

Kasveissa tuotettu rokote porsaiden vieroitusripuliin

Jussi Joensuu¹, Frank Verdonck², Andrea Ehrström³, Minna Peltola^{1,6}, Hilikka Siljander-Rasi⁴, Anna Maria Nuutila⁵, Kirsi-Marja Oksman-Caldentey⁵, Teemu Teeri¹, Eric Cox², Bruno Goddeeris², Viola Niklander-Teeri¹

¹Soveltavan biologian laitos, PL 27, 00014 Helsingin yliopisto, jussi.joensuu@helsinki.fi, minna.peltola@helsinki.fi, teemu.teeri@helsinki.fi, viola.niklander-teeri@helsinki.fi

²Laboratory of Veterinary Immunology, Gent University, Belgium, frank.verdonck@ugent.be, eric.cox@ugent.be, bruno.goddeeris@ugent.be

³Kotieläintieteen laitos, PL 28, 00014 Helsingin yliopisto, andrea.ehrstrom@helsinki.fi

⁴MTT, Sikatalous, Tervamäentie 179, 05840 Hyvinkää, hilikka.siljander-rasi@mtt.fi

⁵VTT Biotekniikka, PL 1500, 02044 VTT, anna-maria.nuutila@vtt.fi, kirsi-marja.oksman@vtt.fi

⁶Soveltavan kemian ja mikrobiologian laitos, PL 56, 00014 Helsingin yliopisto

Tiivistelmä

Enterotoksiset *Escherichia coli*-kannat (ETEC) ovat yleisiä porsas- ja sikaripulin aiheuttajia maailmanlaajuisesti. Vieroitusvaiheessa (3-5 viikon iässä) porsaiden vastustuskyky on heikoimmillaan, koska imetyksen mukana ternimaidosta saadut vasta-aineet vähenevät ja porsaiden oma vasta-aineiden tuotto on vasta alkamassa. Tällöin haitalliset suolistopatogeenit (bakteerit tai virukset) pääsevät helposti kolonisoimaan ohutsuolen ja aiheuttamaan ripulin. Ripuli aiheuttaa paitsi turhaa kärsimystä porsaille, myös tuotannon heikkenemistä kasvun hidastuessa ja ääritapauksissa porsaskuolemia.

Hygienian, kasvatusolosuhteiden ja ravinnon korkea taso ovat ensisijaisen tärkeitä pyrittäessä ehkäisemään ripulisairauksien puhkeamista, mutta usein joudutaan myös turvautumaan yksittäisten eläinten rokottamiseen tai antibiootteihin. Antibioottien käyttöä pyritään nykyään yleisesti rajoittamaan, sillä niiden leviäminen ympäristöön johtaa väistämättä antibiooteille vastustuskykyisten bakteerikantojen kehittymiseen.

Vieroitusripulin ehkäisemiseksi kaivataankin uusia, sekä inhimillisesti, taloudellisesti että ajankäytöllisesti parempia keinoja. Kasvibioteekniikka mahdollistaa porsaiden ripuliongelman ehkäisemisen uudella tavalla. Rehukasveissa voidaan tuottaa ns. syötäviä kasvirokotteita, jotka aktivoivat elimistön oman puolustusjärjestelmän (immuunivasteen), minkä seurauksena eläin välttyy tietyn patogeenin aiheuttamalta taudilta.

Tässä työssä olemme siirtogeenitekniikan avulla tuottaneet sinimailasessa ETEC bakteerin F4 fimbriin tartuntaproteiinia (FaeG). Tämä rokoteproteiini kohdennettiin viherhiukkasiin, jolloin siirtogeeniset sinimailaset tuottivat sitä 1% liukoisesta proteiinistaan. Kasvissa tuotettu rokoteproteiini todettiin kestäväksi ja se säilyi muuttumattomana kuivatussa sinimailasmateriaalissa ainakin kahden vuoden ajan. Porsaskokeessa vierotetuille porsaille annettiin rokoteproteiinia sisältävää sinimailasta. Kasvissa tuotettu rokoteproteiini sai porsaisissa aikaan heikon F4-spesifisen seerumin vasta-ainereaktion, jota pystyttiin vahvistamaan, kun rokoteproteiinin tehostajana käytettiin koleratoksiinia. Kun koeporsaat altistettiin patogeenisellä F4+ ETEC-kannalla, koleratoksiinilla tehostettu rokoteproteiini pystyi myös vähentämään ulosteessa erittyvien ETEC-bakteerien määrää merkittävästi verrattuna kontrolliryhmään, joka oli käsitelty ei-siirtogeenisellä sinimailasella. Tulokset osoittavat, että kasvissa tuotettu FaeG rokoteproteiini käynnistää porsaisissa F4-vasta-ainetuotannon ja vähentää F4+ETEC-infektion vakavuutta.

