

Strategisamling FHF Trondheim 1. juni 2001

# Grunnleggende kunnskap for vaksineutvikling

Siri Mjaaland

Veterinærinstituttet / FHI

# Bakgrunn

- Virussykdommer stort problem for oppdrettsnæringen
  - Dagens vaksiner – lite effektive / fraværende
  - Hvorfor får vi det ikke til?
  - NFR: erkjennelse av behov for økt grunnleggende kunnskap om hva som skjer i løpet av en virusinfeksjon i laks
- **Kunnskapsbaserte, målrettede vaksinestrategier**

# Kunnskapsplattform for viral akvamedisin

Virus – vert interaksjoner

Havbruk 185217/S40; 2008-2012

## Partnere:

Siri Mjaaland, VI/FHI (koordinator)

Jorunn Jørgensen, NFH, UiT

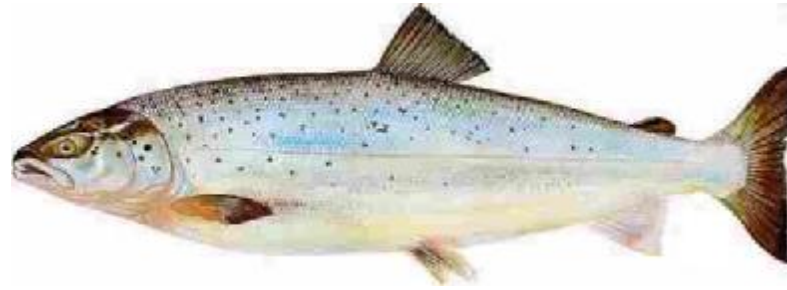
Børre Robertsen, NFH, UiT

Unni Grimholt, UiO

- 4 likeverdige prosjekter, som henger nøye sammen
- 4 år
- 16 mill (6 mill fra FHF)

# Modellsystem (virus-vert interaksjoner)

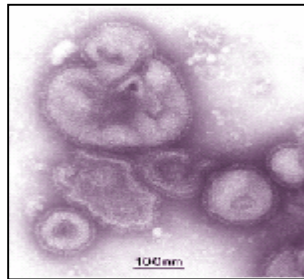
Vert: Laks



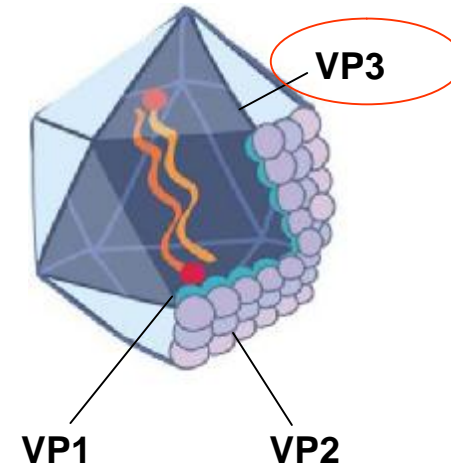
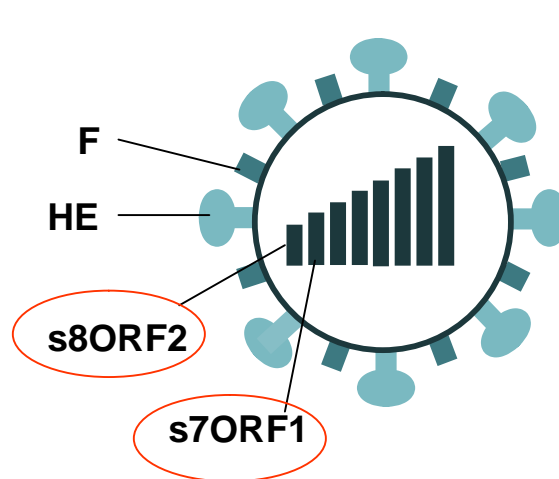
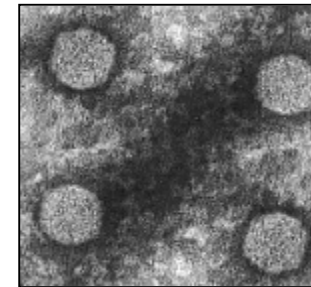
Virus:

- Viktige for oppdrettsnæringen
- Virus vi har mye kunnskap om
- Trigger ulike immunresponser
- Utviklet ulike strategier for å unnslippe vertens immunsystem

ILAV



IPNV



# Verts-virus interaksjoner- en evig kamp!

**Vertens immunforsvar:** viktig hindring for infeksjøs virus

**Virus** har utviklet ulike mekanismer for å unngå dette forsvaret

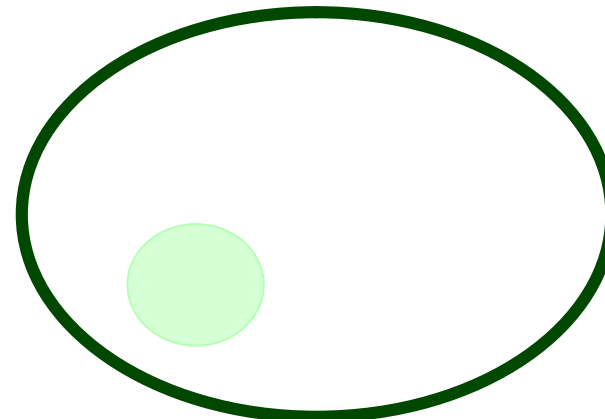
## MÅL:

Å forstå dette samspillet mellom virus og vert er viktig for å kunne utvikle gode, målrettede vaksinestrategier

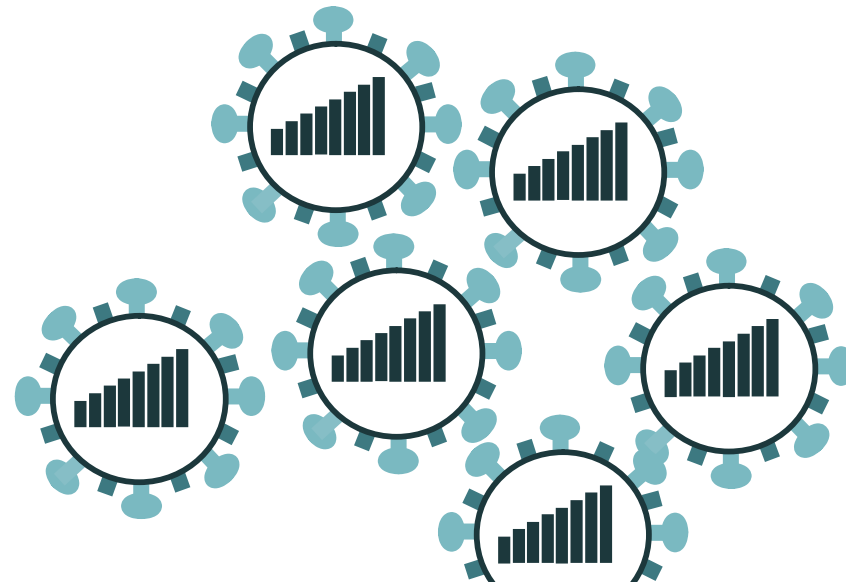
# Hovedfokus

- ILAV / IPNV virulens
- Interaksjon med førstelinjeforsvaret (IFN systemet)
- Antigen presentasjon
- Karakterisering av beskyttende immunresponser
- Vaksinetilnærminger

# Virusinfeksjon



Celle



- Intracellulær parasitt
- infeksjon setter cellen i alarmberedskap

# Immunsystemet

**STRAKS:** Førstelinjeforsvaret / medfødt immunrespons  
(IFN-systemet)

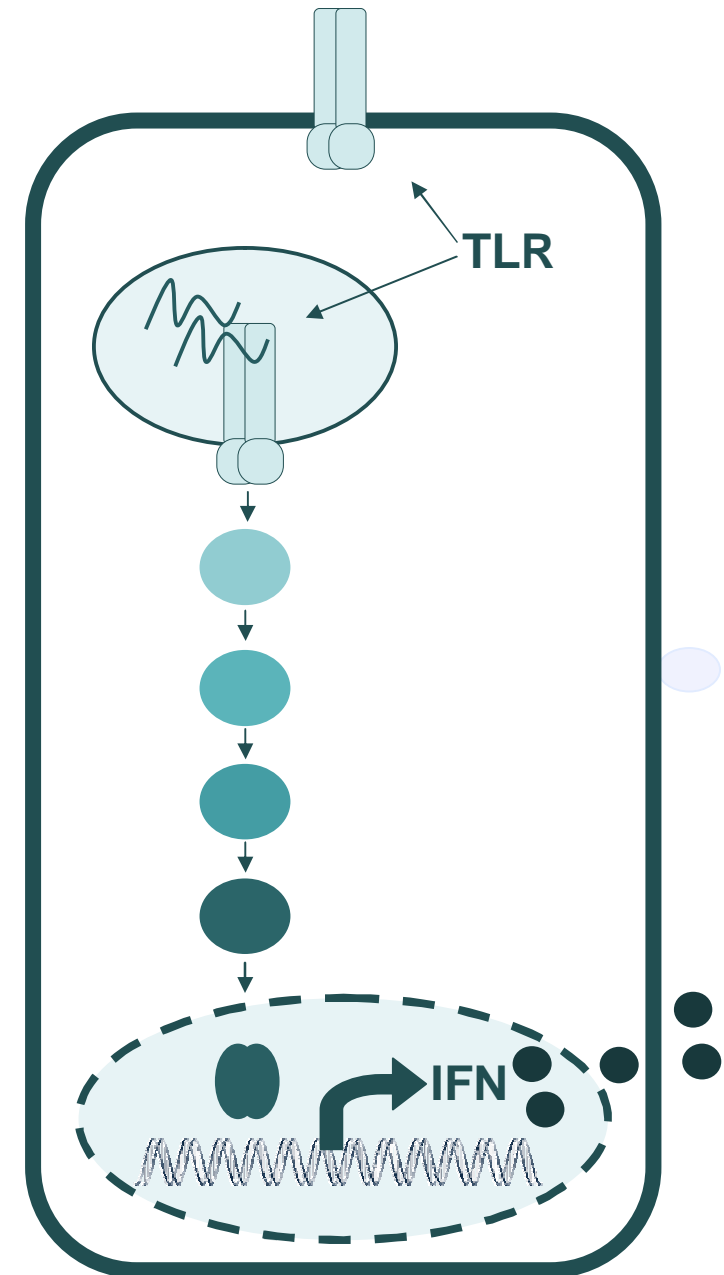


**OVER TID:** Ervervet / adaptiv immunrespons  
(B-celler / T-celler)



# Medfødt immunforsvar (førstelinjeforsvar)

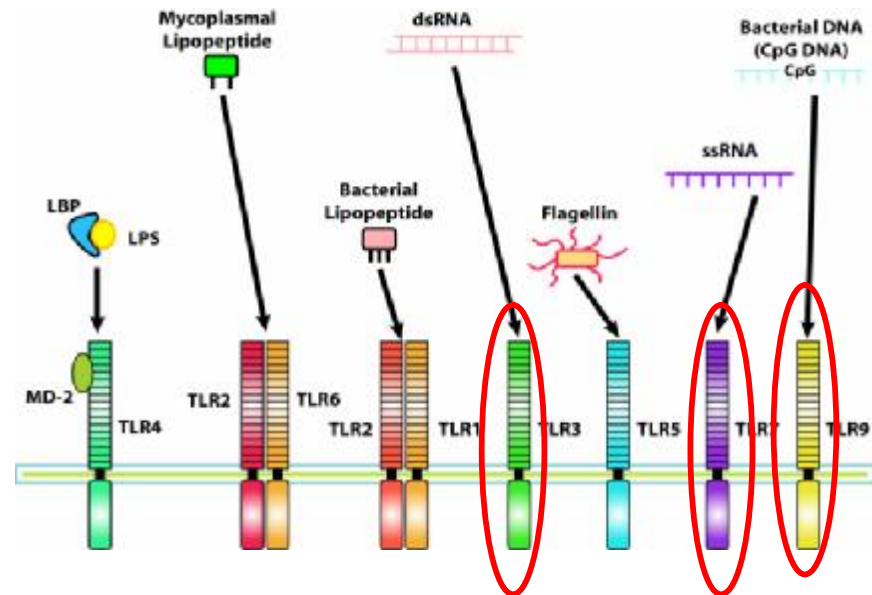
- Verten trenger ikke ha "sett" patogenet før.
- Toll-liknende reseptorer (TLR) kjenner igjen molekyler fra patogenet



