

Nederlandse Samenvatting

Kinkhoest is een ernstige infectieziekte van de bovenste luchtwegen veroorzaakt door de Gram-negatieve bacterie *Bordetella pertussis*. Aanvankelijk is een kinkhoestbesmetting niet te onderscheiden van een verkoudheid, maar na enige tijd ontstaan de voor kinkhoest typische, zeer langdurige en hevige hoestbuien, waarbij de patiënt tot stikkens toe hoest en daarna met gierende ademhaling weer lucht schept: de zogenaamde “whoop” uit de Engelse benaming “whooping cough”. De kinkhoestbacterie verspreidt zich door middel van aerosolen, die tijdens het hoesten vrij komen. Kinkhoest heeft een incubatieperiode van 7 tot 10 dagen. Tijdens deze periode koloniseert de bacterie eerst de keelholte en luchtpijp, waarna de bacterie zich snel vermeerderd en verder verspreidt. De productie van toxines veroorzaakt beschadiging van de slijmvliezen, waardoor uiteindelijk de voor kinkhoest zo karakteristieke symptomen ontstaan.

De introductie van kinkhoestvaccins in de jaren 40 en 50 van de vorige eeuw heeft ervoor gezorgd dat de kinkhoestincidentie, almede de morbiditeit en mortaliteit, enorm verlaagd zijn in nagenoeg alle westerse landen en vele ontwikkelingslanden. De eerste kinkhoestvaccins waren zogeheten cellulaire vaccins en bestonden uit hele, afgedode bacteriën. Na het van start gaan van de vaccinatiecampagnes werd echter snel duidelijk dat deze vaccins relatief veel bijwerkingen geven. Dit wordt veroorzaakt door de aanwezigheid van sterk immuun-stimulerende componenten, waaronder het lipopolysaccharide (LPS) molecuul. Dit molecuul is een belangrijke component van Gram-negatieve bacteriën en staat erom bekend sepsis (endotoxische shock) te kunnen veroorzaken. Om deze reden staat LPS ook wel bekend als endotoxine. Daarnaast heeft LPS nog een andere eigenschap: het functioneert als een immunologisch adjuvant. Dit houdt in dat de door vaccinatie opgewekte immuunrespons krachtiger zal zijn in aanwezigheid van LPS. De problemen betreffende de veiligheid van de cellulaire vaccins hebben geleid tot de ontwikkeling van minder toxische kinkhoestvaccins, de zogeheten a-cellulaire kinkhoestvaccins, die in het begin van de jaren tachtig van de vorige eeuw werd geïntroduceerd en sinds 2005 ook in het Nederlandse vaccinatieprogramma worden toegepast. Deze vaccins bevatten geen LPS en bestaan uit een combinatie van gezuiverde kinkhoestantigenen. A-cellulaire kinkhoestvaccins geven duidelijk minder bijwerkingen en lijken over het algemeen even goed te beschermen als de cellulaire vaccins. Een probleem van deze vaccins is echter dat de productiekosten relatief hoog zijn wat de toepasbaarheid in ontwikkelingslanden bemoeilijkt. Verder is het aannemelijk dat het gebruik van a-cellulaire vaccins zal leiden tot een versnelde selectie van mutanten, die niet meer goed herkend worden door het immuunsysteem; door het schaarse aantal antigenen waar deze vaccins op gebaseerd zijn bestaat er een relatief grote kans op het ontstaan van mutaties die de herkenning van de bacterie door het

immuunsysteem doen verminderen. Een ander belangrijk nadeel van deze vaccins is dat ze een ander soort immuniteit opwekken dan de cellulaire kinkhoestvaccins of een natuurlijke kinkhoestbesmetting. Terwijl de cellulaire vaccins en natuurlijke besmetting een zogenaamde Th1 respons opwekken, wekken a-cellulaire kinkhoestvaccins een zogenaamde Th2 respons op. Uit onderzoek is gebleken dat een te eenzijdige Th2 response kan leiden tot een verhoogd risico op allergische aandoeningen. Zeker over de lange termijn effecten van het vaccineren van immunologisch immature individuen (lees: zuigelingen) met a-cellulaire kinkhoestvaccins is op dit moment onvoldoende bekend.

