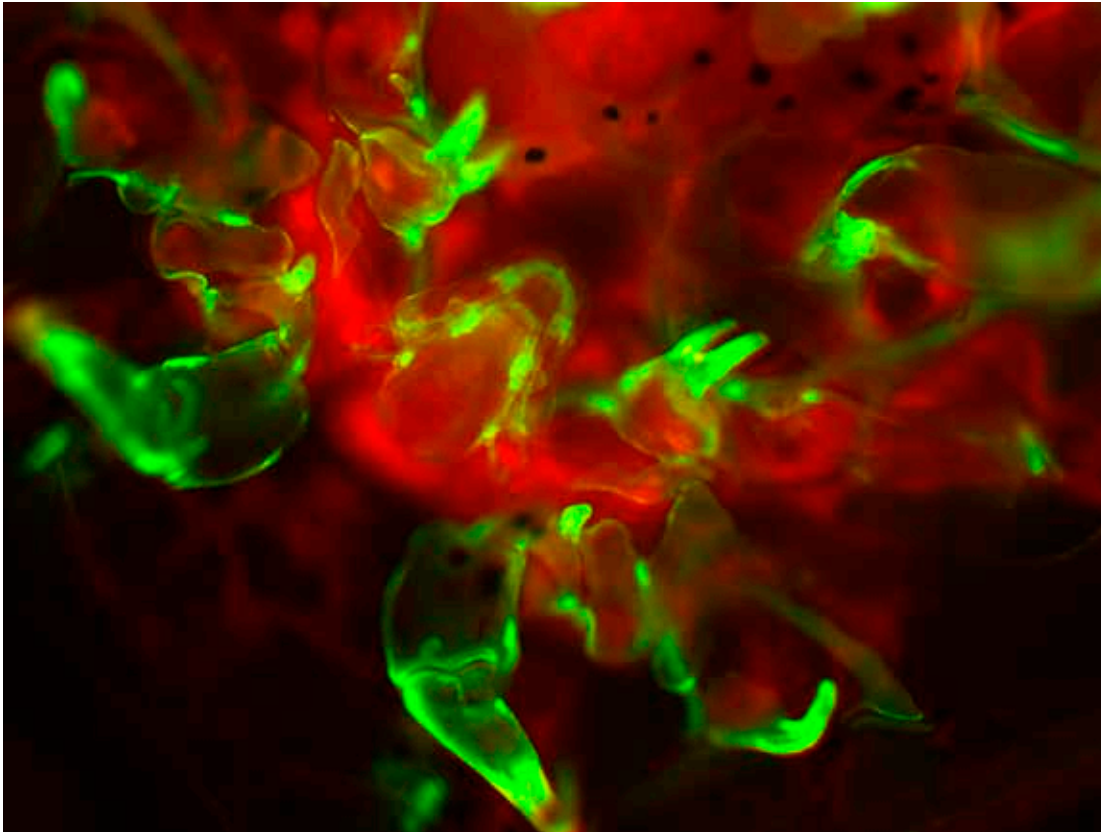


### 3.6.2 MOLEKYLÆRE STUDIER AV LAKSELUS

Lakselus er en parasitt som lever på laksefisk, og den er en alvorlig trussel mot ville bestander av laks og sjørøret. I tillegg utgjør lakselus et økende problem for lakseoppdrettsnæringen. På Havforskningsinstituttet gjennomfører vi en grundig beskrivelse av lakselusens biologi. Denne beskrivelsen blir blant annet utført som en molekylær karakterisering. Vi vil her forklare prinsippene bak disse metodene.



Sussie Trine Dalvin  
sussie.dalvin@imr.no

Christiane Eichner  
christiane.eichner@imr.no

Rasmus Skern-Mauritzen  
rasmus.skern@imr.no

Frank Nilsen  
frank.nilsen@imr.no

Lakselusen er et parasittisk krepsdyr som finnes på laksefisk, hvor den lever av slim, skinn og blod (Figur 3.6.2.1). Lakselusen påvirker laksens immunforsvar. Når lakselus finnes i store mengder, kan beiteaktiviteten resultere i sårdannelse, som igjen kan medføre osmotisk stress og større motakelighet for infeksjoner.

