

4.5 Lakselus – vaksineutvikling

Petter Frost og Frank Nilsen, Havforskningsinstituttet

Ved Havforskningsinstituttet er det nylig utført forsøk som klart indikerer at det er mulig å vaksinere mot lakselus. I jakten på de rette komponentene i en lakselusvaksine brukes en rekke molekylærbiologiske angrepsvinkler. Til sammen skal dette gjøre oss i stand til å identifisere noen få gener (av lakselusens totalt 15 000-20 000 gener) som koder for proteiner involvert i biologiske prosesser i lusen og som kan blokkeres via vaksinasjon.

Utvikling av vaksiner har vært en av de viktigste faktorene til suksessen i norsk lakseoppdrett. I dag har man effektive vaksiner mot de fleste bakteriesykdommene og i tillegg vaksine mot virussykdommen IPN. Helt siden starten har oppdrettsnæringen hatt problemer med lakselusinfeksjoner, og store mengder medikamenter har vært og blir stadig benyttet for å kontrollere infeksjoner med lus. Dette er ugunstig ut ifra flere synspunkter, og man bør i stedet satse på å få frem gode forebyggende tiltak. Leppefisk blir i dag en del benyttet i lakse-

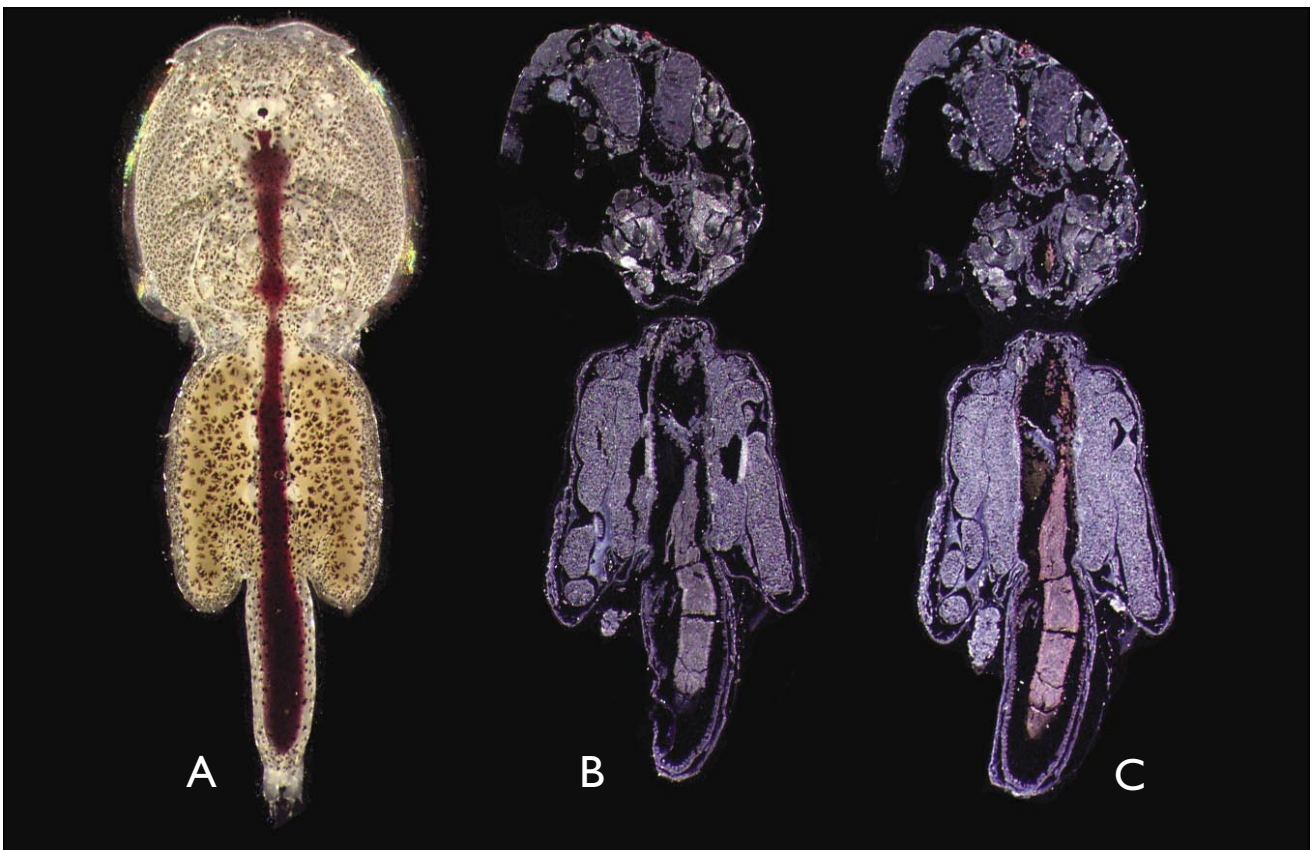
luskontroll, og fører til en reduksjon i antall behandlinger, men er ikke godt nok som kontrolltiltak alene.