Vandaag de dag maken de meeste ontwikkelingslanden gebruik van cellulaire kinkhoestvaccins, omdat deze vaccins niet alleen relatief goed werken, maar ook eenvoudig en goedkoop te produceren zijn. Daarentegen maken de meeste westerse landen op dit moment gebruik van de veiliger-geachte, maar duurdere a-cellulaire kinkhoestvaccins. Ondanks dat kinkhoestvaccinatie over het algemeen als een succes wordt gezien en de incidentie relatief laag is, is kinkhoest altijd in de samenleving aanwezig gebleven. Zeker in vergelijking met andere vaccineerbare ziektes is kinkhoest, als ziekte, het minst onder controle. Hier komt bij dat vanaf de jaren 80 van de vorige eeuw de kinkhoestincidentie in vele landen, inclusief Nederland, weer aan het stijgen is. Misschien nog zorgwekkender is dat, waar kinkhoest vroeger voornamelijk voorkwam bij kleuters, de ziekte tegenwoordig steeds vaker gevonden wordt bij pubers, volwassenen en belangrijker, bij pasgeborenen, die nog geen goed afweersysteem hebben. De bovenstaande redenen laten zien dat de ontwikkeling van verbeterde kinkhoestvaccins erg belangrijk is. Een van de belangrijkste obstakels hierbij, in ieder geval vanuit het perspectief van een verbeterd cellulair kinkhoestvaccin, is dat deze vaccins dus relatief veel bijwerkingen veroorzaken. Een van de voornaamste oorzaken hiervan is, zoals eerder gezegd, de aanwezigheid van LPS in het vaccin. Zoals de naam "lipopolysaccharide" al zegt, bestaat LPS uit een lipide gedeelte (het zogenaamde lipid A) en een polysaccharide (suiker) gedeelte. Lipid A is op zichzelf weer opgebouwd uit twee suikermoleculen (glucosamines), die ieder nog een fosfaatgroep hebben. Verder zijn aan deze twee glucosamines nog een aantal vetzuurstaarten gekoppeld (zie Fig. 6 van de General Introduction). Het is bekend dat de toxiciteit van het LPS voor het overgrote deel afhankelijk is van de samenstelling van het lipid A gedeelte en dan vooral van de hoeveelheid en de lengte van de vetzuurstaarten en de aanwezigheid van de fosfaatgroepen. Tevens is bekend dat het mogelijk is kleine veranderingen in het LPS te maken en dat deze veranderingen de toxiciteit van het LPS kunnen beïnvloeden. Zo is bijvoorbeeld aangetoond dat het LPS van de hersenvliesontstekingsbacterie

Neisseria meningitidis beduidend minder toxisch wordt als er vetzuurstaarten vanaf worden gehaald. Daar komt bij dat de adjuvant activiteit (de goede eigenschap van LPS) van deze veranderde LPS moleculen soms grotendeels behouden bleek te zijn. Dit minder toxische LPS met een behouden adjuvant activiteit is uiteraard uitermate geschikt voor gebruik in humane vaccins, omdat je dan wel de goede maar niet de slechte eigenschappen van het LPS benut.

Het voornaamste doel van het hier beschreven onderzoek was om veranderingen aan te brengen in het LPS van *B. pertussis* en zo te komen tot een minder toxische kinkhoeststam, die dan gebruikt zou kunnen worden als basis voor een verbeterd cellulair vaccin. Voor het aanbrengen van de veranderingen in het LPS maakten we enerzijds gebruik van enzymen die het LPS op specifieke plekken kunnen veranderen (**hoofdstukken 2 t/m 5**) en anderzijds grepen we in in de biosynthese route van het LPS (**hoofdstukken 8 & 9**). Verder hebben we onderzocht of het toevoegen van speciale LPS moleculen (deze zijn in staat de toxiciteit van andere LPS moleculen beïnvloeden) aan een cellulair kinkhoestvaccin een goede strategie is om de vaccins te verbeteren (**hoofdstuk 6**). In het verlengde hiervan hebben we ook bekeken of de toevoeging van deze speciale LPS moleculen de werking en effectiviteit van a-cellulaire kinkhoestvaccins beïnvloedt, onder andere omdat het bekend is dat LPS een Th2 immuunrespons om kan buigen naar een Th1 immuunrespons. Dit is interessant aangezien een van de belangrijkste nadelen van a-cellulaire kinkhoestvaccins was, dat ze een Th2 in plaats van een Th1 immuunrespons opwekken (**hoofdstuk 7**). Aangezien aangetoond is dat het reduceren van het aantal vetzuurstaarten aan LPS in het algemeen leidt tot verminderde toxiciteit was een enzym, PagL, dat vetzuurstaarten van LPS af kan knippen een van de primaire kandidaten voor toepassing in onze strategie. We zijn daarom eerst begonnen met het bestuderen van dit enzym (**hoofdstukken 2 & 3**).

