



Faculteit Bio-ingenieurswetenschappen

Academiejaar 2015 – 2016

Rol van CD13-gemedieerde signalisatie in de opbouw
van mucosale immuniteit

Sanne Van Campenhout

Promotoren: Prof. dr. Daisy Vanrompay

Dr. Bert Devriendt

Tutor: Dr. Bert Devriendt

Masterproef voorgedragen tot het behalen van de graad van
Master in de bio-ingenieurswetenschappen: Cel- en genbiotechnologie



Faculteit Bio-ingenieurswetenschappen

Academiejaar 2015 – 2016

Rol van CD13-gemedieerde signalisatie in de opbouw van mucosale immuniteit

Sanne Van Campenhout

Promotoren: Prof. dr. Daisy Vanrompay

Dr. Bert Devriendt

Tutor: Dr. Bert Devriendt

Masterproef voorgedragen tot het behalen van de graad van
Master in de bio-ingenieurswetenschappen: Cel- en genbiotechnologie

De auteur en de promotoren geven de toelating deze masterproef voor consultatie beschikbaar te stellen en delen van de masterproef te kopiëren voor persoonlijk gebruik. Elk ander gebruik valt onder de beperkingen van het auteursrecht, in het bijzonder met betrekking tot de verplichting de bron uitdrukkelijk te vermelden met het aanhalen van resultaten uit deze masterproef.

The author and promotors give permission to consult and copy parts of this project for personal use only. Any other use falls under the limitations of copyright, specifically to the obligations to explicitly mention the source when citing parts of this project.

Juni 2016

De promotoren

De auteur

Prof. dr. Daisy Vanrompay

Sanne Van Campenhout

Dr. Bert Devriendt

Woord vooraf

Deze masterproef, omtrent de rol van CD13-gemedieerde signalisatie in de opbouw naar mucosale immuniteit, werd uitgevoerd in het kader van een groter project rond orale vaccinatie tegen ETEC bij biggen aan de vakgroep immunologie van de Faculteit Diergeneeskunde in Merelbeke. Het werd geschreven met oog op het behalen van mijn masterdiploma in de bio-ingenieurswetenschappen: Cel- en genbiotechnologie aan de universiteit van Gent.

Tussen alle mogelijke thesisonderwerpen werd mijn aandacht getrokken naar deze masterproef door de focus op cellulaire signalisatieprocessen en de mogelijkheid bij te dragen aan kennis waarmee potentieel een nieuwe vaccinatiemethode ontwikkeld kan worden. Ook de grote verscheidenheid aan technieken waarmee ik in aanraking zou komen sprak mij aan.

Bij deze wil ik graag mijn tutor Bert bedanken voor de begeleiding en ondersteuning en de talrijke uren die hij aan mijn thesis besteed heeft. Verder wil ik mijn promotoren bedanken om mij de kans te bieden mij in dit onderwerp te verdiepen. Ook de mensen van het labo wil ik vermelden, en in het bijzonder Charlotte, om voor de hybridomacellen te zorgen die veel antilichamen voor mijn onderzoek hebben geproduceerd.

Inhoud

| | |
|--|-----------|
| 1. Inleiding | 1 |
| 2. Literatuurstudie | 2 |
| 2.1. Enterotoxigene <i>Escherichia coli</i> | 2 |
| 2.1.1. <i>Escherichia coli</i> | 2 |
| 2.1.2. ETEC infecties bij de mens..... | 2 |
| 2.1.3. Neonatale diarree en spendiarree bij het varken | 3 |
| 2.2. ETEC behandeling..... | 4 |
| 2.2.1. ETEC behandeling bij de mens | 4 |
| 2.2.2. ETEC behandeling bij varkens..... | 4 |
| 2.3. Vaccinatie | 6 |
| 2.3.1. ETEC vaccinatie bij de mens | 6 |
| 2.3.2. ETEC vaccinatie bij varkens..... | 7 |
| 2.3.2.1. Parenterale vaccins..... | 8 |
| 2.3.2.2. Orale vaccinatie | 9 |
| 2.4. Aminopeptidase N (CD13)..... | 16 |
| 2.4.1. Locatie | 16 |
| 2.4.2. Structuur..... | 16 |
| 2.4.3. Functie | 17 |
| 2.4.3.1. Enzymatische activiteit..... | 17 |
| 2.4.3.2. Receptor voor adhesie, endocytose en fagocytose | 18 |
| 2.4.3.3. Signaaltransductie | 19 |
| 3. Materiaal en methode | 22 |
| 3.1. Onderhouden van de IPEC-J2-APN cellijn | 22 |
| 3.2. APN expressie op de IPEC-J2-APN cellijn..... | 23 |
| 3.2.1. Opzuivering van de monoklonale antilichamen..... | 23 |
| 3.2.2. Immunodetectie door anti-APN polyklonale Ig met behulp van flowcytometrie..... | 24 |
| 3.2.3. Immunodetectie met behulp van microscopie | 25 |
| 3.3. APN enzymatische activiteit test..... | 26 |
| 3.4. ERK fosforylatie door <i>crosslinking</i> van APN | 28 |
| 3.4.1. <i>Crosslinking</i> van APN | 28 |
| 3.4.2. SDS-PAGE en Western blotting | 29 |
| 3.5. ERK fosforylatie na opname van APN-gerichte micropartikels in darmepitheelcellen..... | 31 |
| 3.5.1. Koppeling van monoklonale antilichamen aan fluorosferen | 31 |

| | | |
|-----------|---|-----------|
| 3.5.2. | Koppelingsefficiëntie | 32 |
| 3.5.3. | Functionaliteit van de anti-APN micropartikels | 33 |
| 3.5.3.1. | Flowcytometrie | 33 |
| 3.5.3.1. | Microscopie | 34 |
| 3.5.4. | ERK fosforylatie door binding van anti-APN micropartikels..... | 34 |
| 4. | Resultaten | 35 |
| 4.1. | Doelstelling..... | 35 |
| 4.2. | APN expressie door de IPEC-J2-APN cellijn | 35 |
| 4.3. | APN-specifieke mAbs inhiberen de enzymatische activiteit van APN niet | 37 |
| 4.4. | ERK fosforylatie door <i>crosslinking</i> van APN | 39 |
| 4.5. | ERK fosforylatie in darmepitheelcellen na opname van APN-gerichte micropartikels..... | 41 |
| 5. | Discussie..... | 47 |
| 6. | Algemene conclusies..... | 50 |
| 7. | Toekomstperspectieven | 51 |
| 8. | Referenties | 52 |
| 9. | Bijlagen | 62 |

Lijst van afkortingen

| | |
|----------|--|
| A | Oppervlakte |
| AF | AlexaFluor |
| APC | Antigeen-presenterende cellen |
| APC | Allophycocyanine |
| APN | Aminopeptidase N |
| APS | Ammonium persulfaat |
| ASC | Antilichaam secreterende cellen |
| BCA | Bicinchoninezuur |
| BSA | Bovien serum albumine |
| CCov | Canien enterisch coronavirus |
| CT | Cholera toxine |
| CTB | Cholera toxine B subeenheid |
| DABCO | 1,4-diazabicyclo[2.2.2]octaan |
| DAEC | Diffuus adherente <i>E. coli</i> |
| DAMP | <i>Danger-associated molecular pattern</i> |
| DC | Dendritische cellen |
| DMEM/F12 | Dulbecco's gemodificeerd Eagle's medium: nutriënten mix F-12 |
| dmLT | Dubbel gemuteerd hitte-labiel enterotoxine |
| DMP | Dimethyl pimelimidaat |
| EAEC | Enteroaggregatieve <i>E. coli</i> |
| EDC | 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide |
| EDTA | Ethyleendiaminetetra-azijnzuur |
| EGF | Epidermale groeifactor |
| EHEC | Enterohemorragische <i>E. coli</i> |
| EIEC | Enteroinvasieve <i>E. coli</i> |
| ELISA | <i>Enzyme-linked immuno sorbent assay</i> |
| EPEC | Enteropathogene <i>E. coli</i> |
| ERK | Extracellulair signaal-gereguleerd kinase |
| ETEC | Enterotoxigene <i>E. coli</i> |
| FAE | Follikel-geassocieerd epitheel |
| FcRn | Neonatale Fc-receptor |
| FCS | <i>Foetaal kalf serum</i> |

| | |
|---------------------|--|
| FcγR | Fcγ receptoren |
| FSC | Voorwaartse verstrooiing |
| H | Hoogte |
| HCoV229E | Humaan respiratoir coronavirus 229E |
| HRP | Horseradish peroxidase |
| I | Inhibitie |
| IFN | Interferon |
| Ig | Immunoglobuline |
| IgA | Immunoglobuline A |
| IgG | Immunoglobuline G |
| IgM | Immunoglobuline M |
| IPEC | Intestinale varkensepitheelcellen |
| Irr | Irrelevant IgG |
| Iso | Isotype IgG |
| ITS | Insuline/transferrine/selenium |
| KT | Kamertemperatuur |
| LPS | Lipopolysachariden |
| LT | Hitte-labele enterotoxines |
| LTB | Hitte-labiel enterotoxine B subeenheid |
| mAb(s) | Monoklonaal antilichaam |
| M-cellen | <i>Microfold</i> cellen |
| MES | 2-(N-morpholino)ethaansulfonzuur |
| MM | MagicMark |
| NC | Negatieve controle |
| pAb(s) | Polyklonaal antilichaam |
| PAGE | Polyacrylamidegelelelectroforese |
| PBS | Fosfaatgebufferde zoutoplossing |
| PE | R-phycoerythrine |
| PEG-NH ₂ | Polyethyleenglycolamine |
| pERK | Gefosforyleerd ERK |
| pPPA | Poly(2-propenal, 2-propeenzuur) |
| PVDF | Polyvinylideenfluoride |
| RECK | Reversion-inducing cysteine-rich proteïn with Kazal motifs |
| RFC | <i>Relative fold change</i> |

| | |
|-----------|--|
| RPMI | <i>Roswell Park Memorial Institute medium</i> |
| SDS | Natriumdodecylsulfaat |
| SIgA | Secretorisch immunoglobuline A |
| SSC | Zijwaartse verstrooiing |
| ST | Hitte-stabiele enterotoxines |
| Sulfo-NHS | Sulfo-N-hydroxysuccinimide |
| TEMED | Tetramethylethyleendiamine |
| TGEV | Overdraagbaar porcien gastro-enteritis virus |
| TLR4 | <i>Toll-like</i> receptor 4 |
| TNF | <i>Tumor necrosis factor</i> |
| VHH | Variabele domein van lama zware keten antilichamen |

Samenvatting

Orale vaccinatie heeft veel potentieel om infecties door darmpathogenen, die specifiek een mucosale immuunrespons vragen, tegen te gaan. Vooraleer dit in de praktijk gebracht kan worden, moeten nog een aantal obstakels, waaronder de lage opname van het antigeen door het darmepitheel, overwonnen worden. Een veelbelovende techniek om deze opname te verhogen, is het selectief richten van antigenen naar aminopeptidase N (APN), een apicale receptor aanwezig op het intestinaal epitheel van de dunne darm. Eerder werd aangetoond dat oraal toegediende APN-gerichte antilichamen opgenomen kunnen worden door het intestinaal epitheel en een immuunrespons kunnen induceren. Aangezien intestinaal APN functioneert als enzym bij de spijsvertering en dit proces niet verstoord mag worden, werden enkele kandidaat antilichamen getest op hun mogelijke interferentie met de enzymatische activiteit van APN. Er werd geen antilichaam-gemedieerde inhibitie vastgesteld. In humane monocyten activeert *crosslinking* van APN signaaltransductiewegen met ERK1/2 fosforylatie tot gevolg. Aangezien er nog niets geweten is over de signaaltransductie in epitheelcellen, werd de ERK1/2 fosforylatie in detail bekeken in een intestinale epitheelcellijn. Er werd slechts een lage ERK1/2 fosforylatie vastgesteld en meer herhalingen zullen nodig zijn om dit te bevestigen. Verder werd de opname van APN-gerichte polystyreen micropartikels door intestinale epitheelcellen nagegaan. Hiervoor werden deze micropartikels gefunctionaliseerd met APN-specifieke antilichamen. Na 6 uur incubatie werd een significante APN-gemedieerde opname vastgesteld in de intestinale epitheelcellen. Ook de ERK1/2 fosforylatie na *crosslinking* door de APN-gerichte partikels werd nagegaan, maar slechts kleine verschillen werden gedetecteerd. Meer herhalingen zouden een beter beeld kunnen geven van de APN-gemedieerde ERK fosforylatie in intestinale epitheelcellen.

1. Inleiding

E. coli is een veelvoorkomende darmbacterie, die meestal niet pathogeen is voor de gastheer. Er zijn echter ook pathogene stammen, waaronder enterotoxigene *E. coli* (ETEC) die ernstige diarree veroorzaakt. Bij varkens is deze bacterie vooral gevaarlijk net na de geboorte en een paar dagen na de lactatie, aangezien het immuunsysteem van het dier tijdens deze periode nog niet voldoende ontwikkeld is. Om de biggen te beschermen tegen deze pathogeen wordt gezocht naar een geschikt vaccin. In deze masterproef worden de gevolgen en behandeling van ETEC infecties bij de mens en het varken besproken, gevolgd door een overzicht van de mogelijke vaccinatiemethoden. Aangezien ETEC de darm koloniseert is een beschermende mucosale immuunrespons gewenst. Dit is het best te verwezenlijken via orale vaccinatie, mits een oplossing gevonden wordt voor bepaalde probleempunten, waaronder de lage opname-efficiëntie van orale vaccins door het darmepitheel. Deze hindernis kan overwonnen worden door de vaccin antigenen selectief te richten naar CD13, ook gekend als aminopeptidase N (APN), aanwezig op het darmepitheel. Darmepitheelcellen zijn namelijk in staat om CD13-gerichte antilichamen op te nemen en doorheen de epitheellaag te transporteren, waarna een mucosale immuunrespons opgewekt wordt. De eigenschappen van dit eiwit zullen verder in detail besproken worden.

In het praktisch gedeelte van deze masterproef zal eerst onderzocht worden of de antilichamen niet interfereren met de normale werking van CD13 in de darm en veilig zijn voor gebruik bij vaccindoeleinden. Ondanks de veelbelovende kenmerken van CD13 is er nog niet veel geweten over de signaaltransductie die gepaard gaat met CD13-gemedieerde transcytose in darmepitheelcellen. Het doel is om meer kennis te verkrijgen over welke eiwitten hierin een belangrijke rol spelen. De eventuele CD13-gemedieerde activatie van het extracellulair signaal-gereguleerd kinase (ERK) werd geanalyseerd. Een derde doelstelling is het aantonen van opname van CD13-gerichte polystyreen partikels door intestinale epitheelcellen. Tenslotte worden er nog mogelijke technieken besproken waarmee de CD13-gemedieerde signaaltransductie verder onderzocht kan worden.

2. Literatuurstudie

2.1. Enterotoxigene *Escherichia coli*

2.1.1. *Escherichia coli*

E. coli is bij de mens één van de meest voorkomende facultatief anaerobe bacterie in de darm [1]. In de meeste gevallen is deze bacterie onschadelijk. Er zijn echter ook pathogene *E. coli* stammen, die diarree, sepsis, meningitis of infecties van de urinewegen kunnen veroorzaken. Stammen die aanleiding kunnen geven tot diarree zijn enterotoxigene *E. coli* (ETEC), enteroinvasieve *E. coli* (EIEC), diffuus adherente *E. coli* (DAEC), enteropathogene *E. coli* (EPEC), enterohemorragische *E. coli* (EHEC) en enteroaggregatieve *E. coli* (EAEC) [1]. Deze stammen bevatten specifieke kolonisatiefactoren of fimbriae, waarmee ze zich kunnen vasthechten aan de mucosa van de dunne darm en op die manier de darm kunnen koloniseren [2]. Deze fimbriae bepalen de species specificiteit [3]. In deze masterproef wordt de focus gelegd op ETEC, dat gekend is als de oorzaak van diarree bij mens en dier. Bij humane ETEC stammen is er een grotere diversiteit in fimbriae (meer dan 20) dan bij dier ETEC stammen (een 8-tal: F4, F5, F6, F17, F18, F41, F42, F165) [4, 5]. De *E. coli* bacteriën die onderverdeeld worden in het ETEC pathotype bevatten minstens één enterotoxine uit twee gedefinieerde groepen: de hitte-stabiele (ST) en de hitte-labiele (LT) enterotoxines [6]. Deze enterotoxines worden geproduceerd na kolonisatie van de bacterie op het darmoppervlak en verstoren de water- en elektrolytenbalans van de enterocyten [7]. Hierdoor ontstaat een waterige diarree.

2.1.2. ETEC infecties bij de mens

E. coli kan bij de mens diarree veroorzaken met ernstige gevolgen voor verzwakte individuen [8]. Globaal wordt geschat dat meer dan 210 miljoen mensen jaarlijks besmet raken en 380 000 mensen jaarlijks sterven aan een ETEC infectie [9]. De meeste en ook meest ernstige infecties komen voor bij kinderen onder de 5 jaar, die in regio's leven waar ETEC endemisch is [8]. In deze regio's ondervinden kinderen ongeveer twee tot vijf keer ETEC-gerelateerde diarree tijdens hun eerste drie levensjaren [10]. Ook reizigersdiarree is een gekend fenomeen. Er zijn jaarlijks ongeveer 10 miljoen gevallen van ETEC-gerelateerde diarree bij militairen en reizigers naar Afrika, Azië en Latijns-Amerika [10]. Een aantal van deze patiënten (10-14%) ontwikkelt na herstel het prikkelbare darm syndroom. Af en toe worden infecties op cruiseschepen of in geïndustrialiseerde landen waargenomen. Besmetting gebeurt meestal enerzijds door het consumeren van besmet voedsel of water, of anderzijds door feco-oraal of direct contact met een besmet persoon of dier.

2.1.3. Neonatale diarree en speendiarree bij het varken

Biggen en kalveren zijn vatbaar voor ETEC infecties, die neonatale diarree en speendiarree veroorzaken [2]. Diarree bij het varken komt vaak voor net na de geboorte, ook wel neonatale diarree genoemd, of een paar dagen na de lactatie, ook wel speendiarree genoemd [4]. Tijdens de lactatie is de vatbaarheid van de big voor ETEC infectie afhankelijk van de antilichamen die het via de moedermelk meekrijgt en de aanwezigheid van receptoren op het darmepitheel die bepaalde kolonisatiefactoren herkennen [4]. Op het merendeel van de bedrijven worden de zeugen intramusculair gevaccineerd tegen ETEC. De zeug kan echter ook resistent zijn, waardoor ze geen infectie doormaakt en haar immuunsysteem bijgevolg niet blootgesteld wordt aan de pathogeen. Hierdoor bevat de moedermelk niet de juiste antilichamen, wat de big vatbaar maakt voor neonatale diarree door ETEC infectie. Neonatale diarree wordt veroorzaakt door ETEC stammen die F4, F5, F6 of F41 fimbriae tot expressie brengen [4, 11].

Speendiarree vindt plaats wanneer de lactatie stopt en dus de bescherming via de maternale immuniteit wegvalt [4]. Daarom zijn de biggen opnieuw gevoelig voor infecties door enteropathogenen. Bovendien ondervinden de biggen stress doordat ze weggenomen worden bij de zeug en door de overgang van melk naar vast voedsel. Deze stress zorgt voor een disruptie van de microbiota van de darm en een verstoring van de werking van het immuunsysteem, wat de biggen vatbaarder maakt. Speendiarree is de oorzaak van grote economische verliezen door de sterfte van biggen, maar ook door een vertraagde groei bij de biggen voor ze een gewicht van 25 kg bereikt hebben en een verhoogd geneesmiddelengebruik om deze infecties te behandelen [12]. Ongeveer 1% van alle biggen sterft aan deze ziekte, terwijl 20-50% geïnfecteerd raakt [13]. Op jaarbasis komt dit overeen met ongeveer 106 500 biggen in België die aan de infectie sterven. Dit betekent een verlies van ongeveer 3 miljoen euro per jaar. Indien ook de extra kosten door de vertraagde groei en de extra geneesmiddelen meegerekend worden, vormt dit een totaalbedrag van 7 miljoen euro per jaar.

Speendiarree kan veroorzaakt worden door verschillende pathogenen, waaronder ETEC, maar ook door het rotavirus, *Salmonella sp* en in beperkte gevallen door *Brachyspira sp* [12]. ETEC blijkt echter de grootste oorzaak te zijn. Voornamelijk stammen die F4 of F18 fimbriae bevatten veroorzaken speendiarree [14]. ETEC kan de gastheer infecteren doordat het kan binden aan bepaalde receptoren (glycoproteïnen) op het darmepitheel. Naarmate het dier ouder wordt, zijn er andere receptoren aanwezig die andere fimbriae herkennen [4], waardoor het dier vatbaar wordt voor infecties met andere ETEC stammen. In pasgeboren biggen zijn er nog geen receptoren voor F18 fimbriae aanwezig, maar is er wel een grote hoeveelheid receptoren voor F4 fimbriae [4]. Nadien daalt de hoeveelheid F4 fimbriae receptoren en blijft min of meer constant tijdens en na het spenen. Vanaf deze periode zijn er ook F18 fimbriae receptoren aanwezig. Het aantal F5 fimbriae receptoren daalt gradueel naarmate het dier ouder wordt, terwijl de hoeveelheid receptoren voor F6 fimbriae net stijgt. Deze stijging is zo

groot dat de receptoren worden afgescheiden in het lumen van de darm en binden aan bacteriën, zodat deze de darm niet meer kunnen koloniseren. Hoe het aantal receptoren voor F41 fimbriae verandert tijdens het ouder worden van de biggen is nog niet helemaal gekend.

2.2. ETEC behandeling

2.2.1. ETEC behandeling bij de mens

ETEC besmetting kan deels vermeden worden door een goede hygiëne na te streven na contact met dieren of bij het verwerken van voedsel [8]. Indien er toch een besmetting plaatsvindt, is het belangrijk om vocht- en elektrolytenverlies te voorkomen. Bij de inheemse bevolking uit de regio's waar ETEC infecties het grootste probleem vormen, wordt meestal niet behandeld met antibiotica. De reden hiervoor is dat deze hier niet altijd voorhanden zijn, veilig moeten zijn voor gebruik door kinderen en antibioticaresistentie kan optreden [1].

Reizigers in streken waar ETEC infecties vaak voorkomen en die besmetting willen voorkomen worden aangeraden om potentieel besmet voedsel en water te vermijden en twee keer per dag 200 mg of één keer per dag 600 mg rifaximine, een semisyntetisch antibioticum gebaseerd op het macrolide rifamycine, te nemen [15]. Dit antibioticum is een macrolactam dat de RNA-synthese in gevoelige bacteriën inhibeert door een interactie met het bacterieel DNA-afhankelijk RNA polymerase [16]. Wanneer er toch diarree optreedt, kan er behandeld worden met antibiotica zoals rifaximine, fluoroquinolonen (interactie met DNA gyrase) of het macrolide azithromycine (interactie met bacteriële ribosomen), waardoor de diarree na 24 uur ophoudt [15]. Rifaximine kan niet gebruikt worden bij bloederige diarree die gepaard gaat met koorts, omdat het niet via de darmwand naar de bloedcirculatie gaat [16].

2.2.2. ETEC behandeling bij varkens

ETEC infecties bij varkens kunnen behandeld worden door antibiotica die oraal toegediend worden of via een injectie [17]. Bij zuigelingen kan antibiotica in water gebruikt worden. Aangezien een ETEC infectie besmettelijk is, is het belangrijk om meteen alle dieren te behandelen die in contact komen met het besmette dier. Hierdoor stijgt de kans dat antibioticaresistenties optreden [18]. Verder worden vaak orale oplossingen toegediend die de elektrolytenbalans herstellen en zo dehydratatie kunnen controleren [17].

Voorkomen is echter meestal beter dan genezen. Door het uitbreken van antibioticaresistenties is er een zoektocht naar alternatieven om ETEC infecties te bestrijden of te voorkomen. Voorbeelden van componenten met een antimicrobiële werking zijn zink oxide en organische zuren, zoals poly(2-

propenal, 2-propeenzuur) (pPPA) [17, 19, 20]. De aanwezigheid van ZnO zorgt naar alle waarschijnlijkheid voor schade aan de microbiële celmembranen, waardoor de bacterie sterft [21]. Een nadeel is dat bacteriën ook hiertegen al resistentiemechanismen hebben ontwikkeld [22]. Aangezien een groot deel van het zink oxide terug uitgescheiden wordt via de feces, zal het toedienen van zink oxide in grote hoeveelheden bovendien het milieu vervuilen [19]. Als de ZnO-partikels echter omgeven worden door een lipidenmembranen is een lagere dosis nodig om bescherming te bekomen en is er ook minder milieuvervuiling. pPPA wordt verondersteld bacteriën te doden door *crosslinking* van bacteriële lipoproteïnen [20]. Het bestaat uit aldehydegroepen, die een antimicrobiële activiteit uitoefenen en een carboxylzuur voor de wateroplosbaarheid. Absorptie door de darm wordt tegengegaan door het grote moleculaire gewicht en een lange keten conformationele structuur.

Een andere methode om ETEC infecties te voorkomen is het toevoegen van receptor analogen of blokkers aan het voeder. Deze componenten herkennen de fimbriae op de bacteriën en verhinderen zo de bacteriële adhesie aan de darmwand. Een voorbeeld van voedingrediënten die als receptor analogen voor de F4 fimbriae van ETEC kunnen gebruikt worden zijn tarwezemelen, johannesbroodpitmeel en het caseïne glycomacropptide [23]. Het nadeel is dat de suikerstructuur die herkend wordt door de F4 fimbriae nog niet gekend is en er met deze ingrediënten enkel een daling in adhesie wordt waargenomen, waardoor het dier nog steeds geïnfecteerd kan worden. Het voordeel is dat dit natuurlijke componenten zijn die gemakkelijk aan voeder kunnen worden toegevoegd.

Een andere manier om ETEC infecties te bestrijden bestaat uit het toedienen van pre- en probiotica. Probiotica zijn ongevaarlijke bacteriën die het darmoppervlak koloniseren en door competitie vermijden dat pathogenen kunnen aanhechten, terwijl prebiotica onverteerbare moleculen zijn die de groei of activiteit van probiotische bacteriën stimuleren. Zo werd een competitieve exclusiecultuur ontwikkeld uit de microbiota van het varken [24]. Deze werd toegediend aan biggen binnen de eerste 12 uur na de geboorte en zorgde voor een verminderde kolonisatie van de darm door F6⁺ *E. coli* na een doelbewuste infectie met deze pathogeen. In een andere studie werden *Pediococcus acidilactici* en *Saccharomyces cerevisiae boulardii* als probiotica toegediend tijdens de lactatieperiode en na het spenen [25]. Na doelbewuste infectie met F4⁺ ETEC kon bij de biggen die probiotica hadden gekregen een verminderde kolonisatie van de darm door de pathogeen, en in het geval van *P. acidilactici* ook een verhoogde cytokine expressie in de darm, vastgesteld worden. Beta-1,3/1,6-glucaan (Macrogard) is een prebiotische component die de kolonisatie van F4⁺ ETEC in biggen reduceert [26, 27]. Het nadeel van pre- en probiotica is dat deze geen volledige bescherming bieden en er meestal enkel bescherming is tijdens de toedieningsperiode.

Een andere veelbelovende methode is bescherming door passieve immuniteit. Dit is mogelijk door het toedienen van pathogeen-specifieke antilichamen via het voeder of via de melk, na vaccinatie van de zeug [28]. Er wordt echter geen actieve immuniteit geïnduceerd, waardoor de dieren enkel beschermd

zijn zolang de antilichamen worden toegediend. Voorbeelden van passieve immunisatie zijn eidooiers met F4-specifiek IgY, gespreidroogd varkensplasma, immunoglobuline G (IgG) opgezuiverd uit varkensbloedplasma, of F4- en F18 gerichte nanobodies [29-33]. Een recentere ontwikkeling zijn plant-geproduceerde antilichamen, bijvoorbeeld genetisch gemodificeerde *Arabidopsis thaliana* zaadjes die anti-ETEC antilichamen bevatten [28]. De antilichamen zijn een fusie van het variabele domein van lama zware keten antilichamen (VHHs) gericht tegen F4 fimbriae en het Fc-domein van varken immunoglobuline A (IgA), en bieden bescherming aan biggen na doelbewuste infectie met F4⁺ ETEC. Op deze manier kan passieve immuniteit bekomen worden in de periode net na het spenen, wanneer actieve immunisatie moeilijker te verkrijgen is door de neutralisatie van het vaccin door glycoproteïnen en antilichamen uit de moedermelk en de tijd die nodig is om een immuunrespons op te wekken [34]. Bij sommige dieren ontbreekt de expressie van bepaalde receptoren voor *E. coli* fimbriae [17]. Deze dieren zijn beschermd tegen infectie van de overeenkomstige *E. coli* pathotypes. Het ontbreken van de receptoren wordt genetisch overgedragen en voor F4⁺ ETEC is dit een recessieve eigenschap [4]. Hierdoor wordt het mogelijk om bepaalde infecties te controleren door te kruisen. Dit is echter een tijdrovend proces dat pas na meerdere generaties verwezenlijkt kan worden en tijdens dit proces kunnen ook ongewenste eigenschappen geselecteerd worden.