ER DET MULIG Å VAKSINERE MOT LAKSELUS?

I dag eksisterer det få vaksiner mot parasitter og bare én kommersiell vaksine mot ektoparasitter (parasitter som lever på utsiden av verten). Denne blir brukt mot sydlig kveglflått (*Boophilus microplus*) og effekten er en ca. 90 % reduksjon i reproduksjonen av flått på vaksinert kveg. Studier fra flått og andre parasitter har vist at skal man lykkes med å lage vaksine, må denne baseres på ett eller noen få effektive antigener (protein som brukes som vaksine) som er essensielt i en eller flere viktige biologiske prosesser. Parasittvaksiner baserer seg på antigener som finnes inne i parasitten og som vertens immunsystem derfor ikke “ser” i et naturlig vert-parasitt-forhold. For at vaksineeffekt skal oppnåes må antistoffer eller andre komponenter i vertens immunsystem derfor komme inn i parasitten og nå fram til



Figur 1
Lakselus samler seg ofte i tette klynger og kan forårsake store skader.
Salmon lice are often found close together in high numbers, and can cause severe damages.



Figur 2

Lakselus med lakseblod i tarmen har også antistoffer fra laksen i tarmen.

A. Voksen lakselus hunn med lakseblod i tarmen.

B-C. Vevssnitt gjennom lakselus, med lakseblod i tarmen, analysert for tilstedeværelse av lakseantistoffer ved immunohistokjemi.

Bilde C viser påvisning av rester av lakseantistoffer i tarmen (røde områder), bilde B viser en negativ kontroll.

Salmon lice with salmon blood in the intestine have also salmon antibodies in the intestine.

A. Adult female salmon louse with salmon blood in the intestine.

B-C. Tissue sections through salmon louse, with salmon blood in the intestine, analysed for presence of salmon antibodies by immunohistochemistry.

Picture C shows detection of salmon antibodies in the intestine (red areas), picture B shows a negative control.

det proteinet som er benyttet i vaksinen, i en konsentrasjon som kan blokkere den aktuelle biologiske prosessen. Hos laks har det lenge vært et spørsmål om antistoff finnes på overflaten av fisken der lusene lever. Lakseblodet inneholder imidlertid antistoffer, og siden lakselus spiser blod (særlig voksne hunner) vil dette trolig være den viktigste kilden for antistoff fra verten og inn i parasitten. Ved Havforskningsinstituttet har vi påvist at lakseblod i lakselusens tarm inneholder lakseantistoffer.