Hoofdstuk 2 beschrijft de identificatie van PagL homologen in een groot aantal Gram-negatieve bacteriën. Het PagL enzym werd als eerste gevonden in de bacteriesoort *Salmonella enterica*. Toentertijd dacht men dat PagL uniek was voor deze ene soort. Toen wij echter gingen zoeken in een database waarin alle bekende genoomsequenties van bacteriesoorten opgenomen zijn, bleek al snel dat aan PagL gelijkende eiwitten ook in veel andere bacteriesoorten te vinden zijn. Nieuwe homologen werden onder andere geïdentificeerd in de genomen van verschillende *Bordetella* en *Pseudomonas* soorten, inclusief de kinkhoestbacterie *B. pertussis* en de opportunistische humane pathogeen *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa* is vooral bekend om zijn rol bij taaislijmziekte, waarbij de bacterie vaak infecties veroorzaakt). Interessant genoeg vonden we dat de *pagL* sequentie in het genoom van *B. pertussis*, in tegenstelling tot de andere *Bordetella*

soorten, verstoord is door een frame-shift mutatie, waardoor deze bacterie het PagL enzym niet meer kan maken. Wellicht is het muteren van *pagL* door *B. pertussis* dus wel een manier geweest om zich aan te passen aan de menselijke gastheer. Verder konden we op basis van sequentievergelijkingen een voorspelling doen welke aminozuren belangrijk zouden kunnen zijn voor de activiteit van het PagL enzym. We kwamen hierbij uit op twee aminozuurresiduen: één serine en één histidine. Door te laten zien dat het vervangen van deze aminozuren leidt tot een niet actief enzym, konden we aantonen dat ze inderdaad belangrijk zijn voor de activiteit van PagL.

In **hoofdstuk 3** gingen we nog een stap verder en werden nog een aantal nieuwe PagL homologen geïdentificeerd. Daarnaast beschrijft dit hoofdstuk de kristalstructuur van het PagL enzym van *P. aeruginosa*. Deze structuur liet zien dat het enzym een β -barrel is opgebouwd uit acht β -strands. Verder vonden we dat het enzym waarschijnlijk scheef in de membraan zit en konden we, nu we met veel meer detail konden kijken, een betere voorspelling doen over welke aminozuren belangrijk zijn voor de enzym activiteit. Naast de al in **hoofdstuk 2** geïdentificeerde serine en histidine residuen konden we nu ook een derde aminozuur, een glutamaat, aanwijzen als onderdeel van het enzymatisch centrum van het eiwit. Daarnaast werden nog drie andere belangrijke residuen gevonden: een aspartaat (voor substraat herkenning), een fenylalanine (voor substraat positionering) en een asparagine (betrokken bij de formatie van het oxyanion hole).