# Toll-lignende reseptorer (TLR)

## - viktige sensorer for virusinfeksjoner

- TLR 3, 7, 8 og 9 gener er identifisert i mange fiskearter, deriblant laks
- Stimulerer produksjon av signalmolekyler som er viktige for beskyttelse:
  - **interferoner**
  - **pro-inflammatoriske cytokiner**
- TLR-ligander (eks.: CpG og poly I:C) tilsatt vaksiner er vist å ha adjuvant effekt



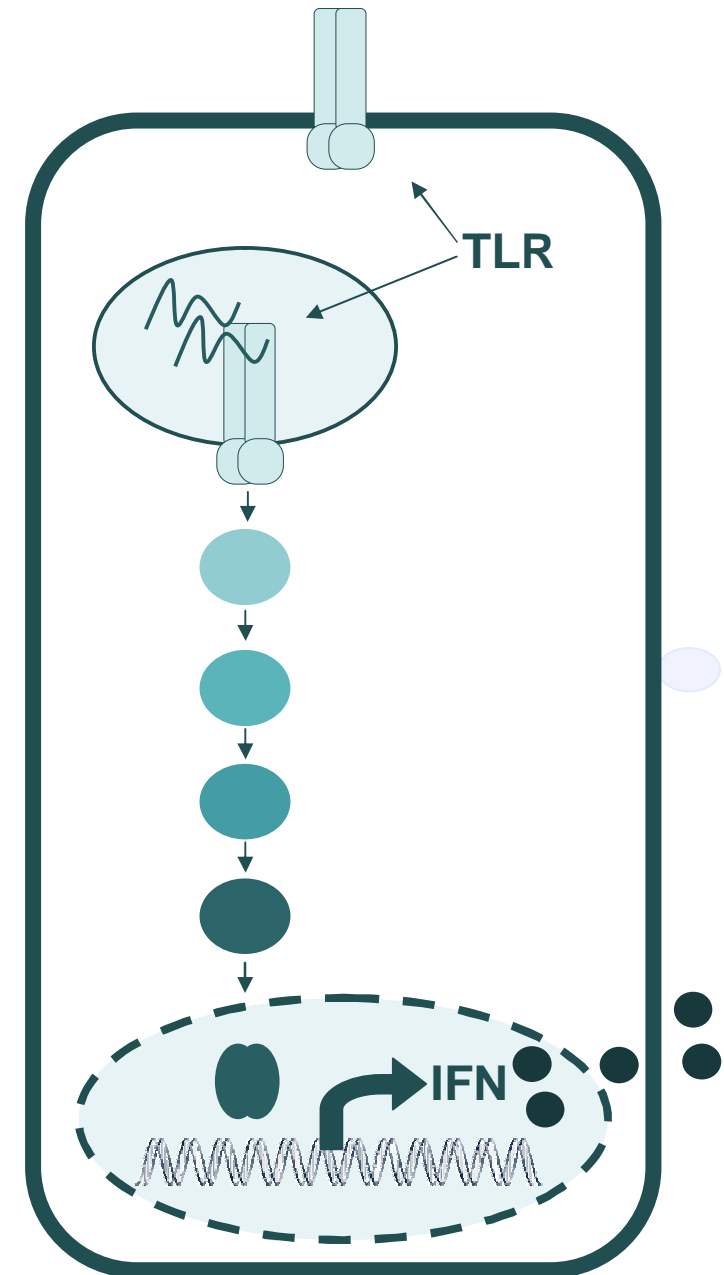
**Det medfødte forsvarets gjenkjenning av patogener – også viktig for vaksineutvikling?**

# Medfødt immunforsvar (førstelinjeforsvar)

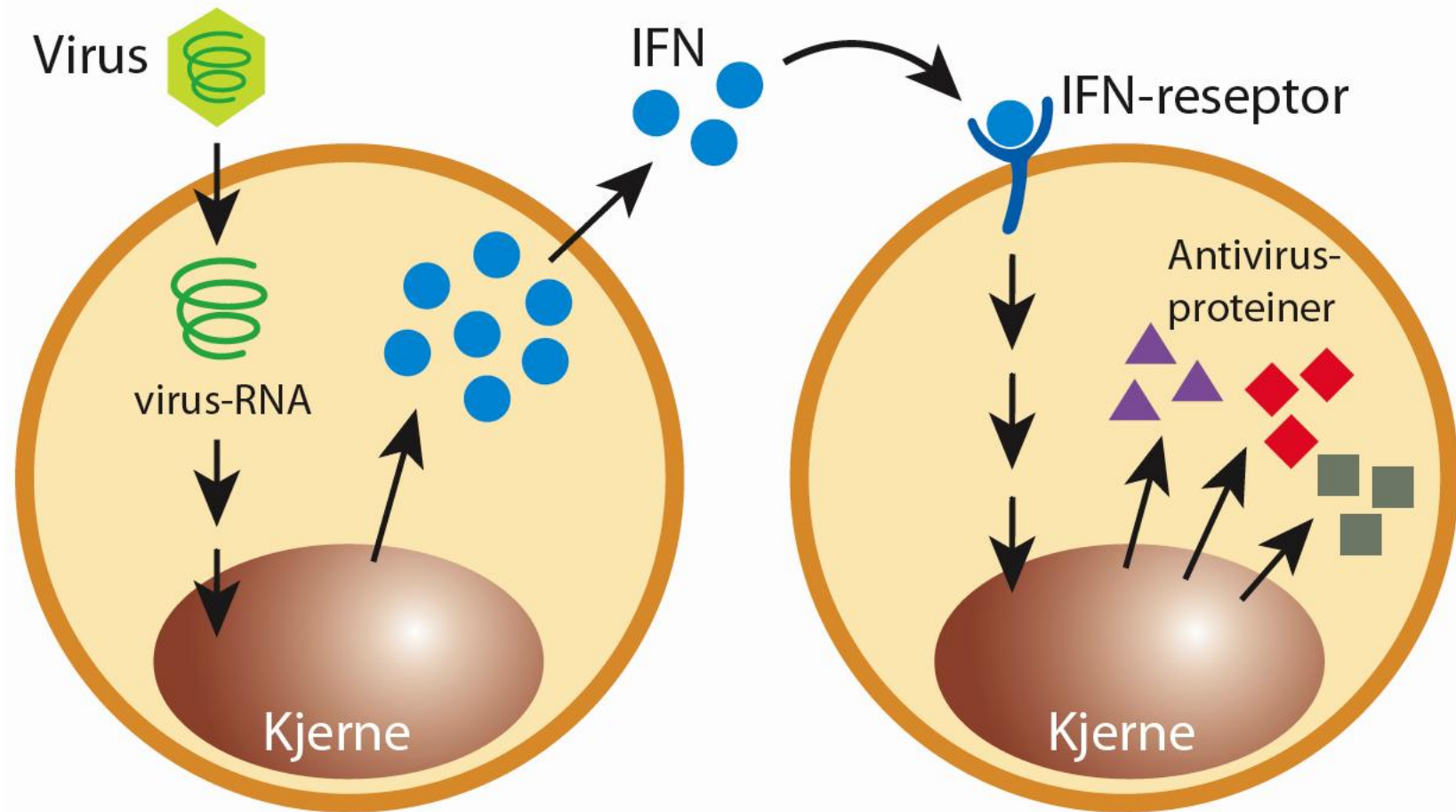
- Verten trenger ikke ha "sett" patogenet før.
- Toll-liknende reseptorer (TLR) kjenner igjen molekyler fra patogenet

## INTEFERON type I

- Skilles ut fra celler
- "SOS" signal, oppregulering av antivirale proteiner
- Hemmer virusreplikasjon



# Interferoner (IFN) er proteiner som beskytter celler mot virus-infeksjon

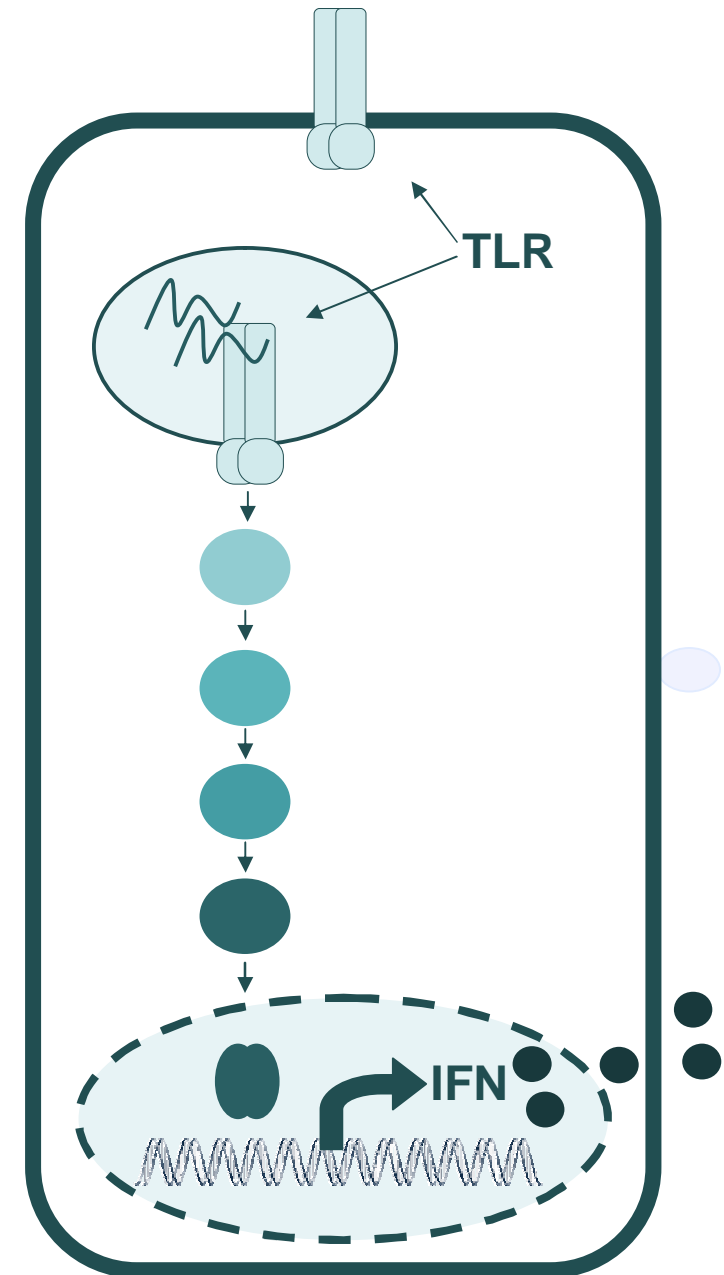


# Medfødt immunforsvar (førstelinjeforsvar)

- Verten trenger ikke ha "sett" patogenet før.
- Toll-liknende reseptorer (TLR) kjenner igjen molekyler fra patogenet

