

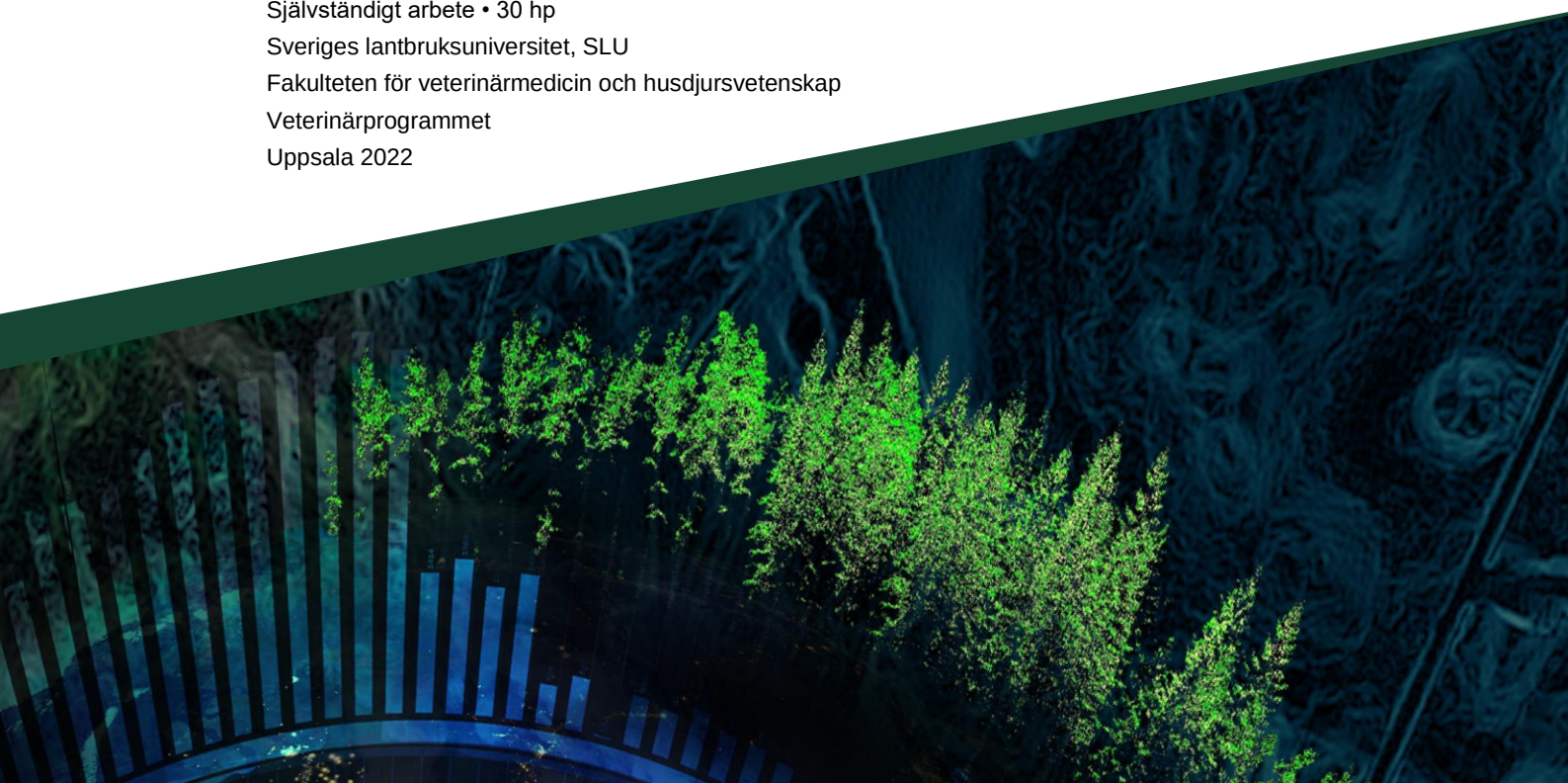


Utsöndrade extracellulära vesiklar (EV) från hästens spolmask *Parascaris univalens* och deras immunmodulerande roll

*Secreted extracellular vesicles (EV) from the equine parasitic roundworm
Parascaris univalens and their immunomodulatory role*

Karin Tufvesson

Självständigt arbete • 30 hp
Sveriges lantbruksuniversitet, SLU
Fakulteten för veterinärmedicin och husdjursvetenskap
Veterinärprogrammet
Uppsala 2022



Utsöndrade extracellulära vesiklar (EV) från hästens spolmask *Parascaris univalens* och deras immunmodulerande roll

Secreted extracellular vesicles (EV) from the equine parasitic roundworm Parascaris univalens and their immunomodulatory role

Karin Tufvesson

Handledare: Magnus Åbrink, Sveriges lantbruksuniversitet, Institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap (BVF)

Bitr. handledare: Frida Martin, Sveriges lantbruksuniversitet, Institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap (BVF)

Examinator: Eva Tydén, Sveriges lantbruksuniversitet, Institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap (BVF)

Omfattning: 30 hp

Nivå och fördjupning: A2E

Kurstitel: Självständigt arbete i veterinärmedicin

Kurskod: EX0869

Program/utbildning: Veterinärprogrammet

Kursansvarig inst.: Institutionen för kliniska vetenskaper

Utgivningsort: Uppsala

Utgivningsår: 2022

Nyckelord: Extracellulära vesiklar, *Parascaris univalens*, hästens spolmask, ST2, DUSP1, PCR

Sveriges lantbruksuniversitet

Fakulteten för veterinärmedicin och husdjursvetenskap

Institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap (BVF)

Enheten för immunologi

Publicering och arkivering

Godkända självständiga arbeten (examensarbeten) vid SLU publiceras elektroniskt. Som student äger du upphovsrätten till ditt arbete och behöver godkänna publiceringen. Om du kryssar i **JA**, så kommer fulltexten (pdf-filen) och metadata bli synliga och sökbara på internet. Om du kryssar i **NEJ**, kommer endast metadata och sammanfattning bli synliga och sökbara. Fulltexten kommer dock i samband med att dokumentet laddas upp arkiveras digitalt.

Om ni är fler än en person som skrivit arbetet så gäller krysset för alla författare, ni behöver alltså vara överens. Läs om SLU:s publiceringsavtal här:

<https://www.slu.se/site/bibliotek/publicera-och-analysera/registrera-och-publicera/avtal-for-publicering/>.

☒ JA, jag/vi ger härmed min/vår tillåtelse till att föreliggande arbete publiceras enligt SLU:s avtal om överlåtelse av rätt att publicera verk.

☐ NEJ, jag/vi ger inte min/vår tillåtelse att publicera fulltexten av föreliggande arbete. Arbetet laddas dock upp för arkivering och metadata och sammanfattning blir synliga och sökbara.

Sammanfattning

Under det senaste decenniet har ett nytt forskningsområde vuxit fram som handlar om kartläggning av extracellulära vesiklar (EV) från parasiter samt hur de kan påverka värdjurets immunförsvar. EV är lipidmembranförsedda blåsor innehållande bland annat proteiner och nukleinsyror och som används för cellkommunikation. Parasiter kan använda EV för att kommunicera med värdjurets celler och modifiera dem till sin fördel.

Då fler och fler parasiter utvecklar resistens mot anthelmintika är det önskvärt att hitta ett alternativt behandlingssätt. Ett alternativ som diskuteras inom forskarvärlden är att rikta ett vaccin mot parasitens EV, vilket skulle blockera EV:s inverkan på värdjuret och i längde förhindra en parasitinfektion.

För att kunna skapa ett vaccin krävs dock gedigen grundforskning. I detta arbete tas ett första steg att undersöka EV från *Parascaris univalens* (hästens spolmask). Ett av huvudsyftena med arbetet var att visa att EV från *P. univalens* larver går att rena fram i *in vitro* kultur. Detta lyckades fastslås genom att detektera specifika gener för *Parascaris*, ”glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase” (GPD-1) och aktin, i framrenade EV.

I arbetet undersöktes även hur *P. univalens*-larver och deras exkretoriska/sekretoriska produkter (ESP), innehållande bland annat EV, påverkar hästens immunceller. Med hjälp av qPCR studerades genuttrycksförändringar hos ”dual specificity protein phosphatase 1” (DUSP1), en gen som påverkar ”mitogen-activated protein” (MAP)-kinas signalering. Resultatet visar att DUSP1 ökar i uttryck hos immunceller utsatta för *P. univalens*-larver. Resultaten är dock osäkra och det krävs flera liknande försök för att säkerställa sambandet.

Utöver detta utformades även ett protokoll för att skapa bakteriefria larvkulturer av *P. univalens*, vilket framöver kommer underlätta vid cellkultursförsök med parasitlarver. Arbetet ledde även till modifiering av protokoll för larvutveckling på grund av upptäckten att larvutvecklingen försämras när för många ägg inkuberas tillsammans. Bästa resultaten sågs när färre än 10 000 ägg inkuberades, i 15 ml vatten.

Den lyckade framreningen av EV, *P. univalens* larvers påverkan på DUSP1:s genuttryck samt utformningen och modifieringen av protokoll rörande hantering av *P. univalens*-larver lägger grunden för fortsatta studier av EV från *Parascaris*. Förhoppningen är att detta i framtiden kan leda till upptäckten av en lämplig vaccinkandidat mot parasiten.

Nyckelord: Extracellulära vesiklar (EV), *Parascaris univalens*, hästens spolmask, ST2, DUSP1, PCR

Abstract

In the last decade, research on how extracellular vesicles (EV) from parasites can affect the host has become an increasing area of research. EV are lipid membrane vesicles containing proteins and nucleic acids among other things and are used for cell-cell communication. Parasites' EV are used by the parasite to communicate and modify the host's immune system.

As an increasing number of parasites develop resistance to anthelmintics, it is desirable to find an alternative treatment. An alternative that is being discussed within the research community is to target a vaccine against the parasite's EV and thus block their impact on the host animal and in the long run prevent a parasitic infection.

In order to create a vaccine, however, basic research is required. In this work, a first step is taken to investigate EV from *Parascaris univalens* (the equine roundworm). One of the main purposes of the work was to show that EV from *P. univalens* larvae can be purified in *in vitro* culture. This was established by detecting specific genes for *Parascaris*, glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GPD-1) and actin, in purified EV.

The work also investigated how *P. univalens* larvae and their excretory/secretory products (ESP), containing EV among other things, affect equine immune cells. By using qPCR, changes in gene expression were studied in dual specificity protein phosphatase 1 (DUSP1), a gene that affects mitogen-activated protein (MAP) kinase signaling. The results show an increase expression of DUSP1 in immune cells exposed to *P. univalens* larvae. The results, however, are uncertain and further cell culture experiments are needed to ensure the correlation.

In addition, a protocol was designed to create bacteria-free larval cultures from *P. univalens*, which in the future could be of use for cell culture experiments with parasitic larvae. The work also led to modification of protocol for larval development of *P. univalens*, due to the discovery of poor larval development when too many eggs were incubated together. The best results were seen when less than 10 000 eggs were incubated, in 15ml of water.

The successful purification of EV, *P. univalens* larvae's impact on DUSP1 gene expression and the design and modification of protocols for the management of *P. univalens* larvae, lay the foundation for further studies of *Parascaris*' EV. Hopefully, in the future, it may lead to the discovery of a suitable vaccine candidate against the parasite.

Keywords: Extracellular vesicles (EV), *Parascaris univalens*, equine roundworm, ST2, DUSP1, PCR

Innehållsförteckning

Förkortningar	9
1. Inledning	11
2. Litteraturoversikt	12
2.1. <i>Parascaris</i> spp.	12
2.2. Immunförsvar mot gastrointestinala helminter	13
2.2.1. Tarmens akuta immunsvär	14
2.2.2. Leverns och lungornas immunsvär	15
2.2.3. Kroniskt immunsvär	16
2.3. Extracellulära vesiklar (EV) och deras immunmodulerande förmåga	16
3. Studiedesign	19
4. Material och metod	20
4.1. Rening av parasitägg	20
4.2. Kläckning av ägg och hantering av parasitlarver	20
4.3. Cellkulturförsök	21
4.4. Isolering av RNA från EV och celler	22
4.5. Primerdesign	23
4.5.1. Primer för RT-PCR av EV-prover	23
4.5.2. Primer för qPCR av cellkultursprover	23
4.6. cDNA syntes	24
4.7. RT-PCR	25
4.8. qPCR	25
4.9. Beräkning av relativt genuttryck och statistisk analys	26
5. Resultat	27
5.1. Larvutveckling	27
5.2. Utformning av nya metoder	28
5.3. RT-PCR resultat	28
5.4. qPCR resultat	31
6. Diskussion	32
6.1. Larvutveckling	32

6.2.	Metodproblem.....	32
6.3.	EV extraktion	33
6.4.	Design av primerpar	34
6.5.	qPCR resultat och genuttryck.....	35
6.6.	Konklusion	37
Referenser.....		38
Tack		45
Populärvetenskaplig sammanfattning		46
Bilaga 1 – Hantering av parasitägg och larver		48
Bilaga 2 – cDNA syntes och PCR		50

Förkortningar

AAM	Alternativt aktiverade makrofager
BAL	Bronkoalveolärt lavage
cDNA	Complementary DNA
Cq	Cycle quantification
DNA	Deoxyribonucleic acid
DUSP1	Dual specificity protein phosphatase 1
ESP	Exkretoriska/sekretoriska produkter
EV	Extracellulära vesiklar
GAPDH	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase för djurceller
gDNA	Genomisk DNA
GPD-1	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase för <i>Parascaris</i>
HBSS	Hank's Balanced Salt Solution
IL	Interleukin
ILC	Innate lymfoid cell
MAP	Mitogen-activated protein
mRNA	Messenger-RNA
miRNA	Mikro-RNA
NCBI	The National Center for Biotechnology Information
PCR	Polymerase chain reaction
qPCR	Quantitative PCR
RNA	Ribonucleic acid
RPL32	Ribosomalt Protein L32
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RT-PCR	Reverse Transcriptase PCR
SLU	Sveriges lantbruksuniversitet
Spp.	Species
ST2	Stimulation-2
SVA	Sveriges veterinärmedicinska anstalt
Th cell	T-hjälparcell
TGF- β	Transforming growth factor-beta
TSLP	Thymic stromal lymphopoietin

1. Inledning

Ökad resistensutveckling mot antibiotika hos bakterier är ett välkänt problem. Att resistens mot olika anthelmintika hos parasiter också är ett alltmer växande problem är kanske inte lika välkänt. Till exempel uppvisar hästens spolmask *Parascaris univalens* idag multiresistens mot alla tre klasser av anthelmintika (Martin 2021).

