

Immunisering af høns med antigen i sprayform

Udarbejdet af Aiko Sho Nielsen (freelancejournalist og gymnasielærer i biologi) for Danmarks 3R-Center (copyright)

– undersøgelse af en smertefri metode til produktion af antistoffer i æg.

Forskere fra Afdeling for Eksperimentel Medicin på Københavns Universitet er i gang med at undersøge en ny metode til produktion af polyklonale antistoffer i æg. Man vil forsøge at koble et udvalgt antigen på en af de vacciner, som alle kyllinger rutinemæssigt får mod sygdomme. Disse vacciner indånder kyllingerne i aerosolform, dvs. som forstøvet væske. Hvis metoden viser sig at fungere, vil den på sigt kunne spare millioner af forsøgsdyr for det ubehag og stress, som er forbundet med den normale praksis ved immunisering, hvor man sprøjter antigen ind i underhud eller muskel. Projektet støttes af Danmarks 3R-Center.

Antistoffer til mange formål

Produktion af antistoffer er et bioteknologisk område i vækst. Alene i USA menes det, at omsætningen indenfor antistofproduktion er op mod 3 milliarder dollars årligt. I dag bruger man f.eks. antistoffer til passiv immunisering mod forskellige infektionssygdomme, som modgift til toksiner fra slangebid og til diagnosticering og påvisning af forskellige stoffer i biologisk materiale. Mange af disse tests udføres i laboratorier, men antistoffer indgår også i håndkøbsprodukter, som f.eks. graviditetstests til urin.

Det er immunforsvarets evne til at danne antistoffer mod overflademolekyler på skadelige mikroorganismer (antigener), som vi mennesker kan udnytte i antistofproduktionen. Vi kan stimulere immunforsvaret til at danne lige præcis de antistoffer, som vi har brug for. I denne produktion spiller forsøgsdyr en central rolle.

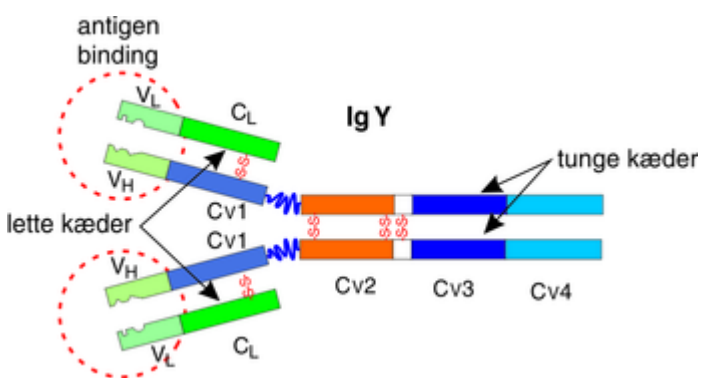
Hønsæg er fulde af antistoffer

Når man immuniserer dyr med et antigen, kan man senere tappe deres blod, som så indeholder antistoffer mod antigenet. Man bruger ofte pattedyr som mus, kaniner og får til at danne de ønskede antistoffer. Men i de sidste årtier har høns, eller rettere, hønsæg, også vist sig som værdifulde i antistofproduktion. Hønsæg indeholder store mængder af antistof, da disse overføres fra hønen til dens kylling via æggeblommen. Faktisk kan æg fra en høne give mange gange mere antistof, end man kan få fra blodet i en kanin.

At pattedyr er tættere beslægtet med hinanden end med fugle, afspejles også i deres antistoffer. Både pattedyr og fugle danner flere forskellige typer af immunoglobuliner, men hvor pattedyr danner antistof af typen IgG, danner fugle deres egen variant, kaldet IgY. Når man skal producere antistoffer mod humane (eller andre pattedyrs-)proteiner til bioassays (tests), kan det være en fordel, at bruge høns, fordi der er større chance for en kraftig reaktion fra hønsens immunforsvar, dvs. der dannes hurtigt og effektivt IgY mod antigenet. Dette skyldes at hønsens immunforsvar genkender flere epitoper på antigenet end et pattedyrs

immunforsvar. I andre tilfælde, f.eks. til visse medicinske formål, er det dog pt. stadig nødvendigt at bruge IgG fra pattedyr.