## INTEFERON type I

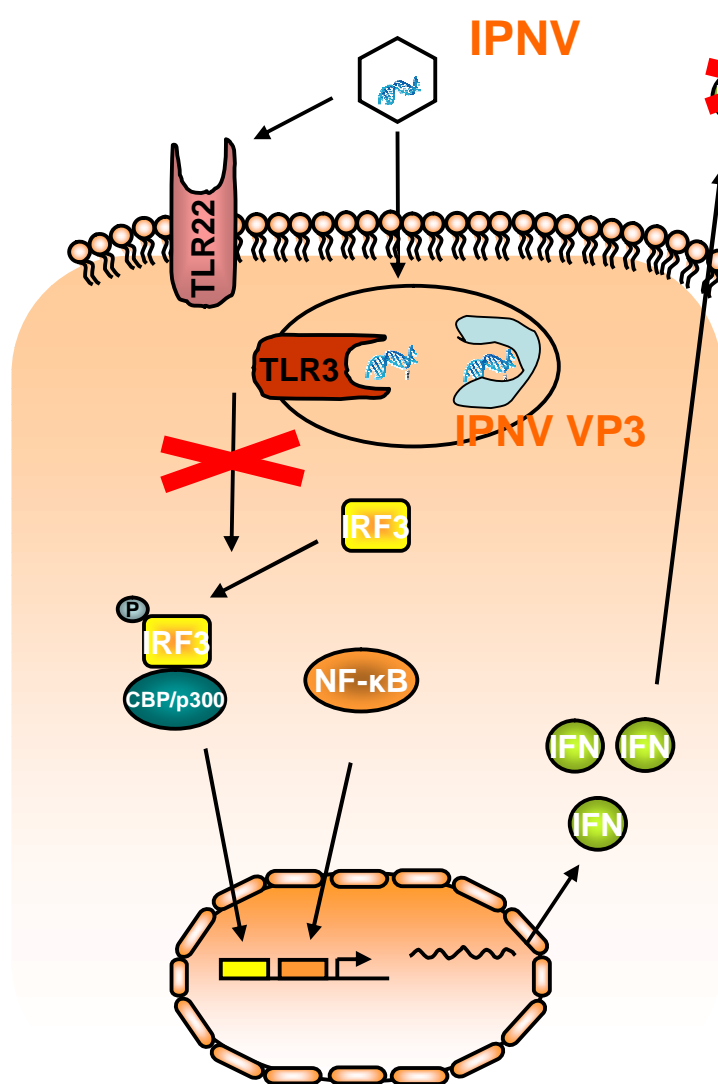
- Skilles ut fra celler
- "SOS" signal, oppregulering av antivirale proteiner
- Hemmer virusreplikasjon
- Virus svarer med antagonister som hemmer interferon



# Interferon antagonisme

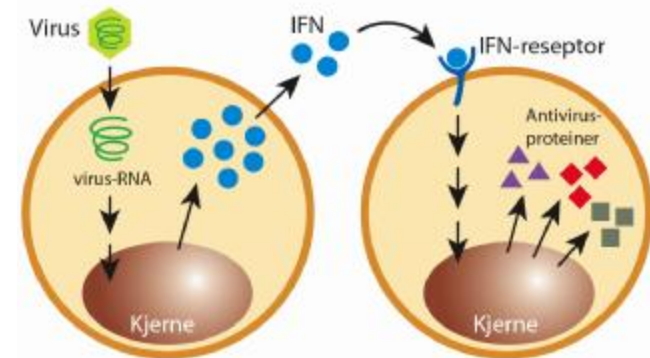
- Hvordan unnslipper virus cellens interferonrespons?
- Proteomikk: Y2H (protein-protein interaksjoner)
- Mer fullstendig forståelse av molekylær patogenese ved ILA og IPN

# Hvilke jokere har IPN virus gjemt i ermet?

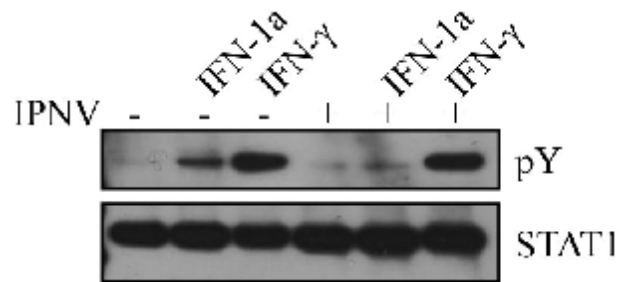


IPNV **VP3** binder dsRNA –  
hindrer aktivering av  
reseptorer som binder virus-RNA

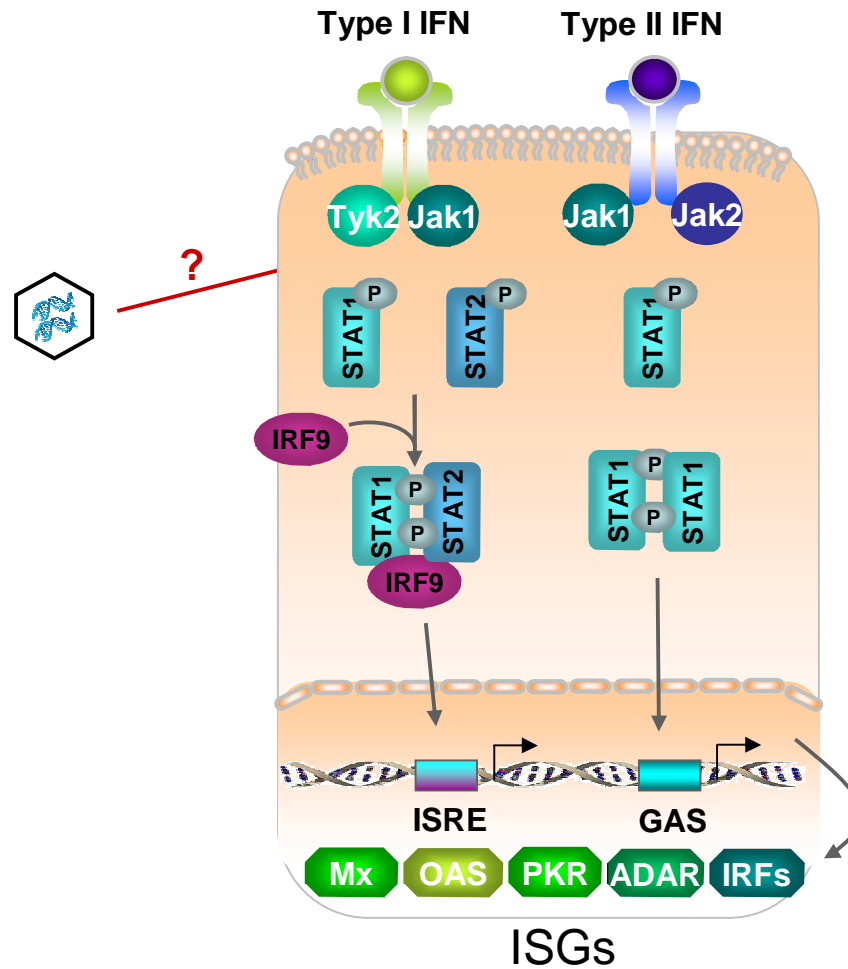
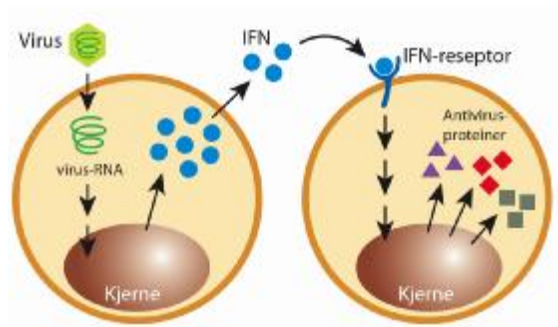
Resultat: hemmer IFN produksjon



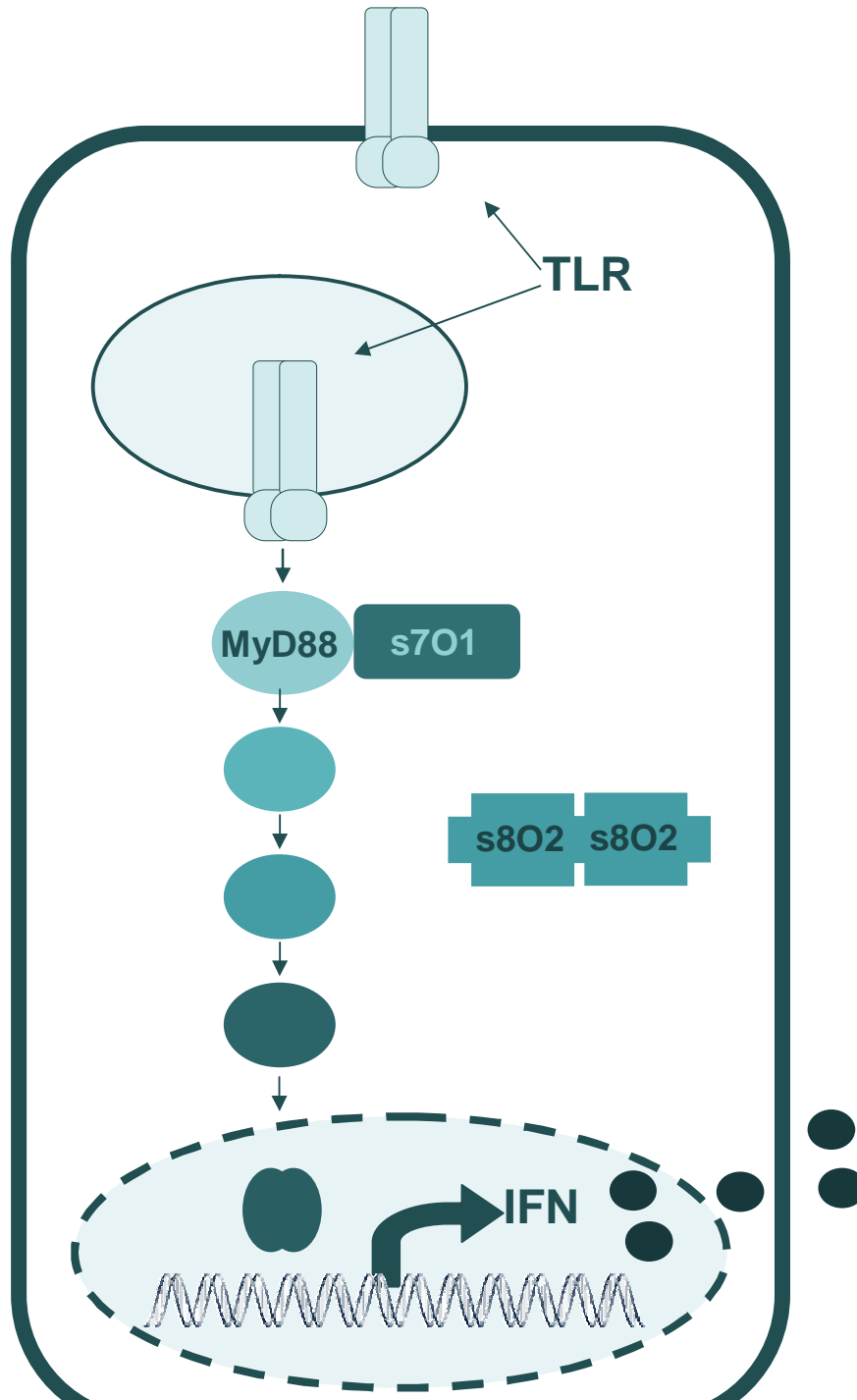
# IPNV hemmer IFN- $\alpha$ 1 industert fosforylering av STAT1 – og dermed induksjon av antivirale gener



Lysates from IPNV infected, IFN-stimulated TO-cells



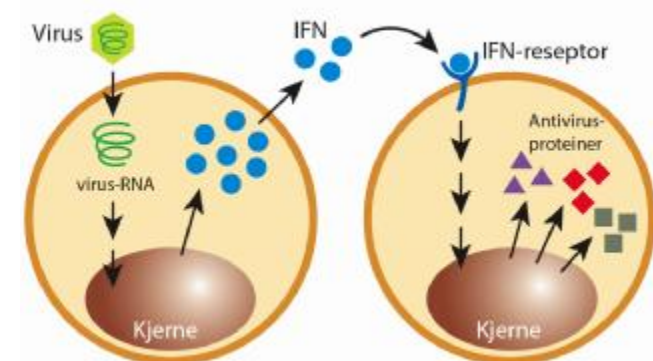




## Hvordan slipper ILA virus unna?

- **s802** binder dsRNA - kan hindre at reseptorer som binder virus-RNA blir aktiverte
- **s802** binder seg til seg selv
- **s701** binder **MyD88**

**Resultat: hemmer IFN produksjon**



# Interferoner

Funksjonen til interferoner i iboende og adaptiv immunitet mot virusinfeksjoner hos atlantisk laks