Parascaris är en rundmask som orsakar problem och sjukdom hos föl och åringar (Nielsen *et al.* 2014). I Sverige anses prevalensen av hästens spolmask vara hög och på nio svenska gårdar som Lind & Christensson (2009) undersökte låg prevalensen på 48 % bland fölen. Det sker ofta en rutinavmaskning av föl utan att föregå träckprovsundersökning vilket annars är standard för annan avmaskning hos vuxna hästar (SVA 2020). Ett överanvändande av avmaskningsmedel har resulterat i läkemedelsresistens och ett alternativt behandlingssätt mot spolmaskinfektion är därför önskvärt.

Ett alternativ till avmaskning skulle vara att vaccinera värdjuret mot parasiten. På senare år har så kallade parasitära extracellulära vesiklar (EV) diskuterats som ett möjligt mål för ett vaccin (Eichenberger *et al.* 2018a; Sotillo *et al.* 2020; Sánchez-López *et al.* 2021). EV är små lipidmembranförsedda blåsor som används av celler från alla olika domäner, för cellkommunikation (Deatherage & Cookson 2012). Parasiter använder sig av EV för att kommunicera med och manipulera värdjurets celler och därigenom förbättra parasitens chans till överlevnad (Sánchez-López *et al.* 2021). På så vis skapas tolerans för parasiten vilket möjliggör kronisk infektion.

Syftet med detta arbete är att kartlägga de än så länge outforskade EV från hästens spolmask. Målet är att rena fram EV från *P. univalens*-larver. Därefter att undersöka larvernas och de utsöndrade produkternas (däribland EV) immunmodulerande förmåga *in vitro*. Detta skulle lägga grunden för fortsatta studier som i längden kan leda till en lämplig vaccinkandidat.

2. Litteraturöversikt

2.1. *Parascaris* spp.

Parascaris tillhör familjen spolmaskar, *Ascarididae*, och infekterar hästar (Lind & Christensson 2009). Andra arter av spolmaskar är exempelvis *Ascaris suum* (grisens spolmask), *Ascaris lumbricoides* (människans spolmask) (Bradley & Jackson 2004) och *Toxocara canis* (hundens spolmask) (Gillespie 1988). Dessa tre infekterar framför allt gris, människa och hund, men kan även vara zoonotiska (Gillespie 1988; Bradley & Jackson 2004). De finns två olika arter av *Parascaris*; *Parascaris equorum* som har räknats som den traditionella hästspolmasken, och *Parascaris univalens* (Goday & Pimpinelli 1984) som på senare tid visats vara den huvudsakliga arten som infektera hästar (Nielsen *et al.* 2014; Martin *et al.* 2018). Det som främst skiljer dessa arter från varandra är att *P. equorum* har två par kromosomer medan *P. univalens* har ett par. De går dock inte att skilja dessa arter åt makroskopiskt och Nielsen *et al.* (2014) hävdar att om en artidentifiering inte är gjord bör hästens spolmask betecknas som *Parascaris* species (spp.) och är anledningen varför det framöver i litteraturöversikten kommer benämnas *Parascaris* spp.

Parascaris spp.:s livscykel består av ett oralintag av ägg innehållande det infektiösa larvstadiet L2 från miljön (Burk 2013). Efter att ägget kläckts tar sig larven igenom tunntarmens slemhinna till blod- eller lymfkärl för vidare transport till levern (Clayton & Duncan 1979). Väl i levern migrerar larven genom parenkymet i ca en vecka vilket ger upphov till lesioner och senare fibros. Larvutvecklingen då L2 blir till L3 är inte klarlagt än men Burk (2013) resonerar att det sker innan larverna når levern. Från levern tar sig larverna till lungan och återfinns där ca två veckor efter äggintaget (Clayton & Duncan 1979). Larverna kommer därefter migrera upp i trakea, bli upphostade till svalget, för att sedan sväljas ner och återvända till tunntarmen (Burk 2013). I tunntarmen utvecklas de först till L4 och sedan till vuxna maskar. Som vuxna maskar fortplantar de sig och utsöndrar stora mängder ägg som följer med avföringen ut i miljön och utvecklas till infektiösa larver i ägget, vilket under optimala förhållanden tar runt 10 dagar (Burk 2013).

Spolmaskinfektion brukar betraktas som de ungas infektion då de verkar vara mer mottagliga (Holland 2009; Gazzinelli-Guimarães *et al.* 2013). Detta gäller även för *Parascaris* spp., då infektion främst utgör ett problem bland föl och unghästar (Nielsen *et al.* 2014). Infektionen kan ge upphov till allt från milda respiratoriska sjukdomstecken såsom hosta och bilateralt näsflöde och mer diffusa kliniska tecken såsom trötthet, viktnedgång och försämrad tillväxt, till allvarliga fall där parasitbördan av vuxna maskar i tarmen blivit så stor att den leder till obstruktion (Clayton & Duncan 1978). I värsta fall kan tarmen rupturerat, vilket kan vara fatalt (Cribb *et al.* 2006).

Lind & Christensson (2009) undersökte prevalensen av *Parascaris* spp. bland föl på nio svenska gårdar och kom fram till en prevalens på 48 %. Det kan jämföras med en prevalens mellan 31–58 % internationellt (Martin *et al.* 2018). Prevalensen bland äldre hästar är betydligt lägre. I Relf *et al.* (2013) studie sågs en prevalens på 4 % vid 1 års ålder som sjönk till 3 % i åldern 2–4 år och sedan 1 % vid 5–14 år.

Eftersom prevalensen är hög och att en infektion med *Parascaris* spp. kan ha en dödlig utgång avmaskas föl oftast rutinmässigt i Sverige (SVA, 2020). Sveriges veterinärmedicinska anstalts (SVA) rekommenderar behandling med anthelmintika vid 8–10 veckors ålder och sedan igen vid 16–18 veckors ålder. Konsekvensen av en rutinmässig överanvändning av läkemedlen är en ökad resistensutveckling och i Sverige finns utebliven effekt rapporterad för alla tre anthelmintika klasser (Martin 2021).

2.2. Immunförsvar mot gastrointestinala helminter

En generell term för parasitära maskar som infekterar värdjuret genom tarmkanalen är gastrointestinala helminter (Ávila & Isaac 2013). De inbegriper nematoder (rundmaskar), trematoder (plattmaskar) och cestoder (bandmaskar). Värddjurets immunologiska svar mot parasiter kommer här beskrivas generellt för gastrointestinala helminter och endast i vissa fall lyfta fram immunsvaret mot spolmaskar/*Parascaris*. Det beror dels på att immunförsvaret mot gastrointestinala helminter i generella drag är lika varandra, dels på grund av att det endast är få studier (till exempel Srihakim & Swerczek 1978; Clayton & Duncan 1979) som belyser hästens immunförsvar vid en *Parascaris*-infektion.

De flesta studier som finns kring värdjurets försvar mot gastrointestinala helminter är gjorda på möss (Anthony *et al.* 2007). För specifikt spolmaskinfektion har främst grisens spolmask *A. suum* använts och då även det på musmodeller (Gazzinelli-Guimarães *et al.* 2013). Mycket av denna kunskap kan med stor sannolikhet extrapoleras även på hästens försvar mot *Parascaris*.

Spolmaskinfektion räknas som kronisk till sin natur (Holland 2009), till exempel kan *A. suum* infektion pågå i 1-2år (Midttun *et al.* 2018). En spolmaskinfektion kan därmed delas upp i en akut och kronisk fas (Gazzinelli-Guimaraes & Nutman 2018). Dessa två faser har två olika immunsvär. För att bäst gå igenom dessa reaktioner kommer det här följa parasitens väg genom kroppen och vilken respons det genererar i de olika vävnaderna, med början i tarmen.

2.2.1. Tarmens akuta immunsvär

Under den akuta fasen, när parasitlarven kommer till tarmen och påbörjar sin migration genom vävnaden aktiveras ett T-hjälparcell 2 (Th-2) svar (Bradley & Jackson 2004). Det genererar i sin tur ett lokalt svar i den aktuella vävnaden. Th2-svar karaktäriseras av aktivering av IgE producerande B-celler, eosinofiler, mastceller samt basofiler (Anthony *et al.* 2007) och är kopplat till stora extracellulära patogener samt allergier (Abebe & Bjune 2009; Vivier *et al.* 2018). Till skillnad från T-hjälparcell 1 (Th1) -svar som snarare aktiverar cytotoxiska T-celler, neutrofiler och makrofager (Anthony *et al.* 2007) och bekämpar framför allt intracellulära patogener i form av bakterier, virus och tumörceller (Abebe & Bjune 2009; Vivier *et al.* 2018).

Aktiveringen av Th-2 svaret sker genom att epiteliala sensoriska celler, så kallade tuftceller, detekterar helminterna i tarmen och skickar ut alarminer, det vill säga cytokiner som slår larm (Cortés *et al.* 2017). De främsta alarminerna som skickas ut är interleukin (IL)-25, IL-33 och "thymic stromal lymphopoietin" (TSLP), vilka får typ 2 celler att aktiveras och differentiera. Med typ 2 celler menas i detta fall celltyper som aktiveras och skickar ut typ-2 associerade cytokinerna, IL-4, IL-5, IL-9, IL-13 (Gazzinelli-Guimaraes & Nutman 2018). Det innefattar Th-2, som tillhör det förvärvade immunförsvaret, och "innate lymfoid cell" (ILC)-2, vilket tillhör det medfödda immunförsvaret. ILC1, 2, 3 är relativt nyupptäckta celltyper och kan liknas med det medfödda immunförsvarets variant av Th1, Th2 och Th17 (Vivier *et al.* 2018). ILCs saknar de antigenspecifika receptorer som Th-cellerna har men kan upptäcka förändringar i mikromiljön och aktiveras av alarminer, neurotransmittorer, och komponenter från nutrition och mikroorganismer (Panda & Colonna 2019).

Frisättningen av typ-2associerade cytokiner får flera följder för tarmen. Detta leder dels till vad som brukar kallas för "weep and sweep response" (von Moltke *et al.* 2016) och som innebär en hyperplasi av bägarceller och tuftceller i tarmen, ökad utsöndring av mukus, ökad omsättning av epitelceller och ökad kontraktion av glattmuskulaturen (Sorobetea *et al.* 2018). Allt detta för att försöka skölja ut parasiterna. Denna reaktion upprätthålls och förstärks också av en positiv feedbackloop mellan ILC2 och tuftceller (von Moltke *et al.* 2016). Likt ILC celler är

tuftceller också relativt outforskade, trots att de upptäcktes för mer än 50 år sedan. De har dock visat sig ha en viktig funktion mot gastrointestinala helminter i det att de är den primära källan till IL-25 som initierar den positiva feedbackloop (von Moltke *et al.* 2016).

Utöver tarmens ”weep and sweep respons” leder de typ 2-associerade cytokinerna också till en proliferation av mastceller, eosinofiler, basofiler i tarmväggen samt får makrofager att differentiera ut till alternativt aktiverade makrofager (AAM) (Allen & Maizels 2011). Vid en helmintinfektion har AAM visat sig främja ett Th2 svar, samt kontrollera pro-inflammatoriska- och Th1-reaktioner och hjälper till i läkningsprocessen (samanställt i Kreider *et al.* 2007).

2.2.2. Leverns och lungornas immunsvär

Stora delar av leverns immunsvär till spolmaskarnas migration utgör än så länge en kunskapslucka (Else *et al.* 2020). Vad man vet är att infektion med *Ascaris* spp. leder till stark inflammatorisk respons med hög infiltration av granulocyter, så som eosinofiler (Srihakim & Swerczek 1978) och makrofager (Dold *et al.* 2010). Migrationen genom leverparenkymet leder även till ökade nivåer av fria syreradikaler och proteiner kopplade till komplementsystemet (Deslyper *et al.* 2016).

När *Ascaris* larverna senare migrerar till lungorna ses en delvis snarlik respons som i tarmen genom att ge upphov till neutrofil-, makrofag- och eosinofil infiltration. Gazzinelli-Guimarães *et al.* (2013) visade att i samband med att de första larverna anländer till lungorna stiger nivåerna av IL-5 (dag 4 efter infektion) hos möss infekterade med *A. suum*. Författarna resonerar att det har som funktion att locka dit eosinofiler och att en möjlig källa för IL-5 även här kan vara ILC-2 då epitelcellerna, eller snarare tuftceller (von Moltke *et al.* 2016), i lungorna kan skicka ut IL-25 och IL-33 som aktiverar ILC-2. Vidare visar Gazzinelli-Guimarães *et al.* (2013) studie att när det var som flest larver i lungorna (kring dag 8 efter infektionsstart) skedde en ökad infiltration av neutrofiler. Detta följdes lite senare av en infiltration av makrofager och eosinofiler. I Nogueira *et al.* (2016) studie sågs dock eosinofil- och lymfocytinfiltration främst hos möss som utsatts för upprepad infektion med *A. suum* medan bronkoalveolärt lavage (BAL)-sköljvätskan från engångsinfekterade möss endast hade ökad mängd protein och erytrocyter. De visade att vid upprepade infektioner fick mössen starkare immunrespons i lungorna och färre larver lyckades migrera ut från lungorna.

Det finns även en del studier specifikt gjorda på *Parascaris* spp. som visar att infekterade föl får ökad mängd eosinofiler i lungorna och levern (Srihakim & Swerczek 1978) samt i blodet (Clayton & Duncan 1979). Clayton & Duncan (1977) visade också en koppling mellan ökad mängd eosinofiler och återinfekterade individer.

2.2.3. Kroniskt immunsvar

När *Ascaris* spp. slutligen kommer tillbaka till tarmen etablerar de en kronisk infektion som kännetecknas av immunförsvärsbild som är tillåtande mot parasiten. Th2 svaret moduleras till att vara mer tolerant för parasiter genom proliferation av regulatoriska T-celler (Treg), immunmodulerande monocyter (såsom toleranta dendritiska celler och AAM) och ökade mängder av IL-10 och ”transforming growth factor-beta” (TGF- β), som är immunhämmande cytokiner (Eichenberger *et al.* 2018a). Förutom att det leder till en parasittolerans så hindrar det även en överreaktion av immunförsväret såsom vid allergier och autoimmuna sjukdomar. Av den anledningen diskuterats helminter som ett möjligt sätt att behandla dysfunktionellt immunförsvär som en form av immunoterapi, vid till exempel Crohns sjukdom (Maizels 2016).

2.3. Extracellulära vesiklar (EV) och deras immunmodulerande förmåga

Parasiter har utvecklat sätt att undvika upptäckt av värddjurets immunförsvär och modulera det till parasitens fördel (Sotillo *et al.* 2020). Ett sätt är att utsöndra olika substanser, så kallade exkretoriska/sekretoriska produkter (ESP). ESP inbegriper dock allt som parasiten utsöndrar till sin omgivning, det vill säga både ”avfallsprodukter” och aktivt utsöndrade funktionella molekyler såsom specifika proteiner, lipider, metaboliter och nukleinsyror samt extracellulära vesiklar (EV) (Sotillo *et al.* 2020; Sánchez-López *et al.* 2021).