Asiasanat: F4 (K88) fimbria, enterotoksinen *Escherichia coli*, syötävä rokote, sinimailanen, porsas

Johdanto

Porsaille esiintyy yleisesti ripulia vieroitusvaiheessa (3-5 viikon iässä). Vieroituksen aikana ternimaidosta saadut vasta-aineet vähenevät ja porsaiden oma vasta-aineiden tuotto on vasta alkamassa. Tällöin haitalliset suolistobakteerit pääsevät helposti kolonisoimaan ohutsuolen ja aiheuttamaan ripulin. Yleisimpiä vieroitusripulin aiheuttajia ovat enterotoksiineja tuottavat *Escherichia coli* (ETEC) kannat.

ETEC kantojen tuottamat enterotoksiinit häiritsevät nesteiden ja elektrolyyttien normaalia imeymistä suolenseinämän läpi ja aiheuttavat ripulin (Bertschinger ja Fairbrother 1999). Avainasemassa taudin puhkeamisessa enterotoksiinien lisäksi on ETEC-bakteerien kyky tarttua suoliston limakalvoepiteeliin (Cowart 1995). ETEC-bakteerit tarttuvat limakalvoepiteelin reseptoreihin pintansa hiusmaisten proteiinirakenteiden avulla. Näitä antigeenisiiä proteiinirakenteita kutsutaan fimbrioksi. ETEC-bakteerien pinnalta on löydetty useita erilaisia fimbriatyyppejä, mutta yleisin Suomessa vieroitusripulia aiheuttavista ETEC kannoissa tavattava tyyppi on F4-fimbria (Bertschinger ja Fairbrother 1999). F4-fimbria muodostuu sadoista yhteenketjuttuneista FaeG-alayksikköproteiineista. F4-fimbrian sekä adhesiivisten että antigeenisten ominaisuuksien on todettu johtuvan FaeG-proteiinin rakenteesta (Bakker ym. 1992, Van den Broek ym. 2000).

Ripuli aiheuttaa paitsi turhaa kärsimystä porsaille, myös tuotannon heikkenemistä kasvun hidastuessa ja ääritapauksissa porsaskuolemia. Hygienian ja kasvatusolosuhteiden korkea taso ovat ensisijaisen tärkeitä pyrittäessä ehkäisemään ripulisairauksien puhkeaminen, mutta usein joudutaan myös turvautumaan antibiootteihin ja yksittäisten eläinten rokottamiseen. Lisäksi tavanomainen rokottaminen ETEC-ripulisairauksia vastaan on melko tehotonta, koska se aktivoi limakalvovälitteisen vasta-ainetuotannon sijasta lähinnä verenkiertojärjestelmän vasta-ainetuotannon (Van den Broek ym. 2000).

Kun porsaat immunisoidaan suunkautta bakteerista puhdistetuilla F4-fimbrioidilla tai FaeG-alayksikköproteiinilla, aktivoituu myös limakalvovälitteinen immuunijärjestelmä. Suoleen erittyvät IgA vasta-aineet sitoutuvat F4 ETEC-bakteerien pintarakenteisiin ja estävät kiinnittymisen ohutsuolen limakalvon reseptoreihin ehkäisten näin ripulin puhkeamisen (Van den Broek ym. 1999 b,c Verdonck ym. 2004a).

Tutkimusprojektimme päämääränä on kehittää uusi tapa porsasripulin ehkäisemiseksi. Ideana on kehittää FaeG rokoteproteiinia tuottavia siirtogeenisiä viljelykasveja, joista valmistettua rehua voidaan suoraan käyttää 'syötävänä rokotteenä'. Aiemmin olemme osoittaneet, että kasvissa tuotettu rokoteproteiini (pFaeG) pystyy kiinnittymään porsaista eristettyjen ohutsuolen pintasolujen reseptoreihin (Joensuu ym. 2004). Tässä tutkimuksessa selvitimme, saako sinimaillassa tuotettu pFaeG proteiini suunkautta annettuna porsaisa aikaan F4-spesifisen vasta-ainereaktion ja pystyykö se suojaamaan porsaita F4+ ETEC infektiolta (Joensuu ym. 2006).