2.3. Vaccinatie

2.3.1. ETEC vaccinatie bij de mens

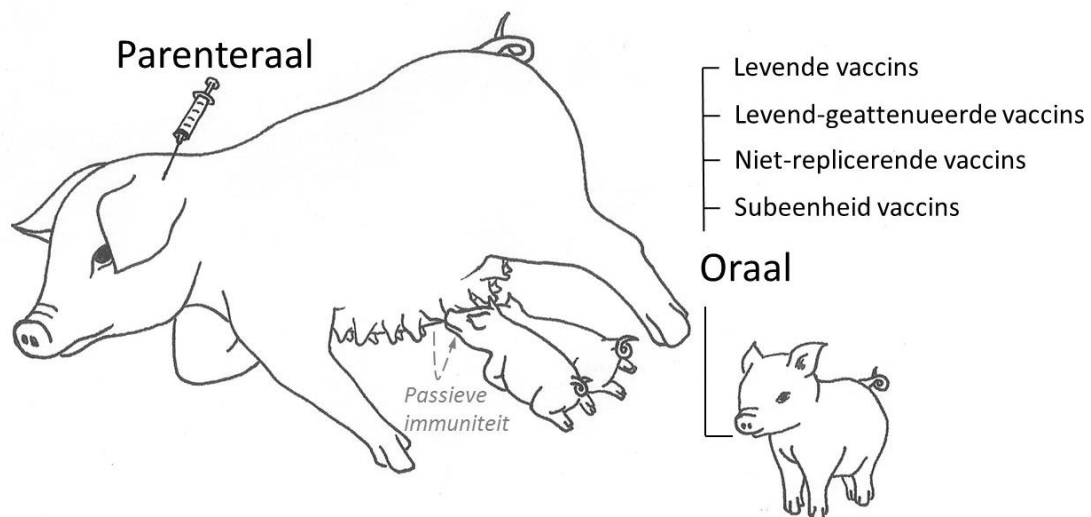
Er is momenteel nog geen commercieel vaccin beschikbaar om ETEC infecties bij de mens te bestrijden [8, 35]. Bij het orale vaccin tegen *Vibrio cholerae*, Dukoral[®], werd wel kruisbescherming tegen ETEC opgemerkt [35]. Dit is een gevolg van de gelijkaardige structuur van het cholera toxine (CT) van *V. cholerae* en het hitte-labiel enterotoxine van ETEC. Er werd echter maar een gedeeltelijke bescherming opgemerkt, waardoor de zoektocht naar een goed vaccin tegen humane ETEC infecties verdergaat. Een huidpleister met het LT toxine vertoonde belovende resultaten, maar induceerde onvoldoende bescherming in fase III klinische studies [35, 36]. Zowel levende niet-pathogene, levend geattenueerde als geïnactiveerde *E. coli* bacteriën worden gebruikt in de zoektocht naar een goed ETEC vaccin [35, 37-39]. Bepaalde koloniseringsfactoren, fimbriae van humane ETEC stammen geselecteerd op prevalentie, werden overgeëxprimeerd in de *E. coli* stammen en verschillende adjuvantia werden getest, waaronder de B subeenheid van het LT enterotoxine (LTB), de cholera toxine B subeenheid (CTB) en het dubbel gemuteerd LT toxine (dmLT). Momenteel wordt nog onvoldoende bescherming bekomen, maar er zijn nog verschillende fase I en II klinische studies en preklinische studies bezig omtrent ETEC vaccinatie [10, 35]. De meest belovende kandidaten zijn ETVAX, een mix van vier

geïnactiveerde stammen, en ACE527, een mix van drie levend geattenuerde stammen [10]. Beide bevatten het dmLT adjuvans.

Reizigersdiarree kan ook bestreden worden door passieve immunisatie door gelyofiliseerd colostrum van gevaccineerde koeien toe te dienen. Hierbij wordt geen volledige bescherming bekomen, maar de personen zijn beschermd zolang ze het vaccin nemen en kunnen op deze manier zonder problemen op reis gaan [35, 40]. Meer uitleg over passieve immuniteit volgt in de paragraaf over maternale immuniteit bij dieren.

2.3.2. ETEC vaccinatie bij varkens

Om de negatieve gevolgen van ETEC infecties bij varkens te vermijden is men op zoek naar een goed vaccin. Er zijn echter nog maar enkele vaccins beschikbaar tegen ETEC [41]. Een overzicht van de belangrijkste vaccinatiemogelijkheden wordt gegeven in Figuur 1.



Figuur 1: Overzicht van de vaccinatiemogelijkheden tegen ETEC bij het varken.

Een vaccin kan op verschillende manieren toegediend worden [42]. Dit kan op een invasieve manier, zoals injecties in de huid (subcutaan), in de spier (intramusculair) of rechtstreeks in het bloed (intravasculair). Deze toedieningswegen worden parenterale methoden genoemd. Vaccins kunnen ook op een niet-invasieve manier toegediend worden via orale inname, inhalatie in de longen (pulmonair), nasaal, rectaal, sublinguaal, De meest aantrekkelijk methode voor massavaccinatie is orale toediening. De natuurlijke infectieroute van het doelwit pathogeen is belangrijk bij de keuze voor de toedieningsweg van het vaccin. Bij pathogenen die de gastheer infecteren via de mucosa is een lokale toediening de beste methode om een beschermende mucosale immuniteit op te wekken.

2.3.2.1. Parenterale vaccins

De meest populaire toedieningsroute voor vaccins is momenteel injectie, waarbij het antigeen rechtstreeks in het bloed, de huid of een spier wordt ingespoten. Deze methode heeft zowel een praktisch als een immunologisch nadeel [43]. Ten eerste is er getraind medisch personeel nodig voor de toediening wat personeelskosten met zich meebrengt, zeker wanneer meerdere injecties nodig zijn. Verder bestaat het risico dat de naalden hergebruikt worden of gecontamineerd zijn en zo infecties kunnen veroorzaken. Op immunologisch gebied is injectie niet de meest effectieve manier om een juiste respons te verkrijgen. Om een goede bescherming te krijgen tegen darmpathogenen, zoals ETEC, zijn pathogeen-specifieke secretorisch immunoglobuline A (SIgA) antilichaam secreterende cellen (ASC) in het darmkanaal nodig [44]. Parenterale vaccins wekken een systemische respons op, die hoofdzakelijk bestaat uit antigeen-specifieke Immunoglobuline M (IgM) en IgG antilichamen [41, 45]. Deze antilichamen worden echter in tegenstelling tot SIgA afgebroken door proteasen in het darmkanaal [44].

SIgA kan de enterotoxines van pathogene micro-organismen neutraliseren, adhesiemoleculen blokkeren en antigenen en pathogenen vanuit de lamina propria terug naar het darmlumen transporteren. Verder zorgt SIgA voor agglutinatie van antigenen ter hoogte van de mucosale membranen, waardoor de antigenen die tot aan de mucuslaag geraken hierin vast komen te zitten. Hierdoor kunnen de antigenen gemakkelijk samen met deze slijmlaag uitgescheiden worden. IgG daarentegen zorgt voor agglutinatie en neutralisatie van antigenen, maar ook voor opsonisatie en complement activatie [9]. SIgA ASC worden bij parenterale vaccins onvoldoende geïnduceerd. Men probeert de hoeveelheid SIgA ASC in de mucosa te verhogen door het toevoegen van adjuvantia aan parenterale vaccins. Zo heeft onderzoek aangetoond dat co-injectie van $1\alpha,25$ dihydroxyvitamine D₃ met F4 fimbriae bij intramusculaire immunisatie van biggen resulteerde in een lichte verhoging van de antigeen-specifieke SIgA ASC in de Peyerse platen. Dit was echter onvoldoende om bescherming te bieden tegen een daaropvolgende F4⁺ ETEC infectie [46]. Recent onderzoek heeft aangetoond dat subcutane injectie van het geïnactiveerd overdraagbaar porcien gastro-enteritis virus (TGEV) vaccin samen met retinoïnezuur, een vitamine A precursor, TGEV-specifieke CD8⁺ T cellen ter hoogte van de dunne darm verhoogde [47].

Parenterale toediening is dus niet de meest geschikte methode om bescherming tegen darmpathogenen te bekomen. Het kan echter wel gebruikt worden om het moederdier te vaccineren en zo via maternale immuniteit neonatale infecties te vermijden. Er zijn al verschillende vaccins voor het moederdier op de markt. Deze worden meestal parenteraal toegediend en bevatten geïnactiveerde bacteriën met fimbriae of opgezuiverde fimbriae met of zonder het LT enterotoxine [48, 49]. Aangezien F4, F5, F6, en/of F41 fimbriae het meest prevalent zijn bij neonatale ETEC infecties

worden deze fimbriae meestal gebruikt in commerciële vaccins voor zeugen [11]. Door vaccinatie van het moederdier worden de jonge dieren beschermd door ETEC-specifieke antilichamen die zich in de moedermelk bevinden [50, 51]. Deze immuniteit is slechts passief en wanneer de lactatie stopt worden de biggen opnieuw vatbaar voor ETEC infecties. Bij herkauwers vormt enkel neonatale diarree een groot probleem, maar op dat moment kan voldoende bescherming bekomen worden door de maternale immuniteit [48]. Na het spenen zijn de dieren niet meer vatbaar voor kolonisatie van de darm door ETEC.

Door het wegvallen van de maternale immuniteit na het spenen, is een beschermende immuniteit nodig ter hoogte van het maag-darmkanaal om de biggen te beschermen tegen ETEC infecties. De meest aangewezen strategie om deze beschermende intestinale immuniteit te bekomen is via orale vaccinatie.

2.3.2.2. Orale vaccinatie

In tegenstelling tot parenterale injecties is orale immunisatie niet invasief en heeft het enkele voordelen [43]. Het is gebruiksvriendelijk, er is geen getraind personeel nodig om de vaccins toe te dienen, het verlaagt injectie-gerelateerde risico's, zoals ziekteverspreiding door hergebruik van naalden, en bevordert de therapietrouw. Een ander voordeel is dat de regelgeving rond de formulatie minder strikt moet zijn dan voor injecteerbare vaccins, hoofdzakelijk met betrekking tot endotoxines [52]. Voornamelijk voor darmpathogenen zouden orale vaccins heel doeltreffend kunnen zijn omdat ze dezelfde route volgen als de pathogenen om het lichaam binnen te komen en een mucosale immunerespons veroorzaken [43].

Niettegenstaande deze voordelen verloopt de ontwikkeling van orale vaccins moeizaam door de verschillende obstakels die overwonnen moeten worden [53]. Allereerst moet het vaccin de gastro-intestinale omgeving verdragen. Verder moeten de antigenen lang genoeg in het intestinaal lumen verblijven om een interactie met intestinale cellen mogelijk te maken. Ook moeten verschillende barrières zoals de mucuslaag, de microvilli, de glycocalyx en het intestinaal epitheel doorbroken worden, waarvan de laatste het paracellulair transport van macromoleculen groter dan 50 kDa verhindert. Pas dan kan het antigeen opgenomen worden en een immunerespons induceren. Hierdoor wordt maar een kleine hoeveelheid van het geconsumeerde antigeen effectief opgenomen en moeten relatief grote hoeveelheden antigeen toegediend worden [54]. Een bijkomend probleem zijn de overheersende tolerogene mechanismen in de darm. Het maag-darmkanaal wordt dagelijks overspoeld door lichaamsvreemde antigenen, afkomstig van voedsel en de microbiota, waartegen geen immuniteit mag opgebouwd worden [55]. Een vaccin zal dus niet enkel bovenstaande

hindernissen, maar ook deze tolerogene omgeving moeten overwinnen om een beschermende immuniteit te induceren.

Levende orale vaccins

Ondanks de probleempunten omtrent orale vaccinatie zijn er toch al enkele orale vaccins commercieel beschikbaar, waaronder vaccins tegen cholera, typhus en humaan rotavirus [56, 57] en ETEC bij het varken [41]. Hierbij wordt gebruik gemaakt van levende, geattenueerde micro-organismen die in de darm kunnen repliceren. In het geval van ETEC kunnen ook levende wild-type avirulente *E. coli* vaccins gebruikt worden [41]. Voorbeelden van commerciële vaccins tegen varken specifieke ETEC stammen zijn: Entero Vac (F4⁺ *E. coli*), Oedema Vac (F18⁺ *E. coli*) en Coliprotec (F4⁺ *E. coli*) [58, 59]. Deze *E. coli* bacteriën vertonen wel expressie van F4 of F18 fimbriae, maar produceren geen toxines en zijn daardoor niet gevaarlijk. Levende vaccins hebben echter nadelen, zoals de mogelijkheid om terug virulent te worden, mogelijke verspreiding in de omgeving en de noodzaak om koud bewaard te worden, wat niet altijd gemakkelijk is in ontwikkelingslanden [60]. Levende vaccins kunnen in sommige gevallen ook gevaarlijk zijn voor bepaalde immunogecompromitteerde of jonge individuen, waarbij het immuunsysteem niet bekwaam is om een respons op te wekken tegen de verzwakte micro-organismen [61]. Deze individuen hoeven hiervoor niet gevaccineerd te zijn. De kans bestaat immers dat hun darm ongewild gekoloniseerd wordt door bijvoorbeeld contact met de geattenueerde micro-organismen in de feces van een gevaccineerd individu.

Niet-replicerende orale vaccins

Een andere mogelijkheid is het gebruik van niet-replicerende orale vaccins. Ze hebben niet de hierboven vernoemde nadelen van levende vaccins, maar ze zijn wel veel minder doeltreffend. Niet-replicerende orale vaccines induceren meestal niet de nodige gevaarsignalen om een goede immunrespons te induceren en kunnen resulteren in orale tolerantie [62].

Orale subeenheid vaccins

Om de nadelen van levende en niet-replicerende vaccins te omzeilen, kunnen subeenheid vaccins gebruikt worden. Deze vaccins bevatten een onderdeel, meestal een eiwit, van de pathogeen, dat recombinant aangemaakt kan worden [63]. Omdat deze vaccins slechts bepaalde componenten van de pathogeen bevatten zijn ze veel veiliger [64]. De keuze van de subeenheid vormt soms echter een probleem, aangezien niet voor elke pathogeen geweten is welk antigeen, of combinatie van antigenen, nodig is om een beschermende immuniteit op te bouwen. Verder moet de component een orale immunrespons kunnen opwekken, terwijl de meeste antigenen na orale toediening net tolerantie zullen induceren. Er zijn echter bepaalde antigenen gekend die wel een effectieve systemische en

intestinale immuunrespons kunnen opwekken als ze in lage dosissen oraal worden toegediend [54]. Deze antigenen zijn eiwitten die kunnen binden op receptoren in de darm, zoals CTB en F4 fimbriae [65, 66, 41]. Inderdaad, een volledige bescherming tegen F4⁺ ETEC infectie werd aangetoond na een orale vaccinatie van biggen met opgezuiverde F4 fimbriae gedurende drie opeenvolgende dagen met een booster 16 dagen later [66].

Formulatiemethoden

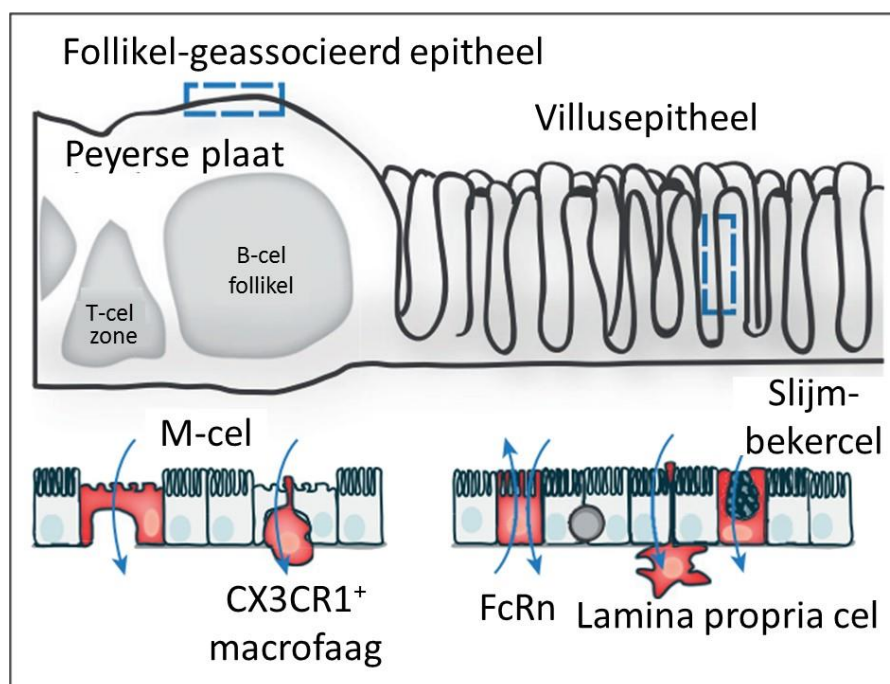
Men probeert ook strategieën te ontwikkelen die de huidige problemen rond orale immunisatie kunnen oplossen. Bij toediening van een vaccin heeft het immuunsysteem tijd nodig om een respons te ontwikkelen. Indien de orale vaccins pas toegediend worden tijdens het spenen is er een kleine periode waarin er nog geen bescherming is tegen ETEC infecties [41]. Om dit tegen te gaan kan het vaccin best toegediend worden tijdens de zoogperiode. De moedermelk bevat echter glycoproteïnen en antilichamen die kunnen interfereren met de orale immunisatie [34]. Daarenboven heerst er in het spijsverteringsstelsel een zure pH en zijn er verschillende enzymen aanwezig die ervoor kunnen zorgen dat het vaccin afgebroken wordt voordat het zijn doelwit bereikt. Encapsulatie kan de antigenen hiertegen beschermen. Een voorbeeld hiervan zijn enterisch-gecoate pellets met F4 fimbriae die openbreken in het begin van het jejunum, door een pH-stijging tot minimum 6,3, en zo een bescherming bieden tegen de enzymen en lage pH in de maag [67]. Hierbij werd geen volledige immuniteit bekomen, maar wel een verminderde ernst van infectie ten opzichte van immunisatie met ongecoate F4 fimbriae. Een ander voorbeeld is een oraal tablet bestaande uit amylose zetmeel met een hoog carboxymethyl gehalte, waarin zich levende F4⁺ *E. coli* [68] of opgezuiverde F4 fimbriae [69] bevinden. Ook bioencapsulatie is een mogelijkheid. Een voorbeeld hiervan is transgene rijst dat CTB bevat [65]. De aminozuursamenstelling van CTB is sterk gelijkend op die van de hitte-labiele toxine B subunit van ETEC, waardoor kruisbescherming plaatsvindt. Zowel een intestinale IgA als een systemische IgG en IgA respons werd geïnduceerd in minivarkens. De effectiviteit werd ook aangetoond voor maternale immunisatie.

Een tweede probleem is de lage opname van de antigenen in de darm. Dit kan verhoogd worden door encapsulatie in micro- of nanopartikels en/of het selectief richten van de antigenen naar cellen, die betrokken zijn bij de opname ter hoogte van de dunne darm. De oppervlakte van deze antigeengeladen micro- of nanopartikels kan gemodificeerd worden, zodat deze partikels gemakkelijker door de mucuslaag van de darm kunnen penetreren en zo de onderliggende epitheellaag kunnen bereiken [70]. Om een beter inzicht te krijgen in de mechanismen van antigeenopname worden ze hieronder in detail besproken.

Een derde probleem is de inductie van tolerantie in plaats van protectieve immuniteit. Om dit tegen te gaan kunnen bovenstaande technieken van encapsulatie en selectief richten van antigenen gecombineerd worden met adjuvantia. Voorbeelden zijn orale adjuvantia gebaseerd op de bacteriële toxines CT en LT [9]. Ook U-Omp19, een bacteriële protease inhibitor van *Brucella spp.*, is een mogelijk oraal adjuvans dat tevens een rol speelt in een langere levensduur van het antigeen door de inhibitie van intestinale proteasen [71].

Mechanismen van antigeenopname in het darmkanaal

Een eenlagig epitheel beschermt de intestinale weefsels tegen de buitenwereld, namelijk de lumenale inhoud [72]. Enerzijds bestaat deze epitheel laag uit follikel-geassocieerd epitheel dat de lymfoïde compartimenten in de Peyerse platen bedekt en anderzijds uit normaal villusepitheel. Dit epitheel vormt een barrière tegen de passieve opname van antigenen. Afhankelijk van de aard van het antigeen kan soms wel transcellulaire diffusie optreden, bijvoorbeeld bij inerte moleculen kleiner dan 600 Da [73]. Een schematisch overzicht van de verschillende mechanismen van antigeenopname ter hoogte van de dunne darm wordt gegeven in Figuur 2.



Figuur 2: Antigeenopname in de dunne darm [72]. FcRn: neonatale Fc receptor.

In het follikel-geassocieerd epitheel (FAE) van de Peyerse platen bevinden zich gespecialiseerde cellen, *microfold* cellen of M-cellen, die in staat zijn om macromoleculen en partikels op te nemen. M-cellen hebben enkele eigenschappen die de antigeenopname bevorderen [70, 74]. Ze bevatten minder en kleinere microvilli dan de omliggende cellen, waardoor dit proces vergemakkelijkt wordt. Bovendien

bevat het FAE in de omgeving van de M-cellen geen slijmbekercellen, zodat er slechts een minimale mucuslaag aanwezig is. Daarnaast is de glycocalyx minder uitgesproken en bevatten de M-cellen minder enzymen die antigenen degraderen. Kleine hoeveelheden van het lumen van de darm worden opgenomen door clathrine-gemedieerde endocytose, actine-afhankelijke fagocytose of macropinocytose en terug vrijgegeven aan de kant van het basolaterale membraan waar de M-cel een invaginatie vormt die lymfocyten, macrofagen en dendritische cellen (DC) bevat [72, 75]. Eventueel aanwezige antigenen worden vrijgegeven, opgenomen door antigeen-presenterende cellen (APC), verwerkt tot peptiden en gepresenteerd aan lymfocyten via het peptide-MHC complex [9]. Ook bevatten de M-cellen ligand-specifieke apicale receptoren die betrokken zijn in antigeenopname wat suggereert dat ze selectief bepaalde antigenen kunnen opnemen [9]. Zo ondergaat SIgA na antigeenbinding een conformatieverandering, wat de opname van de SIgA-antigeen immuuncomplexen door M-cellen stimuleert [76]. Men vermoedt dat dectine-1 een belangrijke rol speelt in dit proces [77]. Microbiële stimuli kunnen CD11c⁺CD103⁻CX₃CR1⁺ macrofagen recrutereren in de invaginatie aan de basolaterale zijde van de M-cel die mogelijk de M-cel activiteit kunnen reguleren of zelf antigenen opnemen met behulp van uitlopers doorheen een porie in de M-cel [72, 78].

Ook aan de basolaterale zijde van het normaal villusepitheel komen CD103⁻CX₃CR1⁺ macrofagen voor [78, 79]. Deze vormen uitlopers door de *tight-junctions* van het epitheel, waardoor rechtstreeks antigenen uit het darmlumen kunnen opgenomen worden. Waarschijnlijk is signalisatie via epitheliale *Toll-like* receptoren de drijvende kracht achter de vorming van deze uitlopers [79]. Deze macrofagen geven de opgenomen antigenen door aan CD103⁺CX₃CR1⁻ dendritische cellen via *gap junctions* [80]. Deze DC induceren voornamelijk orale tolerantie via de inductie van regulatorische T-cellen.

Een ander mechanisme om in het villusepitheel antigenen op te nemen zijn mucus-secreterende bekerellen die instaan voor het transport van antigenen naar de basolaterale zijde waar ze gepresenteerd kunnen worden aan CD103⁺CX₃CR1⁻ dendritische cellen [81]. Dit proces vindt echter enkel plaats voor kleine oplosbare antigenen en leidt hoofdzakelijk tot immuuntolerantie door de inductie van regulatorische T-cellen. Dit proces wordt ook wel omschreven als slijmbekercel-geassocieerde passages.

Lange tijd werd gedacht dat enterocyten enkel een barrière vormen om het darmweefsel te beschermen tegen lichaamsvreemde en mogelijk gevaarlijke stoffen in het darmlumen. Recent werd het echter duidelijk dat ook enterocyten antigenen kunnen opnemen als deze antigenen specifieke receptoren kunnen binden aan de apicale zijde van deze enterocyten [72, 82]. Receptor-gemedieerde opname zou ook eerder een antigeen-specifieke mucosale immuunrespons opwekken in plaats van orale tolerantie, wat deze mechanismen interessant maakt als doelwit voor orale vaccinatie [55]. Enterocyten zouden bacteriën kunnen fagocyteren of door de epitheellaag kunnen transloceren via een *Toll-like* receptor 4 (TLR4) gemedieerd proces [83]. Een tweede voorbeeld van receptor-

gemedieerde opname zijn F4 fimbriae die door enterocyten opgenomen kunnen worden via de F4 receptor [66]. Een ander voorbeeld is de neonatale Fc-receptor (FcRn), die tot uiting komt op enterocyten in de darm van het varken en andere diersoorten [79, 82]. FcRn heeft een hoge affiniteit voor IgG en IgG-immuuncomplexen bij een licht zure pH van 6,5, maar niet bij een fysiologische pH van 7,4 [55]. Het transporteert IgG van de basolaterale zijde van het epitheel naar het lumen, waar deze antilichamen met hun overeenkomstige antigenen kunnen binden en immuuncomplexen kunnen vormen. Deze immuuncomplexen worden dan via FcRn weer opgenomen door de epitheelcellen en getransporteerd naar de basolaterale zijde, waar ze gepresenteerd kunnen worden aan antigeen-presenterende cellen, zoals DC. Deze cellen hebben Fc γ receptoren (Fc γ R) op hun oppervlak die ook de Fc domeinen van IgG herkennen. Na *crosslinking* door IgG-immuuncomplexen wordt een signaaltransductie geïnduceerd in de DC, die afhankelijk van het soort Fc γ R een stimulerend of inhiberend effect kan hebben [79]. Er zijn drie Fc γ R in het varken die activerende signalen opwekken: Fc γ RI (CD64), Fc γ RII (CD32) en Fc γ RIII (CD16), en één Fc γ R die inhiberend werkt: Fc γ RIIb. De werking van Fc γ RIIb kan omzeild worden door bepaalde IgG subklassen te selecteren of specifieke mutaties in het IgG Fc domein aan te brengen, zodat de affiniteit van de antilichamen voor deze receptor daalt.

Doelgericht afleveren van vaccin antigenen

Bepaalde receptoren in de darm kunnen als hulpmiddel gebruikt worden om doelgericht een grotere hoeveelheid vaccin antigenen op te nemen [54, 84]. Er wordt specifiek gezocht naar receptoren met de eigenschap om bepaalde componenten via transcytose naar de basolaterale zijde van het villusepitheel te brengen. Zowel receptoren op M-cellen als op enterocyten kunnen gebruikt worden als doelwit [85]. Er zijn echter veel meer enterocyten aanwezig in de darm dan M-cellen, waardoor het aantrekkelijker lijkt om deze receptoren te gebruiken om efficiënte antigeenopname te verwezenlijken. Ook kunnen receptoren op CD103⁻CX₃CR1⁺ macrofagen een mogelijk doelwit vormen [79]. In normale omstandigheden komt dit proces echter niet veel voor. Door doelgericht de vaccin antigenen naar de basolaterale zijde van het darmepitheel te transporteren hoopt men om een voldoende hoge immunrespons te verkrijgen met een lage antigeen dosis. Dit doelgericht transport kan verwezenlijkt worden met behulp van endogene liganden, antilichamen, of liganden van pathogene oorsprong [72, 84].

Liganden die gebruikt zouden kunnen worden om de opname via receptoren te verwezenlijken zijn lectines [55]. Deze binden op specifieke koolhydraatstructuren op oppervlakteproteïnen en -lipiden, die sterk verschillen naargelang de diersoort, de leeftijd van het dier en de locatie van de cellen in het lichaam. Een groot nadeel van lectines is hun toxiciteit en gevoeligheid voor degradatie. Ook het omgekeerde proces is mogelijk, namelijk lectines op het oppervlak van enterocyten gebruiken als doelwit door het vaccin te conjugeren aan bepaalde koolhydraatstructuren [55]. Een ander voorbeeld

van zo'n receptor is FcRn [82]. De antilichamen kunnen gekoppeld worden aan antigenen en functioneren als carriermolecule om een immuunrespons op te wekken tegen deze antigenen. Recent onderzoek heeft aangetoond dat FcRn in staat is om nanopartikels waarop het Fc domein geconjugeerd is, te transloceren naar de basolaterale zijde van de intestinale epitheellaag [86].

Buiten lectines kunnen ook bacteriële adhesines, waaronder F4 fimbriae, en toxines of delen hiervan, waaronder CTB, gebruikt worden om via hun receptoren opname van antigenen in het darmepitheel te bevorderen [65, 84]. Orale immunogenen zijn echter uitzonderlijk. Bij F4 fimbriae is de receptor-gemedieerde opname in het intestinaal epitheel te wijten aan hun polymeer karakter [87]. Het voordeel van bacteriële adhesines is dat ze relatief resistent zijn tegen degradatie in de darm [55]. Oraal toegediende F4 fimbriae ondergaan transcytose door M-cellen en follikel-geassocieerde enterocyten in de Peyerse platen en door de villusenterocyten van de lamina propria, waarna ze worden vrijgesteld aan de basolaterale zijde van het intestinaal epitheel [88]. Ook is het mogelijk om F4 fimbriae als carriermolecule te gebruiken [89]. F4 fimbriae kunnen bijvoorbeeld gekoppeld worden aan het FedF adhesine van F18 fimbriae, dat op zichzelf geen goede immuunrespons opwekt [90]. Een systemische en lokale FedF-specifieke immuunrespons werd bekomen na immunisatie van varkens, maar onvoldoende om het dier volledig te beschermen. Een ander nadeel van het gebruik van bacteriële adhesines als carriermoleculen is dat de adhesines zelf een immuunrespons kunnen opwekken. Deze respons kan de endocytose van de partikels door enterocyten verhinderen [55]. Ook kan het vaccin zijn efficaciteit verliezen als de gastheer al een eerder contact met de pathogeen heeft gehad en immuniteit heeft ontwikkeld. Belangrijk voor de vaccinatie met F4 fimbriae al dan niet als dragermolecule voor een ander antigeen, is de aanwezigheid van de F4 receptor en niet alle dieren zijn F4R⁺ [55].

