

Claudia Ehrenhofer: Überprüfung der Eignung verschiedener Methoden der Antigenapplikation für die Immunisierung gegen parasitäre Erkrankungen.

## **Erweiterte Zusammenfassung**

### Zielsetzung

In der vorliegenden Arbeit wurden verschiedene Formen der Applikation von einem parasitären Extrakt hinsichtlich ihrer Wirksamkeit zur Induktion einer humoralen Immunantwort des Wirtes untersucht. Ein lösliches Membranantigen (extrahiert von dem Mitteldarm der Rinderzecke Boophilus microplus, LI-GM), das Rinder vor dem Befall mit diesem Parasiten schützt (WONG u. OPDEBEECK 1989), wurde für diese Studie ausgewählt. Um mehrere Parameter unterschiedlicher Vakzinationsregime statistisch analysieren zu können, sowie aus ökonomischen Gründen, wurden alle Versuche an Mäusen durchgeführt. Als Parameter der Wirksamkeit verschiedener Applikationsmethoden dienten die sich entwickelnden Antikörperspiegel und die Antikörperavidität, die mit einem indirekten Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) gemessen wurden.

Es wurde der Effekt der Anzahl der Injektionen, der Verwendung von Adjuvans sowie kontinuierlicher Freisetzung von parasitärem Antigen auf die humorale Immunantwort in Mäusen untersucht. Ferner wurden Parameter, die die Immunogenität und Antigenität des Zeckenextraktes beeinflussen, in der Studie berücksichtigt.

### Anzahl der Injektionen und Adjuvans

LI-GM wurde ohne Adjuvans in drei Injektionen und mit Adjuvans (Quil A) in einer, zwei und drei Injektionen verabreicht. Alle Injektionen wurden im Abstand von vierzehn Tagen subkutan injiziert. Die höchsten Anti-LI-GM Antikörperspiegel wurden erreicht, wenn die gesamte Dosis von LI-GM mit Adjuvans in

drei Injektionen im Abstand von vierzehn Tagen gegeben wurde ( $P < 0.01$ ). Das Adjuvans hatte einen starken immunpotenzierenden Effekt ( $P < 0.01$ ).

#### Verschiedene Formen der Antigen- und Adjuvansapplikation

In diesem Versuch wurden osmotische Pumpen (Alzet, Model 2 002), die kontinuierlich Antigen über vierzehn Tage freisetzen, Injektionsreihen, sowie Kombinationen dieser beiden Formen der Antigenapplikation eingesetzt, um Versuchstiere mit LI-GM (mit und ohne Adjuvans) zu immunisieren. Die osmotischen Pumpen wurden vor der subkutanen Implantation für vier Stunden bei  $37^{\circ}\text{C}$  in physiologischer Kochsalzlösung inkubiert. Mit den zu injizierenden Antigenchargen wurde gleichermaßen verfahren.

Die gemessenen Anti-LI-GM Antikörperspiegel waren nach allen Applikationsarten zumeist gleichermaßen erhöht, wenn LI-GM mit Quil A verabreicht worden war ( $P < 0.01$ ). Die Kombination einer Injektion mit der Implantation einer Pumpe bewirkte tendenziell höhere Antikörperspiegel. Nach der Applikation von LI-GM ohne Adjuvans zeigten nur Mäuse, die entweder zwei Injektionen erhalten hatten oder denen zwei Pumpen implantiert worden waren, erhöhte Anti-LI-GM Antikörperspiegel ( $P < 0.05$ ).

Die Avidität der Antikörper wurde nur für Mäuse bestimmt, die LI-GM mit Adjuvans erhalten hatten, da die Antikörperspiegel der anderen Mäuse für die benutzte Analysemethode zu niedrig waren ( $< 0,35$  Absorbance bei  $405\text{ nm}$ ). Die Gruppe von Mäusen, die LI-GM mit Quil A kontinuierlich von zwei osmotischen Pumpen erhalten hatte, mußte ebenfalls von der Analyse ausgeschlossen werden. Die Bindungsstärke der Anti-LI-GM Antikörper stieg nach allen anderen Applikationsarten während des Untersuchungszeitraumes (39 Wochen) an. Mäuse, die LI-GM mit Quil A in einer Injektion erhalten hatten und denen nachfolgend eine osmotischen Pumpe implantiert worden war, hatten tendenziell die höchste durchschnittliche Antikörperavidität.