Typer, ekspresjon og beskyttelse mot virusinfeksjon

Virus-mediert hemming av interferon-syntese

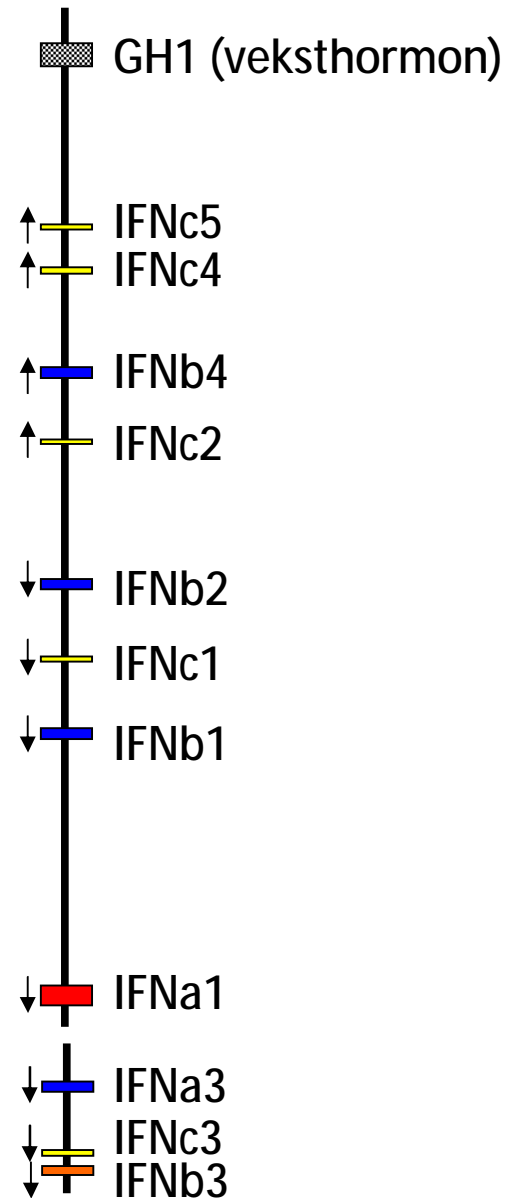
Rolle i DNA-vaksine mekanismer

Rolle i T-celle mediert adaptiv immunitet

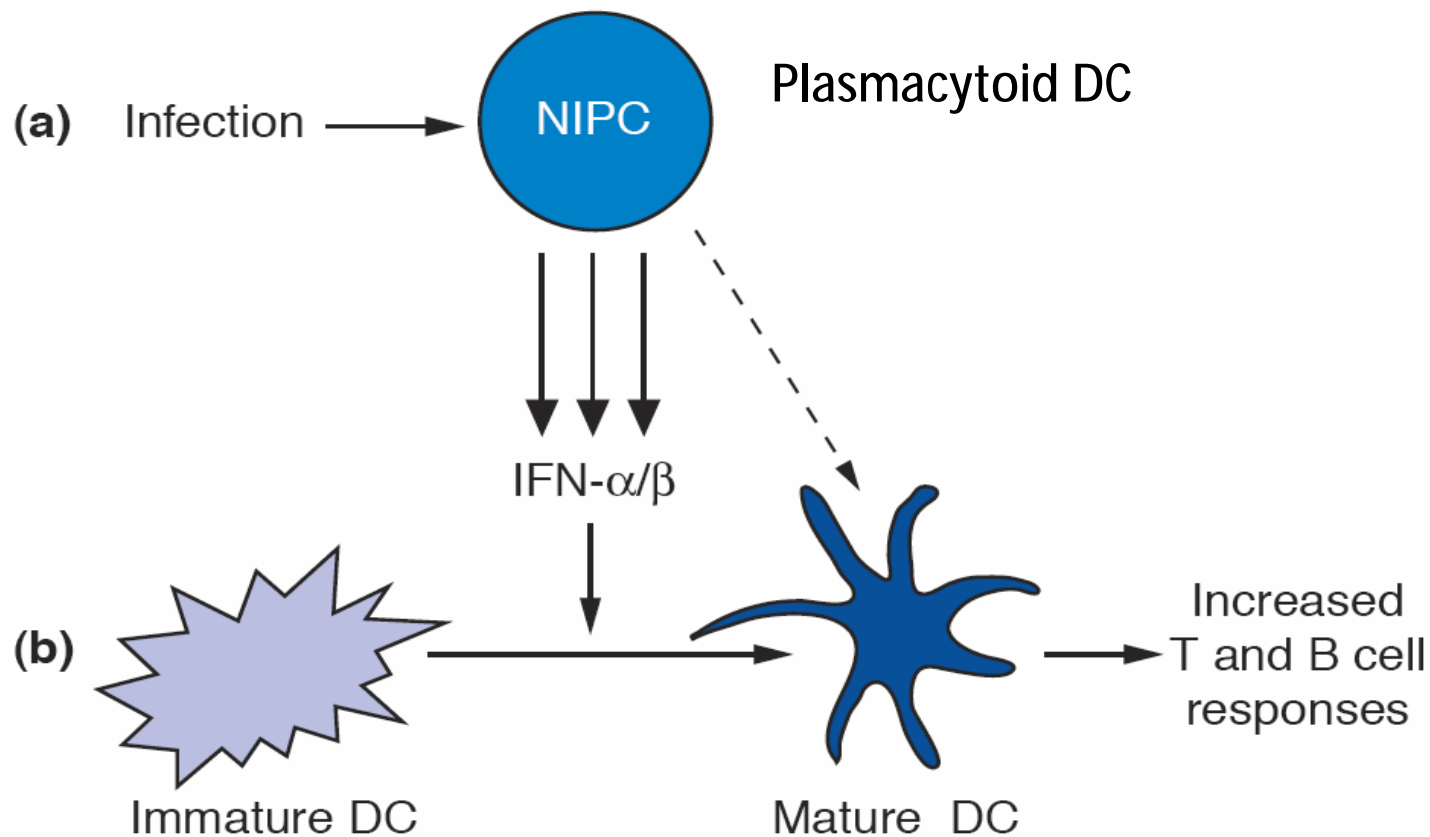
- Type I IFN: viktigst i medfødt immunitet
  - Laks: IFNa, IFNb, IFNc, IFNd (>12 gener)
- Type II IFN: viktigst i ervervet immunitet
  - Laks: IFNg1, IFNg2, IFNg3

# Type I IFN lokus hos atlantisk laks

1 IFNa1 gen  
1 IFNa3 gen  
4 IFNb gener  
5 IFNc gener



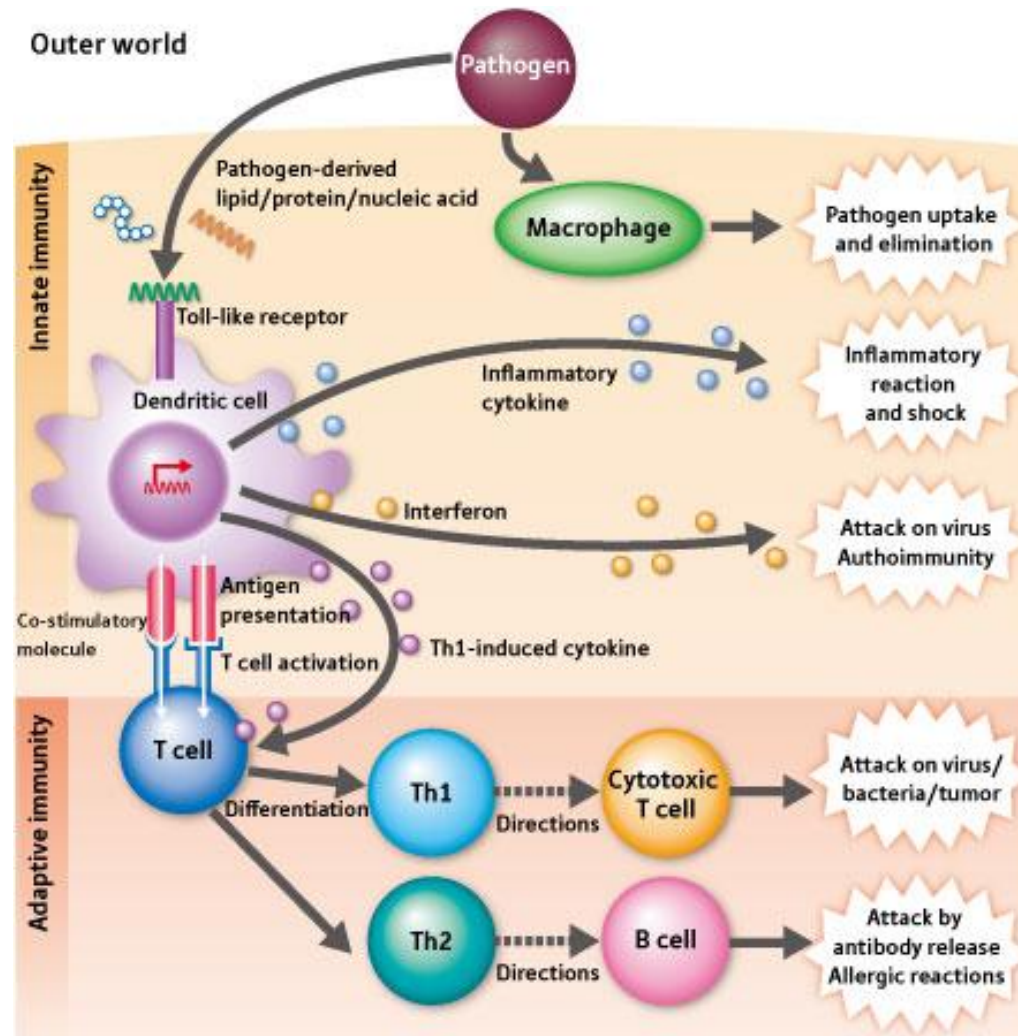
Type I IFN kopler sammen medfødt og ervervet immunrespons ved å stimulere modning av antigenpresenterende (dendrittiske) celler