Uit verder onderzoek naar welke receptor verantwoordelijk is voor de transcytose van F4 fimbriae doorheen het epitheel bleek dat deze sleutelmolecule aminopeptidase N is [84]. Dit werd aangetoond doordat oraal toegediende anti-APN antilichamen opgenomen worden door het darmepitheel en een immuunrespons induceren. Bovendien worden β -glucaan micropartikels beter opgenomen door het darmepitheel als deze selectief gericht worden naar APN via antilichamen [85]. Ook hier werd een verhoogde systemische antigeenspecifieke immuunrespons bekomen na orale toediening van deze APN-gerichte micropartikels aan biggen.

Aangezien APN in het spijsverteringsstelsel gebruikt kan worden als doelwit voor orale vaccinatie wordt in de volgende paragrafen meer uitleg gegeven over dit membraaneiwit.

2.4. Aminopeptidase N (CD13)

2.4.1. Locatie

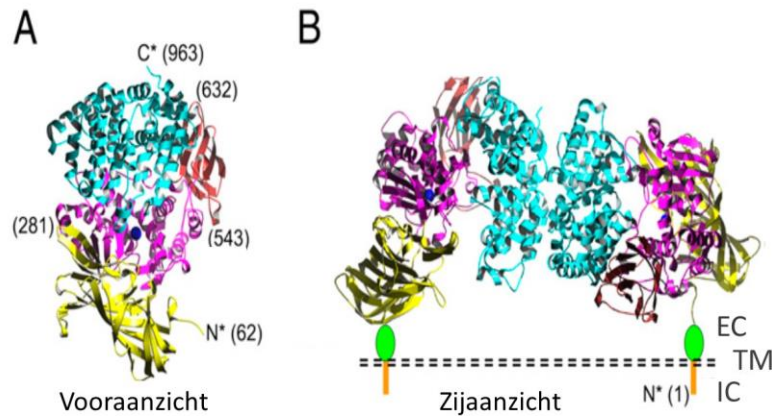
Aminopeptidase N, ook gekend als CD13, is een type II metalloprotease dat op veel plaatsen en op verschillende celtypen in het lichaam voorkomt [91, 92]. Andere benamingen voor dit eiwit zijn: membraan alanyl aminopeptidase, amino-oligopeptidase, aminopeptidase M, membraan alanine aminopeptidase, membraan aminopeptidase I, microsomaal aminopeptidase, partikel-gebonden aminopeptidase en peptidase E [93]. Bij de mens komt APN hoofdzakelijk tot expressie in de mucosa van de dunne darm, in de lever en in de borstelzooimembranen van de nier [91, 94]. Verder wordt het onder meer teruggevonden in de hersenen en in het zenuwweefsel.

De aanwezigheid van APN werd in het varken aangetoond in de basale membraan van de slokdarm, in de speekselklieren en in de basale membraan en de lamina propria van de tong en van de keelholte [62]. In de dunne darm komt het grotendeels tot expressie in het epitheel en in mindere mate in de basale membraan en de lamina propria. Het is afwezig in de dikke darm, het rectum en het gekeratiniseerd epitheel van de tong, slokdarm en maag.

APN komt niet enkel voor op darmepitheelcellen, maar ook op immuuncellen, zoals monocytten, macrofagen en dendritische cellen [95]. CD13 expressie is specifiek aangerijkt in de pro-inflammatoire subset van monocytten [96]. In hematopoïetische cellen is er enkel CD13 expressie in stamcellen en myeloïde cellen. Hierdoor wordt CD13 ook wel gezien als een myelomonocytische merker [97].

2.4.2. Structuur

APN behoort tot de M1 familie van de metallopeptidase familie, ook wel gluzincines genoemd [98] en bevat een zink-bindend HEXXH motief [99]. In deze familie is APN uniek daar het als enige een homodimeer vormt en geen monomeer [99]. APN is opgebouwd uit 967 aminozuren en bestaat uit een transmembranair gedeelte, een groot cellulair ectodomein met het katalytisch domein en een kort N-terminaal cytoplasmatisch domein, zoals wordt weergegeven in Figuur 3 [91, 99]. De twee dimeren worden bij elkaar gehouden door een niet-covalente binding [91].



Figuur 3: De algemene opbouw van aminopeptidase N uit het varken [99]. **A:** Vooraanzicht; **B:** Zijaanzicht. EC: Extracellulair domein; TM: Transmembranair domein; IC: Intracellulair domein.

APN kan zowel in een membraangebonden vorm als een oplosbare vorm voorkomen [99]. De opgeloste vorm wordt vaak teruggevonden in kankerweefsels of na infecties. Het is enzymatisch actief en de mogelijkheid bestaat dat het de functies van membraan-gebonden APN kan reguleren [100]. Dit laatste zou gebeuren door de adhesie van liganden aan de membraangebonden vorm via competitieve inhibitie te reguleren. Verder bestaat aminopeptidase N voor meer dan 20% van zijn massa uit koolhydraten, die kunnen verschillen tussen individuen en dominant worden overgeërfd [91, 101]. APN is dus zwaar geglycosyleerd.

2.4.3. Functie

Aminopeptidase N kent drie verschillende soorten actiemechanismen: enzymatische activiteit, een receptor voor adhesie, endocytose en fagocytose en signaaltransductie [100]. Sommige functies vereisen een interactie van deze mechanismen en variëren afhankelijk van het weefsel en de celtypes waar CD13 tot expressie komt.

2.4.3.1. Enzymatische activiteit

De actieve plaats van het eiwit knipt peptidebindingen van verschillende substraten met een voorkeur voor N-terminale neutrale aminozuren van kleine peptiden [95]. Hiermee draagt APN bij tot de finale digestie van peptiden in de dunne darm, waardoor het de vertering van eiwitten bevordert [94]. Ook speelt het een rol bij de enzymatische regulatie van peptiden door het knippen van de N-terminus [100]. Voorbeelden van peptiden waarvan de degradatie gekatalyseerd wordt door APN zijn: tuftsine, kinines, glutathione, somatostatine, thymopentine, neurokinine A, splenopentine, nociceptine FQ, enkephaline en angiotensine-III [98, 100, 102]. Enkephaline is betrokken bij de ervaring van pijn en de gemoedstoestand [102], terwijl angiotensine-III nodig is voor de bloeddrukregulatie [98].

In immuuncellen helpt APN bij de antigeenpresentatie [94]. Onderzoek heeft aangetoond dat APN kan instaan voor het verknippen van peptiden om ze vervolgens op MHC-II moleculen te laden [103]. Ook kan het synthetische peptiden op dendritische cellen degraderen, waardoor deze peptiden niet meer gepresenteerd kunnen worden aan andere immuuncellen [104]. Uit experimenten is gebleken dat de opregulatie van APN door IFN- γ gepaard gaat met een verhoogde expressie van MHC-II, onafhankelijk van de IFN- γ concentratie [105].

De enzymatische activiteit van APN heeft verder ook een functie bij tumorcel invasie, differentiatie van cellen, proliferatie en apoptose, motiliteit van cellen en chemotaxis [100].

2.4.3.2. Receptor voor adhesie, endocytose en fagocytose

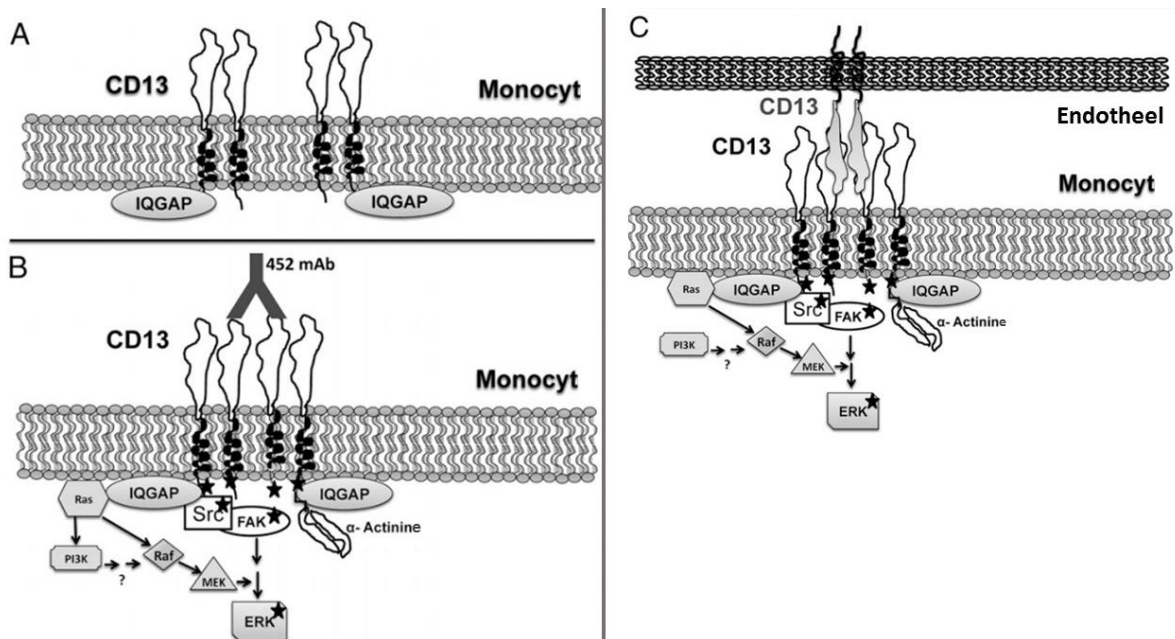
Op epitheelcellen is aminopeptidase N een receptor voor endocytose en draagt het onder meer bij tot de opname van cholesterol [100]. Ook werd aangetoond dat APN op epitheelcellen een receptor is voor F4⁺ ETEC en als receptor misbruikt wordt door bepaalde coronavirussen [100], waaronder het humaan respiratoir coronavirus 229E (HCoV229E), het overdraagbaar porcien gastro-enteritis virus (TGEV), het felien enterisch coronavirus (FCoV) en het canien enterisch coronavirus (CCov) [104-106]. Andere voorbeelden zijn het humaan en het murine cytomegalovirus [109].

APN bevordert de fagocytose door macrofagen en dendritische cellen, net als cel-cel adhesie bij monocytten [110, 111]. De celadhesie wordt gemedieerd door het C-terminaal domein van CD13, net als homotypische endotheliale celadhesie en myeloïd celtransport [96]. Bij monocytten verloopt de initiële fase van dit proces waarschijnlijk via een integrine-onafhankelijk en koolhydraat-afhankelijk mechanisme via galectine-3 [112]. Galectine-3 associeert met CD13 op de plasmamembraan. Wanneer CD13 *crosslinking* plaatsvindt, komen de galectine moleculen vrij en kunnen vervolgens associëren met andere receptoren om zo een signaaltransductie in gang te zetten of adhesie te veroorzaken door brugvorming met receptoren op andere cellen.

Interessant om te weten is dat actief fagocyterende monocytten in perifeer bloed meer dan dubbel zoveel aminopeptidase N op hun oppervlak hebben dan cellen die minder fagocyteren [113]. Op humane immuuncellen (monocytten, macrofagen en dendritische cellen) heeft CD13 onder meer een functie als co-receptor en primaire receptor voor fagocytose [95]. De mate van fagocytose is meer dan 80% van deze geïnduceerd door de fagocytische receptor Fc γ RI. Er werd aangetoond dat CD13 expressie op een niet-fagocytische cellijn HEK293 voldoende is om fagocytose te induceren in afwezigheid van andere fagocytische receptoren, zoals Fc γ R en complement receptor 3 (CR3) [95].

2.4.3.3. Signaaltransductie

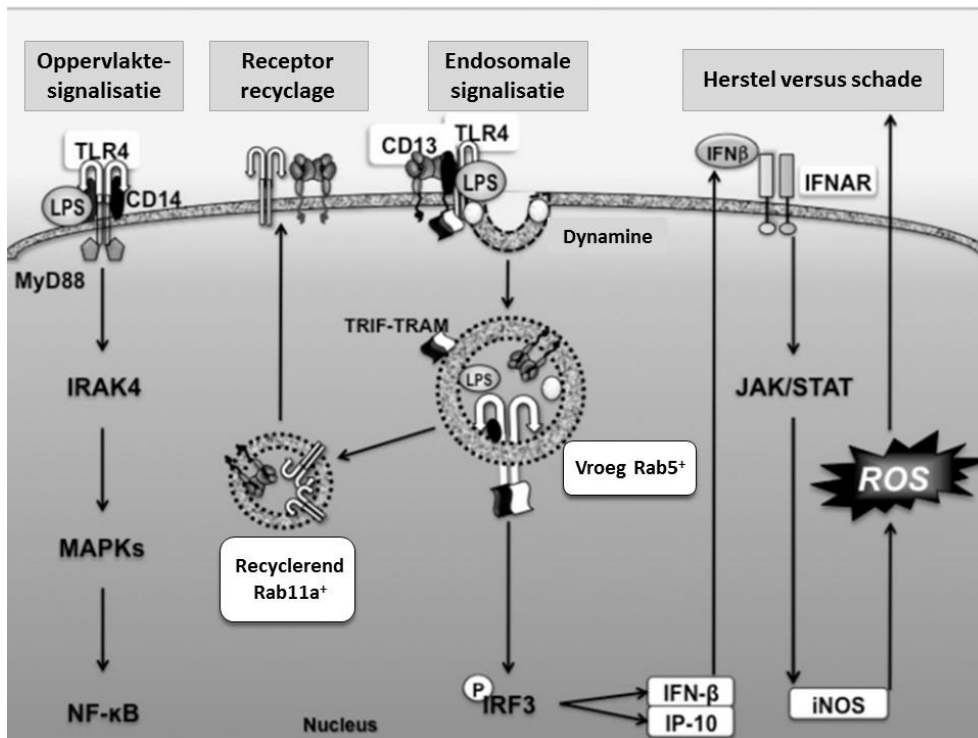
Het laatste actiemechanisme is signaaltransductie, wat waarschijnlijk geïnitieerd wordt door liganden die CD13 *crosslinking* op de plasmamembraan veroorzaken [95, 100]. Dit is nodig bij bepaalde processen zoals angiogenese, adhesie en fagocytose. Aangezien APN een rol speelt in signaaltransductie, maar het cytoplasmatisch domein relatief kort is en geen gekende signaalsequentie bevat, werd verondersteld dat aminopeptidase N hiervoor interageert met externe proteïnen [114, 115]. Er zijn al verschillende proteïnen bekend die associëren met APN die zouden kunnen bijdragen tot de signaaltransductie. Dit zijn onder andere galectine-3 op monocyten [116], galectine-4 op intestinale epitheelcellen [117], RECK (reversion-inducing cysteine-rich proteïen with Kazal motifs) [118], het tumor-geassocieerde antigeen L6 [119], de adaptor eiwitten Grb2/Sos in U937 monocyten die deel uitmaken van de MAPK-*pathway* [116] en het *scaffolding* proteïne IQGAP1 [110]. Ook α -actinine wordt met CD13 geassocieerd, aangezien het een brug vormt tussen membraan-gebonden CD13 en het actine cytoskelet [110]. Ondertussen werd in U937 monocyten aangetoond dat CD13 gefosforyleerd kan worden op Tyr6 van zijn cytoplasmatisch domein op een Src-afhankelijke manier, wat resulteert in ERK en FAK activatie via de Ras/MAPK *pathway* en CD13-gemedieerde adhesie [95, 110]. Hieruit blijkt dat CD13 niet noodzakelijk moet associëren met interne adaptor proteïnen om signaaltransductie te veroorzaken. Een overzicht van deze signalisatie is weergegeven in Figuur 4.



Figuur 4: Schematische voorstelling van de CD13-geïnduceerde signalisatie en adhesie [110]. **A:** CD13 in rustende monocyten; **B:** CD13 *crosslinking* door monoklonale antilichamen (mAbs); **C:** Adhesie van monocyten aan endotheelcellen na signaaltransductie geïnduceerd door mAb-gemedieerde CD13 *crosslinking*.

CD13-gemedieerde fagocytose door monocyten is onafhankelijk van de enzymatische functie van CD13, maar berust op herschikkingen van de actine polymeren en activatie van PI3K [95]. Verder is het deels afhankelijk van Syk activatie. In tegenstelling tot CD13 is FcγR-gemedieerde fagocytose helemaal afhankelijk van de aanwezigheid van Syk. CD13 activatie zorgt verder ook voor een intracellulaire Ca²⁺-stijging in monocyten [95].

Met betrekking tot inflammatie is het gekend dat CD13 een regulerende rol heeft op Toll-like receptor 4 [120]. Op deze manier wordt receptor-gemedieerde antigeenopname in dendritische cellen negatief gereguleerd om zo T-cel activatie te controleren. De signaaltransductie is weergegeven in Figuur 5. TLR4 herkent lipopolysachariden (LPS) op gram-negatieve bacteriën en een aantal endogene signalen van beschadigd weefsel, ook wel *danger-associated molecular patterns* (DAMP's) genoemd, en activeert zo het immuunsysteem [120]. Een te grote reactie van het immuunsysteem kan echter gevaarlijke weefselschade en immunopathologieën veroorzaken. CD13 inhibeert deze reactie door de dynamine-afhankelijke endocytose na herkenning van een antigeen door TLR4 negatief te reguleren door fosforylatie van Akt in de PI3K-Akt signaaltransductie [120, 121]. Herkenning van een ligand door TLR4 induceert de TIRAP-MyD88-gemedieerde signaaltransductie die p38MAPK en IKKβ-α inflammatoire cytokine genen activeert [120]. Hierdoor wordt het TLR4-ligand complex op een dynamine-afhankelijke manier opgenomen door de cel in een Rab⁺ vroeg endosoom. Hier zorgt het voor een TRAM-TRIF-afhankelijke respons. Op deze manier wordt de transcriptie van type I interferonen (IFN) via de IFN regulerende factor IRF3 opgereguleerd. Deze TRIF-afhankelijke endosomale signaaltransductie wordt door CD13 gereguleerd, terwijl de MyD88-gemedieerde *tumor necrosis factor* (TNF) productie niet beïnvloed wordt [120]. Deze laatste is niet afhankelijk van endocytose. Verlies van CD13 zorgt voor een IFNβ-gemedieerde signaaltransductie via JAK-STAT dat de transcriptie van nitriet-inducerende genen stimuleert, waardoor weefselschade optreedt. De vorming van reactieve zuurstofradicalen geïnduceerd door CD13 activatie werd ook aangetoond in een macrofaag-achtige cellijn J774 [95]. Daarenboven vertonen geactiveerde macrofagen een verhoogde CD13 expressie en co-immunoprecipiteren ze CD13 en TLR4 [120]. Verlies van CD13 zorgt voor een verhoogde concentratie van TLR4 op het oppervlak van dendritische cellen en verhoogt de opname van LPS.



Figuur 5: Schematisch overzicht van de regulatie van TLR4-gemedieerde endocytose door CD13 [120].

Veel van deze functies zijn een mogelijk doelwit voor medische doeleinden. Men moet echter opletten dat door het moduleren van een bepaalde functie andere belangrijke *pathways* niet verstoord worden [100]. Door de veelzijdigheid van dit eiwit zouden eventuele nevenreacties gemakkelijk over het hoofd gezien kunnen worden. In tegenstelling tot de CD13-gemedieerde signaaltransductie in immuuncellen is nog onbekend welke eiwitten geactiveerd worden in epitheelcellen. Het praktisch gedeelte van deze masterproef heeft als doel enkele aspecten van deze signaaltransductie bij epitheelcellen op te helderen.

3. Materiaal en methode

3.1. Onderhouden van de IPEC-J2-APN cellijn

Om de rol van aminopeptidase N (APN) in de activatie van signaalwegen in intestinale epitheelcellen te bestuderen werd de IPEC-J2-APN cellijn, intestinale varkenspitheelcellen die stabiel getransfected werden om APN tot expressie te brengen, in cultuur gehouden en gebruikt voor verschillende experimenten. Ook gewone intestinale varkenspitheelcellen (IPEC-J2) werden in cultuur gehouden om te kunnen vergelijken met de IPEC-J2-APN cellijn.

Buffers en reagentia

- Penicilline/streptomycine; stockoplossing = 10^4 U/mL penicilline G Natrium zout (Sigma-Aldrich); 10 mg/mL streptomycine sulfaat (Sigma-Aldrich) in H₂O
- Celcultuurmedium (IPEC-J2): 5% foetaal kalf serum (FCS; Integro); 1% penicilline/streptomycine stockoplossing; 15,505 µg/mL insuline/ transferrine/ selenium (ITS, Sigma-Aldrich); 4 mM L-glutamine (Gibco); 5 ng/mL recombinant humane epidermale groeifactor (EGF, ThermoScientific) in Dulbecco's gemodificeerd Eagle's medium: nutriënten mix F-12 (DMEM/F12, Gibco)
- Celcultuurmedium (IPEC-J2-APN): Celcultuurmedium (IPEC-J2) met 1,5 mg/mL geneticine (G418, ThermoScientific)
- Fosfaatgebufferde zoutoplossing (PBS; pH 7,4): 136,9 mM NaCl (VWR); 2,7 mM KCl (Calbiochem); 10 mM Na₂HPO₄ (Merck); 2 mM KH₂PO₄ (VWR) in H₂O
- Verseen: 54 mM ethyleendiaminetetra-azijnzuur (EDTA;VWR) in PBS
- Trypsinebuffer: 25 mg/mL trypsine (Gibco); 1% verseen; 1% penicilline/streptomycine stockoplossing in PBS

Werkwijze

De getransfectede cellijn werd bewaard in vloeibare stikstof. Om deze cellijn in cultuur te brengen werd ze vanuit de vloeibare stikstof opgewarmd in een warmwaterbad bij 37°C tot de ingevroren cellijn grotendeels ontdooid was en vervolgens gesuspendeerd in 10 mL celcultuurmedium (4°C). Na centrifugatie bij 350 g en 4°C voor 8 min werd de celpellet geresuspendeerd in 1 mL cultuurmedium en overgebracht in een medium cultuurfles met 20 mL cultuurmedium (37°C). De cellen werden geïncubeerd bij 37°C en 5% CO₂ en om de 3 dagen werd het medium vervangen. Wanneer de cellen 90-100% confluente bereikt hadden, werd het medium afgenomen, de cellen gewassen met steriele

PBS en vervolgens geïncubeerd met 10 mL trypsinebuffer (37°C; 10 min) tot de cellen loskwamen. Na collecteren en toevoegen van 10 mL medium werden de cellen gecentrifugeerd voor 10 min bij 4°C en 350 g en de pellet geresuspendeerd in 1 mL cultuurmedium. Vervolgens werd 200 µl van deze celsuspensie opnieuw overgebracht in een nieuwe cultuurfles met 20 mL medium (37°C).

3.2. APN expressie op de IPEC-J2-APN cellijn

Met behulp van flowcytometrie en immunodetectie werd gecontroleerd of de IPEC-J2-APN cellijn nog voldoende APN tot expressie bracht. Dit werd vergeleken met de expressie op een gewone IPEC-J2 cellijn. Hierbij werd ook een idee verkregen van de te gebruiken antilichaamconcentraties in verdere experimenten. Verder werd het effect van incubatie in medium zonder selectiemerker op de APN expressie nagegaan. Hiervoor werden eerst de nodige primaire antilichamen opgezuiverd uit het supernatans van hybridomacellen. Na dialyse werd de eiwitconcentratie bepaald met behulp van een bicinchoninezuur (BCA) reactie.

3.2.1. Opzuivering van de monoklonale antilichamen

Buffers en reagentia

- EtOH-oplossing: 20% ethanol (VWR) in H₂O; ontgassen (20 min)
- Na-fosfaat stockoplossing (500 mM): 460 mM Na₂HPO₄·2H₂O (VWR)+ 61 mM NaH₂PO₄·2H₂O (VWR) in H₂O
- Na-fosfaatbuffer (200 mM; pH 7): 40% Na-fosfaat stockoplossing in H₂O
- Bindingsbuffer (100 mM; pH 7): 20% Na-fosfaat stockoplossing in H₂O
- Wasbuffer (10 mM; pH 7): 2% Na-fosfaat stockoplossing in H₂O
- Elutiebuffer (pH 2,7): 100 mM glycine (Sigma-Aldrich) in H₂O
- Neutralisatiebuffer (pH 8): 1 M Tris-base (VWR) in H₂O
- Hybridoma supernatans (*in-house*)
- BSA: Bovien serum albumine (Sigma-Aldrich); stockoplossing = 1 mg/mL
- BCA-reagens: 1:50 reagens B (CuSO₄·5H₂O; Sigma-Aldrich) en reagens A (bicinchoninezuur; Sigma-Aldrich)
- Ladingsbuffer: 0,83% broomfenolblauw (Merck); 0,83% xyleen cyanol FF (Sigma-Aldrich); 13,33% sucrose (Fluka); 10% β-mercaptoethanol (Merck) in H₂O

Werkwijze

Een peristaltische pomp werd luchtvrij gemaakt met behulp van een injectiepomp en vervolgens gedurende 10 min gewassen met EtOH-oplossing en 10 min met bindingsbuffer (1 mL/min). De kolom werd aangesloten op de peristaltische pomp en nagekeken op lekken. Hierna werd de kolom gewassen met 10 mL bindingsbuffer, waarna het hybridoma supernatans aan de pomp geschakeld werd, zodat het supernatans overnacht over de kolom kon lopen (4°C). De kolom werd nadien gewassen (5 tot 10 kolomvolumes wasbuffer) en geëluëerd met elutiebuffer (kamertemperatuur (KT)) gebruik makende van een ÄKTA explorer eiwit opzuiveringssysteem, waarbij de elutiefractionen werden geïncubeerd in 75 µL neutralisatiebuffer (ijskoud).

De eiwitfractionen werden gedialyseerd en de concentratie werd bepaald via een BCA-reactie. Voor de dialyse werden de elutiefractionen in een dialysemembraan gebracht met een moleculaire gewichtsgrens van 10 kDa en overnacht, bij 4°C en onder zacht roeren, in 5 L PBS gedialyseerd. Voor de BCA-reactie werd een standaardreeks van BSA in PBS gemaakt met volgende concentraties: 0, 0,05, 0,1, 0,2, 0,5, 0,8 en 1 mg/mL. Vervolgens werd 250 µL BCA-reagens toegevoegd aan 12,5 µL eiwitfractie of een verdunning ervan in PBS en de standaardreeks, gemengd en 30 min geïncubeerd bij 37°C. Hierna werd 100 µL van elk staal in duplicaat in een weefselcultuurplaat gebracht en de optische dichtheid werd gemeten bij 560 nm (OD₅₆₀) met een *Infinite F50 ELISA plate reader* (Tecan).

3.2.2. Immunodetectie door anti-APN polyklonale Ig met behulp van flowcytometrie

Buffers en reagentia

- Differentiatie-medium: Celcultuurmedium zonder FCS
- Accutase (Gibco)
- PBS-EDTA: 1 mM EDTA (VWR) in PBS
- Kleuringbuffer: 1% FCS in *Roswell Park Memorial Institute medium* (RPMI; Gibco)
- Primaire antilichamen: polyklonaal konijn anti-APN immunoglobuline G (IgG) (*in-house*; opgezuiverd hitte-geïnactiveerd serum na immunisatie met varken APN [84]) en irrelevant konijn IgG (*in-house*; opgezuiverd hitte-geïnactiveerd serum [84]);
- Secundair antilichaam: R-phycoerythrine (PE) gelabeld anti-konijn IgG (Invitrogen)

Werkwijze

IPEC-J2-APN cellen werden geplant in een 24-well plaat aan een concentratie van $2,5 \cdot 10^5$ cellen/well. Na een incubatie van vier dagen op gewoon medium en één dag op differentiatie-medium bij 37°C en 5% CO₂, werden de cellen gewassen met 500 µL PBS en losgemaakt door 300 µL/well accutase toe te

voegen. De cellen werden 10 min gecentrifugeerd bij 400 g en 4°C en geresuspendeerd in 1 mL PBS-EDTA. Na het tellen van de cellen werden ze overgebracht naar een V-vormige 96-well microtiter plaat aan een concentratie van $1 \cdot 10^5$ cellen/well en aangelegd tot 100 μ L met kleuringsbuffer. De V-plaat werd 3 min bij 400 g en 4°C gecentrifugeerd en het supernatans werd voorzichtig verwijderd. De primaire polyklonale anti-APN (0,2, 0,5, 1, 2, 5 en 102 μ g/well) en irrelevant konijn IgG (10 μ g/well) werden toegevoegd in 50 μ L/well kleuringsbuffer. Na 20 min incubatie op ijs werd 100 μ L/well kleuringsbuffer toegevoegd en gecentrifugeerd (3 min, 400 g, 4°C). De cellen werden gewassen met 150 μ L kleuringsbuffer en opnieuw gecentrifugeerd. Na het verwijderen van het supernatans werd 0,25 μ g/well secundair antilichaam toegevoegd en 20 min op ijs en in het donker geïncubeerd. Nadien werd 100 μ L/well kleuringsbuffer toegevoegd, gecentrifugeerd (3 min, 400 g, 4°C), het supernatans afgenomen, 200 μ L ijskoude PBS toegevoegd, opnieuw gecentrifugeerd (3 min, 400 g, 4°C), het supernatans afgenomen en de cellen geresuspendeerd in 200 μ L ijskoude PBS. De celsuspensies werden geanalyseerd met de flowcytometer (CytoFLEX). Er werden minimaal 4000 events opgenomen in de singlet populatie en vervolgens geanalyseerd met CytExpert software.

