

UNIwersytet Warszawski

Wydział Biologii



KATARZYNA ROESKE

Nr albumu: 220425

***„Konstrukcja i charakterystyka uniwersalnego  
bakteryjnego wektora do wykorzystania  
w szczepionkach nowej generacji”***

*Rozprawa doktorska  
w zakresie nauk biologicznych  
dyscyplina: biologia*

Praca wykonana pod kierunkiem  
prof. dr hab. Jacka Bieleckiego  
Zakład Mikrobiologii Stosowanej, Instytut Mikrobiologii  
Wydział Biologii, Uniwersytet Warszawski

Warszawa, 2015

---

### *Oświadczenie kierującego pracą*

---

Oświadczam, że niniejsza praca została przygotowana pod moim kierunkiem i stwierdzam, że spełnia ona warunki do przedstawienia jej w postępowaniu o nadanie stopnia doktora nauk biologicznych w zakresie biologii.

Data

Podpis kierującego pracą

---

### *Oświadczenie autora pracy*

---

Świadom odpowiedzialności prawnej oświadczam, że niniejsza rozprawa doktorska została napisana przeze mnie samodzielnie i nie zawiera treści uzyskanych w sposób niezgodny z obowiązującymi przepisami.

Oświadczam również, że przedstawiona praca nie była wcześniej przedmiotem procedur związanych z uzyskaniem stopnia doktora w innej jednostce.

Oświadczam ponadto, że niniejsza wersja pracy jest identyczna z załączoną wersją elektroniczną.

Data

Podpis autora pracy

---

### ***Słowa kluczowe***

---

Ag85B, *Bacillus subtilis*, komórkowa odpowiedź immunologiczna, owoalbumina, prezentacja antygeny, szczepionka, wektor szczepionkowy

---

### ***Tytuł pracy w języku angielskim***

---

*“Construction and characterization of a universal bacterial vector for use in a new generation of vaccines”*

Serdeczne podziękowania pragnę złożyć:

**prof. Jackowi Bieleckiemu** za opiekę i przewodnictwo naukowe, zaangażowanie, ogromną życzliwość i wsparcie;

**dr. Radosławowi Stachowiakowi i dr. Tomaszowi Jagielskiemu** za wspólne poszukiwanie nowych rozwiązań, inspirujące dyskusje, cenne sugestie oraz doskonałą atmosferę pracy;

**prof. Michałowi Obuchowskiemu i członkom jego zespołu** za wprowadzenie w tajniki nowoczesnej wakcynologii, umożliwienie mi realizacji długotrwałych eksperymentów w Zakładzie Bakteriologii Molekularnej Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego, jak również za nieocenioną pomoc merytoryczną i praktyczną;

**prof. Nadziei Dreli i członkom jej laboratorium** w Zakładzie Immunologii Uniwersytetu Warszawskiego za umożliwienie wykonania części badań oraz za cenne uwagi i sugestie;

**lek. wet. Grażynie Peszyńskiej-Sularz** za doskonałą współpracę w badaniach z wykorzystaniem zwierząt laboratoryjnych;

**mgr Michałowi Kamińskiemu i mgr Zofii Bakule** za wszelką pomoc i wieloletnią współpracę naukową;

**Moim byłym studentom, z którymi miałam wielką przyjemność współpracować – mgr Marcie Piotrowskiej, mgr Michałowi Misiowcowi, mgr Dominice Jurkiewicz, mgr Aleksandrze Ziółkowskiej oraz Sylwii Gregorczyk;**

**Pracownikom Zakładów Instytutu Mikrobiologii oraz Zakładu Immunologii** za stworzenie miłej i naukowej atmosfery pracy;

**Mojemu kochanemu mężowi Pawłowi Roeske** za nieustające wsparcie w zmaganiach przy realizacji projektu doktorskiego i dostarczenie inspiracji podczas pisania rozprawy;

**Moim wspaniałym Rodzicom i siostrze Karolinie** za wiarę we mnie i dzielne podtrzymywanie mnie na duchu.

---

## Spis treści

---

<b>Wykaz skrótów .....</b>	<b>9</b>
<b>Streszczenie .....</b>	<b>11</b>
<b>1. Wstęp.....</b>	<b>14</b>
Wprowadzenie.....	14
1.1.    Wakcynologia – rys historyczny i perspektywy .....	14
1.2.    Swoista (nabyta) odpowiedź immunologiczna .....	17
1.3.    Komórki efektorowe komórkowej odpowiedzi immunologicznej .....	19
1.4.    Prezentacja antygeny i jego rozpoznanie przez limfocyty .....	22
1.5.    Pamięć immunologiczna .....	27
1.6.    Szczepionki indukujące komórkową odpowiedź immunologiczną .....	28
1.7.    Szczepionki podjednostkowe .....	29
1.8.    Szczepionki wektorowe .....	34
1.9.    Bakterie patogenne jako wektory szczepionkowe .....	37
1.10.   Bakterie niepatogenne jako wektory szczepionkowe .....	38
Charakterystyka obiektu badań .....	39
<b>2. Cele pracy.....</b>	<b>48</b>
Cel poznawczy .....	48
Cel praktyczny.....	48
<b>3. Materiały.....</b>	<b>49</b>
3.1. Szczepy bakteryjne .....	49
3.2. Komórki eukariotyczne .....	51
3.3. Zwierzęta .....	51
3.4. Plazmidy bakteryjne.....	51
Plazmidy użyte w pracy .....	51
Plazmidy skonstruowane w pracy .....	52
3.5. Startery do reakcji PCR .....	55
Startery do amplifikacji DNA / RNA .....	55
3.6. Podłoża i dodatki do podłoży.....	57
Podłoża do hodowli bakteryjnych .....	57
Dodatki do podłoży do hodowli bakteryjnych .....	58
Podłoża do hodowli komórkowych .....	58
Dodatki do podłoży do hodowli komórkowych.....	58
Podłoże do mrożenia.....	58
3.7. Roztwory i bufory .....	59
Bufor PBS.....	59
137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM bufor fosforanowy; pH 7,4 .....	59
Bufor TM.....	59
Roztwór soli fizjologicznej .....	59
Roztwór do zamrażania hodowli bakteryjnych .....	59
Bufory i roztwory do elektroforezy DNA w żelach agarozowych .....	59
Bufor SET .....	59
Bufor SSC .....	59
Bufor lizujący dla <i>L. monocytogenes</i> .....	60
Roztwory do przygotowywania komórek chemokompetentnych <i>E. coli</i> .....	60
Roztwory do transformacji <i>B. subtilis</i> .....	60

3.8. Bufory i roztwory do analizy białek.....	60
Bufor Laemmli'ego .....	60
Bufory do oczyszczania białek z metryczką 6xHis.....	60
Bufory i roztwory do elektroforezy białek w żelu SDS-PAGE.....	61
Bufory do barwienia żeli białkowych.....	62
Bufor do transferu białek na membranę nitrocelulozową .....	62
Bufory do immunodetekcji metodą Western-blot.....	62
Roztwory stosowane przy infekcji komórek eukariotycznych bakteriami .....	62
Bufor ACK do izolacji splenocytów .....	62
Bufory do wykrywania przeciwciał IgG metodą ELISA.....	62
3.9. Specyficzne odczynniki, materiały i przeciwciała.....	63
<b>4. Metody .....</b>	<b>67</b>
4.1. Hodowla szczepów bakteryjnych, pomiar CFU, przechowywanie.....	67
4.2. Analiza kwasów nukleinowych .....	67
Izolacja DNA plazmidowego .....	67
Izolacja DNA chromosomalnego .....	67
Amplifikacja DNA w reakcjach PCR.....	68
Trawienie enzymami restrykcyjnymi, modyfikacja końców, ligacja DNA.....	68
Elektroforeza w żelach agarozowych .....	68
Izolacja fragmentów DNA z żelu agarozowego .....	69
Sekwencjonowanie DNA .....	69
Izolacja totalnego RNA z komórek bakteryjnych.....	69
RT-PCR.....	69
4.3. Wprowadzanie DNA do komórek bakteryjnych .....	70
Transformacja komórek <i>E. coli</i> metodą rubidowo-wapniową .....	70
Transformacja komórek <i>B. subtilis</i> .....	70
4.4. Analiza białek.....	71
Izolacja białek sekrecyjnych .....	71
Nadprodukcja i oczyszczanie LLO .....	71
Oznaczanie stężenia białka.....	71
Rozdział białek w żelach poliakrylamidowych metodą SDS-PAGE .....	72
Rozdział białek w żelach tricinowych metodą SDS-PAGE .....	72
Barwienie białek błękitem brylantowym Coomassie .....	72
Transfer na membranę nitrocelulozową .....	72
Western-blot .....	72
Analizy dot-blot .....	73
4.5. Hodowla komórek eukariotycznych .....	73
Warunki hodowli .....	73
Przechowywanie komórek eukariotycznych .....	74
Gentamycynowy test inwazyjności i proliferacji .....	74
Określenie żywotności komórek eukariotycznych .....	75
4.6. Metody specyficzne .....	75
Test hemolityczny.....	75
Pomiar fluorescencji GFP.....	75
4.7. Metody immunologiczne .....	76
Modele prezentacji antygeny OVA .....	76
Znakowanie immunocytochemiczne i cytometria przepływowa .....	76

Pomiar dawki LD <sub>50</sub> .....	76
Immunizacja myszy .....	77
Izolacja splenocytów .....	77
Analiza produkcji INF- $\gamma$ w teście ELISPOT .....	78
Uzyskanie surowicy krwi .....	78
Wykrywanie przeciwciał IgG za pomocą testu ELISA .....	78
4.8. Analiza komputerowa sekwencji nukleotydowych i aminokwasowych .....	79
4.9. Analizy statystyczne .....	79
<b>5. Wyniki .....</b>	<b>80</b>
5.1. Konstrukcja plazmidowych wektorów integracyjnych umożliwiającą ekspresję genów kodujących heterologiczne białka w <i>B. subtilis</i> .....	80
5.2. Ocena inwazyjności i cytotoksyczności szczepów <i>B. subtilis</i> wytwarzających LLO .....	83
Inwazyjność szczepów <i>B. subtilis</i> BR1S i BR1C .....	83
Cytotoksyczność szczepów <i>B. subtilis</i> BR1S i BR1C .....	84
5.3. Analiza ekspresji owoalbuminy jaja kurzego (OVA) w <i>B. subtilis</i> oraz określenie potencjału szczepów <i>B. subtilis</i> -OVA do indukcji komórkowej odpowiedzi immunologicznej .....	85
Konstrukcja szczepów <i>B. subtilis</i> LLO-OVA i LLO-OVA-GFP .....	85
Detekcja białek fuzyjnych w supernatantach hodowli szczepów <i>B. subtilis</i> LLO-OVA .....	91
Zdolność szczepów <i>B. subtilis</i> -OVA do wnikania do wnętrza komórek APC .....	94
Żywotność komórek APC infekowanych szczepami <i>B. subtilis</i> -OVA .....	95
Prezentacja epitopu SIINFEKL białka OVA na komórkach dendrytycznych infekowanych <i>B. subtilis</i> -OVA ..	97
Aktywacja limfocytów CD8 <sup>+</sup> w odpowiedzi na prezentację epitopu SIINFEKL na komórkach dendrytycznych infekowanych <i>B. subtilis</i> -OVA .....	102
5.4. Analiza wpływu delekcji linkera CTL w chaperonie SecA na sekrecję OVA .....	104
Uzyskanie szczepów pochodnych <i>B. subtilis</i> BR1S i R_OVA3 niosących mutację w genie <i>secA</i> .....	104
Analiza sekrecji białek heterologicznych w zmutowanych szczepach <i>B. subtilis</i> BR1S $\Delta$ CTL oraz R_OVA3 $\Delta$ CTL .....	105
5.5. Analiza ekspresji Ag85B <i>M. tuberculosis</i> w <i>B. subtilis</i> oraz potencjału szczepów <i>B. subtilis</i> -Ag85B do immunizacji myszy .....	106
Konstrukcja szczepów <i>B. subtilis</i> wytwarzających Ag85B <i>M. tuberculosis</i> .....	106
Analiza aktywności hemolitycznej i sekrecji Ag85B .....	107
Pomiar stężenia LLO w supernatantach hodowlanych .....	109
Pomiar komórkowej odpowiedzi immunologicznej indukowanej przez szczepy R_Ag85B i K_Ag85B – testy ELISpot .....	110
Humoralna odpowiedź immunologiczna indukowana przez szczepy R_Ag85B i K_Ag85B .....	111
<b>6. Wnioski .....</b>	<b>113</b>
<b>7. Dyskusja .....</b>	<b>115</b>
<b>8. Załączniki .....</b>	<b>131</b>
8.1. Konstrukcja wektora pUR10 umożliwiającego fakultatywną ekspresję genów sklonowanych w miejscu MCS .....	131
8.2. Konstrukcja wektora pUK10 umożliwiającego konstytutywną ekspresję genów sklonowanych w miejscu MCS i uzyskanie szczepu <i>B. subtilis</i> BR1C konstytutywnie wydzielającego LLO .....	134
8.3. Konstrukcja szczepów <i>B. subtilis</i> wytwarzających antygeny fuzyjne LLO-OVA .....	135
Uzyskanie plazmidowych wektorów niosących fuzyjne antygeny LLO-OVA .....	138
Uzyskanie szczepów <i>B. subtilis</i> produkujących białka fuzyjne LLO-OVA .....	145
8.4. Konstrukcja szczepów <i>B. subtilis</i> wytwarzających antygeny fuzyjne LLO-OVA-GFP .....	145
Uzyskanie plazmidowych wektorów niosących fuzyjne antygeny LLO-OVA-GFP .....	145