# Medfødt versus ervervet immunitet

Medfødt  
immunitet

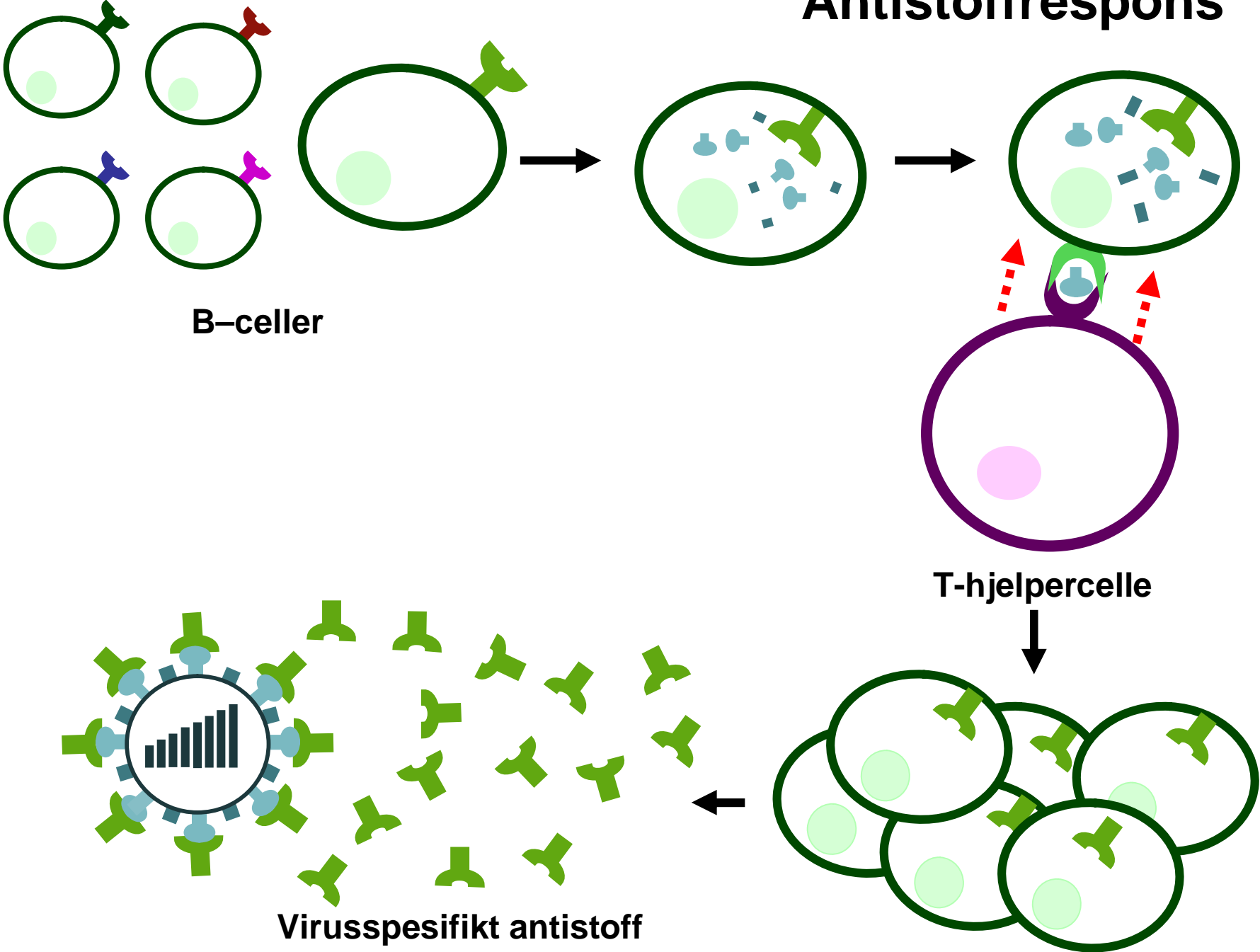
Ervervet  
immunitet



# Adaptive immunresponser

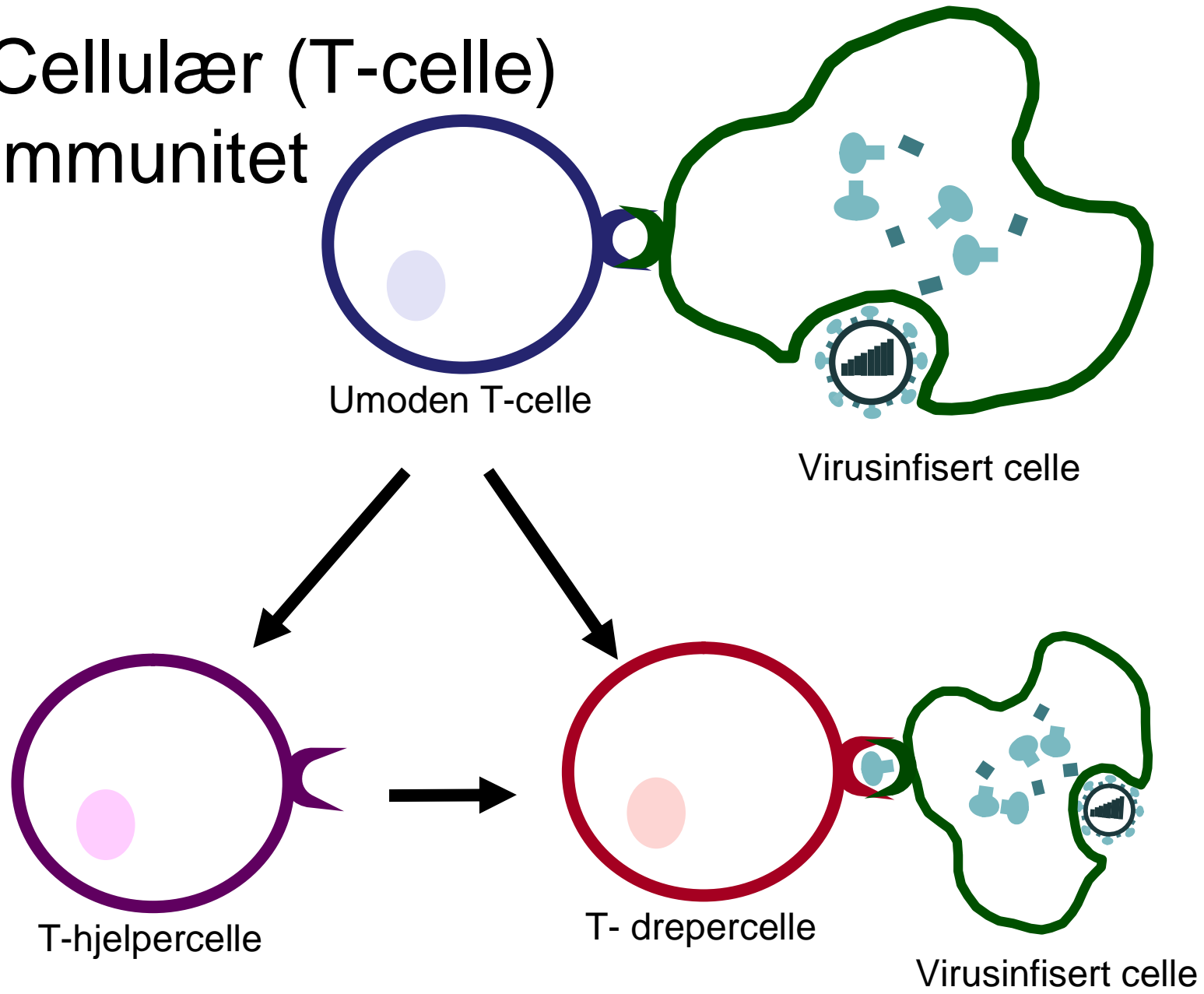
- Humoral respons (B-celle respons)
- Cellulær respons (T-celle respons)