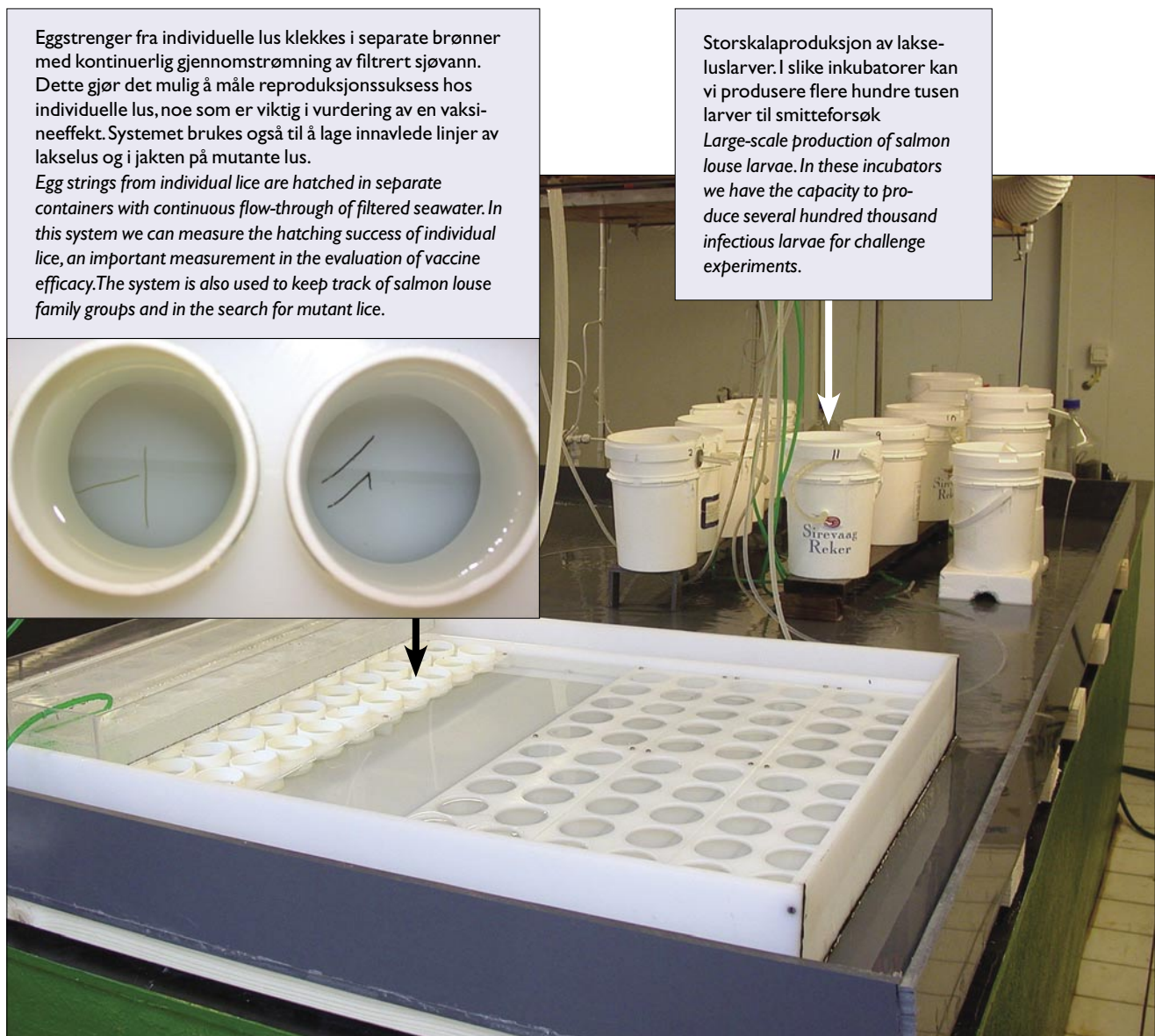
Blokkering av prosesser i lusetarmen er derfor en mulig angrepsvinkel. Siden det særlig er voksen hunn som spiser mye blod vil prosesser knyttet til reproduksjon, for eksempel eggproduksjon, også være et aktuelt angrepspunkt. Havforskningsinstituttet har nylig avsluttet det første forsøket med vaksinerings av atlantisk laks mot lakselus. Forsøket, som ble utført for å teste et nyopprettet system for å vurdere effekten av fremtidige kandidatvaksiner mot lakselus, indikerte klart at det er mulig å vaksinere mot lakselus.