Na deze uitgebreide analyse van het PagL enzym stapten we in **hoofdstuk 4** over op de mogelijke toepassing van dit enzym voor de ontwikkeling van minder toxische kinkhoeststammen. Daartoe brachten we het *pagL* gen van *Bordetella bronchiseptica* in *B. pertussis* tot expressie. We kozen voor PagL van *B. bronchiseptica*, omdat we in **hoofdstuk 2** hadden laten zien dat dit enzym inderdaad actief is, en omdat we, gezien de nauwe verwantschap tussen *B. pertussis* en *B. bronchiseptica*, hierbij de minste problemen verwachtten met betrekking tot de expressie en biogenese van het eiwit en de herkenning van het LPS substraat. Behalve de PagL-producerende stam werden ook nog twee PagP-producerende *B. pertussis* stammen geconstrueerd. PagP is ook een LPS-modificerend enzym, maar het plakt een extra vetzuurstaart aan lipid A, in plaats van er een af te halen zoals PagL dat doet. Eerst lieten we zien dat het LPS dat deze drie *B. pertussis* stammen maken een veranderde toxiciteit heeft. Het LPS van de PagL-producerende stam was minder toxisch, terwijl het LPS van de PagP-producerende stammen juist toxischer was. Dit klopte met onze verwachtingen, aangezien de algemene regel luidde: hoe minder vetzuurstaarten aanwezig, hoe minder toxisch het LPS. Vervolgens bestudeerden we de toxiciteit van hele bacteriecellen. Zoals verwacht

waren de PagP-producerende cellen, net als het LPS van deze bacteriën, toxischer geworden, maar verrassenderwijs was dit ook het geval voor de PagL-producerende bacteriën. Dus, hoewel het LPS minder toxisch geworden was, vonden we dat de hele bacteriecellen juist toxischer geworden waren. In het vervolg van het hoofdstuk lieten we zien dat dit resultaat wellicht deels verklaard kan worden, doordat gedeacyleerd LPS makkelijker loslaat uit de bacteriemembraan. Het is bekend dat vrij LPS toxischer is dan eenzelfde hoeveelheid membraan-gebonden LPS. Het zou dus kunnen dat het makkelijker vrijkomen van het LPS uit de PagL-producerende bacteriën de verlaagde toxiciteit van het LPS te niet doet.

In **hoofdstuk 5** maakten we de overstap naar een diermodel. Tot dan toe hadden we toxiciteit alleen getest *in vitro* en nu wilden we graag de effecten van de LPS modificaties testen in levende dieren. Hiervoor werden de in **hoofdstuk 4** geconstrueerde *B. pertussis* stammen en een controle (wildtype) stam verwerkt tot cellulaire kinkhoestvaccins en gebruikt voor vaccinatie van muizen. Na twee vaccinaties werden de muizen geïnfecteerd met wildtype *B. pertussis*, waarna geanalyseerd werd hoe goed de muizen in staat waren om de infectie te weerstaan. Hieruit kwam naar voren dat zowel het vaccin gebaseerd op de PagP-producerende stam als het vaccin gebaseerd op de PagL-producerende stam een betere bescherming boden dan het controle vaccin. Naast deze effectiviteitsanalyse werd ook gekeken naar de hoeveelheid *B. pertussis*-specifieke antilichamen in het bloed en naar een specifieke klasse van eiwitten, genaamd cytokines, die een belangrijke rol spelen binnen het immuunsysteem. Doel was te bepalen wat voor een type immuunrespons de vaccins hadden opgewekt en hoe toxisch de vaccins waren. Voor dit laatste werd onder andere de interleukine-6 (IL-6) concentratie in het bloed bepaald. IL-6 is een ontstekingsopwekkend cytokine, dat wordt geproduceerd zodra een persoon geïnfecteerd wordt met bacteriën. Normaal gesproken is dit een goede zaak, aangezien een ontstekingsreactie nodig is om een bacterie-infectie op te ruimen, maar in het geval van bijvoorbeeld het cellulaire kinkhoestvaccin, wanneer zeer lokaal een grote dosis bacteriën wordt ingespoten, kan de reactie hierop wel eens te heftig zijn, wat dan resulteert in ongewilde bijwerkingen. Uit de analyse van de IL-6 concentraties in het bloed bleek dat de vaccins gebaseerd op de PagP- en PagL-producerende stammen qua toxiciteit gelijk waren aan het controle vaccin. Dit laatste was onverwacht aangezien we in **hoofdstuk 4** gezien hadden dat de productie van PagP en PagL de bacteriecellen toxischer maakte. Blijkbaar zijn resultaten die verkregen worden *in vitro* dus niet automatisch te vertalen naar uitkomsten van dierexperimenten. Deze conclusie onderstreept het belang van het uitvoeren van beide soorten experimenten. De vaccintoxiciteit werd ook nog op andere manieren bepaald.

