

## Samenvatting

In de strijd tegen infectieziekten zijn er in de loop der jaren verschillende succesvolle vaccins ontwikkeld. Deze vaccins worden meestal via injecties toegediend, maar hieraan kleven ook enkele nadelen: het gebruik van naalden houdt altijd een risico van besmetting met pathogenen (ziekteverwekkers) in, injecties moeten door speciaal opgeleid personeel worden toegediend en het gebruik van naalden is met name voor kinderen beangstigend.

Bij vaccins die oraal (via de mond) worden toegediend zijn geen naalden meer nodig. De toediening van orale vaccins is verder dusdanig eenvoudig dat, in principe, iedereen ze kan toedienen. Hierdoor zal een grootschalige vaccinatie (zoals de recente meningococcen-vaccinatie campagne) minder tijd kosten en minder angst en stress bij de gevaccineerde opleveren. Verder zijn orale vaccins in staat om zowel in het bloed als in de beschermde slijmlagen van het lichaam (de mucosa) een immunologische reactie op te wekken. Het mucosale immuunsysteem wordt hierbij geactiveerd. Bescherming aan de mucosa is belangrijk, omdat de meeste pathogenen via de mucosa het lichaam van een gastheer binnenkomen. Injecteerbare vaccins brengen met name immunologische bescherming in het bloed teweeg, maar het mucosale immuunsysteem wordt nauwelijks geactiveerd. Een voorbeeld van een succesvol oraal vaccin is het poliovaccin wat een belangrijke bijdrage heeft gehad in de wereldwijde uitroeiing van polio. Momenteel zijn er weinig andere orale vaccins commercieel verkrijgbaar, maar gezien de vele voordelen van orale vaccins wordt er nog steeds intensief onderzoek naar nieuwe orale vaccins uitgevoerd.

Met behulp van de huidige kennis in moleculaire biologie is het mogelijk om vaccins in planten te produceren. Wanneer een oraal vaccin in eetbare delen van een plant wordt gemaakt, kan het vaccin toegediend worden door simpelweg de plant of het eetbare deel ervan op te eten. In dit proefschrift is het onderzoek naar de haalbaarheid van de productie van orale vaccins in planten beschreven. Het onderzoek werd uitgevoerd in muizen die oraal eiwitten toegediend kregen. Als eerste model-eiwit werd ovalbumine (OVA) gebruikt en als tweede model-eiwit werd de B-subunit van het hittelabele enterotoxine van *Escherichia coli* gebruikt.

Wanneer een pathogeen een gastheer voor de eerste maal binnendringt wordt het immuunsysteem geactiveerd. Bij deze primaire reactie slaat het geactiveerde immuunsysteem herkenningspunten (epitopen) van het pathogeen op in het geheugen. Bij een nieuwe besmetting met hetzelfde pathogeen herkent het immunologisch geheugen van de gastheer dit pathogeen en wordt er sneller op de binnengedrongen ziekteverwekker gereageerd (secundaire reactie). Een vaccin moet een pathogeen kunnen nabootsen en het immuunsysteem dusdanig activeren dat het immuunsysteem in het vervolg het pathogeen herkent. Het vaccin zelf mag de gastheer niet ziek maken. Veel vaccins bestaan uit volledige pathogenen die verzwakt of afgedood zijn. Hierbij bestaat er echter altijd een mogelijk risico op reactivatie van het pathogeen. Daarom wordt er

## Samenvatting

veel onderzoek gedaan naar veiliger geachte vaccins. Deze zouden kunnen bestaan uit stukjes van het pathogeen, bijvoorbeeld alleen de voornaamste eiwitten van het pathogeen die een immunologische reactie kunnen veroorzaken. Uit onderzoek is gebleken dat vaccins die bestaan uit delen van het pathogeen minder effectief zijn dan vaccins die uit het complete pathogeen bestaan en moeten daardoor aangevuld worden met een adjuvant, een component die de immunologische reactie versterkt.

