

Lipopeptide als Adjuvantien bei der Immunisierung von Legehennen

Andrea Hofmann¹, Michael Erhard¹, Peter Schmidt², Wolfgang Bessler³, Karl-Heinz Wiesmüller⁴, Pia Zinsmeister¹, Manfred Stangassinger¹ und Uli Lösch¹

¹Institut für Physiologie, Physiologische Chemie und Tierernährung der Ludwig-Maximilians-Universität, D-München
²Institut für Tierpathologie der Ludwig-Maximilians-Universität, D-München ³Institut für Immunbiologie der Universität, D-Freiburg, ⁴Naturwissenschaftliches und Medizinisches Institut der Universität Tübingen, D-Reutlingen

Zusammenfassung

Aus der zunehmenden Bedeutung der Gewinnung von spezifischen Antikörpern aus Hühnereiern ergibt sich die Suche nach gut verträglichen und wirksamen Adjuvantien zur Immunisierung von Legehennen.

Für das Lipopeptid Pam₃Cys-Ser-(Lys)₄ (PCSL) konnte bei der Immunisierung von Hennen mit einem Virusantigen eine gute immunstimulierende Wirkung nachgewiesen werden, die zu ähnlichen, teilweise sogar signifikant höheren spezifischen Antikörpergehalten im Serum führte als die Immunisierung unter Verwendung von Freund'schem kompletten Adjuvans (FCA).

Die Verwendung einer Kombination aus PCSL und einem neuen Lipopeptid (PCST_H16) bei der Erstimmunisierung von Legehennen mit rekombinantem bovinen Wachstumshormon erbrachte keine signifikant höheren spezifischen Antikörpertiter im Vergleich mit den bei Verwendung nur eines Lipopeptids gemessenen Werten.

Die Korrelationen zwischen den Antikörpergehalten in den Seren und in den eine Woche später gewonnenen Dottern betragen bei dem Virusantigen 0,81 (FCA) und 0,86 (PCSL), beim rekombinanten bovinen Wachstumshormon unter Verwendung von Lipopeptiden lagen sie zwischen 0,78 und 0,88.

Keywords: lipopeptides, complete Freund's adjuvant, egg yolk antibodies, immunoglobulin Y

Summary: Lipopeptides as adjuvants for the immunisation of laying hens.

Increasing interest on the extraction of specific antibodies from chicken egg yolk rises the question for powerful adjuvants without side effects for the immunisation of laying hens.

The lipopeptide Pam₃Cys-Ser-(Lys)₄ (PCSL) showed effective immunostimulating capacity in case of the immunisation of chickens with a viral antigen. The specific antibody contents of the sera were comparable to and sometimes even significantly higher than those achieved with complete Freund's adjuvants (CFA).

Considering the immunisation of laying hens with recombinant bovine somatotropin, the use of a combination of PCSL with a novel lipopeptide (PCST_H16) for the primary immunisation did not result in higher specific antibody titers compared to the groups which received only one adjuvant. The correlation between the contents of specific antibodies in the sera and those of the egg yolks collected a week later were 0.81 (CFA) and 0.86 (PCSL) in case of the viral antigen and between 0.59 and 0.88 with recombinant bovine somatotropin using lipopeptides as adjuvants.

Abkürzungen: BSA: Bovines Serumalbumin; ELISA: enzyme linked immunosorbent assay; FCA: Freund'sches komplettes Adjuvans; IgY: Immunglobulin Y; PBS: Phosphatgepufferte Salzlösung; PCSL: Pam₃Cys-Ser-(Lys)₄; POD: Meerrettich-Peroxidase; rbST: rekombinantes bovinen Wachstumshormon; TMB: Tetramethylbenzidin.

1 Einleitung und Fragestellung

Aus praktischen und ökonomischen Gründen ist man bestrebt, bei der Immunisierung von Tieren zur Gewinnung spezifischer Antiseren mit einer möglichst geringen Menge an Antigen und durch nur wenige Impfungen eine bestmögliche Antikörperproduktion zu erzielen. Hierzu und auch aufgrund der geringen Immunogenität mancher Antigene werden sogenannte Adjuvantien zur Steigerung der Immunantwort zusammen mit dem Antigen verabreicht.