EV är små lipidmembranförsedda blåsor som innehåller en rad olika molekyler såsom proteiner, nukleinsyra, lipider och olika metaboliter (Tritten & Geary 2018). Förmågan att utsöndra EV är konserverad bland alla domäner av organismer; från bakterier och arkéer till eukaryoter såsom djur- och växtceller, och används bland annat för cellkommunikation (Deatherage & Cookson 2012). EV kan delas upp i tre olika undergrupper beroende på deras ursprung och storlek; exosomer, mikrovesiklar och apoptotiska kroppar (Yáñez-Mó *et al.* 2015). Exosomer definierades för första gången på 1980-talet och har sedan dess studerats flitigt på djurceller och inom cancerforskning (Zhang *et al.* 2020). Det är först under det senaste decenniet som parasiters EV har börjat karaktäriseras (Sotillo *et al.* 2020) och hittills har inte någon funktionell skillnad påvisats mellan de olika subtyperna av parasiternas vesiklar (Sánchez-López *et al.* 2021).

Parasit EV innehåll på proteiner och mikroRNA (miRNA) är bäst utforskat bland helminter och det som tros ha störst inverkan på värddjurets celler, även om lipider också visat sig ha viss inverkan (Eichenberger *et al.* 2018a). miRNA är en konser-

verad klass av små, icke-kodande, 21-24 nukleotider lång RNA-molekyl som kontrollerar genuttryck genom att binda in till specifika mål-mRNA ("messenger-RNA") och förhindra transkriptionen av dessa till protein (Sotillo *et al.* 2020). På så vis kan parasitens miRNA styra vilka proteiner som kommer till uttryck hos värdjurets celler. Att EV från nematoder har en immunmodulerande funktion har flera studier visat (Buck *et al.* 2014; Coakley *et al.* 2017; Hansen *et al.* 2019).

Buck och medarbetare visade att EV miRNA från *Heligmosomoides polygyrus* nedreglerar generna "Dual specificity protein phosphatase 1" (DUSP1) och Stimulation-2 (ST2) *in vitro* (Buck *et al.* 2014). DUSP1 reglerar mitogen-activated protein (MAP)-kinas. Aktivering av genen leder till ökade nivåer av IL-10 (som brukar kopplas till immuntolerans), men minskad mängd av IL-6 och ökade kväveoxid-nivåer; en profil som är förknippat med parasitutdrivning (Eichenberger *et al.* 2018a). ST2 är receptorn för alarminet IL-33 och signalering via ST2 leder till aktivering av ILC2. ILC2 i sin tur utsöndrar IL5, vilket är ett kemokin för eosinofiler. På så vis leder en aktivering av ST2 bland annat till eosinofili. *H. polygyrus*:s inhibering av ST2-receptorn och DUSP1 blockerar Th2-svarets eosinofili, vilket är fördelaktigt för parasiten (Lee & Rosenberg 2013). Buck *et al.* (2014) visar även att *H. polygyrus* EV kan *in vivo* hämma ILC2:s utsöndring av IL-5 och IL-13, vilket ledde till ett reducerat antal eosinofiler hos möss som på konstgjord väg fått lung-eosinofili. EV från *H. polygyrus* har dessutom visat sig kunna inhibera aktivitet av typ 1 (proinflammatoriska) och typ 2 (AMM) makrofager (Coakley *et al.* 2017). Detta verkar dock inte gälla alla nematoder då EV från *Brugia malayi* i stället framkallar aktivering av typ 1 makrofager (Zamanian *et al.* 2015).

Hansen *et al.* (2019) analyserade EV-innehåll hos olika larvstadier samt vuxna maskar av *A. suum* och identifierade miRNA som potentiellt kan ha alarminerna IL-25 och IL-33 samt typ 2 cytokinet IL-13 som mål. De identifierade även en rad proteiner som kan påverka immunförsvaret åt olika håll. Exempelvis proteinaser som tros kunna bryta ner immuncellers receptorer (Eichenberger *et al.* 2018b) samt olika heat shock proteins (HSP) som kan fungera som alarminer för immunförsvaret (Eichenberger *et al.* 2018a). Studien av Hansen *et al.* (2019) visade också att EV-innehållet skiljer sig till viss del åt hos olika larvstadier respektive vuxna maskar av *A. suum*. Värt att notera är att det infektiösa stadiet L3 av *A. suum* hade flest unika miRNA, i jämförelse mot de andra larvstadiernas och vuxna maskarnas EV.

Så vad kan ökad kunskap kring EV eventuellt leda till? På grund av EV immunmodulerande förmåga diskuterar forskningsfältet idag följande: om EV kan användas vid immunterapi eller som möjligt diagnostiskt verktyg för enkel detektion av parasitinfektion i blodprov, samt om EV kan fungera som "blue-print" vid vaccin-formulering (Eichenberger *et al.* 2018a; Sotillo *et al.* 2020; Drurey & Maizels 2021). Så kallade "single-antigen"-vacciner mot parasiter har historiskt sett

visat sig ge ett undermåligt skydd mot infektion (Gu *et al.* 2013). Genom att använda sig av ”genomic-led reverse vaccinology” där hela genomet hos parasiten jämförs mot andra parasitarters genom kan flera konserverade gener identifieras och väljas ut som lämpliga vaccinkandidater (Autheman *et al.* 2021). Då parasiter är komplexa organismer kan ett multi-peptidvaccin också diskuteras för att ge ett tillräckligt brett immunsvär.

3. Studiedesign

Parascaris-äggen som används i försöket kommer från hästar som varit del i Frida Martins försök och är artbestämda som *P. univalens*.

Huvudsyftena med detta arbete är att visa att EV från *P. univalens* går att rena fram och därefter undersöka deras inverkan på immunceller. För att påvisa *Parascaris*-EV i proverna kommer "housekeeping"-gener GPD-1 och aktin från *Parascaris* användas. "Housekeeping"-gener är gener som håller ett stabilt uttryck i alla celler på grund av att de har en grundläggande funktion i cellen (Kozera & Rapacz 2013). Exakt hur cellen distribuerar RNA-innehållet i EV är inte klarlagt (Singh *et al.* 2021). Här utgås det ifrån att housekeeping gener med större sannolikhet kan hittas i EV jämfört med andra gener.

För att undersöka *P. univalens* larvernas och deras EV:s förmåga att modulera immunceller kommer genuttrycksförändringar att studeras för ST2 och DUSP1. Dessa gener väljs på grund av Buck med medarbetare (2014):s upptäckt att EV från *Heligmosomoides polygyrus* både i *in vitro* och *in vivo* kan förändra genuttrycket hos epitelceller hos mus. Hypotesen är att även *P. univalens* kan ha denna inverkan på immunceller. ST2, som är receptorn till IL-33 och som kan initiera ett Th-2 svar, finns i stor utsträckning hos immunceller (Griesenauer & Paczesny 2017). Både hos celler i medfödda immunsystemet och i det förvärvade. Därför anses chanserna att se en genuttrycksförändring hos ST2 vara stora. DUSP1 å sin sida, var den gen som Buck med medarbetare (2014) hade sett störst förändringar i genuttryck hos och därför är också den intressant att studera.

Under studiens gång utformades en delstudie som inte var med i ursprungliga planen för arbetet. När äggen renats fram och står under utveckling att bli larver, studerades larvutvecklingen. Syftet var att undersöka om sättet äggen lagrats på innan larvutvecklingen påbörjas samt om äggkoncentrationen under larvutvecklingen kan ha en inverkan på larvutvecklingen.

4. Material och metod

4.1. Rening av parasitägg

Parascaris-äggen renades fram från hästräck som även varit del i Frida Martins försök och där de artbestämdes som *P. univalens*. Det användes även ägg som Frida Martin redan filtrerat från träcken och som sedan lagrats i vatten under ett år i kyl.

Parasitägg renades fram enligt protokollet i bilaga1. Hästräck löstes upp i vatten och filtrerades i fyra olika steg; genom 1,4 mm sil (W.S. Tyler incorporated), 150 µm sil (Retsch®), 110 µm och 70 µm ”pitchford funnels”, cylinderformade filter. Äggen eluerades från filtret och natriumhypokloridlösning (Milton-2 lösning, natrium-hypoklorit 2 % v/v i natriumklorid 16,5 %) tillfördes för att få äggen att floterar. På så sätt kunde alla partiklar som inte floterar selekteras bort. Lösningen har även en bakteriedödande effekt. Äggen tvättades fem gånger för att bli av med natrium-hypokloriden.

Slutligen beräknades äggkoncentrationen i 10 µl (x3) i mikroskop. Äggmängder >30 000 ägg i 15 ml späddes till 10 000, 20 000 eller 30 000 ägg i 15 ml. Äggen inkuberades i 15 ml vatten i ett 50 ml rör (Falcon®) i 28 °C för att utvecklas till larver i minst 14 dagar, men ofta längre tid.

4.2. Kläckning av ägg och hantering av parasitlarver

Larvutvecklingen i äggen följdes i mikroskop. Andelen ägg som innehöll larver beräknades genom att räkna totala antal ägg och larvutvecklade ägg i 10 µl (x3) i mikroskop.

När larverna bedömdes vara kläckningsredo behandlades äggen med 1 % formalin i 24 h (för att avdöda bakterier och svamp). Äggen tvättades med autoklaverat vatten för att bli av med formalinet och kläcktes mekanisk med hjälp av en Kimble® Kontes® 15 mL glashomogenisator enligt beskriven teknik i Martin *et al.* (2021). De framkläckta larverna tvättades fyra gånger med autoklaverat vatten samt två

gångar med cellmediumet Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 + Gluta-MAX (Gibco®), båda innehållande penicillin-streptomycin (Sigma-Aldrich®, 50 enheter/ml respektive 50 µg/ml) samt fungizone (antimykotikum, 1µg/ml).

Efter tvättningen förvarades larverna i 5 ml RPMI 1640 media i 15 ml-rör (Sarstedt). Utöver den antibiotikan och antimykotikumet som nämnts ovan tillfördes även polymyxin B (Sigma-Aldrich®, 1 mg/ml) under första dygnet. Antal larver beräknades i 10µl (x3) i mikroskop. Larverna inkuberades i 37 °C (0 % CO₂).

Supernatant (med förmodat innehållande EV) samlades in antingen var 24 h eller efter 72 h (efter en helg) genom centrifugering i 1409 g i 5 min. Supernatant filtrerades genom 1,2 µm (Whatman Puradisc) och förvarades i -80 °C inför senare analys. Nytt media tillfördes till larverna och inkuberades på nytt i 24 eller 72 h. Sammantaget samlades supernatant på detta vis tre gånger, därefter användes larverna till att stimulera cellkulturer.

En mer exakt beskrivning av utförande finns i bilaga 1.

4.3. Cellkulturförsök

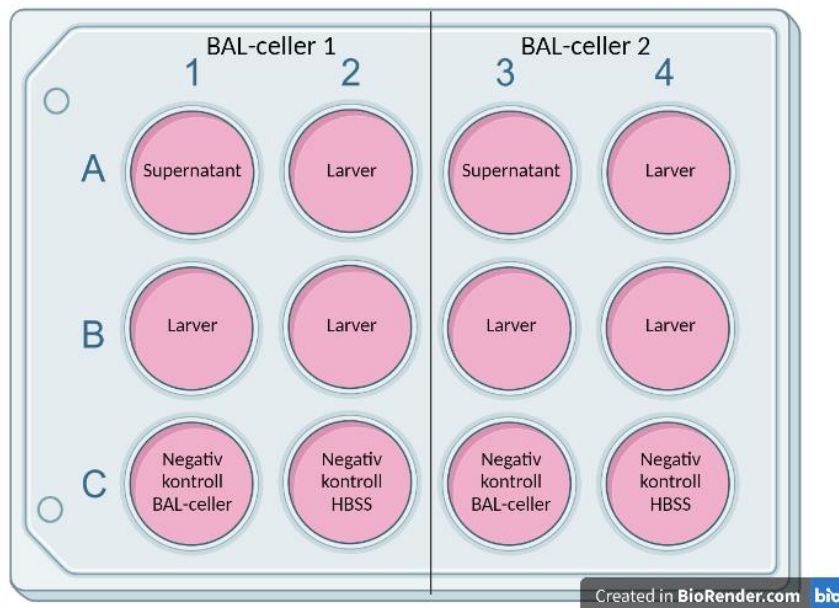
Bronkoalveolärt lavage (BAL)-celler från två olika astmatiska hästar tvättades fyra gånger med Hanks' Balanced Salt Solution (HBSS utan Fenylrött från SVA). Varje BAL-sköljning innebar olika innehållsfördelning av celler:

- Cellprofil för BAL-sköljvätska 1: Neutrofiler 15 %, Lymfocyter 24 %, Makrofager 58 %, Eosinofiler 0 %, Mastceller 3 %.
- Cellprofil för BAL-sköljvätska 2: Neutrofiler 3 %, Lymfocyter 44 %, Makrofager 49 %, Eosinofiler 0 %, Mastceller 4 %.

Cellfördelningen räknas manuellt i mikroskop på cytospinprepatat av personal på Institutionen för kliniska vetenskaper, SLU.

De inkuberades 24 h i 37 °C på en 12-brunnsplatta, där BAL-cellerna från vardera häst delats upp på fem brunnar med 2 miljoner celler i varje brunn (2 ml per brunn). I de återstående två brunnarna på plattan tillfördes endast 2 ml HBSS som en negativ kontroll. Efter 24h tillfördes antigen *P. univalens* larver eller supernatant, förmodat innehållande larvernas exkretoriska/sekretoriska produkter (ESP) och EV, till BAL-cellerna enligt figur 1. Innan tillförsel till brunnarna centrifugerades vätskan med larverna i 1409 g i 5 min. Därefter tillfördes brunnarna 500 µl supernatant alternativt ca 1000 larver per brunn, enligt figur 1. I försöket fanns två

negativa kontroller; brunn 5 med enbart BAL-celler och brunn 6 med endast 2 ml HBSS (Figur 1). 12-brunnsplattan inkuberades därefter i 37 °C och 5 % CO₂.



Figur 1. 12-brunnsplattans innehåll under cellkulturförsöket.

Efter 24 h skördades cellerna, larverna och supernatanten, genom att pipettera upp vätskan i brunnarna och centrifugera den (1409 g i 5 min). Mestadels av de adherenta BAL-cellerna förmodades då vara kvar på plattan medan larverna följde med vätskan. 500 µl TRIzol (ambion®) tillfördes till vardera cellinnehållande-brunn för att lysera cellerna. Lösningen flyttades sedan till ett 1,5 ml rör, och lagrades i -20 °C innan RNA-extraktion och cDNA syntes utfördes, vilket krävs för senare analys med hjälp av ”quantitative polymerase chain reaction” (qPCR).

Supernatanten i rören innehållande vätskan från brunnarna flyttades över till nya rör. Detta lagdes sedan i -80 °C för att senare användas i analyser utanför detta examensarbete.

Pelleten som blivit kvar efter att supernatanten förflyttats, och som tros innehålla mestadels larver, flyttades till 1,5 ml rör och 500 µl TRIzol tillsattes. Proven lagrades sedan i -20 °C, men kommer även det användas i analyser utanför detta examensarbete.