In hoofdstuk 1 werd een algemene inleiding over de achtergronden van orale vaccinatie gegeven inclusief een beknopt overzicht van het mucosale immuunsysteem. In de volgende twee hoofdstukken werd de optimalisatie van een immunisatie protocol voor eetbare vaccins beschreven. De effectiviteit van een oraal vaccin bleek te kunnen worden verhoogd door meerdere (multiple) doses van het vaccin te verstrekken. Wanneer deze multiple doses niet meerdere dagen achtereen, maar om de dag werden gegeven, waren er geen nadelige gevolgen voor de gezondheid (hoofdstuk 2). Orale vaccinatie bleek minder effectief te zijn dan injecteerbare vaccinatie. Daarom werd er gekeken of de twee vaccinatie vormen combineerbaar waren en zo bescherming in zowel het bloed als in de mucosa opgewekt kon worden. Door het immuunsysteem eerst met een injecteerbare (subcutane) vaccinatie optimaal te activeren (priming), was het mogelijk om met behulp van orale vaccinaties het immuunsysteem te reactiveren (booster; hoofdstuk 3). Bij deze experimenten werd OVA gebruikt als model eiwit en vloeibaar rechtstreeks in de maag (intra-gastraal) van muizen toegediend. De resultaten van deze studies hebben geleid tot een immunisatie protocol waarbij één enkele subcutane priming met een antigeen in combinatie met een adjuvant drie weken later wordt gevolgd door orale boost immunisaties op alternerende dagen (systemische priming/orale boost protocol). Dit protocol werd toegepast op eetbare vaccins.

Als een model voor eetbare vaccins werd de B-subunit van het hittelabiele enterotoxine (LTB) van *Escherichia coli* geproduceerd in de knollen van transgene aardappelplanten. Stukjes aardappelknol werden gevoerd aan muizen of een aardappel extract werd intra-gastraal toegediend volgens het systemische priming/orale boost protocol. Specifieke antilichamen tegen LTB waren meetbaar in zowel het bloed als in mucosale secreties zoals de feces of in darmschraapsels (hoofdstuk 4). Vervolgens werd bestudeerd of LTB als adjuvant voor een ander, tegelijkertijd toegediend eiwit gebruikt kon worden. Hiervoor werden transgene aardappelen gemaakt die, naast LTB, een eiwit (E2) van het klassieke varkenspest virus tot expressie brachten. Dit eiwit werd samen met LTB in de aardappelknollen geproduceerd (E2 + LTB), maar werd ook als fusie-eiwit aan LTB geproduceerd (E2-LTB). De expressie niveaus van E2 + LTB en E2-LTB waren aanzienlijk lager dan die van LTB alleen. Dit komt waarschijnlijk omdat E2 + LTB en E2-LTB complexere en grotere moleculen zijn. Dit verklaart mogelijk ook waarom de immunologische reactie tegen deze aardappelen veel lager was. Er werden alleen maar specifieke antilichamen tegen LTB en niet tegen E2 gemeten. LTB geproduceerd in

## Samenvatting

aardappelknollen kon niet dienen als adjuvant voor tegelijkertijd toegediende eiwitten (hoofdstuk 5). Om de effectiviteit van op LTB gebaseerde vaccins te verhogen moeten allereerst de expressieniveaus van de (fusie)eiwitten worden verhoogd.

Tijdens de experimenten met de aardappelknollen werd aangetoond dat er een verschil bestaat tussen de immunologische reactie na het voeren van aardappelknollen en het intragastraal toedienen van een aardappelextract. In hoofdstuk 6 werd dit uitgebreider bestudeerd. Intragastrale toediening van OVA samen met een opgeloste voedselbrok van muizen wekte sterkere immunologische reacties op dan het direct opeten van een droge voedselbrok met vergelijkbare doses OVA. De route van orale toediening bleek een belangrijke rol te spelen bij orale vaccinatie. Dit maakt experimenten met intragastrale toediening van vaccins minder geschikt om de mogelijkheden van eetbare vaccins te bepalen (hoofdstuk 6).

Het voorgestelde systemische priming/orale boost protocol bleek toepasbaar te zijn voor intragastrale toediening van orale vaccins en het voeren van eetbare vaccins in het bijzonder. Hoewel na het eten van rauwe knollen er niet-wenselijke bijwerkingen bij de muizen zichtbaar waren. Het ideale door planten geproduceerde eetbare vaccin moet het eiwit in voldoende mate tot expressie brengen, moet makkelijk te vermeerderen zijn onder uiteenlopende omstandigheden en mag niet toxisch zijn wanneer het in hoge doses wordt toegediend. Wanneer hiernaar gekeken wordt blijken aardappelen minder geschikt te zijn. Consumptie van rauwe aardappelen is niet aan te raden en koken kan het vaccin denatureren. Voor toekomstige studies naar eetbare vaccins moet een meer geschikte plant gekozen worden (bijvoorbeeld tomaten- of bananenplanten).



## Samenvatting