<i>Uzyskanie szczepów B. subtilis produkujących białka fuzyjne LLO-OVA-GFP</i> .....	149
8.5. Konstrukcja szczepów <i>B. subtilis</i> pozbawionych linkera CTL w białku SecA .....	149
<i>Sekwencje genów wykorzystanych przy konstrukcji</i> .....	149
<i>Uzyskanie szczepów BR1SΔCTL i R_OVA3ΔCTL z delecją linkera CTL w białku SecA</i> .....	153
8.6. Konstrukcja szczepów <i>B. subtilis</i> wytwarzających antygeny fuzyjne LLO-Ag85B .....	155
<i>Sekwencje nukleotydowe genów wykorzystywanych przy konstrukcji wektorów niosących antygen fuzyjny LLO-Ag85B</i> .....	155
<i>Uzyskanie plazmidowych wektorów niosących fuzyjne antygeny LLO-OVA</i> .....	158
<i>Uzyskanie szczepów B. subtilis produkujących białka fuzyjne LLO-Ag85B</i> .....	162
<b>9. Literatura</b> .....	<b>163</b>
<b>10. Upowszechnienie wyników i finansowanie badań</b> .....	<b>178</b>



---

## Wykaz skrótów

---

Skrót	Oznaczenie
<b>Abs<sub>nm</sub></b>	( <i>absorbance</i> ), absorbancja mierzona przy fali wzbudzenia o określonej długości
<b>AP</b>	alkaliczna fosfataza
<b>APC</b>	( <i>antigen presenting cell</i> ), komórka prezentująca antygen
<b>APC</b>	allofikocyjanina
<b>Ap<sup>R</sup></b>	( <i>ampicillin resistance</i> ), oporność na ampicylinę
<b>Ble<sup>R</sup></b>	( <i>bleomycin resistance</i> ), oporność na bleomycynę
<b>bp</b>	( <i>base pair</i> ) para zasad
<b>CFU</b>	( <i>colony forming units</i> ), jednostki wytwarzające kolonie
<b>ConA</b>	konkanawalina A
<b>CTL</b>	( <i>C-terminal linker</i> ), linker CTL
<b>DNA</b>	( <i>deoxyribonucleic acid</i> ), kwas deoksyrybonukleinowy
<b>DNaza</b>	deoksyrybonukleaza
<b>ER</b>	( <i>endoplasmic reticulum</i> ) retikulum endoplazmatyczne, siateczka śródplazmatyczna
<b>Erm<sup>R</sup></b>	( <i>erythromycin resistance</i> ) oporność na erytromycynę
<b>HRP</b>	( <i>horse radish peroxidase</i> ), peroksydaza chrzanowa
<b>Ig</b>	immunoglobulina
<b>IL</b>	interleukina
<b>INF-γ</b>	interferon-γ
<b>K</b>	kontrola
<b>Kan<sup>R</sup></b>	( <i>kanamycin resistance</i> ), oporność na kanamycynę
<b>kDa</b>	( <i>kilodalton</i> ), kilodalton
<b>LD</b>	( <i>lethal dose</i> ), dawka letalna
<b>LLO</b>	( <i>listeriolysin O</i> ) listeriolizyna O
<b>LPS</b>	lipopolisacharyd
<b>MCS</b>	( <i>multicloning site</i> ), polilinker
<b>MHC</b>	( <i>major histocompatibility complex</i> ), cząsteczki układu zgodności tkankowej
<b>MOI</b>	( <i>multiplicity of infection</i> )
<b>NeoR</b>	( <i>neomycin resistance</i> ), oporność na neomycynę
<b>o/n</b>	( <i>overnight</i> ), całonocny
<b>OD</b>	( <i>optical density</i> ), gęstość optyczna
<b>OE PCR</b>	( <i>overlap extension PCR</i> ), ligacja metodą PCR
<b>OVA</b>	owoalbumina
<b>PAMP</b>	( <i>pathogen associated molecular pattern</i> ), wzorzec molekularny związany z patogenem
<b>PCR</b>	( <i>polymerase chain reaction</i> ), reakcja łańcuchowa polimerazy
<b>PE</b>	( <i>phycoerythrin</i> ) fikoerytryna
<b>RBS</b>	( <i>ribosome binding site</i> ) miejsce wiązania rybosomu
<b>RNA</b>	( <i>ribonucleic acid</i> ) kwas rybonukleinowy
<b>RNaza</b>	rybonukleaza
<b>RPM</b>	( <i>revolutions per minute</i> ), obroty na minutę
<b>RT-PCR</b>	( <i>reverse transcription PCR</i> ), PCR poprzedzony reakcją odwrotnej transkrypcji
<b>SDS-PAGE</b>	( <i>sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i> ), elektroforeza w żelu poliakrylamidowym w obecności SDS

<b>SP</b>	( <i>signal peptide</i> ), peptyd sygnałowy
<b>spp.</b>	(łac. <i>species</i> ) nieokreślony gatunek danego rodzaju (l. mnoga)
<b>t / T</b>	( <i>time</i> ), czas
<b>TAA</b>	( <i>tumor associated antigen</i> ), antygen związany z nowotworem
<b>Tc</b>	( <i>cytotoxic T cell</i> ), limfocyt cytotoksyczny
<b>TCR</b>	( <i>T cell receptor</i> ), receptor limfocyta T
<b>Th</b>	( <i>T helper</i> ), limfocyt T pomocniczy
<b>TLR</b>	( <i>Toll-like receptor</i> ), receptor Toll-like
<b>TNF</b>	( <i>tumor necrosis factor</i> ), czynnik martwicy guza
<b>UW</b>	Uniwersytet Warszawski
<b>WHO</b>	( <i>World Health Organisation</i> ), Światowa Organizacja Zdrowia
<b>wt</b>	( <i>wild type</i> ), fenotyp niezmodyfikowany, dziki
<b>ZMS, UW</b>	Zakład Mikrobiologii Stosowanej, Uniwersytet Warszawski

---

## *Streszczenie*

---

Zrozumienie mechanizmów odpowiedzialnych za wywoływanie odpowiedzi immunologicznej ma kluczowe znaczenie w generowaniu odporności przeciw wszystkim patogenom. Największe wyzwanie stanowi wywołanie odporności przeciw patogenom namnażającym się wewnątrzkomórkowo, które są przyczyną chorób takich jak: AIDS, malaria czy gruźlica, prowadzących do stale wzrastającej liczby zgonów. W przeciwieństwie do zewnątrzkomórkowych czynników chorobotwórczych, są one mniej widoczne dla układu immunologicznego, co powoduje, że do ich eliminacji niezbędne jest zajście komórkowej odpowiedzi immunologicznej, której efektorami są limfocyty pomocnicze CD4<sup>+</sup> i cytotoksyczne CD8<sup>+</sup>. Efektywną metodą prowadzącą do aktywacji cytotoksycznych limfocytów T jest dostarczenie antygeny do cytoplazmy komórki prezentującej antygen. Istnieją różne strategie wprowadzania antygenów do cytozolu tj.: wykorzystanie nanocząstek, wirusów czy patogennych lub niepatogennych bakterii. Jedną z obiecujących i intensywnie badanych strategii jest wykorzystanie komórek bakteryjnych.

Wyniki badań wstępnych wskazują, że bakteria *Bacillus subtilis* stanowi doskonały wektor nośnikowy dla heterologicznych antygenów, ze względu na zdolność do bardzo efektywnej sekrecji białek na zewnątrz komórki, niepatogenność, znajomość genetyki oraz niskie koszty hodowli. W toku eksperymentów z wykorzystaniem *B. subtilis* wykazano, że ekspresja genu kodującego listeriolizynę O umożliwia wnikanie do wnętrza komórek eukariotycznych oraz wyswobodzenie się z ich wakuoli do cytoplazmy, a także, że koekspresja LLO z innymi antygenami w wektorach bakteryjnych przyczynia się do zwiększonej odpowiedzi immunologicznej. Cechy te przemawiają za tym, że *B. subtilis* może spełniać funkcję nośnika antygenów i umożliwiać zgłębienie procesu indukcji komórkowej odpowiedzi immunologicznej. Hipoteza badawcza przedstawianej rozprawy doktorskiej zakłada, że *B. subtilis* wytwarzający jednocześnie sekrecyjne formy LLO i danego heterologicznego antygeny będzie skutecznie dostarczał antygen bezpośrednio do cytozolu komórki prezentującej, umożliwiając tym samym jego prezentację w kompleksach MHC klasy I i indukcję odpowiedzi komórkowej.

Przedstawiona rozprawa doktorska stanowi próbę stworzenia nowatorskiego i uniwersalnego wektora szczepionkowego na bazie *B. subtilis* wywołującego odpowiedź

immunologiczną skierowaną przeciw dowolnemu białku. Pierwsza jej część dotyczy konstrukcji plazmidowych wektorów umożliwiających uzyskiwanie szczepów *B. subtilis* wytwarzających sekrecyjną formę danego antygeny. W toku eksperymentów otrzymano zarówno wektor umożliwiający fakultatywną, zależną od obecności induktora w podłożu hodowlanym ekspresję antygenów, jak i wektor umożliwiający konstytutywną syntezę. Potwierdzono zdolność otrzymanych plazmidów do inkorporacji do chromosomu *B. subtilis* oraz zwiększoną efektywność transformacji do komórek kompetentnych, co przyczyniło się do znacznego uproszczenia procesu uzyskiwania modyfikowanych szczepów *B. subtilis* produkujących heterologiczne białka.

Opisane w pierwszej części rozprawy doktorskiej wektory posłużyły jako baza do stworzenia szczepów bakteryjnych wytwarzających heterologicznie prokariotyczne oraz eukariotyczne białka. Ich zdolność do wywoływania prezentacji antygeny na komórkach APC i specyficznej, ukierunkowanej przeciw danemu antygenowi odpowiedzi immunologicznej analizowano w drugiej części przedstawionej pracy. Pierwszym jej etapem było uzyskanie szczepów *B. subtilis* wytwarzających owoalbuminę jaja kurzego, która jest modelowym antygenem eukariotycznym. Antygen ten wytypowano ze względu na dostępność zaawansowanych narzędzi molekularnych umożliwiających ocenę potencjału immunologicznego oraz powszechność użycia go w badaniach. Stworzono szczepy wytwarzające fuzyjny antygen LLO-OVA powstały poprzez połączenie pełnej formy lub N-terminalnej części listeriolizyny O niosącej sekwencje: sygnałową i PEST-podobną z pełnej długości lub fragmentaryczną owoalbuminą. Analiza produkcji różnych form białka fuzyjnego LLO-OVA miała na celu wytypowanie struktury genetycznej przyczyniającej się do wzbudzenia najefektywniejszej prezentacji antygeny i najsilniejszej odpowiedzi immunologicznej. W toku badań sprawdzono zdolność uzyskanych szczepów do wnikania do cytozolu komórek APC i dostarczania antygeny, określono poziom prezentacji epitopu OVA oraz aktywacji limfocytów cytotoksycznych rozpoznających epitop OVA w kontekście MHC I. Przeprowadzone eksperymenty wykazały, że jedynie ekspresja pełnej długości OVA poddanej fuzji do N-końcowej sekwencji LLO w *B. subtilis* umożliwia zajście skutecznej prezentacji antygeny na komórkach dendrytycznych, prowadzącej do aktywacji cytotoksycznych limfocytów T. Sekrecja epitopu OVA w fuzji z pełnej długości LLO bądź jej N-końcową sekwencją nie prowadzi do zajścia komórkowej odpowiedzi immunologicznej. Badania opisane tej części dowiodły ponadto, że *B. subtilis* jest skutecznym wektorem

szczepionkowym dostarczającym antygeny eukariotyczne i indukującym ich prezentację w kompleksach z układami zgodności tkankowej.