Dit gebeurde in een zogeheten muistoxiciteitstest, waarbij na vaccinatie het gewicht van de muizen en de hoeveelheid witte bloedcellen in het bloed bepaald werden. Daarbij geldt dat hoe meer gewicht de muizen verliezen en hoe meer witte bloedcellen aanwezig, hoe toxischer de vaccins. Uit deze analyse bleek dat alle geteste vaccins leidden tot evenveel gewichtsverlies, maar dat in de muizen gevaccineerd met de PagP-producerende stam duidelijk grotere hoeveelheden witte bloedcellen aanwezig waren dan in de muizen gevaccineerd met de PagL-producerende stam of de controle stam. Deze resultaten laten zien dat de PagL-producerende stam, en in mindere mate misschien ook de PagP-producerende stam, veelbelovende kandidaten zijn voor de ontwikkeling van een verbeterd cellulair kinkhoest vaccin. Aangezien vaccinatie met de PagL-producerende stam een betere bescherming opleverde dan vaccinatie met de controle stam kan voor eenzelfde vaccineffectiviteit waarschijnlijk een lagere vaccindosis gebruikt worden, wat zal resulteren in een reductie van bijwerkingen.

In **hoofdstuk 6** zijn we overgegaan op een andere aanpak. In dit hoofdstuk hebben we bestudeerd of een tweetal specifieke LPS analogen de effectiviteit en toxiciteit van cellulaire kinkhoestvaccins gunstig kunnen beïnvloeden. Hiervoor werden monophosphoryl lipid A (MPL) en *N. meningitidis* LpxL2 LPS gebruikt. MPL heeft een lage toxiciteit en wordt gebruikt als immunologisch adjuvant. LpxL2 heeft ook een lage toxiciteit, maar bezit daarnaast, zoals beschreven in dit hoofdstuk, ook de capaciteit om de toxiciteit van andere LPS vormen te verlagen (het werkt als een zogeheten LPS antagonist). Het idee was dat toevoeging van MPL waarschijnlijk zou leiden tot een verhoogde vaccineffectiviteit (MPL werkt immers als een adjuvant) zonder de toxiciteit van het vaccin te verhogen. De resultaten lieten zien dat dit inderdaad het geval was en dat toevoeging van MPL aan cellulaire kinkhoestvaccins, net als het gebruik van de PagL-producerende stam, waarschijnlijk een verlaging van de vaccindosis mogelijk maakt en dus het aantal en de ernst van de bijwerkingen zal verlagen. De resultaten met het LpxL2 gesupplementeerde vaccin waren nog meer veelbelovend. LpxL2 LPS werkt als een LPS antagonist wat inhoudt dat toevoeging aan een cellulair vaccin de vaccintoxiciteit zal verlagen. En inderdaad, na vaccinatie met het LpxL2 gesupplementeerde vaccin waren de IL-6 concentraties in het bloed significant lager dan na vaccinatie met het controle vaccin. Hier komt bij dat de effectiviteitsanalyse liet zien dat het LpxL2 gesupplementeerde vaccin ook nog eens een betere bescherming gaf. Het mes snijdt hier dus aan twee kanten; de toxiciteit wordt verlaagd en de effectiviteit gaat omhoog. Deze resultaten laten zien dat toevoeging van LpxL2 LPS (of LPS vormen met vergelijkbare eigenschappen) aan cellulaire kinkhoestvaccins een uitermate veelbelovende strategie is om uiteindelijk te komen tot een effectiever en

minder toxisch cellulair kinkhoestvaccin.

In **hoofdstuk 7** hebben we net als in **hoofdstuk 6** gebruikt gemaakt van de LPS analogen MPL en LpxL2 LPS. Dit keer werden de analogen echter toegevoegd aan a-cellulaire kinkhoest vaccins. De achterliggende gedachte was dat toevoeging van LPS, waarvan het bekend is dat het de immuunrespons richting Th1 duwt, de Th2 respons, die normaal door a-cellulaire kinkhoestvaccins wordt opgewekt, om zou kunnen buigen naar een Th1 respons. Tevens hebben MPL en LpxL2 LPS een adjuverende werking, wat betekent dat zij de vaccineffectiviteit waarschijnlijk zullen verhogen. De resultaten lieten zien dat toevoeging zowel van MPL als van LpxL2 LPS inderdaad leidde tot een sterkere Th1 respons en een verhoogde vaccineffectiviteit. Deze bevindingen ondersteunen de conclusie dat het gebruik van LPS analogen potentieel een goede strategie is om in ieder geval sommige van de problemen met a-cellulaire kinkhoestvaccins op te kunnen lossen.