Aufgrund seiner bekanntermaßen guten immunstimulierenden Wirkung wird auch bei der Gewinnung von Dotterantikörpern aus den Eiern immunisierter Legehennen vorwiegend Freund'sches komplettes/inkomplettes Adjuvans (FCA/FIA) verwendet. Während jedoch Gassmann et al. (1990) bei der Immunisierung von Legehennen unter Verwendung von Freund'schem Adjuvans keine lokalen Entzündungsreaktionen an den Injektionsstellen beobachten konnten, zeigten andere Arbeiten, daß der Einsatz von FCA auch beim Huhn zu gravierenden Nebenwir-

kungen führt (Sprick-Sanjosè Messing, 1990; Kaufmann, 1995; Schmidt et al., 1996; Wanke et al., 1996). Deshalb stellt – auch im Sinne des Tierschutzes – die Entwicklung und Prüfung neuer, nebenwirkungsarmer Adjuvantien eine wichtige Aufgabe im Rahmen von Immunisierungen dar.

Für synthetisch hergestellte Lipopeptide konnte inzwischen bei verschiedenen Säugetierspezies im Zusammenhang mit einer ganzen Reihe von Antigenen eine immunstimulierende Wirkung nachgewiesen werden, die nicht mit unerwünschten Nebenwir-

kungen verbunden ist (Bessler und Jung, 1992).

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die adjuvante Wirkung des Lipopeptids Pam₃Cys-Ser-(Lys)₄ und eines Konjugates aus dem Lipopeptidanteil Pam₃Cys-Ser und einem T-Helferzell-Epitop mit der Aminosäuresequenz FISEA IIHVLHSRHPG (PCST_H16; Bessler et al., in Vorbereitung) bei der Immunisierung von Legehennen mit verschiedenen Antigenen zu untersuchen.

2 Tiere, Material und Methoden

2.1 Versuch I

Zur Gewinnung spezifischer Dotterantikörper gegen die häufigsten Erreger der bovinen Neugeborenen διάρhoe wurden jeweils 8 Hühner der Rasse Weißes Leghorn mit 1 ml Lactovac[®] Muttertier-Vakzine¹ immunisiert. Der Impfstoff enthält nach Angaben des Herstellers unter anderem inaktiviertes Coronavirus, Stamm 800. Zu den Zeitpunkten Woche 0, Woche 4 und Woche 12 wurden eine Gruppe von 8 Tieren unter Verwendung von 500 µg PCSL pro Tier und Immunisierung und eine Vergleichsgruppe unter Verwendung von jeweils 0,5 ml FCA i.m. immunisiert. In wöchentlichen Abständen wurden Serum- und Dotterproben zur Bestimmung des Gehalts an Coronavirus-spezifischen Antikörpern im ELISA gewonnen.

2.2 Versuch II

Um zu untersuchen, ob die adjuvante Wirkung von PCSL durch die Kombination mit dem neuen Lipopeptid PCST_H16 verstärkt werden kann, wurden Hühner nach folgender Tabelle mit rekombinantem bovinen Wachstumshormon (rbST²; 1 mg pro Tier und Immunisierung) immunisiert.

Bis zum Versuchsende wurden wöchentlich Serum- und Dotterproben gewonnen und im rbST-spezifischen ELISA die Antikörpertiter bestimmt.

2.3 Bestimmung der spezifischen Antikörper im ELISA

Direkter ELISA zum Nachweis von Coronavirus-spezifischen Antikörpern
Mit Coronavirus beschichtete ELISA-Platten wurden freundlicherweise von Herrn Dr. W. Eichhorn, Institut für Medizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenmedizin, Universität München, zur Verfügung gestellt.

Tabelle: Schema für die Immunisierung der Hühner mit rekombinantem bovinen Wachstumshormon

Gruppe (n=6)	Erstimmunisierung (Woche 0)	1. und 2. Boosterung (Woche 4 und 8)
rbST	rbST	rbST
rbST + PCSL	rbST PCSL (250 µg)	rbST
rbST + PCSL + PCST _H 16	rbST PCSL (125 µg) PCST _H 16 (125 µg)	PCSL (250 µg)

Nach Blockierung mit 1 % bovinem Serumalbumin (BSA³; 200 µl/Kavität) wurden die Seren in einer Verdünnung von 1:5000 in PBS-Tween (50 µl/Kavität) aufgetragen. Im nächsten Schritt wurde G1-POD (Erhard et al., 1992) in einer Verdünnung von 1:5000 eingesetzt (50 µl/Kavität). Zwischen allen Schritten erfolgte eine einstündige Inkubation bei 37°C nach der die Mikrotiterplatten mit Waschlösung (0,09 %ige NaCl mit 0,05 % Tween) gewaschen wurden. Nach Zugabe des Substrates Tetramethylbenzidin (TMB; 200 µg/ml 0,1 M Carbonatpuffer pH 5,0; 100 µl/Kavität) wurde die Reaktion nach zehn Minuten mit Schwefelsäure (1 M; 50 µl/Kavität) abgestoppt und die Extinktion bei 450 nm bestimmt.