Wytypowana struktura genetyczna antygeny heterologicznego została zastosowana przy konstrukcji szczepów *B. subtilis* wytwarzających główny antygen bakterii *M. tuberculosis*, transferazę mykolylową 85B (Ag85B). Analiza zdolności szczepów *B. subtilis* do immunizacji myszy przeciwko *M. tuberculosis* jest integralną częścią opisanych w rozprawie badań. Gruźlica w ostatnich czasach znalazła się w czołówce najgroźniejszych chorób, a od kilku lat obserwuje się postępujący wzrost zachorowań. Do tej pory nie opracowano skutecznej metody immunizacji powodującej trwałą i silną odporność przeciw gruźlicy, więc zastosowanie żywych wektorów szczepionkowych na bazie niepatogennej bakterii do immunizacji stanowi obiecujący i silnie eksplorowany trend współczesnej wakcynologii. W części rozprawy doktorskiej poświęconej konstrukcji szczepionki przeciwgruźliczej uzyskano dwa szczepy konstytutywnie lub fakultatywnie produkujące Ag85B. Po potwierdzeniu zdolności do sekrecji heterologicznego białka poza komórkę bakteryjną, przeprowadzono szeroką analizę immunogenności *in vivo*. Myszy seryjnie szczepiono bakteriami, a ich splenocyty oraz surowica krwi posłużyły do określenia typu zachodzącej odpowiedzi immunologicznej. Analizy nieoczekiwanie wykazały, że oba analizowane szczepy *B. subtilis* nie prowadzą do aktywacji mediatorów odpowiedzi komórkowej, jakimi są limfocyty Tc. Immunizacja szczepem konstytutywnie wytwarzającym gruźliczy antygen prowadzi natomiast do zwiększenia poziomu całkowitej immunoglobuliny IgG, co świadczy o zajęciu humoralnej odpowiedzi immunologicznej. Rozbieżność wyników analiz z wykorzystaniem szczepów ekspresujących białko OVA i Ag85B sugeruje, że natura ekspresowanego antygeny może wpływać na typ generowanej odpowiedzi odpornościowej, jednak hipoteza ta musi być zweryfikowana poprzez przeprowadzenie odpowiednich dalszych badań.

Podsumowując, przeprowadzone badania dowiodły, że wykorzystanie wegetatywnych komórek *B. subtilis* w immunizacji jest obiecującą perspektywą współczesnej wakcynologii. Wektory szczepionkowe uzyskiwane na bazie szczepu MB4 są zdolne do efektywnej produkcji oraz sekrecji zarówno eukariotycznych, jak i prokariotycznych białek, co może mieć przełożenie na podatność ich wykorzystania do indukcji zarówno komórkowych, jak i humoralnych mechanizmów odporności nabytej.

---

## 1. Wstęp

---

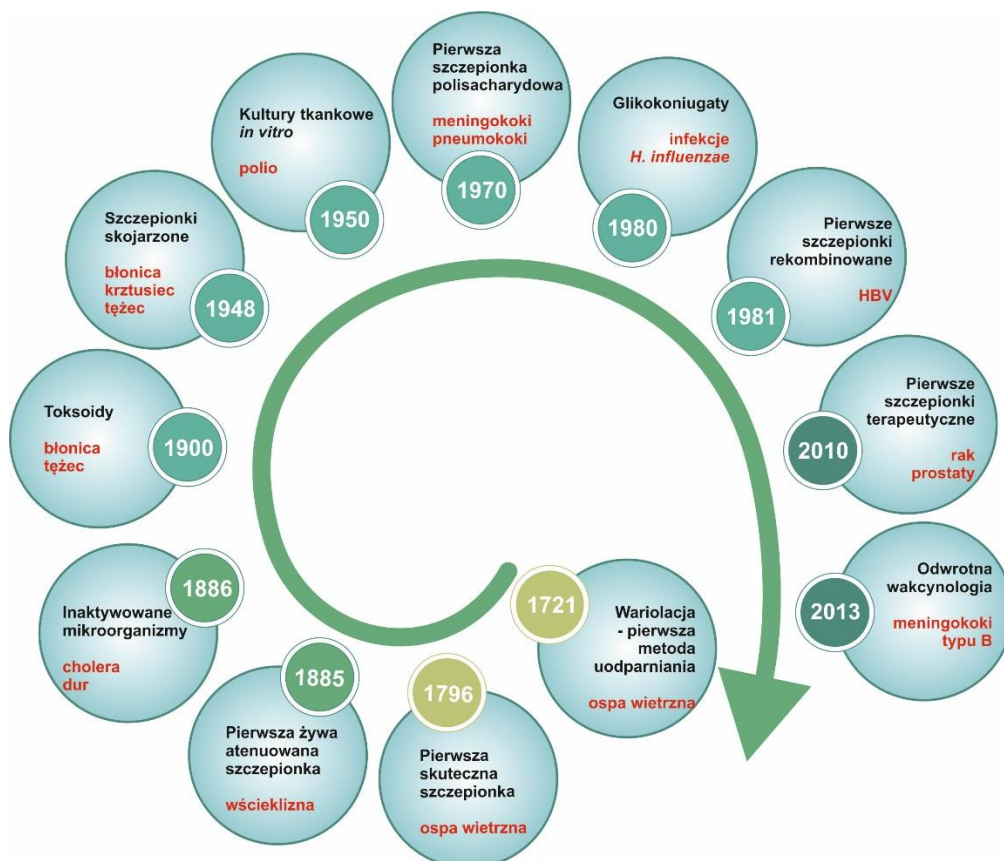
### Wprowadzenie

#### 1.1. Wakcynologia – rys historyczny i perspektywy

Postępy w nauce od zawsze stanowiły siłę napędową w badaniach nad konstrukcją nowych, skutecznych szczepionek (**rysunek 1.1**). Termin szczepionki jako preparatu biologicznego wzmagającego odporność na daną chorobę oraz koncepcja szczepień zostały wprowadzone przez Edwarda Jennera w 1796 roku. Wykorzystał on materiał zakaźny ospy krowianki do zaszczepienia 8-letniego chłopca, co przyniosło efekt w postaci skutecznej immunizacji przeciw wirusowi ospy prawdziwej (Smith, 2013). Złotą erę wakcynologii zapoczątkowały odkrycia Pasteura i Kocha, którzy opracowali preparaty szczepionkowe opierające się na żywych, atenuowanych mikroorganizmach, organizmach inaktywowanych bądź produkowanych przez nie toksynach. Ludwik Pasteur w 1885 roku dokonał pierwszych skutecznych szczepień chroniących przed wirusem wścieklizny. Opracował on metodę szybkiego namnażania wirusa poprzez hodowlę w organizmach króliczych oraz jego atenuacji na drodze odwadniania płynu mózgowo-rdzeniowego zainfekowanych wirusem królików poprzez jego ekspozycję na działanie powietrza (Berche, 2012). Robert Koch w toku swoich badań nad przecinkowcem cholery (*Vibrio cholerae*) dowiódł, że pojedyncze zakażenie chroni przed kolejnymi infekcjami w czasie tej samej epidemii. Pierwsze próby zastosowania zabitych komórek *V. cholerae* do immunizacji zostały natomiast podjęte pod koniec XIX wieku przez Jaime Ferrána, a także Sawtschenko i Sabolotnego (Lopez i wsp., 2014).

Początek XX wieku przyniósł odkrycie nowego typu szczepionek, w których wykorzystywano toksoidy, inaktywowane na drodze chemicznej lub termicznej toksyny bakteryjne, które pozbawione były cech toksyczności, ale jednocześnie wykazywały potencjał immunizacyjny. Powstały szczepionki na bazie toksyny tężcowej *Clostridium tetani* oraz toksyny błoniczej *Corynebacterium diphtheriae*. Następnym krokiem było opracowanie pierwszych skojarzonych szczepionek, uodparniających na błonicę i tężec (Di-Te) lub na błonicę, krztusiec i tężec równocześnie (Di-Per-Te). Kolejny przełom w badaniach z dziedziny wakcynologii nastąpił w drugiej połowie XX wieku jako następstwo rozwoju technik hodowli

komórkowych, dzięki zastosowaniu których możliwe stało się namnażanie cząstek wirusowych. Umożliwiło to stworzenie szczepionek skutecznie immunizujących przeciw rotawirusom czy wirusom zapalenia wątroby typu A, polio, różyczki, świnki, odry i ospy wietrznej. Dalszy progres w dziedzinie mikrobiologii doprowadził do opracowania szczepionek polisacharydowych, które wywoływały odpowiedź przeciw polisacharydom otoczkowym bakterii takich jak *Streptococcus pneumoniae*, *Neisseria meningitidis* serotyp A, C, W i Y czy *Haemophilus influenzae*. Tego typu terapeutyki indukowały jednak stosunkowo słabą reakcję immunologiczną u dzieci. Opracowanie szczepionek w formie glikokoniugatów pozwoliło na pokonanie tych ograniczeń, gdyż powodowało indukcję humoralnych mechanizmów immunologicznych. Odkrycia biologii molekularnej pozwoliły również na skonstruowanie preparatów immunizujących przeciw mikroorganizmom nie dającym się namnażać w oparciu o hodowle komórkowej, takim jak wirus zapalenia wątroby typu B (HBV) czy wirus brodawczaka ludzkiego (HPV). Szczepionki przeciw tym patogenom mają postać oczyszczonych, zrekombinowanych białek wirusa, które tworzą niewirulentne cząstki wirusowe (viral-like particle, VLP) (Delany i wsp., 2014).



Rysunek 1.1. Główne odkrycia wakcynologii (zmodyfikowane wg Delany i wsp., 2014).

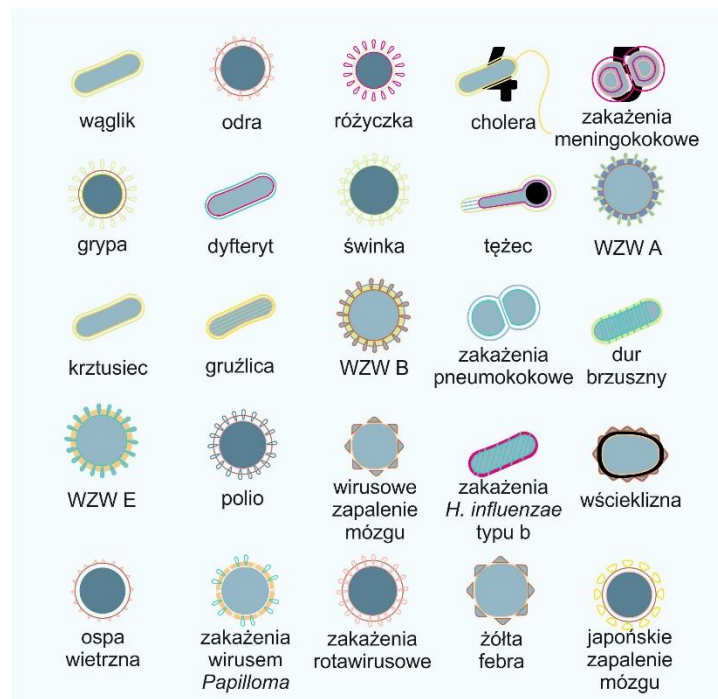
Ostatnie dwie dekady przyniosły nowe rozwiązania w wakcynologii, które umożliwiają poszukiwanie najbardziej immunogennych antygenów. Zsekwencjonowanie kompletnych genomów organizmów chorobotwórczych oraz człowieka doprowadziło do powstania tzw. „odwrotnej wakcynologii”, techniki, która na drodze analiz genomicznych pozwala na wytypowanie najlepszych celów dla komórek układu immunologicznego. Genom danego organizmu stanowi bowiem rezerwuar genów kodujących białka stanowiące potencjalny immunogen, który może być zastosowany do konstrukcji szczepionki (Kanampalliar i wsp., 2013). Sztandarowym przykładem wykorzystania tej techniki jest opracowanie szczepionki immunizującej przeciw bakterii *Neisseria meningitidis* serotypu B (MenB), która w przeciwieństwie do meningokoków innych typów pokryta jest polisacharydem wykazującym duże podobieństwo do polisacharydu obecnego w ludzkich tkankach. Cecha ta sprawiła, że szczepionki glikokoniugatowe były nieskuteczne w immunizacji przeciw MenB. Wybrane na drodze analiz genomu białka poddano ekspresji w komórkach *E. coli*, dzięki czemu uzyskano pierwszą skuteczną szczepionkę przeciw MenB (Giuliani i wsp., 2006).

