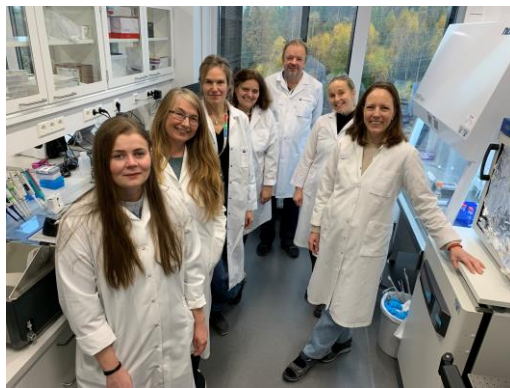




Utvikling av cellelinjer for å redusere antallet forsøksdyr i studier av fiskehelse



**Cellemodellteamet i Veterinærinstituttets satsningsprosjekt BIO-Direct,
representert ved Anita Solhaug, Mona Gjessing og Hilde Sindre**





Presentasjon av prisvinnerne:

Anita Solhaug



Anita.Solhaug@vetinst.no

- Cellebiolog, doktorgrad i toksikologi
- Fagfelt - cellelinjer, cellesignalisering, toksisitet
- BioDirect - cellemodell teamleder
- GILLMODEL- prosjektleder

Mona Gjessing



mona.gjessing@vetinst.no

- Veterinær
- Doktorgrad knyttet til gjellesykdommer
- Fagfelt - fiskepatologi, cellelinjer, gjellesykdommer (bl.a. laksepox)

Hilde Sindre



hilde.sindre@vetinst.no

- Biolog, doktorgrad human virologi
- Fagfelt - isolering og karakterisering av virus hos fisk
- OIE ekspert PD-virus

Del av:

Cellemodellteamet



2019-2022

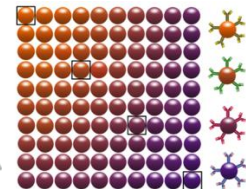
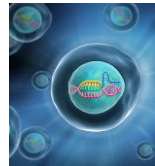
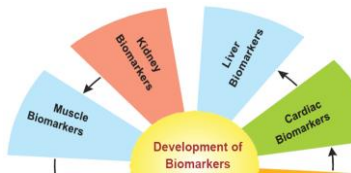
BIO-DIRECT



Ledet av Maria K. Dahle

Biomarkører & Bioassays for veterinærmedisinsk forskning og diagnostikk

“shape the future of disease understanding and preparedness”

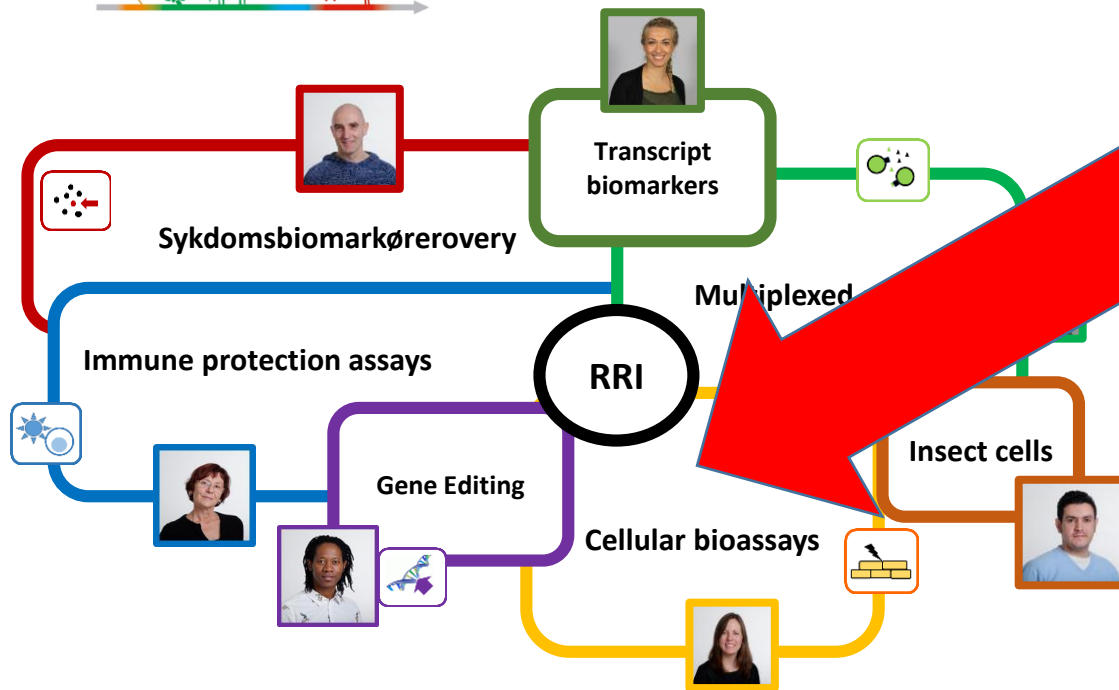


magnetic microsphere





Organisering av teamet:



Alle teamene er tverrfaglige og på tvers av seksjoner på Veterinærinstituttet



"We like to bring together people from radically different fields and wait for the friction to produce heat, light and magic. Sometimes it takes a while."

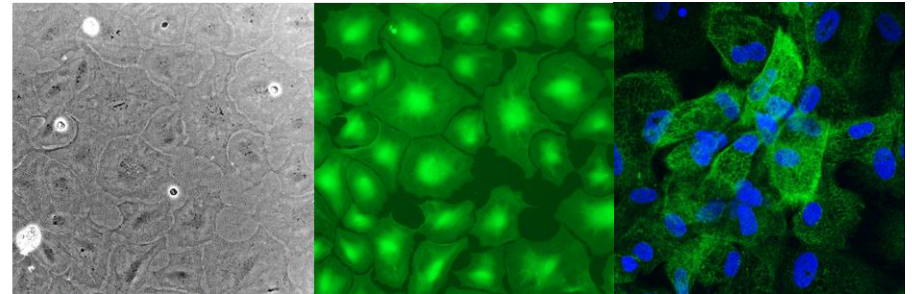


WP4: Cellulære bioassay

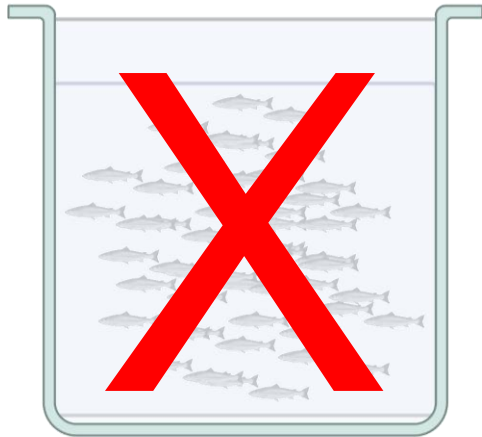
Anita Solhaug
Cell biology/toxicology
Cell lab responsible - Ås



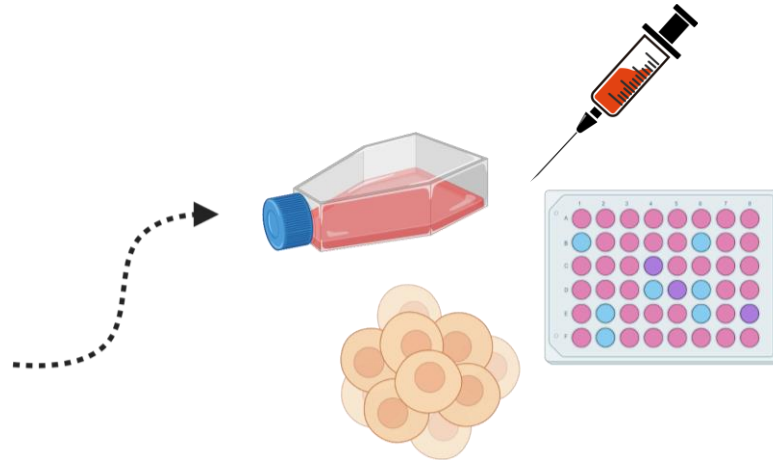
**Samarbeid med GILLMODEL (NFR)
ledet av Anita Solhaug**



Hvorfor etablere in vitro cellemodeller?