En lakselus antas å ha 15 000-20 000 gener. Å identifisere og finne funksjonen til enkeltgener involvert i viktige biologiske

prosesser, som for eksempel fordøyelse og reproduksjon, krever koordinert anvendelse av en rekke molekylærbiologiske metoder.

BIBLIOTEK OVER LAKSELUSENS AKTIVE GENER (EST-SEKVENSERING)

I dag finnes det metoder der man kan studere mange tusen gener samtidig. Utgangspunktet for gensekvensene kan enten være arvestoffet som finnes i cellekjernen (genomisk DNA) eller kun gener som er aktive. Har man sekvensen til all genomisk DNA i én organisme (genomet), kan man også finne de fleste genene. For å identifisere gener i genomisk DNA benytter man seg av bioinformatiske metoder. For å verifisere et gen funnet på denne måten må man ha biologiske funn som viser at det genet er aktivt. Hos de fleste flercellede organismer består storparten av genomet av deler som ikke koder for gener. Dette betyr at man ved denne strategien bruker store ressurser på å sekvensere DNA som ikke koder for gener. Alternativet er å sekvensere utelukkende de aktive genene, ved å isolere mRNA (stadiet mellom et gen og det proteinet genet koder for når genet er aktivt) og kopiere dette til DNA som kan sekvenseres. Slike gensekvenser kalles EST



Eggstrenger fra individuelle lus klekkes i separate brønner med kontinuerlig gjennomstrømning av filtrert sjøvann. Dette gjør det mulig å måle reproduksjonssuksess hos individuelle lus, noe som er viktig i vurdering av en vaksineeffekt. Systemet brukes også til å lage innavlede linjer av lakselus og i jakten på mutante lus.

Egg strings from individual lice are hatched in separate containers with continuous flow-through of filtered seawater. In this system we can measure the hatching success of individual lice, an important measurement in the evaluation of vaccine efficacy. The system is also used to keep track of salmon louse family groups and in the search for mutant lice.

Storskalaproduksjon av lakseluslarver. I slike inkubatorer kan vi produsere flere hundre tusen larver til smitteforsøk

Large-scale production of salmon louse larvae. In these incubators we have the capacity to produce several hundred thousand infectious larvae for challenge experiments.

Figur 3

(uttrykte sekvensbiter), og representerer til sammen en samling av alle organsimens aktive gener på prøvetidspunktet. Dette kalles et genbibliotek.

Ved å sekvensere mange EST-er vil man få en oversikt over hvilke gener som er aktive ved de betingelsene biblioteket er laget fra, for eksempel utviklingsstadier i lusens liv, organ, eller vevstype. Avhengig av genaktivitet og hvor mange EST-er man sekvenserer, kan man på denne måten identifisere mange av de uttrykte genene. Fra lakselus er det laget flere genbiblioteker, over 5000 EST-er er rensert og ca 3 400 av disse er sekvensert. Indikasjon om funksjon til genene som de sekvenserte EST-ene representerer kan man få ved å sammenligne med gener fra andre organismer der funksjonen er kjent (datasøk i Genbank). Resultater viser at over 45 % av EST-ene fra lakselus ikke har signifikant treff i Genbank, noe som indikerer at disse genene er "nye" i forhold til informasjon som allerede finnes i tilgjengelige databaser. Videre analyser av EST-ene fra lakselus tyder på at de representerer omtrent 1 500 ulike gener, altså inntil 10 % av lakselusens aktive gener.

En samling av EST-er kan benyttes til flere formål. Man kan for eksempel, basert på Genbanks foreslåtte funksjon for et identifisert gen, studere disse prosessene i lakselusen og få bekreftet eller avkreftet om genet er involvert i denne prosessen. Havforskningsinstituttet har på denne måten påvist og detaljstudert en rekke lakselusgener, involvert i både fordøyelse og reproduksjon.