# Antistoffrespons

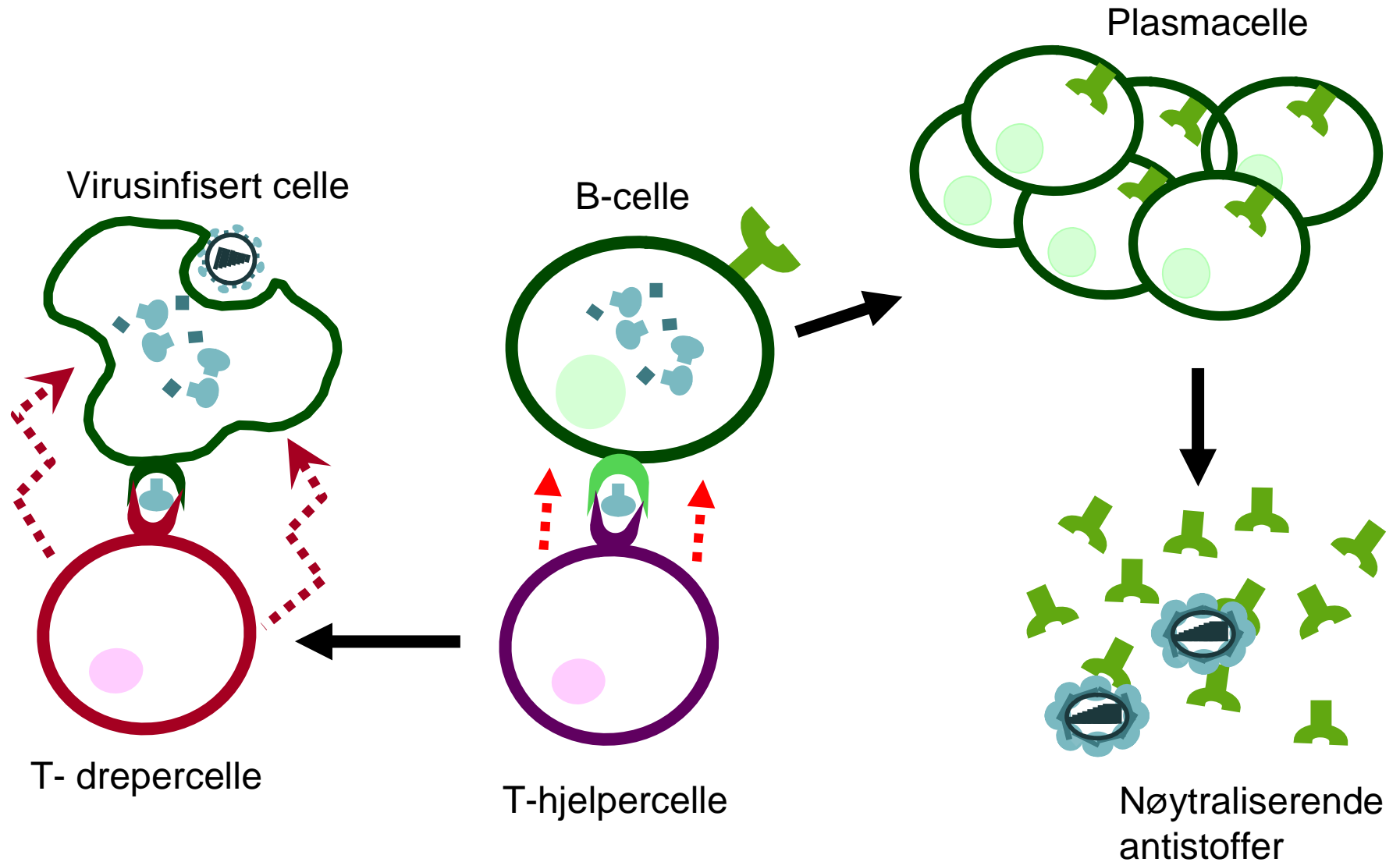




# Cellulær (T-celle) immunitet



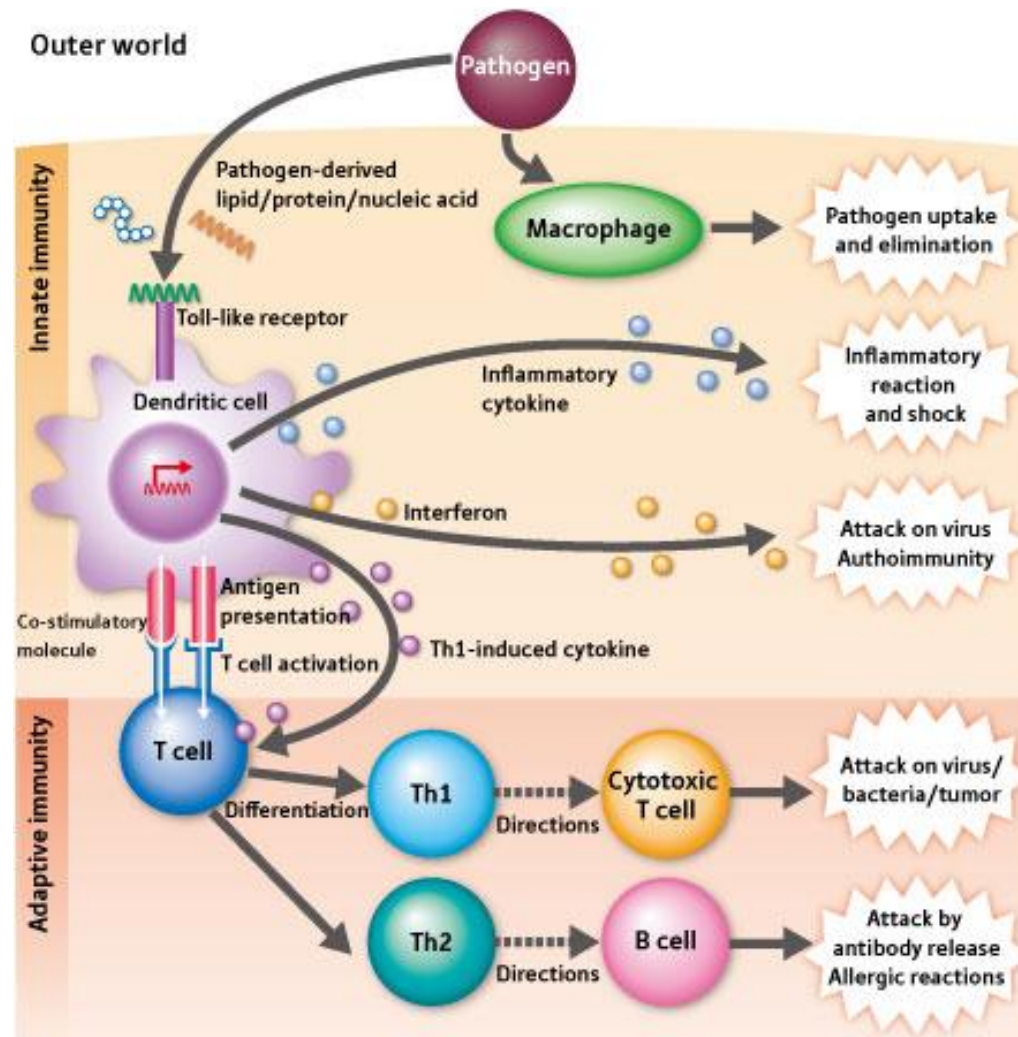
# Immunsystemets to hovedgrener



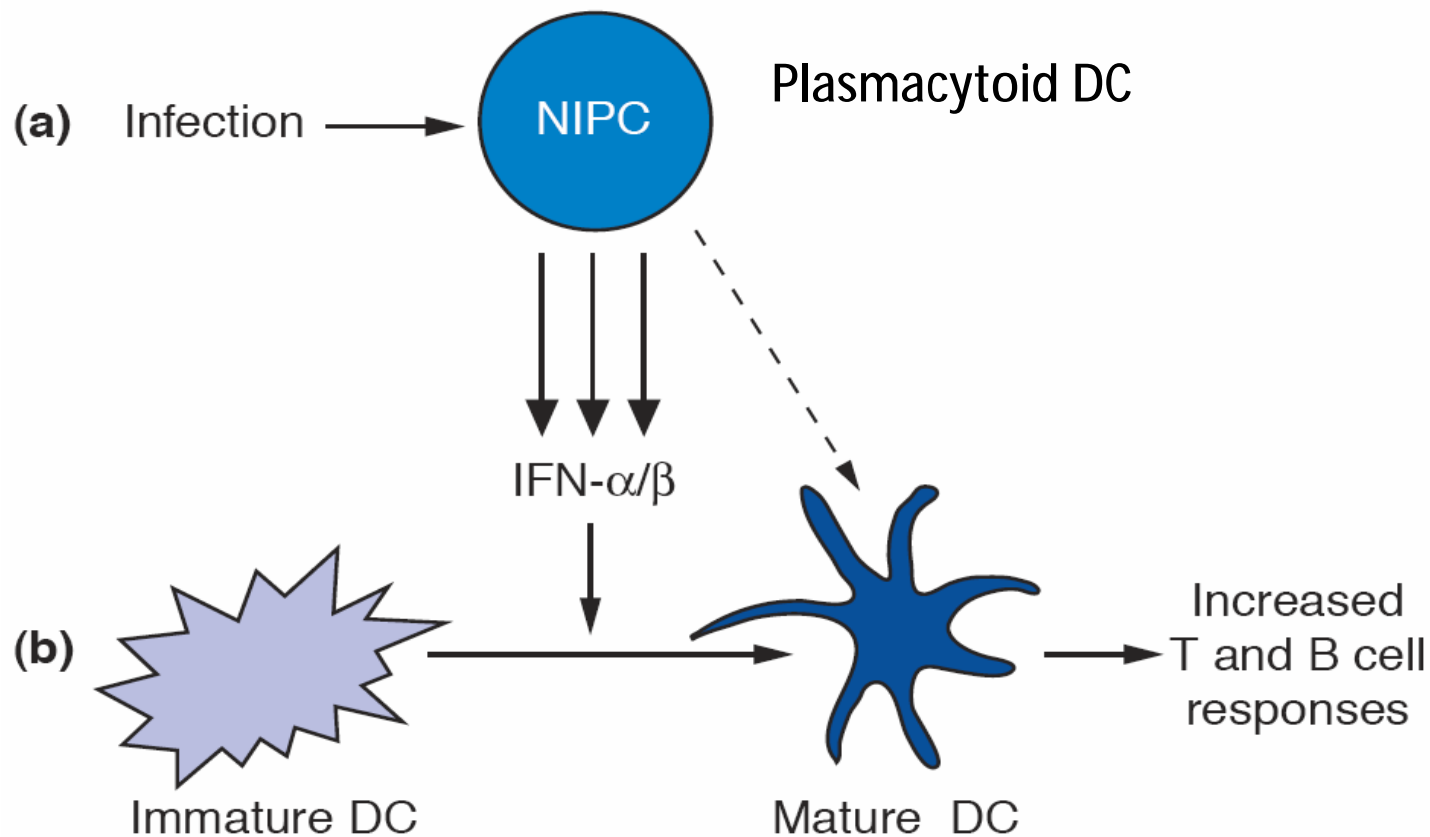
# Medfødt versus ervervet immunitet

Medfødt  
immunitet

Ervervet  
immunitet



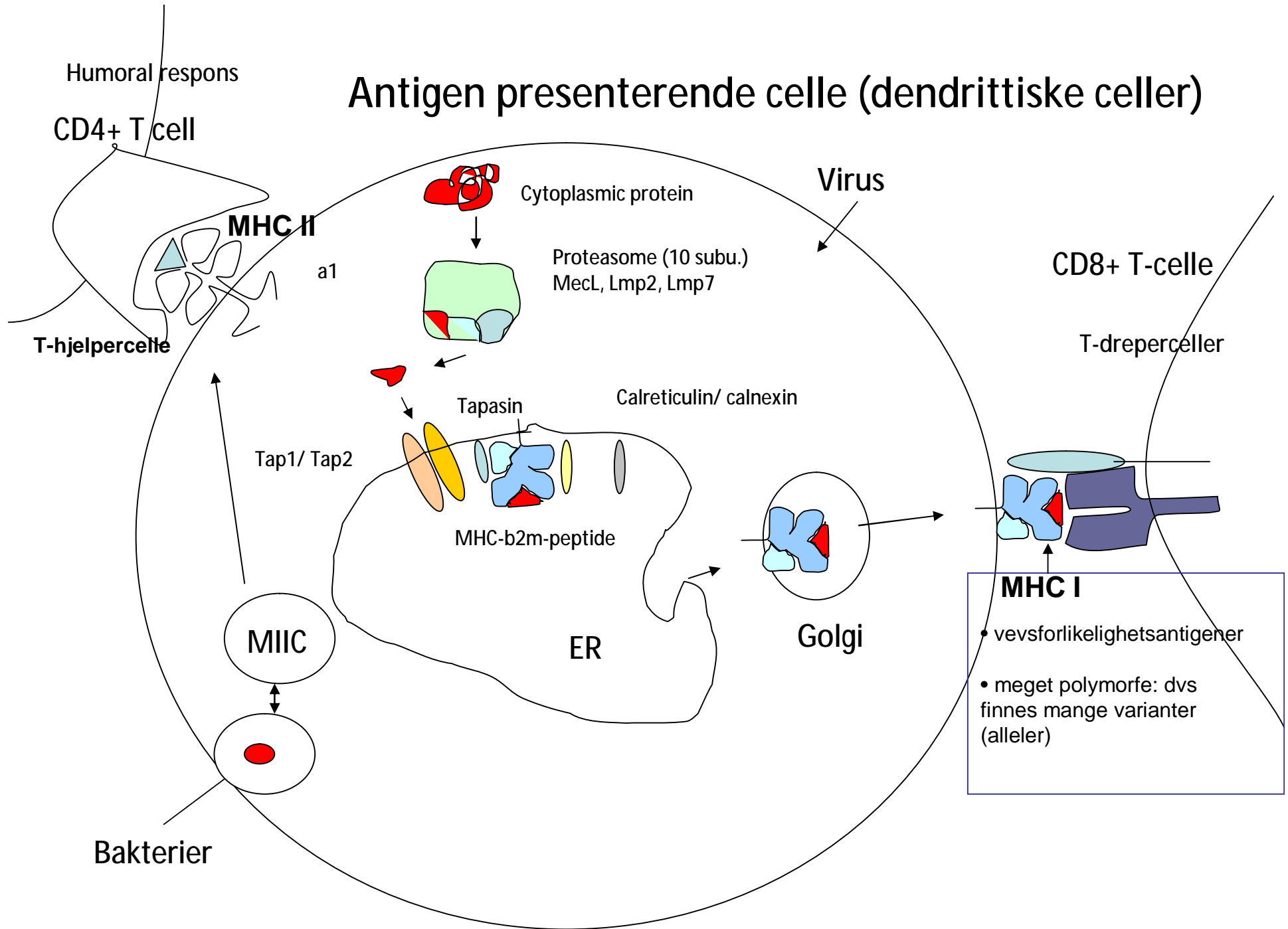
Type I IFN kopler sammen medfødt og ervervet immunrespons ved å stimulere modning av antigenpresenterende (dendrittske) celler

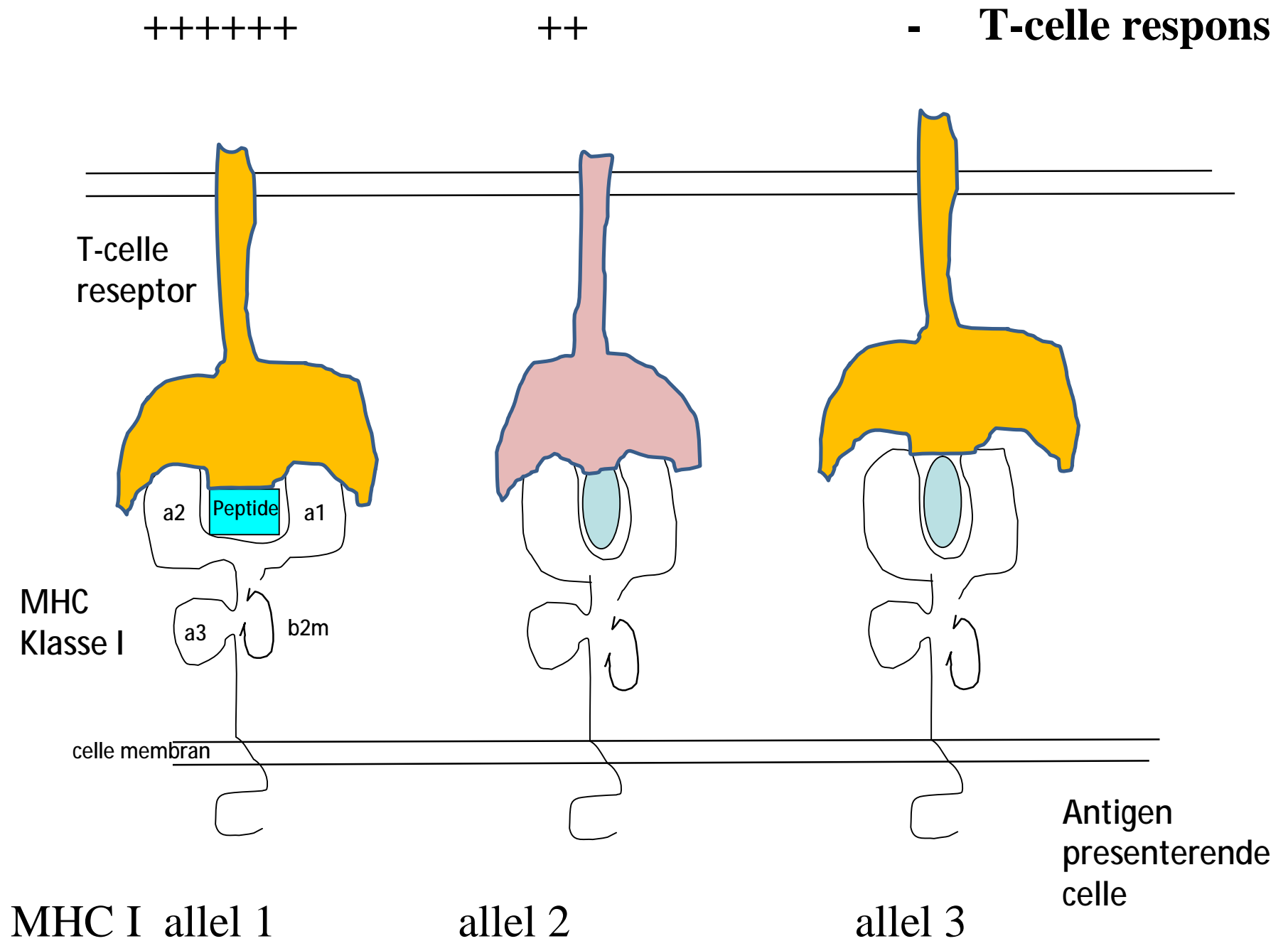


# Antigen presentasjon og respons

Hvilke virale peptider gir god  
respons?