3.2.3. Immunodetectie met behulp van microscopie

Buffers en reagentia

- Primaire antilichamen: polykonaal konijn anti-APN immunoglobuline G (IgG) (*in-house*; zie 3.2.2) en irrelevant konijn IgG (*in-house*; zie 3.2.2); monokonaal muis anti-APN IgG (IMM013; zie 3.2.1) en muis IgG₁ isotype (*in-house*; zie 3.2.1)
- Secundaire antilichamen: FITC-gelabeld anti-konijn IgG (Sigma-Aldrich) en FITC-gelabeld anti-muis IgG (Sigma-Aldrich)
- Hoechst (Thermo Fisher Scientific)
- Monteervloeistof: 9,5 M glycerine (VWR); 223 mM 1,4-diazabicyclo[2.2.2]octaan (DABCO; Sigma-Aldrich) in PBS

Werkwijze

Om de APN expressie na te gaan werden cellen geteld en uitgeplant in een 24-well plaat aan een concentratie van $2,5 \cdot 10^5$ cellen/mL in een volume van 1 mL en met een draagglaasje. In een eerste experiment werd na 16 uur incubatie bij 37°C en 5% CO₂ het celcultuurmedium vervangen door medium zonder of met de selectiemerker geneticine en verder geïncubeerd bij 37°C en 5% CO₂. In een tweede experiment werden de cellen rechtstreeks uitgeplant in medium met of zonder de selectiemerker. Wanneer een monolaag gevormd werd, werd het medium vervangen door differentiatie-medium en 24 uur later werden de monolagen gebruikt om de APN expressie via

immunodetectie te analyseren. Hiervoor werden de cellen gewassen met 500 μ L PBS en gefixeerd door 10 minuten te incuberen in 500 μ L 4% paraformaldehyde (KT). Na opnieuw te wassen met 500 μ L PBS werd 25 μ g polykonaal konijn anti-APN of irrelevant IgG toegevoegd in een volume van 250 μ L en 1 uur geïncubeerd bij KT. In een tweede experiment werd in dezelfde condities geïncubeerd met 1 of 10 μ g monokonaal muis anti-APN of isotype antilichaam. Na het wegwassen van deze primaire antilichamen met 500 μ L PBS, werd 250 μ L secundaire antilichamen toegevoegd in een 1/40 (anti-konijn) en een 1/50 (anti-muis) verdunning en één uur geïncubeerd bij KT in het donker. Tijdens de laatste 5 minuten werd Hoechst (10 μ g/mL) toegevoegd om de celkernen te kleuren. Na de dekglasjes te wassen met 500 μ L PBS werden ze gemonteerd op een draagglasje met monteervloeistof en onder de fluorescentiemicroscopie bekeken.

3.3. APN enzymatische activiteit test

De enzymatische activiteit van APN en de eventuele inhibitie hiervan door APN-specifieke monoklonale antilichamen werd nagegaan op zowel opgezuiverd porcien APN als op de IPEC-J2-APN cellijn.

Buffers en reagentia

- Varken APN (Sigma-Aldrich); stockoplossing = 370 μ g/mL in PBS
- Bestatine (Sigma-Aldrich); stockoplossing = 1 mM in H₂O
- Substraat: L-Leucine-p-nitroanilide (Sigma-Aldrich); stockoplossing = 99,5 mM in EtOH (VWR)
- Antilichamen: anti-APN monoklonale antilichamen (IMM013, H1F10, H2B8, C5C8, H1H6, C5C4, F1B7; *in-house*; zie 3.2.1)

Werkwijze celgebaseerde test

IPEC-J2-APN cellen werden geplant in een 96-well plaat aan een concentratie van $1 \cdot 10^5$ cellen/well in 200 μ L medium in aan- of afwezigheid van de selectiemerker geneticine. Vervolgens werden de cellen geïncubeerd bij 37°C en 5% CO₂ tot een volledige monolaag gevormd werd. De cellen werden gewassen met 100 μ L PBS, waarna 100 μ L L-Leucine-p-nitroanilide werd toegevoegd aan een concentratie van 0, 1, 5 of 10 mM in PBS. Elke conditie werd drie keer herhaald. Na een incubatiestap van 45 minuten bij 37°C werd de optische densiteit bij 405 nm gemeten.

Nadat een substraatconcentratie gekozen werd, werd nagegaan of het wegwassen van de inhibitor voor het toedienen van het substraat een invloed had. De monolaag werd gewassen met 200 μ L PBS, waarna 50 μ L PBS werd toegevoegd. De 96-well plaat werd 10 min geïncubeerd bij 37°C, waarna de wells werden aangevuld met 25 μ L H₂O of bestatine in H₂O aan een finale concentratie van 1 mM. Na

een incubatie van 45 min bij 37°C werd een deel van de wells gewassen met 200 µL PBS en terug aangevuld met 50 µL PBS en 25 µL H₂O. Nadien werd overal 25 µL substraat toegevoegd aan finale concentraties van 0, 1 of 5 mM en na 45 min incubatie bij 37 °C werd de optische densiteit bij 405 nm gemeten. Elke conditie werd drie keer herhaald.

Om het effect van het APN-specifieke monoklonaal IgG IMM013 na te gaan op de enzymatische activiteit van APN, werden IPEC-J2-APN cellen geplant en geïncubeerd tot een volledige monolaag gevormd werd zoals hierboven beschreven. De monolaag werd vervolgens gewassen met 200 µL PBS (4°C) en na toevoegen van 75 µL PBS, werden de cellen 20 min geïncubeerd op ijs. De wells werden aangevuld met 25 µL PBS, IMM013 in PBS aan een uiteindelijke concentratie van 0, 0,1, 1 of 10 µg/mL, of bestatine (1 µM), gevolgd door een incubatie bij 4°C van 45 min. De cellen werden daarna gewassen met 200 µL PBS (4°C), waarna L-Leucine-p-nitroanilide aan een uiteindelijke concentratie van 0 of 1 mM in 100 µL PBS (37°C) werd toegevoegd. Na een incubatiestap van 55 min bij 37°C werd de optische densiteit bij 405 nm gemeten. Elke conditie werd twee tot drie keer herhaald. De resultaten werden gebruikt om de inhibitie (*I*) te berekenen volgens:

$$I (\%) = \frac{1 - (OD_{405,C} - OD_{405,A})}{OD_{405,B} - OD_{405,A}} \cdot 100$$

A = achtergrond; B = inhibitor of antilichamen met substraat; C = substraat

Met een tweezijdige enkelvoudige Wilcoxon *signed-rank* test werd nagegaan of een significant effect op de enzymatische activiteit waargenomen kon worden op een 95% betrouwbaarheidsniveau.

Werkwijze Enzyme-linked immuno sorbent assay (ELISA)-gebaseerde test

Een polysorp 96-well microtiter plaat werd gevuld met 50 µL/well PBS of APN aan een finale concentratie van 2 µg/mL, gevolgd door een incubatiestap van 20 min bij 37°C. Vervolgens werd 25 µL H₂O of bestatine in H₂O aan een finale concentratie van 1, 10 of 100 µM toegevoegd. Van elke conditie werden minstens twee technische herhalingen meegenomen in de analyse. Na 45 min incuberen bij 37°C werd 25 µL substraat toegevoegd aan een finale concentratie van 1, 5 of 10 mM. De 96-well platen werden geïncubeerd bij 37°C en op verschillende tijdstippen (5, 15, 30 en 45 minuten) werd de optische densiteit bij 405 nm gemeten (OD₄₀₅) met een SpectraFluor plus microplate reader (TECAN). Behalve IMM013 werden nog verschillende andere APN-gerichte monoklonale antilichamen (H1F10, H2B8, C5C8, H1H6, C5C4, F1B7) getest op hun invloed op de enzymatische activiteit van APN. Hiervoor werden de wells van een polysorp 96-well plaat gevuld met 50 µL PBS of APN in PBS aan een finale concentratie van 2 µg/mL, gevolgd door een incubatiestap van 20 min bij 37°C. Vervolgens werd 25 µL PBS, de antilichamen in PBS (0,1, 1 en 10 µg/mL) of bestatine (1 µM) toegevoegd. Na 45 minuten incuberen bij 37°C werd 25 µL L-Leucine-p-nitroanilide toegevoegd aan een finale concentratie van 1 mM. De 96-well platen werden geïncubeerd bij 37°C en na 45 min werd de optische densiteit bij 405

nm gemeten. Het percentage inhibitie I werd berekend uit de optische dichtheid zoals hierboven beschreven en ook hier werd een tweezijdige enkelvoudige Wilcoxon *signed-rank* test uitgevoerd (95% significantie).

3.4. ERK fosforylatie door *crosslinking* van APN

In het volgende experiment werd een poging gedaan om een verschil in fosforylatie van ERK te detecteren in de IPEC-J2-APN cellijn na *crosslinking* door monoklonale of polyklonale immunoglobulinen (Ig). Hiervoor werd eerst de optimale concentratie van polykloonaal anti-APN Ig bepaald (zie 3.2.2). Nadien werden verschillende condities uitgetest op de IPEC-J2-APN cellijn, waarbij zowel polyklonale (pAb) als monoklonale (mAb) antilichamen met of zonder *crosslinking* door een secundair Ig gebruikt werden. Deze cellen werden gelyseerd, de eiwitconcentratie van de lysaten bepaald en met behulp van natriumdodecylsulfaat (SDS) polyacrylamidegelelelektroforese (PAGE) en Western blotting werden de eiwitten uit de lysaten gescheiden en op een membraan gebracht. Met behulp van immunodetectie kon tubuline, de totale hoeveelheid ERK en de hoeveelheid gefosforyleerd ERK (pERK) gevisualiseerd worden, waarna deze resultaten kwantitatief geanalyseerd werden.

3.4.1. *Crosslinking* van APN

Buffers en reagentia

- Primaire antilichamen: polykloonaal konijn anti-APN immunoglobuline G (IgG) (*in-house*; zie 3.2.2); irrelevant konijn IgG (*in-house*; zie 3.2.2); monokloonaal muis anti-APN IgG (IMM013; zie 3.2.1)) en muis IgG₁ isotype controle (*in-house*; zie 3.2.1)
- Secundaire antilichamen: geit anti-konijn IgG (Sigma-Aldrich) en konijn anti-muis Ig (DakoCytomation)
- TNE buffer: 50 mM Tris-HCl (pH 7,4); 100 mM NaCl; 0,1 mM EDTA in H₂O
- Lysebuffer: 0,5 mg/mL protease inhibitor cocktail (Roche); 1,43% Nonidet P-40 substituuut (Roche) in TNE buffer

Werkwijze

Het protocol om de *crosslinking* van APN op de IPEC-J2-APN cellijn te veroorzaken, werd opgesteld op basis van experimenten rond *crosslinking* van APN op monocytten [95, 110]. IPEC-J2-APN cellen werden geplant aan $2,5 \cdot 10^5$ cellen/well in een 24-well plaat en geïncubeerd bij 37°C en 5% CO₂ tot een volledige monolaag bekomen werd, waarna het celmedium vervangen werd door differentiatiedium. Voor de verdere analyse werd ook telkens differentiatiedium gebruikt. Ongeveer 7 dagen na het planten

werden de cellen twee keer gewassen met 500 μL ijskoud medium. Nadien werden de primaire antilichamen toegevoegd in duplicaat aan een concentratie van 10 $\mu\text{g}/\text{well}$ in 250 μL medium en werden de cellen 30 min geïncubeerd bij 4°C. Na drie keer wassen met 500 μL ijskoud medium werd 250 μL medium met of zonder secundaire antilichamen toegevoegd aan een concentratie van 10 $\mu\text{g}/\text{well}$. Na een incubatie van 15 minuten bij 4°C werden de cellen drie keer gewassen met 500 μL ijskoud medium, waarna 500 μL warm medium (37°C) werd toegevoegd. De cellen werden voor 5, 10, 15 of 30 min of 24 uur bij 37°C in de incubator geplaatst, waarna de cellen op ijs geplaatst werden. Het medium werd vervangen door 200 μL lysebuffer. Na 20 minuten werden de cellen losgeschraapt en minstens 20 keer door een 21G naald gezogen. Nadien werden de lysaten ingevroren, ontdooid en voor 5 minuten gecentrifugeerd bij 18626 g en 4°C.

De concentratie van de lysaten werd bepaald via een BCA-reactie zoals beschreven in 3.2.1. De lysaten werden 3/4 verdund met een 4x ladingsbuffer. Nadien werden de stalen gedenuatureerd door deze 5 minuten bij 95°C te plaatsen en opnieuw ingevroren of meteen gebruikt voor verdere analyse.

3.4.2. SDS-PAGE en Western blotting

Buffers en reagentia

- Scheidingsgel (12%); Stockoplossing (10 mL) = 3,4 mL H_2O ; 4,0 mL 30% acrylamide/bisacrylamide (29:1; BioRad); 2,6 mL 1,5 M Tris-base (VWR) in H_2O (pH 8,8); 100 μL 347 mM SDS (Promega) in H_2O ; 100 μL 438 mM ammonium persulfaat (APS; BioRad); 4 μL tetramethylethyleendiamine (TEMED; GE Healthcare)
- *Concentratiegel* (4%); Stockoplossing (5 mL) = 3,05 mL H_2O ; 1,25 mL 0,5 M Tris-base (VWR) in H_2O (pH 6,8); 50 μL 347 mM SDS (Promega); 650 μL 30% acrylamide/bisacrylamide (29:1; BioRad); 50 μL 438 mM ammonium persulfaat (APS; BioRad); 10 μL tetramethylethyleendiamine (TEMED; GE Healthcare)
- Isopropanol (Promega)
- SDS-PAGE loopbuffer: 24,8 mM Tris-base (VWR); 192 mM glycine (Sigma-Aldrich); 3,5 mM SDS (Promega) in H_2O
- Proteïne standaard: MagicMark XP Western blot proteïne standaard (ThermoFisher)
- MeOH (VWR)
- Transferbuffer: 50 mM glycine (Sigma-Aldrich); 25 mM Tris-base (VWR); 20% MeOH (VWR) in H_2O
- Blokkbuffer: 5% magere melkpoeder (Elk); 0,2% Tween80 (Merck) in PBS
- Tris-gebufferde zoutoplossing (TBS; pH 7,4): 25 mM Tris-base (VWR); 1,37 M NaCl (VWR); 26,8 mM KCl (Calbiochem) in H_2O

- Primaire antilichamen: anti-ERK of anti-gefosforyleerd ERK Ig (Cell signaling technology) en HRP-gelabeld anti-tubuline IgG (Abcam)
- Secundaire antilichamen: Horseradish peroxidase (HRP)-gelabeld varken anti-konijn IgG (DakoCytomation) en HRP gelabeld geit anti-konijn IgG (DakoCytomation)
- Antilichaam bindingsbuffer: 5% BSA (Sigma-Aldrich); 0,1% Tween20 (Sigma-Aldrich) in TBS
- Detectie reagent 1: peroxide oplossing (Pierce ECL *Western blotting substrate*; ThermoScientific)
- Detectie reagent 2: *luminol enhancer* oplossing (Pierce ECL *Western blotting substrate*; ThermoScientific)
- PBS-T: 0,2% Tween20 (Sigma-Aldrich) in PBS

Werkwijze

De gels werden aangemaakt tussen glaasjes met een opening van 1,5 mm die werden vastgezet in een houder. De scheidingsgel stockoplossing werd aangemaakt, waarbij APS en TEMED als laatste werden toegevoegd, en tussen de glaasjes gebracht tot ongeveer 5 cm hoogte. Bovenop de scheidingsgel werd 1 mL isopropanol gebracht. Na 30 min, als de gel gestold was, werd 1 mL H₂O toegevoegd en verwijderd met de isopropanol. De concentratiegel werd aangemaakt en bovenop de scheidingsgel gebracht, samen met een kammetje met 10 slotjes. Na het stollen van de concentratiegel bovenop de scheidingsgel werden de gels overgebracht in een buffertank met SDS-PAGE loopbuffer. De stalen (6,8 µg) en de proteïne standaard (4 µL) werden geladen in de slotjes van de concentratiegel en de SDS-PAGE werd gestart aan 80 V. Na 5 tot 10 min werd het voltage verhoogd tot 120 V en na 1 à 2 uur, wanneer het front de onderzijde van de gel bereikt had, werd de SDS-PAGE stopgezet. Voor elke gel werd een polyvinylideenfluoride (PVDF) membraan (GE Healthcare) geactiveerd in MeOH. De SDS-PAGE gels werden overgebracht in blotting houders met hierin de gel met het membraan en langs weerszijden vier whatman papertjes (GE Healthcare) en twee vezeldoeken. Alle materialen buiten het PVDF membraan werden op voorhand geweekt in transferbuffer. De blotting houders werd samen met een ijselement in een met transferbuffer gevulde buffertank geplaatst en de eiwitten werden voor 2 uur aan 80 V getransfereerd naar de PVDF membranen. Nadien werden de membranen 1 uur geschud in blokbuffer bij 4°C, drie keer gewassen met PBS-T en overnacht geïncubeerd bij 4°C en 140 rpm met een 1/1000 verdunning van de primaire antilichamen in antilichaam bindingsbuffer. Na opnieuw drie keer te wassen met PBS-T werden de membranen 1 uur geïncubeerd op de schudplaat bij 4°C in een 1/1000 verdunning van het varken secundair IgG of een 1/3000 verdunning van het geit secundair IgG (met of zonder 1/5000 verdund anti-tubuline IgG). De membranen werden drie keer gewassen met PBS-T en 500 µL detectie reagent 1 en 500 µL detectie reagent 2 werden samengevoegd op het

membraan en gedurende 1 min over het membraan gepipetteerd. De chemiluminescentie werd gemeten met het *Chemidoc imaging system* (BioRad).

De bekomen afbeeldingen werden geanalyseerd met Image lab analyse software (BioRad). Hierbij werd het geïntegreerd volume (V_i) van het gemeten signaal bij elk bandje gebruikt om de *relative fold change* (RFC) van ERK fosforylatie te berekenen volgens:

$$RFC_A = \frac{V_{i,pERK,A} / V_{i,pERK,C}}{V_{i,ERK,A} / V_{i,ERK,C}}$$

A = staal; C = negatieve controle

3.5. ERK fosforylatie na opname van APN-gerichte micropartikels in darmepitheelcellen

Om aan te tonen dat monoklonale antilichamen gericht tegen APN opgenomen kunnen worden door darmepitheelcellen van het varken, werden anti-APN IgG en een isotype controle gekoppeld aan FITC-geladen micropartikels. Nadien werd de koppelingsefficiëntie nagegaan met behulp van flowcytometrie. De functionaliteit van de gekoppelde fluorescente microparels werd nagegaan door de opname van APN-geconjugeerde fluorosferen door de IPEC-J2-APN cellijn te analyseren met behulp van flowcytometrie en microscopie. Als laatste stap werd de ERK fosforylatie na binding met de antilichaam-gekoppelde fluorosferen nagegaan op analoge wijze als eerder beschreven.

3.5.1. Koppeling van monoklonale antilichamen aan fluorosferen

Buffers en reagentia

- Fluorosferen: Carboxylaate fluorosferen (1,0 μm ; geel-groen 505/515; Life technologies)
- MES-buffer (pH 6): 0,1 M 2-(N-morpholino)ethaansulfonzuur (Fluka) in H_2O
- EDC: 1 mM 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide (Sigma-Aldrich) in MES-buffer
- Sulfo-NHS: 2,5 mM sulfo-N-hydroxysuccinimide (Sigma-Aldrich) in MES-buffer
- Proteïne G oplossing: 125 $\mu\text{g}/\text{mL}$ proteïne G (Sigma-Aldrich) in PBS
- PEG-NH₂: 200 mg/mL polyethyleenglycolamine (Sigma-Aldrich) in PBS
- Glycine-oplossing: 444 mM glycine (Sigma-Aldrich) in H_2O
- Antilichaam-bindingsbuffer (pH 8,2): 50 mM natriumboraat (Vel) in H_2O
- Monoklonale antilichamen: IMM013 (zie 3.2.1) en een muis isotype IgG₁ (*in-house*; zie 3.2.1)
- *Crosslinking* buffer (pH 8,2): 380 mM triethanolamine hydrochloride (Sigma-Aldrich) in H_2O
- DMP (pH 8-9): 20 mM dimethyl pimelimidaat (Sigma-Aldrich) in *crosslinking buffer*
- *Quenching* buffer (pH 8,2): 0,1 M ethanolamine hydrochloride (Sigma-Aldrich) in H_2O
- Zoutoplossing: 154 mM NaCl (VWR) in H_2O

Werkwijze

Fluorosferen ($9,1 \cdot 10^8$) werden aangelengd tot 2 mL met MES-buffer en gecentrifugeerd bij 5000 g voor 20 min bij 18°C. De micropartikels werden een tweede keer gewassen met 2 mL MES-buffer en opnieuw gecentrifugeerd. Vervolgens werd de pellet geresuspendeerd in 800 µL MES-buffer en 2 min gesoniceerd om geaggregeerde partikels van elkaar los te maken. Hierna werd 100 µL EDC en 100 µL sulfo-NHS toegevoegd en gevortexed. De partikels werden 15 min geïncubeerd op een schudplaat aan 500 rpm bij KT, gecentrifugeerd (5000 g, 20 min, 18°C) en geresuspendeerd in 1 mL PBS (pH 7,4). Nadien werd opnieuw 5 min gesoniceerd en 500 µL proteïne G oplossing toegevoegd. Na vortexen werden de partikels op een schudplaat geplaatst en overnacht geïncubeerd bij 4°C en 500 rpm. Na deze incubatiestap werd 50 µL PEG-NH₂ toegevoegd en 30 min zacht geschud bij KT. Vervolgens werd 450 µL glycine-oplossing toegevoegd en opnieuw voor 30 min bij KT geïncubeerd op de schudplaat. De partikels werden gecentrifugeerd (5000 g, 20 min, 18°C) en gewassen in 2 mL antilichaam-bindingsbuffer, waarna de partikels gecentrifugeerd (5000 g, 20 min, 18°C) en geresuspendeerd werden in 100 µL antilichaam-bindingsbuffer. Dit werd gevolgd door een sonicatie van 2 minuten. Om vervolgens de fluorosferen aan de monoklonale antilichamen te koppelen werd 250 µg van deze antilichamen aangelengd met 900 µL antilichaam-bindingsbuffer, toegevoegd aan de partikels, en voor 45 min zacht geschud bij KT. Na centrifugatie (5000 g, 20 min, 18°C) werd de pellet geresuspendeerd in 900 µL antilichaam-bindingsbuffer en 100 µL *crosslinking* buffer. Vervolgens werd 1 mL DMP toegevoegd en gedurende 1 uur bij KT zacht geschud. Na centrifugatie (5000 g, 20 min, 18°C) werd de pellet geresuspendeerd in 1 mL *quenching* buffer en 10 minuten zacht geschud bij KT. Het proces werd vervolledigd door de fluorosferen na centrifugatie te wassen met 2 mL zoutoplossing, opnieuw te centrifugeren en ze te resuspenderen in 900 µL zoutoplossing. De concentratie werd bepaald door een standaardreeks met de oorspronkelijke fluorosferen op te stellen en de fluorescentie te meten bij 485 nm.

3.5.2. Koppelingsefficiëntie

Buffers en reagentia

- Gelabelde antilichamen: AlexaFluor (AF) 647 muis IgG₁ (isotype controle; Molecular probes) en AF647 geit anti-muis IgG (Molecular probes)
- varken IgG (*in-house*; opgezuiverd uit hitte-geïnactiveerd serum)

Werkwijze

Om de koppelingsefficiëntie te bepalen werden de antilichaam-gekoppelde fluorosferen bestudeerd met behulp van flowcytometrie. De micropartikels worden zoveel mogelijk afgeschermd van het licht om *photobleaching* te voorkomen. Fluorosferen ($5 \cdot 10^5$) werden in 100 μL PBS gebracht samen met 1/10 verdund isotype controle AF647-gelabeld muis IgG₁, 1/100 verdund AF647-gelabeld geit anti-muis IgG of 5 μg varken IgG om vrije bindingsplaatsen op de fluorosferen te blokkeren, en gedurende 30 min bij kamertemperatuur geïncubeerd. Bij de fluorosferen die de blokkeringsstap ondergingen werd het AF647-gelabeld geit anti-muis IgG toegevoegd in PBS aan een uiteindelijke verdunning van 1/100. Deze laatste werden opnieuw 30 min bij KT geïncubeerd. Alle fluorosferen werden twee keer gecentrifugeerd bij 5000 g gedurende 20 min en geresuspendeerd in 200 μL PBS. Hierna werden de partikels geanalyseerd met de flowcytometer (FACS Aria III). Er werden minimaal 1500 events opgenomen in de singlet FITC⁺ populatie en vervolgens geanalyseerd met FACSDiva 6.1.3 software. Onbehandelde partikels werden gebruikt om de selectie op punt te stellen.

3.5.3. Functionaliteit van de anti-APN micropartikels

3.5.3.1. Flowcytometrie

Werkwijze

IPEC-J2-APN cellen werden geplant in een 96-well plaat (10^5 cellen/well) of een 24-well plaat ($2,5 \cdot 10^5$ cellen/well) en geïncubeerd bij 37°C en 5% CO₂ tot een volledige monolaag bekomen werd. Het gemiddeld aantal cellen per well werd vooraf bepaald. De cellen werden eerst twee keer gewassen met 200 μL (96-well) of 1 mL (24-well) cultuurmedium, waarna 10^6 of $2,5 \cdot 10^6$ fluorosferen/well (96-well; respectievelijk 20 of 50 fluorosferen/cel; 25 of 50 μL) in duplicaat of $6 \cdot 10^6$ fluorosferen/well (24-well; 20 fluorosferen/cel; 250 μL) aan de cellen werden toegevoegd. Na een incubatiestap bij 37°C en 5% CO₂ gedurende 30, 60, 180 of 360 min, werden de cellen twee maal gewassen met 200 μL (96-well) of 1 mL (24-well) medium. Vervolgens werden de cellen losgemaakt door ze te incuberen in 100 μL (96-well) of 200 μL (24-well) trypsinebuffer gedurende ongeveer 10 min bij 37°C en 5% CO₂. Hierdoor worden de eiwitten aan de buitenkant van de cel en de antilichamen op de micropartikels afgebroken, zodat normaal geen partikels meer kunnen binden. Vervolgens werden de cellen gecollecteerd in een 96-well V-plaat samen met 100 μL PBS (4°C) (96-well) of in epjes (24-well). Na één (24-well) of twee (96-well) centrifugatie- (400 g, 10 min, 4 °C) en wasstappen met 200 μL koude PBS werden de cellen geanalyseerd met de flowcytometer (FACS Aria III). Er werden minimaal 3000 events opgenomen in de singlet populatie en vervolgens geanalyseerd met FACSDiva 6.1.3 software. Voor alle condities werd een eenzijdige tweevoudige Wilcoxon *signed-rank* test uitgevoerd (95% significantie).

3.5.3.1. Microscopie

Buffers en reagentia

- Antilichamen: anti-EGF receptor monoklonaal antilichaam (Sigma-Aldrich) en TexasRed (TR) gelabeld anti-muis IgG (Invitrogen)

Werkwijze

De opname van de partikels werd ook gevisualiseerd met behulp van de fluorescentiemicroscopie. Hiervoor werden IPEC-J2-APN cellen geplant in een 24-well plaat met dekglasjes aan een concentratie van $2,5 \cdot 10^5$ cellen per well in een volume van 1 mL en na twee dagen incubatie bij 37°C en 5% CO₂ werd het celmedium vervangen door differentiatie-medium. Na 24 uur werden de cellen twee keer gewassen met 1 mL differentiatie-medium zonder EGF en werden ze geïncubeerd met $6,0 \cdot 10^6$ antilichaam-gekoppelde fluorosferen in een volume van 250 µL PBS, gevolgd door een incubatie van 6 uur bij 37°C. Nadien werden de cellen twee keer gewassen met 1 mL PBS en gefixeerd door 10 minuten te incuberen in 500 µL 4% PFA. Na tweemaal te wassen met 1 mL PBS werd een 1/500 verdunning van muis anti-EGF receptor IgG toegevoegd in een volume van 250 µL. De cellen werden 1 uur geïncubeerd bij 37°C en opnieuw gewassen. In een volume van 250 µL werd een 1/100 verdunning van een TexasRed-gelabeld anti-muis IgG toegevoegd. Er werd opnieuw 1 uur geïncubeerd bij 37°C en in de laatste 10 minuten werd Hoechst toegevoegd in een finale verdunning van 10 µg/mL om de kernen te kleuren. Vervolgens werd opnieuw twee keer gewassen met 1 mL PBS en werden de dekglasjes op een microscopieglasje gemonteerd met monteervloeistof. De opname van de fluorosferen werd bestudeerd met een fluorescentiemicroscopie.

3.5.4. ERK fosforylatie door binding van anti-APN micropartikels

Werkwijze

IPEC-J2-APN cellen werden geplant en in cultuur gehouden zoals beschreven in 3.4.1. Na wassen met ijskoude PBS werden de antilichaam-gekoppelde fluorosferen toegevoegd aan de IPEC-J2-APN monolagen aan een concentratie van 20 partikels/cel ($6,0 \cdot 10^6$ partikels/well) in 250 µL medium (ijskoud of 37°C). In een eerste experiment, waarbij de partikels koud werden toegevoegd werd voor 1 uur geïncubeerd bij 4°C, voorzichtig aangelengd tot 1 mL/well met warm medium en 5, 10, 15 of 30 min geïncubeerd bij 37°C en 5% CO₂. In een tweede experiment, waarbij de partikels warm werden toegevoegd, werd voor 1, 3 of 6 uur geïncubeerd bij 37°C en 5% CO₂. De cellen werden op ijs geplaatst en het medium werd vervangen door 200 µL lysebuffer. Het maken van de cellysaten en verdere analyse van ERK fosforylatie verliep zoals eerder beschreven in 3.4.