In de laatste twee hoofdstukken zijn we weer terug gegaan naar het aanbrengen van veranderingen in het LPS. Hiervoor maakten we deze keer geen gebruik van LPS-modificerende enzymen maar grepen we, door het aanbrengen van mutaties, direct in in de LPS biosynthese route. **Hoofdstuk 8** beschrijft de ontdekking van twee *B. pertussis* genen, *lpxL1* en *lpxL2*, die coderen voor eiwitten die lijken op enzymen die in andere bacteriën verantwoordelijk zijn voor het aanplakken van secundaire vetzuurstaarten aan LPS. Aangezien *B. pertussis* LPS normaal gesproken maar 1 secundaire vetzuurstaart heeft (een C14 vetzuurstaart; zie Fig. 6 van de General Introduction) was de vraag welke van de twee gecodeerde enzymen verantwoordelijk is voor het aanzetten van deze vetzuurstaart en wat de functie van het andere enzym is. Uit onze analyses bleek dat de secundaire C14 vetzuurstaart wordt aangezet door het LpxL2 enzym, terwijl het andere enzym, LpxL1, verantwoordelijk is voor het aanzetten van een tot nu toe voor *B. pertussis* onbekende secundaire hydroxy-C12 vetzuurstaart. Verder hebben we laten zien dat een *B. pertussis lpxL1* mutant onder andere een veranderde membraan integriteit heeft en minder goed in staat is macrofagen te infecteren. Verder onderzoek zal moeten uitwijzen wat het effect van de *lpxL1* mutatie op het vaccinpotentieel van *B. pertussis* is. Tot slot hebben we in **hoofdstuk 9** een viertal nieuwe *B. pertussis* genen geïdentificeerd die mogelijk coderen voor eiwitten betrokken bij de biosynthese van het suikergedeelte van het LPS. Door deze genen één voor één uit te schakelen konden we laten zien dat in ieder geval twee van de vier genen hier inderdaad bij betrokken zijn. De functie van de andere twee genen is nog onduidelijk. Het suikergedeelte van het LPS is onder andere belangrijk voor de binding van het LPS (en dus van de hele bacterie) aan immuuncellen. Deze binding is belangrijk in twee opzichten. Enerzijds zorgt het

ervoor dat de bacteriën efficiënt kunnen worden opgenomen, wat belangrijk is voor het opbouwen van een goede immuunrespons. Anderzijds zorgt het er ook voor dat de immuuncellen zich verder ontwikkelen (matureren). Om deze reden hebben we de maturatie van dendritische cellen (een speciale klasse van immuuncellen) onderzocht na incubatie met onze suikermutanten. Hierbij kwam naar voren dat veranderingen in het suikergedeelte van het LPS inderdaad invloed hebben op de maturatie van de dendritische cellen. Mutaties kunnen zowel leiden tot een slechtere maturatie (Δ BP2329 mutant) als tot een betere maturatie (Δ BP2331 mutant). Deze resultaten laten zien dat niet alleen veranderingen in het lipid A gedeelte van het LPS bruikbaar kunnen zijn voor de ontwikkeling van een verbeterd kinkhoestvaccin, maar dat ook zeker aanpassingen in het suikergedeelte tot de opties behoren. Om hier meer duidelijkheid over te krijgen zullen deze mutanten getest moeten worden in een muizen beschermingsmodel.