Indikasjon om funksjon til gener i slike samlinger av EST-er kan også fåes ved at EST-ers grad av uttrykking sammenlignes i to ulike prøver, for eksempel to ulike utviklingsstadier av lusens. Ved hjelp av mikromatriseteknologi kan uttrykingsgraden til alle EST-ene analyseres samtidig. Man kan da også få indikasjon om funksjon til de EST-ene som ikke gir signifikant treff i Genbank, og som da potensielt vil være "nye" gener.

MED MIKROMATRISER KAN TUSENVIS AV GENER ANALYSERES SAMTIDIG

Mikromatriser inneholder tusenvis av mikroskopiske flekker som hver tilsvarer DNA-sekvensen til en enkelt EST

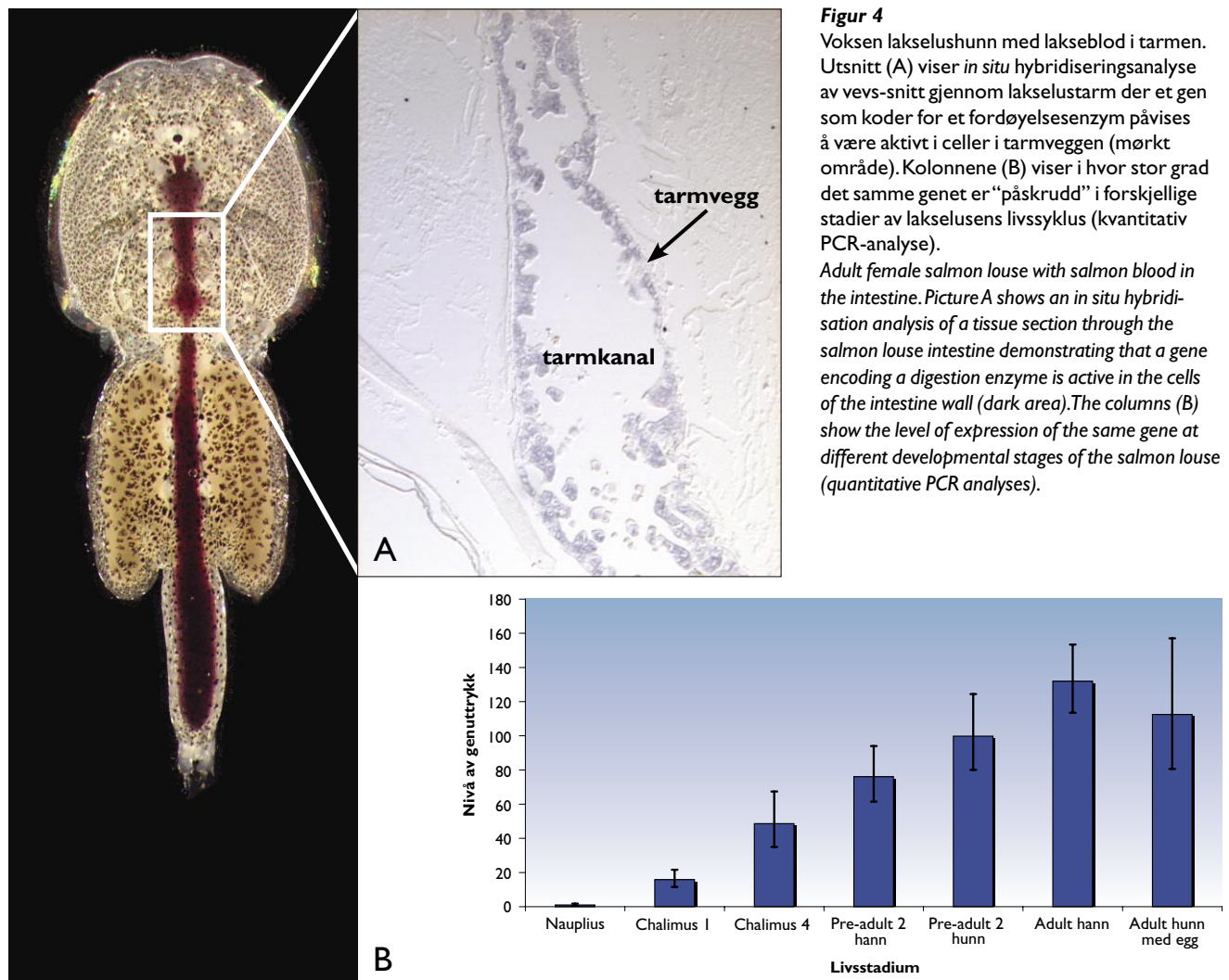
eller et enkelt gen. Disse brukes til å analysere hvilke av genene på mikromatrisen som er ulikt "påskrudd" i to ulike biologiske prøver, f.eks. ulike stadier av lakselus. Ved Havforskningsinstituttet etableres nå mikromatriseteknologi på lakselus i samarbeid med FUGE-plattformen til Det Norske Mikroarraykonsortium. I et prosjekt finansiert av Norges forskningsråd brukes mikromatriser blant annet til å identifisere om noen av genene i EST-samlingen er involvert i de strukturelle endringer voksne lakselushunner gjennomgår for å kunne produsere egg.