4.4. Isolering av RNA från EV och celler

För att isolera RNA från EV användes exoRNeasy Midi kit (Qiagen ®) och utfördes enligt tillverkarens protokoll. Vid RNA-isolering från BAL-celler användes Invitrogens protokoll med TRIzol (ambion®).

Koncentrationsbestämning av RNA gjordes på NanoDrop™ enligt tillverkarens instruktioner.

4.5. Primerdesign

4.5.1. Primer för RT-PCR av EV-prover

Primerparen som användes för RT-PCR av EV-proverna var GPD-1 (glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase) och aktin som är "housekeeping"-gener för *P. univalens*-larver, samt 16S, en universal primer för bakterier. Dessa fanns redan till förfogande. För primersekvenser samt produktlängd se tabell 1 längre ner.

4.5.2. Primer för qPCR av cellkultursprover

Till qPCR av cellkulturproverna användes primerpar för DUSP1, ST2 samt GAPDH (Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase) och RPL32 (Ribosomalt Protein L32) som "housekeeping"-gener för häst. GAPDH och RPL32 fanns redan till förfogande, medan DUSP1 och ST2 designades från grunden.

Primerpar för DUSP1 och ST2 designades genom en kombination av tre olika sätt; dels genom att manuellt undersöka lämplig basparskombination i gensekvensen som hämtats från "The National Center for Biotechnology Information" (NCBI 2021a); dels genom att söka i artiklar efter vad andra använt för primerpar och slutligen genom att använda NCBI:s "primer BLAST" (NCBI 2021b). Sekvenserna kontrollerades även mot NCBI:s "nucleotide BLAST" (NCBI 2021c) för att säkerställa att den utvalda sekvensen var unik för just häst/hästdjur och därmed minimera risken att få ett felaktigt resultat på grund av felaktigt inbindande till nukleotidkontamination från andra arter. Krav som ställdes på primerparen var att forward-primern och reverse-primern skulle ligga i olika exoner med ett intron emellan sig. Detta för att minimera risken att det bildas produkt om genomisk DNA kontaminerar provet då det skulle bildas en så stor produkt att den har svårt att konkurrera med den önskvärda produkten. För primersekvenser samt produktlängd se tabell 1. Vid utprovning av primerpar och upptäckt av felaktig produkt skapades nya primerpar. För ST2 användes i slutändan två olika forward primers, även den inkluderad i tabell 1.

Tabell 1. Primsekvenser samt genproduktstorlek i antal baspar. F=forward och R=reverse.

¹(Hjertner et al. 2013), ²(Martin et al. 2021), ³(Strub et al. 2007)

Gennamn/familj	Primersekvens (5'→3')	Produktsstorlek (bp)
<i>GPD-1</i> ²	F:ACAGTGGAGAGATGGACGTG R: GCCATGCCAGTCAGTTTACC	116
<i>Aktin</i> ²	F:TCGTTTTTTAGGGGAGGGATG R: AAACACCGAGCAAAATGGAG	137
<i>16S</i> ³	F:TCCTACGGGAGGCAGCAGT R: GGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTT	466
<i>DUSP1</i>	F:GCGCACGTCTTCTTCCTCAAAG R: GAAGCATGGTATGCACTGCCC	224
<i>ST2</i>	F1:GGGACTTTGGCGAAGCAAGAATTCAAGAG F2:TCCAGTAATTATAGCCCCTCCAC R: GAGACAAGTCATCTCATTGCTGG	Par1:74 Par 2: 217
<i>GAPDH</i> ¹	F:ATCTGACCTGCCGCCTGGAG R: CGATGCCTGCTTCACCACCTTC	68
<i>RPL32</i> ¹	F:AGCCATCTACTCGGCGTCA R: TCCAATGCCTCTGGGTTTC	144

4.6. cDNA syntes

För att kunna göra ”Reverse Transcriptase” PCR (RT-PCR) och sedan ”quantitative” PCR (qPCR) från provernas RNA krävs det att RNA:t först omvandlas till så kallat ”complementary” DNA (cDNA). Detta utfördes enligt rådande praxis, se protokoll i bilaga 2. Proverna DNase-behandlades (Ambion™ DNase I) för att bryta ner eventuellt medföljande genomisk DNA (gDNA) som kan störa resultatet. Därefter addera byggstenarna till processen att göra om RNA:t till DNA i form av dNTP, Hexa och Oligo dT. Två reaktioner skapas sedan från varje RNA-prov. Ett som tillförs enzymet ”reverse transkriptase” (SuperSkript™ IV) och kallas då RT+ och ett utan enzymet (RT-). Reverse transkriptas omvandlar RNA till DNA och RT-provet används då som en negativ kontroll för att detektera kontaminerande gDNA.

Den RNA mängd som användes för proverna från cellkulturförsöket var 300 ng medan för EV-proverna var det mellan 40-110 ng (se tabell 2 i resultatdelen).

Det gjordes dock en justering av protokollet vid cDNA syntesen av RNA-proven från EV. För de första proverna utfördes inte DNas-behandlingen, då protokollet till exoRNeasy-metoden angivit att det inte är nödvändigt. Detta justerades dock tillbaka för till sista omgången RNA-prover och DNas-behandling genomfördes. Anledningen var upptäckten av en artikel som visar att EV innehåller gDNA (Hur & Lee 2021). En annan justering till ursprungliga cDNA-protokollet som gjordes var att addera 1 µl av revers-primer för generna GPD-1 och aktin under syntesen. Det gjordes för att öka detektionschansen för generna av intresse.

4.7. RT-PCR

RT-PCR gjordes dels för utprovning av primerparen för ST2, DUSP1, GAPDH och RPL32 för senare användning i qPCR; dels för att påvisa "housekeeping"-generna GPD-1 och aktin hos framrenade *P. univalens* EV. RT-PCR genomfördes enligt protokollet i bilaga 2 med PCRBIO Ultra Polymerase (Techtum) vid båda tillfällena.

För samtliga gener i de båda försöken (ST2, DUSP1, GAPDH, RPL32 samt GPD-1 och aktin) gjordes ett prov med RT+ cDNA, vilket utgjorde provet av intresse, samt ett RT- prov. RT- provet fungerade som negativ kontroll och möjliggjorde detektion av kontaminerande nukleinsyror i provet. Proverna kördes därefter i en PCR maskin (iCycler BIO RAD) med ett så kallad "touchdown" program. Det innebär att temperaturen börjar över den optimala temperaturen för primerparen och stegvis går nedåt (Korbie & Mattick 2008). Detta ökar specificiteten, sensitiviteten och produktutbyte. RT-PCR programmet för de olika generna återfinns i bilaga 2.

Specifikt för RT-PCR av EV-proven var att en universal bakterieprimer för 16S lades till i försöket. Detta gjordes för att detektera bakteriell kontamination i larv-kulturen, då det misstänktes vara ett problem. cDNA från *P. univalens*-larver användes som positiv kontroll av GPD-1 och aktin.

Produkterna från samtliga RT-PCR kördes slutligen ut på en 2,5–3 % agaros gel med hjälp av elektrofores under en spänning på 100 mV. Detta för att storleks-bestämma produkterna.

4.8. qPCR

qPCR genomfördes på cDNA från cellkulturförsöket. iQ SYBR® Green Supermix (BIO RAD), innehållande bland annat polymeras, fördelades på en 96-brunnsplatta

tillsammans med cDNA och primerparen från respektive gen (GAPDH, RPL32, ST2 och DUSP1). Varje gen fick brunnar med samtliga RT+ cDNA från cellförsöket, samt tre av RT- proven för GAPDH och samtliga 10 RT- cDNA för övriga tre gener. Detta utgjorde en typ av negativ kontroll. En annan negativ kontroll utgjordes av PCRMix tillsammans med vatten i stället för cDNA, en så kallad "No template control". Som positivkontroll användes cDNA från BAL-celler som använts vid utprovning av primerparen. Protokollet som användes återfinns i bilaga 2.

Proverna kördes på CFX96™ Real-Time System (BIO RAD). PCR programmet som användes började med ett denatureringssteg vid 95 °C i 15 min. Detta följdes av cykel med 15 sek på 95 °C, följt av en sänkning till primer-specifik annealingtemperatur i 30 sek och slutligen ett elongeringssteg på 72 °C för insamling av fluorescensdata. Denna cykel utfördes totalt 40 gånger. Programmet avslutades med en 5 sek 0,5 °C stegvis temperaturökning från 65 °C till 95 °C för att etablera en smältkurva för PCR-produkten. Följande annealingtemperaturer användes; 59 °C för RPL32, ST2 och DUSP1 samt 64 °C för GAPDH.

4.9. Beräkning av relativt genuttryck och statistisk analys

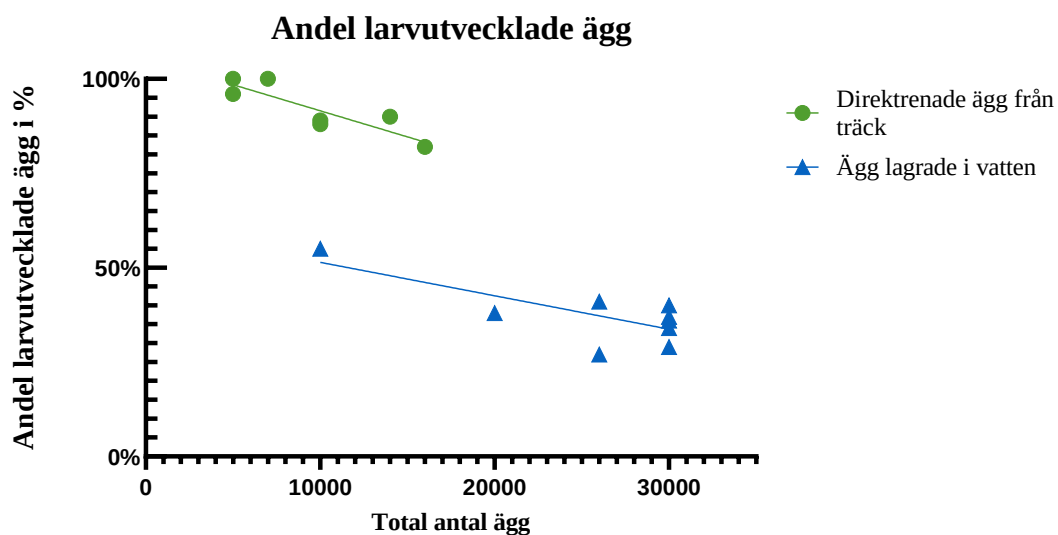
Beräkning av relativt genuttryck gjordes i Microsoft Excel 2016 med hjälp av $\Delta\Delta C_q$ -metoden (Livak & Schmittgen 2001). Genom att använda provernas "cycle quantification" (C_q)-värde, det vill säga hur många PCR-cykler det tar för provet att skära ett satt tröskelvärde, för varje gen kunde ΔC_q och $\Delta\Delta C_q$ beräknas. Målgenen DUSP1 sattes i relation till referensgenerna RPL32 och GAPDH för att avgöra om cellerna ändrat sitt genuttryck av DUSP1. Statistisk analys i form av ett Brown-Forsythe och Welch ANOVA test, utfördes med hjälp av GraphPad Prism 9.1.0.

5. Resultat

5.1. Larvutveckling

Under larvutvecklingen beräknades andelen ägg som utvecklades till kläckdugliga larver. De ägg som renats fram direkt från träck som lagrats i 6 °C låg mellan 82–100 % utveckling. Ägg som filtrerats från träck för ca ett år sedan och därefter förvarats i vatten i 6 °C hade 34–55 % utveckling. De som förvarats i vatten i kyl innehöll ett högt antal ägg, ca 269 000 ägg. Dessa späddes till bestämda koncentrationer på 10 000, 20 000 och 30 000 ägg i 15 ml.

Då larvutvecklade ägg i % sätts i relation till antal ägg i provröret sågs en försämrad utveckling hos äggen vid högre koncentrationer. I figur 2 ses andel larvutvecklade ägg i % i relation till totalt antal ägg i röret. En trendlinje är ritad för de två olika grupperna. Linjens lutning (k-värde) för ”direktrenade ägg från träck” är -0,0014 och -0,0009 för ”ägg lagrade i vatten”.



Figur 2. Larvutveckling i % i relation till totalt antal ägg.

5.2. Utformning av nya metoder

Denna studie var ett pilotförsök med mål att rena fram EV samt undersöka vad som sker hos hästens immunceller vid direktkontakt med *P. univalens* respektive dess utsöndrande produkter. Under vägens gång tillstötte en rad problem som var tvungna att lösas genom att utforma nya metoder. Ett av dessa problem var att få larverna tillräckligt rena från bakterier och svamp. Till en början försöktes att endast tvättas dem med PBS fyra gånger och cellmedium innehållande penicillin, streptomycin och fungizone två gånger. Det ledde till stora förluster av larver då de inte formade en tillräckligt stabil pellet under centrifugeringen och pipetterades bort tillsammans med supernatanten. Tvättningen av larverna visade sig även vara otillräcklig då larvkulturerna efter ett par dagar fick en överväxt av bakterier eller svampar.

Efter att ha testat olika metoder utformades protokollet med formalinbehandling, autoklavering av redskap, flera tvättar av både ägg och larver och addering av en tredje antibiotika, polymyxin B (se bilaga 1). För att kontrollera bakterieförekomst sattes en bakterieodling före och efter formalinbehandling samt efter polymyxin B behandling. Det växte endast på plattan från obehandlade prover, det vill säga innan formalinbehandlingen.

Vid byte av provrör från 50ml polypropylen rör (Falcon®) till ett 15ml polystyren rör (Starstedt) formades en mer stabil pellet. Därmed minskade förlusterna av larver drastiskt och möjliggjorde centrifugering.

5.3. RT-PCR resultat

RT-PCR användes till utprovning av primers samt detektion av *Parascaris* gener i EV. Vid utprovning av primerpar sågs två produkter hos ST2 och DUSP1, där den kortare produkten hade rätt storlek. Nya primerpar skapades genom att designa en ny "forward primer" som låg två exon bort från "reverse primer" för vardera gen. Detta löste problemet för DUSP1 som fick önskvärd produkt, medan ST2 fortfarande bildade två produkter. Denna gång var den längre produkten av rätt storlek.