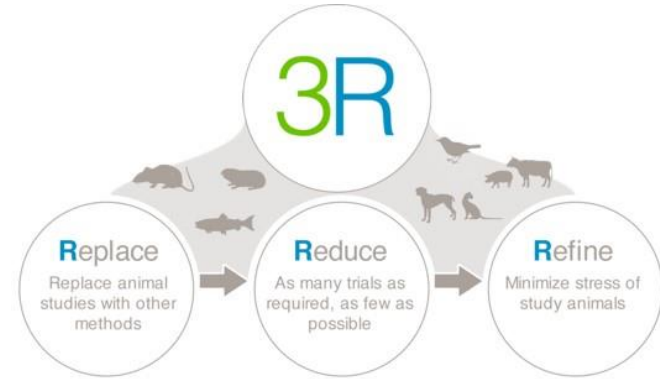
Fiskeforsøk



Cellemodeller i laboratoriet

Fordeler og utfordringer med cellebaserte modellsystemer:

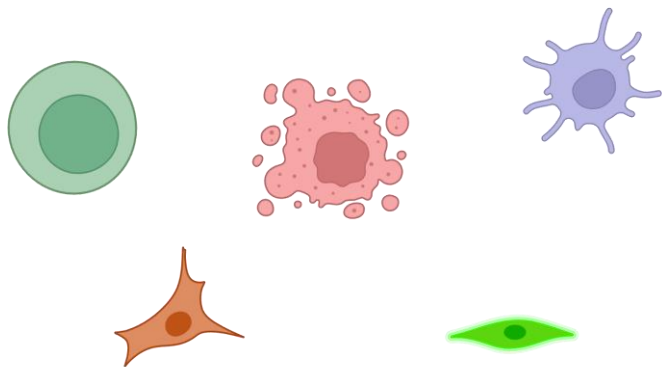
- + erstatte/reducere behov for forskning på levende fisk (3R)
- + Cellelinjer er enkle og rimelige å vedlikeholde i laboratoriet.
- + lette å standardisere (repeterbarhet og sammenligning mellom laboratorier).
- Viktig å sikre at cellene er representative/sammenlignbare knyttet til celfunksjoner *in vivo* – nøye karakterisering nødvendig!
- For fisk er det begrenset med tilgang på cellelinjer fra relevante organer sammenlignet med landdyr/menneske



«FISK ER IKKE FISK»



«CELLER ER IKKE CELLER»



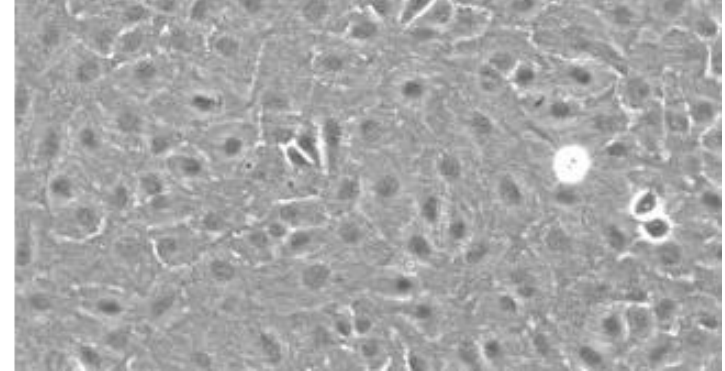
Ønskelig med panel av celletyper fra ulike organer og arter!

Hva kan vi undersøke i cellemodeller?

Identifisere biomarkører for vannkvalitet

Studere ulike cellulære mekanismer/responser

Studere mottakelighet/respons for patogener og effekt av toksiner.



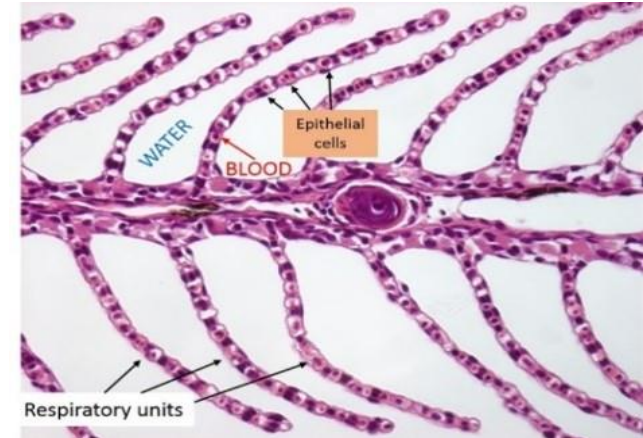
Gjelle – et komplekst organ med mange funksjoner

Gjelleepitel er direkte eksponert for vann og representerer en viktig barrier for skadelige stoffer og patogener.

En svekket barrier øker risiko for gjellesykdommer

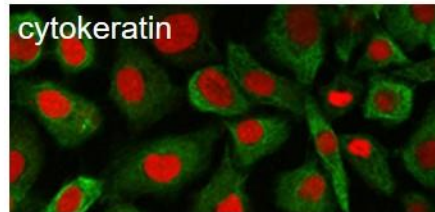
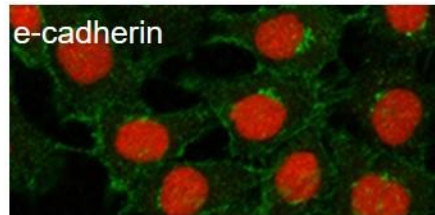
Viktige gjellefunksjoner:

- oksygenopptak
- Metabolsk avfallsutskillelse waste excretion
- ioneregulering
- Immunfunksjoner
- Metabolisme av medikamenter og andre miljøforurensninger i vannet.

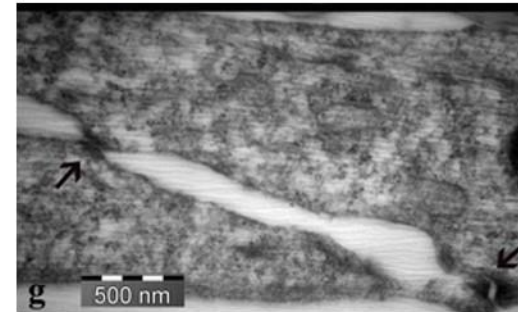


ASG10 – En ny gjellecellelinje fra atlantisk laks

- Etablert på Veterinærinstituttet i 2018
- Sannsynligvis av epitelopprinnelse
- Mottakelig for flere ulike virus



desmosomes



Made from fresh water
smolt, gill explant

RESEARCH ARTICLE

Development and characterization of two cell lines from gills of Atlantic salmon

Mona C. Gjessing^{1*}, Maria Aamelfot¹, William N. Batts², Sylvie L. Benestad¹, Ole B. Dale¹, Even Thoen³, Simon C. Wel¹, James R. Winton²