### Komplexe Zusammensetzung von LI-GM

Die Proteinzusammensetzung von LI-GM wurde mit Hilfe der Sodium Dodecyl Sulphate-polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE) und der High Performance Size Exclusion Chromatography (HPSEC) untersucht. Unter reduzierten Bedingungen in der SDS-PAGE waren multiple Banden im Molekulargewichtsbereich von < 14,3 bis < 200 kDa identifiziert worden. In der HPSEC, in der Proteine nicht reduziert wurden, trat ein Molekulargewichtsbereich von < 12,4 bis > 2 000 kDa auf. LI-GM zeigte somit eine komplexe Proteinzusammensetzung.

### Stabilität von LI-GM

LI-GM wurde für bis zu 14 Tage bei 37°C in einem Brutschrank inkubiert und anschließend mit der HPSEC analysiert. Bereits nach vier Stunden traten bedeutende Veränderungen des Protein Profils auf, die sich bis zum dritten Tag der Inkubation fortsetzten. Danach waren zwischen dem dritten und vierzehnten Tag der Inkubation nur noch geringe Veränderungen des Proteinprofils feststellbar. Die Reaktivität des inkubierten Antigens mit spezifischen Antikörpern (Antigenität), die mit Hilfe des indirekten ELISA gemessen wurde, blieb jedoch erhalten.

Weiterhin wurden Mäuse sowohl mit nicht inkubiertem LI-GM und LI-GM, das für 4 Stunden bei 37°C inkubiert worden war, immunisiert. Die Fähigkeit von LI-GM, eine Immunantwort in Mäusen zu stimulieren (Immunogenität), war nach vierstündiger Inkubation tendenziell bis signifikant reduziert (LI-GM ohne und mit Adjuvans, entsprechend). Der Abfall der Immunogenität trat dabei unabhängig von der gesamten Dosis des Antigens und vom Hinzufügen des Adjuvans Quil A auf.

### Modell Vakzine

Da eine einsatzfähige Vakzine gegen Parasiten voraussichtlich aus einer Mischung verschiedener gentechnisch hergestellter

Antigene bestehen wird, wurde in weiteren Versuchen das LI-GM Antigen durch eine Mischung aus Antigenen ersetzt. Ziel dieser Versuche war es, den Einfluß der Molekulargröße, verschiedener Applikationsformen und der komplexen Zusammensetzung eines solchen Antigengemisches auf die Immunantwort im Detail zu studieren. Die Antigene (Cytochrom C, 12,4 kDa; Bovines Serum Albumin (BSA), 66 kDa;  $\beta$ -Amylase, 200 kDa; Thyroglobulin, 669 kDa), die in ihren Molekulargewichten dem Molekulargewichtsspektrum vom LI-GM Antigen entsprechen, wurden einzeln und als Antigenmischung (komplexes Antigen) appliziert. Die Ergebnisse dieser Versuche können wie folgt zusammengefaßt werden:

- a) Mit zunehmender Molekulargröße des Antigens stieg seine Fähigkeit eine Immunantwort, die mit Hilfe des ELISA gemessen wurde, hervorzurufen (Cytochrom C < BSA <  $\beta$ -Amylase < Thyroglobulin).
- b) Die Fähigkeit von Cytochrom C, in Mäusen eine mit einem indirekten ELISA meßbare Immunantwort zu induzieren, war entweder durch die Molekulargröße oder durch die Struktur von Cytochrom C beeinträchtigt.
- c) Die Injektion einer Antigenmischung (BSA,  $\beta$ -Amylase und Thyroglobulin) führte zur beinahe vollständigen Unterdrückung der Immunantwort auf BSA. Dieses Phänomen war weniger deutlich, wenn die gleiche Antigenmischung durch osmotische Pumpen im Wirt freigesetzt wurde.
- d) Das üblicherweise benutzte Vakzinationsregime von drei Injektionen im Abstand von vierzehn Tagen kann durch die Implantation von zwei osmotischen Pumpen ersetzt werden. Dabei scheint sowohl die Molekulargröße als auch die komplexe Zusammensetzung eines Antigengemisches, keinen Einfluß auf den Erfolg der kontinuierlichen Antigen Freisetzung zu haben.