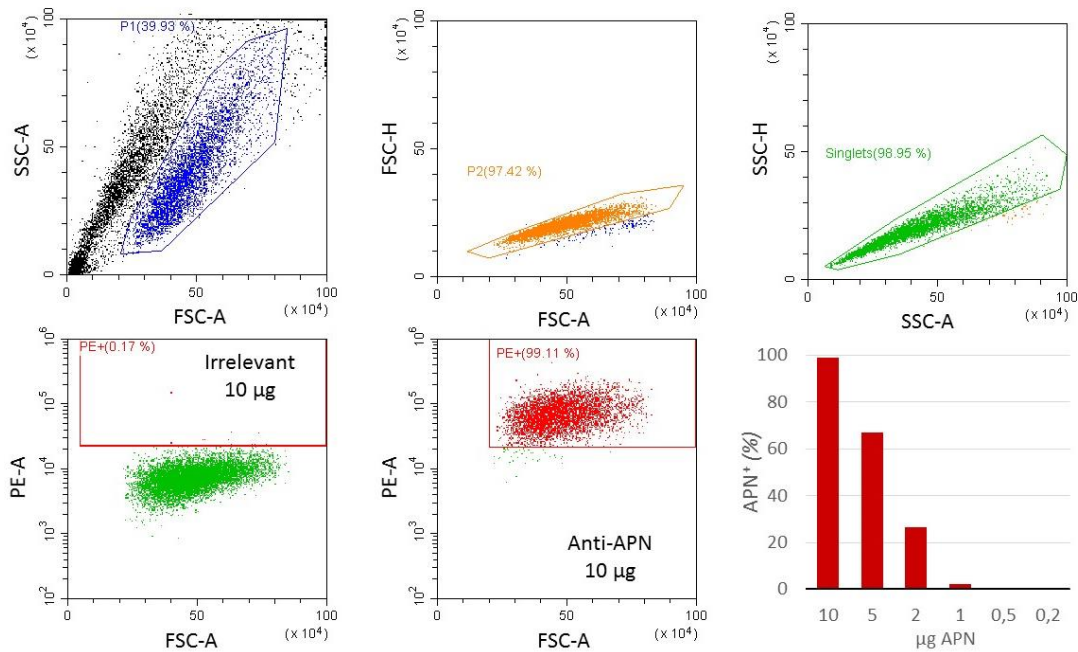
4. Resultaten

4.1. Doelstelling

In de zoektocht naar een oraal vaccin, dat efficiënt opgenomen wordt door darmepitheel, zou het selectief richten van vaccin antigenen naar aminopeptidase N aanwezig op het intestinaal epitheel, een belangrijke stap voorwaarts kunnen betekenen. Dit selectief richten naar APN kan gebeuren met behulp van APN-specifieke monoklonale antilichamen. Recent onderzoek heeft inderdaad aangetoond dat het richten van antigeen-geladen micropartikels naar APN resulteerde in een verhoogde opname van deze partikels door het intestinaal epitheel. Bovendien leidde orale immunisatie van biggen met deze micropartikels tot een verhoogde antigeen-specifieke immuunrespons [85]. Aangezien APN in het darmepitheel een belangrijke rol speelt in de vertering van voedsel door peptiden af te breken, is het belangrijk om de invloed van deze antilichamen op de enzymatische activiteit van APN te onderzoeken. Bovendien heeft recent onderzoek bij humane monocytten aangetoond dat de binding van antilichamen aan APN resulteert in fosforylatie van ERK [110]. In deze masterthesis werd daarom nagegaan of eenzelfde mechanisme plaatsvindt in intestinale epitheelcellen om zo een beter inzicht te krijgen in de werking van APN-gerichte orale vaccins. Om dit te verwezenlijken werd gebruik gemaakt van een intestinale epitheelcellijn afkomstig van de dunne darm van het varken. Deze IPEC-J2 cellijn werd in vorig onderzoek stabiel getransfecteerd om APN tot expressie te brengen. Hier werd eerst de optimale concentratie van de antilichamen bepaald om APN op deze cellijn te detecteren.

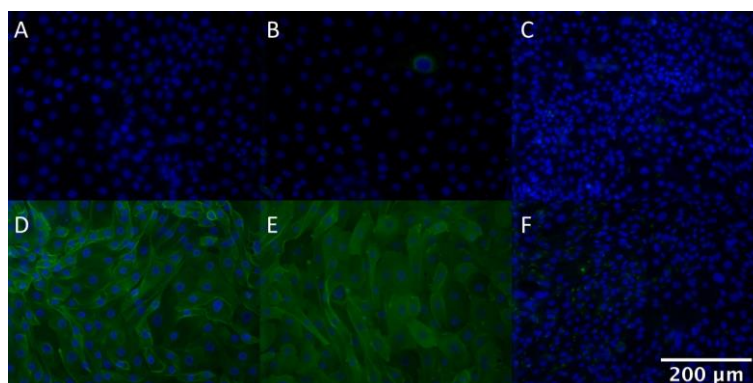
4.2. APN expressie door de IPEC-J2-APN cellijn

Het aminopeptidase N aanwezig op de IPEC-J2-APN cellen werd aangekleurd met anti-APN polyklonale IgG en geanalyseerd via flowcytometrie. De gemeten hoogte (H) en oppervlakte (A) in de zijwaartse (SSC) en voorwaartse verstrooiing (FSC) werden gebruikt om de enkelvoudige intestinale epitheelcellen te selecteren in SSC-A/FSC-A, FSC-H/FSC-A en SSC-H/SSC-A plots (Figuur 6). Hierna werd de APN⁺ populatie bepaald. Figuur 6 toont dat enkel een concentratie van 10 µg pAbs/10⁵ cellen alle cellen kan kleuren, terwijl bij 5 en 2 µg pAbs/10⁵ cellen het percentage APN⁺ cellen daalt tot respectievelijk 67% en 27% (zie ook bijlage Figuur A).



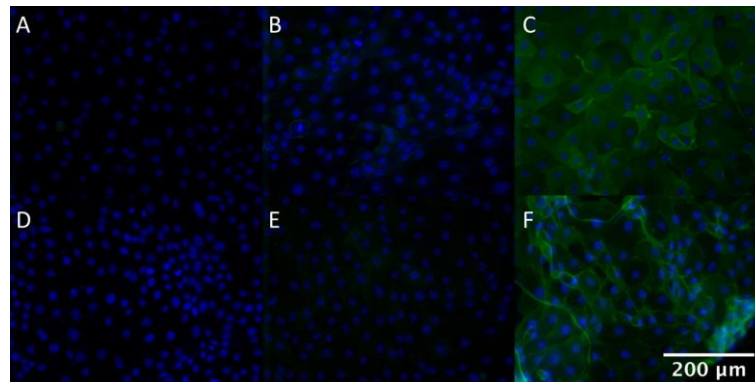
Figuur 6: Immunodetectie van APN op de IPEC-J2-APN cellen met behulp van polyklonale konijn anti-APN antilichamen via flowcytometrie. IPEC-J2-APN cellen ($1,0 \times 10^5$) werden aangekleurd met verschillende concentraties anti-APN pAb of irrelevant konijn IgG. Dit werd gedetecteerd met anti-konijn IgG/PE, waarna het percentage APN⁺ cellen werd bepaald.

Aangezien in verdere experimenten voornamelijk monolagen worden gebruikt in plaats van suspensiecellen, werd APN op de IPEC-J2 en IPEC-J2-APN cellijnen aangekleurd en gevisualiseerd met behulp van fluorescentiemicroscopie. Zoals weergegeven in Figuur 7, brengen alle IPEC-J2-APN cellen zoals verwacht APN tot expressie (Figuur 7D), terwijl slechts enkele IPEC-J2 cellen positief aankleuren (Figuur 7F). Om het effect van de selectiemerker na te gaan, werd de APN expressie eveneens bestudeerd op IPEC-J2-APN cellen die gedurende twee dagen in cultuur gehouden werden in afwezigheid van deze selectiemerker. In Figuur 7E is duidelijk zichtbaar dat de APN expressie niet daalt in afwezigheid van de selectiemerker.



Figuur 7: Visualisatie van APN expressie door de IPEC-J2-APN en IPEC-J2 cellijn met behulp van polyklonale konijn anti-APN antilichamen. **A-C:** irrelevant konijn IgG (25 µg); **D-F:** polykloonaal konijn anti-APN IgG (25 µg); **A, D:** IPEC-J2-APN in medium met selectiemerker; **B, E:** IPEC-J2-APN, 2 dagen in medium zonder selectiemerker; **C, F:** IPEC-J2.

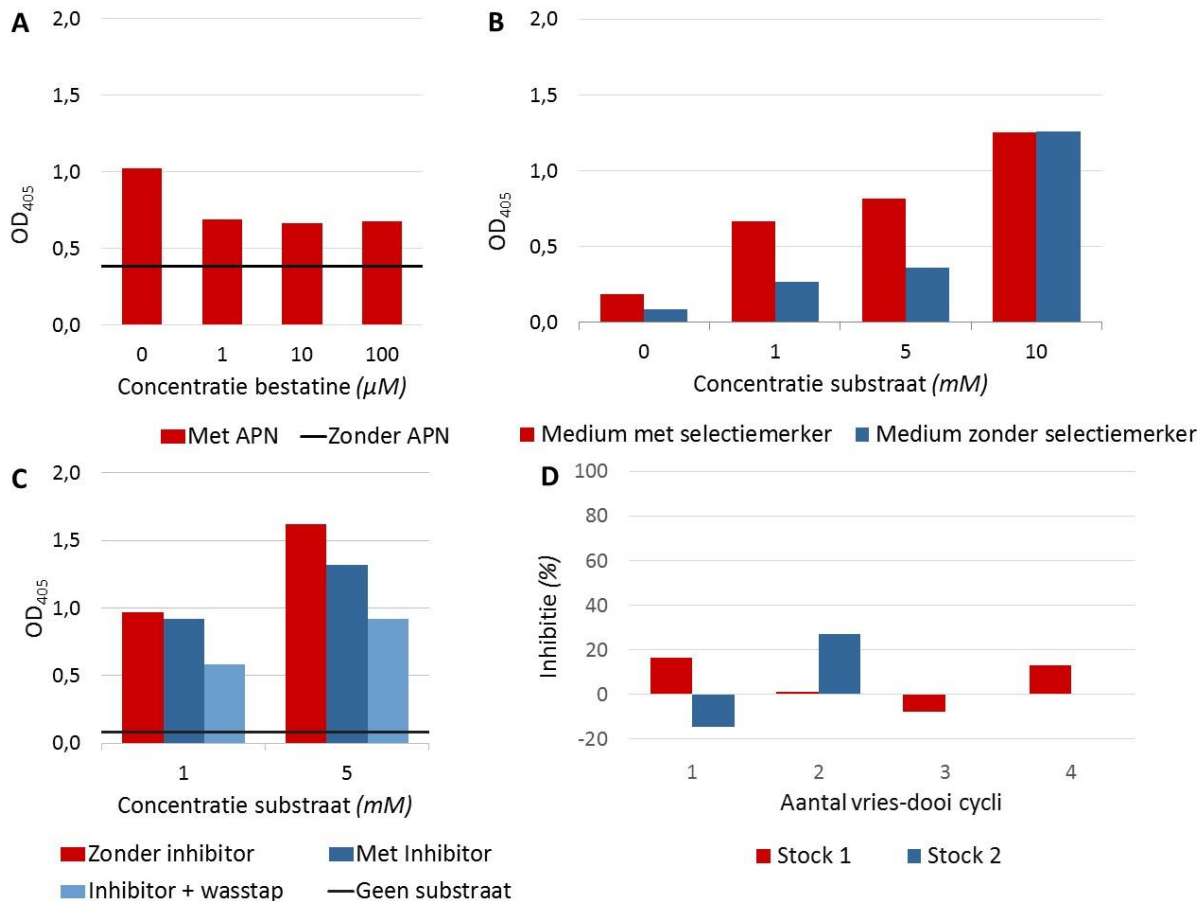
Behalve polyklonale antilichamen werd de expressie van APN door de IPEC-J2-APN ook geanalyseerd met behulp van een APN-specifiek monoklonaal antilichaam, IMM013. In Figuur 8 is duidelijk zichtbaar dat alle cellen APN tot expressie brengen (Figuur 8C). Indien slechts 1 μg IMM013 gebruikt werd, is geen duidelijke kleuring zichtbaar (Figuur 8B). Ook cellen die drie dagen op medium zonder selectiemerker gegroeid werden, hebben nog APN op hun oppervlak, al lijkt dit iets minder (Figuur 8F).



Figuur 8: Visualisatie van APN expressie door de IPEC-J2-APN cellijn met behulp van monoklonale muis anti-APN antilichamen. **A, D:** isotype controle (10 μg); **B, E:** IMM013 (1 μg); **C, F:** IMM013 (10 μg); **A-C:** IPEC-J2-APN in medium met selectiemerker; **D-F:** IPEC-J2-APN, 3 dagen in medium zonder selectiemerker.

4.3. APN-specifieke mAbs inhiberen de enzymatische activiteit van APN niet

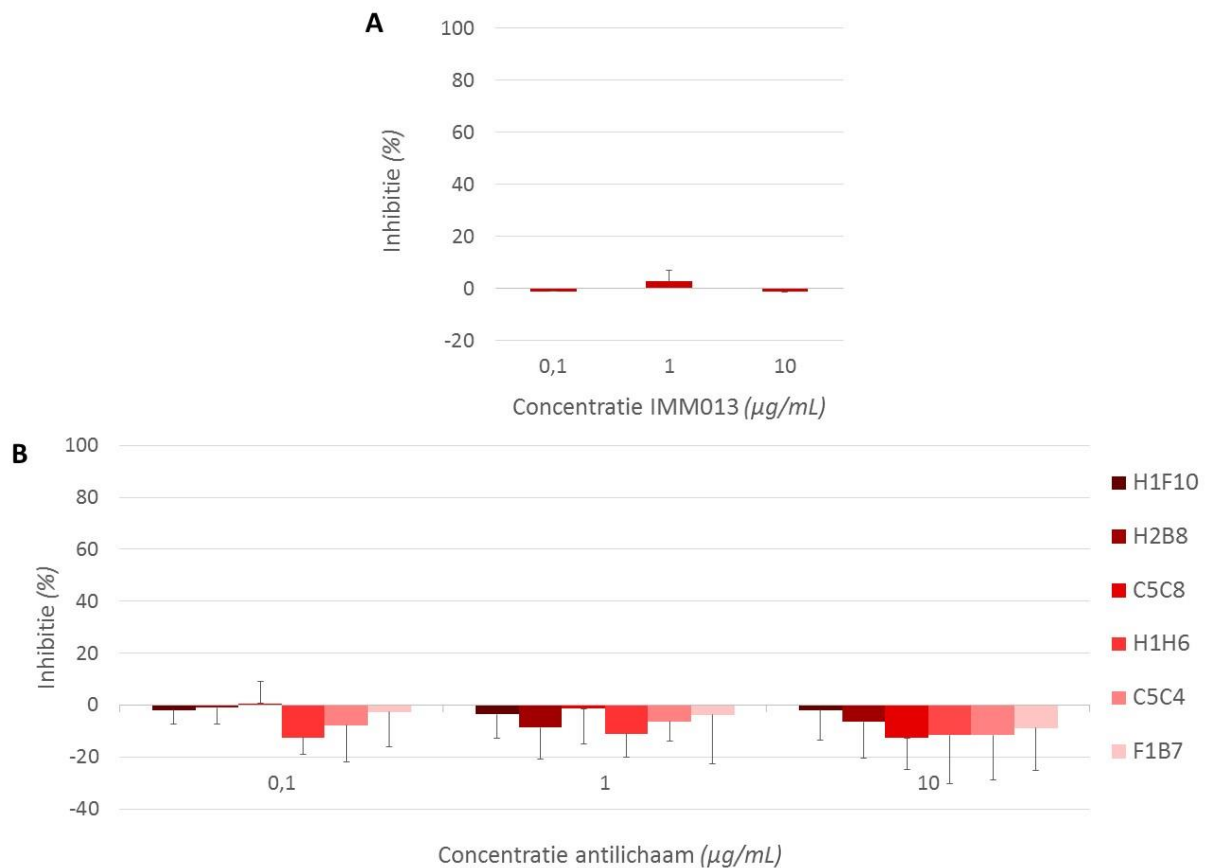
Om de invloed van de monoklonale antilichamen op de enzymatische activiteit van APN te bepalen werden een ELISA-gebaseerde en een celgebaseerde test eerst op punt gesteld. In de ELISA-gebaseerde test met APN afkomstig van de varkensnier en het L-Leucine-p-nitroanilide als substraat werden verschillende concentraties van de APN inhibitor bestatine [95] uitgetest. Hierbij was een duidelijke bestatine-afhankelijke daling in de optische densiteit zichtbaar (Figuur 9A). Aangezien hogere bestatineconcentraties geen verder effect hadden, werd 1 μM bestatine geselecteerd. Aangezien het APN-specifiek mAb IMM013, dat in de verdere analyses veel gebruikt wordt, varkensnier APN in ELISA niet goed herkent, werd een celgebaseerde test op punt gezet om de invloed van dit mAb op de enzymatische activiteit van APN na te gaan. Hiervoor werden verschillende substraatconcentraties uitgetest. In Figuur 9B is een sterke substraatconcentratie-afhankelijke stijging in de optische densiteit zichtbaar. Omdat bij 10 mM gelvorming optrad en aangezien het verschil tussen 1 en 5 mM klein is, werd 1 mM als substraatconcentratie gekozen. Verder is er een verlaging in de enzymatische activiteit zichtbaar na incubatie in medium zonder selectiemerker. Ook werd het effect van een extra wasstap bepaald om effecten door interacties tussen het substraat en de ongebonden inhibitor uit te sluiten. Uit de resultaten blijkt dat de ongebonden inhibitor voor de incubatie bij 37°C zonder problemen weggewassen kan worden (Figuur 9C).



Figuur 9: Optimalisatie van de enzymatische testen. **A:** Optische densiteit na enzymatische activiteit van APN bij verschillende concentraties bestatine via de ELISA-gebaseerde test; **B:** Enzymatische activiteit van APN bij verschillende substraatconcentraties via de celgebaseerde test. De cellen werden gegroeid in medium met of zonder selectiemerker (13 dagen); **C:** Enzymatische activiteit van een IPEC-J2-APN cellijn onder invloed van 1 μM bestatine en de invloed van het wegwassen ervan voor incubatie bij 37°C; **D:** Inhibitie van de enzymatische activiteit van APN op een IPEC-J2-APN cellijn door 1 μM bestatine na verschillende vries-dooi cycli (stock 1: 1-4 cycli; stock 2: 1-2 cycli). De resultaten zijn weergegeven als het gemiddelde van technische herhalingen.

In de ELISA-gebaseerde test werd duidelijk aangetoond dat IMM013 bij geen enkele concentratie de enzymatische activiteit van APN op de IPEC-J2-APN cellijn inhibeerde (Figuur 10A). De andere APN-specifieke mAbs waren in een ELISA-gebaseerde test bij verschillende concentraties ook niet in staat om de enzymatische activiteit van APN te inhiberen (Figuur 10B).

In tegenstelling tot de optimalisatieproeven kon tijdens het testen van de mAbs geen inhibitie door bestatine vastgesteld worden in de ELISA- (inhibitie = $4 \pm 3\%$) en celgebaseerde (inhibitie = $7 \pm 19\%$) testen. Dit kan niet verklaard worden door een mogelijke degradatie van bestatine door opeenvolgende vries-dooi cycli, aangezien er geen duidelijke correlatie is tussen het aantal vries-dooi cycli van de bestatine stocks en het verliezen van de mogelijkheid tot inhibitie (Figuur 9D).



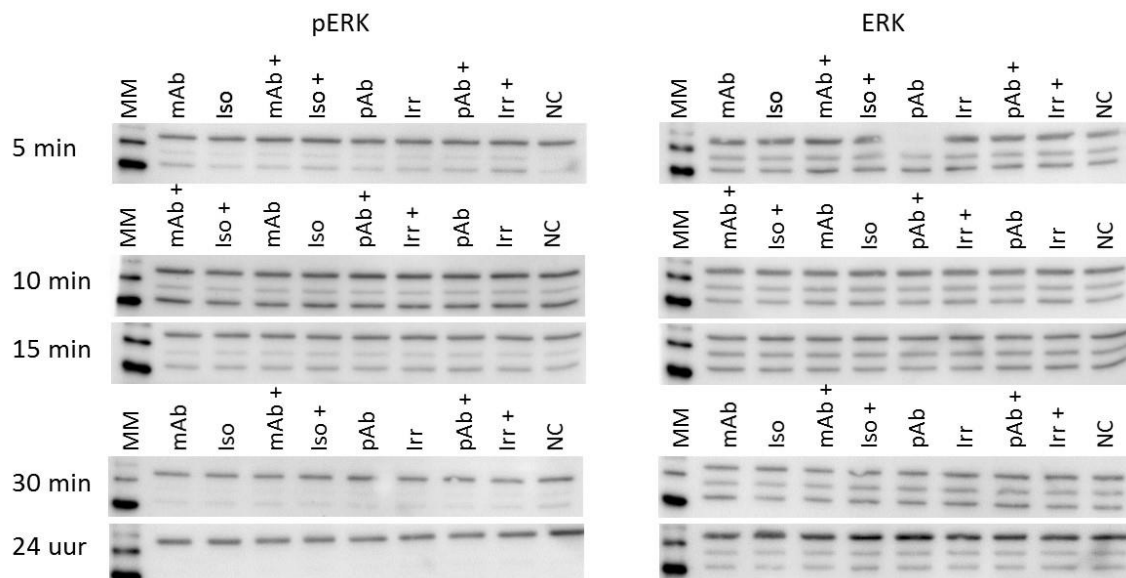
Figuur 10: **A:** De inhibitie van de enzymatische activiteit van APN op de IPEC-J2-APN cellijn door IMM013; **B:** De inhibitie van de enzymatische activiteit van APN door verschillende APN-specifieke monoklonale antilichamen. De data zijn weergegeven als het gemiddelde \pm de standaarddeviatie (A: $n = 4$, B: $n = 3$). Voor alle condities werd een eenzijdige tweevoudige Wilcoxon signed-rank test uitgevoerd (95% significantie).

4.4. ERK fosforylatie door *crosslinking* van APN

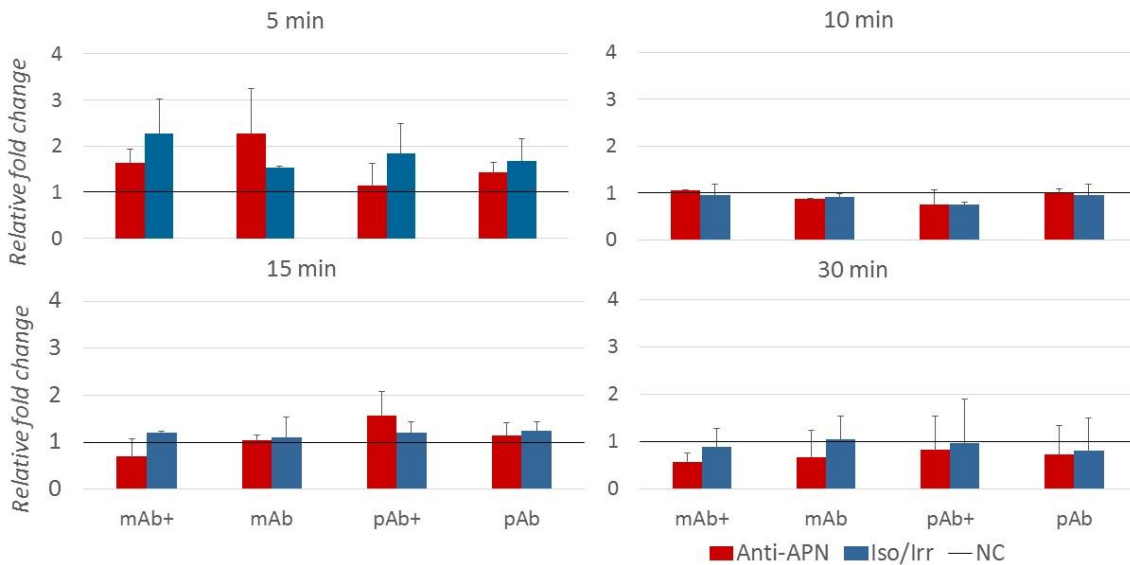
De APN-geïnduceerde signaaltransductie in epitheelcellen is nog niet gekend. Er werd echter in humane monocytten aangetoond dat de binding van mAbs aan CD13 resulteerde in de fosforylatie van de cytosolische staart van CD13 [95, 100, 110]. Dit gaf aanleiding tot de activatie van een signaaltransductieweg met onder meer fosforylatie van ERK. Om na te gaan of ERK fosforylatie ook een rol speelt in de APN-gemedieerde signaaltransductie in epitheelcellen, werden IPEC-J2-APN cellen behandeld met monoklonale of polyklonale antilichamen. De *crosslinking* van APN werd al dan niet verhoogd door het toedienen van secundaire antilichamen, waarna de ERK fosforylatie via Western blotting werd onderzocht.

Na incubatie van de cellen met de APN-specifieke mAbs of pAbs werden deze gelyseerd om met Western blotting de ERK1/2 fosforylatie (pERK) te bepalen. Daarenboven werd ook totaal ERK1/2 en tubuline gedetecteerd (Figuur 11, bijlage Figuur B en C). Deze blots werden gebruikt om de kinetiek van de *relative fold change* in ERK fosforylatie van de verschillende condities ten opzichte van de negatieve controle te bepalen (Figuur 12). Na 5 min incubatie bij 37°C is er een tweevoudige stijging in

de *relative fold change* zichtbaar bij de anti-APN mAbs ten opzichte van de negatieve controle (Figuur 12). Deze stijging in ERK fosforylatie bij het anti-APN mAb is hoger dan de isotype controle. Bij de andere tijdstippen werd geen stijging in ERK fosforylatie waargenomen. Om de antilichaam-gemedieerde *crosslinking* van APN te verhogen werden ook secundaire antilichamen toegevoegd. Hierbij werd na 5 min incubatie net meer ERK fosforylatie bij het isotype waargenomen. Ook hier werd bij de andere tijdstippen geen stijging in ERK fosforylatie waargenomen. Indien de cellen gedurende 5 min geïncubeerd werden met polyklonale antilichamen werd ERK fosforylatie geïnduceerd, maar op een APN-onafhankelijke wijze. Langere incubatietijden hadden geen invloed op ERK fosforylatie. Indien de APN *crosslinking* verhoogd werd, was na 15 min de stijging in ERK fosforylatie bij het anti-APN pAb hoger in vergelijking met het irrelevant. Na 24 uur was er voor alle condities nagenoeg geen ERK fosforylatie zichtbaar. Enkel het monoklonaal anti-APN antilichaam IMM013 is dus in staat om in epiteelcellen ERK fosforylatie te induceren na 5 min.



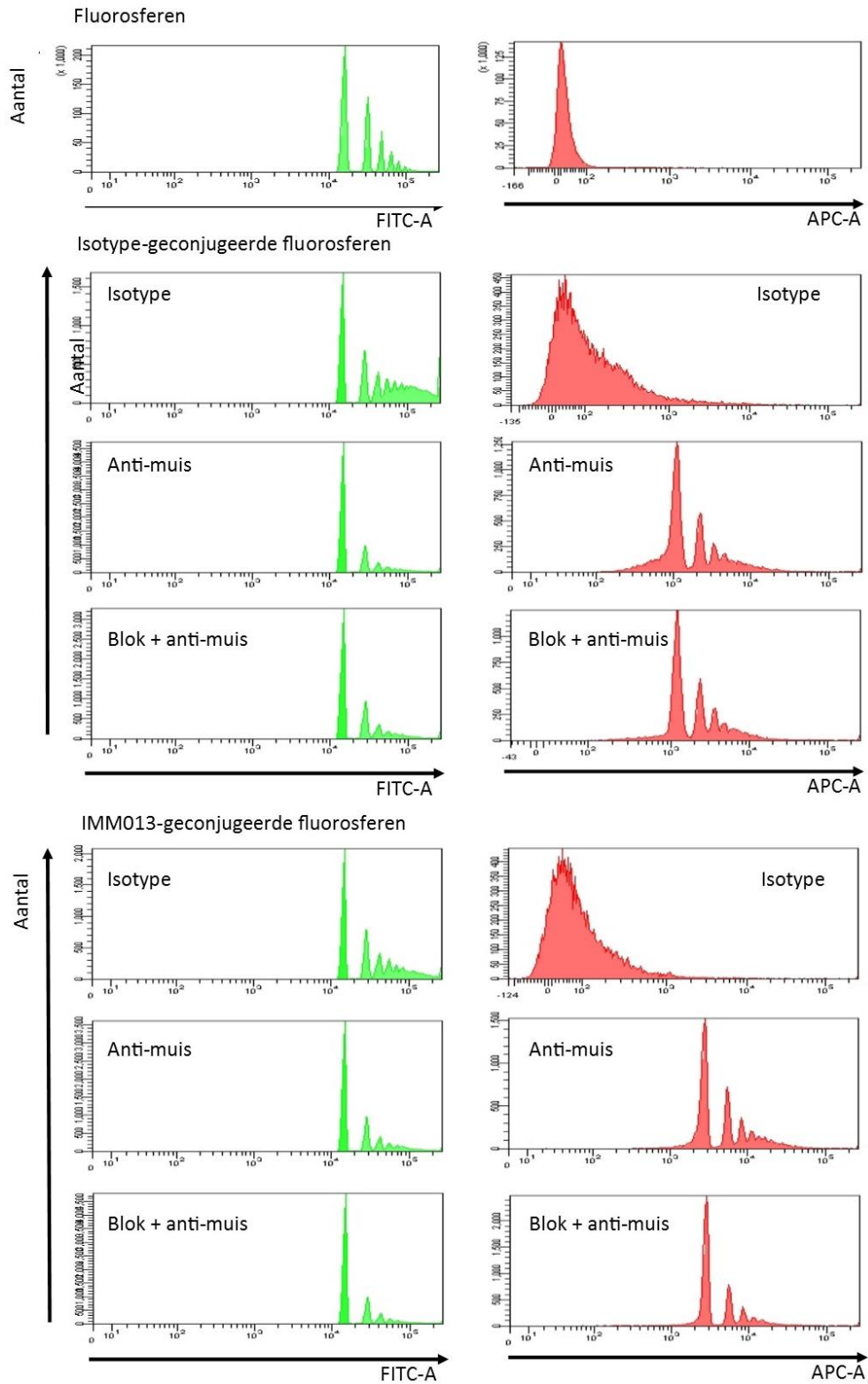
Figuur 11: APN-gemedieerde ERK1/2 fosforylatie in IPEC-J2-APN cellen. Cellen werden gelyseerd na verschillende incubatietijden met mAbs of pAbs met of zonder *crosslinking*. De cellysaten (6,8 μ g) werden onderworpen aan Western blotting en tubuline (50 kDa), gefosforyleerd of totaal ERK1/2 (44/42 kDa) werd gedetecteerd. MM: MagicMark (40 en 50 kDa); mAb: anti-APN mAb (IMM013); Iso: isotype; pAb: Anti-APN pAb; Irr: Irrelevant konijn IgG; NC: negatieve controle; +: *crosslinking*.