Aineisto ja menetelmät

Kasvimateriaali

Sinimailaslajike REGEN-SY transformoitiin agrobakteerivälitteisesti geenikonstruktiolla, joka ohjasi rokoteproteiinin ilmenemisen kasvisolujen viherhiukkasiin (kuva 1a). Siirtogeenisistä sinimailaslinjoista eristettiin liukoiset proteiinit ja tutkittiin niiden sisältämä pFaeG proteiinin määrä. Kaksi eniten rokoteproteiinia tuottavaa sinimailaslinjaa valittiin monistettaviksi kasvihuonekasvatusta varten. Porsaskoetta varten sinimailasmateriaali kuivattiin 37°C lämpötilassa ja jauhettiin hienoksi.

Koeryhmät ja F4/FaeG immunisaatio

Kokeessa käytettiin suomalaisia F4-seronegatiivisia maatiaisporsaita kolmesta eri pahnueesta. Porsaat olivat vierotettaessa 31-33 vuorokauden ikäisiä. Porsaat vierotettiin karanteeniyksikköön ja jaettiin neljään koeryhmään (4-5 porsasta/karsina). Vierotuksen yhteydessä porsaille annettiin suun kautta antibioottia (ORIPRIMTM, 125 mg/kg), emakkosikalasta peräisin olevan bakteeriflooran tuhoamiseksi. Viikon totuttelujakson jälkeen porsaat (pFaeG ryhmä, 5 porsasta) saivat 30 g veteen liuotettua (1/10, paino/tilavuus) siirtogeenistä sinimailasjauhetta (sis. 20 mg pFaeG/porsas). Lisäksi liuos sisälsi 0,28% NaHCO₃ mahalaukun pH:n neutralisoimiseksi. Liuos annettiin porsaille mahaletkun avulla. Toinen

ryhmä (pFaeG+CT, 5 porsasta) sai lisäksi 50 µg koleratoksiinia/porsas. Positiivisena kontrollinen toiminut ryhmä (C+F4, 5 porsasta) sai 2 mg/porsas 5/95 ETEC kannasta puhdistettua F4-fimbriaa täydennettynä vastaavalla määrällä ei-siirtogeenistä sinimailasta. Negatiivinen kontrolliryhmä (C, 4 porsasta) sai ei-siirtogeenistä sinimailasta. Käsittelyt toistettiin kolmena peräkkäisenä päivänä. Kahden viikon päästä ensimmäisestä käsittelystä suoritettiin tehostusimmunisaatio yhtenä päivänä samoilla annoksilla. Rokotuskäsittelyiden yhteydessä porsaas olivat kolme tuntia ennen, ja kaksi tuntia käsittelyn jälkeen paastolla. Muuten porsaas saivat kokeen ajan rajoituksetta vettä ja rehua.

Verinäytteet

Porsailta otettiin viikoittain verinäytteet kainalolaskimosta. Seerumin erottamiseksi verinäytteitä seisoitettiin +37°C tunnin ajan ja sentrifugoitiin 10 000x g 10min. Seerumeille tehtiin komplementin inaktivaatio 56°C, 30min, sekä kaoliini käsittely epäspesifisen taustan vähentämiseksi F4 ELISA-vasta-ainemäärityksessä. Analysointia varten seeruminäytteet säilytettiin -20°C.