Lakselusen er i dag blant de største utfordringene for villaksen og oppdrettsindustrien i Norge. Lakselusens forekomst på oppdrettsfisk blir i hovedsak kontrollert kjemisk med medikamenter som SLICE, Salmosan, ALPHAmox og Betamax, som påvirker lusens nervesystem. Imidlertid har lakselus i visse deler av landet utviklet

**Figur 3.6.2.1**

Konfokal mikroskopi: Autofluorescens i munnpartiene og antenner av voksen lakselus. Lakselusen bruker munnpartiet til å holde seg fast i verten og spise skinn og blod fra fisken.

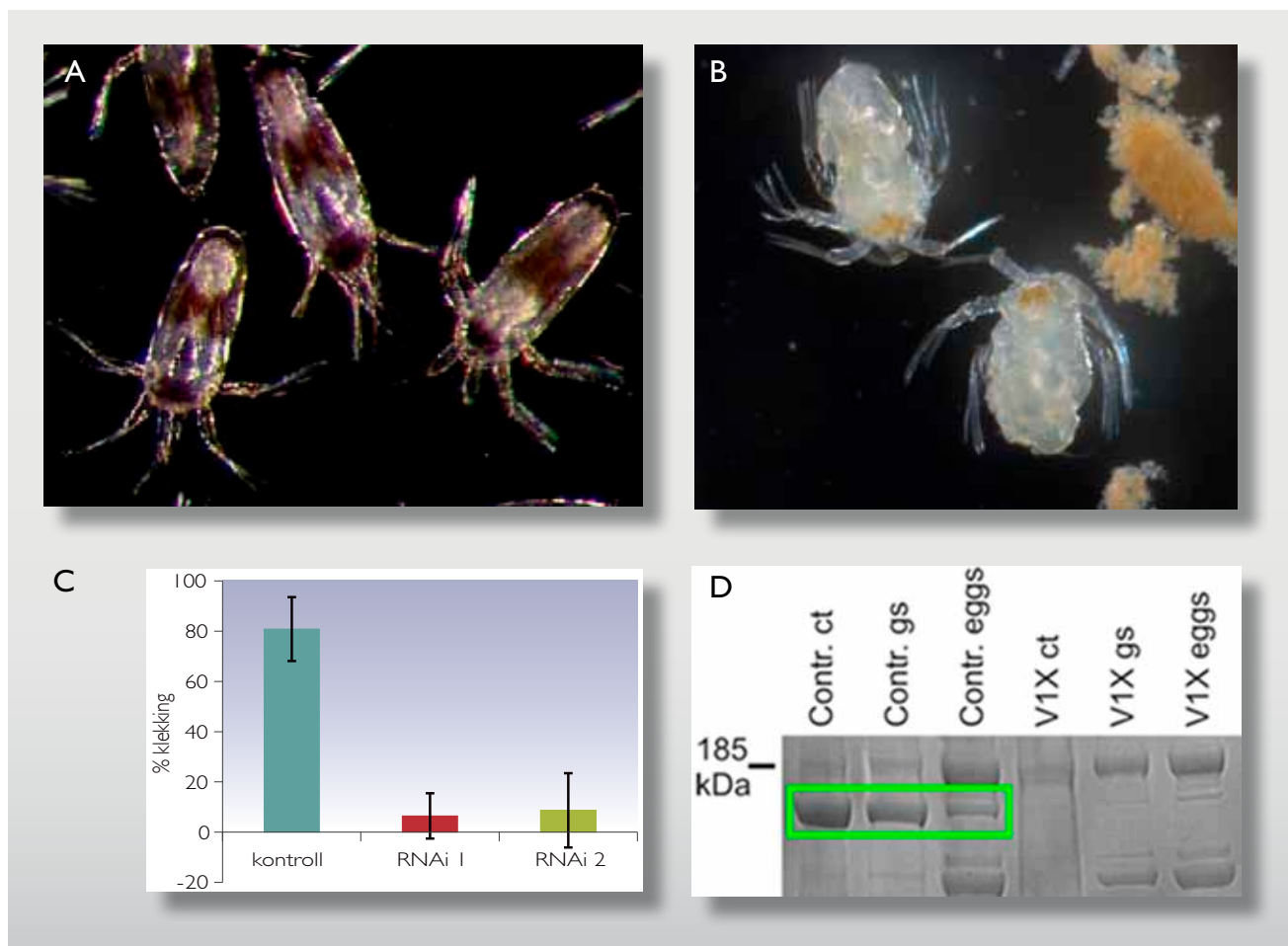
*Confocal microscopy: Autofluorescence in mouthparts and antennae of adult salmon lice. The louse uses the mouthpart to hang on to the host and eat skin and blood from the fish.*