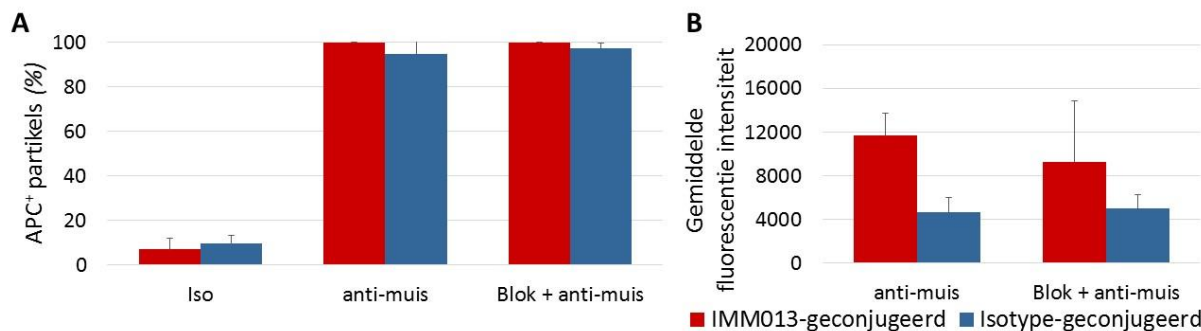
Figuur 12: Relative fold change in ERK fosforylatie in IPEC-J2-APN cellen na incubatie met mAbs of pAbs. Iso: isotype; Irr: Irrelevant konijn IgG; NC: negatieve controle; +: crosslinking. De data zijn weergegeven als het gemiddelde \pm de standaarddeviatie ($n = 2$).

4.5. ERK fosforylatie in darmepitheelcellen na opname van APN-gerichte micropartikels

Recent onderzoek heeft aangetoond dat de functionalisatie van micropartikels met APN-specifieke antilichamen de opname van deze micropartikels door intestinale epitheelcellen bevordert [85]. Deze micropartikels zijn echter opgebouwd uit β -glucanen, een micro-organisme geassocieerd moleculair patroon dat herkend kan worden door patroonherkenningsreceptoren, zoals dectine-1 en complement receptor 3 [122]. Aangezien intestinale epitheelcellen deze receptoren ook tot expressie brengen [123-126], kan de herkenning van deze β -glucanen door epitheelcellen interfereren met de activatie van signaalwegen door APN. Om de APN-gemedieerde signalisatie te kunnen correleren met opname, werden daarom inerte, FITC-geladen polystyreen micropartikels gefunctionaliseerd met APN-specifieke mAbs. De koppeling van deze mAbs aan de micropartikels werd nagegaan met behulp van flowcytometrie. De micropartikels werden gekleurd met AlexaFluor647-geconjugeerd anti-muis IgG of een isotype controle (Figuur 13-14, bijlage Figuur D). Deze data tonen duidelijk aan dat de micropartikels gekoppeld zijn met muis IgG₁ en het APN-specifiek mAb (>90%). Om een vals positief signaal, door binding van het detectie antilichaam aan vrij proteïne G, uit te sluiten, werden eventuele vrije bindingsplaatsen op het proteïne G geblokkeerd. Uit de data weergegeven in Figuur 13 en 14 kan besloten worden dat geen vrije bindingsplaatsen meer beschikbaar zijn. Wel is er een verschil zichtbaar in de gemiddelde fluorescentie in het APC kanaal tussen de isotype- en IMM013-geconjugeerde micropartikels. Er is duidelijk minder mAb gebonden aan de isotype-geconjugeerde micropartikels.

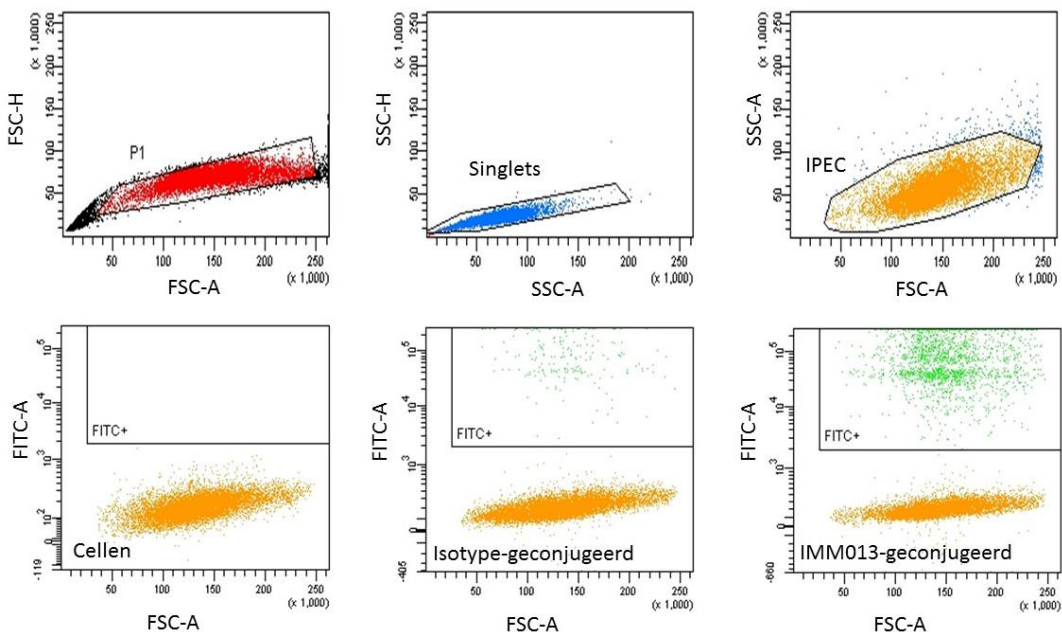


Figuur 13: Koppelingsefficiëntie van de mAbs aan de FITC-geladen micropartikels. Micropartikels ($5 \cdot 10^5$) werden aangekleurd met isotype IgG, anti-muis IgG₁-AF647 of geblokkeerd met irrelevant varken IgG. De histogrammen zijn representatief voor twee loten (zie bijlage Figuur D).



Figuur 14: Bepaling van de antilichaam koppelingsefficiëntie aan FITC-geladen micropartikels. Micropartikels ($5 \cdot 10^5$) werden aangekleurd met isotype IgG, anti-muis IgG₁-AF647 of geblokkeerd met irrelevant varken IgG. **A:** Percentage APC⁺ fluorosferen in de FITC⁺ populatie; **B:** Fluorescentie APC⁺ micropartikels in de FITC⁺ populatie. Iso: isotype controle; Blok: irrelevant varken IgG. De data zijn weergegeven als het gemiddelde \pm de standaarddeviatie ($n = 2$).

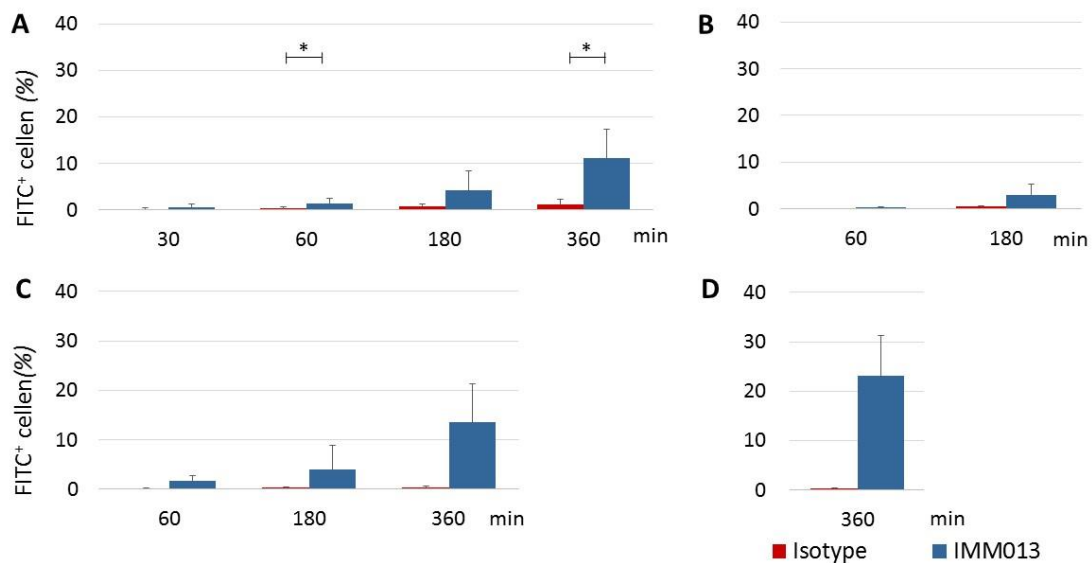
Om te functionaliteit van de APN-geconjugeerde micropartikels te bestuderen, werd hun opname door IPEC-J2-APN cellen geanalyseerd. IPEC-J2-APN monolagen werden geïncubeerd met verschillende concentraties mAb-gekoppelde partikels en de kinetiek van opname werd met flowcytometrie bestudeerd. De selectiestrategie om het aantal FITC⁺ cellen te bepalen is weergegeven in Figuur 15. Na exclusie van celaggregaten werden de intestinale varkensepitheelcellen geselecteerd in een FSC-A/SSC-A plot en vervolgens werd het percentage FITC⁺ cellen bepaald.



Figuur 15: Selectiestrategie van FITC⁺ cellen. De IPEC-J2-APN cellen werden gedurende 6u geïncubeerd met medium, isotype- of IMM013-geconjugeerde micropartikels.

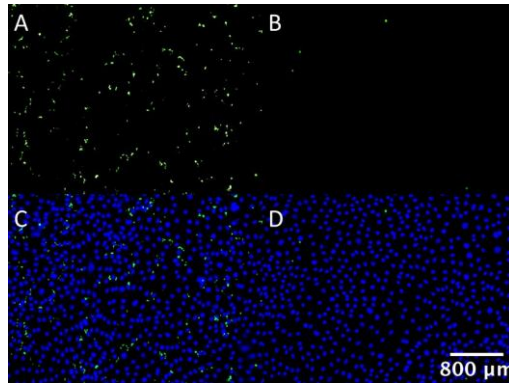
Na een incubatie van de IPEC-J2-APN monolagen met 20 micropartikels/cel in een volume van 50 μ L werd een duidelijke tijdsafhankelijke stijging waargenomen in het aantal cellen met opgenomen partikels (Figuur 16A). Bovendien werden partikels gericht naar APN significant beter opgenomen dan niet-gerichte partikels. Na 6 uur hebben $11 \pm 7\%$ van de cellen APN-gerichte partikels opgenomen,

terwijl slechts $1 \pm 2\%$ van de cellen de isotype-gekoppelde partikels heeft opgenomen. Een verhoging van het aantal partikels van 20 naar 50 partikels/cel resulteerde niet in een stijging van het aantal FITC⁺ cellen (Figuur 16B). Een verlaging van het incubatievolume van 50 naar 25 μL (bij 20 micropartikels/cel) resulteerde daarentegen wel in een kleine stijging van het aantal FITC⁺ cellen van $11 \pm 7\%$ naar $14 \pm 8\%$ (Figuur 16C). Bij de opschaling naar een 24-well plaat was een duidelijke stijging van het aantal FITC⁺ cellen van $14 \pm 8\%$ naar $23 \pm 9\%$ zichtbaar (Figuur 16D).



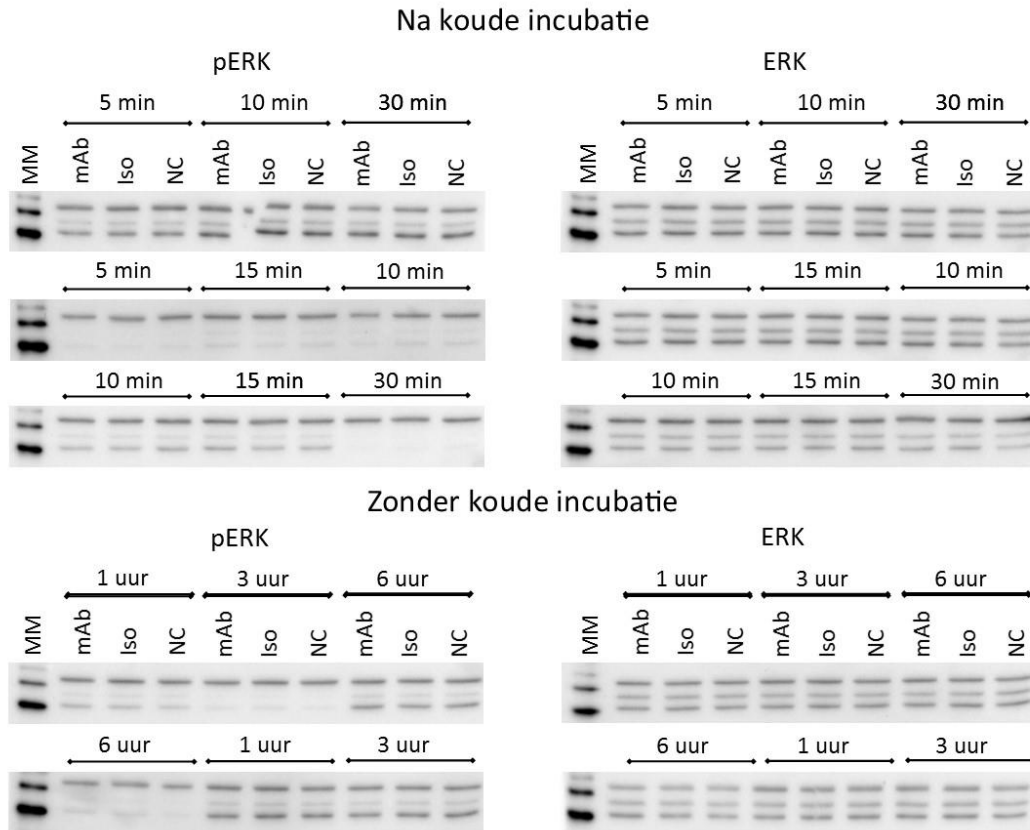
Figuur 16: Opname van mAb-geconjugeerde micropartikels door IPEC-J2-APN cellen na verschillende tijdstippen; **A:** 20 partikels/cel in 50 μL (96-well): 30 min ($n = 2$), 1 u ($n = 5$), 3 u ($n = 4$), 6 u ($n = 6$); **B:** 50 partikels/cel in 50 μL (96-well): $n = 2$; **C:** 20 partikels/cel in 25 μL (96-well): $n = 3$; **D:** 20 partikels/cel in 250 μL (24-well): $n = 2$. De data zijn weergegeven als het gemiddelde \pm de standaarddeviatie. Voor alle condities met meer dan 2 herhalingen werd een Wilcoxon two sample signed rank rest uitgevoerd (95% significantie). *: $p < 0,05$.

Als bevestiging van deze resultaten werden IPEC-J2-APN monolagen 6 uur geïncubeerd met 20 mAb-gekoppelde partikels/cel (250 μL ; 24-well) en gefixeerd voor visualisatie met behulp van microscopie. Zowel de kernen als de EGF-receptor werden gekleurd. De kleuring van de EGF-receptor was echter zwak, en de spectrale *bleed-through* afkomstig van de fluorosferen te sterk, zodat geen duidelijk beeld gevormd kon worden van de posities van de celmembranen. Hierdoor is het onderscheid tussen adhesie en opname moeilijk. Wel is een duidelijk hogere adhesie en opname van de APN-gerichte partikels door de IPEC-J2-APN cellen zichtbaar na 6 uur incubatie in vergelijking met de controle micropartikels (Figuur 17).

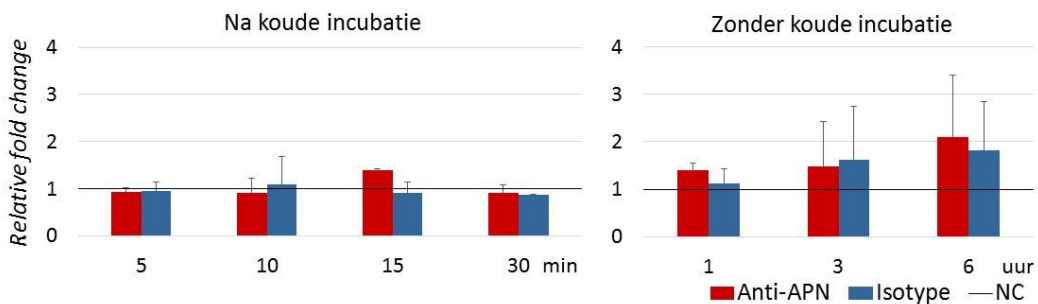


Figuur 17: Opname en adhesie van antilichaam-gekoppelde micropartikels door IPEC-J2-APN cellen; **A, C:** Anti-APN gekoppelde micropartikels; **B, D:** Isotype gekoppelde micropartikels. De kernen werden gekleurd met Hoechst (**C, D**).

Aangezien er geen duidelijke ERK activatie in intestinale epitheelcellen kon vastgesteld worden na *crosslinking* met monoklonale of polyklonale APN-specifieke antilichamen, werd nagegaan of mAbs geconjugeerd aan polystyreen partikels ERK kunnen activeren. Hiervoor werden twee strategieën uitgetest. In een eerste strategie werden de micropartikels bij 4°C geïncubeerd om adhesie aan de cellen toe te laten, gevolgd door een collectieve activatie door een temperatuurstijging naar 37°C. Bij de tweede strategie werden de micropartikels warm toegediend en langer geïncubeerd voor 1, 3 of 6 uur, aangezien bij eerdere experimenten (zie 4.5) na 6 uur opname van de partikels kon aangetoond worden. De Western blotting is weergegeven in Figuur 18. Bij activatie na koude incubatie is er enkel na 15 min een lichte stijging in de ERK fosforylatie zichtbaar na het toedienen van de APN-gerichte micropartikels in vergelijking met de controles. Indien de micropartikels warm toegediend werden, kon na 3 en 6 uur incubatie een lichte stijging in de ERK fosforylatie opgemerkt worden voor zowel de isotype- als anti-APN-geconjugeerde partikels. Na 1 uur is er ook bij de cellen behandeld met anti-APN-geconjugeerde partikels een lichte stijging in RFC zichtbaar. Er is dus ERK fosforylatie, maar dit proces lijkt niet APN-gemedieerd.



Figuur 18: APN-gemedieerde ERK1/2 fosforylatie in IPEC-J2-APN cellen. Cellen werden gelyseerd na verschillende incubatietijden (37°C) met antilichaam-geconjugeerde microparels, al dan niet vooraf gegaan door een koude incubatie (4°C). De cellysaten (6,8 µg) werden onderworpen aan Western blotting en tubuline (50 kDa), gefosforyleerd of totaal ERK1/2 (44/42 kDa) werd gedetecteerd. MM: MagicMark (40 en 50 kDa); mAb: anti-APN mAb-geconjugeerde microparels; Iso: isotype-geconjugeerde microparels; NC: negatieve controle.



Figuur 19: Relative fold change in ERK fosforylatie in IPEC-J2-APN cellen na verschillende incubatietijden (37°C) met antilichaam-geconjugeerde micropartikels, al dan niet vooraf gegaan door een koude incubatie (4°C). mAb: anti-APN mAb-geconjugeerde microparels; Iso: isotype-geconjugeerde microparels; NC: negatieve controle. De data zijn weergegeven als het gemiddelde ± de standaarddeviatie (5, 15, 30 min en 1, 3, 6 uur: n = 2; 10 min: n = 3).

5. Discussie

Recent onderzoek heeft aangetoond dat het selectief richten van antigeen-geladen micropartikels naar aminopeptidase N op intestinale epitheelcellen resulteerde in enerzijds een verhoogde opname van de partikels door het darmepitheel en anderzijds verhoogde antigeenspecifieke serum antilichaamresponsen [85]. APN speelt een rol in het knippen van peptidebindingen van verschillende substraten met een voorkeur voor N-terminale neutrale aminozuren van kleine peptiden en zou dus een rol kunnen spelen bij de voedselvertering in de dunne darm [94, 95]. Aangezien het uiteindelijke doel is om antigenen selectief te richten naar epitheliaal APN met behulp van antilichamen, is het belangrijk om na te gaan of deze APN-specifieke antilichamen geen negatieve invloed hebben op de enzymatische activiteit van APN in de darm. Hiervoor werden twee methodes, een ELISA- en een celgebaseerde test, op punt gesteld. Aan de hand van deze testen werd aangetoond dat de APN-specifieke monoklonale antilichamen, die aangemaakt werden aan de faculteit diergeneeskunde in Gent, geen inhiberende invloed hebben op de enzymatische activiteit van aminopeptidase N. Opmerkelijk genoeg werd bij deze testen geen duidelijke inhibitie door bestatine vastgesteld, alhoewel de concentratie vooraf werd geoptimaliseerd. Deze afname van het inhiberend vermogen van bestatine is niet te wijten aan het aantal vries-dooicycli van de stockoplossing. Aangezien bestatine minstens 2 jaar stabiel is bij -20°C, maar een langere tijd bewaard werd, bestaat de kans dat bestatine zijn stabiliteit verloren heeft [127]. Verder onderzoek is nodig om de oorzaak te vinden.

Om een beter inzicht te krijgen in de APN-gemedieerde reactie van epitheelcellen werd de kinetiek van ERK fosforylatie onderzocht. In humane monocytten induceert de antilichaam-gemedieerde *crosslinking* van APN namelijk ERK fosforylatie [95, 100, 110]. Hier werd een anderhalve, twee- of drievoudige stijging bekomen in ERK1 fosforylatie na respectievelijk 5, 15 en 30 min incubatie met APN-gerichte antilichamen, waarbij de *crosslinking* verhoogd werd door toevoegen van een F(ab)₂ fragment van een anti-muis IgG [110]. Na 5 min incubatie van de IPEC-J2-APN monolaag met antilichamen stijgt de ERK1/2 fosforylatie zwak in vergelijking met de negatieve controle. Het toevoegen van polyklonale antilichamen wekte geen hogere ERK1/2 fosforylatie op in vergelijking met irrelevant konijn IgG op alle onderzochte tijdstippen. Het verhogen van de *crosslinking* door toevoegen van anti-konijn IgG resulteerde enkel na 15 min in een licht verhoogde ERK1/2 fosforylatie in vergelijking met de negatieve controle en irrelevant konijn IgG. In tegenstelling tot de polyklonale antilichamen induceerden de APN-specifieke mAbs ERK1/2 fosforylatie na 5 min in vergelijking met de negatieve controle en de isotype controle. Op de andere tijdstippen werd deze verhoogde ERK1/2 fosforylatie niet waargenomen. Onverwachts resulteerde het verhogen van de APN *crosslinking* door toevoegen van anti-muis IgG niet in een verhoogde ERK1/2 fosforylatie.

Aangezien de APN-gemedieerde stijging in ERK1/2 fosforylatie klein is, zijn meer herhalingen nodig, eventueel aangevuld met kwantitatieve methoden, zoals ELISA, om significante resultaten en een duidelijker beeld te bekomen van deze APN-gemedieerde ERK fosforylatie in intestinale epitheelcellen. Omdat ERK1/2 fosforylatie zeer snel kan optreden en slechts op een beperkt aantal tijdstippen de ERK1/2 fosforylatie geanalyseerd werd, bestaat de mogelijkheid dat de piek van APN-gemedieerde ERK1/2 fosforylatie gemist werd.

Er werd nagegaan of APN *crosslinking* door APN-specifieke Abs gekoppeld aan micropartikels ERK1/2 fosforylatie kan induceren. De functionalisatie van β -gluucanpartikels met APN-specifieke antilichamen bevordert de opname van deze micropartikels door intestinale epitheelcellen [85]. Dit systeem kan echter niet gebruikt worden om de activatie van signaalwegen door APN in epitheelcellen te onderzoeken, aangezien β -glucanen herkend kunnen worden door patroonherkenningsreceptoren aanwezig op intestinale epitheelcellen [123-126]. Daarom werden mAb gekoppeld aan inerte FITC-geladen polystyreen micropartikels. De koppelingsefficiëntie van deze micropartikels werd geanalyseerd, waaruit bleek dat meer dan 90% van alle micropartikels mAbs op hun oppervlak bevatten. Er werd echter wel een verschil in de gemiddelde fluorescentie intensiteit opgemerkt tussen de isotype- en anti-APN-gekoppelde micropartikels, waardoor besloten kan worden dat minder mAbs gebonden zijn aan de oppervlakte van de isotype-geconjugeerde micropartikels in vergelijking met de anti-APN-geconjugeerde. Dit is mogelijk het gevolg van een foute concentratiebepaling van de gebruikte antilichaamstock.

Om de functionaliteit van de APN-gerichte micropartikels na te gaan, werden IPEC-J2-APN cellen geïncubeerd met de micropartikels en de opname geobserveerd. Na 6 uur incubatie in een 96-well plaat werd een significant grotere opname gedetecteerd van de anti-APN gebonden partikels in vergelijking met de isotype controle micropartikels ($11 \pm 7\%$; 20 partikels/cel). In tegenstelling met deze resultaten werden anti-APN mAb gefunctionaliseerde β -gluucanpartikels na 3 uur incubatie door dezelfde cellijn opgenomen, waarbij het aantal partikel positieve cellen 80, >60 en >30% bedroeg bij concentraties van respectievelijk 167, 42 en 10 partikels/cel (1 mL) in een 24-well plaat [85]. Bij opschaling naar een 24-well plaat steeg de opname van de APN-gerichte polystyreen micropartikels na 6 uur incubatie naar $23 \pm 9\%$ (20 partikels/cel; 250 μ L). Bij de opname van de β -gluucanpartikels werd echter een centrifugatiestap ingebouwd, waarbij de partikels tegen het celoppervlak werden geduwd. Dit was niet mogelijk bij de polystyreen partikels door hun kleinere massa. Deze verschillen in proefopzet, samen met het verschil in partikelgrootte tussen de β -gluucan (2-4 μ m) en polystyreen partikels (1 μ m) zouden aan de basis kunnen liggen van het dit verschil in opname van de micropartikels door de IPEC-J2-APN cellen.

Aangezien er geen duidelijke ERK1/2 activatie kon vastgesteld worden na *crosslinking* met monoklonale of polyklonale antilichamen, werd nagegaan of de APN-gerichte polystyreen micropartikels ERK1/2 fosforylatie konden induceren. Bij de strategie om eerst adhesie toe te laten bij een incubatiestap bij 4°C was er slechts een kleine stijging in ERK1/2 fosforylatie zichtbaar na 15 min incubatie bij 37°C met de APN-gerichte micropartikels. Meer herhalingen en meer tijdstippen zijn nodig om een duidelijker beeld te krijgen van de ERK1/2 fosforylatie opgewekt door APN-gerichte micropartikels. Ook kan het toedienen van meer micropartikels of een langere incubatietijd bij 4°C, mits de monolagen hierdoor niet loskomen, helpen om meer cellen te activeren.

Zonder deze koude incubatie induceren de mAb-geconjugeerde partikels een kleine stijging in ERK1/2 fosforylatie in vergelijking met de negatieve controle. Bij 3 en 6 uur incubatie werd er echter geen verschil waargenomen tussen de APN-gerichte en isotype micropartikels, waardoor deze effecten niet CD13-gemedieerd zijn. Na 1 uur is er wel een lichte stijging in ERK fosforylatie bij de APN-gerichte partikels zichtbaar.

6. Algemene conclusies

Speendiarree bij het varken vormt nog steeds een groot probleem en veroorzaakt een vertraagde groei en soms sterfte van biggen. Parenterale vaccinatiemethoden zijn niet in staat om een beschermende intestinale immuunrespons op te wekken, waardoor orale vaccinatie de meest aangewezen strategie blijft om biggen te beschermen tegen speendiarree. Orale vaccinatie wordt echter bemoeilijkt door een aantal hindernissen, waaronder de lage opname van antigenen door het darmepitheel. Om dit probleem te omzeilen kunnen antigenen met behulp van antilichamen selectief gericht worden naar aminopeptidase N (CD13), een apicale receptor op intestinale epitheelcellen. Aangezien APN in intestinale epitheelcellen functioneert als enzym bij de spijsvertering mogen de gebruikte antilichamen niet interfereren met dit proces. In deze masterproef werden verschillende anti-APN antilichamen getest en er werd geen invloed op de enzymatische activiteit van APN aangetoond. Dit wijst erop dat deze antilichamen mogelijk gebruikt kunnen worden om orale vaccins selectief te richten naar APN. Eerder werd aangetoond dat oraal toegediende anti-APN antilichamen opgenomen kunnen worden door het intestinaal epitheel en een immuunrespons kunnen induceren [84]. Net zoals bij humane monocytten zou de opname van anti-APN antilichamen door intestinale epitheelcellen gepaard kunnen gaan met ERK1/2 fosforylatie. Onze resultaten toonden een verhoogde ERK1/2 fosforylatie na binding van APN-specifieke monoklonale antilichamen aan de epitheelcellen, maar deze stijging was echter laag en meer herhalingen zullen nodig zijn om dit te bevestigen.

