

Aus der Professur für Agrobiotechnologie und Begleitforschung zur Bio- und Gentechnologie  
der Agrar- und Umweltwissenschaftlichen Fakultät

Zusammenfassung der kumulativen Dissertation

**Strategien zur Kontrolle von Mäusepopulationen – Produktion  
artspezifischer kontrazeptiver Peptide in Pflanzen  
als oraler Impfstoff**

zur Erlangung des akademischen Grades  
Doktor der Agrarwissenschaften (doctor agriculturae, Dr. agr.)

an der Agrar- und Umweltwissenschaftlichen Fakultät  
der Universität Rostock

vorgelegt von  
M.Sc. Khadijeh Ghasemian

Verteidigung am 15. Dezember 2023

## Summary

Rodents are a major problem in many parts of the world due to their high population densities. Traditional methods of rodent population control are non-specific and lethal methods that often pose a risk to humans, ecosystem, and non-target species. Therefore, it is imperative to develop a safe, more humane, and ethical approach to population reduction. Fertility control through immunocontraception can be a promising alternative. However, mice can only be vaccinated orally with immunocontraceptives. Oral vaccines must be species-specific to avoid effects on non-target organisms. Oral vaccines can be produced in plants inexpensively and on a large scale. Therefore, the aim of the present study was to develop strategies for the production of a mouse-specific and orally applicable contraceptive vaccine in plants.

The results demonstrated that mouse-specific epitopes of the contraceptive zona pellucida (ZP) proteins, ZP2 and ZP3, and the sperm protein Izumo were transiently produced as short peptides (mZP2, mZP3 and mlzumo1) in *Nicotiana benthamiana*. The stability and accumulation of peptides was significantly increased by fusion with stabilizing proteins or by trimerization. All three plant-produced peptides induced IgG antibodies in subcutaneously vaccinated mice. Moreover, oral delivery of the leaves expressing HBcAg-mZP3 fusion protein elicited systemic and mucosal immunity in mice without addition of an adjuvant. Mice immunized with a physical mixture of plant-produced mZP2-3 and mlzumo1-3 showed a 39 % reduction in the number of offspring. The litter size was negatively correlated with the level of antibodies against both mZP2 and mlzumo1. Induced anti- mZP3 and mZP2 antibodies recognized the native ZP and bound to the oocyte in wild mice ovaries *in vitro*. Notably, oral delivery of leaves expressing mZP3 peptide, in the form of HBcAg-mZP3, also elicited specific antibodies that cross-reacted with wild mice ZP. Observations suggest that antibodies may react with oocytes *in vivo* and reduce the fertility of wild-type mice.

In conclusion, we showed that small putative mouse-specific contraceptive peptides could be produced in sufficient quantities in plants as cheap, easy scale-up, and orally applicable expression systems. The generation of ZP-reactive antibodies by plant-produced peptides and the induction of antibody-correlated infertility in immunized mice warrant further study to investigate the contraceptive effect of plant-produced peptides in wild-type mice. The results of our experiments can be the basis for the development of mouse-specific contraceptive feeding baits for oral immunization of rodents and their population management.

## Zusammenfassung

Nagetiere stellen auf Grund ihrer hohen Populationsdichte in vielen Teilen der Welt ein großes Problem dar. Herkömmliche Methoden zur Bekämpfung von Nagetierpopulationen sind unspezifisch und tödlich und bedeuten oft ein Risiko für Menschen, Ökosysteme und Nichtzielorganismen. Daher ist es unbedingt erforderlich, einen sicheren, humaneren und ethischeren Ansatz zur Reduktion der Populationen zu entwickeln. Die Fruchtbarkeitskontrolle durch Immunkontrazeption kann so eine Alternative sein. Ein Immunkontrazeptivum kann Mäusen aber nur oral verabreicht werden. Um eine Wirkung auf Nicht-Zielorganismen zu vermeiden, müssen orale Impfstoffe artspezifisch wirken. Leider ist dies nur für kleine Epitope der bisher zur Immunkontrazeption genutzten Proteine der Fall. Orale Impfstoffe lassen sich in großem Maßstab und kostengünstig in Pflanzen herstellen. Aufgabe der vorliegenden Arbeit war es daher Strategien zu entwickeln um in Pflanzen einen mausspezifischen, kontrazeptiven oral applizierbaren Impfstoff zu produzieren.

Mausspezifische Epitope der kontrazeptiven *Zona pellucida* (ZP) Proteine ZP2, ZP3 und des Spermienproteins Izumo wurden als kurze Peptide (mZP2, mZP3 und mlzumo1) in *Nicotiana benthamiana* transient produziert. Die Stabilität und Akkumulation der Peptide in Pflanzen wurde durch Fusion mit stabilisierenden Proteinen oder Trimerisierung deutlich erhöht. Alle drei in Pflanzen produzierte Peptide induzierten bei subkutan geimpften Mäusen die Bildung von IgG-Antikörper. Außerdem induzierte die orale Einnahme der Blätter, die das Fusionsprotein HBcAg-mZP3 exprimierten, ohne Adjuvans bei Mäusen eine systemische und mukosale Immunität. Mäuse, die mit einer Mischung aus in Pflanzen produziertem mZP2-3 und mlzumo1-3 immunisiert wurden, zeigten eine Reduzierung der Nachkommenszahl um 39 %. Die Wurfgröße korrelierte negativ mit der Menge von Antikörpern gegen mZP2 und mlzumo1. Induzierte Anti-mZP3- und mZP2-Antikörper erkannten die nativen ZP Proteine und banden *in vitro* an die Eizelle in den Eierstöcken von Wildmäusen. Bemerkenswert ist, dass auch die orale Verabreichung von Blättern, die das mZP3-Peptid in Form von HBcAg-mZP3 exprimierten, zur Bildung von Antikörpern führte die mit ZP von Wildmäusen kreuzreagierten. Unsere Beobachtungen legen nahe, dass Antikörper möglicherweise *in vivo* mit Eizellen reagieren und die Fruchtbarkeit bei Wildtyp-Mäusen verringern können.

Zusammenfassend haben wir gezeigt, dass kleine vermutliche mausspezifische kontrazeptive Peptide in ausreichenden Mengen in Pflanzen kostengünstig, leicht skalierbar und oral anwendbar produziert werden können. Die Erzeugung von ZP-reaktiven Antikörpern durch pflanzenproduzierte Peptide und die Induktion von Antikörper-assoziiertes Unfruchtbarkeit legt weitere Studien nahe, um den Unfruchtbarkeitseffekt pflanzenproduzierter Peptide bei Wildtyp-Mäusen zu untersuchen. Die Ergebnisse der Experimente können die Grundlage für die Entwicklung mausspezifischer kontrazeptiver Futterkörner zur oralen Immunisierung von Nagetieren und ihr Populationsmanagement sein.