resistens. Dette problemet ventes å øke med en stadig voksende oppdrettsindustri. Nye behandlingsmetoder, enten det er vaksiner eller kjemiske medikamenter, fungerer ved å blokkere eller manipulere biologiske prosesser i lakselusen. På Havforskningsinstituttet har vi over flere år hatt en forskningsaktivitet med formål å kartlegge lakselusens biologi på molekylært nivå, fordi det er på dette nivået nye avluningsmidler og vaksiner må utvikles. Molekylærbiologi er et ukjent fagfelt for mange, og vi ønsker derfor på en forenklet måte å forklare hvordan man gjør slike undersøkelser og hvilke fordeler slike metoder har.

#### Grunnkonsepter i molekylærbiologi

Alle levende organismer består av celler. Celler i forskjellige deler av kroppen har

ofte veldig ulik utseende og funksjon, men de inneholder alle samme arvestoff, som består av DNA. Arvestoffet inneholder all informasjon som trengs for å styre hva som foregår i cellen og i hele organismen. Arvestoffet er som en stor oppskriftsbok som cellene bruker hver gang de skal utføre nye oppgaver. Arvestoffet inneholder oppskrifter (gener) som beskriver hvordan produkter (proteiner) skal produseres. I tillegg til beskrivelsene av de ferdige produktene, fins det også informasjon om når og hvor de forskjellige produktene skal produseres. Protein er kroppens viktigste råmateriale, fordi det både kan brukes som byggestein, som opplagsnæring og til å styre og forestå prosesser. Avhengig av hvor i organismen cellen befinner seg, kan behovet for produkter variere. En celle i tarmen skal for eksempel produsere



fordøyelsesenzymer, mens en nervecelle primært skal sørge for at den er i stand til å sende nervesignaler videre til sine nabo-celler.

#### Hvordan produseres proteiner?

Ved mangel på et protein i kroppen, må cellene produsere dette. Da sjekker cellen den genetiske oppskriften i arvestoffet og lager en avskrift som består av RNA. Denne avskriften kalles budbringerRNA. Avskriften transporteres til proteinproduksjonsapparatet, og proteinet settes sammen etter beskrivelse. Cellen har da et produkt som den kan bruke til å løse en spesifikk oppgave.

#### Tre typer molekulære undersøkelser

En molekylær karakterisering kan inndeles i tre delundersøkelser: A) Undersøkelser av arvestoffet, B) Undersøkelser av budbringerRNA og C) Undersøkelse av proteiner.

*A) Undersøkelser av organismens arvestoff:* I denne type undersøkelser kartlegger man vha. sekvensering hele eller deler av arvestoffet. Man kan da få informasjon om alle proteinene en organisme kan produsere. Denne informasjonen kan brukes til å skille individer eller arter, til å studere evolusjon, og ikke minst, til å forstå en arts biologi.

*B) Undersøkelser av organismens budbringerRNA:* BudbringerRNA er ustabil og fins bare i dyret mens produksjon av et spesifikt produkt pågår. Derfor gir undersøkelser og sekvensering av budbringerRNA-molekyler informasjon om hvilke gener som er uttrykt i den livssituasjonen dyret befinner seg i når undersøkelsen finner sted. Videre kan man undersøke hvor mye budbringerRNA som finnes, og i hvilke celler det finnes.

*C) Undersøkelse av protein:* Gjennom disse undersøkelsene får man vite hvor proteinene er, hvor mye det er av dem, og når de produseres.