F4 ELISA, seerumi

ELISA-levyt (Nunc Maxisorb) päällystettiin puhdistetuilla F4 fimbrioidilla (10µg/ml PBS, 100µl/kuoppa) 4°C yli yön. Päällystys tehtiin samasta kannasta peräisin olevalla F4 fimbrialla, jolla porsas oli rokotettu/altistettu). Seuraavaksi levyt pestiin kolme kertaa PBS-puskurilla ja blokattiin laimennuspuskurilla (PBS+1% BSA, 300µl/kuoppa) tunnin ajan huoneenlämmössä epäspesifisen sitoutumisen vähentämiseksi. Näytekupurilla laimennetut seeruminäytteet (1/10-1/1280 laimennokset) lisättiin levyille (1 tunti huoneenlämmössä, 100µl/kuoppa). Pesut toistettiin ja levyille tarttuneet F4-vasta-aineet detektoitiin vuohessa tuotetulla goat-anti-pig IgG-AP (Bethyl) vasta-aineella, johon oli liitetty alkaalinen fosfataasi (1 tunti, 100µl/kuoppa). Uusien pesujen jälkeen levyiltä mitattiin fostataasiaktiivisuus käyttäen p-nitrofenyylifosfaattia substraattina (1mg/ml, 50µl/kuoppa). Entsyymireaktion tuloksena syntyvä keltainen väri mitattiin spektrometrisesti 405nm aallonpituudella.

Vierotuksen yhteydessä otetuista 1/10 laimennetuista näytteiden A_{405nm} -arvoista laskettiin (keskiarvo+2x keskihajonta, 0,351) raja-arvo, jonka perusteella muista aikapisteistä määritettiin laimennokset jotka ylittivät tämän arvon. Näiden raja-arvon ylittävien laimennoksien vastaluvuista otettiin 10-kantainen logaritmi tulosten esittämistä varten kuvaajassa.

ETEC altistus ja sontanäytteet

Porsaas altistettiin viikko viimeisen F4 käsittelyn jälkeen elävillä 5/95 ETEC-bakteereilla (serotyypin O149:F4ac, LT⁺, ST-B⁺). Tehokkaan altistuksen varmistamiseksi 3-6 päivää ennen altistusta porsaille annettiin suun kautta antibioottia (ORIPRIMTM, 125mg/kg). Porsaas olivat kolme tuntia ennen ja kaksi tuntia altistuksen jälkeen paastolla. ETEC-bakteerit kasvatettiin TSB-alustalla (tryptone soy broth, Pronadisa) 18 tuntia (37°C, ravistelu 85 kier/min) ja kerättiin sentrifugoimalla 4°C, 5000x g. Bakteerit pestiin kerran PBS-puskurilla ja suspendoitiin PBS-puskuriin konsentraatioksi 1×10^9 ETEC/ml. ($1.0 A_{605nm} = 1 \times 10^9$ ETEC/ml). Kaksikymmentä minuuttia ennen altistusta porsaiden mahalaukku neutraloitiin antamalla mahaletkulla 60ml 1,4% NaHCO. ETEC altistuksessa mahaletkulla annettiin porsaille 10ml ETEC suspensiota (1×10^{10} ETEC).

Altistuksen jälkeen porsailta kerättiin päivittäin sontanäytteet kahdeksan vuorokauden ajan. Näytteistä määritettiin sonnassa erittyvien F4 ETEC bakteerien määrä. Sontanäytteet laimennettiin PBS-puskurilla ja maljattiin veriagarmaljoille (5% defibrilloitu lampaan veri). Maljoilta laskettiin hemolyytiset kolipesäkkeet. Pesäkkeiden F4-spesifisyyden varmistamiseksi pesäkkeet siirrettiin nitrosellusosakalvolle ja detektoitiin F4ac-spesifisellä monoklonalisella vasta-aineella.

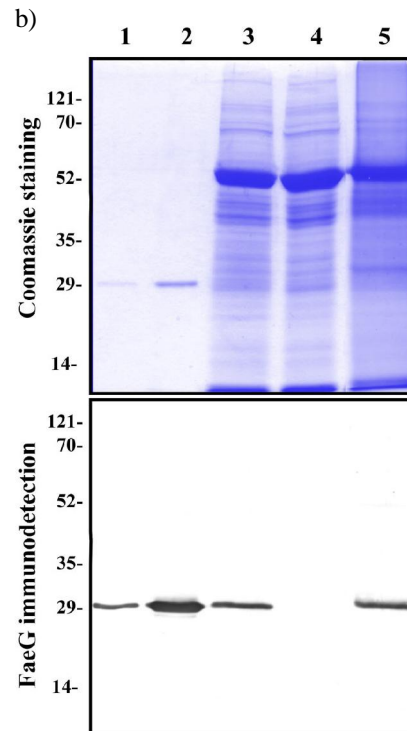
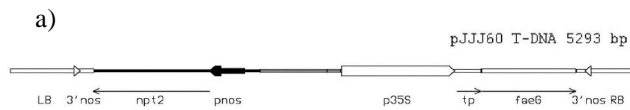
Tilastolliset menetelmät

Tilastollinen analyysi koeporsaiden vasta-ainelaimennoksille ja sonnassa erittyvien bakteerien määriin tehtiin SPSS 12.0 for Windows ohjelmalla käyttämällä seuraavia parametrejä: General linear model (repeated measures analysis of variance), multiple comparisons by Bonferoni.