Op dit moment eist kinkhoest wereldwijd jaarlijks ongeveer 300.000 kinderlevens waarvan het overgrote deel onder de niet gevaccineerde populatie. Kinkhoestvaccins hebben bewezen betrekkelijk veilig en effectief te zijn. In de meeste landen bestaat kinkhoestvaccinatie uit een primaire serie van drie immunisaties, startend tussen de 6 weken en 3 maanden na geboorte, gevolgd door een vierde immunisatie wanneer de kinderen ongeveer 1 jaar oud zijn. In sommige landen wordt ook op latere leeftijd (tussen de 4 en 6 jaar) nog een vijfde immunisatie gegeven. Ondanks een hoge vaccinatiegraad komt kinkhoest nog steeds relatief vaak voor. Een van de mogelijke oorzaken hiervan is dat kinkhoestvaccinatie maar voor een beperkte tijd bescherming biedt en dat op latere leeftijd dus niet meer voldoende immuniteit aanwezig is om infectie te voorkomen. Deze redenering is consistent met de observatie dat kinkhoest tegenwoordig steeds vaker gevonden wordt bij oudere kinderen en volwassenen. Aanpassingen van huidige a-cellulaire kinkhoestvaccins, bijvoorbeeld door het toevoegen van extra antigenen, zou tot verbetering van de effectiviteit kunnen leiden, maar het is twijfelachtig of deze aanpassingen ook zullen leiden tot een langere beschermingsduur. Het is wellicht interessanter om te kijken naar de mogelijkheid van het toevoegen van LPS analogen. Zoals we in **hoofdstuk 7** hebben laten zien leidt deze strategie tot het opwekken van een ander soort immuniteit: Th1 immuniteit in plaats van Th2 immuniteit. In het achterhoofd houdende dat een natuurlijke kinkhoestinfectie wel voor langere tijd bescherming biedt en dat natuurlijke infectie ook Th1 immuniteit opwekt, zou dit kunnen betekenen dat het toevoegen van LPS analogen aan a-cellulaire kinkhoestvaccins niet alleen, zoals we hier hebben laten zien, de effectiviteit verhoogd, maar wellicht ook langer bescherming biedt. Dergelijke aanpassingen zullen echter niet alle problemen van de a-cellulaire kinkhoestvaccins, bijvoorbeeld de hoge productiekosten, oplossen. Daarom zullen ook

andere mogelijkheden onderzocht moeten worden. Een flink aantal wetenschappers is op dit moment bezig met het ontwikkelen van verbeterde kinkhoestvaccins. Hierbij wordt onder andere gewerkt aan geattenueerde pertussis vaccins, welke bestaan uit verzwakte, maar levende kinkhoestbacteriën, en vaccins gebaseerd op DNA. In dit proefschrift hebben we laten zien dat het aanpassen van de LPS samenstelling ook een goede strategie kan zijn om cellulaire kinkhoestvaccins te verbeteren. Het is op dit moment echter te vroeg om te zeggen op welke manier dit dan het beste kan. Het meest veelbelovend lijkt op dit moment de optie van het toevoegen van LPS antagonist, zoals bijvoorbeeld LpxL2 LPS. We hebben laten zien dat deze strategie leidt tot een effectiever vaccin dat minder toxisch is. Het is echter wel denkbaar dat het toevoegen van extra LPS aan kinkhoestvaccins zal stuiten op bezwaren met betrekking tot de registreerbaarheid van een dergelijk vaccin, aangezien LPS wordt gezien als een toxisch bestanddeel en het dus raar is om iets wat in principe toxisch is toe te voegen aan een vaccin dat je minder toxisch wilt maken. Het is daarom wellicht interessanter het gebruik van bijvoorbeeld de PagL-producerende stam te overwegen. Daarnaast is het belangrijk door te gaan met het testen van andere *B. pertussis* stammen, bijvoorbeeld de suikermutanten en de *lpxL1* mutant, andere LPS-modificerende enzymen, andere LPS mutaties en andere soorten adjuvantia. Niettemin zal het introduceren van nieuwe kinkhoestvaccins nog een flinke tijd in beslag nemen, onder andere omdat het registreren van nieuwe vaccins erg tijdrovend is. Het is daarom van belang het gebruik van de huidige kinkhoestvaccins verder te optimaliseren. Hierbij zou onder andere het invoeren van (vrijwillige) kinkhoestvaccinatie voor pubers en volwassenen of voor zwangere vrouwen (factoren die bescherming bieden tegen kinkhoest kunnen van moeder op kind worden overgedragen via de placenta) overwogen kunnen worden. Verder zou het wellicht mogelijk zijn om zéér kort na geboorte al een eerst kinkhoestvaccinatie te geven.