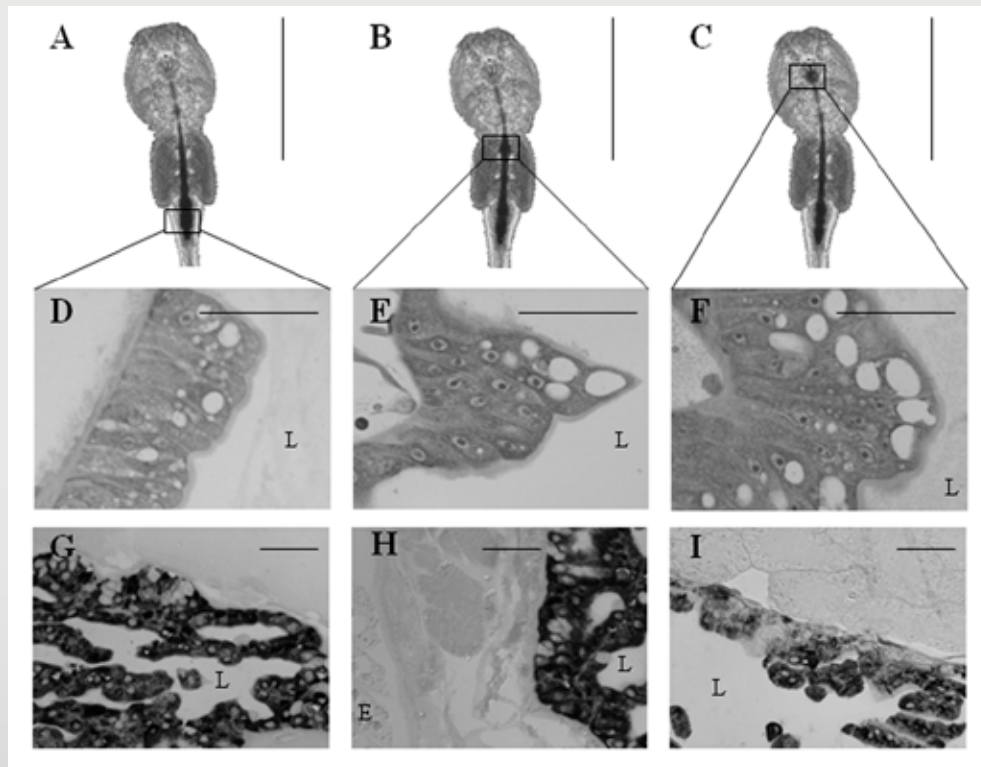
#### Eksperimentell genuttrykksmanipulering

Som nevnt vil en celle som har bruk for et protein, produsere dette basert på instruksene som fins i genene med budbringer RNA. Imidlertid kan cellene manipuleres til selektivt å destruere et på forhånd valgt budbringerRNA. Metodikken som brukes for å få dette til, kalles RNA interferens (RNAi). Det praktiske med denne metoden er at man kan undersøke hva som skjer når et protein ikke lages. Dette gir en god pekepinn på hva proteinets funksjon kan være. RNAi fungerer ikke like godt i alle organismer. Metodikken har imidlertid vist seg å være svært effektiv i lakselus

#### Figur 3.6.2.2

Resultater fra et RNAinterferensforsøk. BudbringerRNA fra et spesifikt gen ble destruert og uttrykket av dette genet ble undertrykt. Lakseluslarvene kan ikke utvikles på normal måte og er heller ikke levedyktige. A: Normale lakseluslarver. B: Manipulerte lakseluslarver. C: Klekkesuksess av manipulerede lus i forhold til ikke-manipulerte lus (kontroll). Ca. 80 % av eggene utvikles til normale larver i kontrollen, mens mindre enn 10 % klekkes i manipulerede lus (RNAi1 og RNAi2). D: Proteiner isolert av lus og egg fra normale lus (venstre tre kolonner) og fra manipulerede lus (høyre tre kolonner). Mens det spesifikke protein finnes i vanlige lus og egg (grønn kasse), er det fraværende i de manipulerede lusene og eggene.

*Results of an RNA interference experiment. The messenger RNA from a specific gene has been destroyed, and the expression of this gene has been suppressed. The salmon louse larva cannot develop normally and are not able to survive. A: Normal salmon louse larva. B: Manipulated salmon louse larva. C: Hatching success of manipulated lice in comparison to non-manipulated lice. About 80% of all eggs hatched normal lice (control = kontroll), less than 10% hatched in manipulated lice (RNAi1 and RNAi2). D: Proteins isolated from lice and egg of normal lice (three columns on the left) and from manipulated lice (three columns on the right). While the specific protein is present in normal lice and egg (green box), it is absent in the manipulated ones.*



**Figur 3.6.2.3**

Lokalisering av budbringerRNA for et fordøyelsesenzym som finnes i lakselusens tarm i bakkropp (bilde A og mørke områder i bilde G), kjønnssegment (bilde B og mørke områder i bilde H) og forkropp (bilde C og mørke områder i bilde I). En negativ kontroll bekreftet at resultatene er korrekte (mangel på tilsvarende mørke områder i bilde D, E og F).