Direkter ELISA zum Nachweis von

rbST-spezifischen Antikörpern

Mikrotiterplatten wurden über Nacht bei 4°C mit rbST (10 µg/ml 0,1 M Carbonatpuffer pH 9,6; 200 µl/Kavität) beschichtet und anschließend mit 1 % BSA (200 µl/Kavität) blockiert. Danach wurden die Serum- oder Dotterproben (Vorverdünnung bei Serum 1:250, bei Dotter 1:50) in einer logarithmischen Zweierverdünnung in PBS-Tween (50 µl/Kavität) aufgetragen. Inkubationszeiten und -temperatur, das Waschen der Platten und alle weiteren Schritte erfolgten analog zum Coronavirus-spezifischen ELISA.

3 Ergebnisse

3.1 Versuch I

Abbildung 1 zeigt die Ergebnisse der Immunisierung von Legehennen mit Lactovac[®] Muttertiervaccine unter Verwendung der beiden Adjuvantien

PCSL und FCA. Dargestellt sind die im Coronavirus-spezifischen ELISA bei einer Vorverdünnung der Seren von 1:5000 gemessenen Extinktionen. Nach der Erstimmunisierung konnten in keiner der beiden Versuchsgruppen spezifische IgY-Antikörper in den Seren nachgewiesen werden. Erst nach der ersten Boosterung erfolgte sowohl bei den unter Verwendung von PCSL als auch bei den zusammen mit FCA immunisierten Tieren ein deutlicher Anstieg des Gehalts an spezifischen Antikörpern im Serum, wobei in beiden Gruppen annähernd gleich hohe Extinktionen erreicht wurden. Im weiteren Verlauf fielen die spezifischen Antikörpergehalte in den Seren bei allen Legehennen langsam ab, um nach der zweiten Boosterung erneut anzusteigen. Bei den unter Verwendung von FCA immunisierten Tieren konnten mit der zweiten Wiederholungsimmunisierung keine höheren Antikörpergehalte als nach der ersten Boosterung erreicht werden; in der PCSL-Gruppe hingegen wurden im Zeitraum nach der zweiten Boosterung höhere Antikörpergehalte als nach der ersten Wiederholungsimmunisierung gemessen. Darüber hinaus zeigten die Seren der unter Verwendung von PCSL immunisierten Tiere zum Zeitpunkt Woche 13, 17 und 19 sogar signifikant höhere Antikörpergehalte als die der FCA-Vergleichsgruppe.

Die Korrelationen der spezifischen Antikörpergehalte im Serumpool und im gepoolten Eidotter immunisierter Legehennen waren beim Vergleich der Proben mit einer Zeitdifferenz von einer Woche sowohl in der PCSL- als auch in der FCA-Gruppe am höchsten. So betrug die Korrelation zwischen Serumwerten und den Werten der eine Woche später gewonnenen Dotter in

¹ Hoechst, Unterschleißheim, Deutschland; ² Monsanto, St. Louis, USA; ³ Sigma, Deisenhofen, Deutschland