Tulokset ja tulosten tarkastelu

FaeG rokoteproteiinin tuotto sinimailasessa

Parhaat siirtogeeniset sinimailaslinjat tuottivat *FaeG* rokoteproteiinia 1% kaikesta liukoisesta proteiinistaan. Sinimailasessa tuotettu rokoteproteiini kesti hyvin kasvimateriaalin kuivauksen ja säilyi muuttumattomana kahden vuoden varastoinnin ajan (kuva 1b). Saavutettu tuottotaso mahdollistaa rokoteproteiinin riittävän annostelun vierotusporsaille, sillä 100 g kuivattua sinimailasta sisältää 66 mg *FaeG* proteiinia. Aiemmassa tutkimuksessa 1 mg F4-fimbrinia ja 8 mg *FaeG* proteiinia / immunisaatio on todettu suojaavan vierotusporsaita merkittävästi F4-EPEC koealtistusta vastaan (Verdonck ym. 2004a).



Kuva 1. a) Geenikonstrukto, jonka avulla siirtogeeninen sinimailanen tuottaa *FaeG* rokoteproteiinia. p35S, kukkakaalin mosaiikkiviruksen 35S RNA:n geeninsäätelyalue, joka ohjaa *faeG*-geenin ilmenemistä kasvilla; tp, herneen rubisco-entsyymien pienen alayksikön kohdennuspeptidi, joka ohjaa *FaeG* proteiinin viherhiukkasiin. *faeG*, *FaeG* proteiinia koodaava geeni ETEC bakteerista; 3' nos, nopaliinisyntetaasi geenin lopetusalue; pnos, nopaliinisyntetaasin geeninsäätelyalue; ntp2, kanamysiiniresistenssigeeni, geenin avulla erotetaan kasvit, joissa geeninsiirto on onnistunut; LB ja RB, raja-alueet, jotka rajoittavat kasviin siirtyvän DNA-alueen. b) Siirtogeeniset sinimailaset tuottavat *FaeG* rokoteproteiinia 1% kaikesta sisältämästään liukoisesta proteiinista. Yläkuvassa on esitetty kasvien kokonaisproteiinivärväys, alakuvassa vastaavat näytteet on värjätty *FaeG* vasta-ainetunnistuksen avulla. Näytteet 1-2, 0.1 ja 0.5 µg ETEC bakteerista puhdistettua *FaeG* proteiinia; näyte 3, liukoiset proteiinit tuoreesta siirtogeenisestä sinimailasesta; näyte 4, liukoiset proteiinit tuoreesta ei-siirtogeenisestä sinimailasesta; näyte 5, liukoiset proteiinit kuivatusta kaksi vuotta säilytetystä siirtogeenisestä sinimailasesta. Näytteet 3-5 sisälsivät 20 µg kasvin liukoista kokonaisproteiinia. Proteiinien molekyylimassa on ilmaistu kilodaltonneissa.