*Localization of messenger RNA encoding a digestive enzyme in the gut of the louse in the abdomen (picture A and dark areas in picture G), the genital segment (picture B and dark areas in picture H) and the front segment (picture C and dark areas in picture I). A negative control confirms the specificity of the signal (lack of dark coloration in pictures D, E and F).*

hvor gener kan skrues ned eller av i hele organismen over lange perioder (Figur 3.6.2.2).

#### **Molekylær karakterisering i praksis og status for lakselus**

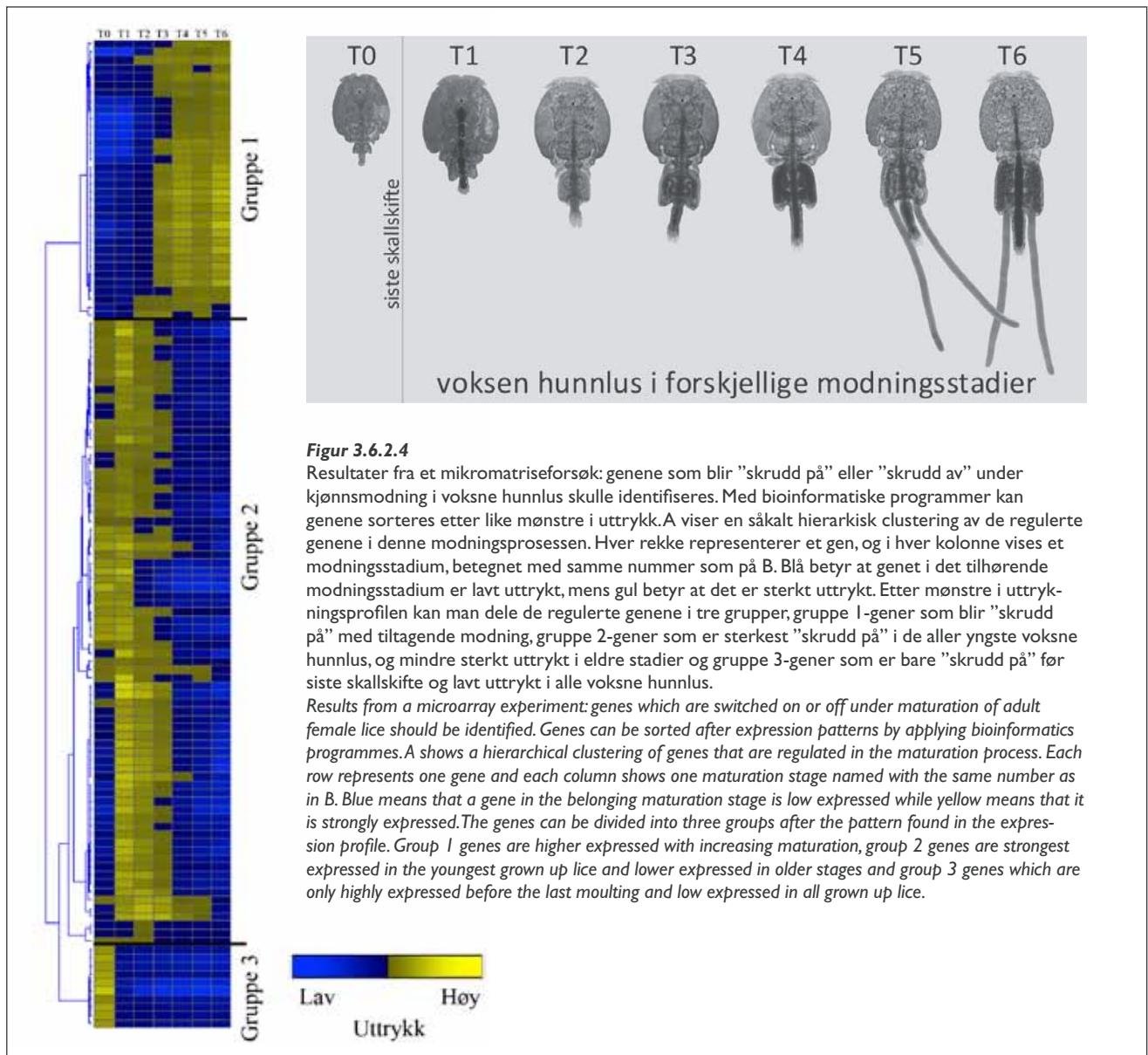
For å forstå hvordan en organisme fungerer på cellenivå, begynner man ofte med å spørre hvilke gener som brukes i et bestemt utviklingsstadium eller under en spesiell påvirkning. Fordi cellene har minst ett budbringerRNA for hvert gen som brukes, kan man ved å samle og sekvensere disse budbringerRNA-molekylene få et overblikk over de uttrykte genene. Vi har sekvensert 36 000 budbringerRNA-fragmenter fra forskjellige stadier av lakselus. Disse representerer omtrent 7 000 gener, dvs. 50 % av det totale antall gener man forventer å finne i lakselus. En begrensning ved å basere studiene på sekvens fra budbringerRNA er at man bare får infor-