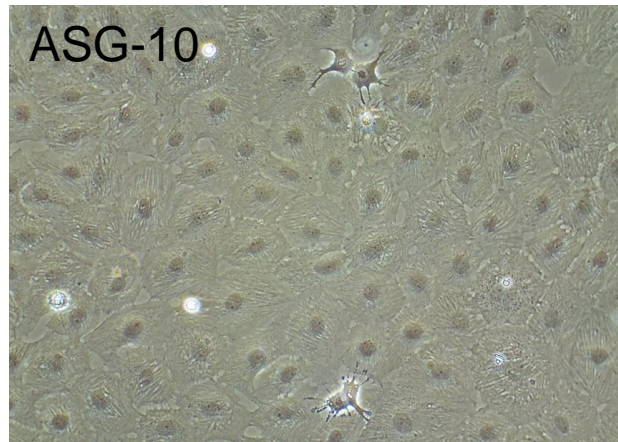
¹ Norwegian Veterinary Institute, Oslo, Norway, ² US Geological Survey Western Fisheries Research Center, Seattle, Washington, United States of America, ³ Norwegian University of Life Sciences, Oslo, Norway

* mona.gjessing@vetinst.no

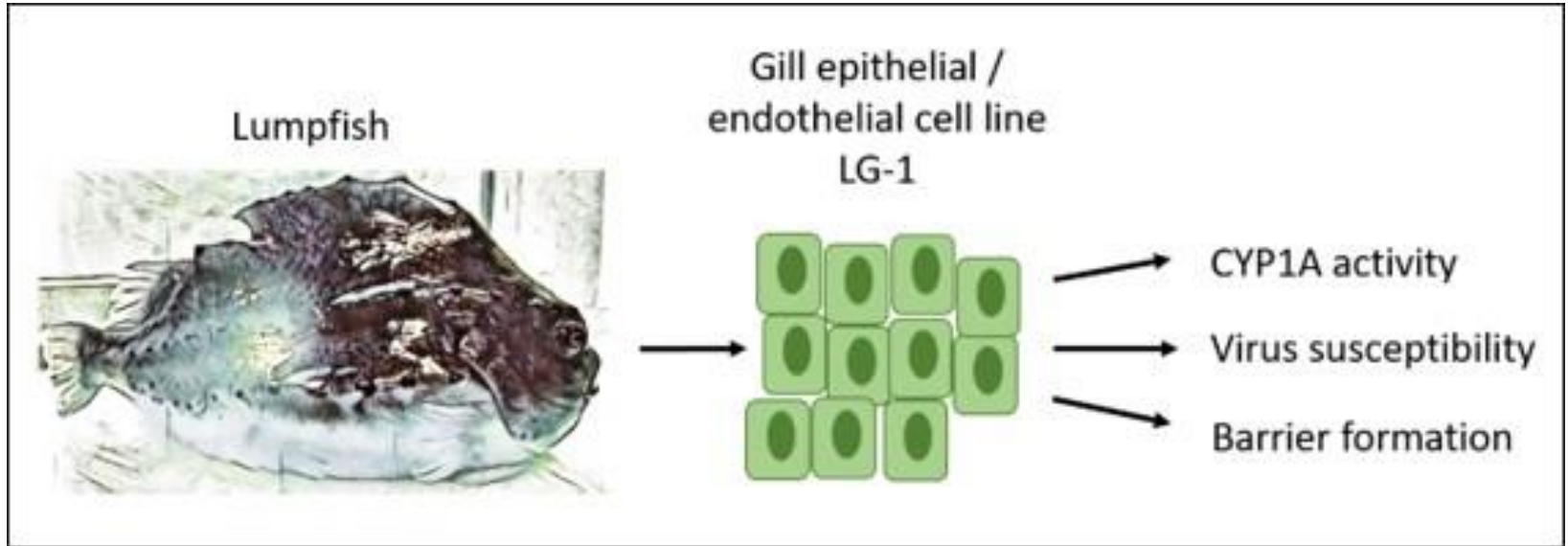
GILLMODEL prosjektet, Forskningsrådet, (RCN294876,Havbruk2)

Kan ASG10 benyttes for studier av gjelleepitelbiologi og som en erstatning for forsøk med levende fisk (3R)?

- **Detoksifiseringsegenskaper**
- **Barrierefunksjoner**
- **Fersk- og sjøvannstoleranse**
- **Miljøfaktorer / vannkvalitet**
(f.eks. toksiner/medikamenter, O₂/CO₂, ammonia, aluminium, smittestoffer, mikroplast mm.)



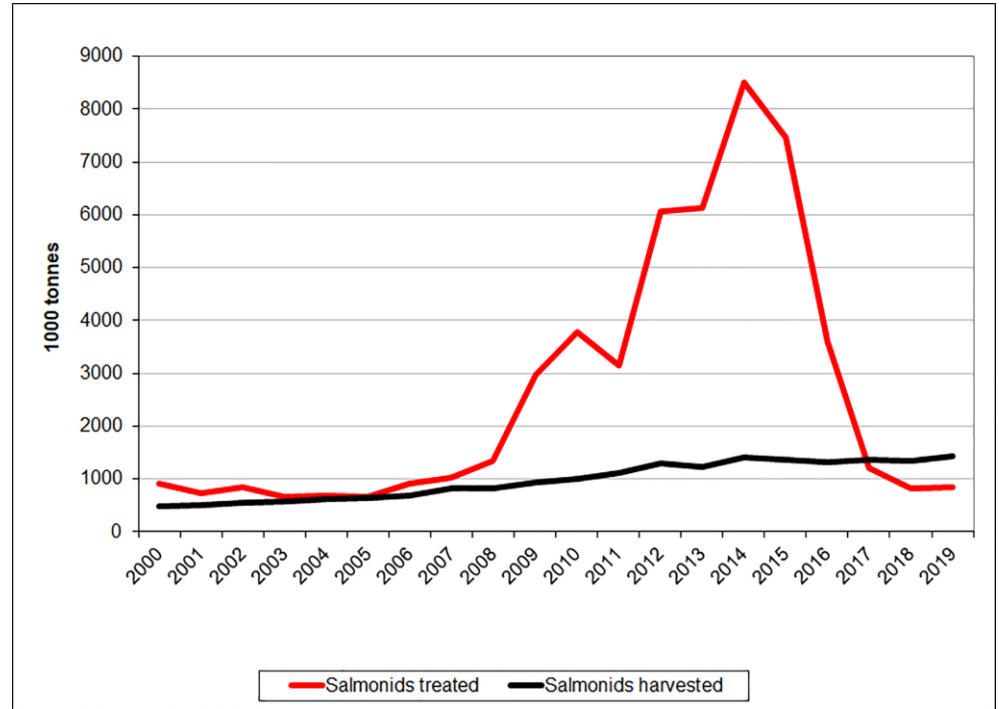
Etablering og karakterisering av cellelinje fra rognkjeksgjelle:





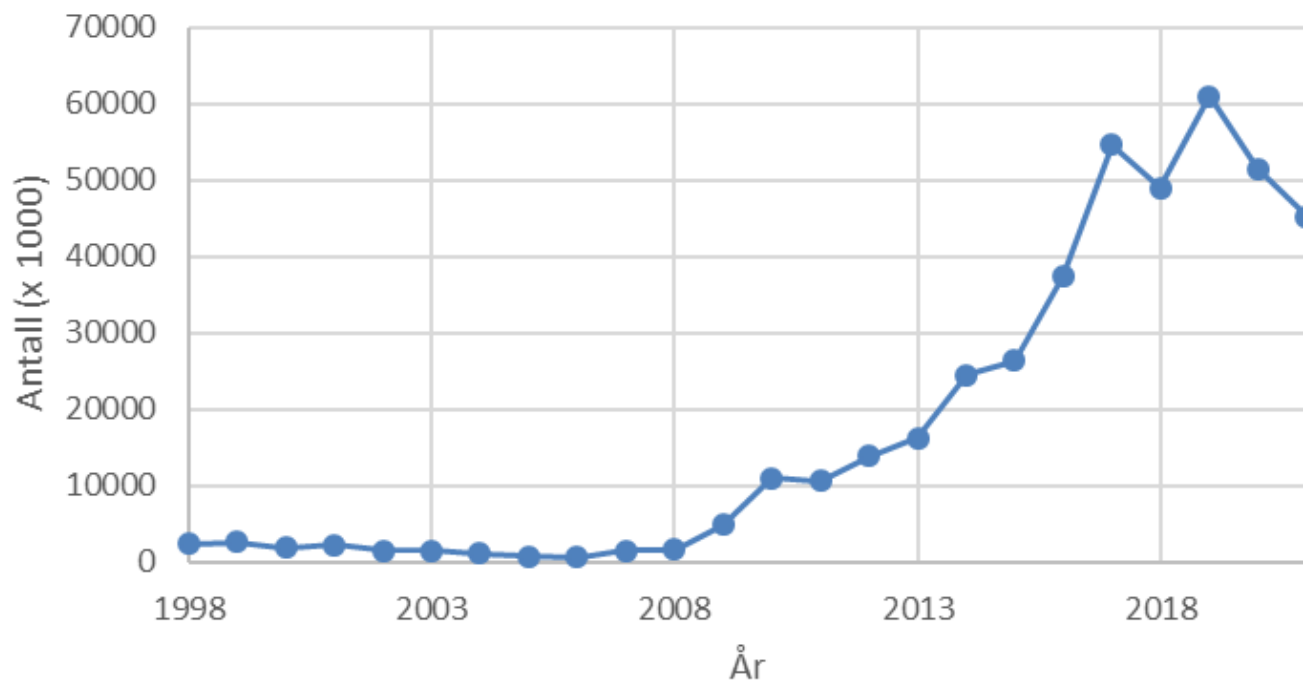
“...the nemesis of the farmed Atlantic salmon...”

The Guardian, April 2017



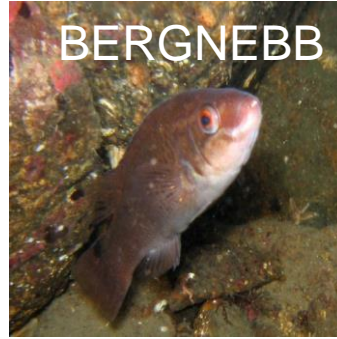
Myhre Jensen et al (2020) Trends in de-lousing of Norwegian farmed salmon from 2000–2019—Consumption of medicines, salmon louse resistance and non-medical control methods. PLoS ONE 15(10): e0240894.

total bruk av renseskjold i norsk akvakultur



Basert på tall fra
Fiskeridirektoratet

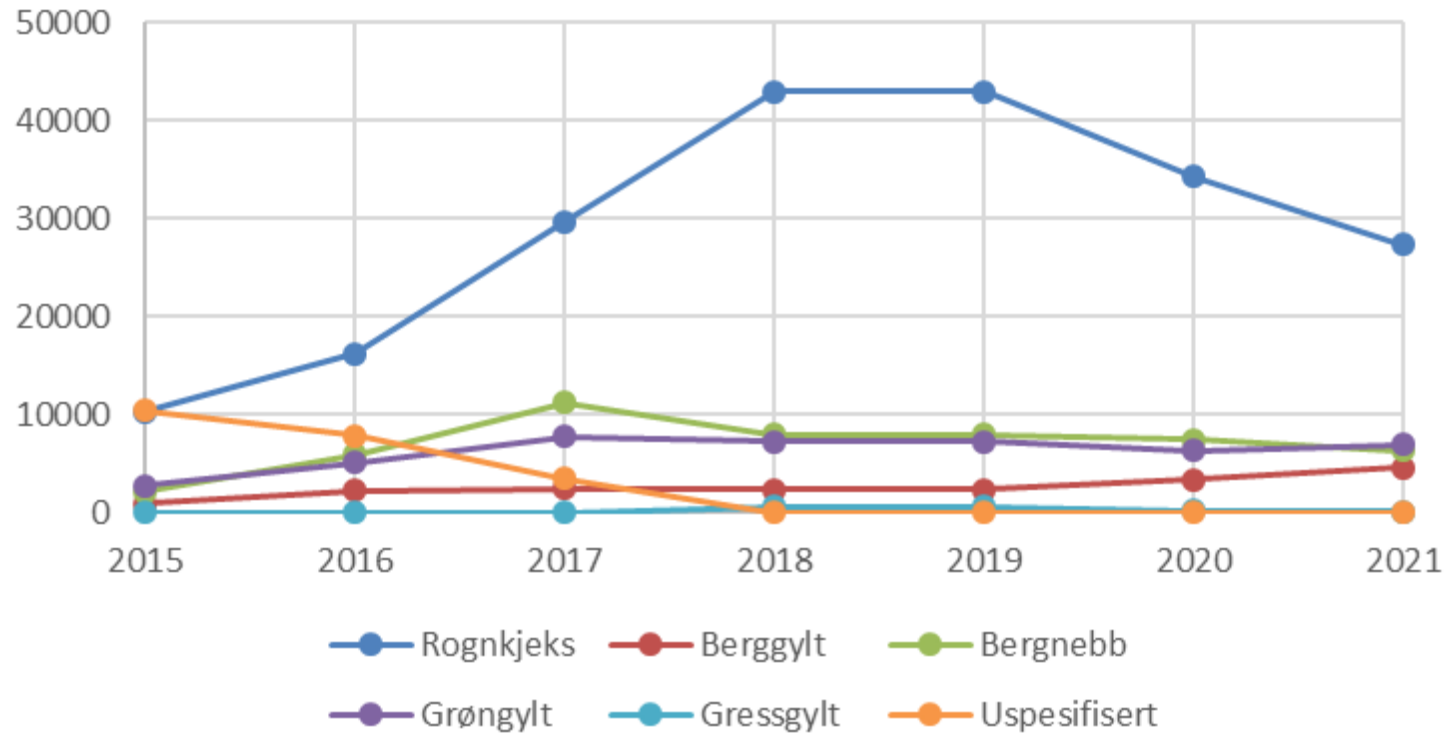
Arter rensefisk:



LEPPEFISK



Utsett av rensefisk i Norge



Basert på tall fra
Fiskeridirektoratet

Utfordringer:

- Nye fiskearter → nye sykdommer!
- Risiko for smittespredning mellom arter
- Velferd rensefisk



Patogener funnet i rognkjeks:

VIRUS

VHSV

Nodavirus

IPNV

Lumpfish flavivirus (LFV)

Totivirus (CLuTV)

Coronavirus (CLuCV)

Ranavirus

BACTERIA

Tenacibaculum s

Piscirickettsia salmonis

Pasteurella sp

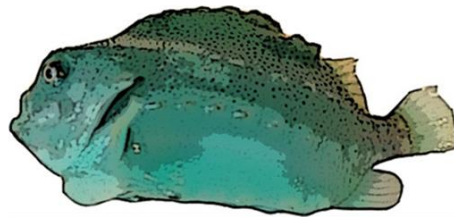
Aeromonas salmonicida

Moritella viscosa

Pseudomonas anguilliseptica

Vibrio sp

Epitheliocystis bacteria (phylum Chlamydiae)