Kolejnym wyzwaniem współczesnej wakcynologii stało się również opracowanie szczepionek przeciw mikroorganizmom wykazującym duże różnice w ekspresji antygenów, jako że preparaty opracowane w XX wieku wykazują skuteczność głównie w profilaktyce zakażeń patogenami cechującymi się niską zmiennością antygenową. Rozwiązaniem jest stosowanie szczepionek niosących antygeny wielu szczepów jednocześnie. Przykładem takich immunoterapeutyków są poliwalentne szczepionki koniugatowe zawierające antygeny 7, 9 lub 13 spośród 93 znanych serotypów streptokoków (Auranen i wsp., 2013) lub poliwalentna szczepionka przeciw wirusowi grypy zmieniana sezonowo w oparciu o przewidywania dotyczące ewolucji biologicznej szczepów (Łuksza i Lässig, 2014). Do tej pory nie udało się jednak opracować skutecznej i trwale immunizującej szczepionki przeciw mikroorganizmom, które charakteryzuje bardzo duże tempo mutacji, takim jak wirusy HIV czy HCV. Potrafią one uniknąć odpowiedzi antygenowej organizmu gospodarza dzięki zmianom antygenów będących celem układu immunologicznego.

W ciągu ostatniego wieku szczepienia w bardzo znaczącym stopniu przyczyniły się do ograniczenia zapadalności na choroby zakaźne oraz zmniejszyły wywoływaną przez nie śmiertelność. Światowa Organizacja Zdrowia (World Health Organization, WHO) podaje, że szczepienia mogą ratować życie od 2 do 3 milionów ludzi każdego roku. Dzięki rozbudowanym programom szczepień choroby takie jak ospa prawdziwa czy polio zostały



wyeliminowane na całym świecie. Z danych raportu WHO z 2014 roku wynika, że w latach 2000 – 2012 o 78% spadła również liczba zgonów spowodowanych przez odrę. Jednocześnie organizacja informuje, że przy pomocy szczepień można kontrolować zapadalność na jedynie 25 ze wszystkich znanych chorób zakaźnych (**rysunek 1.2**). W 2012 roku w czołówce chorób powodujących najwyższą śmiertelność i przeciw którym nie istnieje skuteczna szczepionka plasowały się HIV/AIDS (1,6 miliona zgonów), gruźlica (1,3 miliona zgonów) czy malaria (0,6 miliona zgonów). Coraz większe zagrożenie stanowią również nowotwory, które w 2012 roku spowodowały śmiertelność rzędu 8,2 miliona osób. Ich profilaktyka za pomocą szczepień stanowi więc poważne wyzwanie dla współczesnej wakcynologii.



**Rysunek 1.2. Dostępne szczepionki uodparniające przeciw chorobom zakaźnym** (zmodyfikowane wg [www.who.int](http://www.who.int), dane kampanii World Immunization Week 2014).

## 1.2. Swoista (nabyta) odpowiedź immunologiczna

Szczepienie ma na celu wywołanie swoistej (nabytej) odpowiedzi immunologicznej, dlatego warunkiem niezbędnym do opracowania nowych metod skutecznej immunizacji jest bardzo dokładne poznanie jej mechanizmów. Terminem swoistej odpowiedzi immunologicznej określa się typ odporności organizmu zależny od rozpoznania antygenów przez przeciwciała i receptory znajdujące się na limfocytach. Odpowiedź ta jest indukowana

kontaktem receptora z antygenem, w związku z czym wykształca się wolniej niż mechanizmy zapalne. Cechuje ją specyficzność względem unikalnego antygeny oraz zdolność do wywoływania tzw. pamięci immunologicznej zapewniającej długotrwałą odporność organizmu na dany patogen. Składowymi nabytej odpowiedzi immunologicznej są białka - immunoglobuliny (Ig) zwane przeciwciałami oraz populacje limfocytów B i T.

Przeciwciała produkowane przez limfocyty B krążą w układzie krwionośnym i wiążą się z antygenami na powierzchni czynników infekcyjnych. Może to skutkować inaktywacją patogenu lub indukcją mediatorów stanu zapalnego, które doprowadzą do jego zniszczenia. Taką reakcję organizmu określa się mianem humoralnej odpowiedzi immunologicznej. Przeciwciała są odpowiedzialne za eliminowanie zakażeń patogenami, które mają pozakomórkowy etap w swoich cyklach życiowych lub które produkują metabolity wydostające się poza komórki gospodarza.

Drugim, swoistym mechanizmem immunologicznym jest komórkowa odpowiedź immunologiczna, która ma decydujące znaczenie przy wytwarzaniu odporności przeciw wirusom oraz patogenom wewnątrzkomórkowym, a także przy zwalczaniu komórek nowotworowych. Limfocyty T będące jej głównymi mediatorami w czasie trwania odpowiedzi różnicują do różnych subpopulacji komórek efektorowych, które mają wpływ na inne komórki układu odpornościowego. Część z nich przekształca się w limfocyty cytotoksyczne,  $CD8^+$  (cytotoxic T cell, CTL), które rozpoznają obce antygeny i prowadzą do zabicia komórki zainfekowanej wirusem, wewnątrzkomórkową bakterią czy też do eliminacji komórki nowotworowej. Pozostałe limfocyty tworzą populacje komórek  $CD4^+$  o właściwościach regulatorowych lub pomocniczych, stymulujące aktywność pozostałych leukocytów poprzez wydzielanie cytokin bądź przez bezpośredni kontakt z nimi.

Na efektywność odpowiedzi nabytej wpływają zarówno prawidłowy przebieg humoralnej oraz komórkowej odpowiedzi, jak i odpowiednia interakcja między komórkami efektorowymi obu typów odpowiedzi. Bardzo duże znaczenie ma współpraca limfocytów pomocniczych  $CD4^+$  z limfocytami B. Co najważniejsze, oba rodzaje nabytej odpowiedzi przyczyniają się do generowania populacji komórek pamięci, dzięki którym ponowny kontakt z tym samym antygenem prowadzi do szybszej i efektywniejszej odpowiedzi (Rote, 2006).

### 1.3. Komórki efektorowe komórkowej odpowiedzi immunologicznej

#### Limfocyty pomocnicze (CD4+, Th)

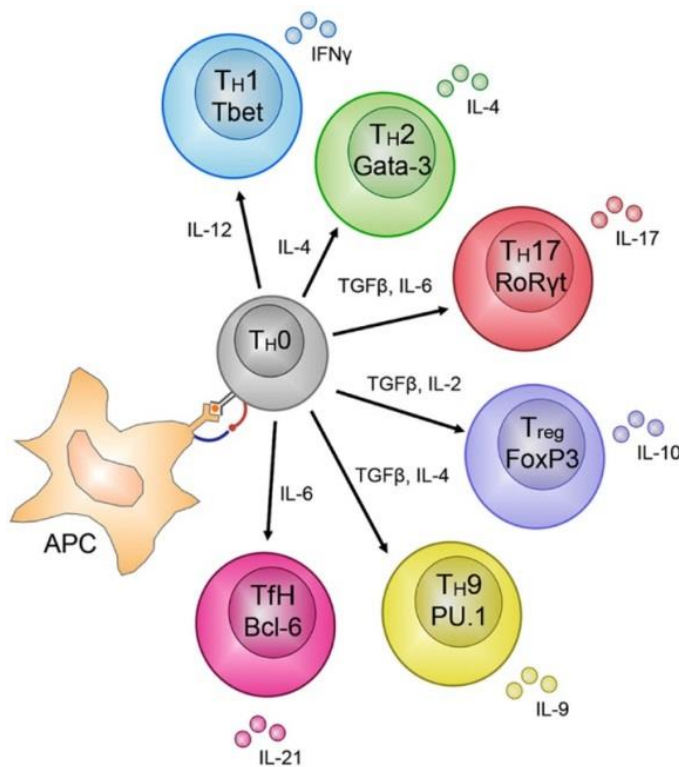
Limfocyty pomocnicze (T helper cells, Th) CD4<sup>+</sup> odgrywają centralną rolę w funkcjonowaniu układu immunologicznego. Stymulują limfocyty B do produkcji przeciwciał, wzmagają i utrzymują odpowiedź limfocytów CD8<sup>+</sup>, regulują aktywność makrofagów oraz odpowiedź immunologiczną przeciw mikroorganizmom patogennym, a także odpowiadają za kontrolę procesów autoimmunologicznych. Są również mediatorami pamięci immunologicznej, a spadek ich liczebności w organizmie przyczynia się do zwiększonej podatności na choroby infekcyjne. Tak zróżnicowaną rolę mogą pełnić dzięki różnicowaniu naiwnych komórek CD4<sup>+</sup> (Th<sub>0</sub>) do komórek efektorowych w odpowiedzi na prezentację antygeny przez komórki APC.

W 1986 roku Mosmann i wsp. wykazali istnienie dwóch grup limfocytów CD4<sup>+</sup> różniących się profilem produkowanych cytokin oraz markerami powierzchniowymi, oznaczonych jako Th1 i Th2. Cechą charakterystyczną limfocytów Th1 wspomagających głównie komórkową odpowiedź immunologiczną jest wydzielanie interferonu- $\gamma$  (INF- $\gamma$ ) oraz interleukiny-2 (IL-2). Komórki Th2 biorące udział w humoralnej odpowiedzi nie produkują natomiast INF- $\gamma$ , a ich sygnaturowymi cytokinami są interleukiny IL-4, IL-5 i IL-13. W 2003 roku dowiedziono istnienia trzeciej populacji komórek CD4<sup>+</sup>, która charakteryzuje się sekrecją nieprodukowanych przez Th1 i Th2 interleukin IL-17A, IL-17F i IL-22 (Murphy i wsp., 2003). Linia ta oznaczona jako Th17 (Park i wsp., 2005; Harrington i wsp., 2005) odgrywa znaczną rolę w generowaniu odporności na wczesnych etapach zakażeń *M. tuberculosis* (Khader i wsp., 2007). Jednocześnie odkryto czwartą populację indukowanych regulatorowych limfocytów T o fenotypie CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> (Chen i wsp., 2003). Są one zaangażowane w utrzymanie stanu tolerancji immunologicznej – hamują proliferację komórek T, a eksperymentalne dane świadczą również o blokowaniu defektów autoimmunologicznych. Różnicują one z limfocytów CD4<sup>+</sup> poza grasicą, co odróżnia je od naturalnych komórek regulatorowych T (Haribhai i wsp., 2011). Innymi komórkami uznawanymi za subpopulację limfocytów Th są pęcherzykowe limfocyty Fth (follicular T helpers). Migrują one do ośrodków rozmnażania GC (germinal centers) w obrębie pęcherzyków limfocytów B w tkance limfatycznej, gdzie wspomagają ich różnicowanie w komórki plazmatyczne lub komórki pamięci (Pratama i Vinuesa, 2014). W ciągu ostatnich

kilku lat scharakteryzowano również inne subpopulacje limfocytów Th, takie jak aktywne w trakcie zakażeń pasożytniczych i mogące się przyczyniać do chorób autoimmunologicznych komórki Th9 (Veldhoen i wsp., 2008) czy Th22, które mogą być zaangażowane w obronę immunologiczną i naprawę tkanki skórnej (Duhon i wsp., 2009).

Powstanie tak zróżnicowanych subpopulacji efektorowych i regulatorowych limfocytów CD4<sup>+</sup> zależy od ekspresji odpowiednich czynników transkrypcyjnych i rodzaju transkrybowanych genów, co w warunkach *in vitro* warunkowane jest obecnością różnych zestawów cytokin w trakcie aktywacji limfocyty przy udziale receptora TCR. Różnicowanie komórek Th do populacji Th1 indukowane jest obecnością IL-12, która jest produkowana przez komórki APC zainfekowane wirusami lub wewnątrzkomórkowymi patogenami. Powstałe limfocyty Th1 wytwarzają natomiast INF- $\gamma$ , który jest aktywny względem tego typu czynników infekcyjnych. Tego typu sprzężenie dodatnie obserwowane jest również przy różnicowaniu populacji komórek Th2, która generowana jest w obecności IL-4. Ta cytokina aktywuje limfocyty B oraz poprzez wpływ na makrofagi oraz monocyty bezpośrednio przyczynia się do wytworzenia stanu zapalnego, co prowadzi do usunięcia infekcji tego typu patogenami. W przypadku zakażeń grzybami lub niektórymi gatunkami bakterii komórki APC wytwarzają z kolei IL-1 $\beta$ , IL-6 i IL-23 indukujące różnicowanie w komórki Th17, które przez sekrecję IL-17 i rekrutację neutrofilów pośredniczą w ochronie przed patogenami zewnątrzkomórkowymi (Sallusto i wsp., 2010). Indukcja limfocytów iTreg odbywa się natomiast w obecności TGF- $\beta$  i IL-2 (Zhu i wsp., 2010).

Odebranie pozakomórkowego sygnału ze strony cytokin przez aktywowane komórki Th powoduje zmianę ekspresji czynników transkrypcyjnych. Różnicowanie do komórek Th1 zależy od aktywacji czynnika STAT1 i ekspresji T-box (T-bet) (Kanno i wsp., 2012). W procesie różnicowania limfocytów Th2 IL-4 aktywuje z kolei czynnik STAT6, co prowadzi do regulacji czynnika transkrypcyjnego Gata3 (Ansel i wsp., 2003). Przy powstawaniu limfocytów Th17 indukowana jest ekspresja czynnika ROR $\gamma$ T (Dong, 2008), natomiast czynnik transkrypcyjny FoxP3 aktywowany jest w przypadku komórek regulatorowych Treg (**rysunek 1.3**).