De ERK1/2 fosforylatie werd ook geanalyseerd na incubatie van intestinale epitheelcellen met APN-gerichte polystyreen partikels. Meer dan 99% van deze partikels hebben antilichamen op hun oppervlak en zijn functioneel, aangezien door het selectief richten naar APN significant meer micropartikels werden opgenomen door de epitheelcellen. Deze APN-gerichte micropartikels induceerden een lichte stijging in ERK1/2 fosforylatie 15 min na een voorafgaande incubatie bij 4°C of na 1 uur incubatie bij 37°C. De moeilijkheid ligt erin om voldoende cellen tegelijk te activeren om een betrouwbaar resultaat te verkrijgen. Als slechts een klein percentage van de cellen geactiveerd wordt, zal een verschil in ERK1/2 fosforylatie met de huidige methode naar alle waarschijnlijkheid niet gedetecteerd worden.

7. Toekomstperspectieven

Er is nog veel werk om de APN-gemedieerde signaaltransductie in varkensepitheelcellen op te helderen. In deze masterproef werd de activatie van ERK bekeken, maar er konden geen duidelijke effecten gedetecteerd worden. Mogelijk is de huidige detectiemethode onvoldoende gevoelig om kleine verschillen op te merken. Een alternatieve techniek die kwantitatiever is dan de gebruikte Western blotting is ELISA. Analoog aan de Western blotting wordt het gefosforyleerd ERK gekwantificeerd met behulp van pERK-specifieke antilichamen. Een ELISA kan uitgevoerd worden op de cellysaten, maar ook op intacte cellen na fixatie en permeabilisatie [128, 129]. Met een *Acumen laser scanning reader* kan de ERK1/2 fosforylatie in afzonderlijke cellen gevisualiseerd worden [130]. Hierdoor kunnen verschillen opgemerkt worden, indien bij slechts een klein percentage van de cellen APN-gemedieerde activatie optreedt, zoals het geval is na het toevoegen van APN-gerichte fluorescente micropartikels. Hierbij wordt het probleem dat de meerderheid van de cellen tegelijk geactiveerd moet worden omzeild. Een methode om dit proces volledig op afzonderlijke cellen te bekijken is flowcytometrie, waarbij tegelijk de opname van fluorescente partikels en ERK fosforylatie geanalyseerd kan worden [128]. De immunokleuring verloopt analoog aan deze bij ELISA, maar de cellen worden eerst losgemaakt voor ze worden gefixeerd, gepermeabiliseerd en het ERK en pERK aangekleurd wordt.

Momenteel kunnen we niet besluiten dat ERK1/2 fosforylatie een rol speelt in de APN-gemedieerde signaaltransductie in epitheelcellen. Eerdere experimenten hebben uitgewezen dat CD13-gemedieerde fagocytose in monocyten gepaard gaat met een intracellulaire Ca^{2+} stijging en afhankelijk is van PI3K [131]. Dit kan ook nagegaan worden bij epitheelcellen met behulp van Ca^{2+} gevoelige fluoroforen en PI3K-inhibitoren via flowcytometrie of *live cell* microscopie. Met deze methoden wordt slechts één eiwit geanalyseerd, terwijl nog niet gekend is welke signaaltransductiewegen door APN geactiveerd worden in epitheelcellen. Massaspectrometrie zou gebruikt kunnen worden om alle gemodificeerde eiwitten te bekijken, al is dit een arbeidsintensief proces [128]. Aanrijingsstappen, zoals affiniteitschromatografie, zijn nodig om de lage ionisatie-efficiëntie van de gemodificeerde proteïnen en de lage abundantie ervan te overkomen. Niet alleen de processen in de cel na APN-gemedieerde activatie van epitheelcellen zijn interessant, ook het secretieprofiel van deze cellen kan nieuwe kennis opleveren. De samenstelling van dit APN-geïnduceerde secretoom kan via massaspectrometrie onderzocht worden. Alhoewel APN-gemedieerde orale vaccinatie tegen darmpathogenen veelbelovend is, moet er nog een lange weg afgelegd worden voor men de signaaltransductie in intestinale epitheelcellen, na APN-gemedieerde transcytose van vaccin antigenen, volledig kan begrijpen.

8. Referenties

- [1] J. P. Nataro en J. B. Kaper, „Diarrheagic Escherichia coli,” *Clinical microbiology reviews*, vol. 11, nr. 1, pp. 142-201, 1998.
- [2] M. M. Levine, P. Ristaino, G. Marley, C. Smyth, S. Knutton, E. Boedeker, R. Black, C. Young, M. L. Clements en C. Cheney, „Coli surface antigens 1 and 3 of colonization factor antigen II-positive enterotoxigenic Escherichia coli: morphology, purification, and immune responses in humans,” *Infection and immunity*, vol. 44, nr. 2, pp. 409-420, 1984.
- [3] W. A. Pearce en T. M. Buchanan, „Structure and cell membrane-binding properties of bacterial fimbriae,” in *Bacterial adherence*, Tennessee, Springer science & business media, 2013, pp. 289-344.
- [4] B. Nagy en P. Z. Fekete, „Enterotoxigenic Escherichia coli (ETEC) in farm animals,” *Veterinary research*, vol. 30, nr. 2-3, pp. 259-284, 1999.
- [5] J. P. Nataro en E. M. Barry, „Section 3: Vaccines in development and new vaccine strategies,” in *Vaccines*, China, Elsevier Health Sciences, 2012, p. 1550.
- [6] W. P. Zhang, E. M. Berberov, J. Freeling, D. He, R. A. Moxley en D. H. Francis, „Significance of heat-stable and heat-labile enterotoxins in porcine colibacillosis in an additive model for pathogenicity studies,” *Infection and immunity*, vol. 74, nr. 6, pp. 3107-3114, 2006.
- [7] C. L. Gyles, „Escherichia coli enterotoxins,” in *Escherichia coli in domestic animals and humans*, Wallingford, CAB international, 1994, p. 337.
- [8] Vlaamse wetenschappelijke vereniging voor jeugdgezondheidszorg vzw, „Draaiboek infectieziekten CLB: E. coli-infecties,” 7 2010. [Online].
www.vwvj.be/uploads/documentenbank/ffaeb641d78fc668f405a821907efed7.pdf.
[Geopend 16 9 2015].
- [9] C. J. H. Davitt en E. C. Lavelle, „Delivery strategies to enhance oral vaccination against enteric infections,” *Advanced drug delivery reviews*, vol. 91, pp. 52-69, 2015.
- [10] A. L. Bourgeois, T. F. Wierzba en R. I. Walker, „Status of vaccine research and development of enterotoxigenic Escherichia coli,” *Vaccine*, 2016.
- [11] H. W. Moon en T. O. Bunn, „Vaccines for preventing enterotoxigenic Escherichia coli infections in farm animals,” *Vaccine*, vol. 11, nr. 2, pp. 213-220, 1993.
- [12] Dierengezondheidszorg Vlaanderen, „Onderzoek naar pathogenen betrokken bij spendiarree bij biggen in Vlaanderen (2012),” *Veepeiler varken*, 2012. [Online].
www.dgz.be/project/onderzoek-naar-pathogenen-betrokken-bij-spendiarree-bij-biggen-vlaanderen-2012. [Geopend 16 9 2015].
- [13] Elanco, „Post-weaning diarrhoea in pigs due to Escherichia coli,” 11 2014. [Online].
www.elancoanimalhealth.co.uk/pdfs/ela_newsletter-uk-final.pdf. [Geopend 16 9 2015].
- [14] J. M. Fairbrother, E. Nadeau en C. L. Gyles, „Escherichia coli in postweaning diarrhea in pigs: an update on bacterial types, pathogenesis, and prevention strategies,” *Animal health research reviews*, vol. 6, nr. 1, pp. 17-39, 2005.
- [15] H. L. DuPont, „Therapy for and prevention of traveler's diarrhea,” *Clinical infectious diseases*, vol. 45, pp. S78-S84, 2007.

- [16] D. S. Wishart, C. Knox, A. C. Guo, S. Shrivastava, M. Hassanali, P. Stothard, Z. Chang en J. Woolsey, „Rifaximin,” DrugBank Versie 4.3, 2016. [Online].
<http://www.drugbank.ca/drugs/DB01220>. [Geopend 18 2 2016].
- [17] College of veterinary medicine, „Colibacillosis (E. coli diarrhea),” Iowa State University, [Online].
<https://vetmed.iastate.edu/vdpam/FSVD/swine/index-diseases/colibacillosis>.
 [Geopend 16 12 2015].
- [18] F. A. Moredo, P. E. Pineyro, G. C. Marquez, M. Sanz, R. Colello, A. Etcheceria, N. L. Padola, M. A. Quiroga, C. J. Perfumo, L. Galli en G. A. Leotta, „Enterotoxigenic Escherichia coli subclinical infection in pigs: bacteriological and genotypic characterization and antimicrobial resistance profiles,” *Foodborne pathogens and disease*, vol. 12, nr. 8, pp. 704-711, 2015.
- [19] C. H. Kwon, C. Y. Lee, S. J. Han, S. J. Kim, B. C. Park, I. Jang en J. H. Han, „Effects of dietary supplementation of lipid-encapsulated zinc oxide on colibacillosis, growth and intestinal morphology in weaned piglets challenged with enterotoxigenic Escherichia coli,” *Animal science journal*, vol. 85, nr. 8, pp. 805-813, 2014.
- [20] A. L. Murdoch, R. D. McCauley en D. J. Hampson, „Review of the efficacy and safety of poly (2-propenal, 2-propenoic acid): a novel antimicrobial polymer,” *Thai journal of veterinary medicine*, vol. 37, nr. 4, pp. 9-17, 2007.
- [21] Y. Liu, L. He, A. Mustapha, H. Li, Z. Hu en M. Lin, „Antibacterial activities of zinc oxide nanoparticles against Escherichia coli O157:H7,” *Journal of applied microbiology*, vol. 107, nr. 4, p. 1193–1201, 2009.
- [22] S. Silver, „Bacterial resistances to toxic metal ions - a review,” *Gene*, vol. 179, nr. 1, pp. 9-19, 1996.
- [23] G. Gonzalez-Ortiz, J. F. Perez, R. G. Hermes, F. Molist, R. Jimenez-Diaz en S. M. Martin-Orue, „Screening the ability of natural feed ingredients to interfere with the adherence of enterotoxigenic Escherichia coli (ETEC) K88 to the porcine intestinal mucus,” *British journal of nutrition*, vol. 111, nr. 4, pp. 633-642, 2014.
- [24] K. J. Genovese, R. B. Harvey, R. C. Anderson en D. J. Nisbet, „Protection of suckling neonatal pigs against infection with an enterotoxigenic Escherichia coli expressing 987P fimbriae by the administration of a bacterial competitive exclusion culture,” *Microbial ecology in health and disease*, vol. 13, nr. 4, pp. 223-228, 2001.
- [25] J. F. Daudelin, M. Lessard, F. Beaudoin, E. Nadeau, N. Bissonnette, Y. Boutin, J. P. Brousseau, K. Lauzon en J. M. Fairbrother, „Administration of probiotics influences F4 (K88)-positive enterotoxigenic Escherichia coli attachment and intestinal cytokine expression in weaned pigs,” *Veterinary research*, vol. 42, nr. 1, 2011.
- [26] E. Stuyven, E. Cox, S. Vancaeneghem, S. Arnouts, P. Deprez en B. M. Goddeeris, „Effect of beta-glucans on an ETEC infection in piglets,” *Veterinary immunology and immunopathology*, vol. 128, nr. 1-3, pp. 60-66, 2009.
- [27] E. Stuyven, W. Van den Broeck, H. Nauwynck, B. M. Goddeeris en E. Cox, „Oral administration of beta-1,3/1,6-glucan Macrogard (R) fails to enhance the mucosal immune response following oral F4 fimbrial immunisation in gnotobiotic pigs,” *Veterinary immunology and immunopathology*, vol. 137, nr. 3-4, pp. 291-297, 2010.
- [28] V. Virdi, A. Coddens, S. De Buck, S. Millet, B. M. Goddeeris, E. Cox, H. De Greve en A. Depicker, „Orally fed seeds producing designer IgAs protect weaned piglets against enterotoxigenic Escherichia coli infection,” *Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America*, vol. 110, nr. 29, pp. 11809-11814, 2013.

- [29] X. Y. Li, L. L. Wang, Y. H. Zhen, S. Y. Li en Y. P. Xu, „Chicken egg yolk antibodies (IgY) as non-antibiotic production enhancers for use in swine production: a review,” *Journal of animal science and biotechnology*, vol. 6, nr. 40, 2015.
- [30] D. Torrallardona, „Spray dried animal plasma as an alternative to antibiotics in weanling pigs - A review,” *Asian-Australian journal of animal sciences*, vol. 23, nr. 1, pp. 131-148, 2010.
- [31] C. J. Hedegaard, M. L. Strube, M. B. Hansen, B. K. Lindved, A. Lihme, M. Bove en P. M. Heegaard, „Natural pig plasma immunoglobulins have anti-bacterial effects: potential for use as feed supplement for treatment of intestinal infections in pigs,” *PLoS One*, vol. 11, nr. 1, 2016.
- [32] K. Moonens, M. De Kerpel, A. Coddens, E. Cox, E. Pardon, H. Remaut en H. De Greve, „Nanobody mediated inhibition of attachment of F18 fimbriae expressing Escherichia coli,” *PLoS One*, vol. 9, nr. 12, 2014.
- [33] K. Moonens, I. Van den Broeck, E. Okello, E. Pardon, M. De Kerpel, H. Remaut en H. De Greve, „Structural insight in the inhibition of adherence of F4 fimbriae producing enterotoxigenic Escherichia coli by llama single domain antibodies,” *Veterinary research*, vol. 46, nr. 14, 2015.
- [34] F. Shahriar, M. Ngeleka, J. R. Gordon en E. Simko, „Identification by mass spectroscopy of F4ac-fimbrial-binding proteins in porcine milk and characterization of lactadherin as an inhibitor of F4-ac-positive Escherichia coli attachment to intestinal villi in vitro,” *Developmental and comparative immunology*, vol. 30, pp. 723-734, 2006.
- [35] M. O’Ryan, R. Vidal, F. del Canto, J. C. Salazar en D. Montero, „Vaccines for viral and bacterial pathogens causing acute gastroenteritis: part II: Vaccines for Shigella, Salmonella, enterotoxigenic E. coli (ETEC), enterohemorrhagic E. coli (EHEC) and Campylobacter jejuni,” *Human vaccines & immunotherapeutics*, vol. 11, nr. 3, pp. 601-619, 2015.
- [36] R. H. Behrens, J. P. Cramer, T. Jelinek, H. Shaw, F. von Sonnenburg, D. Wilbraham, T. Weinke, D. J. Bell, E. Asturias, H. L. Enkerlin Pauwells, R. Maxwell, M. Paredes-Paredes, G. M. Glenn, S. Dewasthaly, D. M. Stablein, Z. D. Jiang en H. L. DuPont, „Efficacy and safety of a patch vaccine containing heat-labile toxin from Escherichia coli against travellers' diarrhoea: a phase 3, randomised, double-blind, placebo-controlled field trial in travellers from Europe to Mexico and Guatemala,” *Lancet infectious diseases*, vol. 14, nr. 3, pp. 197-204, 2014.
- [37] J. Tobias en A. M. Svennerholm, „Strategies to overexpress enterotoxigenic Escherichia coli (ETEC) colonization factors or the construction of oral whole-cell inactivated ETEC vaccine candidates,” *Applied microbiology and biotechnology*, vol. 93, nr. 6, pp. 2291-2300, 2012.
- [38] A. Lundgren, L. Bourgeois, N. Carlin, J. Clements, B. Gustafsson, M. Hartford, J. Holmgren, M. Petzold, R. Walker en A. M. Svennerholm, „Safety and immunogenicity of an improved oral inactivated multivalent enterotoxigenic Escherichia coli (ETEC) vaccine administered alone and together with dmLT adjuvant in a double-blind, randomized, placebo-controlled phase I study,” *Vaccine*, vol. 32, nr. 52, pp. 7077-7084, 2014.
- [39] A. Lundgren, S. Leach, J. Tobias, N. Carlin, B. Gustafsson, M. Jertborn, L. Bourgeois, R. Walker, J. Holmgren en A. M. Svennerholm, „Clinical trial to evaluate safety and immunogenicity of an oral inactivated enterotoxigenic Escherichia coli prototype vaccine containing CFA/I overexpressing bacteria and recombinantly produced LTB/CTB hybrid protein,” *Vaccine*, vol. 31, nr. 8, pp. 1163-1170, 2013.
- [40] W. Otto, B. Najnigier, T. Stelmasiak en R. M. Robins-Browne, „Randomized control trials using a tablet formulation of hyperimmune bovine colostrum to prevent diarrhea by enterotoxigenic Escherichia coli in volunteers,” *Scandinavian journal of gastroenterology*, vol. 46, nr. 7-8, pp. 862-868, 2011.

- [41] E. Cox, V. Melkebeek, B. Devriendt, B. M. Goddeeris en D. Vanrompay, „Vaccines against enteric Escherichia coli infections in animals,” in *Pathogenic Escherichia coli: molecular and cellular microbiology*, 14, Caister academic press, 2015, pp. 255-270.
- [42] R. Duncan, „Targeting and intracellular delivery of drugs,” in *Reviews in cell biology and molecular medicine*, Cardiff, UK, Welsh school of pharmacy, Cardiff university, 2006, pp. 10-11.
- [43] C. A. Janeway, P. Travers, M. Walport en M. J. Shlomchik, „Part V. The immune system in health and disease,” in *Immunobiology*, New York, Garland Publishing, 2001, p. 701.
- [44] C. A. Janeway, P. Travers, M. Walport en M. J. Shlomchik, „Part IV. The adaptive immune response,” in *Immunobiology*, New York, Garland Publishing, 2001, pp. 486-487.
- [45] J. Wang, L. Thorson, R. W. Stokes, M. Santosuosso, K. Huygen, A. Zganiacz, M. Hitt en Z. Xing, „Single mucosal, but not parenteral, immunization with recombinant adenoviral-based vaccine provides potent protection from pulmonary tuberculosis,” *Journal of immunology*, vol. 173, nr. 10, pp. 6357-6365, 2004.
- [46] Y. Van der Stede, E. Cox, F. Verdonck, S. Vancaeneghem en B. M. Goddeeris, „Reduced faecal excretion of F4+ E. coli by the intramuscular immunisation of suckling piglets by the addition of 1 alpha,25-dihydroxyvitamin D3 or CpG-oligonucleotides,” *Vaccine*, vol. 21, pp. 1023-1032, 2003.
- [47] X. J. Chen, C. Z. Tu, T. Qin, L. Q. Zhu, Y. Y. Yin en Q. Yang, „Retinoic acid facilitates inactivated transmissible gastroenteritis virus induction of CD8+ T-cell migration to the porcine gut,” *Scientific reports*, vol. 6, 2016.
- [48] D. R. Snodgrass, L. K. Nagy, D. Sherwood en I. Campbell, „Passive immunity in calf diarrhoea: vaccination with K99 antigen of enterotoxigenic Escherichia coli and rotavirus,” *Infection and immunity*, vol. 37, pp. 586-591, 1982.
- [49] B. Nagy en P. Z. Fekete, „Enterotoxigenic Escherichia coli in veterinary medicine,” *International journal of medical microbiology*, vol. 295, pp. 443-454, 2005.
- [50] P. Deprez, C. Van den Hende, E. Muylle en W. Oyaert, „The influence of the administration of sow's milk on the post-weaning excretion of hemolytic E. coli in the pig,” *Veterinary research communications*, vol. 10, pp. 4560-4563, 1986.
- [51] J. M. Rutter en G. W. Jones, „Protection against enteric disease caused by Escherichia coli- a model for vaccination with a virulence determinant?,” *Nature*, vol. 242, pp. 531-532, 1973.
- [52] N. Lycke, „Recent progress in mucosal vaccine development: potential and limitations,” *Nature reviews immunology*, vol. 12, nr. 8, pp. 592-605, 2012.
- [53] M. A. Clark, B. H. Hirst en M. A. Jepson, „Lectin-mediated mucosal delivery of drugs and microparticles,” *Advanced drug delivery reviews*, vol. 43, nr. 2-3, pp. 207-223, 2000.
- [54] E. C. Lavelle, „Generation of improved mucosal vaccines by induction of innate immunity,” *Cellular and molecular life sciences*, vol. 62, nr. 23, pp. 2750-2770, 2005.
- [55] B. Devriendt, B. G. De Geest, B. M. Goddeeris en E. Cox, „Crossing the barrier: targeting epithelial receptors for enhanced oral vaccine delivery,” *Journal of controlled release*, vol. 160, nr. 3, pp. 431-439, 2012.
- [56] M. M. Levine, „Immunization against bacterial diseases of the intestine,” *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition*, vol. 31, nr. 4, pp. 336-355, 2000.
- [57] K. Soares-Weiser, H. MacLehose, I. Ben-Aharon, E. Goldberg, F. Pitan en N. Cunliffe, „Vaccines for preventing rotavirus diarrhoea: vaccines in use,” *Cochrane database of systematic reviews*, nr. 5, 2010.

- [58] ARKO, „Swine products,” ARKO laboratories, [Online].
http://www.arkolabs.com/pb/wp_9ae62bed/wp_9ae62bed.html#Edema%20Vac.
 [Geopend 25 2 2016].
- [59] EMA, „Coliprotec F4,” European medicines agency, 2015. [Online].
http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/medicines/veterinary/medicines/003797/smops/Positive/vet_smop_000151.jsp&mid=WC0b01ac058008d7aa.
 [Geopend 25 2 2016].
- [60] UKHealthCentre, „Advantages and disadvantages of live vaccinations,” UKHealthCentre, 2015. [Online].
<http://www.healthcentre.org.uk/vaccine/advantages-disadvantages-live-vaccinations.html>.
 [Geopend 18 12 2015].
- [61] C. A. Janeway, P. Travers, M. Walport en M. J. Shlomchik, „Part V. The Immune System in Health and Disease,” in *Immunobiology*, New York, Garland Publishing, 2001, p. 688.
- [62] P. Bellot, *New strategies for oral immunization: targeting soluble antigens or delivery of particles to the intestinal mucosa*, Universiteit Gent, 2013.
- [63] C. A. Janeway, P. Travers, M. Walport en M. J. Shlomchik, „Part V. The immune system in health and disease,” in *Immunobiology*, New York, Garland Publishing, 2001, pp. 698-701.
- [64] UKHealthCentre, „Advantages and disadvantages of subunit vaccines,” UKHealthCentre, [Online].
<http://www.healthcentre.org.uk/vaccine/advantages-disadvantages-subunit-vaccines.html>.
 [Geopend 28 2 2016].
- [65] N. Takeyama, Y. Yuki, D. Tokuhara, K. Oroku, M. Mejima, S. Kurokawa, M. Kuroda, T. Kodama, S. Nagai, S. Ueda en H. Kiyono, „Oral rice-based vaccine induces passive and active immunity against enterotoxigenic E. coli-mediated diarrhea in pigs,” *Vaccine*, vol. 33, nr. 39, pp. 5204-5211, 2015.
- [66] W. Van den Broeck, E. Cox en B. M. Goddeeris, „Receptor-dependent immune responses in pigs after oral immunization with F4 fimbriae,” *Infection and immunity*, vol. 67, nr. 2, pp. 520-526, 1999.
- [67] V. Snoeck, N. Huyghebaert, E. Cox, A. Vermeire, S. Vancaeneghem, J. P. Remon en B. M. Goddeeris, „Enteric-coated pellets of F4 fimbriae for oral vaccination of suckling piglets against enterotoxigenic Escherichia coli infections,” *Veterinary immunology and immunopathology*, vol. 96, pp. 219-227, 2003.
- [68] C. Calinescu, J. Mulhbacher, E. Nadeau, J. M. Fairbrother en M. A. Mateescu, „Carboxymethyl high amylose starch (CM-HAS) as excipient for Escherichia coli oral formulations,” *European journal of pharmaceuticals and biopharmaceutics*, vol. 60, pp. 53-60, 2005.
- [69] C. Calinescu, E. Nadeau, J. Mulhbache, J. M. Fairbrother en M. A. Mateescu, „Carboxymethyl high amylose starch for F4 fimbriae gastro-resistant oral formulation,” *International journal of pharmaceuticals*, vol. 343, pp. 18-25, 2007.
- [70] C. Gamazo, N. Martín-Arbella, A. Brotons, A. I. Camacho en J. M. Irache, „Mimicking microbial strategies for the design of mucus-permeating nanoparticles for oral immunization,” *European journal of pharmaceuticals and biopharmaceutics*, vol. 96, pp. 454-463, 2015.

- [71] A. E. Ibanez, L. M. Coria, M. V. Carabajal, M. V. Delpino, G. S. Risso, P. G. Cobiello, J. Rinaldi, P. Barrionuevo, L. Bruno, F. Frank, S. Klinke, F. A. Goldbaum, G. Briones, G. H. Giambartolomei, K. A. Pasquevich en J. Cassataro, „A bacterial protease inhibitor protects antigens delivered in oral vaccines from digestion while triggering specific mucosal immune responses,” *Journal of controlled release*, vol. 220, nr. A, pp. 18-28, 2015.
- [72] O. Schulz en O. Pabst, „Antigen sampling in the small intestine,” *Trends in immunology*, vol. 34, nr. 4, pp. 155-161, 2013.
- [73] S. Menard, N. Cerf-Bensussan en M. Heyman, „Multiple facets of intestinal permeability and epithelial handling of dietary antigens,” *Mucosal immunology*, vol. 3, nr. 3, pp. 247-259, 2010.
- [74] M. A. McGuckin, S. K. Linden, P. Sutton en T. H. Florin, „Mucin dynamics and enteric pathogens,” *Nature reviews microbiology*, vol. 9, nr. 4, pp. 265-278, 2011.
- [75] M. Rescigno, M. Urbano, B. Valzasina, M. Francolini, G. Rotta, R. Bonasio, F. Granucci, J. P. Kraehenbuhl en P. Ricciardi-Castagnoli, „Dendritic cells express tight junction proteins and penetrate gut epithelial monolayers to sample bacteria,” *Nature immunology*, vol. 2, nr. 4, pp. 361-367, 2001.
- [76] N. J. Mantis, N. Rol en B. Corthesy, „Secretory IgA's complex roles in immunity and mucosal homeostasis in the gut,” *Mucosal immunology*, vol. 4, nr. 6, pp. 603-611, 2011.
- [77] N. Rochereau, D. Drocourt, E. Perouzel, V. Pavot, P. Redelinguys, G. D. Brown, G. Tiraby, X. Robin, B. Verrier, C. Genin, B. Corthesy en S. Paul, „Dectin-1 is essential for the reverse transcytosis of glycosylated SIgA-antigen complexes by intestinal M cells,” *Plos biology*, vol. 11, nr. 9, 2013.
- [78] J. H. Niess, S. Brand, X. Gu, L. Landsman, S. Jung, B. A. McCormick, J. M. Vyas, M. Boes, H. L. Ploegh, J. G. Fox, D. R. Littman en H.-C. Reinecker, „CX3CR1-mediated dendritic cell access to the intestinal lumen and bacterial clearance,” *Science*, vol. 307, pp. 254-258, 2005.
- [79] B. Devriendt, B. G. De Geest en E. Cox, „Designing oral vaccines targeting intestinal dendritic cells,” *Expert opinion on drug delivery*, vol. 8, nr. 4, pp. 467-483, 2011.
- [80] E. Mazzini, L. Massimiliano, G. Penna en M. Rescigno, „Oral tolerance can be established via gap junction transfer of fed antigens from CX3CR1+ macrophages to CD103+ dendritic cells,” *Immunity*, vol. 40, nr. 2, pp. 248-261, 2014.
- [81] J. R. McDole, L. W. Wheeler, K. G. McDonald, B. Wang, V. Konjufca, K. A. Knoop, R. D. Newberry en M. J. Miller, „Goblet cells deliver luminal antigen to CD103+ dendritic cells in the small intestine,” *Nature*, vol. 483, pp. 345-350, 2012.
- [82] M. Yoshida, S. M. Claypool, J. S. Wagner, E. Mizoguchi, A. Mizoguchi, D. C. Roopenian, W. I. Lencer en R. S. Blumberg, „Human neonatal Fc receptor mediates transport of IgG into luminal secretions for delivery of antigens to mucosal dendritic cells,” *Immunity*, vol. 20, nr. 6, pp. 769-783, 2004.
- [83] M. D. Neal, C. Leaphart, R. Levy, J. Prince, T. R. Billiar, S. Watkins, J. Li, S. Cetin, H. Ford, A. Schreiber en D. J. Hackam, „Enterocyte TLR4 mediates phagocytosis and translocation of bacteria across the intestinal barrier,” *Journal of immunology*, vol. 176, nr. 5, pp. 3070-3079, 2006.
- [84] V. Melkebeek, K. Rasschaert, P. Bellot, K. Tilleman, K. Favoreel, D. Deforce, B. G. De Geest, B. M. Goddeeris en E. Cox, „Targeting aminopeptidase N, a newly identified receptor for F4ac fimbriae, enhances the intestinal mucosal immune response,” *Mucosal immunology*, vol. 5, nr. 6, pp. 635-645, 2012.