GENJAKT VIA AVL OG MUTANTE LAKSELUS

Som beskrevet tidligere kan gener isoleres "blindt" ved å sekvensere tilfeldige kloner i et genbibliotek. Å få karakterisert alle aktive gener i en organisme på denne måten er imidlertid svært ressurskrevende, og de fleste slike EST-samlinger representerer derfor bare en liten andel av organismens gener. Jakten på genfunksjon basert på slike klonsamlinger, f.eks. ved mikromatriser, vil derfor bare kunne indikere funksjon til de gener som faktisk er i samlingen. Det er derfor viktig å søke etter gener og genfunksjon på alternative måter. Funksjonen til gener er i mange tilfeller påvist ved identifikasjon av et ødelagt (mutert) gen i individer med endret egenskap (fenotype) i den prosessen man studerer, f.eks. skyldes arvelige sykdommer muterte gener.

Mutasjoner forekommer naturlig i alle organismer, men er vanskelig å oppdage i naturlige populasjoner. Dersom man lager innavlede linjer av en aktuell organisme i laboratoriet, er sjansen til å oppdage slike mutanter langt større. Mutasjoner som gir en synlig defekt i en biologisk prosess kan være en veiviser til gener som styrer denne prosessen, helt uavhengig av genbibliotek, EST-er og storskala DNA-sekvensering. Ved Havforskningsinstituttet har vi etablert flere innavlede linjer av lakselus, og i denne sammenhengen har vi oppdaget flere slike spontane mutasjoner som gir opphav til avvikende fenotyper.

Spontane mutasjoner er imidlertid sjeldne selv i innavlede familier, og det er svært tidkrevende å identifisere hvilke gener som er defekte. Ved å benytte moderne genteknologiske metoder kan imidlertid gener muteres med høy frekvens og på en måte som i tillegg gjør det relativt enkelt å identifisere de muterte gener. Via tildeling fra Forskningsrådets FUGE-program skal Havforskningsinstituttets forskningsgruppe for genomforskning, i samarbeid med SARS-senteret i Bergen, nå starte et prosjekt der det skal lages muterte lakselus og identifisere muterte gener i individer med "interessante" fenotypavvik. Metoden som skal benyttes baserer seg på tilfeldig innsetting av en DNA-bit med kjent sekvens. Dersom denne DNA-biten blir satt inn i et gen, vil funksjonen til genet





Figur 5

En normal lakselus og en lus med strukturelt avvik (deformert gonadekompleks). Slike avvik kan skyldes et defekt gen og "vise vei" i jakten på gener involvert i viktige biologiske prosesser.