**Rysunek 1.3. Różnicowanie limfocytów CD4<sup>+</sup>** (Russ i wsp., 2013). Komórki Th posiadają zdolność różnicowania do różnych subpopulacji w zależności od obecności cytokin w trakcie rozpoznania komórki APC, np. komórki Th1 różnicują w obecności IL-12. Wejście na ścieżkę różnicowania powoduje uruchomienie ekspresji różnych czynników transkrypcyjnych, np. RoR $\gamma$ t dla komórek Th17. Powstałe subpopulacje komórek wytwarzają cytokiny regulujące przebieg infekcji patogenu, w wyniku której nastąpiło wydzielanie cytokin przez komórki APC.

### Limfocyty cytotoksyczne (CD8<sup>+</sup>, Tc)

Limfocyty cytotoksyczne (Tc) cechujące się obecnością markera CD8 na swej powierzchni odpowiadają za eliminację komórek nowotworowych lub komórek zainfekowanych patogenami wewnątrzkomórkowymi. Swoją funkcję efektorową zyskują dzięki produkcji cytokin takich jak INF- $\gamma$  czy TNF- $\alpha$  (tumor necrosis factor  $\alpha$ ) lub poprzez aktywność cytolytyczną. Po aktywacji komórek Tc dochodzi do uwolnienia perforujących błonę komórkową perforyn i granzymów, a także do indukcji apoptozy w zainfekowanej komórce na drodze FasL. Produkowana przez limfocyty Tc cytokina FasL łączy się z komórką przeznaczoną do apoptozy za pośrednictwem zewnątrzkomórkowej domeny receptora Fas, FASR, który zawiera również domenę transbłonową kotwiczącą receptor i domenę cytoplazmatyczną, zwaną domeną śmierci FADD (Fas associated death domain) o charakterze wykonawczym. Przekazuje ona sygnał do białek cytoplazmy, kontrolujących fazę kontrolno-decyzyjną (Seder i Hill, 2000).

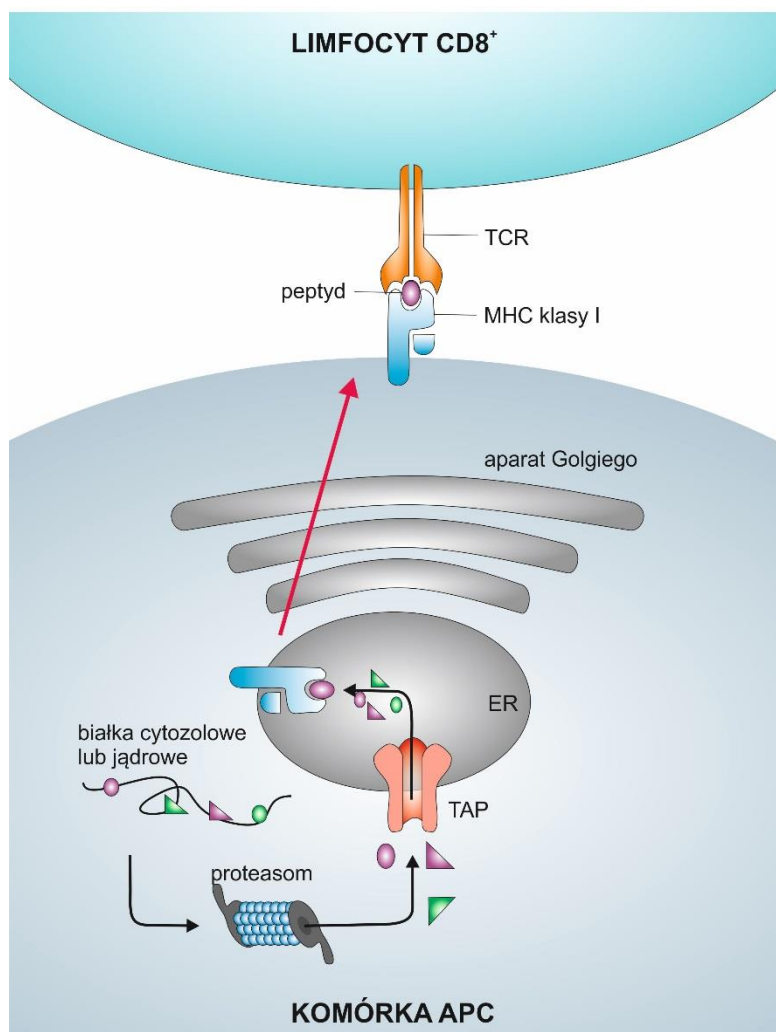
#### 1.4. Prezentacja antygeny i jego rozpoznanie przez limfocyty

Antygeny są cząsteczkami lub fragmentami cząsteczek posiadającymi zdolność do wiązania się z przeciwciałem lub receptorem na powierzchni limfocytów B lub T. Jeśli przyczyniają się one do wzbudzenia odpowiedzi immunologicznej, nazywa się je immunogenami. Nie wszystkie antygeny mają potencjał immunomodulujący, co jest bardzo istotnym aspektem konstruowania nowych szczepionek, które powinny indukować wysoki poziom odpowiedzi immunologicznej, aby skutecznie chronić przed patogennymi mikroorganizmami.

Immunogenność zależy od wielu parametrów. Duże znaczenie ma stopień obcości danej molekuly dla organizmu, gdyż auto-antygeny zazwyczaj nie indukują odpowiednio silnej odpowiedzi immunologicznej. Równie istotne są parametry fizyczne – duże cząsteczki takie jak białka, polisacharydy czy kwasy nukleinowe należą do najbardziej immunogennych. Cząsteczki o mniejszej masie molekularnej mogą zaś funkcjonować jako hapteny, antygeny zyskujące immunogenność po połączeniu z odpowiednim nośnikiem. Podobnie, duże znaczenie ma stężenie antygeny – jego zbyt niskie lub zbyt wysokie ilości mogą powodować trudności w wyzwoleniu odpowiedzi immunologicznej i przyczyniać się do powstawania stanu tolerancji. Istotna jest także droga podania antygeny, gdyż zależnie od jej wyboru stymulowane mogą być różne rodzaje tkanki limfatycznej i w ten sposób indukowane odmienne typy odpowiedzi immunologicznej. Immunogenność antygeny może być również wzmacnana poprzez dostarczanie antygeny z innymi substancjami, zwanymi adiuwantami (Rote, 2006).

Limfocyty biorące udział w komórkowej odpowiedzi immunologicznej rozpoznają antygeny, które są prezentowane na komórkach eukariotycznych w kompleksach z cząsteczkami układów zgodności tkankowej (MHC). Cząsteczki MHC klasy I eksprymowane na wszystkich jądrzastych komórkach prezentują peptydy endogenne, cytoplazmatycznego lub jądrowego pochodzenia (**rysunek 1.4**). Znane są trzy ścieżki prezentacji antygeny w MHC I: a) bezpośrednia prezentacja antygeny syntetyzowanego w komórce, b) prezentacja krzyżowa antygeny pozakomórkowego pochodzenia i c) tzw. „cross-dressing”, transfer kompleksów MHC I-peptyd między komórkami, jednak najczęściej wykorzystywany jest szlak bezpośredni. Białka cytoplazmatyczne lub jądrowe podlegają w nim ubikwitynylacji, a następnie degradacji w proteasomie. Są to białka, których czas trwania kończy się, białka będące defektywnymi produktami translacji zwanymi DRiPs

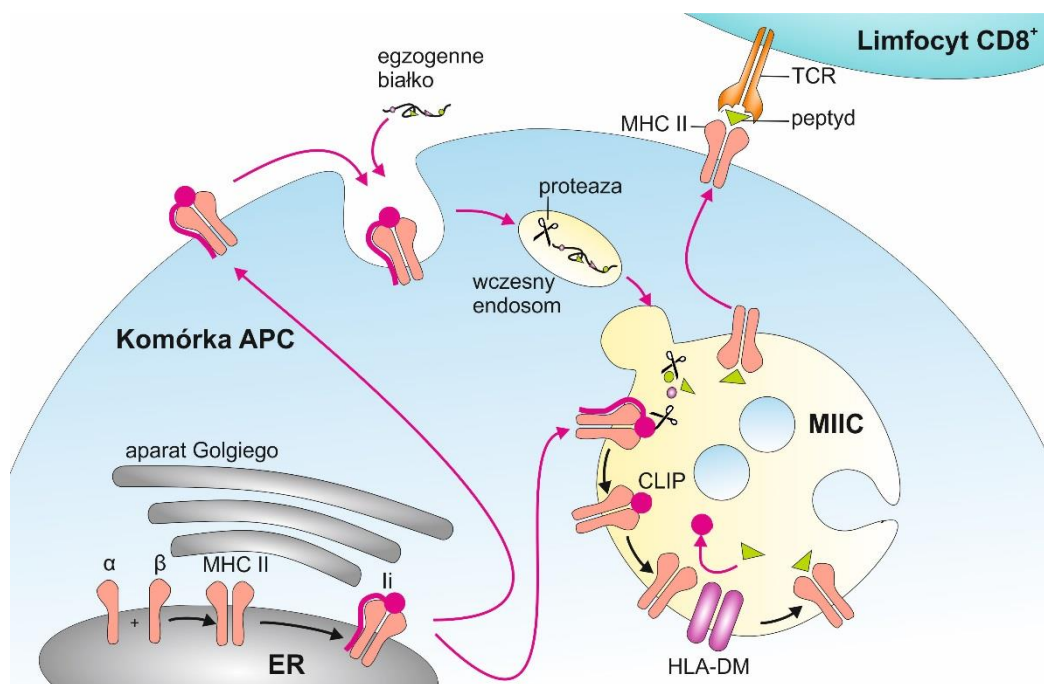
(defective ribosomal products) lub białkowe produkty patogenów wewnątrzkomórkowych. Powstałe w wyniku degradacji peptydy są translokowane do retikulum endoplazmatycznego (ER) przez transportery TAP (transporters associated with antigen presentation), gdzie łączą się z cząsteczkami MHC I. Heterodimery MHC I są składane z polimorficznych łańcuchów (lekkiego i ciężkiego)  $\beta_2$ -mikroglobuliny ( $\beta_2m$ ). Związanie 8–10-aminokwasowego peptydu do rowka MHC I zapewnia stabilność całej strukturze. W stanie nie wiążącym peptydu łańcuchy MHC są stabilizowane przez białka chaperonowe ER takie jak kalretikulina, ERp57, izomeraza PDI czy tapazylna. Ostatnie z wymienionych białek oddziałuje z transporterem TAP, zapewniając łączność między procesem translokacji peptydu do ER i jego dostarczaniem do MHC I. Po związaniu peptydu białka chaperonowe są uwalniane, a kompleksy są transportowane na powierzchnię komórki, gdzie mogą być rozpoznane przez efekторы komórkowej odpowiedzi immunologicznej (Neefjes, 2011).



Rysunek 1.4.

**Ścieżka prezentacji antygeny w kompleksach z cząsteczkami MHC klasy I** (zmodyfikowany według Neefjes i wsp., 2011). Prezentacja wewnątrzkomórkowych immunogennych peptydów jest wynikiem serii zdarzeń. Antygeny ulegają degradacji w proteasomie. Powstałe peptydy są translokowane za pomocą transporterów TAP do ER, gdzie ulegają kompleksowaniu z cząsteczkami MHC I. Kompleksy peptyd-MHC I są uwalniane z ER i przy udziale aparatu Golgiego transportowane na powierzchnię komórki, gdzie mogą być rozpoznane przez limfocyt cytotoksyczny. APC – komórka prezentująca antygen; TAP – transporter associated protein; ER – retikulum endoplazmatyczne; TCR – receptor limfocyta T.

W procesie krzyżowej prezentacji zachodzącej tylko na niektórych typach komórek eukariotycznych antygeny trafiają do komórki na drodze fagocytozy lub makropinocytozy, a następnie ulegają kompleksowaniu z MHC I na drodze jednego z trzech znanych szlaków. Pierwszym z nich jest proces o nieznanym mechanizmie, udokumentowany dla wirosomów, kompleksów immunostymulujących czy liposomów, w którym białko przedostaje się z fagosomu do cytoplazmy, a następnie wchodzi na ścieżkę TAP-zależnej prezentacji (Sun i wsp., 2009). Drugim sposobem jest opuszczenie fagosomu przez antygen, jego obróbka w proteasomie, a następnie powrót do fagosomu, w którym zachodzi łączenie z MHC klasy I (Rock i Shen, 2005). Trzecia ścieżka zwana wakuolarną różni się od pierwszej brakiem zaangażowania transporterów TAP i proteasomu w kompleksowaniu antygeny z MHC (Rock i Shen, 2005).