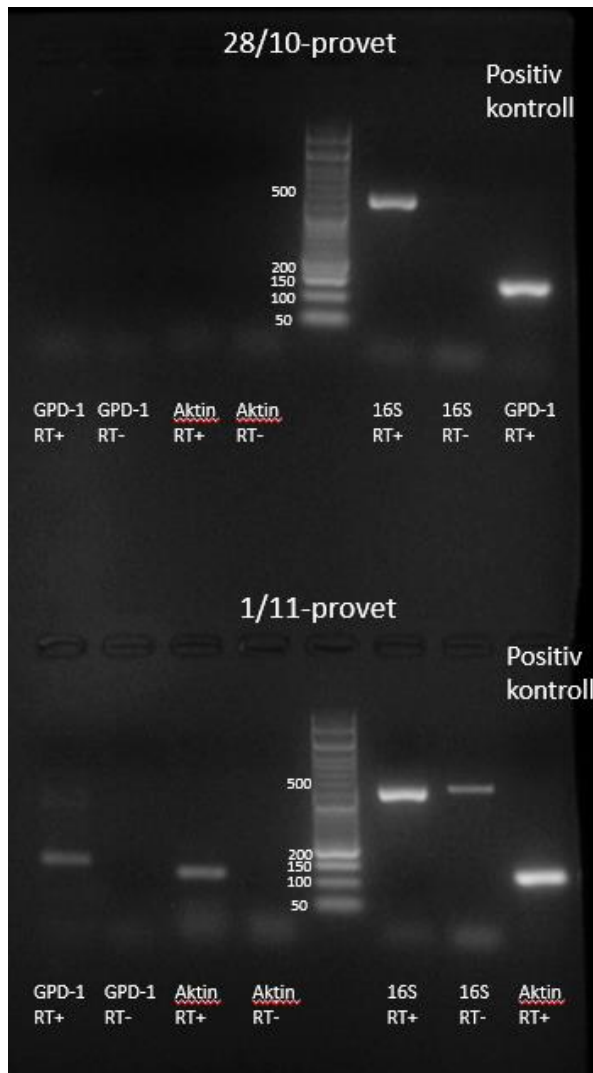
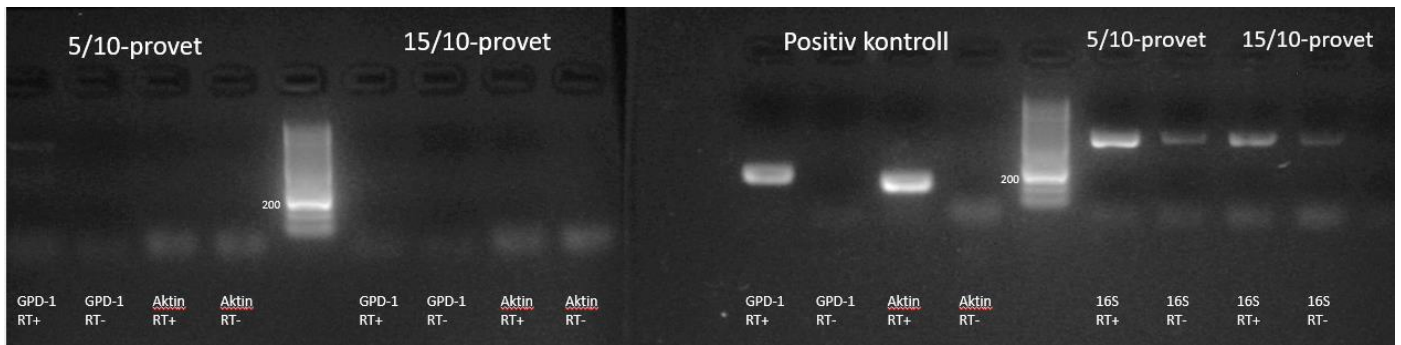
För att bevisa framrening av EV från *P. univalens* utfördes RNA-extraktion av EV från *P. univalens* på 4 olika prover, här benämnda efter datumet då supernatanten samlades från larverna; 5/10, 15/10, 28/10 och 1/11. De två första proverna utfördes på supernatant från larver som ej behandlat med formalin och polymyxin B. Antal larver som supernatanten samlades från, tid mellan insamlingar av supernatant, RNA-koncentration samt mängd av provet som använts till cDNA syntes ses i tabell 2.

Tabell 2. EV-prover; Datum för insamlad supernatant och benämningen av provet, antal larver som supernatanten samlades från, tid i timmar larverna fått på sig att producera EV (tid mellan insamlingar), RNA-koncentration avrundat i heltal samt mängd av provet som använts till cDNA syntes.

Datum för insamlad supernatant	Antal larver	Timmar mellan insamling av supernatant	RNA-koncentration (ng/μl)	Mängd använd till cDNA (ng)
5/10	8300	24	13	65
15/10	240	24	22	110
28/10	6000	24	25	40
1/11	6000	72	8	40

Proverna kördes därefter ut på agarosgel för att avgöra storleken av produkterna från RT-PCR. Resultaten från gelerna ses i figur 3 och tyder på produkt för GPD-1 och aktin hos 1/11-provet men inte hos övriga tre prover. Bakteriegenen 16S utgjorde kontroll för kontamination av bakterier och där samtliga prover fick produkt i både RT+ och RT-, bortsett från 28/10 som inte hade produkt i RT-.

För proverna 28/10 samt 1/11 gjordes två olika cDNA-synteser; först utan en DNas-behandling och senare en med DNas-behandling. Den enda skillnaden som såg var att produkterna i 1/11-provet blev svagare på gelen efter DNas-behandlingen, med andra ord hade det bildats mindre mängd produkt.



Figur 3. Produkterna för GPD-1, aktin och 16S från EV-proverna utkörda på agarosgel tillsammans med PCRBIO Ladder III (storlek 50–1500baspar). Positiv kontroll för GPD-1 och aktin utgjorde cDNA från *P. univalens* larver. Övre bilden visar resultatet för proverna 5/10 samt 15/10. Nedre bilden till vänster visar resultatet för proverna 28/10 och 1/11. Storleken i antal baspar är utskriven bredvid stegen.

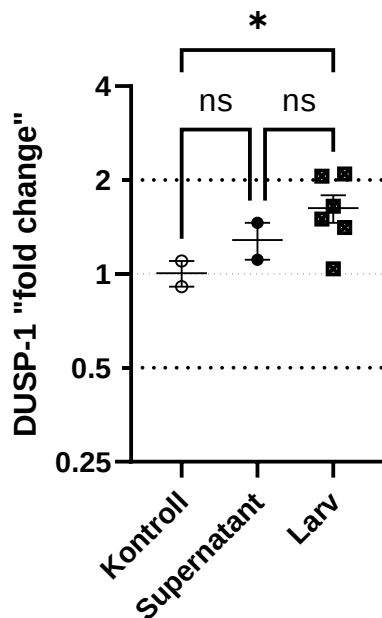
5.4. qPCR resultat

Resultatet från qPCR av BAL-cellerna tydde på vis problematik. För det första fick generna GAPDH, RPL32 och ST2 produkt i de negativa kontrollproven RT-. DUSP1 var med andra ord den enda genen som inte fått produkt i RT-. Att det skapas produkt i RT- tyder på en DNA kontamination av proverna. Produkterna för GAPDH och RPL32 kördes ut på gel och visade på samma (rätta) storlek för RT+ som för RT-. Data från qPCR visade dock att RT- har ett ca 5,5 till 7,7 enheter högre Cq-värde jämfört med RT+ för båda generna. Av den anledningen bedömdes de båda generna ändå kunna användas i den statistiska undersökningen. En närmare förklaring varför återfinns i diskussionen.

För det andra gav ST2's båda primersuppsättningar upphov till två produkter under qPCRn. Dessutom gav ST2's RT- produkter ett liknande Cq-värden som RT+. ST2's data förkastades och ingick inte i statistiska undersökningen.

Cq-värdena för RT+ proverna för GAPDH låg mellan 23,8-27,7 cykler, RPL32 mellan 24,1-27,6 cykler och DUSP1 mellan 28,9-33,6 cykler.

Uträkning av $\Delta\Delta Cq$ för DUSP1 som målgén jämfört med GAPDH och RPL32 som referensgener visade på en signifikant säkerställd ökning ($p=0,0457$) av genuttryck för DUSP1 hos celler stimulerade med larver jämfört med ostimulerade celler. Se figur 4. Ingen signifikant skillnad sågs hos celler utsatta för supernatant.



Figur 4. Förändring i DUSP1 genuttryck jämfört mellan kontrollgruppen och grupperna celler stimulerade med supernatant respektive larver. $*p<0,05$, ns=not significant.

6. Diskussion

6.1. Larvutveckling

Under projektets gång tillkom vissa delstudier såsom undersökningarna kring larvutveckling hos *P. univalens*. Uppfattningen bland de som jobbat med *P. univalens*-ägg och -larver på SLU (såsom Eva Tydén och Frida Martin) är att äggen tycks få en hämmad larvutveckling om det finns ett högt antal ägg på en liten yta. Detta undersöktes genom att beräkna andelen utvecklade ägg hos prover inne-hållande olika mängder ägg. Detta gjordes på två olika grupper ägg; ägg direkt renade från träck samt ägg som filtrerats från träck och sedan lagrats i vatten i kyl. För båda grupper-na ägg sågs en försämrad larvutveckling när antalet ägg i provröret ökade (se figur 1), vilket då förstärker den ovan nämnda uppfattningen.

En annan sak som blev uppenbar vid beräkning av andelen utvecklade ägg var att ägg renade direkt från träck hade en högre utvecklingsprocent än de som filtrerats och lagras i vatten i kyl under ett år. De ägg som förvarats i träck hade 82–100 % utvecklade ägg medan ägg lagrade i vatten hade 34–55 %. Det är alltså bättre att förvara äggen kvar i träcken i stället för i vatten fram tills larvutveckling ska påbörjas.

Det upptäcktes också att det finns en stor osäkerhet vid räkning av ägg och larver då upprepade räkningar kunde ge skillnader på flera 1000. Trots noggrann blandning och pipettering samt beräkning av ägg/larver i flera droppar kunde detta inte frångå. Därmed bör antal ägg och larver endast ses som ett ungefärligt värde och inte ses som det sanna värdet.

6.2. Metodproblem

Hur mycket man än tänker och planerar innan ett projekt är det svårt, om inte omöjligt, att undvika problem helt. Detta gäller speciellt pilotprojekt där det ibland kan vara lättare att lösa problemen när de uppstår snarare än att lyckas förutspå dem innan. Det största problemet detta projekt stötte på var att larvkulturerna efter ett

par dagar fick en överväxt av bakterier eller svampar. Det gjorde proverna obrukbara då det skulle ge upphov till falska resultatet. Dels eftersom bakterier och svampar också producerar EV (Deatherage & Cookson 2012), dels att det inte skulle gå att avgöra vilken av de tre patogenerna det är som påverkar cellerna under ett cellkulturförsök. Problem löstes genom att lägga till formalinbehandling av äggen, utökad tvättningssteg, autoklivering av redskap samt ytterligare antibiotikabehandling till protokollet. Att det fungerade konfirmerades genom bakterieodling efter varje avslutat steg.

Ett annat problem som tillkom tidigt var att larverna inte formade en stabil pellet vid centrifugering. Det omöjliggjorde tvättningen av larverna utan att göra stora förluster. Det spekulerades kring olika orsaker kring detta. Bland annat att tvättningsmediets saltbalans gjorde att larverna lättare flöt i vätskan, eller att larverna fastnade på pipettspetsarnas plast som byttes mellan varje tvätt. Dock försvann problemet när 50 ml polypropylenrör byttes mot 15 ml polystyrenrör. Det tycks som att den smalare botten-konan skapar en stabilare pellet alternativt att materialet polystyren är mer gynnsamt vid centrifugering av *P. univalens*-larver.

6.3. EV extraktion

Det främsta målet med detta arbete var att undersöka om det var möjligt att rena fram EV från *P. univalens*. Ett kit från Qiagen som är avsedd att rena fram RNA från exomer från människor användes för detta ändamål. Jämfört med ultracentrifugering, som är den vanligaste använda metoden vid extraktion av EV från helminter (Sotillo *et al.* 2020), är detta kommersiella kit mer tid- och kostnadseffektivt. Ett liknande kit från Qiagen, exoEasy, som renar fram EV men inte lyserar dem, har använts av Zhou med medarbetare (2019). De renade fram EV från *Echinococcus granulosus*, hundens dvägbandmask, med lyckat resultat. Det finns även en studie av Enderle med medarbetare (2015) som jämför exoRNeasy mot ultracentrifugering och konstaterar att kittet isolerar RNA från EV likvärdigt eller till och med bättre än ultracentrifugering. Under ultracentrifugeringen finns en risk för kontamination av extracellulära miRNA då det inte renats bort innan isoleringsprocessen. Det bör dock nämnas att författarna bakom artikeln är anställda av Qiagen, men att företaget inte ska ha haft något inflytande över studie-design, datainsamling och analys, eller publicering.

För att påvisa EV från *P. univalens* i proverna användes *Parascaris* "housekeeping"-gener GPD-1 och aktin. Det utgicks ifrån att housekeeping gener med större sannolikhet skulle hittas i EV:na, då de har ett stabilt uttryck i celler (Kozera & Rapacz 2013) och har större chans att distribueras i EV. I vår studie hittades

GPD-1 och aktin i ett av proven, vilket stödjer denna teori. Att övriga tre prover inte hade produkt från PCR kan ha många förklaringar. Antingen fanns inte EV i proverna utan koncentrationen RNA kom från något annat, till exempel kontaminerande bakterier, eller så fanns inte "housekeeping"-generna i just dessa prover då RNA distribueringen kanske skiljer sig åt mellan EV. En annan förklaring är om RNA:t från EV:na var delvis denaturerat, vilket lett till att primerparen inte kunnat fästa in och bilda produkt under RT-PCR.

När det kommer till den universala primerparet för bakterier 16S lades den till i arbetet efter framreningen av proverna 5/10 och 15/10. Anledningen var att dessa prover inte hade produkt från GPD-1 och aktin trots att det fanns en RNA koncentration. RNA:t misstänktes då härstamma från bakterier och 16S primerparet lades till.

Resultatet blev att samtliga RT+ prover gav produkt för 16S, även i de prover där protokollet för att desinficera ägg och larvkulturerna införts och som dessutom fått negativa bakterieodlingar (proverna 28/10 och 1/11). Även alla RT- 16S prover, förutom 28/10-provet, fick produkt. Dock om än svagare utslag på gelen än RT+ (se figur 3).

En möjlig förklaring till produkt i mer eller mindre samtliga prover (både RT+ och RT-) är att polymeras, och även andra enzymer som används vid PCR, kan vara kontaminerat med bakteriell gDNA (Philipp *et al.* 2010). Det innebär att det kan bildas produkter från 16S primers utan att bakteriella gener ursprungligen funnits i proverna. Det skulle kunna förklara varför det blivit produkt i 16S RT+ även efter att de antibakteriella åtgärderna satts in. Det skulle även kunna förklara varför RT+ proverna har mer produkt (starkare utslag på gelen) än RT-, då flera enzym, såsom "reverse transcriptase", använts i RT+ proverna och därmed fått mer kontaminerande bakteriell DNA. Vad denna teori dock inte kan förklara är varför 28/10-provet inte har produkt i RT- när alla övriga prover har det. Samma PCR mixer användes till den som till de andra proverna. Oavsett blir slutsatsen kring resultatet från 16S att primerparet har ett begränsat värde vid detektion av bakteriell kontamination i larvkulturen.