ELISA, F4 vasta-aineet seerumissa

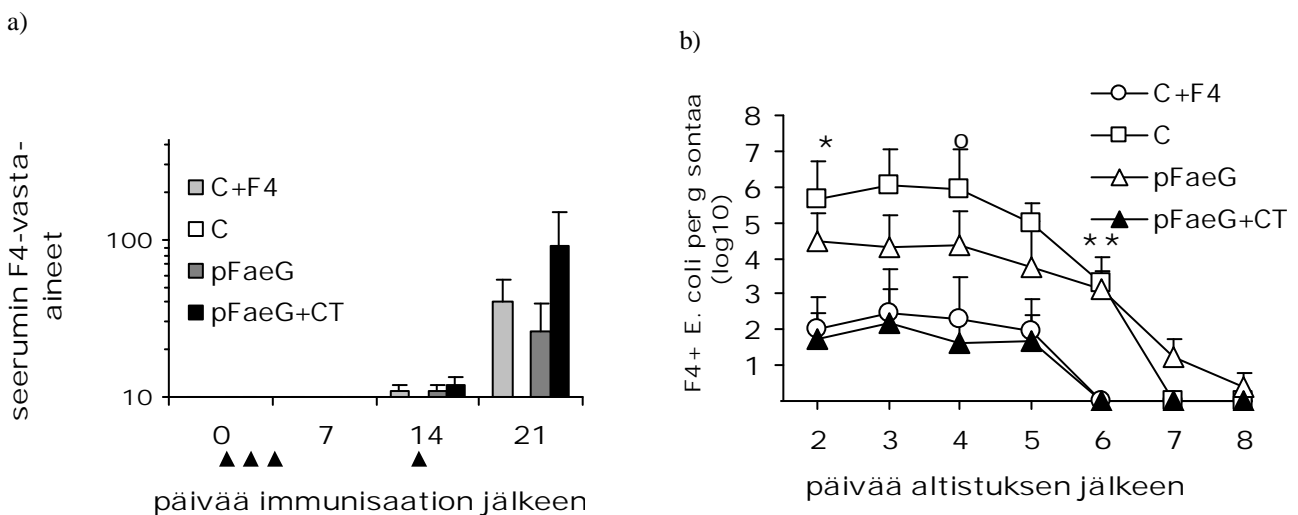
Kaikki kokeessa käytetyt porsaat olivat vieroitettaessa F4 seronegatiivisia. F4-fimbrilla tai pFaeG proteiinilla rokotetuissa ryhmissä ensimmäiset F4-vasta-aineet havaittiin kaksi viikkoa ensimmäisten immunisaatioiden jälkeen (14 päivää primaari-immunisaatiosta, ppi) (kuva 2a). Viikko tehosteimmunisaation jälkeen (21 ppi) F4 ja pFaeG+CT ryhmien F4-vasta-aineet olivat selvästi koholla. pFaeG ryhmässä nousu oli vähäisempää. Pelkkää kontrollisinimailasta saaneen ryhmän eläimistä ei havaittu F4 vasta-aineita koko kokeen aikana. Vaikka koeporsaiden veren seerumista havaitut F4-vasta-ainemäärät eivät olleet tilastollisesti merkittäviä, voidaan tuloksista alustavasti päätellä, että sinimailasessa tuotettu ja oraalisesti annettu pFaeG alayksikköproteiini on immunogeeninen porsaille. Samanaikaisesti annettu koleratoksiini näyttää tehostavan pFaeG proteiinin antigeenisuutta.

ETEC erityis altistuksen jälkeen

F4-fimbria-ryhmä sekä koleratoksiinilla tehostettu pFaeG rokoteproteiiniryhmä erittivät altistuksen jälkeen selvästi negatiivista kontrolliryhmää (C) vähemmän ETEC bakteereita (kuva 2b). Päivinä 2,4 ja 6 altistuksen jälkeen koleratoksiinilla tehostettu *FaeG* rokoteproteiini vähensi ulosteessa erittyvien

bakteerien määrää ja erityksen kestoa tilastollisesti merkitsevästi (päivät 2,4 ja 6 altistuksen jälkeen, $p=0.041$, 0.062 ja 0.002) tavallista sinimailasta saaneeseen kontrolliryhmään verrattuna. Myös pelkkää FaeG -rokoteproteiinia saaneen ryhmän bakteerieritys oli ensimmäisinä altistuksen jälkeisinä päivinä kontrolliryhmää vähäisempää, mutta erot eivät olleet tilastollisesti merkitseviä.

Yhteenvetona tuloksista voidaan todeta, että FaeG proteiini säilyttää antigeeniset ja immunogeeniset ominaisuutensa myös sinimailasessa tuotettuna. Tässä tutkimuksessa käytetyllä annoksella ja aikataululla annettuna pelkkä pFaeG proteiini ei saanut aikaan riittävän voimakasta paikallista vasta-ainetuotantoa suolistossa, jotta se olisi pystynyt merkittävästi ehkäisemään ETEC bakteereiden kiinnittymistä porsaiden ohutsuolen reseptoreihin. Sinimailasessa tuotetun pFaeG-proteiinin immunogeenisuutta pystyttiin kuitenkin tehostamaan merkittävästi, kun porsaille annettiin samanaikaisesti pieni annos koleratoksiinia. Tämä tukee aiempia tuloksia (Verdonck ym. 2005a), joissa bakteerissa tuotetun FaeG proteiinin ETEC-infektioita suojaavaa vaikutusta pystyttiin tehostamaan koleratoksiinilla (F4-fimbria toimii tehokkaasti myös ilman koleratoksiinia). F4 fimbriat (Verdonck ym. 2005b) tai FaeG proteiini (Verdonck, 2004) on todettu toimivan myös kantajaproteiininä, joka saa aikaan paikallisen vasta-ainetuotannon myös siihen liitetyjä ylimääräisiä peptidejä vastaan. Tämä lisää FaeG proteiinin käyttömahdollisuuksia tulevaisuuden syötävissä rokotteissa.