# Antigen presenterende celle (dendrittiske celler)





# MHC, presentasjon av virale peptider og T-celle respons

Hvis vi vet hvilke deler av et virus som bindes av hvilke MHC varianter (alleler), og hvilke responser de gir kan denne kunnskapen brukes til å forbedre vaksiner.



# Komparativ forskning

- Utgangspunkt: forskning på influensavaksine (human/mus)
- Ny vaksinestrategi (målstyring)
- Verktøy til å forstå adaptive immunresponser

# Prosjekter (virus-vert)

## Influenza A:

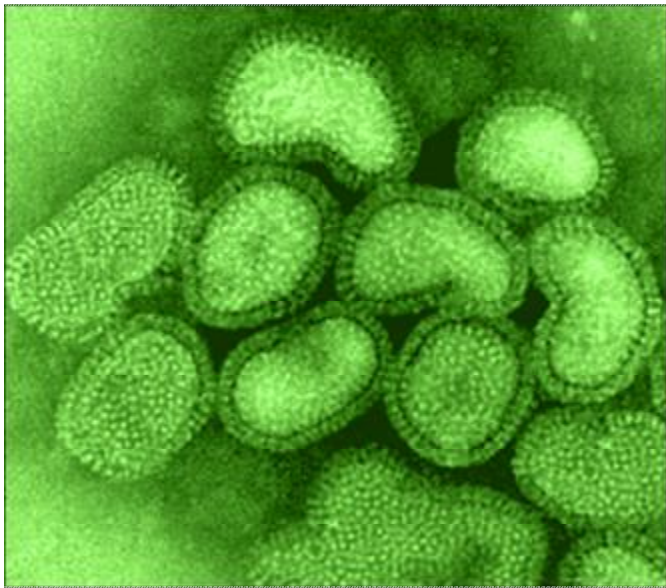
- 1) Utvikling av en universell profylaktiske peptidvaksine mot influensa (musemodell)
  - NFR-FUGE (Bionor) – (2007-2010)
- 2) Slimhinnevaksine mot influensapandemi (humant vaksinemateriale)
  - EU: FluSecure (2007-2010)
  - NFR-FUGE (2007-2010)
- 3) Influenza A og Vaccibodies (musemodell) – **MEGET LOVENDE RESULTATER**
  - Samarbeide med Bjarne Bogen og Gunnveig Grødeland

## ILAV:

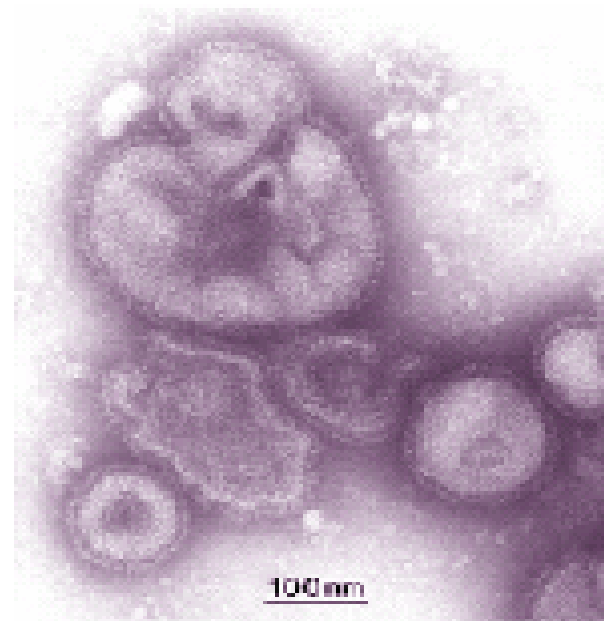
- 4) Molekylær karakterisering av virulens: Virus-vert interaksjoner (laks)
  - **NFR-FUGE II (2008-2010)**
  - **NFR: Kunnskapsplattform (2008-2011)**
- 5) ILAV og Vaccibodies
  - Samarbeide med Bjarne Bogen (UiO)

# Virus: Orthomyxovirus

- **Influenza A** (en rekke pattedyr og fugl), B, C (humant primært)
- Thogotovirus (flått) - THOV
- **Infeksiøs lakseanemivirus (laks) - ILAV**



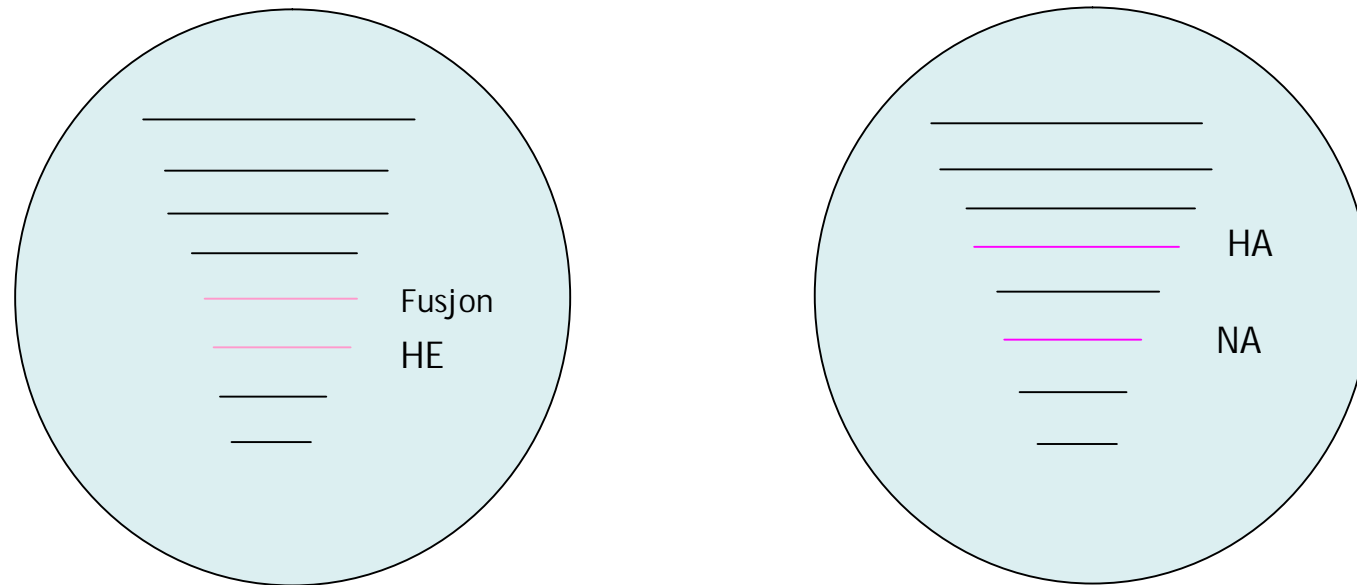
Influenza A



ILAV

Foto: Ellen Namork

# ILA vs influensavirus



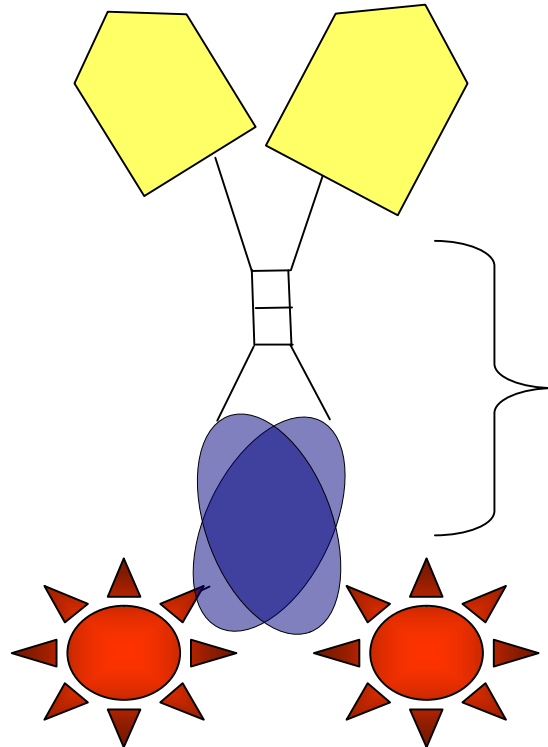
HE: reseptorbindende og reseptorødeleggende funksjon  
(tilsvarende NA's funksjon i influensavirus)

F: fusjons proteinet (HA's andre funksjon i influensavirus)

# Vaccibody: prinsipp

Her:  
MHC klasse II  
eller MIP-1 $\alpha$

Influenza HA  
ILAV HE eller F



Målstyrende enhet (mot APC)

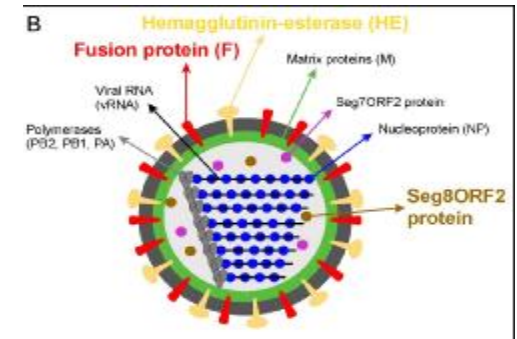
- scFv ( $V_H+V_L$ )
- naturlige ligander (e.g. chemokines)