**Coronavirus-spezifische Antikörper im Serum
(Vorverdünung 1:5000)**

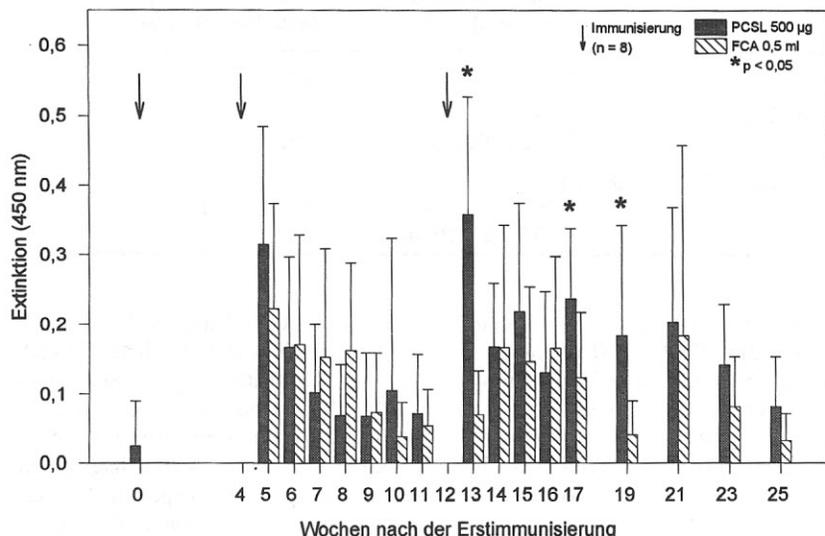


Abbildung 1: Verlauf des spezifischen Antikörpergehaltes im Serum (Vorverdünung 1:5000) nach der Immunisierung von Hühnern mit Lactovac® Muttertiervaccine (1 ml pro Tier und Immunisierung) unter Verwendung von Pam₃Cys-Ser-Lys₄ und Freundschem kompletten Adjuvans

rbST-spezifische Antikörper im Serum

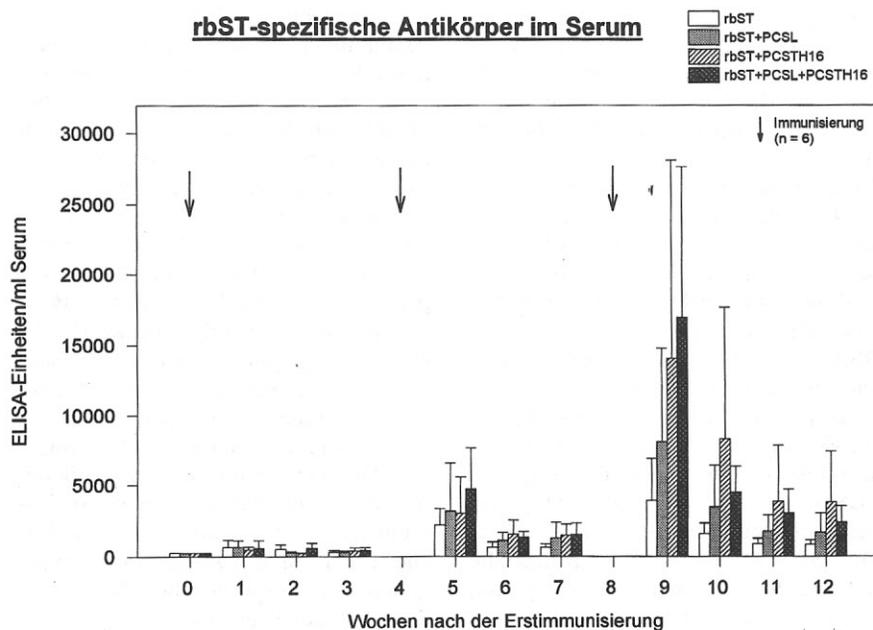


Abbildung 2: Verlauf der spezifischen Antikörpertiter im Serum nach der Immunisierung von Hühnern mit rekombinantem bovines Wachstumshormon (1mg pro Tier und Immunisierung) unter Verwendung von Pam₃Cys-Ser-Lys₄ und/oder PCST_{H16}

der PCSL-Gruppe 0,86 und in der FCA-Gruppe 0,81.

3.2 Versuch II

Bei der Immunisierung von Legehennen mit rekombinantem bovines

Wachstumshormon unter Verwendung von PCSL und/oder dem Lipopeptid PCST_{H16} zeigte keine der Versuchsgruppen nach der Erstimmunisierung relevante Antikörpertiter im Serum

(siehe Abbildung 2). Erst nach der ersten Boosterimmunisierung stieg der Gehalt an spezifischen IgY-Antikörpern in den Seren vor allem bei den unter Verwendung von PCSL und der Kombination beider Lipopeptide erstimmunisierten Tieren deutlich an. Anschließend erfolgte ein rascher Abfall der spezifischen Antikörpertiter bis zur erneuten Boosterung. Eine Woche nach der zweiten Wiederholungsimmunisierung wurden die maximalen Titer während des gesamten Untersuchungszeitraumes gemessen. Zu diesem Zeitpunkt waren die Antikörpertiter in den Serumproben der Tiere, die bei der Erstimmunisierung beide Lipopeptide verabreicht bekommen hatten, tendenziell höher als bei den unter Verwendung nur eines oder den ohne Adjuvans immunisierten Legehennen. Signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Versuchsgruppen konnten jedoch zu keinem Versuchszeitpunkt beobachtet werden.

