

Bakgrund

Det SLF-finansierade projektet "Immunprofylax hos gris (liksom det nu pågående Formasprojektet "Riktad immunmodulering för bättre grisvaccin"; 2015-2017) främsta syftet är att studera hur den adjuvanta komponenten i ISCOM-vaccin påverkar den generella immunreaktiviteten i gris. Effekten av adjuvanset studeras utan tillsats av något vaccinantigen eftersom antigen i sig kan ha en immunmodulerande effekt. Det långsiktiga syftet med SLF-studien har varit att undersöka om det är möjligt att bygga upp grisens naturliga förmåga till immunsvaret genom en profylaktisk behandling med adjuvanset, t.ex. före förflyttningar eller vid andra moment under uppfödning som sannolikt innebär exponering för nya infektiösa ämnen. Matrix-M används eftersom adjuvanset anses ha en balanserad immunmodulerande effekt. Vid vaccination mäts immunsvaret vanligast som nivå av specifika antikroppar men eftersom inget antigen används i vår modell måste en del av arbetet inriktas på att hitta "markörer" som indikerar en generell immunaktivering i gris. Sådana biomarkörer kan också fungera som indikatorer på immunaktivering orsakade av infektioner utan att behöva identifiera infektiösa ämnen.

Våra tidigare studier har visat att uttrycket av ett antal interferonreglerade gener ökar i den dränerande lymfknutan 24 timmar efter intramuskulär injektion av Matrix-M. Aktivering av interferonsystemet är mycket viktigt i det tidiga generella skyddet mot virusinfektioner liksom det är viktigt för att rekrytera och aktivera immunologiska celler vid bakteriella infektioner. Studierna under År 1 (se Lägesrapport oktober 2013) inriktades därför på att utarbeta tekniker för att mäta genuttrycket av interferon- α (IFN- α) och IFN- β samt relevanta interferonreglerade gener. Effekten av Matrix-M på dessa gener studerades i kulturer av lymfocytiska celler från gris samt i arkiverat material från grisar som administrerats Matrix-M. Under År 2 utvidgades studierna av den immunmodulerande effekten hos Matrix-M *in vitro* bland annat med kinetikstudier för att bedöma den bästa tidpunkten för behandling av grisar, t.ex. före transport. Samtidigt söktes etiskt tillstånd för att behandla SPF-grisar med Matrix-M före förflyttning till en teststation (Månserud) där djuren blandas med individer från olika besättningar och produktionsdata registreras fram till slakt. Blodprov skulle samlas från de behandlade djuren samt från obehandlade kontroller under uppfödningssperioden och djuren skulle avlivas och obduceras vid slaktmognad. Tyvärr stängdes teststationen i januari 2015 innan försöket kunde utföras och den djurförsöksetiska nämnden prövar nu ansökan om att få utföra en modifierad studie där Matrix-M behandlade SPF-grisar blandas med konventionellt uppfödda grisar på SVA's djurhus. Så snart etiska ansökan godkänts kommer försöket att utföras med medel som avsatts inom Formasprojektet. Resultat som redovisas här summerar *in vitro* studierna samt analyser på arkiverat material.

Resultat

Metoder för studera inverkan av Matrix-M på grisceller har etablerats *in vitro*. Olika typer av cellkulturer och odlingstider har testats. För att efterlikna *in vivo* förhållandet så mycket som möjligt har vi undersökt helblodskulturer, leukocytkulturer (buffy coats), mononukleära blodceller (MNC), lymfocyter, monocytdriverade makrofager och monocytdriverade dendritiska celler (MoDC) som drivits fram i närvaro av interleukin-4 (IL-4) och granulocyte/monocyt –kolonistimulerande faktor (GM-CSF).

De olika celltyperna har odlats i närvaro av Matrix-M under olika tidsintervall och det relativa genuttrycket har mätts med realtids-PCR (RT-PCR). Gener som studerats har valts utifrån våra tidigare transkriptomanalyser av den dränerande lymfknutan hos grisar som visade att ett stort antal interferonreglerade gener aktiverats 24 timmar efter administrering av Matrix. Med flödescytometri visades att MNC framrenade ur grisblod hade en god överlevnad i närvaro av 0.3 till 1 microgram Matrix per ml odlingsmedium. Efter 18 timmar var proportionen apoptotiska (Fig 1a) eller döda (Fig 1b) celler densamma som när cellerna odlats i enbart medium.