Immuniseringen af dyrene sker ved indsprøjtninger i enten underhuden eller muskelvæv. For at få et godt respons fra immunsystemet, tilsætter man et hjælpemiddel, kaldet adjuvans, som stimulerer immunsystemet. Mange typer af adjuvans virker lokalirriterende, og vil derfor give svie og smerte i området, hvor man har stukket dyret. For senere at få fat i de dannede antistoffer i pattedyr, er man nødt til at tappe blod fra dem. Hver gang et dyr skal stikkes eller tappes, kræver det, at man fanger og holder fast i dyret, og det stresser dem. Ved at bruge hønseæg til produktion af antistoffer undgår man at skulle tappe blod fra dyret, og dermed er der allerede taget et skridt på vejen mod bedre dyrevelfærd for forsøgsdyr.



Figur: IgY (copyright: Jens Bøgeskov) IgY og IgG har mange ligheder i deres struktur. På IgG er Cv2-regionerne på de tunge kæder erstattet af et 'hængsel-område' uden aminosyrer, som er bundet sammen af to disulfidbindinger. Det er med til at gøre IgG-molekylet mere bøjeligt end IgY

Monoklonale og polyklonale antistoffer

Man skelner mellem to overordnede typer antistoffer i bioteknologien; de polyklonale og de monoklonale.

Polyklonale antistoffer: Disse antistoffer kan stamme fra flere forskellige B-lymfocytter, hvilket medfører at der vil være små forskelle i deres struktur og den måde, de binder sig til antigenet. Det skyldes, at et antigens overflade kan have flere områder (epitoper), som antistoffer kan hæfte sig til. Når man immuniserer et dyr aktiveres mange B-lymfocytter, og der vil derfor dannes antistoffer rettet mod forskellige epitoper på antigenet. Polyklonale antistoffer kan høstes direkte fra blod eller fra æggeblommer.

Monoklonale antistoffer: Hvis man dyrker en enkelt lymfocyt, kan man danne mange kloner af identiske B-lymfocytter (celler, som alle stammer fra samme cellelinje). Disse kloner vil danne identiske immunoglobuliner (Ig), som derfor binder sig til den samme epitop på antigenet. Monoklonale antistoffer kan kun laves in vitro, ved en kompliceret proces, hvor man som udgangsmateriale skal bruge levende væv fra forsøgsdyr, f.eks. fra milten hos mus, til at isolere B-lymfocytter fra.

Ukendte faktorer udfordrer

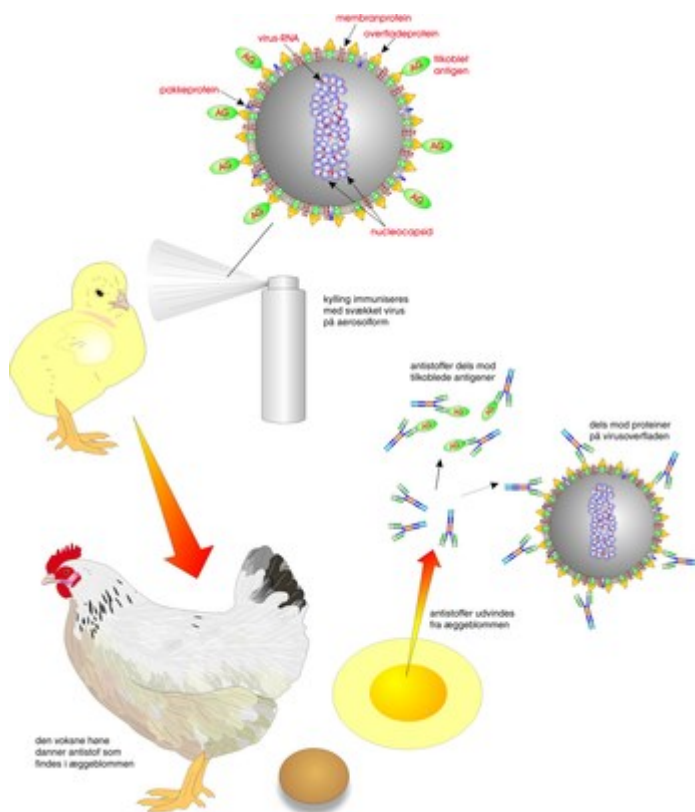
I forsøget er der fem grupper af høner, som er fordelt tilfældigt. To af grupperne er kontrolgrupper, hvor den ene gruppe blot immuniseres med almindelig IB-vaccine på aerosol som kyllinger, mens den anden immuniseres med GFP i brystmusklen, når de er voksne. To forsøgsgrupper får aerosol-vaccine med sammenkoblet GFP, hhv. med en høj og en lav GFP:virus ratio. Den sidste forsøgsgruppe af kyllinger får aerosolvaccine med GFP, dvs. hvor GFP ikke er kemisk sammenkoblet med den svækkede virus. Alle kyllinger vaccineres mere end en gang, for at få den ønskede respons fra immunforsvaret.