6.4. Design av primerpar

Vid utprovning av primerparen för DUSP1 och ST2 skapades två produkter under RT-PCR. Den kortare bedömdes vara den korrekta produkten då den hade rätt storlek jämfört med stegen. Båda genernas primerpar hade designats så att ett intron skiljde forward och reverse åt. Intronen i fråga var relativt korta för båda generna (91bp för ST2 och 367bp för DUSP1) och den andra produkten som bildats

bedömdes vara en amplifiering av både exon och intron då det stämde storleksmässigt. Teorin var att det antingen fanns med kontaminerande genomisk DNA eller att så kallade pre-mRNA:n med i proven. Pre-mRNA är mRNA som inte genomgått splicing än och därför fortfarande innehåller intron (Green 1986).

För att komma runt problemet designades nya forward-primers för båda generna. Forward primern placerades två exon bort från reverse så att paren skiljdes åt med två intron och en exon och därmed öka avståndet mellan forward och reverse. Detta skulle minska risken att en extra, icke önskvärd produkt skulle bildas då den skulle bli för lång för att hinnas bildas under PCR-cyklerna. För DUSP1 fungerade strategin men för ST2 bildades fortfarande en extra produkt. Denna gång kortare än den rätta produkten, vilket gjorde att uttrycket av ST2 inte kunde analyseras. Vad denna extra produkt är har inte än listats ut, men primerdimer har diskuterats som en möjlig förklaring. En primerdimer är när primerparen binder in till varandra istället för cDNA och skapar en felaktig produkt (Poritz & Ririe 2014). Om mer tid funnits hade ännu ett primerpar tagits fram och testats för ST2 för att få bättre och säkrare resultat i qPCR. Trots problemet med dubbla produkter provades ST2 på cellförsöksproverna i qPCR, men var tvungen att förkastas på grund av den felaktiga korta produkten som uppträdde i alla prover, både RT+ och RT-. Närmare beskrivning av anledning återfinns i 5.5 qPCR resultat och genuttryck.

6.5. qPCR resultat och genuttryck

Buck med medarbetare (2014) visade att EV från den gastrointestinala musparasiten *Heligmosomoides polygyrus* kan inhibera genuttrycket av IL-33 receptorn ST2 samt MAP-kinas signaleringen genom genen DUSP1. Med detta i åtanke gjordes här ett cellkulturförsök med både larver och supernatant från *P. univalens*, för att undersöka genuttrycksförändringar i ST2 och DUSP1.

qPCR resultatet från cellkulturförsöket visade dock på problem med produkt i negativa kontrollen RT- för ST2 samt referensgenerna GAPDH och RPL32. Produkterna för samtliga tre gener hade samma storlek i RT- jämfört med RT+. Proverna kördes om efter att ha tagit nytt PCR-mix, nukleasfritt vatten och primers för att få bort en eventuell kontamination med nukleinsyror från häst. Då även dessa gav produkt i RT- drogs slutsatsen att felet låg i cDNA syntesen och skulle behöva göras om för säkra resultat. Detta fanns det dock inte tid för.

Cq-värdena för RT- hos GAPDH och RPL32 var 5,5–7,7 enheter högre än RT+, vilket innebär att den DNA som fanns i RT- provet tog längre tid att skapas och därför är av betydligt lägre koncentration. En möjlig förklaring till detta är om

pseudogener fanns med i provet. Pseudogener är naturligt existerande sekvenser som liknar funktionella gener och som visat sig kunna ge falska utslag i RT- (Javadirad *et al.* 2020). GAPDH är en sådan gen som visat sig ha problem med pseudogener hos människa och det är inte otänkbart att problemet även sträcker sig till hästens GAPDH eller för den delen RPL32. Av den anledningen bedömdes dessa referens-gener ändå kunna användas för statistisk analys av förändrat genuttryck. ST2 förkastades dock då dess RT- Cq-värden var likvärdiga med RT+. Dessutom gav båda primerparen för ST2 två produkter, där det andra primerparet gav en felaktig kort produktstorlek (möjligen en primerdimer), vilket gör resultatet obrukbart. DUSP1 å andra sidan hade ingen produkt i RT- och bedömdes kunna analyseras mot referensgenerna för att undersöka förändrat genuttryck.

Vid statistisk analys av genuttrycksförändring hos DUSP1 sågs en signifikant ökning hos gruppen celler som utsatts för larver jämfört mot kontrollgruppen. Det innebär att uttrycket av den MAP-kinas styrande genen DUSP1 ökar hos immunceller som utsätts för *P. univalens* larver. Detta är motsatsen till vad Buck med medarbetare (2014) visade hände för celler utsatta för EV från *H. polygyrus*. Det bör dock påpekas att utformningen av försöken skiljer sig mycket åt. De använde sig endast av framrenade EV samt stimulerade mustarmceller (cellinje), medan här användes både larver och supernatant innehållande ESP/EV för att stimulera primära immunceller (BAL-celler). Buck *et al.* (2014) använde även andra analysmetoder som bland annat möjliggjorde mätning av cellernas upptag av EV.

Man bör också vara försiktig med att dra för stora slutsatser från den statistiska analysen, då det finns en rad osäkerhetsfaktorer. Dels hade det varit önskvärt att göra försöket större så att mer data erhållits och fler mätvärden kunnat användas. Dels skulle cDNA syntesen göras om för att förhoppningsvis inte få produkt i RT-proverna under qPCR och på så vis erhålla mer trovärdiga RT+ resultat. Dock hade det inte löst problemet med ST2s kortare, felaktiga produkt om det nu rör sig om en primerdimer.

Det sågs ingen signifikant förändring i genuttrycket hos celler som endast utsattes för supernatant från larvskulturerna. Supernatanten förmodades innehålla larvernas ESP men det var inget som undersöktes och fastställdes. Det går då inte att dra några slutsatser rörande ESP, då det är okänt om provernas faktiskt innehöll ESP. Dessutom så utgjorde gruppen med supernatant-stimulerande celler endast två brunnar i försöket, vilket ger få mätvärden och försvårar detektionen av mindre förändringar.

6.6. Konklusion

Denna studie har tagit de första stegen för att utforska EV från *P. univalens* samt utformat metoder för att möjliggöra det. Ett protokoll har utformats för larvhantering inför cellförsök samt bevisat att det är möjligt att rena fram EV från *P. univalens* med hjälp av exoRNeasy kit. Cellkulturförsöket som genomförts ger en indikation på att genuttrycket av DUSP1 går upp hos celler vid kontakt med larverna.

Sammantaget finns det mycket kvar att undersöka när det kommer till EV från *P. univalens*, däribland att sekvensera RNA- och proteininnehållet i vesiklarna, göra fler cellstimuleringsförsök för att undersöka genuttrycksförändringar, samt utforska om infekterade hästar utvecklar ett antikroppsvar mot EV. Denna kunskap skulle kunna användas i framtiden till att skapa ett vaccin riktat mot parasitens EV och förhoppningsvis komma runt det växande problemet med multiresistens mot anthelmintika.

Referenser

- Abebe, F. & Bjune, G. (2009). The protective role of antibody responses during Mycobacterium tuberculosis infection. *Clinical & Experimental Immunology*, 157 (2), 235–243. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.2009.03967.x>
- Allen, J.E. & Maizels, R.M. (2011). Diversity and dialogue in immunity to helminths. *Nature Reviews Immunology*, 11 (6), 375–388. <https://doi.org/10.1038/nri2992>
- Anthony, R.M., Rutitzky, L.I., Urban, J.F., Stadecker, M.J. & Gause, W.C. (2007). Protective immune mechanisms in helminth infection. *Nature Reviews Immunology*, 7 (12), 975–987. <https://doi.org/10.1038/nri2199>
- Autheman, D., Crosnier, C., Clare, S., Goulding, D.A., Brandt, C., Harcourt, K., Tolley, C., Galaway, F., Khushu, M., Ong, H., Romero-Ramirez, A., Duffy, C.W., Jackson, A.P. & Wright, G.J. (2021). An invariant Trypanosoma vivax vaccine antigen induces protective immunity. *Nature*, 595 (7865), 96–100. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03597-x>
- Ávila, M. & Isaac, D. (2013). Chapter 86 - Helminthic Disease. I: Ryan, S.J., Sada, S.R., Hinton, D.R., Schachar, A.P., Sada, S.R., Wilkinson, C.P., Wiedemann, P., & Schachar, A.P. (eds.) *Retina*. 5th ed., London: W.B. Saunders, 1500–1514. <https://doi.org/10.1016/B978-1-4557-0737-9.00086-2>
- SVA, National Veterinary Institute. (2020). *Avmaskning av häst*. [2021-10-11].
- Bradley, J.E. & Jackson, J.A. (2004). Immunity, immunoregulation and the ecology of trichuriasis and ascariasis. *Parasite Immunology*, 26 (11–12), 429–441. <https://doi.org/10.1111/j.0141-9838.2004.00730.x>
- Buck, A.H., Coakley, G., Simbari, F., McSorley, H.J., Quintana, J.F., Le Bihan, T., Kumar, S., Abreu-Goodger, C., Lear, M., Marcus, Y., Ceroni, A., Babayan, S.A., Blaxter, M., Ivens, A. & Maizels, R.M. (2014). Exosomes secreted by nematode parasites transfer small RNAs to mammalian cells and modulate innate immunity. *Nature Communications*, 5 (1), 5488. <https://doi.org/10.1038/ncomms6488>
- Burk, S. V. (2013). *Detection of antibodies against Parascaris equorum excretory-secretory antigens*. Diss. University of Kentucky. Theses and Dissertations--Animal and Food Sciences. 21. https://uknowledge.uky.edu/animalsci_etds/21
- Clayton, H.M. & Duncan, J.L. (1978). Clinical signs associated with Parascaris equorum infection in worm-free pony foals and yearlings. *Veterinary Parasitology*, 4 (1), 69–78. [https://doi.org/10.1016/0304-4017\(78\)90037-7](https://doi.org/10.1016/0304-4017(78)90037-7)

- Clayton, H.M. & Duncan, J.L. (1979). The development of immunity to *Parascaris equorum* infection in the foal. *Research in Veterinary Science*, 26 (3), 383–384. [https://doi.org/10.1016/S0034-5288\(18\)32899-6](https://doi.org/10.1016/S0034-5288(18)32899-6)
- Coakley, G., McCaskill, J.L., Borger, J.G., Simbari, F., Robertson, E., Millar, M., Harcus, Y., McSorley, H.J., Maizels, R.M. & Buck, A.H. (2017). Extracellular vesicles from a helminth parasite suppress macrophage activation and constitute an effective vaccine for protective immunity. *Cell Reports*, 19 (8), 1545–1557. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.05.001>
- Cortés, A., Muñoz-Antoli, C., Esteban, J.G. & Toledo, R. (2017). Th2 and Th1 responses: clear and hidden sides of immunity against intestinal helminths. *Trends in Parasitology*, 33 (9), 678–693. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2017.05.004>
- Cribb, N., Coté, N., Bouré, L. & Peregrine, A. (2006). Acute small intestinal obstruction associated with *Parascaris equorum* infection in young horses: 25 cases (1985–2004). *New Zealand Veterinary Journal*, 54 (6), 338–343. <https://doi.org/10.1080/00480169.2006.36721>
- Deatherage, B.L. & Cookson, B.T. (2012). Membrane vesicle release in bacteria, eukaryotes, and archaea: a conserved yet underappreciated aspect of microbial life. *Infection and Immunity*, 80 (6), 1948–1957. <https://doi.org/10.1128/IAI.06014-11>
- Deslyper, G., Colgan, T.J., Cooper, A.J.R., Holland, C.V. & Carolan, J.C. (2016). A proteomic investigation of hepatic resistance to *Ascaris* in a murine model. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 10 (8), e0004837. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004837>
- Dold, C., Cassidy, J.P., Stafford, P., Behnke, J.M. & Holland, C.V. (2010). Genetic influence on the kinetics and associated pathology of the early stage (intestinal-hepatic) migration of *Ascaris suum* in mice. *Parasitology*, 137 (1), 173–185. <https://doi.org/10.1017/S0031182009990850>
- Drurey, C. & Maizels, R.M. (2021). Helminth extracellular vesicles: Interactions with the host immune system. *Molecular Immunology*, 137, 124–133. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2021.06.017>
- Eichenberger, R.M., Sotillo, J. & Loukas, A. (2018a). Immunobiology of parasitic worm extracellular vesicles. *Immunology & Cell Biology*, 96 (7), 704–713. <https://doi.org/10.1111/imcb.12171>
- Eichenberger, R.M., Talukder, M.H., Field, M.A., Wangchuk, P., Giacomini, P., Loukas, A. & Sotillo, J. (2018b). Characterization of *Trichuris muris* secreted proteins and extracellular vesicles provides new insights into host–parasite communication. *Journal of Extracellular Vesicles*, 7 (1), 1428004. <https://doi.org/10.1080/20013078.2018.1428004>
- Else, K.J., Keiser, J., Holland, C.V., Grencis, R.K., Sattelle, D.B., Fujiwara, R.T., Bueno, L.L., Asaolu, S.O., Sowemimo, O.A. & Cooper, P.J. (2020). Whipworm and roundworm infections. *Nature Reviews Disease Primers*, 6 (1), 1–23. <https://doi.org/10.1038/s41572-020-0171-3>

- Enderle, D., Spiel, A., Coticchia, C.M., Berghoff, E., Mueller, R., Schlumpberger, M., Sprenger-Haussels, M., Shaffer, J.M., Lader, E., Skog, J. & Noerholm, M. (2015). Characterization of RNA from exosomes and other extracellular vesicles isolated by a novel spin column-based method. *PLOS ONE*, 10 (8), e0136133. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0136133>
- Gazzinelli-Guimarães, P.H., Gazzinelli-Guimarães, A.C., Silva, F.N., Mati, V.L.T., Dhom-Lemos, L. de C., Barbosa, F.S., Passos, L.S.A., Gaze, S., Carneiro, C.M., Bartholomeu, D.C., Bueno, L.L. & Fujiwara, R.T. (2013). Parasitological and immunological aspects of early *Ascaris* spp. infection in mice. *International Journal for Parasitology*, 43 (9), 697–706. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2013.02.009>
- Gazzinelli-Guimaraes, P.H. & Nutman, T.B. (2018). Helminth parasites and immune regulation. *F1000Research*, 7, F1000 Faculty Rev-1685. <https://doi.org/10.12688/f1000research.15596.1>
- Gillespie, S.H. (1988). The epidemiology of *Toxocara canis*. *Parasitology Today*, 4 (6), 180–182. [https://doi.org/10.1016/0169-4758\(88\)90156-1](https://doi.org/10.1016/0169-4758(88)90156-1)
- Goday, C. & Pimpinelli, S. (1984). Chromosome organization and heterochromatin elimination in *Parascaris*. *Science*, 224 (4647), 411–413
- Griesenauer, B. & Paczesny, S. (2017). The ST2/IL-33 axis in immune cells during inflammatory diseases. *Frontiers in Immunology*, 8, 475. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00475>
- Gu, Y., Wei, J., Yang, J., Huang, J., Yang, X. & Zhu, X. (2013). Protective immunity against *Trichinella spiralis* infection induced by a multi-epitope vaccine in a murine model. *PLOS ONE*, 8 (10), e77238. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0077238>
- Hansen, E.P., Fromm, B., Andersen, S.D., Marcilla, A., Andersen, K.L., Borup, A., Williams, A.R., Jex, A.R., Gasser, R.B., Young, N.D., Hall, R.S., Stensballe, A., Ovchinnikov, V., Yan, Y., Fredholm, M., Thamsborg, S.M. & Nejsum, P. (2019). Exploration of extracellular vesicles from *Ascaris suum* provides evidence of parasite–host cross talk. *Journal of Extracellular Vesicles*, 8 (1), 1578116. <https://doi.org/10.1080/20013078.2019.1578116>
- Hjertner, B., Olofsson, K.M., Lindberg, R., Fuxler, L. & Fossum, C. (2013). Expression of reference genes and T helper 17 associated cytokine genes in the equine intestinal tract. *The Veterinary Journal*, 197 (3), 817–823. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2013.05.020>
- Holland, C.V. (2009). Predisposition to ascariasis: Patterns, mechanisms and implications. *Parasitology*, 136 (12), 1537–1547. <https://doi.org/10.1017/S0031182009005952>
- Hur, J.Y. & Lee, K.Y. (2021). Characteristics and clinical application of extracellular vesicle-derived DNA. *Cancers*, 13 (15), 3827. <https://doi.org/10.3390/cancers13153827>
- Javadirad, S.-M., Mokhtari, M., Esfandiarpour, G. & Kolahdouzan, M. (2020). The pseudogene problem and RT-qPCR data normalization; SYMPK: a suitable reference