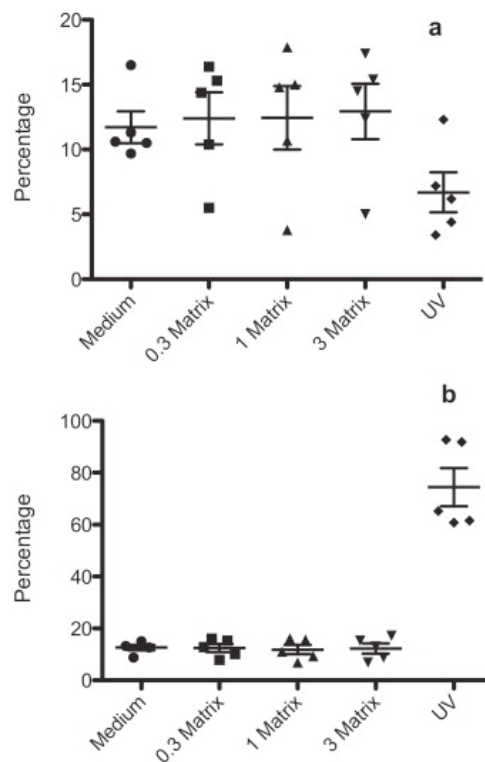
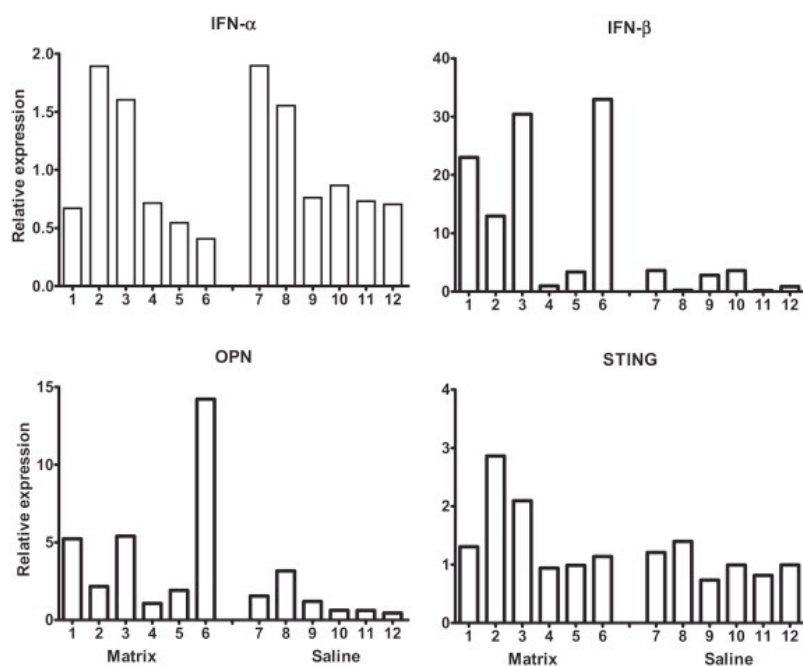


Fig 1. Proportionen apoptotiska (a) eller döda (b) MNC efter 18 timmars odling i 0,3, 1, eller 3 mikrogram Matrix-M per ml odlingsmedium. Enbart odlingsmedium: negativ kontroll, UV-behandlade celler: positiv kontroll.

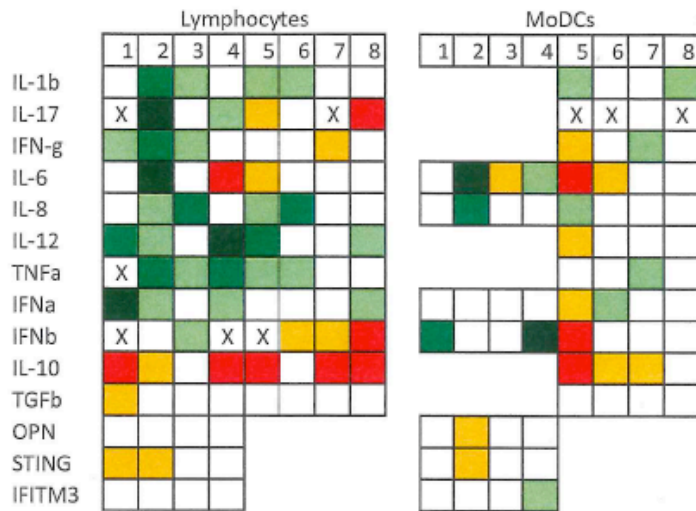
Ett antal RT-PCR analyser etablerades för att kunna mäta det relativa uttrycket av mRNA för IFN- α och IFN- β samt för intressanta IFN-reglerade gener (OPN och STING). Analyserna visar att mRNA för IFN- β är kraftigt uppreglerat i 4 av 6 grisar efter behandling med Matrix (Fig. 2) vilket skulle vara en logisk förklaring till de tidigare fynden *in vivo*. Om Matrix-M kan inducera produktion av IFN- β i gris kan det ha ett mycket viktigt profylaktisk roll, speciellt vid exponering för virus.