FUNGI

Exophiala spp

PARASITES

Trichodina s

Scuticociliates

Ichthyophonus s

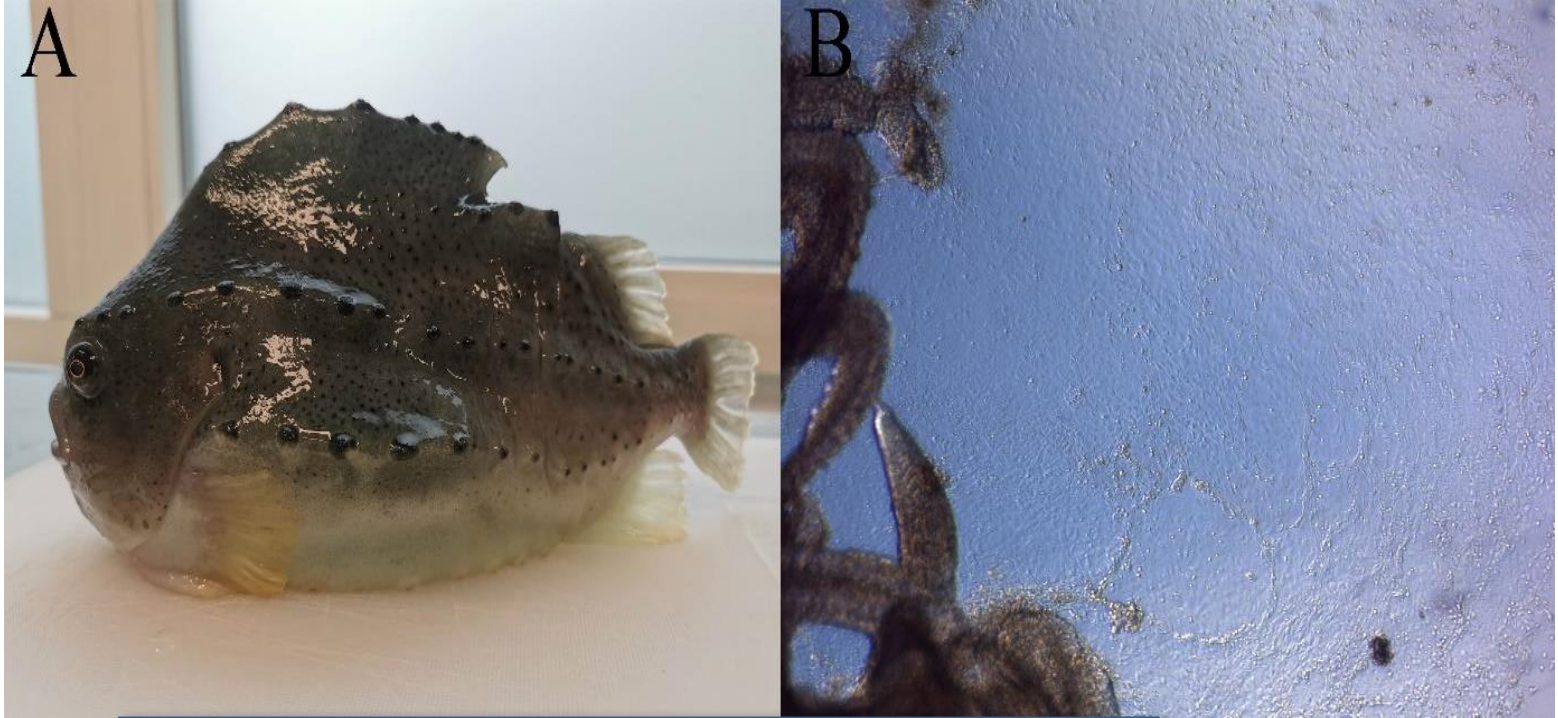
Nucleospora cyclopteri / *Ichthyobodo sp*

Paramoeba perurans

and many more!

Kilde: [Toni Erkinharju](#) et al, Cleaner fish in aquaculture: review on diseases and vaccination, 2020

Etablering av cellelinje - rognkjeks

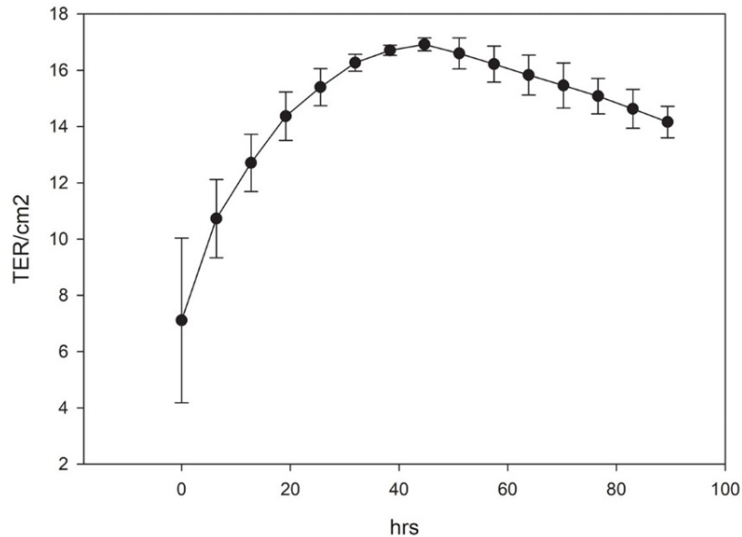


- Gjellevev ble tatt ut fra frisk oppdrettet rognkjeks.
- Cellekulturer ble etablert i vekstflasker i laboratoriet og passert >20 ganger.

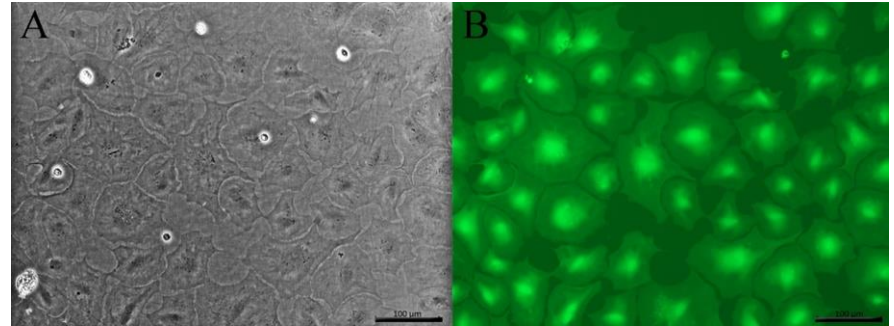
Cellekarakterisering:

- flate, polygonale og utstrekte - nesten transparente i utseende.

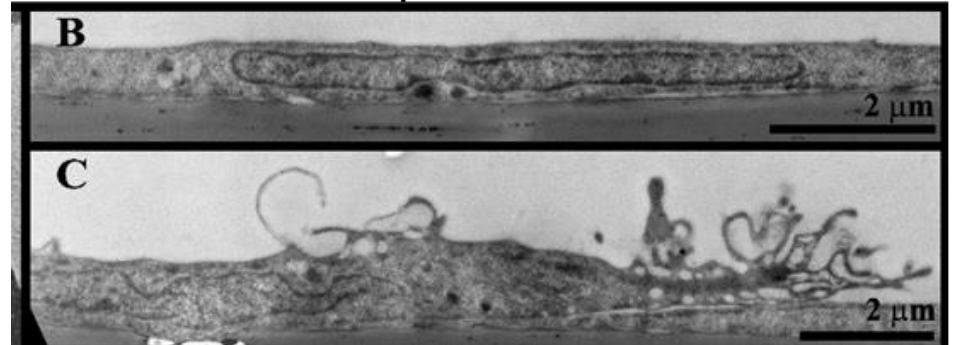
Barrierefunksjon (TER)



A. Lysmikroskopi B. Cellene farget med Calcein-AM for farging av levende celler og visualisert ved fluorescensmikroskopi.