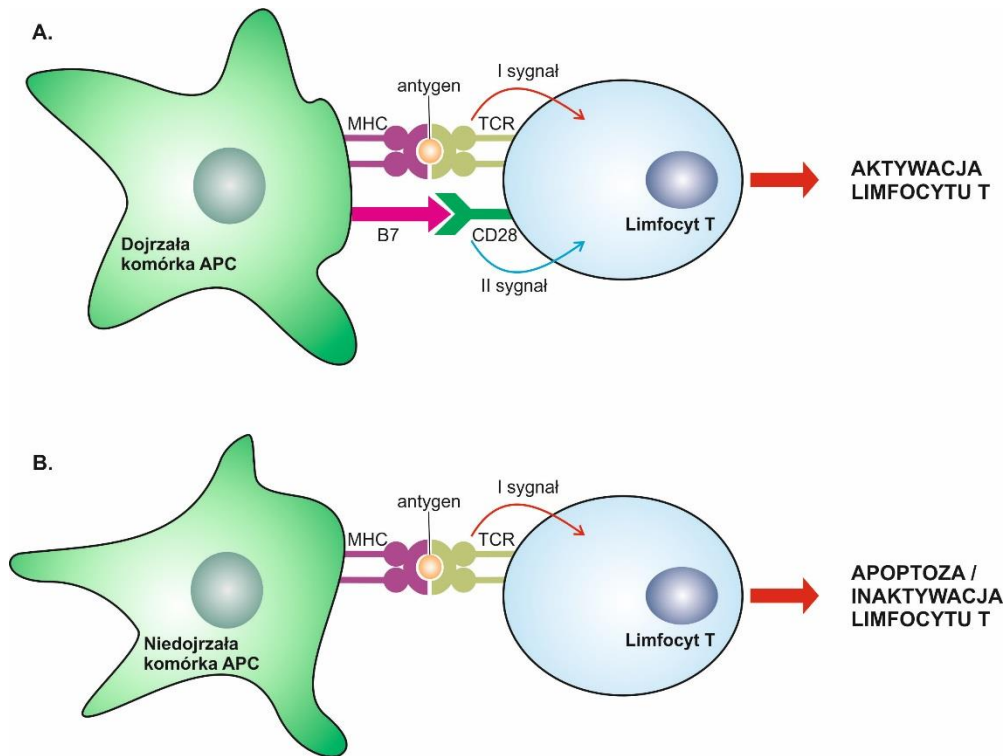


**Rysunek 1.5. Ścieżka prezentacji antygeny w kompleksach z cząsteczkami MHC klasy II** (zmodyfikowany według Neefjes i wsp., 2011). Składanie heterodimerów MHC II z łańcuchów α i β oraz łańcucha zmiennego li odbywa się w ER. Przy udziale aparatu Golgiego są one bezpośrednio lub poprzez błonę komórkową transportowane do kompartmentu MIIC. W MIIC łańcuch li oraz białka pobrane poprzez endocytozę są trawione przez obecne tam proteazy. Peptyd CLIP będący produktem degradacji li początkowo blokuje rowek wiążący peptyd w dimerze MHC II, a następnie jest wymieniany na antygenowy peptyd przy pomocy chaperonu HLA-DM. Kompleksy peptyd-MHC II są kolejno transportowane na powierzchnię błony komórki APC, gdzie mogą być rozpoznane przez limfocyty pomocnicze. APC – komórka prezentująca antygen; ER – retikulum endoplazmatyczne; TCR – receptor limfocyta T; CLIP – fragment peptydu li związanego z MHC II; MIIC – kompartment MHC II.



W przeciwieństwie do MHC klasy I, kompleksy MHC klasy II są obecne na profesjonalnych komórkach prezentujących antygen (antigen presenting cells, APC) takich jak komórki dendrytyczne (DC), makrofagi i limfocyty B. Ich ekspresja może być jednak wzbudzona przez INF- $\gamma$  lub inne czynniki na nieprofesjonalnych komórkach prezentujących, takich jak fibroblasty, komórki nabłonkowe, keratynocyty w przebiegu dermatoz czy jelitowe komórki glejowe podczas choroby Crohna. Składanie kompleksów MHC I z transmembranowych łańcuchów  $\alpha$  i  $\beta$  oraz łańcucha niezmiennego Ii odbywa się w ER. Kompleksy te trafiają do endosomu MHC (MHC class II compartment), gdzie łańcuch Ii jest trawiony. Pozostały w rowku heterodimeru peptyd CLIP jest następnie wymieniany przy udziale chaperonu HLA-DM na specyficzny peptyd pochodzenia pozakomórkowego uzyskany poprzez degradację na ścieżce endosomalnej (**rysunek 1.5**). Następnie kompleksy MHC II-peptyd są transportowane na powierzchnię komórki, gdzie mogą zaprezentować antygen komórkom CD4<sup>+</sup> (Neefjes, 2011).

Komórki APC indukują cytotoksyczne lub pomocnicze limfocyty T do proliferacji i różnicowania w komórki efektorowe dzięki dostarczaniu dwóch sygnałów. Pierwszym z nich są cząsteczki MHC wiążące peptyd na ich powierzchni, rozpoznawane przez receptory TCR (T cell receptors) na limfocytach. Drugi sygnał zapewniają cząsteczki kostymulatorowe takie jak białka B7 (CD80 i CD86), które łączą się z markerem CD28 na powierzchni limfocytów. Ekspresja białek B7 na komórkach prezentujących antygen jest indukowana podczas wrodzonej odpowiedzi immunologicznej przeciw patogenom i dodatkowo wzmagana przez aktywowane limfocyty efektorowe. Dodatkowo, drugi sygnał jest wzmacniany po odebraniu sygnału pierwszego. Indukuje on aktywny transport białek sygnałowych limfocytu T do miejsca kontaktu z komórką APC. Ich akumulacja wzmaga intensywność i wydłuża czas trwania procesu sygnalizacyjnego zapoczątkowanego przez pierwszy sygnał. Uzyskanie tylko pierwszego sygnału ze strony kompleksów MHC I-peptyd może wyzwolić apoptozę lub inaktywację limfocytu T, nawet w przypadku, gdyby drugi sygnał pojawił się w późniejszym czasie, co leży u podstaw wytworzenia tolerancji na auto-antygeny. Receptor TCR rozpoznaje antygen we współpracy z błonowymi białkami CD3, które uczestniczą w przekazaniu do wewnątrz komórki sygnału o związaniu oraz markerem CD4 lub CD8 (Alberts i wsp., 2007) (**rysunek 1.6**).



**Rysunek 1.6. Ścieżki aktywacji limfocytów T** (zmodyfikowany według Alberts i wsp., 2002). **A.** Dojrzała komórka APC aktywuje limfocyt T dostarczając 2 sygnały. **B.** Niedojrzała komórka APC dostarcza jedynie I sygnał, co prowadzi do śmierci lub inaktywacji limfocyty.

W przypadku infekcji patogenami wewnątrzkomórkowymi centralnym elementem odpowiedzi immunologicznej są limfocyty  $CD8^+$ . Ich aktywacja zależy od obecności antygenowo-specyficznych prekursorów, siły oddziaływania receptora TCR z kompleksem MHC I-peptyd czy poziomemu cytokin prozapalnych. W przeciwieństwie do komórek Th, inicjacja programu prowadzącego do osiągnięcia funkcji efektorowej oraz wytworzenia pamięci immunologicznej przez komórki Tc wymaga odebrania trzeciego sygnału zapewnianego przez IL-12 lub  $INF-\alpha$ . W przypadku jego braku dochodzi jedynie do ograniczonej klonalnej ekspansji i wytworzenia stanu tolerancji (Mescher i wsp., 2006). Duże znaczenie ma nie tylko dojrzałość komórki APC, ale również interakcja z limfocytami  $CD4^+$ . Limfocyty Tc wymagają pomocy limfocytów pomocniczych w zależności od natury prezentowanego immunogenu. Antygeny, które cechują słabe ligandy dla receptorów PRR (pattern recognition receptors), do których zalicza się wzorce molekularne PAMP lub DAMP, wymagają obecności limfocytów  $CD4^+$  do dojrzewania komórki APC. W procesie indukowanego przez limfocyt Th „licencjonowania” następuje wówczas ekspresja cząsteczek kostymulatorowych i indukcja trzeciego sygnału aktywacji, którym jest synteza IL-12. Infekcje

przy udziale patogenów wewnątrzkomórkowych, które niosą silne ligandy dla PRR i indukują dzięki nim wczesną odpowiedź prozapalną wiążącą się z syntezą INF typu I są wystarczające do indukcji ekspresji cząsteczek kostymulatorowych na komórkach prezentujących. Wydzielany INF typu I działa jednocześnie jako trzeci sygnał na komórki T<sub>c</sub>, dzięki czemu komórki T<sub>h</sub> nie są wymagane do aktywacji (Bachmann i wsp., 1998). W przypadku infekcji wywołujących niskie stężenia INF-I, udział limfocytów CD4<sup>+</sup> może być wymagany. W niektórych przypadkach komórki T<sub>h</sub> mogą być również istotnymi dostawcami IL-2 wspomagającej aktywację, ekspansję oraz różnicowanie w komórki efektorowe limfocytów T<sub>c</sub> (Wilson i Livingstone, 2008).

### 1.5. Pamięć immunologiczna

Bardzo ważnym aspektem przebiegu swoistej odpowiedzi immunologicznej jest indukcja pamięci immunologicznej. Komórki pamięci są komórkami potomnymi naiwnych limfocytów, które uległy klonalnej ekspansji w trakcie odpowiedzi immunologicznej i przetrwały po wyeliminowaniu antygeny. Zapewniają one natychmiastową ochronę organizmu przy ponownym kontakcie z danym antygenem. Komórki T pamięci zdecydowanie różnią się od limfocytów T naiwnych, ponieważ odpowiadają na niższe stężenia antygeny, produkują szerszy wachlarz antywirusowych oraz prozapalnych cytokin, wzbudzają szybką cytolityczną aktywność oraz skuteczniej migrują do innych regionów w organizmie gospodarza (Sallusto i wsp., 2010). Udowodniono również, że dzielą się one w znacznie szybszym tempie niż komórki T naiwne tuż po rozpoczęciu infekcji wirusowej, ale podobnie jak one wykazują 48–72-godziną fazę opóźnienia, w której nie ulegają podziałom (Whitmire i wsp., 2008).

Komórki T pamięci dzielą się na dwie grupy. Pierwszą z nich stanowią efektorowe komórki pamięci (T<sub>EM</sub>), które rezydują w tkankach lub krążą po organizmie. Są one odpowiedzialne za natychmiastową obronę organizmu przed patogenami ze względu na zachowaną gotowość do pełnienia funkcji efektorowej. Do drugiej grupy należą komórki T<sub>CM</sub>, centralne komórki pamięci, które patrolują obwodowe tkanki limfatyczne, gdzie mogą wejść na drogę proliferacji w odpowiedzi na prezentację antygeny na komórce APC (Sallusto i wsp., 2010).

Komórki pamięci stanowią jedynie niewielką frakcję komórek powstałych w czasie zajęcia odpowiedzi immunologicznej. Stosunek prekursorów komórek efektorowych

i pamięci zależy od różnej ekspresji czynników transkrypcyjnych, na którą wpływają z kolei stymulacja przez antygen, cytokiny i wewnątrzkomórkowe szlaki sygnalizacyjne. W toku analiz naiwnych limfocytów T znakowanych genetycznymi znacznikami w warunkach lokalnej i systemowej infekcji wykazano, że, niezależnie od warunków, jednocześnie zachodzi różnicowanie do obu typów komórek (Gerlach i wsp., 2010). Czas przetrwania komórek pamięci oraz wielkość ich puli zależy od poziomu cytokin egzogenego pochodzenia. W przypadku komórek pamięci typu CD4 i CD8, cytokinami umożliwiającymi przetrwanie są IL-7 i IL-15, które stymulują powolną, ale ciągłą proliferację (Surh i Sprent, 2008). Co interesujące, Sun i wsp. (2004) w badaniach z wykorzystaniem myszy nie wytwarzających limfocytów CD4<sup>+</sup> udowodnili, że komórki CD4<sup>+</sup> są odpowiedzialne nie tylko za dostarczenie trzeciego sygnału przy indukcji różnicowania komórek T<sub>c</sub>, ale również za utrzymanie populacji komórek CD8<sup>+</sup> pamięci. Za populację komórek T pamięci, którą cechuje długotrwała żywotność uważa się komórki T<sub>CM</sub>, w związku z czym obecnie prowadzi się intensywne badania nad opracowaniem leków sprzyjających różnicowaniu limfocytów naiwnych CD4<sup>+</sup> do komórek pamięci tego typu. Araki i wsp. (2009) dowiedli, że rapamycyna, obniżając aktywność kinazy treoninowo-serynowej mTOR będącej sensorem różnych czynników środowiskowych i regulatorem metabolizmu komórkowego, wpływa na przyspieszoną konwersję naiwnych komórek do komórek T<sub>CM</sub>.