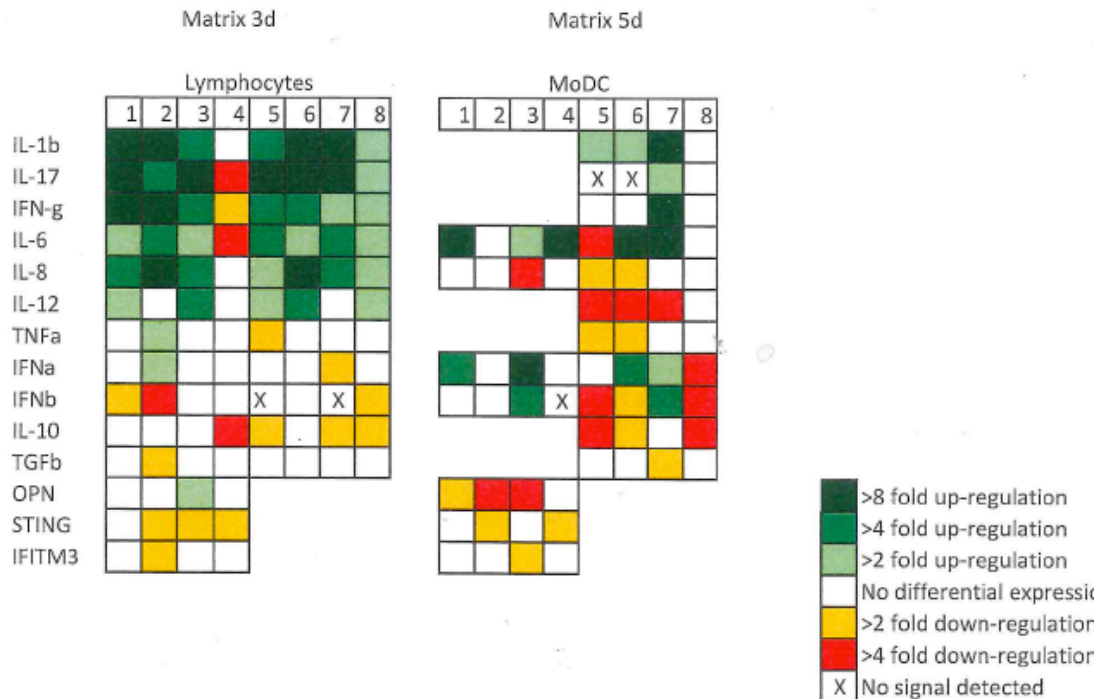
Figur 2. Det relativa uttrycket av mRNA för IFN- α , IFN- β , osteopontin (OPN) och stimulator of interferon genes (STING) i lymfknotor från sex grisar som administrerats Matrix-M 24 timmar tidigare. Lymfknotor från grisar som administrerats NaCl utgör kontrollmaterial.

I de fortsatta *in vitro* studierna användes därför alltid en känd syntetiska interferon-induserare (polyI:C) som positiv kontroll och analyserna utökades till att omfatta såväl pro-inflammatoriska som anti-inflammatoriska cytokiner. Ett visst mönster i cytokinprofilen går att urskilja när porcina lymfocyter och MoDC odlats i närvaro av Matrix från 6h upp till 5 dygn (Fig. 3). Framförallt ses genomgående en uppreglering av mRNA för IL-17, ett cytokin som är känt för att effektivt rekrytera neutrofila granulocyter, vilket kn förklarar neutrofilin som observerades i *in vivo* studien. En aktivering av IL-17 kan alltså vara viktig för att eliminera extracellulära bakterier. Uppreglering av generna för IL-1 β , IL-17, IFN- γ , IL-6, IL-8 och IL-12 är tydligast i lymfocytkulturer som odlats 3 dygn i närvaro av Matrix medan en nedreglering av mRNA för IL-10 ses redan efter 6h.

KORTTIDSMATRIX MOT MEDIUM (6h)



LÅNGTIDSMATRIX MOT MEDIUM



Figur 3. Heat-map som illustrerar det relativa uttrycket av mRNA för ett antal gener i celler från åtta grisar odlade i närvaro av 1 microgram Matrix-M per ml medium under 6 tim, 3 dygn eller 5 dygn.

Sammanfattning

In vitro studierna verifierar att Matrix-M kan aktivera immunceller från gris samt att dessa uppreglerar mRNA för cytokingener som anses vara av stor betydelse för det omedelbara "ospecifika" svaret mot virus (IFN- β) och extracellulära bakterier (IL-17). Alltså bör fortsatta studier av adjuvansets roll i immunprofylax hos gris vara betydelsefulla.

Publikationer

Fossum C, Hjertner B, Ahlberg V, Charerntantanakul W, McIntosh K, Fuxler L, Balagunaseelan N, Wallgren P, Lövgren Bengtsson K. 2014. Early inflammatory response to the saponin adjuvant Matrix-M in the pig. *Vet Immunol Immunopathol.* 158: 53-61.

Hellman, S. *In vitro* immune modulation by the adjuvant Matrix-M in the pig. Master Thesis Uppsala University. Spring 2015.