Wie die Ergebnisse der Bestimmung der spezifischen Antikörper im Dotter in Abbildung 3 zeigen, wurden die nach der Immunisierung produzierten Antikörper in den Dotter transferiert. Unter Berücksichtigung einer Transferzeit von sechs bis sieben Tagen, gestaltet sich der Titerverlauf im Dotter ähnlich wie in den Seren. Auch hier konnten erst nach der ersten Boosterung deutliche Antikörpertiter gemessen werden, die in der sechsten Versuchswoche ihr Maximum erreichten. Dem im weiteren Verlauf zu beobachtenden Abfall der spezifischen Antikörpergehalte folgte zwei Wochen nach der zweiten Wiederholungsimmunisierung ein erneuter Anstieg auf Werte bis annähernd 10000 ELISA-Einheiten pro ml Dotter. Auch im Dotter ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen, die bei der Erstimmunisierung nur ein Lipopeptid erhalten hatten und jener Gruppe, die unter Verwendung beider Adjuvantien erstimmunisiert wurde.

Die Korrelation zwischen den Antikörpertitern im Serum und den eine Woche später in den gewonnenen Dottern gemessenen Werten betrug bei der ohne Adjuvans immunisierten Gruppe 0,59 und lag bei den anderen Versuchsgruppen zwischen 0,78 und 0,88.

4 Diskussion

Nachdem wiederholt beschrieben wurde, daß synthetische Analoga des N-terminalen Anteils von Lipoprotein aus der Zellwand Gram-negativer Bakterien bei der Immunisierung von Säugern mit verschiedenen Antigenen adjuvante Wirkung besitzen (Bessler und Jung, 1992; Kellner et al., 1992; Schlecht, 1993; Kleine et al., 1994), konnte bei der Immunisierung von Legehennen mit Lactovac® Muttertiervaccine gezeigt werden, daß das Lipopeptid Pam₃Cys-Ser-Lys₄ auch beim Huhn immunstimulierende Aktivität besitzt. Die bei Verwendung von PCSL erzielten Antikörpertiter waren durchaus mit den beim Einsatz von Freundschem kompletten Adjuvans erreichten Werten vergleichbar. Dies ist vor allem deshalb von besonderer Bedeutung, da Pam₃Cys-Ser-Lys₄ im Gegensatz zu öligen Adjuvantien zu keinen chronischen pathologischen Veränderungen an der Injektionsstelle führt (Wiedemann et al., 1991; Schmidt et al., 1996). Damit steht auch für diese Tierart mit dem Lipopeptid Pam₃Cys-Ser-Lys₄ ein Adjuvans mit ausreichender immunstimulierender Wirkung und geringen Nebenwirkungen für die Immunisierung zur Gewinnung aviärer Antikörper zur Verfügung.

In einem zweiten Versuchsansatz sollte geprüft werden, inwieweit die Kombination von PCSL mit einem weiteren, ein T-Helferzell-Epitop enthaltenden, Lipopeptid (PCST_H16) bei der Erstimmunisierung eine Steigerung der Immunantwort bewirken kann. Dabei zeigte sich, daß die gemessenen Antikörpertiter nicht signifikant höher lagen als bei den Tieren, die bei allen Immunisierungen nur ein Adjuvans erhalten hatten. Deshalb soll in weiteren Untersuchungen geklärt werden, ob die kombinierte Verwendung beider Lipopeptide auch bei den Boosterungen zu deutlicheren Unterschieden bei den Antikörpertitern im Vergleich zu den beim Einsatz nur eines Adjuvans erreichten Werten führt.

Literatur

- Bessler, W. G. und Jung, G. (1992). Synthetic lipopeptides as novel adjuvants. *Res. Immunol.* 143, 548–553.
 Erhard, M. H., Von Quistorp, I., Schraner, I., Jüngling, A., Kaspers, B., Schmidt, P.