- gene for papillary thyroid carcinoma. *Scientific Reports*, 10 (1), 18408.
<https://doi.org/10.1038/s41598-020-75495-7>
- Korbie, D.J. & Mattick, J.S. (2008). Touchdown PCR for increased specificity and sensitivity in PCR amplification. *Nature Protocols*, 3 (9), 1452–1456.
<https://doi.org/10.1038/nprot.2008.133>
- Kozera, B. & Rapacz, M. (2013). Reference genes in real-time PCR. *Journal of Applied Genetics*, 54 (4), 391–406. <https://doi.org/10.1007/s13353-013-0173-x>
- Kreider, T., Anthony, R.M., Urban, J.F., Jr & Gause, W.C. (2007). Alternatively activated macrophages in helminth infections. *Current Opinion in Immunology*, 19 (4), 448. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2007.07.002>
- Lee, J.J. & Rosenberg, H.F. (eds.) (2013). Chapter 16 - Emerging Concepts. In: *Eosinophils in Health and Disease*. Boston: Academic Press, 607–641.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394385-9.00016-X>
- Lind, E.O. & Christensson, D. (2009). Anthelmintic efficacy on *Parascaris equorum* in foals on Swedish studs. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 51 (1), 45.
<https://doi.org/10.1186/1751-0147-51-45>
- Livak, K.J. & Schmittgen, T.D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻ $\Delta\Delta$ CT method. *Methods*, 25 (4), 402–408.
<https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>
- Maizels, R.M. (2016). Parasitic helminth infections and the control of human allergic and autoimmune disorders. *Clinical Microbiology and Infection*, 22 (6), 481–486.
<https://doi.org/10.1016/j.cmi.2016.04.024>
- Martin, F. (2021). *From field to genetics : anthelmintic resistance in the equine roundworm Parascaris univalens*. Diss. Uppsala: Sveriges lantbruksuniversitet.
<http://urn.kb.se/resolve?urn=urn:nbn:se:slu:epsilon-p-113738> [2021-11-10]
- Martin, F., Eydal, M., Höglund, J. & Tydén, E. (2021). Constitutive and differential expression of transport protein genes in *Parascaris univalens* larvae and adult tissues after in vitro exposure to anthelmintic drugs. *Veterinary Parasitology*, 298, 109535.
<https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2021.109535>
- Martin, F., Höglund, J., Bergström, T.F., Karlsson Lindsjö, O. & Tydén, E. (2018). Resistance to pyrantel embonate and efficacy of fenbendazole in *Parascaris univalens* on Swedish stud farms. *Veterinary Parasitology*, 264, 69–73.
<https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2018.11.003>
- Midttun, H.L.E., Acevedo, N., Skallerup, P., Almeida, S., Skovgaard, K., Andresen, L., Skov, S., Caraballo, L., van Die, I., Jørgensen, C.B., Fredholm, M., Thamsborg, S.M., Nejsum, P. & Williams, A.R. (2018). *Ascaris suum* infection downregulates inflammatory pathways in the pig intestine in vivo and in human dendritic cells in vitro. *The Journal of Infectious Diseases*, 217 (2), 310–319.
<https://doi.org/10.1093/infdis/jix585>

- von Moltke, J., Ji, M., Liang, H.-E. & Locksley, R.M. (2016). Tuft-cell-derived IL-25 regulates an intestinal ILC2–epithelial response circuit. *Nature*, 529 (7585), 221–225. <https://doi.org/10.1038/nature16161>
- Nadkarni, M.A., Martin, F.E., Jacques, N.A. & Hunter, N. 2002 (2002). Determination of bacterial load by real-time PCR using a broad-range (universal) probe and primers set. *Microbiology*, 148 (1), 257–266. <https://doi.org/10.1099/00221287-148-1-257>
- NCBI (2021a). *Gene*. Bethesda, USA: National Center for Biotechnology Information, US National Library of Medicine. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/> [mars-oktober 2021]
- NCBI (2021b). *Primer-BLAST*. Bethesda, USA: National Center for Biotechnology Information, US National Library of Medicine. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/> [mars-oktober 2021]
- NCBI (2021c). *Standard nucleotide BLAST*. Bethesda, USA: National Center for Biotechnology Information, US National Library of Medicine. https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome [mars-oktober 2021]
- Nielsen, M.K., Wang, J., Davis, R., Bellaw, J.L., Lyons, E.T., Lear, T.L. & Goday, C. (2014). *Parascaris univalens*—a victim of large-scale misidentification? *Parasitology Research*, 113 (12), 4485–4490. <https://doi.org/10.1007/s00436-014-4135-y>
- Nogueira, D.S., Gazzinelli-Guimarães, P.H., Barbosa, F.S., Resende, N.M., Silva, C.C., Oliveira, L.M. de, Amorim, C.C.O., Oliveira, F.M.S., Mattos, M.S., Kraemer, L.R., Caliari, M.V., Gaze, S., Bueno, L.L., Russo, R.C. & Fujiwara, R.T. (2016). Multiple exposures to *Ascaris suum* induce tissue injury and mixed Th2/Th17 immune response in mice. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 10 (1), e0004382. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004382>
- Panda, S.K. & Colonna, M. (2019). Innate lymphoid cells in mucosal immunity. *Frontiers in Immunology*, 10, 861. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00861>
- Philipp, S., Huemer, H.P., Irschick, E.U. & Gassner, C. (2010). Obstacles of multiplex real-time PCR for bacterial 16S rDNA: primer specificity and DNA decontamination of Taq polymerase. *Transfusion Medicine and Hemotherapy*, 37 (1), 21–28. <https://doi.org/10.1159/000265571>
- Poritz, M.A. & Ririe, K.M. (2014). Getting things backwards to prevent primer dimers. *The Journal of Molecular Diagnostics*, 16 (2), 159–162. <https://doi.org/10.1016/j.jmoldx.2014.01.001>
- Relf, V.E., Morgan, E.R., Hodgkinson, J.E. & Matthews, J.B. (2013). Helminth egg excretion with regard to age, gender and management practices on UK Thoroughbred studs. *Parasitology*, 140 (5), 641–652. <https://doi.org/10.1017/S0031182012001941>
- Sánchez-López, C.M., Trelis, M., Bernal, D. & Marcilla, A. (2021). Overview of the interaction of helminth extracellular vesicles with the host and their potential functions and biological applications. *Molecular Immunology*, 134, 228–235. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2021.03.020>

- Singh, A.D., Koyyada, R., Samal, R., Alvi, S.B., Patnam, S., Rengan, A.K., Mudigonda, S.S., Maitra, S. & Manda, S.V. (2021). Establishment of optimal housekeeping genes for urinary extracellular vesicle based biomarker development: a step towards non-invasive diagnostics. In review, preprint publication in *Research Square*.
<https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-154349/v1>
- Sorobetea, D., Svensson-Frej, M. & Grecis, R. (2018). Immunity to gastrointestinal nematode infections. *Mucosal Immunology*, 11 (2), 304–315.
<https://doi.org/10.1038/mi.2017.113>
- Sotillo, J., Robinson, M.W., Kimber, M.J., Cucher, M., Ancarola, M.E., Nejsun, P., Marcilla, A., Eichenberger, R.M. & Tritten, L. (2020). The protein and microRNA cargo of extracellular vesicles from parasitic helminths – current status and research priorities. *International Journal for Parasitology*, 50 (9), 635–645.
<https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2020.04.010>
- Srihakim, S. & Swerczek, T.W. (1978). Pathologic changes and pathogenesis of *Parascaris equorum* infection in parasite-free pony foals. *American Journal of Veterinary Research*, 39 (7), 1155–1160
- Strub, S., Van Der Ploeg, J.R., Nuss, K., Wyss, C., Luginbühl, A. & Steiner, A. (2007). Quantitation of *Guggenheimella bovis* and treponemes in bovine tissues related to digital dermatitis. *FEMS Microbiology Letters*, 269 (1), 48–53.
<https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2006.00604.x>
- Tritten, L. & Geary, T.G. (2018). Helminth extracellular vesicles in host–parasite interactions. *Current Opinion in Microbiology*, 46, 73–79.
<https://doi.org/10.1016/j.mib.2018.08.002>
- Vivier, E., Artis, D., Colonna, M., Diefenbach, A., Di Santo, J.P., Eberl, G., Koyasu, S., Locksley, R.M., McKenzie, A.N.J., Mebius, R.E., Powrie, F. & Spits, H. (2018). Innate lymphoid cells: 10 years on. *Cell*, 174 (5), 1054–1066.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.07.017>
- Yáñez-Mó, M., Siljander, P.R.-M., Andreu, Z., Bedina Zavec, A., Borràs, F.E., Buzas, E.I., Buzas, K., Casal, E., Cappello, F., Carvalho, J., Colás, E., Cordeiro-da Silva, A., Fais, S., Falcon-Perez, J.M., Ghobrial, I.M., Giebel, B., Gimona, M., Graner, M., Gursel, I., Gursel, M., Heegaard, N.H.H., Hendrix, A., Kierulf, P., Kokubun, K., Kosanovic, M., Kralj-Iglic, V., Krämer-Albers, E.-M., Laitinen, S., Lässer, C., Lener, T., Ligeti, E., Linē, A., Lipps, G., Llorente, A., Lötvall, J., Manček-Keber, M., Marcilla, A., Mittelbrunn, M., Nazarenko, I., Nolte-‘t Hoen, E.N.M., Nyman, T.A., O’Driscoll, L., Olivan, M., Oliveira, C., Pállinger, É., del Portillo, H.A., Reventós, J., Rigau, M., Rohde, E., Sammar, M., Sánchez-Madrid, F., Santarém, N., Schallmoser, K., Stampe Ostenfeld, M., Stoorvogel, W., Stukelj, R., Van der Grein, S.G., Helena Vasconcelos, M., Wauben, M.H.M. & De Wever, O. (2015). Biological properties of extracellular vesicles and their physiological functions. *Journal of Extracellular Vesicles*, 4 (1), 27066. <https://doi.org/10.3402/jev.v4.27066>
- Zamanian, M., Fraser, L.M., Agbedanu, P.N., Harischandra, H., Moorhead, A.R., Day, T.A., Bartholomay, L.C. & Kimber, M.J. (2015). Release of small RNA-containing exosome-like vesicles from the human filarial parasite *Brugia malayi*. *PLOS*

Neglected Tropical Diseases, 9 (9), e0004069.
<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004069>

Zhang, Y., Bi, J., Huang, J., Tang, Y., Du, S. & Li, P. (2020). Exosome: a review of its classification, isolation techniques, storage, diagnostic and targeted therapy applications. *International Journal of Nanomedicine*, 15, 6917–6934.
<https://doi.org/10.2147/IJN.S264498>

Zhou, X., Wang, W., Cui, F., Shi, C., Ma, Y., Yu, Y., Zhao, W. & Zhao, J. (2019). Extracellular vesicles derived from *Echinococcus granulosus* hydatid cyst fluid from patients: isolation, characterization and evaluation of immunomodulatory functions on T cells. *International Journal for Parasitology*, 49 (13), 1029–1037.
<https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2019.08.003>

Tack

Jag vill rikta ett tack till alla de som varit med och hjälpt mig med detta arbete. Det största tacket vilja jag ge min handledare Magnus Åbrink som alltid lika positiv ställt upp med hjälp både i det praktiska arbetet i labbet, som med korrigeringsläsningen av mitt skriftliga arbete. Du har tålmodigt och entusiastiskt förklarat både olika labbmetoder samt de teoretiska aspekterna bakom arbetet, vilket varit väldigt uppskattat.

Tack också min biträdande handledare Frida Martin och min examinator Eva Tydén som båda jobbar på enheten för parasitolog. Tack för alla värdefulla tips och idéer rörande parasithantering, tillhandahållandet av *Parascaris* äggen samt feedback på det skriftliga arbetet.

Tack även alla som jobbar på enheten för immunologi. Tack Caroline Fossum, Bernt Hjertner, Claudia Lützel Schwab och Stina Hellman. Ni har på måndagsmötena kommit med tankar och idéer kring både projektets fram- och motgångar, vilket lett till korrigeringar och förbättringar av arbetet. Tack veterinärstudenterna Sofie Djerf och Cassandra Linder som också deltagit på måndagsmötena och varit till stor hjälp som bollplank. Det har varit väldigt bra att kunna diskutera och samarbeta kring olika labbmetoder med er.

Jag vill även tacka Miia Riihimäki som bidragit med BAL-sköljvätskan samt hästarna Snekkja och Willow som i BAL-sköljvätskan bistått med sina celler. Jag vill självfallet även tacka familj och vänner som kommit med värdefull input till det skriftliga arbetet samt stöttning genom de svårare delarna av arbetet.

Slutligen tackar jag även för finansiering från Ellen och Tage Westins Fond samt August Carlssons Fond som genom stipendier möjliggjort genomförandet av detta projekt.

Populärvetenskaplig sammanfattning

Hästens spolmask, *Parascaris univalens*, är en vanlig förekommande tarmparasit hos föl och unghästar. Den kan orsaka allt från luftvägsproblem med hosta och nosflöde, till mer diffusa sjukdomstecken som försämrad tillväxt, trötthet och vikt nedgång. I värsta fall kan en stor parasitbörda leda till en blockering av tarmen vilket kan få tarmen att till slut spricka och djuret dör om det inte åtgärdas i tid.