#### **1.6. Szczepionki indukujące komórkową odpowiedź immunologiczną**

Preparaty szczepionkowe konstruowane w przeszłości oparte na inaktywowanych organizmach lub produkowanych przez nie białkach zostały zaprojektowane w taki sposób, aby stymulować odpowiedź humoralną skierowaną przeciw powierzchniowym cząsteczkom komórek bakteryjnych czy wirusów. Dowiedziono jednak, że odpowiedź taka jest nieskuteczna w generowaniu odporności przeciw patogenom wewnątrzkomórkowym (Casadevall i wsp., 2006). Preparaty nowej generacji powinny wzbudzać komórkowe mechanizmy odpowiedzi immunologicznej przeprowadzane przez limfocyty Th oraz T<sub>c</sub>, gdyż jedynie one mogą chronić przed patogenami, które wykazują dużą zmienność serotypową (adenowirusy), prowadzą wewnątrzkomórkowy tryb życia lub które cechuje zdolność do wytwarzania form latentnych (np. HIV, *Herpes*, HBV, HCV, *Helicobacter pylori*, *Plasmodium falciparum*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Francisella tularensis*, *Salmonella enterica*, *Brucella*

spp., *Burkholderia* spp.). Należy podkreślić, że ten typ odpowiedzi chroni także przed procesami nowotworowymi lub chorobami autoimmunologicznymi. Najnowsze badania przebiegu odpowiedzi immunologicznej w zakażeniach prątkami gruźlicy w modelu mysim dowodzą, że limfocyty B mogą regulować przebieg infekcji *M. tuberculosis* poprzez produkcję cytokin czy przeciwciał, jednak ich rola w kontroli zakażenia jest poboczna (Torrado i wsp., 2013). Limfocyty B mogą mieć jedynie ograniczony kontakt z antygenem tuż przed jego wniknięciem do komórki gospodarza lub w czasie rozprzestrzeniania się patogenu między komórkami. Szczepionki indukujące komórkową odpowiedź immunologiczną muszą być konstruowane w sposób umożliwiający dostarczenie antygeny do komórek APC, dzięki czemu będzie on zaprezentowany w kontekście cząsteczek MHC na powierzchni komórki. Mając na uwadze potrzeby współczesnej wakcynologii, która dąży do opracowania preparatów wzbudzających komórkową odpowiedź immunologiczną, nowe szczepionki powinny wybiórczo indukować komórki T o określonym fenotypie i w ściśle określonej lokalizacji. Najważniejszym aspektem badań jest opracowanie metod generowania trwałej puli komórek T pamięci prawidłowo umiejscowionych w szczepionym organizmie w taki sposób, aby wektor szczepionkowy był jak najbardziej bezpieczny dla szczepionego organizmu, a patogen w przypadku infekcji był jak najszybciej usuwany. W celu dobrania warunków sprzyjających indukowaniu trwałej odporności szczepionego organizmu opracowano szereg systemów dostarczania antygeny, do których należą szczepionki podjednostkowe kierowane i wzmacniane przy udziale adiuwantów oraz szczepionki wektorowe wykorzystujące wirusy oraz żywe atenuowane lub niewirulentne bakterie.

### **1.7. Szczepionki podjednostkowe**

Próby opracowania nowych szczepionek podjednostkowych podyktowane są wzrastającym zapotrzebowaniem na szczepionki bardzo dobrze zdefiniowane pod względem molekularnym, które zastąpią preparaty oparte na całych inaktywowanych patogenach niosących wiele antygenów jednocześnie. Obecnie podejmuje się próby konstrukcji szczepionek opartych na wybranych antygenach będących celem dla układu immunologicznego, a nawet na ich najbardziej immunogennych, pojedynczych peptydach zwanych epitopami, pochodzących od czynnika infekcyjnego, komórki nowotworowej bądź alergenu. Szczepionki o minimalnej zawartości antygenów, cechujące się jednocześnie

wysoką specyficznością opracowywane są na podstawie wysokoprzepustowych analiz *in silico* lub eksperymentalnych metod mapowania epitopów (Lundegaard i wsp., 2012). Docelowe preparaty mogą być wprowadzane jako oczyszczone białko, peptyd lub niebiałkowy składnik patogenu bądź ulegać ekspresji z wektora plazmidowego lub zrekombinowanego wirusa. Poszukiwanie podjednostkowych szczepionek stanowi obecnie ważny trend współczesnej wakcynologii. Większość opracowywanych szczepionek immunizujących przeciw leiszmaniozom wywoływanym przez wiciowce z rodziny *Leishmania* ma podjednostkową formę. Dowiedziono skuteczności zastosowania szczepionki niosącej białko gp63 z adiuwantem hsp70, która powodowała wzrost poziomu INF- $\gamma$  oraz obniżenie ekspresji IL-4 i IL-10 w modelu mysim (Kaur i wsp., 2011). Trwają również prace nad szczepionką podjednostkową immunizującą przeciw *Chlamydia muridarum*, w której wykorzystano główne białko błony zewnętrznej MOMP (Tifrea i wsp., 2013) czy przeciw *F. tularensis*, w której białko szoku cieplnego DnaK połączono z powierzchniowym białkiem patogenu Tul4 (Ashtekar i wsp., 2012). Obie szczepionki stymulowały wydzielanie INF- $\gamma$  oraz produkcję przeciwciał. W drugą fazę badań klinicznych wchodzi obecnie szczepionka H56 przeciw *M. tuberculosis* niosąca trzy gruźlicze białka: Ag85B, ESAT-6 oraz białko stanu latencji Rv2660c w kombinacji z adiuwantem IC31, która w modelu mysim wyzwała silną odpowiedź limfocytów CD4<sup>+</sup> i powstrzymuje reaktywację latentnej formy gruźlicy (Weiner i Kaufmann, 2014).

W ciągu ostatnich 20 lat najwięcej uwagi poświęcono konstrukcji szczepionek DNA, które z powodzeniem wprowadzono do użytku w weterynarii m. in. do prewencji zakażeń łososi wodnymi rabdowirusami (Garver i wsp., 2005) czy zachorowań psów na czerniaka złośliwego jamy ustnej (Grosenbaugh i wsp., 2011). Pomimo sukcesu szczepionek DNA o weterynaryjnym zastosowaniu, istnieje silna potrzeba optymalizacji warunków ich użycia do szczepienia ludzi. Podejmowane są liczne próby opracowania wektorów DNA - sukcesem zakończyła się między innymi druga faza badań klinicznych ludzkiej terapeutycznej szczepionki DNA VGX-3100 w postaci plazmidu kodującego antygeny E6/E7 wirusów HPV 16 i HPV 18 dostarczanego przy pomocy elektroporacji *in vivo* (dane National Cancer Institute z lipca 2014 roku). Podanie szczepionki kobietom, u których wykryto raka szyjki macicy typu CIN 2/3 doprowadziło do indukcji limfocytów cytotoksycznych i znacznego ograniczenia wzrostu nowotworu lub jego zaniku (Bagarazzi i wsp., 2012).

## Adiuwanty

Molekularna formuła szczepionkowa często bywa jednak słabo immunogenna, co sprawia, że poszukiwane są odpowiednie adiuwanty, formuły szczepionkowe oraz wektory wzmagające poziom komórkowej odpowiedzi immunologicznej.

Adiuwantem szczepionkowym określa się składnik, który może wspomagać efektywność szczepionki poprzez indukcję silnej odpowiedzi immunologicznej. Koncepcja zastosowania adiuwantów została zaproponowana w 1925 roku przez Ramona, który zaobserwował, że dodanie do szczepionek tężcowej i błoniczej substancji takich jak agar, tapioka, lecytyna, olej krochmalowy czy saponina powoduje wzrost miana specyficznych przeciwciał (Sivakumar i wsp., 2011). Jednocześnie, w 1926 roku, Glenny i wsp. zaobserwowali, że nanoszenie antygeny na nierozpuszczalne cząsteczki związków glinu przed immunizacją generuje lepszą odpowiedź za pośrednictwem przeciwciał niż w przypadku zastosowania rozpuszczalnej formy immunogenego białka (Marrack i wsp., 2009). Od tego odkrycia związki glinu były bardzo powszechnie wykorzystywane do wzmagania odpowiedzi immunologicznej.

Zastosowanie adiuwantów w wakcynologii jest bardzo szerokie – są one wykorzystywane do modulowania odpowiedzi immunologicznej poprzez dostarczanie antygeny w natywnej formie, redukują potrzebę wieloetapowej immunizacji i obniżają tym samym jej koszty, a także przyczyniają się do wzmożonej odpowiedzi u dzieci lub dorosłych pacjentów z obniżoną odpornością (Aguilar i Rodriguez, 2007). Mogą być również podzielone na 2 klasy w zależności od dominującego mechanizmu działania na: a) systemy nośnikowe oraz b) wzmacniacze odpowiedzi immunologicznej. Systemy nośnikowe koncentrują antygen i prezentują go w zorganizowanej formie, podczas gdy wzmacniacze aktywują mechanizmy wrodzonej odpowiedzi immunologicznej (Mohan i wsp., 2013). Efektami działania adiuwantów są: wzrost produkcji przeciwciał i miana limfocytów T, wydłużenie czasu trwania odpowiedzi, wzmocniona ochrona przeciw różnym wariantom tego samego patogenu czy zmniejszona liczba dawek wymaganych do uzyskania ochronnego poziomu przeciwciał czy komórek pamięci. **Tabela 1.1** przygotowana według publikacji przeglądowej Mohan i wsp. (2013) przedstawia listę znanych adiuwantów oraz mechanizmy ich działania.

**Tabela 1.1. Adiuwanty szczepionkowe (przygotowana według przeglądu Mohan i wsp., 2013)**

Typ	Formuła	Działanie
SOLE ALUMINIUM	fosforan aluminium, wodorotlenek aluminium	Spowalnianie tempa uwalniania antygeny, wydłużanie kontaktu antygeny z układem immunologicznym, stymulowanie odpowiedzi limfocytów Th2
INNE SOLE MINERALNE, np. fosforan wapnia	sole wapnia, żelaza, cyrkonu	Ułatwiona adsorpcja antygeny, indukcja wysokiego poziomu przeciwciał IgG
KOMPLETNY ADIUWANT FREUNDA	inaktywowane termicznie komórki z rodzaju <i>Mycobacterium</i>	Stymulacja komórkowej odpowiedzi immunologicznej oraz produkcji IgG i IgA
EMULSJE (niekompletny adiuwant Freunda, montanid, MF59, adiuwant 65)	typu „olej w wodzie” i „woda w oleju”	Stymulacja limfocytów B i Tc
ADIUWANTY POCHODZENIA BAKTERYJNEGO		
<i>TOKSYNY:</i>		
Toksyna CT <i>Vibrio cholerae</i>	Mieszana lub koniugowana z antygenami śluzówkowymi	Wzmaganie immunogenności słabych antygenów
Toksyna PT <i>Bordetella pertussis</i>	Inaktywowane komórki <i>B. pertussis</i> (mieszanina toksyny zawiera LPS)	Wzmaganie komórkowej odpowiedzi immunologicznej
Toksyna A i B <i>Clostridium difficile</i>	Oczyszczony preparat	Zwiększanie poziomu przeciwciał IgA
Toksyna STx <i>Schigella dysenteriae</i>	Oczyszczony preparat	Wzmaganie odpowiedzi humoralnej i komórkowej
Enterotoksyny <i>Staphylococcus</i>	Oczyszczony preparat	Zwiększanie poziomu przeciwciał IgG i IgA
<i>NIETOKSYCZNE BIAŁKA:</i>		
Lipopeptydy	Izolowane z bakteryjny lipoprotein	Adiuwanty przy szczepieniach drogą pokarmową
Dipeptyd muramylowy (MDP)	Izolacja ze ściany komórkowej mykobakterii	Stymulacja niespecyficznym mechanizmów skierowanych przeciw bakteriom i komórkom rakowym
Proteosomy	Niejednorodny preparaty błony zewnętrznej meningokoków	Zwiększanie poziomu IgA
LIPOSOMY	Syntetyczne sfery składające się z warstwy lipidowej otaczającej antygen	Wzmaganie humoralnej i komórkowej odpowiedzi immunologicznej
ŚRODKI POWIERZCHNIOWO CZYNNY (Quil-A)	Składnik detergentu saponiny izolowanej z <i>Quillaja saponaria</i>	Wzmaganie odpowiedzi przeciw T-zależnym i T-niezależnym antygenom
KOMPLEKSY IMMUNOSTYMULUJĄCE (ISCOM)	Cząstki formowane podczas mieszania cholesterolu z Quil-A	Stymulacja produkcji immunoglobulin wszystkich klas, wzmaganie komórkowej odpowiedzi immunologicznej, w tym odpowiedzi CTL