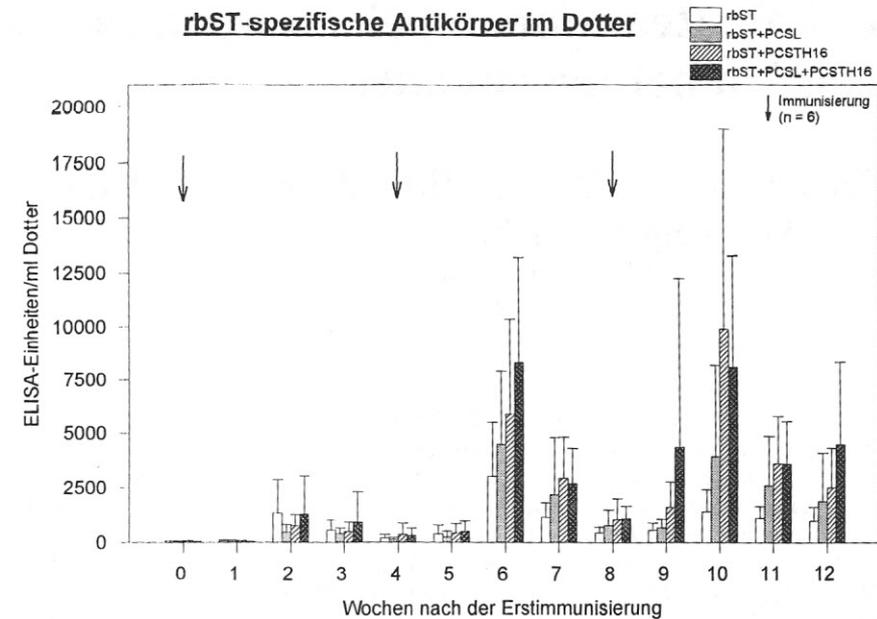


Abbildung 3: Verlauf der spezifischen Antikörpertiter im *Dotter* nach der Immunisierung von Hühnern mit rekombinantem bovines Wachstumshormon (1mg pro Tier und Immunisierung) unter Verwendung von Pam₃Cys-Ser-Lys₄ und/oder PCST_H16

- und Kühlmann, R. (1992). Development of specific enzyme-linked immunosorbent antibody assay systems for the detection of chicken immunoglobulins G, M, and A using monoclonal antibodies. *Poult. Sci.* 71, 302–310.
 Gassmann, M., Thömmes, P., Weiser, T. und Hübscher, U. (1990). Efficient production of chicken egg yolk antibodies against a conserved mammalian protein. *FASEB J.* 4, 2528–2532.
 Kaufmann, P.-F. (1995). *Studien zur Adjuvanswirkung nach der Immunisierung mit einem Hapten bei den Spezies Maus und Haushuhn*. München: Universität, Diss. med.vet.
 Kellner, J., Erhard, M. H., Schraner, I. und Löscher, U. (1992). Influence of various adjuvants on antibody synthesis following immunization with an hapten. *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* 373, 51–55.
 Kleine, B., Rapp, W., Wiesmüller, K.-H., Edinger, M., Beck, W., Metzger, J., Ataulakhanov, R., Jung, G. und Bessler, W. G. (1994). Lipopeptide-polyethylene conjugates as mitogens and adjuvants. *Immunobiol.* 190, 53–66.
 Schlecht, S. (1993). Lipopeptide als natürliche Adjuvantien für Impfstoffe aus Gram-negativen Bakterien. *Naturwissenschaften* 80, 9–17.
 Schmidt, P. (1996). Lokale Reaktionen bei Verwendung verschiedener Adjuvantien beim Huhn. *ALTEX*, diese Ausgabe.
 Sprick-Sanjose Messing, A. (1990). *Studien zur Adjuvanswirkung beim Huhn (gallus gallus)*. München: Universität, Diss. med. vet.

- Wanke, R., Schmidt, P., Erhard, M. H., Sprick-Sanjose Messing, A., Stangassinger, M., Schmahl, W. und Hermanns, W. (1996). Freundsches komplettes Adjuvans beim Huhn: effiziente Immunstimulation bei gravierender lokaler inflammatorischer Reaktion. *J. Vet. Med. A*, 43, 243–253.
 Wiedemann, F., Link, R., Pumpe, K., Jacobshagen, U., Schaefer, H.E., Wiesmüller, K.-H., Hummel, R.-P., Jung, G., Bessler, W. und Böltz, T. (1991). Histopathological studies on the local reactions induced by complete Freund's adjuvant (CFA), bacterial lipopolysaccharide (LPS), and synthetic lipopeptide (P₃C) conjugates. *J. Pathol.* 164, 265–271.

Anmerkungen

Die Autoren danken Frau Birgit Wasl herzlich für ihre Mitarbeit bei der Durchführung der ELISAs.

Die vorliegende Arbeit wurde durch das Bundesministerium für Bildung, Wissenschaft, Forschung und Technologie (BMBF) gefördert.

Korrespondenzadresse

Dr. Andrea Hofmann
 Institut für Physiologie
 Physiologische Chemie und
 Tierernährung
 der Universität München
 Veterinärstr. 13
 D-80539 München