Dimeriseringsenhet

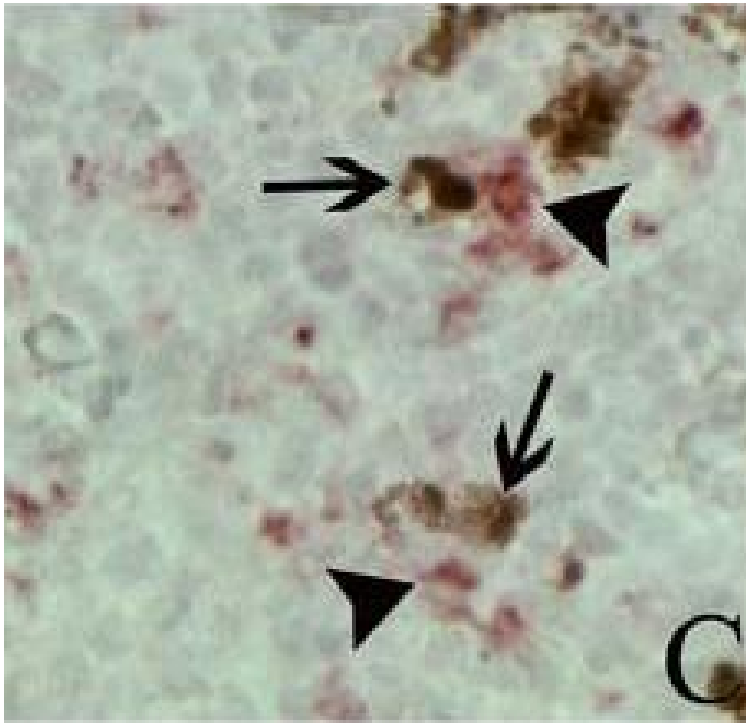
- hengsel
- Cy3

Antigen enhet

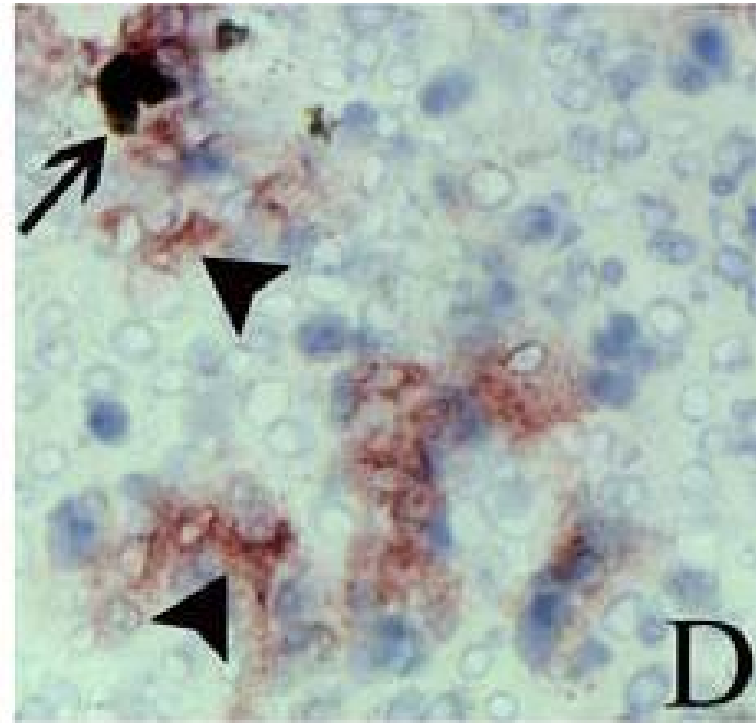
- viralt antigen



# Milt farget med mAb mot laks MHC klasse II ( $\beta$ -kjede; IgG1)



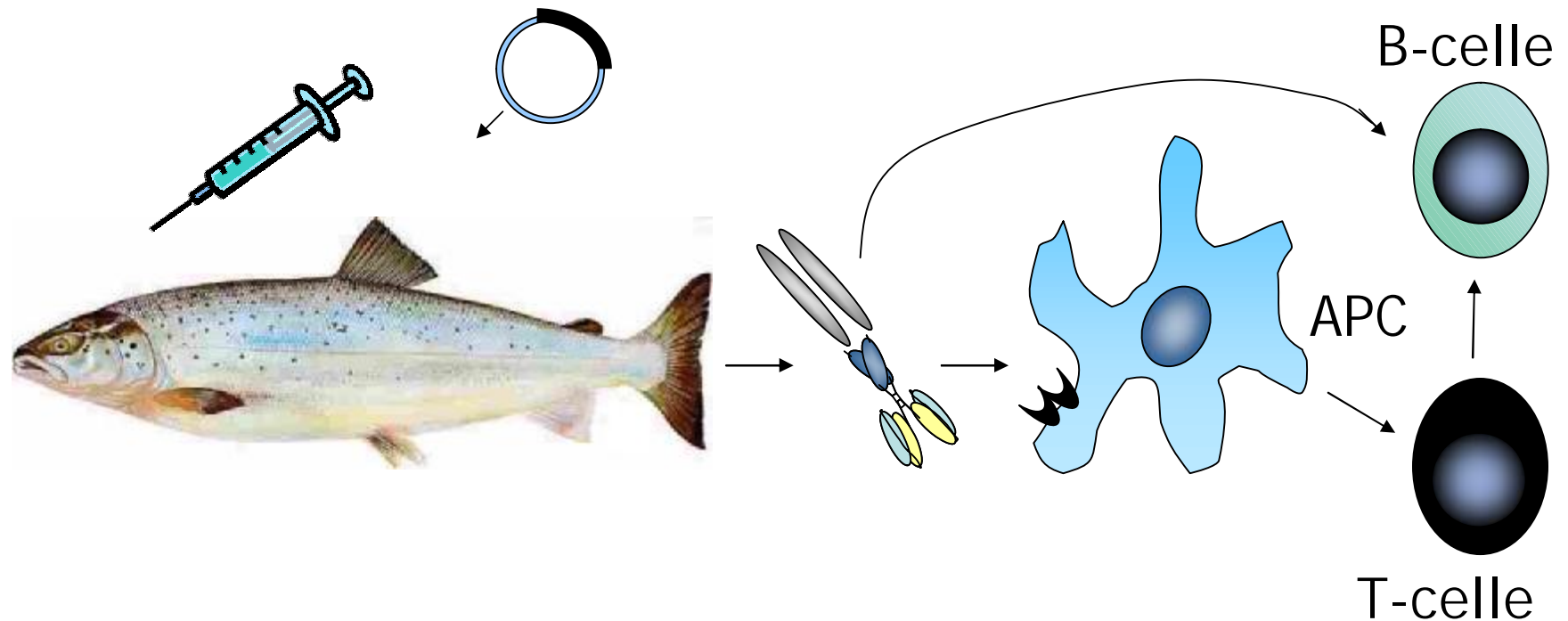
cryosnitt



paraffinsnitt

Melanomakrofag akkumuleringer samt celler i sinusoid vegg

# Vaccibody; virkningsmekanisme

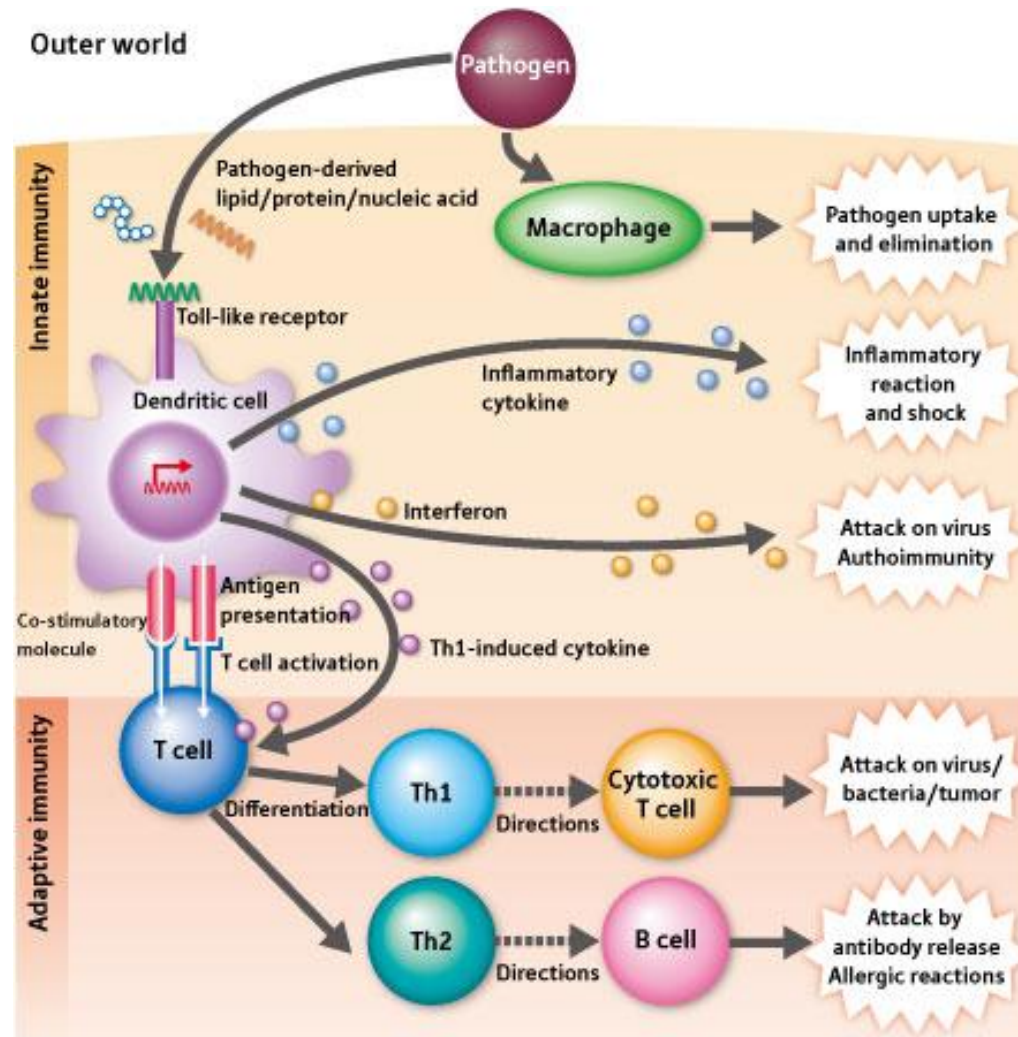


- Vaccibody som binder seg til APC endocyteres, bearbeides og presenteres for T- og B-celler og produserer beskyttende immunitet mot viruset
- Avhengig av molekylet en målstyrer mot kan en styre immunresponsen i den ene eller andre retning

# Medfødt versus ervervet immunitet

Medfødt  
immunitet

Ervervet  
immunitet





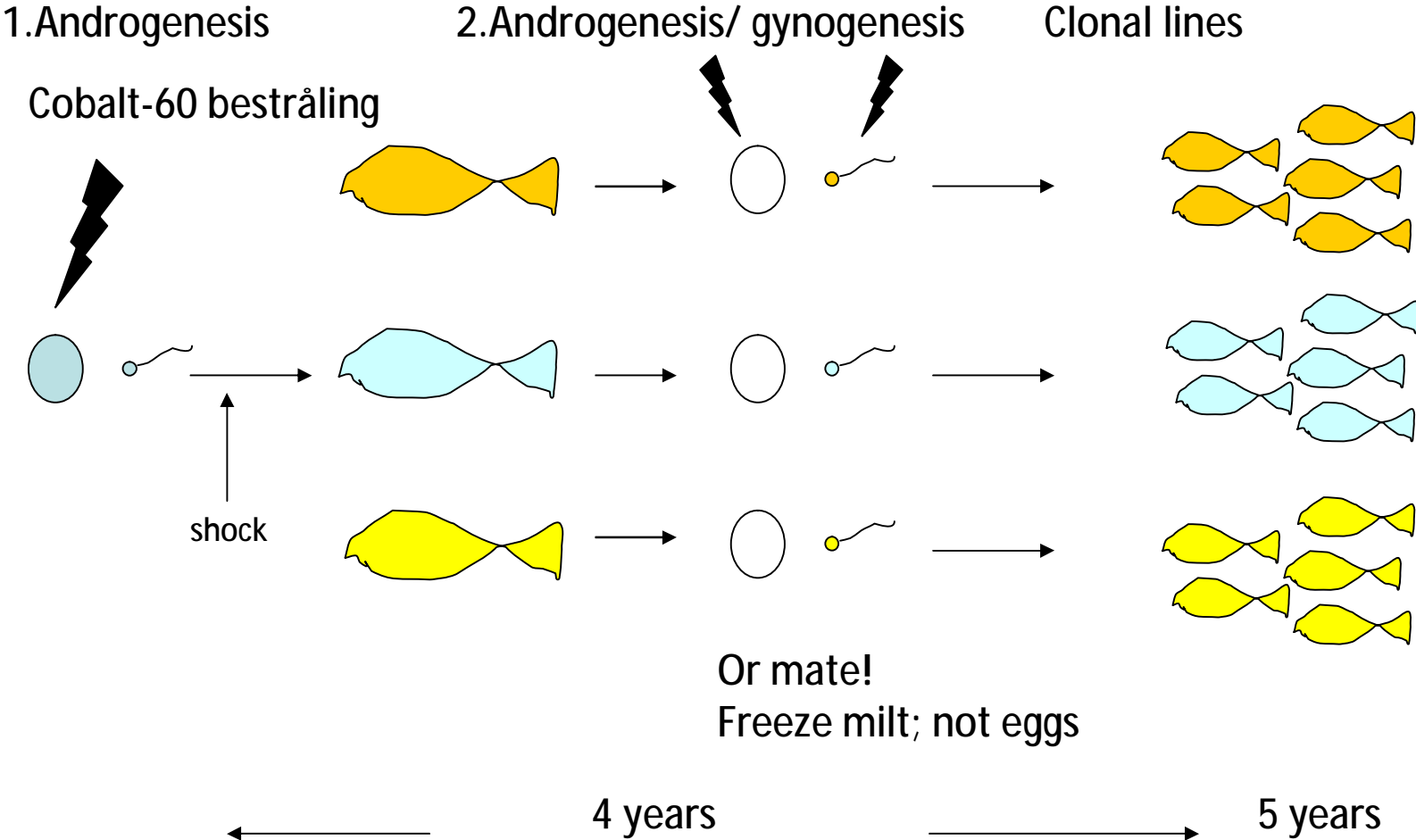




# Fiskeforsøk

- I dag gjøres fiskeforsøk på en brokete gjeng med genetisk ulike fisk
- Resultatet er dårlig reproduserbarhet
- Norge bør ha en plattform for genetisk standardisert laks og torsk

# Androgenesis i laks



USA (G.Thorgaard), France (D.Charrout), Japan (Nakanishi?) Rainbow trout lines

# Medfødt versus ervervet immunrespons