Elektronmikroskopi:



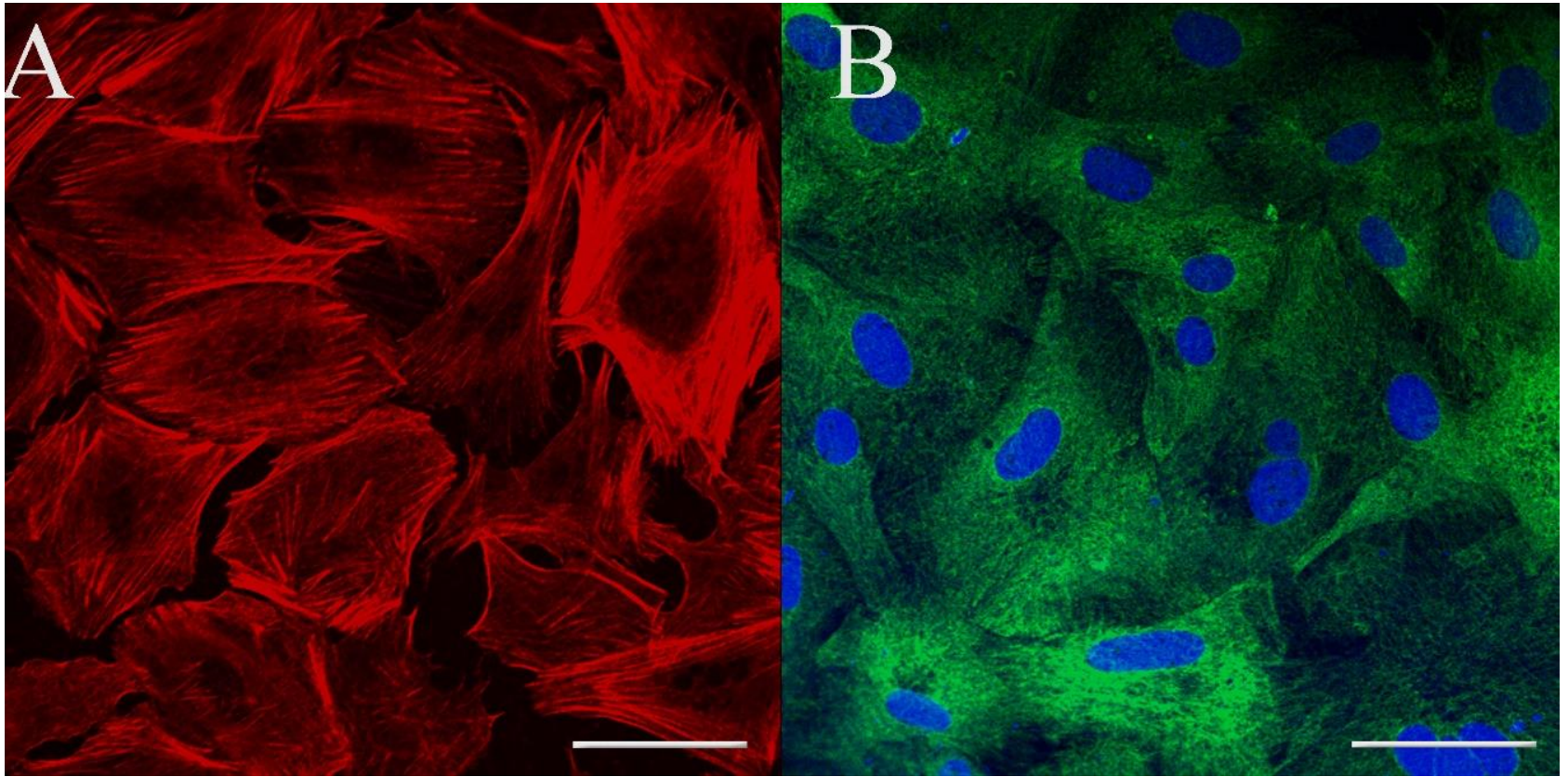
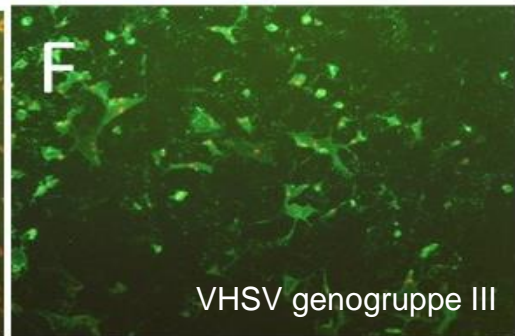
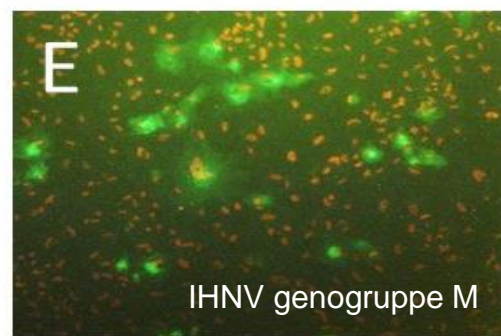
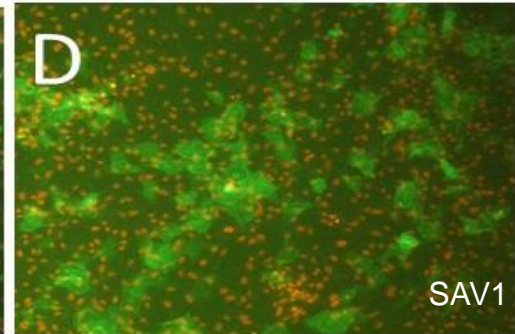
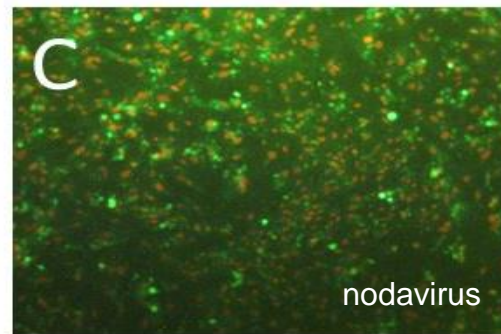
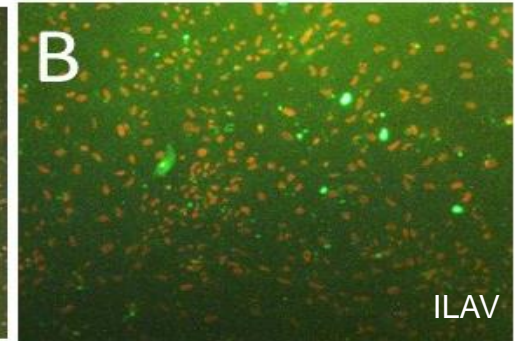
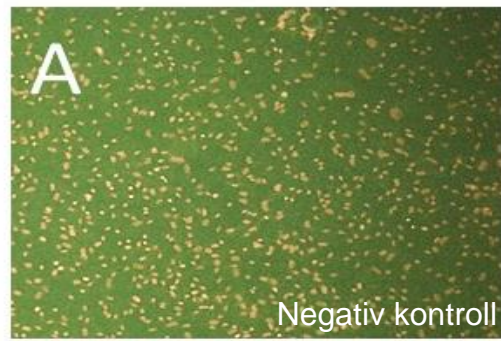


Figure 7: Cytoskeletal filament profile in the LG-1 cells. F-actin (A; phalloidin; red) and cyokeratin (B; green) were stained and visualized by confocal microscopy. Scale bar = 50 μ m.