masjon om de genene som aktivt brukes – alle de som ikke anvendes i det undersøkte materialet vil ikke sekvenseres. For å få kunnskap om alle gener, må organismenes arvestoff sekvenseres, hvilket er ett av våre fremtidige forskningsmål for lakselus.

Genene man finner, enten ved sekvensering av arvestoff eller budbringerRNA, kan sammenliknes med kjente gener fra andre organismer for å få en idé om deres funksjon. Når man har sekvensen for et gen, kan man lage elementer som binder seg til spesifikke budbringerRNA-molekyler. Disse elementene kan blant annet brukes til å vise i hvilke celler dette budbringerRNA finnes, og hvor mye som finnes av det. Dette er metoder som blant annet er brukt i omfattende studier av lakselusens fordøyelsessystem (Figur 3.6.2.3). Sekvensinformasjonen kan også brukes til å konstruere mikromatriser, et verktøy som

gjør det mulig å analysere titusener av gener for deres aktivitet på samme tid. Ved å sammenligne budbringerRNA fra dyr i forskjellige livsstadier eller miljøer, kan en se om det er en endring i bruken av genene. Dette gjelder både for gener med kjente og ukjente funksjoner. Slike mikromatriser har vi brukt til å studere hvordan ca. 3 000 forskjellige gener uttrykkes under kjønnsmodningen av hunnlus (Figur 3.6.2.4). Basert på uttrykksmønsteret til disse 3 000 genene har vi valgt et antall som vi anser som mer sannsynlige som komponenter i en fremtidig vaksine. Vi studerer disse ved hjelp av eksperimentell genuttrykksmanipulering, da dette kan gi en idé om deres egnethet som vaksinekomponenter. Vi har hittil gjennomført eksperimentell nedregulering av 11 gener. Disse genene har videre vært mål for omfattende studier av både deres budbringerRNA og det ferdige protein.





## Lakselusen

### ikke bare et problem

Gjennom de intensive molekylærbiologiske studier av lakselusen de siste ti år har vi fått en god forståelse av lakselusens biologi på molekylært nivå. Gjennom den sideløpende utviklingen av systemer for at holde lakselus i kontinuerlig kultur samt eksperimentelt molekylærbiologisk verktøy (se hovedtekst) har vi lagt til rette for svært avanserte studier av lusen i fremtiden. Dette er bra fordi det kan hjelpe oss til å løse luseproblemet for villaksen og oppdrettsnæringen. Men lakselusen er ikke bare en brysom parasitt, den er også en hoppekreps og således i slekt med noen av de viktigste planktonorganismer i havet. Vi har derfor ikke bare fått molekylærbiologiske verktøy for å studere et problem, vi har også fått verktøy som kan brukes til å studere en representant for en meget viktig organismegruppe.

## Molecular Studies of Salmon Louse

The salmon louse is an ectoparasitic crustacean. It feeds on skin, blood and mucus from the salmon. Heavy parasitic load creates wound and expose the fish to osmotic stress and subsequent infections and is thus an important threat to the salmonid fish. Salmon lice infections are treated using various chemicals, but recently several cases of resistance have occurred. The Institute of Marine Research is currently working on a molecular characterization of salmon lice to enable the development of new treatments. As molecular biology and techniques are not well understood in the general public, we present three examples of experiments performed as part of such a molecular characteriza-

tion. In the first experiment, we specifically removed one type of messenger RNA in a so-called RNA interference experiment. As the messenger RNA is destroyed, protein of that specific type is not produced, and the lack of this leads to severe malformation in salmon lice larvae (Figure 3.6.2.2). In the second experiment we localized the messenger RNA corresponding to a digestive enzyme to the gut of a salmon louse (Figure 3.6.2.3). In the third experiment, we measured the type and amount of messenger RNA in a female salmon lice undergoing sexual maturation in a microarray experiment. Genes were grouped according to whether they were important early or late in the development (Figure 3.6.2.4).