Kuva 2. a) Koeporsaidet keskimääräiset (\pm keskiarvon keskivirhe) verenseerumin F4-spesifiset vasta-aineet eri aikapisteissä rokoteproteiininkäsittelyiden (mustat nuolet, päivät 0, 1, 2 ja 14) jälkeen. b) Rokotuskäsittely seurauksen ETEC altistuksen (päivä 21) jälkeen sonnassa erittyvät keskimääräiset (\pm keskiarvon keskivirhe) ETEC bakteerimäärät. Symbolit o, $p<0,10$; *, $p<0,05$ ja **, $p<0,01$ kuvaavat tilastollisesti merkitseviä eroja pFaeG+CT ja C ryhmien välillä.

Johtopäätökset

Vaikka koleratoksiinilla tehostettu FaeG rokoteproteiini pystyi tässä ja aiemmissa tutkimuksissa (Verdonck ym. 2004a; 2005a) estämään ETEC-bakteerien kolonisaatiota ja vähentämään sonnassa erittyvien ETEC-bakteerien määrää, se ei kuitenkaan pystynyt suojaamaan vierotusporsaita täydellisesti edes homologista F4 ETEC infektiota vastaan. F4 ETEC kannat voidaan jakaa kolmeen erilaiseen alatyypin (F4ab, F4ac, F4ad), jotka kiinnittyvät ainakin osittain erilaiseen reseptoriin porsaiden ohutsuolessa. Tässä tutkimuksessa käytetty FaeG rokoteproteiini on ac-tyyppiä, joka on kolmesta F4 tyypistä yleisin. Verdonck ym. (2004b) on todennut F4-ac tyyppin fimbriat konservoituneiksi, ja että F4ac-tyypin vasta-aineet estävät laajakirjoisesti F4ac-tyypin ETEC kantoja kiinnittymästä porsaiden suolinukkaan (Verdonck, 2004). Siitä pystyvätkö F4ac vasta-aineet suojaamaan F4ab- ja F4ad-tyypin ETEC infektiolta on olemassa ristiriitaista tietoa (Parry ja Potter 1978, Wilson ja Hohmann 1974) ja lisätutkimuksia tarvitaan. Lisäksi on olemassa vierotusripulia aiheuttavia ETEC-kantoja, jotka käyttävät kiinnittymiseen muuntotyypisiä fimbrioita, joita vastaan F4 vasta-aineet ovat tehottomia. Tehokkaasti F4 ETEC vierotusripuli-infektiolta suojelevan syötävän rokotteen kehittämiseksi tarvitaankin lisää tietämystä F4-fimbriat ja suolinukan reseptorin rakenteesta,

sekä laajoja kliinisiä tutkimuksia. Ehkä tulevaisuudessa FaeG proteiiniin pystytään liittämään peptidejä jotka ehkäisevät myös muiden fimbriatyyppeiden kiinnittymistä.

FaeG on lupaava rokoteproteiinikandidaatti, joka aktivoi limakalvovälitteisen puolustusjärjestelmän ja pystyy tarvittaessa toimimaan myös kantajana heterologisille peptideille. Jatkossa on tarkoitus tuottaa kasvissa FaeG rokoteproteiinia, joka pystyisi polymerisoitumaan fimbrian kaltaiseksi rakenteeksi, jolloin koleratoksiinia ei tarvittaisi tehosteena. Tämä tutkimus osoittaa, että kasveissa voidaan tuottaa tehokkaasti rokoteproteiineja myös tulevaisuudessa tarvittavia laajoja kliinisiä tutkimuksia varten. Vieroitusripulin ehkäisemisen lisäksi projektimme tutkimustuloksia voidaan tulevaisuudessa hyödyntää laajemminkin kehiteltäessä uusia kasviperäisiä tuotteita niin kotieläinten kuin ihmisten terveydenhuoltoon.