Mottakelighet for ulike fiskevirus:



Rognkjeks cellemodell- publikasjoner



Establishment and Characterization of a Novel Gill Cell Line, LG-1, from Atlantic Langhåb (Cyclopterus langhob)

Wilde Geir H. Mørst, Espang T, Johnsen H, Sæviik M, Haugen B, Skjerve E, Salte R, Hestmarken R, Ståhl G, Selvig M, Skjerve E, Selvig M

- 1. Institute for Aquaculture Research, 1281 Kvithyllen, N-3370 Sandnessjøen, Norway
- 2. Institute for Aquaculture Research, 1281 Kvithyllen, N-3370 Sandnessjøen, Norway
- 3. Institute for Aquaculture Research, 1281 Kvithyllen, N-3370 Sandnessjøen, Norway
- 4. Institute for Aquaculture Research, 1281 Kvithyllen, N-3370 Sandnessjøen, Norway
- 5. Institute for Aquaculture Research, 1281 Kvithyllen, N-3370 Sandnessjøen, Norway
- 6. Institute for Aquaculture Research, 1281 Kvithyllen, N-3370 Sandnessjøen, Norway

Abstract: The use of cultured gill epithelial cells as models for toxicology and immunology in aquaculture is limited. However, the use of cultured gill epithelial cells as models for immunology and toxicology is increasing. The aim of the present study was to establish a novel gill cell line from Atlantic langhåb (*Cyclopterus langhob*). The cell line was established from gill tissue of Atlantic langhåb and characterized by morphology, growth characteristics, and antigenic profile. The cell line was found to be epithelial in origin and to express markers characteristic for gill epithelial cells. The cell line was named LG-1. The cell line was characterized by morphology, growth characteristics, and antigenic profile. The cell line was found to be epithelial in origin and to express markers characteristic for gill epithelial cells. The cell line was named LG-1. The cell line was characterized by morphology, growth characteristics, and antigenic profile.

CELLS
 Volume 15, Issue 1, 2012
 Pages 1-10
 ISSN 1680-273X
 DOI: 10.1002/cel.1155



In light microscopy, the adherent LG-1 cell population appeared flat, polygonal and epithelial, whereas transmission electron microscopy supported the observation of a homogeneous cell population in a well-cultured monolayer phase, suggesting cells of epithelial origin. Staining the cells with the fluorescent marker Calcein AM (fluorescence dye) showed no toxicity. When staining with the fluorescent marker, the cells demonstrated characteristics that LG-1 cells are representative of gill cells. The cells were cultured at 20 °C for at least 13 weeks without losing their staining response. It was concluded that LG-1 cells were cultured at 20 °C. Similarly, staining for DNA gave no signal, suggesting that most cells in the cell population were not dividing.

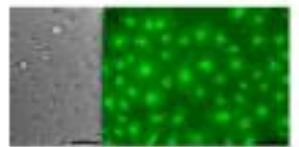


Fig. 1. Light microscopy image of the established LG-1 cell line. (A) Light microscopy. (B) The cell line was stained with Calcein AM and visualized by fluorescence microscopy using a DAPI.

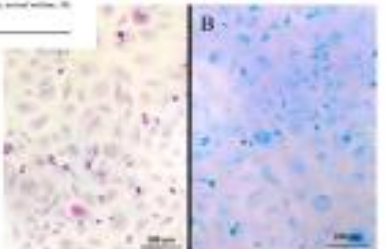


Figure 2. LG-1 cells stained with DAPI (A) and fluorescence image (B) to verify the presence of some cells with bright spots in the respective fluorescence image (A).

Vitenskapsinstituttet
 Vitenskapslaget

RESEARCH INSTITUTET
 VITENSKAPSLAGET



Cellelinje fra rognkjeks-gjeller etablert:

Kan kanskje hjelpe oss å forstå mer av artens biologi

Forskningsgruppen på Vitenskapsinstituttet, BioDirekt, har laget en cellelinje fra rognkjeks-gjeller. Spesialspørsmål og undersøkelser kan nå gjennomføres på denne cellelinjen som ligner den naturlige i miljøet på langhåb. Dette er første gang at man har etablert en cellelinje av rognkjeks-gjeller. Studiene av cellene viser at den kan benyttes spesielt som en modell for å utforske hvordan rognkjeks-gjeller fungerer.

Introduksjon:
 Vitenskapsinstituttet, BioDirekt, har laget en cellelinje fra rognkjeks-gjeller. Spesialspørsmål og undersøkelser kan nå gjennomføres på denne cellelinjen som ligner den naturlige i miljøet på langhåb. Dette er første gang at man har etablert en cellelinje av rognkjeks-gjeller. Studiene av cellene viser at den kan benyttes spesielt som en modell for å utforske hvordan rognkjeks-gjeller fungerer.

Bio-Direct prosjektet

Bio-Direct ble etablert i 2006 som et samarbeid mellom Vitenskapsinstituttet og Universitetet i Tromsø. Prosjektet er utarbeidet og gjennomført av et av forskningslagene i Bio-Direct. Bio-Direct er et samarbeid mellom Vitenskapsinstituttet og Universitetet i Tromsø. Prosjektet er utarbeidet og gjennomført av et av forskningslagene i Bio-Direct.



Nå er alle prosjektene på Bio-Direct avsluttet. Vitenskapsinstituttet har etablert et samarbeid med Bio-Direct. Prosjektet er utarbeidet og gjennomført av et av forskningslagene i Bio-Direct.