A normal salmon louse and a louse with structural abnormalities (deformed gonad-complex). Such defects can be due to gene defects and "show the way" in the identification of genes involved in important biological processes.

bli ødelagt samtidig som et gen i den innsatte DNAbiten blir aktiv, på samme tid og sted som det ødelagte genet ville ha vært aktiv. Da vil man få et signal (fluorescens) som sier at dette individet er mutert.

Lakselusen er gjennomiktig også i voksne stadier og vi kan relativt enkelt se hvor i dyret og når i livssyklusen det muterte genet er aktivt. Ved å spesifikt avle på muterte individer kan man få frem homozygote individer for den aktuelle mutasjonen (termen homozygot mutant forteller at genet er ødelagt i kopien fra både mor og far). Selv om man kan ha fenotypiske avvik når en mutasjon opptrer i heterozygot tilstand (termen heterozygot mutant betyr at genet er ødelagt i en av kopiene, enten den fra mor eller den fra far), vil totaleffekten generelt først komme klart frem når den opptrer som homozygot. Siden sekvensen til DNA-biten som er innsatt er kjent, fungerer den som en merkelapp (markør), og det mutete genet kan relativt enkelt identifiseres i individer med en interessant fenotype (f.eks at mutasjonen i homozygot form er dødelig). Når genet er identifisert må man få bekreftet at gendefekten

og fenotypen hører sammen. Dette kan gjøres ved å "skru av" det samme genet i en normal lus og observere hva som skjer.

HVORDAN "SKRU" AV ET GEN I EN LEVENDE LAKSELUS

RNA-interferens er en relativt nyoppdaget biologisk prosess som er funnet i ulike organismer, fra mark til menneske. Trolig er RNA-interferens en evolusjonsmessig "gammel" form for immunrespons mot virusangrep. Dersom en celle "oppdager" dobbeltrådig RNA, noe som i naturen primært skjer ved virusinfeksjon, angriper RNA-interferens systemet denne RNA-en. Deretter vil systemet gjenkjenne og angripe all RNA i cellen som har lik sekvens. Genet blir altså "skrudd av" ved at utelukkende dette genets mRNA ødelegges.

I moderne genteknologi kan vi nå lage dobbeltrådig RNA, injisere dette i celler og dermed skru av et av cellens egne gener. I høyerestående organismer fungerer, av ulike grunner, dette kun på tidlig embryostadiet eller i cellekulturer. I en del laverestående dyr, blant annet malariamykk, fungerer RNA-interferens på hele den levende voksne organismen ved en enkelt injeksjon av RNA. I disse organismene kan man derfor skru av et gen, observere konsekvensen av at dette skjer, og på denne måten finne genets funksjon. Denne metoden skal nå etableres på lakselus, i samarbeid med EMBL i Heidelberg, som har etablert denne teknikken på malariamykk. Det er ingen åpenbare grunner til at RNA-interferens ikke skal fungere minst like bra i lakselus som i malariamykk.

Med etablert RNA-interferens på lakselus kan vi relativt enkelt få indikasjon om funksjonen til lakselusgener. Teknikken tenkes brukt på gener som er funnet interessante via EST-sekvensering/Genbank søk, mikromatrisestudier eller funn i mutante lakselus. Dette er en effektiv måte å evaluere en stor mengde genprodukter/prosesser som eventuelt kan angripes via vaksinasjon. Dersom det å "skru av" et gen hemmer og kanskje dreper lusen, vil en effektiv blokkering av det samme genets genprodukt (det aktive proteinet), for eksempel ved vaksinasjon, resultere i det samme.

Kliniske vaksinasjonsforsøk vil derfor primært bli gjort med proteiner der forsøk indikerer at proteinet er essensielt for en biologisk prosess i lusen som potensielt kan blokkeres ved vaksinasjon, for eksempel i fordøyelse og/eller reproduksjon. Veien frem til en effektiv vaksine avhenger derfor av hvor mange gener som må testes før man finner gener som koder for slike nøkkelproteiner og i tillegg lar seg produsere som vaksine. Løsningen ligger der et sted, i genene.