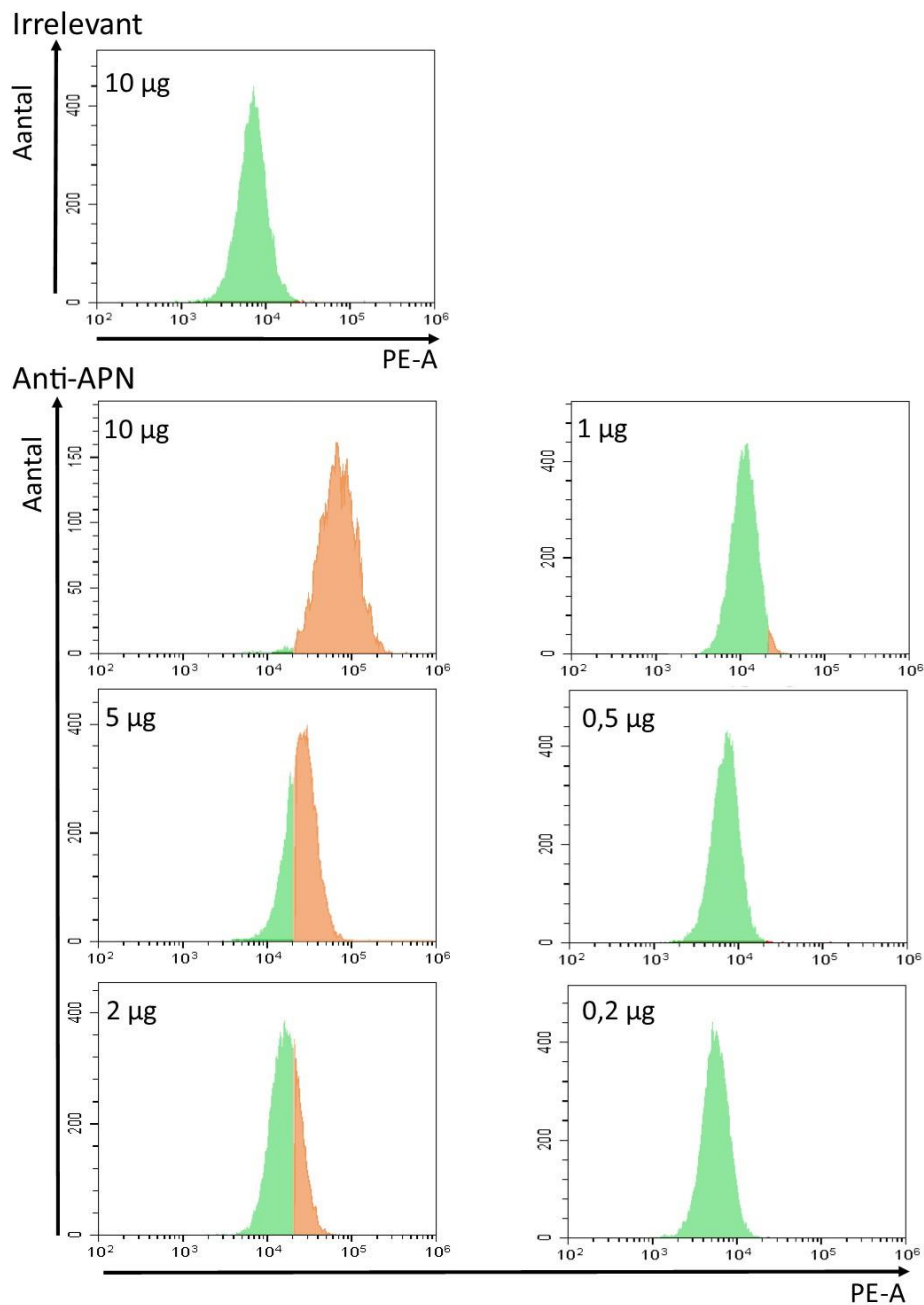
- [85] K. Baert, B. G. De Geest, R. de Rycke, A. B. D. Antunes, H. de Greve, E. Cox en B. Devriendt, „beta-glucan microparticles targeted to epithelial APN as oral antigen delivery system,” *Journal of controlled release*, vol. 220, pp. 149-159, 2015b.
- [86] E. M. Pridgen, F. Alexis, T. T. Kuo, E. Levy-Nissenbaum, R. Karnik, R. S. Blumberg, R. Langer en O. C. Farokhzad, „Transepithelial transport of Fc-targeted nanoparticles by the neonatal Fc receptor for oral delivery,” *Science translational medicine*, vol. 5, nr. 213, 2013.
- [87] F. Verdonck, J. J. Joensuu, E. Stuyven, J. De Meyer, M. Muilu, M. Pirhonen, B. M. Goddeeris, J. Mast, V. Niklander-Teeri en E. Cox, „The polymeric stability of the Escherichia coli F4 (K88) fimbriae enhances its mucosal immunogenicity following oral immunization,” *Vaccine*, vol. 26, nr. 45, pp. 5728-5735, 2008.
- [88] V. Snoeck, W. Van den Broeck, V. De Colvenaer, F. Verdonck, B. M. Goddeeris en E. Cox, „Transcytosis of F4 fimbriae by villous and dome epithelia in F4-receptor positive pigs supports importance of receptor-dependent endocytosis in oral immunization strategies,” *Veterinary immunology and immunopathology*, vol. 124, nr. 1-2, pp. 29-40, 2008.
- [89] F. Verdonck, V. De Hauwere, J. Bouckaert, B. M. Goddeeris en E. Cox, „Fimbriae of enterotoxigenic Escherichia coli function as a mucosal carrier for a coupled heterologous antigen,” *Journal of controlled release*, vol. 104, nr. 2, pp. 243-258, 2005.
- [90] P. Tiels, F. Verdonck, A. Coddens, B. M. Goddeeris en E. Cox, „The excretion of F18+ E. coli is reduced after oral immunisation of pigs with a FedF and F4 fimbriae conjugate,” *Vaccine*, vol. 16, pp. 2154-2163, 2008.
- [91] Y. Luan en W. Xu, „The structure and main functions of aminopeptidase N,” *Current medicinal chemistry*, vol. 14, pp. 639-647, 2007.
- [92] F. Jardinaud, G. Banisadr, F. Noble, S. Melik-Parsadaniantz, H. X. Chen, C. Dugave, H. Laplace, W. Rostene, M. C. Fournie-Zaluski, B. P. Roques en T. Popovici, „Ontogenic and adult whole body distribution of aminopeptidase N in rat investigated by in vitro autoradiography,” *Biochimie*, vol. 86, nr. 2, pp. 105-113, 2004.
- [93] ExPASy, „Enzyme entry: EC 3.4.11.2,” SIB Swiss institute of bioinformatics, [Online]. <http://enzyme.expasy.org/EC/3.4.11.2>. [Geopend 8 2 2016].
- [94] NCBI, „ANPEP alanyl (membrane) aminopeptidase [Homo sapiens (human)],” 2 8 2015. [Online]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene?Db=gene&Cmd=ShowDetailView&TermToSearch=290>. [Geopend 7 9 2015].
- [95] I. Licon-Limón, C. A. Garay-Canales, O. Muñoz-Paleta en E. Ortega, „CD13 mediates phagocytosis in human monocytic cells,” *Journal of leukocyte biology*, vol. 98, pp. 85-98, 2015.
- [96] M. Ghosh, C. Gerber, M. M. Rahman, K. M. Vernier, F. E. Pereira, J. Subramani, L. A. Caromile en L. H. Shapiro, „Molecular mechanisms regulating CD13-mediated adhesion,” *Immunology*, vol. 142, pp. 636-647, 2014.
- [97] D. Riemann, A. Kehlen en J. Langner, „CD13 - not just a marker in leukemia typing,” *Immunology today*, vol. 20, nr. 2, pp. 83-88, 1999.
- [98] R. S. Danzinger, „Aminopeptidase N in arterial hypertension,” *Heart failure reviews*, vol. 13, nr. 3, pp. 293-298, 2008.
- [99] L. Chen, Y. L. Lin, G. Peng en F. Li, „Structural basis for multifunctional roles of mammalian aminopeptidase N,” *PNAS*, vol. 109, nr. 44, pp. 17966-17971, 2012.
- [100] P. Mina-Osorio, „The moonlighting enzyme CD13: old and new functions to target,” *Trends in molecular medicine*, vol. 14, nr. 8, pp. 361-371, 2008.

- [101] R. A. Gibbons, R. Sellwood, M. Burrows en P. A. Hunter, „Inheritance of resistance to neonatal Escherichia coli diarrhea in pig,” *Theoretical and applied genetics*, vol. 51, nr. 2, pp. 65-70, 1977.
- [102] M. König, A. M. Zimmer, H. Steiner, P. V. Holmes, J. N. Crawley, M. J. Brownstein en A. Zimmer, „Pain responses, anxiety and aggression in mice deficient in pre-proenkephalin,” *Nature*, vol. 383, nr. 6600, pp. 535-538, 1993.
- [103] S. L. Larsen, L. O. Pedersen, S. Buus en A. Stryhn, „T cell responses affected by aminopeptidase N (CD13)-mediated trimming of major histocompatibility complex class II-bound peptides,” *Journal of experimental medicine*, vol. 184, pp. 183-189, 1996.
- [104] X. Dong, B. An, L. S. Kierstead, W. J. Storkus, A. A. Amoscato en R. D. Salter, „Modification of the amino terminus of a class II epitope confers resistance to degradation by CD13 on dendritic cells and enhances presentation to T cells,” *The journal of immunology*, vol. 164, pp. 129-135, 2000.
- [105] J. Gabrilovac, B. Cupić, E. Zivković, L. Horvat en D. Mahjen, „Expression, regulation and functional activities of aminopeptidase N (EC 3.4.11.2; APN; CD13) on murine macrophage J774 cell line,” *Immunobiology*, vol. 216, pp. 132-144, 2011.
- [106] B. Delmas, J. Gelfi, R. L'Haridon, L. K. Vogel, H. Sjöström, O. Norén en H. Laude, „Aminopeptidase-N is a major receptor for the enteropathogenic coronavirus TGEV,” *Nature*, vol. 357, nr. 6377, pp. 417-420, 1992.
- [107] D. B. Tresnan, R. Levis en K. V. Holmes, „Feline aminopeptidase N serves as a receptor for feline, canine, porcine and human coronaviruses in serogroup I,” *Journal of virology*, vol. 70, nr. 12, pp. 8669-8674, 1996.
- [108] C. L. Yeager, R. A. Ashmun, R. K. Williams, C. B. Cardellicchio, L. H. Shapiro, A. T. Look en K. V. Holmes, „Human aminopeptidase N is a receptor for human coronavirus 229E,” *Nature*, vol. 357, nr. 6377, pp. 420-422, 1992.
- [109] C. Soderberg, T. D. Giugni, J. A. Zaia, S. Larsson, J. M. Wahlberg en E. Moller, „CD13 (human aminopeptidase N) mediates human cytomegalovirus infection,” *Journal of virology*, vol. 67, nr. 11, pp. 6576-6585, 1993.
- [110] J. Subramani, M. Ghosh, M. M. Rahman, L. A. Caromile, C. Gerber, K. Rezaul, D. K. Han en L. H. Shapiro, „Tyrosine phosphorylation of CD13 regulates inflammatory cell-cell adhesion and monocyte trafficking,” *Journal of immunology*, vol. 191, nr. 7, pp. 3905-3912, 2013.
- [111] M. I. Villasenor-Cardoso, D. A. Frausto-Del-Rio en E. Ortega, „Aminopeptidase N (CD13) is involved in phagocytic processes in human dendritic cells and macrophages,” *Biomed research international*, vol. 2013, 2013.
- [112] P. Mina-Osorio, I. Soto-Cruz en E. Ortega, „A role for galectin-3 in CD13-mediated homotypic aggregation of monocytes,” *Biochemical and biophysical research communications*, vol. 353, nr. 3, pp. 605-610, 2007.
- [113] N. Tokuda en R. B. Levy, „1,25-dihydroxyvitamin D-3 stimulates phagocytosis but suppresses HLA-DR and CD13 antigen expression in human mononuclear phagocytes,” *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine. Society for Experimental Biology and Medicine*, vol. 211, pp. 244-250, 1996.
- [114] W. Kramer, F. Girbig, D. Corsiero, A. Pfenninger, W. Frick, G. Jähne, M. Rhein, W. Wendler, F. Lottspeich, E. O. Hochleitner, E. Orsó en G. Schmitz, „Aminopeptidase N (CD13) is a molecular target of the cholesterol absorption inhibitor ezetimibe in the enterocyte brush border membrane,” *Journal of biological chemistry*, vol. 280, nr. 2, pp. 1306-1320, 2005.

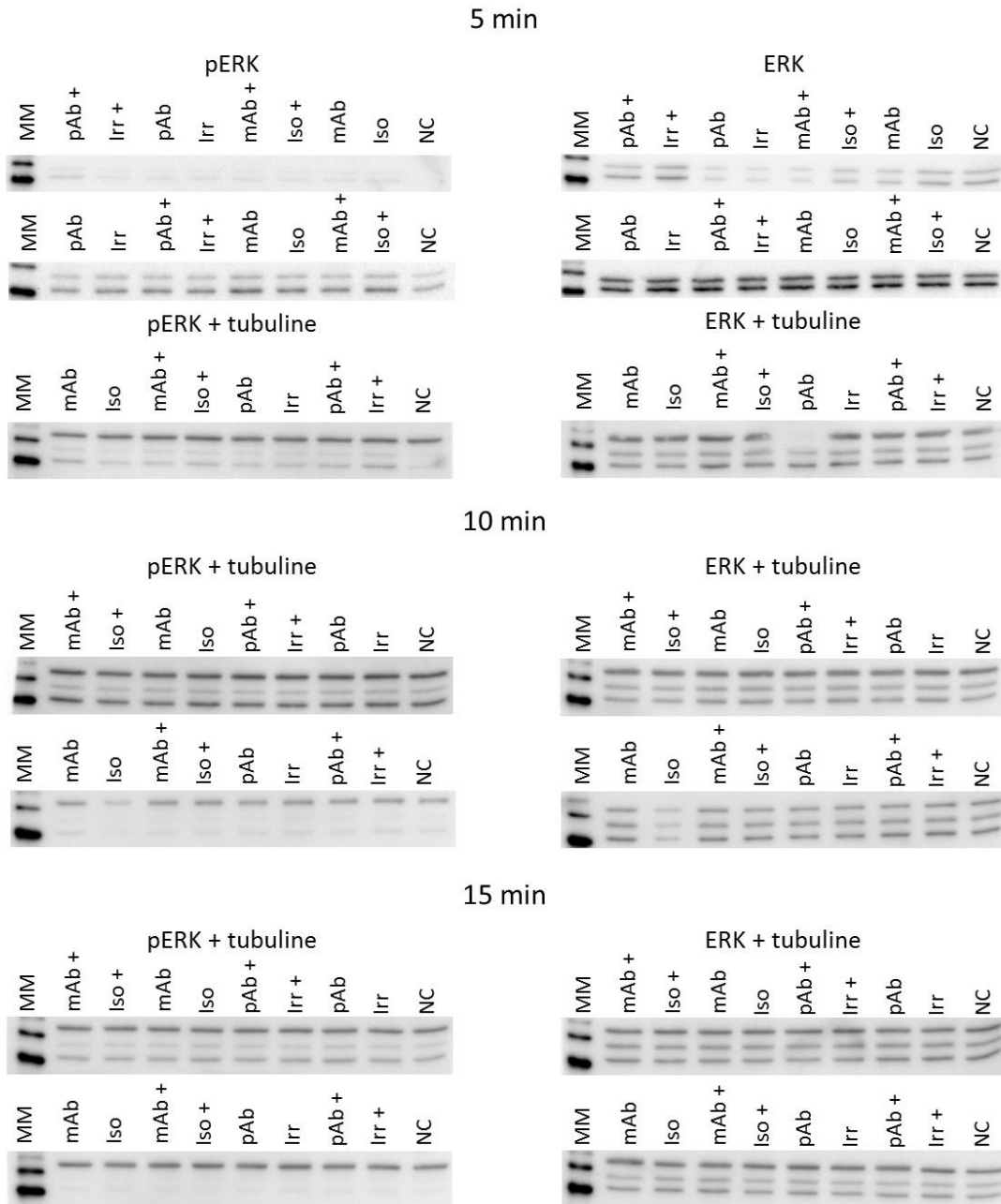
- [115] T. A. Look, R. A. Ashmun, L. H. Shapiro en S. C. Peiper, „Human myeloid plasma membrane glycoprotein CD13 (gp150) is identical to aminopeptidase N,” *Journal of clinical investigation*, vol. 83, pp. 1299-1307, 1989.
- [116] P. Mina-Osorio, L. H. Shapiro en E. Ortega, „CD13 in cell adhesion: aminopeptidase N (CD13) mediates homotypic aggregation of monocytic cells,” *Journal of leukocyte biology*, vol. 79, nr. 4, pp. 719-730, 2006.
- [117] E. M. Danielsen en B. van Deurs, „Galectin-4 and small intestinal brush border enzymes form clusters,” *Molecular biology of the cell*, vol. 8, pp. 2241-2251, 1997.
- [118] T. Miki, Y. Takegami, K. Okawa, T. Muraguchi, M. Noda en C. Takahashi, „The reversion-inducing cysteine-rich protein with Kazal motifs (RECK) interacts with membrane type 1 matrix metalloproteinase and CD13/aminopeptidase N and modulates their endocytic pathways,” *Journal of biological chemistry*, vol. 282, pp. 12341-12352, 2007.
- [119] Y. W. Chang, S. C. Chen, E. C. Cheng, Y. P. Ko, Y. C. Lin, Y. R. Kao, Y. G. Tsay, P. C. Yang, C. W. Wu en S. R. Roffler, „CD13 (aminopeptidase N) can associate with tumor-associated antigen L6 and enhance the motility of human lung cancer cells,” *International journal of cancer*, vol. 112, pp. 243-252, 2001.
- [120] M. Ghosh, J. Subramani, M. Rahman en L. H. Shapiro, „CD13 restricts TLR4 endocytic signal transduction in inflammation,” *The journal of immunology*, vol. 194, pp. 4466-4476, 2015.
- [121] M. Ghosh, B. McAuliffe, J. Subramani, S. Basu en L. H. Shapiro, „CD13 regulates dendritic cell cross-presentation and T cell responses by inhibiting receptor-mediated antigen uptake,” *The journal of immunology*, vol. 188, pp. 5489-5499, 2012.
- [122] K. Baert, E. Sonck, B. M. Goddeeris, B. Devriendt en E. Cox, „Cell type-specific differences in β -glucan recognition and signalling in porcine innate immune cells,” *Developmental & comparative immunology*, vol. 48, nr. 1, pp. 192-203, 2015a.
- [123] E. Sonck, E. Stuyven, B. M. Goddeeris en E. Cox, „Identification of the porcine C-type lectin dectin-1,” *Veterinary immunology and immunopathology*, vol. 130, nr. 1-2, pp. 131-134, 2009.
- [124] P. Gourbeyre, M. Berri, Y. Lippi, F. Meurens, S. Vincent-Naulleau, J. Laffitte, C. Rogel-Gaillard, P. Pinton en I. P. Oswald, „Pattern recognition receptors in the gut: analysis of their expression along the intestinal tract and the crypt/villus axis,” *Physiological reports*, vol. 3, nr. 2, 2015.
- [125] S. Cohen-Kedar, L. Baram, H. Elad, E. Brazowski, H. Guzman-Gur en I. Dotan, „Human intestinal epithelial cells respond to beta-glucans via Dectin-1 and Syk,” *European journal of immunology*, vol. 44, nr. 12, pp. 3729-3740, 2014.
- [126] R. De Smet, T. Demoor, S. Verschuere, M. Dullaers, G. R. Ostroff, G. Leclercq, L. Allais, C. Pilette, M. Dierendonck, B. G. De Geest en C. A. Cuvelier, „Beta-glucan microparticles are good candidates for mucosal antigen delivery in oral vaccination,” *Journal of controlled release*, vol. 172, nr. 3, pp. 671-678, 2013.
- [127] Cayman chemical, „Product information,” 2012. [Online].
<https://www.caymanchem.com/pdfs/70520.pdf>. [Geopend 23 5 2016].
- [128] R&D systems, „Methods for detecting protein phosphorylation,” Bio-Techne Ltd, [Online].
<https://www.rndsystems.com/resources/articles/methods-detecting-protein-phosphorylation>. [Geopend 24 5 2016].
- [129] W.-C. Liao, K. Herman, Z. Zhao, S. Stoesz en R. Campos-Gonzalez, „A novel cell-based ELISA for intracellular proteins or phosphorylation of signaling molecules,” Bio-Techne Ltd, [Online].
<https://www.rndsystems.com/resources/posters/novel-cell-based-elisa-intracellular-proteins-or-phosphorylation-signaling-molecules>. [Geopend 24 5 2016].

- [130] TTP Labtech, „key technical features of acumen's laser scanning imaging cytometry,” TTP Labtech, [Online].
<http://ttplabtech.com/phenotypic-screening/acumen/specifications/>. [Geopend 24 5 2016].
- [131] A. N. Santos, J. Langner, M. Herrmann en D. Riemann, „Aminopeptidase N/CD13 is directly linked to signal transduction pathways in monocytes,” *Cellular immunology*, vol. 201, nr. 1, pp. 22-32, 2000.

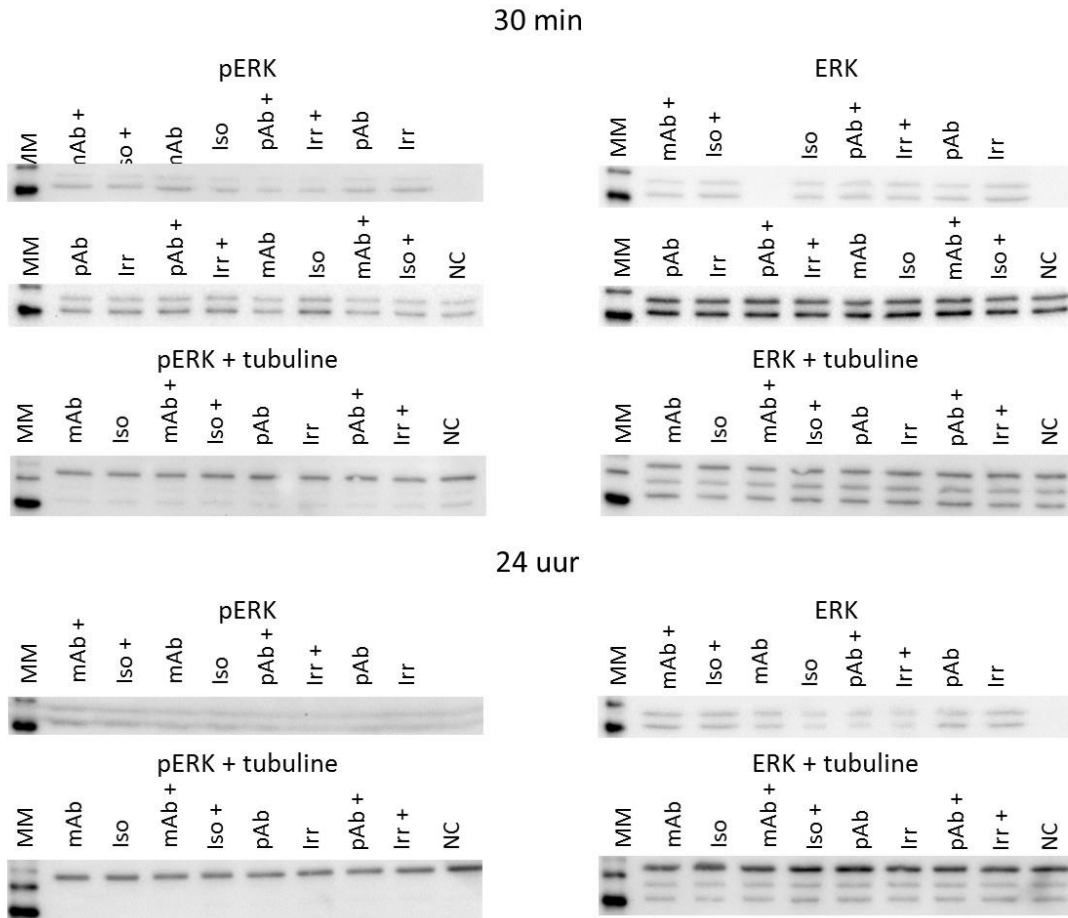
9. Bijlagen



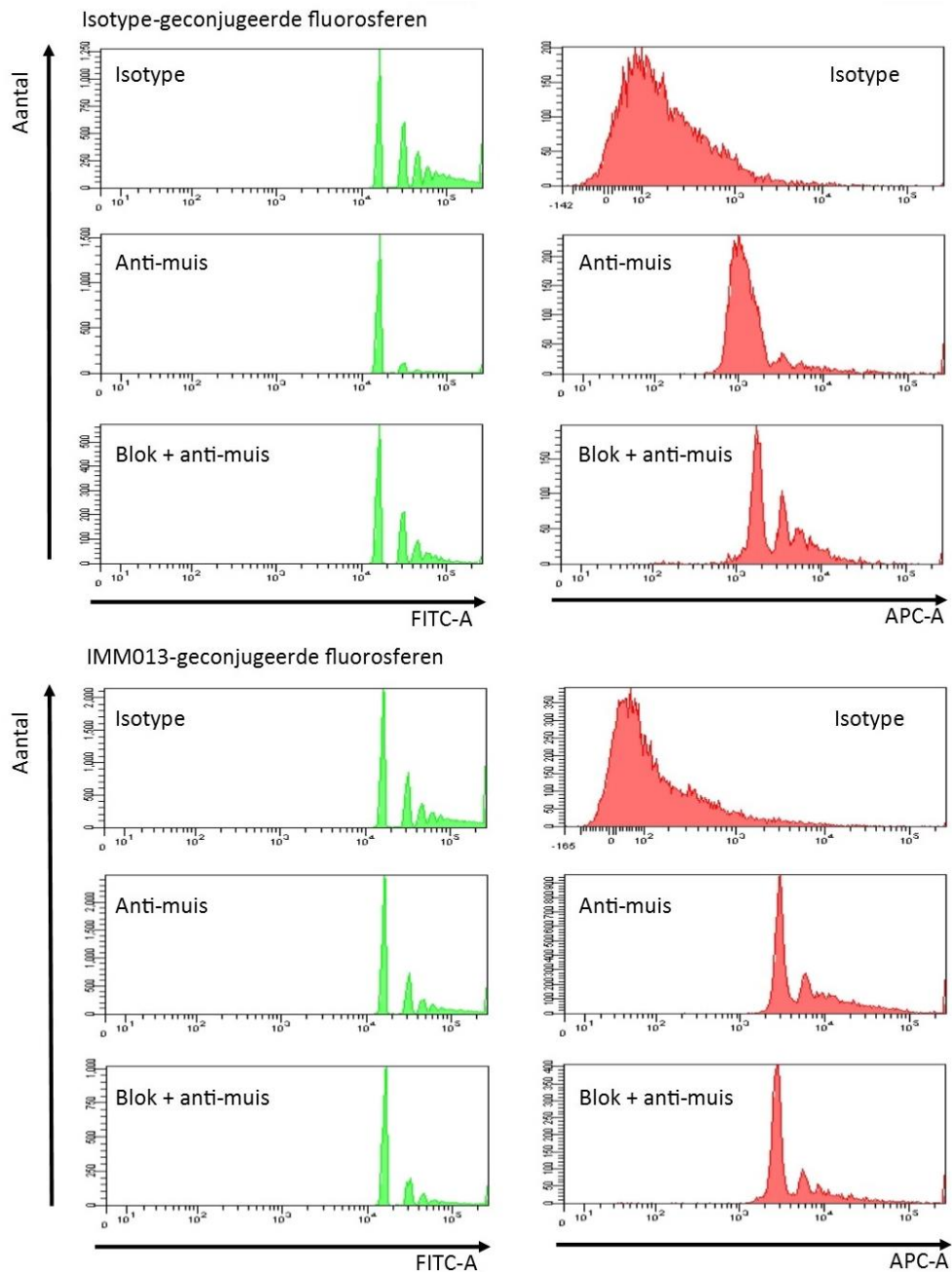
Figuur A: Percentage PE⁺ IPEC-J2-APN cellen na behandeling met pAbs (10, 5, 2, 1, 0,5, 0,2 µg pAbs/10⁵ cellen) en detectie met anti-konijn IgG/PE. Oranje: PE⁺; Groen: PE⁻.



Figuur B: APN-gemedieerde ERK1/2 fosforylatie in IPEC-J2-APN cellen. Cellen werden gelyseerd na verschillende incubatietijden (5, 10 of 15 min) met mAbs of pAbs met of zonder crosslinking. De cellysaten (6,8 µg) werden onderworpen aan Western blotting en tubuline (50 kDa), gefosforyleerd of totaal ERK1/2 (44/42 kDa) werd gedetecteerd. MM: MagicMark (40 en 50 kDa); mAb: anti-APN mAb (IMM013); Iso: isotype; pAb: Anti-APN pAb; Irr: Irrelevant konijn IgG; NC: negatieve controle; +: crosslinking



Figuur C: APN-gemedieerde ERK1/2 fosforylatie in IPEC-J2-APN cellen. Cellen werden gelyseerd na verschillende incubatietijden (30 min of 24 uur) met mAbs of pAbs met of zonder crosslinking. De cellysaten (6,8 μ g) werden onderworpen aan Western blotting en tubuline (50 kDa), gefosforyleerd of totaal ERK1/2 (44/42 kDa) werd gedetecteerd. MM: MagicMark (40 en 50 kDa); mAb: anti-APN mAb (IMM013); Iso: isotype; pAb: Anti-APN pAb; Irr: Irrelevant konijn IgG; NC: negatieve controle; +: crosslinking



Figuur D: Koppelingsefficiëntie van de mAbs aan de FITC-geladen micropartikels. Micropartikels ($5 \cdot 10^5$) werden aangekleurd met isotype IgG, anti-muis IgG₁-AF647 of geblokkeerd met irrelevant varken IgG. Resterende resultaten bij Figuur 13.