Då följderna av en spolmaskinfektion är så allvarliga rekommenderar Statens veterinärmedicinska anstalt (SVA) att avmaska föl även om ingen undersökning av parasitförekomst har gjorts innan. Det är annars ett krav för att få avmaska mot tarmparasiter hos vuxna hästar. Risken med att överanvända avmaskningsmedel är att parasiten kan utveckla resistens mot läkemedlen, varpå medlen tappas sin effekt. Detta är ett växande problem hos just hästens spolmask. En önskvärd väg runt detta problem skulle vara att utveckla ett vaccin mot parasiten i stället.

Inom forskningsvärlden diskuteras för närvarande parasitens så kallade extracellulära vesiklar (EV) som ett eventuellt lämpligt mål att rikta ett vaccin emot. EV är små blåsor fyllda med bland annat proteiner, fetter och genetiskt material i form av olika typer av RNA. EV används för kommunikation mellan celler. Parasitära EV har upptäckts kunna påverka värdjuret immunceller till parasitens fördel. Det är bland annat av den anledningarna varför EV diskuterats som ett lämpligt mål för ett vaccin.

Syftet med detta arbete har därför varit att kartlägga de än så länge outforskade EV från hästens spolmask. Det skulle lägga grunden för fortsatta studier på spolmaskens EV och i längden förhoppningsvis leda till upptäckten av en lämplig vaccinkandidat. Av den anledningen har syftet med arbetet även varit att undersöka hur larver och deras utsöndrande produkter, däribland EV, kan påverka immunceller från häst.

Vägen till att uppnå dessa mål har inneburit framrening av spolmaskägg, sätta upp larvskulturer och samlat in och rena EV från dem. Det har krävts vis justering av befintliga protokoll för uppfödning av larver samt utformning av egna protokoll för att få ägg och larver bakteriefria, så att inte bakterier påverkar resultatet. Det har även inneburit användning av PCR för att detektera hästspolmaskspecifika gener

för att bevisa att de framrenade EV:na tillhör hästens spolmask. För att undersöka hur hästens spolmask och dess utsöndrande produkter påverkar immunförsvaret hos häst har immunceller stimulerats, antingen med larver eller larvernas utsöndrade produkter (däribland EV) i cellförsök. Genom PCR har sedan förändringar i cellernas genuttryck av DUSP1 och ST2 försökts studeras. Dessa två gener har nämligen visat sig uttryckas i lägre grad hos tarmceller hos möss utsatta av mus-tarmparasiten *Heligmosomoides polygyrus*:s EV i cellförsök. Hypotesen var att samma sak skulle ske hos celler utsatta för hästens spolmask.

Studien lyckades med att påvisa spolmaskgener i EV och på så vis bevisa att de EV som renats fram tillhörde spolmasken. Resultatet från cellförsöket indikerade att immuncellers genuttryck av DUSP1 snarare stiger vid kontakt med larver, i motsats till resultatet gällande påverkan av EV från *Heligmosomoides polygyrus*. Gällande ST2 gick resultatet inte att använda då det uppstod problem bland annat med dess negativa kontroll. Om mer tid funnits hade detta försökts rättas till samt mer data hade samlats in från flera försök, vilket skulle leda till säkrare resultat.

Utöver dessa resultat ledde arbetet även till ökad kunskap kring spolmaskens larvutveckling. Detta var inte med i ursprungssyftet med arbetet men blev som en delstudie under studiens gång. Det hade som syfte att ge en bättre förståelse kring uppsättning av larvkulturer. Resultatet visade att fler ägg utvecklas till larver om de är färre som förvaras tillsammans (under 10 000st i 15ml vatten). Dessutom har hanteringen av äggen innan de renas en betydelse för larvutvecklingen. Det är bättre att låta äggen vara kvar i hästbajset fram till larvutveckling än att filtrera dem från bajset och lagra dem i vatten i stället.

Sammanfattningsvis har detta arbete tagit de första trevande stegen för att undersöka hästens spolmask EV. Det finns dock fortfarande mycket kvar att utforska innan ett vaccin mot spolmaskens EV kan bli en verklighet. En kartläggning av innehållet i EV:na, större utforskning av deras effekt på värdjuret samt om hästar infekterade med spolmask utvecklar antikroppar riktade mot EV, är bara några exempel på vad fortsatt forskning kan fokusera på.

Bilaga 1 – Hantering av parasitägg och larver

Protokoll för rening av parasitägg:

1. 5 dl träck blandas med ca 5 dl kranvatten. Blandningen mixas med stav-mixer och eventuellt mer vatten adderas för att underlätta filtrering.
2. Filtrering: Vätskan filtreras först genom 1,4 mm sil och sedan en 150 μm sil. Därefter filtreras vätskan genom två ”pitchford funnels”, cylinderformade filter; 110 μm som är placerad i det lite större 70 μm filtret.
3. Filtrerade vätskan tappas upp i en 50 ml rör. Resterande del av röret fylls upp med vatten till 50 ml.
4. Vätskan centrifugeras i 425 g under 3 min och översta vätskan pipetteras bort så att det är 10ml kvar i botten och centrifugerar på nytt (425 g i 3 min).
5. Supernatanten pipetteras bort så endast 10ml återstår och 40 ml natriumhypoklorid-lösning (Milton-2 lösning, natriumhypoklorit 2 % v/v i natriumklorid 16,5 %) tillförs. Vätskan blandas om innan centrifugering (425 g i 3 min).
6. (Äggen flötterar nu i vätskan på grund av natriumhypokloridlösningen.) Supernatanten med äggen pipetteras upp i fyra 50 ml rör med 10 ml i vardera rör → totalt tas 40 ml av supernatanten. Vardera av de fyra rören fylls upp med 40 ml vatten och centrifugeras (425 g i 3 min).
7. (Det har nu vänt på proportionen vatten jämfört natriumhypokloridlösning vilket får äggen att bilda en pellet. Återstående steg går ut på att tvätta bort natriumhypokloriden.) Supernatanten pipetteras bort så att endast 5 ml återstår i botten på alla fyra rören. Vätskan blandas om och polas i ett av rören vilket ger ca 20 ml vätska i ett rör.
8. Röret fylls upp med kranvatten till 50 ml och centrifugeras (425 g i 3 min).
9. Föregående steg upprepas ytterligare tre gånger och ger totalt fem tvättar.
10. Vätska pipetteras bort så endast 15 ml återstår = volymen äggen inkuberas i. Äggen får sedan utvecklas under minst två veckor i 28 °C värmeskåp.

Man kan med fördel ta en droppe vätska och kolla i mikroskop med jämna mellanrum, närsomhelst under processen, för att kontrollera att äggen är där man förväntar sig att de ska vara.

Protokoll för att få en bakteriell- och svampfri larvkultur

Formalinbehandling av äggen:

1. Vätskan med äggen filtreras genom 40 µm filter (äggerna är för stora att passera och kommer bli kvar på filtret). Filtret vänds upp och ner på en petriskål och äggen spolade av från filtret med 7,5 ml autoklaverat vatten. De 7,5 ml ägginnehållande vätskan flyttas till ett nytt 50 ml rör och 2,5 ml 4 % formalin tillförs, vilket ger en formalinkoncentration på 1 %.
2. Äggen inkuberas i 24 h i 28 °C.
3. Formalinet tvättas bort genom att på nytt fånga upp äggen på ett 40 µm filter och skölja dem med ca 250 ml autoklaverat kranvatten. Äggen extraheras från filtret genom att vända det upp och ner på en petriskål och skölja med 5 ml autoklaverat vatten.

Kläckning av ägg:

1. De 5 ml vätska med behandlade ägg flyttas till en autoklaverad mekanisk kläckare (Kimble® Kontes® 15 ml glashomogenisator).
2. Glasstaven förs ned 6-7 gånger och en droppe av vätskan tas till ett mikroskop för att kontrollera om kläckningen varit lyckad eller om fler slag med staven behövs.
3. Vätskan flyttas till ett 15 ml rör.

Tvättning av larver:

1. 15 ml-röret med nykläckta larverna centrifugeras i 1409 g i 5 min.
2. Supernatanten pipetteras bort.
3. Röret fylls med autoklaverat kranvatten med penicillin (50 enheter/ml), streptomycin (50 µg/ml) och fungizone (1 µg/ml).
4. Steg 1-3 upprepas fyra gånger.
5. Larverna tvättas ytterligare två gånger med cellmediet RPMI-1640 innehållande penicillin, streptomycin och fungizone (samma koncentrationer som ovan).
6. Efter sista tvätten lämnas larverna i 5 ml cellmedium och 150 µl polymyxin B (1 mg/ml) adderas.
7. Larverna inkuberas i 37 °C tills det är dags att samla EV efter 24 eller 72 h.

Bilaga 2 – cDNA syntes och PCR

cDNA syntes

Utförs i ”Clean room” – skapar mixerna:

- DNAs mix (**x antal RNA-prover + 1-2 extra**) **total volym 12 µl per prov**:
 - 1,2 µl 10x xRxn Bufferr
 - 1,2 µl DNase I
 - x µl nukleasfritt vatten:
 - $V_{\text{Total DNAs mix}} - V_{\text{buffert}} - V_{\text{DNase I}} - V_{\text{RNAprov}}$
 - =12 µl-1,2-1,2 - V_{RNAprov} (OBS! tillförs i templet rum och är beroende av RNA-koncentrationen av provet)
- Master Mix I (**x antal RNA-prover + 1-2 extra**):
 - 1 µl dNTP
 - 1 µl oligo dT
 - 1 µl Hexa
 - Gällande EV-RNA:
 - 1 µl **av vardera** reverse primer (aktin och GPD-1)
→totalt 2 µl
- Blanda Master Mix 2 (**x antal RNA-prover + 1-2 extra**):
 - Gällande EV-RNA
 - RT+ (ska bli 11µl i slutänden per prov):
 - 4 µl Buffert (5x First-Strand)
 - 1 µl DTT (0,1M)
 - 1 µl SuperScript IV
 - 5 µl nukleasfritt vatten
 - RT- (ska bli 3 µl i slutänden per prov):
 - 0,8 µl Buffert (5x First-Strand)
 - 0,2 µl DTT (0,1M)
 - 2 µl nukleasfritt vatten
 - **OBS!** Ingen SuperScript
 - Gällande Cell-RNA:
 - RT+ (ska bli 7 µl i slutänden per prov):
 - 4 µl Buffert (5x First-Strand)

- 1 μ l DTT (0,1M)
 - 1 μ l SuperScript IV
 - 1 μ l nukleasfritt vatten
 - RT- (ska bli 1,4 μ l i slutänden per prov):
 - 0,8 μ l Buffert (5x First-Strand)
 - 0,2 μ l DTT (0,1M)
 - 0,4 μ l nukleasfritt vatten
 - **OBS!** Ingen SuperScript
- “Template room” – Där proverna tillförs och reaktionerna utförs:
- DNAs behandling:
 - Blanda:
 - x μ l RNA-prov (beror på RN-koncentrationen)
 - Cell-RNA mängd: 300ng
 - →räkna ut beroende på koncentration vilken volym som ska tillföras
 - x μ l DNAs-mix
 - 12 μ l - V_{RNA}
 - Inkubera i 15 min i rumstemperatur
 - 1,2 μ l EDTA tillförs för att stoppa reaktionen
 - Inkubera 70 °C i 10 min och sedan på is i minst 1 min.
- Master Mix I blandas med provmaterial:
 - EVprov:
 - 5 μ l Master Mix I
 - x μ l RNA-provmaterial
 - EV-RNA:
 - 5/10 och 15/10: 5 μ l → 65 ng av 5/10 och 110 ng av 15/10
 - 28/10 och 1/11: 40 ng → 1,6 μ l av 28/10 och 5 μ l av 1/11
 - Slutvolym ska vara 10 μ l → 3,4 μ l nukleasfritt vatten till 28/10
 - Cellprov:
 - 3 μ l Master Mix I
 - 13,2 μ l RNA prov
- Inkubera lösningen i 59 °C i 5min → sätt på is i minst 1min
- Master Mix II blandas med provmaterial (blir 2 mixer per analysprov):
 - RT+ (totalt 20 μ l i slutet)
 - 9 μ l RNA-behandlade prov
 - 11 μ l RT+ Master Mix II
 - RT- (totalt 4 μ l i slutet)
 - 1 μ l RNA-behandlade prov
 - 3 μ l RT- Master Mix II
- Inkuberar proverna i:
 - → i rumstemperatur i 15 min

- → i 55 °C i 60 min
- → i 70 °C i 15 min (inaktiverar reaktionen)
- Späd proverna 5 gånger:
 - RT+ provet: Addera 80 µl nukleasfritt vatten till 20 µl prov → totalt 100 µl
 - RT- provet: Addera 16 µl nukleasfritt vatten till 4 µl prov → totalt 20 µl

RT-PCR

Utförs i ”Clean room”:

- Blanda PCR Mix:
 - Beräkna antal reaktioner som ska köras för att multiplicera med receptet nedan (en gen=två reaktioner per analysprov)
 - Blanda:
 - 0,5 µl dNTP (10 mM)
 - 5 µl buffert (A 5x, 1,5 mM + MgCl₂)
 - 0,1 µl polymeras enzym
 - 16,4 µl nukleotidfritt vatten
- Placera ut primer i 8-strips provrör (ett primerpar x två rör(=RT+ och RT-) per analysprov)
 - 1 µl forward primer
 - 1 µl reverse primer

Utförs i ”Template room”:

- 1 µl cDNA RT+ i hälften av rören
- 1 µl cDNA RT- i andra hälften av rören
- 22 µl PCR-Mix i varje rör

RT-PCR program

Tabell 3. RT-PCR program för GAPDH och RPL32 samt inom parentes justeringarna gjorda för ST2, DUSP1, GPD-1 och aktin.

Steg	Temperatur °C GAPDH, RPL32 (ST2, DUSP1, GPD-1 och aktin)	Tid	Antal upprepningar
1	95	5min	x1
2	95	30sek	x3
	58 (62)	30sek	
	72	30sek	
3	95	30sek	x3
	57 (59)	30sek	
	72	30sek	
4	95	30sek	x3
	54 (56)	30sek	
	72	30sek	
5	95	30sek	x26
	57 (59)	30sek	
	72	30sek	
6	72	10min	x1
7	4	Håller	

qPCR

- Beräkna antal reaktioner som ska köras per gen
- Clean room
 - PCR-mix (x antal reaktioner) → en mix per gen
 - 12,5 µl Sybr Green mix
 - 1 µl reverse primer
 - 1 µl forward primer
 - 8,5 µl nukleasfritt vatten
- Template room:
 - På en 96-brunnsplatta (Bio-Rad white plate) placeras:
 - 23 µl PCR-mix i varje brunn
 - 2 µl RT+ cDNA
 - Negativkontrollbrunnar:
 - 2 µl nukleasfritt vatten eller RT- cDNA
 - Varje prov görs i duplikat