Kirjallisuus

Bakker D., Willemsen P.T.J., Simons L.H., van Zijderveld F.G. and de Graaf F.K. 1992. Characterization of the antigenic and adhesive properties of FaeG, the major subunit of K88 fimbriae. *Mol Microbiol* 6:247-255

Bertschinger H.U. & Fairbrother J.M. 1999. *Escherichia coli* infections. In **B.E. Straw, S. D’Allaire, W.L. Mengeling & D.J. Taylor**, (eds), *Diseases of Swine*, Ed 8. Iowa State University Press, Iowa, pp 431-454

Cowart R.P. 1995. *An Outline of Swine Diseases: a Handbook*, pp 54-56

Joensuu J.J., Kotiaho M., Riipi T., Snoeck V., Palva E.T., Teeri T.H., Lång H., Cox E., Goddeeris B.M. and Niklander-Teeri V. 2004. Fimbrial subunit protein FaeG expressed in transgenic tobacco inhibits the binding of F4ac enterotoxigenic *Escherichia coli* to porcine enterocytes. *Transgenic Res* 13:295-8.

Joensuu J.J., Verdonck F., Ehrström A., Peltola M., Siljander-Rasi H., Nuutila AM., Oksman-Caldentey K-M., Teeri T.H., Cox E., Goddeeris B.M., Niklander-Teeri V. 2006. F4 (K88) fimbrial adhesin FaeG expressed in alfalfa reduces F4+ enterotoxigenic *Escherichia coli* excretion in weaned piglets. *Vaccine* in press

Parry S.H. & Porter P., 1978. Immunological aspects of cell membrane adhesion demonstrated by porcine enteropathogenic-*Escherichia coli*. *Immunology* 34:41-49

Van den Broeck W.V., Cox E. and Goddeeris B.M. 1999a. Receptor-specific binding of purified F4 to isolated villi. *Vet Microbiol* 68 255-263

Van den Broeck W.V., Cox E. and Goddeeris B.M. 1999b. Induction of immune responses in pigs following oral administration of purified F4 fimbriae. *Vaccine* 17:2020-2029

Van den Broeck W.V., Cox E. and Goddeeris B.M. 1999c. Receptor-dependent immune responses in pigs after oral immunization with F4 fimbriae. *Infect Immun* 2:520-526

Van den Broeck W.V., Cox E., Oudega B. and Goddeeris B.M. 2000. The F4 fimbrial antigen of *Escherichia coli* and its receptors. *Vet Microbiol* 71:223-244

Verdonck F., 2004. F4 fimbriae and its adhesion FaeG as a mucosal carrier for a heterologous antigen of peptide. *Ph.D. thesis*, Faculty of Veterinary Medicine, Gent University, Belgium, ISBN 90-5864-053-1

Verdonck F., Cox E., Van der Stede Y., & Goddeeris B.M. 2004a. Oral immunization of piglets with recombinant F4 fimbrial adhesin FaeG monomers induces a mucosal and systemic F4-specific immune response. *Vaccine* 22:4291-4299.

Verdonck F., Cox E., Schepers E., Imberechts H., Joensuu J.J., & Goddeeris B.M. 2004b. Conserved regions in the sequence of the F4 (K88) fimbrial adhesin FaeG suggest a donor strand mechanism in F4 assembly. *Vet. Microbiol.* 102:215-225

Verdonck, F., Snoeck V., Goddeeris B.M., & Cox E. 2005a. Cholera toxin improves the F4(K88)-specific immune response following oral immunization of pigs with recombinant FaeG. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 103:21-29

Verdonck, F., De Hauwere V., Bouckaert J., Goddeeris B.M., & Cox E. 2005b. Fimbriae of enterotoxigenic *Escherichia coli* function as a mucosal carrier for a coupled heterologous antigen. . J Control Release 104:243-58.

Wilson M.R. & Hohmann, A.W. 1974. Immunity to *Escherichia coli* in pigs: adhesion of enteropathogenic *Escherichia coli* to isolated intestinal epithelial cells. Infect. Immun. 10:776-782