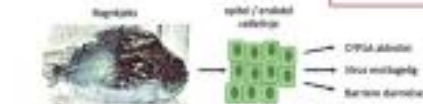
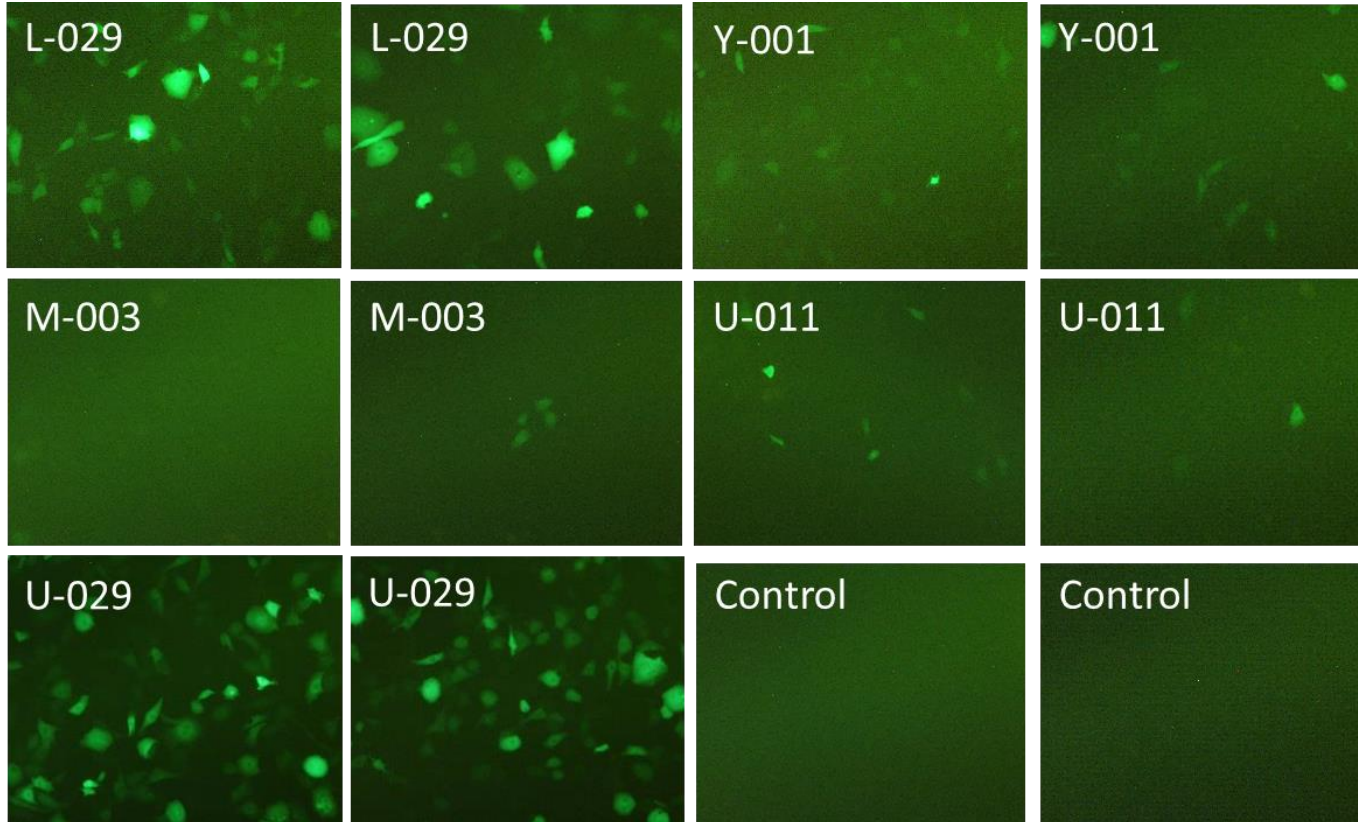


Fig. 1. Etablende av en cellelinje fra rognkjeks-gjeller. (A) Isolering av gjeller fra rognkjeks. (B) Etablende av en cellelinje fra rognkjeks-gjeller.

Optimalisering av transfeksjonsprotokoller for fiskeceller:



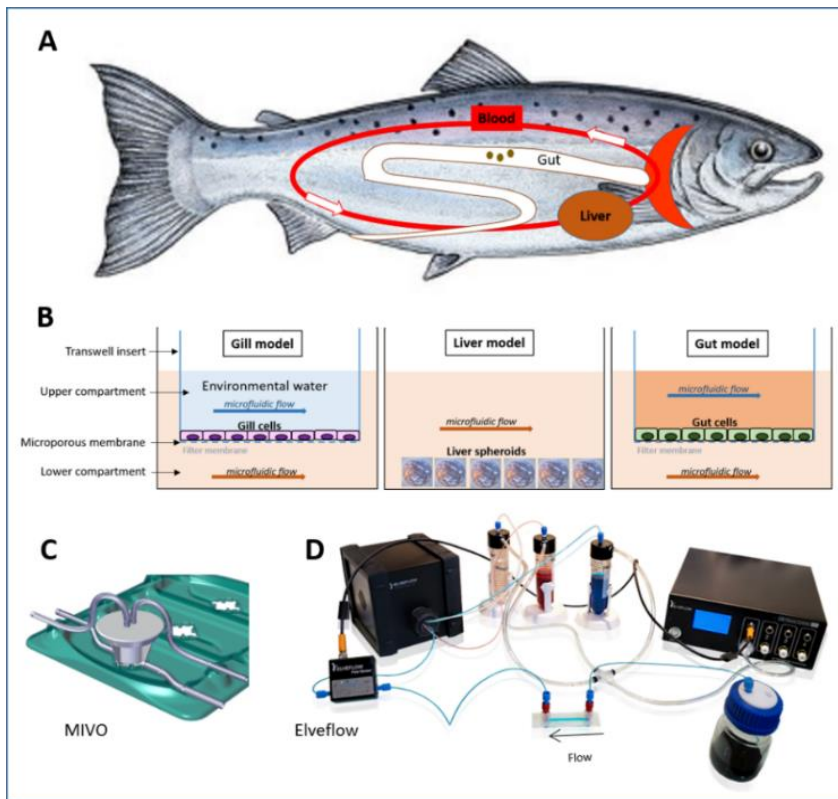
ASG10-celler
transfektet
med
plasmidvektor
med GFP-
markør (grønn
fluorescens)

Sammendrag:

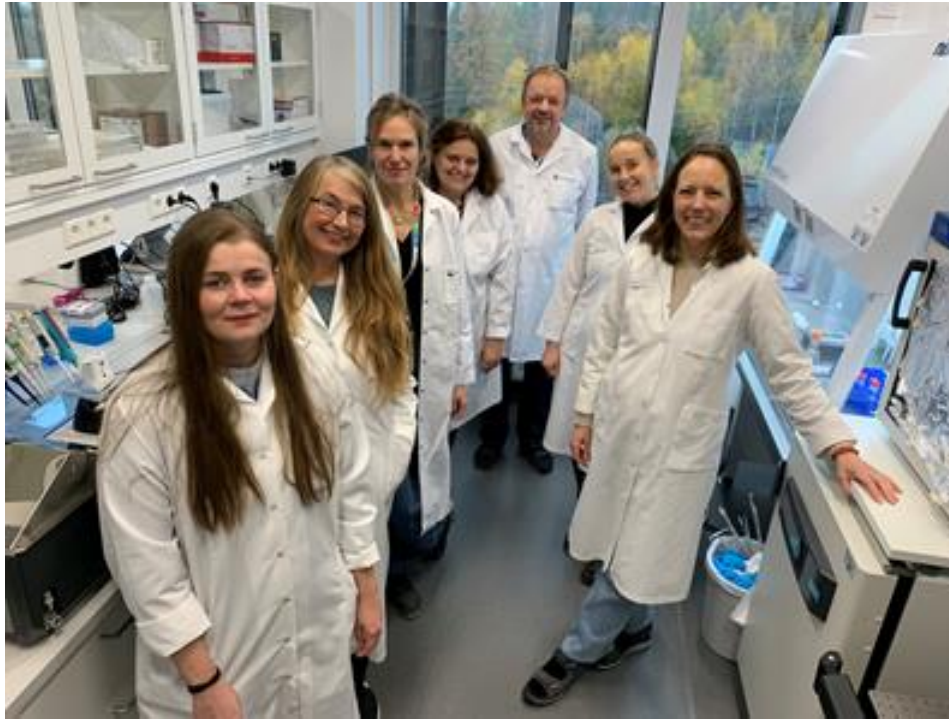
- Vi har etablert og karakterisert cellelinjer fra gjelle hos laks og rognkjeks
- Cellene kan benyttes i funksjonelle studier av gjelleepitelbiologi og av interaksjon mellom vert og smittestoffer.
- Cellene kan benyttes som et diagnostisk verktøy, f.eks. for påvisning av virussykdommer.
- Kan erstatte eller redusere behov for forsøk med levende fisk (3R)



Videre arbeid:



Jobbe for å øke
kjennskapen til
cellemodellene og
fremme bruk av de.



Takk for oppmerksomheten!