Når hønerne begynder at lægge æg, kan man oprense/isolere antistoffer fra æggeblommen, og undersøge om der er dannet IgY mod GFP ved hjælp af en ELISA-test.

Et afgørende trin i projektet er at få koblet det udvalgte antigen, i form af proteinet Green Fluorescent Protein (GFP) på virus-partikler i vaccinen. Det er nødvendigt, fordi cellerne i luftvejenes indre overflade (endothel) er skabt til at beskytte os ved at lukke af for de fleste fremmede stoffer, som indåndes.

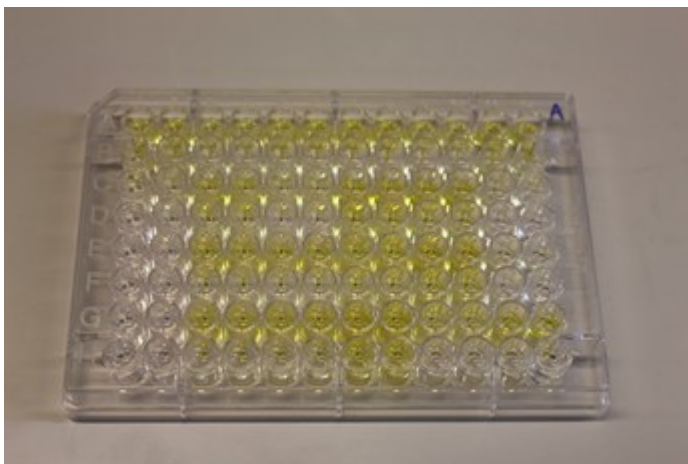
Infektøs Bronchitis (IB) virus, er en såkaldt Corona-virus, og lige præcis denne type vira kan trænge ind i blodbanen via lungerne. Forskerne vil derfor forsøge at lave en kemisk sammenkobling (konjugering) ved hjælp af stoffet succinimidyl (4-iodoacetyl)-aminobenzoat, som kan koble antigenet (GFP) til glycoproteiner på viruspartiklens ydre membran. Fidusen ved at bruge GFP som antigen er, at proteinet er fluorescerende, dvs. lyser op når man bestråler det med ultraviolet lys. Det vil hjælpe forskerne med at se, hvor meget GFP der er koblet til viruspartiklerne. Netop antallet af GFP per viruspartikel kan nemlig spille en vigtig rolle.

Hvis der er for få GFP-partikler koblet til virus, vil immunsystemet måske ikke stimuleres til at danne antistoffer, men er der for mange, vil virus måske ikke kunne passere gennem endothelcellerne. En anden usikkerhedsfaktor er, at man ikke ved særligt meget om de mekanismer, som er forbundet med at virus optages og replikeres i kroppens celler. Så det er på mange måder ganske spændende, hvad der vil ske, når man kobler GFP på virus.



Figur: Sådan vil man immunisere høns med antigen koblet til aerosolbaseret vaccine (copyright: Jens Bøgeskov)

Daggammel kylling immuniseres med antigen koblet til vaccine med svækket IB-virus. Et par uger senere booster man antistofdannelsen med en ny immunisering, også på aerosolbasis. Nu vil kyllingen/hønen danne store mængder IgY mod antigenet, både i dens blod og i blommen i dens æg. Ved oprensning af blommen kan antistofferne høstes.



Figur: ELISA-test, Når æggeblommer fra forsøgets høner er blevet oprenset, kan en indirekte ELISA-test vise, om de indeholder antistoffer mod antigenet GFP. I brøndene er der påført GFP. Først tilsættes lidt oprenset æggeblomme, og derefter et sekundært antistof, som kan binde sig til antistof dannet mod GFP. Det sekundære antistof har fået tilkøbt et enzym, som katalyserer et farveskift ved at binde sig til et substrat i væsken i brønden. Ved hjælp af et spektrofotometer kan koncentrationen af antistoffet herefter bestemmes ud fra den målte absorbans (foto: Rasmus Normann Nielsen).