In Zukunft werden mit Sicherheit zahlreiche natürliche und/oder rekombinierte Antigene von Parasiten zu Immunisierungszwecken zur Verfügung stehen. Aus ökonomischen Gründen werden neu entwickelte Vakzinen aus Antigenen von mehr als einer Parasitenspezies zusammengesetzt sein. Das in dieser Arbeit benutzte künstliche komplexe Antigengemisch (bestehend aus Cytochrom C, BSA,  $\beta$ -Amylase und Throglobulin) kann als ein Modell für eine solche Vakzine betrachtet werden. Die kontinuierliche Freisetzung von Antigenen (z.B. durch osmotische Pumpen) scheint den immunisierenden Effekt wenig immunogener Antigene zu verstärken.

Die zur kontinuierlichen Freisetzung von Antigen benutzten osmotischen Pumpen sind nur für experimentelle Zwecke zugelassen und müssen bei Praxisversuchen durch dort anwendbare Applikationsformen (z.B. Cholesterol Pellets) ersetzt werden. Insgesamt erscheint die Applikation von Vakzinen auf der Basis kontinuierlicher Freisetzung von parasitären Antigenen eine erfolgsversprechende Lösung zu sein.

## 7. SUMMARY/ ERWEITERTE ZUSAMMENFASSUNG

### Summary

The effect of different modes of vaccine delivery on the immune response in mice to a parasite antigen was examined in my study. Membranes derived from the midgut of the cattle tick B. microplus were solubilised with low ionic strength buffer (LI-GM) and used as a parasite antigen for my studies on the role of antigen delivery on immune responses. An ELISA was established to measure anti-LI-GM antibody levels in the sera of mice which were used as an experimental model.

Multiple (three) injections of LI-GM (100  $\mu\text{g}$ ) plus an adjuvant (Quil A, 150  $\mu\text{g}$ ) elicited significantly higher antibody responses in mice than did either one or two injections. Vaccination with LI-GM plus Quil A was generally significantly better than LI-GM without Quil A in eliciting antibody responses in mice. Quil A has a strong immunopotentiating effect on the immune response to LI-GM in mice.

An injection of LI-GM followed by continuous delivery of the antigen, both in the presence of Quil A induced the highest antibody levels as well as antibodies with a higher average avidity over 39 weeks, than all other modes of antigen delivery investigated. LI-GM (500  $\mu\text{g}$ , without adjuvants) delivered either in three injections (weeks 0, 2, 4), or from osmotic pumps (over 28 days), induced similar levels of antibodies in these two groups of mice.

The complexity of LI-GM was shown by both SDS-PAGE and HPSEC with molecular weight ranges of  $< 14.3$  to  $< 200$  kDa and  $< 12.4$  to  $> 2\ 000$  kDa identified, respectively, by these two techniques.

The immunogenicity of LI-GM in mice was significantly reduced

after incubation for 4 hours at 37°C, while its antigenicity either stayed constant or increased during an incubation period of up to 14 days at 37°C. The decrease in the immunogenicity appeared to be independent of both, the total dose applied and the addition of Quil A .

Further studies on antigen delivery were carried out using an artificial complex mixture of antigens (including BSA (66 kDa),  $\beta$ -amylase (200 kDa) and thyroglobulin (669 kDa)), because LI-GM did not seem to be an appropriate antigen to study the effect of various modes of vaccine delivery on the immune response in depth. These studies revealed that:

- a) The immunogenicity was increased as the molecular size (weight) increased (BSA <  $\beta$ -amylase < thyroglobulin).
- b) Either thyroglobulin,  $\beta$ -amylase or both possessed epitopes which were immunodominant to epitopes of BSA.
- c) The immunosilent status of BSA could be broken when the mixture of antigens was delivered continuously by osmotic pumps over 28 days.
- d) Controlled release of the antigen mixture tended to induce higher antibody levels against the three antigens compared with three injections.