Typ	Formuła	Działanie
ADIUWANTY WODOROWĘGLANOWE	Złożone związki wodorowęglanowe naturalnego pochodzenia, np. $\gamma$ -inulina	Indukcja humoralnej i komórkowej odpowiedzi immunologicznej
OLIGONUKLEOTYDY CpG	Niemetylowane dinukleotydy CpG obecne w DNA bakterii	Bezpośrednia aktywacja limfocytów B i komórek dendrytycznych poprzez receptory TLR9, wzmaganie komórkowej odpowiedzi immunologicznej
WZORCE MOLEKULARNE lub ich pochodne (LPS, MPL, peptydoglikan, flagellina, kwasy lipotejchojowe)	Składniki komórkowe bakterii lub ich chemicznie uzyskiwane pochodne (np. MPL – lipid A <i>Salmonella minnesota</i> pozbawiony grupy (R)-3-hydroksydekanoilowej	Wzmaganie wrodzonych mechanizmów immunologicznych (fagocytozy, wydzielana prostaglandyn, rekrutacji komórek stanu zapalnego) oraz humoralnej i komórkowej odpowiedzi immunologicznej
<b>CYTOKINY</b>		
GM-CSF	-	Indukcja migracji komórek dendrytycznych, zwiększenie ekspresji MHC I na ich powierzchni
INF	-	Indukcja proliferacji komórek T, aktywacja komórek NK, modulowanie produkcji cytokin
IL-1	-	Rekrutacja neutrofilów do miejsca stanu zapalnego
IL-2	-	Wzmaganie komórkowej odpowiedzi immunologicznej limfocytów CD4 <sup>+</sup>
IL-6	-	Stymulacja limfocytów B
IL-12	-	Indukcja komórek NK oraz limfocytów B i T
IL-15	-	Indukcja komórek NK oraz limfocytów T
IL-18	-	Wzmaganie proliferacji komórek NK oraz limfocytów CD8 <sup>+</sup>
CHEMOKINY	-	Wzmaganie wrodzonych mechanizmów odpowiedzi immunologicznej
<b>POLIMERY</b>		
Biodegradowalne (polilaktyny PLA, PLG)	-	Adsorpcja antygenów na powierzchni lub ich zamknięcie wewnątrz, stopniowe uwalnianie antygeny
Niedegradowalne (złoto, lateks, krzem, polistyren)	-	Usprawnianie dostarczania antygeny do wnętrza komórek prezentujących antygen
<b>ADIUWANTY POCHODZENIA WIRUSOWEGO</b>		
Wirosomy	Struktury powstałe z połączenia lipidów błonowych z białkami błonowymi wirionu	Dostarczanie antygeny do wnętrza komórek prezentujących antygen
VLP (virus-like particles)	Wielkocząsteczkowe kompleksy białek kapsydu nie zawierającego informacji genetycznej	Wzmaganie odpowiedzi humoralnej i komórkowej

Wyniki najnowszych badań nad zastosowaniem nowoczesnych systemów adiuwantów wspomagających indukcję odpowiedzi immunologicznej przez szczepionki DNA u ludzi są obiecujące. W badaniach klinicznych przetestowano już dużą liczbę adiuwantów będących celami receptorów Toll-like takich jak TLR4 lub TLR9. W Stanach Zjednoczonych w 2006 roku za drugi po związkach glinu adiuwant dopuszczony do użytku w licencjonowanych ludzkich szczepionkach uznano monofosfolipid-A (MPL), który jest agonistą TLR4 (Giannini i wsp., 2006). W Europie dopuszczone jest również stosowanie wirosomów, cząstek VLP (virus-like particles) i emulsji typu „olej w wodzie” takich jak MF59, AS03 i AF03 (Foged i wsp., 2012). Pozytywne wyniki daje zastosowanie adiuwantów cytokinowych – testuje się między innymi podanie interleukiny-12 stymulującej różnicowanie limfocytów T do populacji Th1 czy czynnika wzrostu makrofagów GM-CSF, który indukuje dojrzewanie komórek APC (Flingai i wsp., 2013). Należy zaznaczyć, że wybór adiuwanta może znacząco wpłynąć na ostateczny wynik szczepienia. Ota i wsp. (2011) udowodnili, że obecność glinu w składzie szczepionek używanych w Rozszerzonym Programie Szczepień WHO (Expanded Programme of Immunization, EPI) spowodowała obniżenie skuteczności szczepionki MVA85B stosowanej w immunizacji noworodków przeciw gruźlicy.

Adiuwanty mogą być z powodzeniem wykorzystywane jako składnik kompleksowego szczepienia podjednostkowymi szczepionkami w immunizacji typu „prime-boost”, która wzmacnia odporność organizmu uprzednio traktowanego szczepionką wektorową. Dzięki tej technice pokonany może być problem pojawiającej się odporności na zastosowany wektor. Lin i wsp. (2012) wykazali, że podanie szczepionki H56 w kompleksie z adiuwantem IC31 opóźnia i osłabia objawy kliniczne gruźlicy, a także zapobiega reaktywacji uśpionej infekcji w makakach uprzednio immunizowanych szczepem BCG i eksponowanych na działanie *M. tuberculosis*.

## **1.8. Szczepionki wektorowe**

Szczepionki wektorowe dostarczają antygeny do komórek prezentujących antygen wykorzystując organizmy posiadające naturalną zdolność do wnikania do wnętrza komórki eukariotycznej, takie jak wirusy czy bakterie. Spośród wszystkich znanych typów szczepionek, szczepionki oparte na żywych atenuowanych mikroorganizmach najskuteczniej indukują komórkowe mechanizmy odporności, przy czym w najwyższym stopniu modulują odpowiedź

cytotoksycznych limfocytów T. Skutecznie wzbudzają również syntezę przeciwciał, a niekwestionowaną zaletą ich użycia jest możliwość podania bez użycia strzykawki (Seder i Hill, 2000; Titball, 2008). Śmierć zainfekowanej komórki dodatkowo promuje fagocytozę przez komórki APC, co przyczynia się do zwiększonej prezentacji antygeny. Wektory oparte na wirusach lub bakteriach za sprawą niesionych przez nie wzorców molekularnych, takich jak LPS, CpG czy flagellina, mają ponadto właściwości auto-adiuwantów, dzięki czemu wzmagana jest prezentacja heterologicznego antygeny.

Zgodnie z naturalnym cyklem życiowym, wektory wirusowe posiadają zdolność do efektywnego wnikania do ludzkich komórek i do wewnątrzkomórkowej ekspresji niesionych genów. Naśladowanie infekcji ułatwia indukcję silnej odpowiedzi limfocytów T, w tym limfocytów cytotoksycznych, dzięki czemu indukowane jest powstawanie komórek T pamięci i trwała odporność przeciw patogenom wewnątrzkomórkowym. Do konstrukcji szczepionek wykorzystywane są zarówno replikujące, jak i niezdolne do replikacji wirusy, takie jak: pokswirusy, adenowirusy, alfawirusy, flawiwirusy, pikornawirusy czy paramyksowirusy. Wybór odpowiedniego wirusowego wektora zależy od charakterystyki patogenu, przeciw któremu wywoływana jest odpowiedź oraz od tego czy szczepionka ma powodować całkowitą immunizację lub być stosowana w modelu „prime-boost”. Większość wektorów wirusowych będących przedmiotem badań klinicznych opiera się na atenuowanych adenowirusach lub zmodyfikowanym wirusie Ankara (MVA). Adenowirusy dzięki zdolności do replikacji w ludzkich komórkach wydłużają ekspresję antygeny i jego prezentację na komórkach APC, co przyczynia się do wzmożonej odpowiedzi humoralnej i komórkowej. Duża powszechność infekcji adenowirusowych powoduje jednak, że zachodzi skierowana przeciw wektorowi odpowiedź immunologiczna skutkująca szybkim usuwaniem wirusa i obniżoną immunogennością szczepionki (Chirmule i wsp., 1999). Dwie szczepionki oparte na adenowirusach 35 i 5 eksprymujących antygen Ag85A *M. tuberculosis* są obecnie w fazie II niezależnych od siebie badań klinicznych w Republice Południowej Afryki (Hoft i wsp., 2012; Smaill i wsp., 2013). Dowiedziona została ich skuteczność w indukowaniu odporności pacjentów uprzednio szczepionych BCG i wzmaganiu produkcji INF- $\gamma$  przez komórki Th i Tc. Podobnie jak w przypadku adenowirusów, niereplikujący wirus MVA ma duży potencjał do indukcji limfocytów CD4<sup>+</sup>. MVA85A jako pierwsza szczepionka na bazie tego wirusa osiągnęła fazę II b badań klinicznych. Badania z udziałem dzieci nie potwierdziły jednak skuteczności

szczepionki, natomiast dowiodły zdolności wektora do wzmagania syntezy INF- $\gamma$  (Tameris i wsp., 2013).

Wykorzystanie wektorów wirusowych niesie za sobą pewne ograniczenia, do których zalicza się trudności w produkcji na dużą skalę, ograniczoną wielkość informacji genetycznej pakowanej do kapsydu niektórych wirusów, odpowiedź immunologiczną skierowaną przeciw samemu wektorowi oraz brak możliwości transdukcji do niektórych typów komórek. Co więcej, wirusy wywołują silną odpowiedź zapalną, a integracja do genomu gospodarza może przyczynić się nawet do wytworzenia stanów chorobowych takich jak białaczka (Thomas i wsp., 2003). Alternatywą dla użycia wektorów na bazie wirusów jest wykorzystanie komórek bakteryjnych. W ciągu ostatniego półwiecza postępy w biologii molekularnej i rozumieniu bakteryjnych cykli życiowych przyczyniły się do znacznego postępu w pracach nad stworzeniem wektorów bakteryjnych zdolnych do dostarczania heterologicznych antygenów do komórek APC *in vivo*. Poznano drogi trwałej i dobrze scharakteryzowanej atenuacji genów wirulencji, możliwa stała się regulacja poziomu ekspresji i lokalizacji antygeny niesionego przez komórkę bakteryjną, opracowano różne drogi podania bakteryjnego preparatu szczepionkowego, a co więcej określono potencjał do wzbudzania wrodzonej i nabytej odpowiedzi immunologicznej.

Dużą zaletą wykorzystania żywych wektorów bakteryjnych jest zdolność do naśladowania naturalnej infekcji, dzięki czemu aktywowana może być zarówno niespecyficzna odpowiedź prozapalna, jak i, w przypadku użycia modyfikowanych szczepów wnikających do komórek APC, antygenowo specyficzna odpowiedź komórkowa. Bakteryjne wektory dzięki jednoczesnemu dostarczaniu sygnału antygenowego oraz wzorców molekularnych związanych z patogenami lub ligandów TLR umożliwiają przełamanie stanu tolerancji organizmu wobec antygeny, co jest podstawowym założeniem immunoterapii opierającej się na odpowiedzi cytotoksycznych limfocytów T. Rozpoznanie niesionych przez komórki APC wzorców prowadzi do pozytywnej regulacji ekspresji cząsteczek kostymulatorowych na powierzchni, dojrzewania i migracji komórek APC, co wzmacnia odpowiedź immunologiczną przeciw dostarczanemu antygenowi. Inną zaletą nośników antygenowych na bazie bakterii jest to, że mogą one być zaprojektowane w taki sposób, aby wywoływać odporność przeciw własnym bądź ekspresjonowanym heterologicznie antygenom, a składniki szczepionkowe mogą być dostarczone w formie białka, DNA lub terapeutyku.

### 1.9. Bakterie patogenne jako wektory szczepionkowe

Od lat 80. XX wieku podejmowane są liczne próby wykorzystania żywych wektorów bakteryjnych do dostarczania antygenów. Wykorzystują one naturalną zdolność wirulentnych bakterii do wnikania do wnętrza komórek eukariotycznych, dzięki czemu dostarczony antygen może wywoływać komórkową odpowiedź immunologiczną. Do konstrukcji żywych, atenuowanych szczepionek wykorzystuje się bakterie *Shigella flexneri* (Xu i wsp., 2003; Zheng i wsp., 2005), *Salmonella enterica* (Roberts i wsp., 2000; Darji i wsp., 1997), *Yersinia enterocolitica* (Al Mariri i wsp., 2002), *Listeria monocytogenes* (Maciag i wsp., 2009; Le i wsp., 2012), *Mycobacterium bovis* BCG (Grode i wsp., 2013; Arbues i wsp., 2013) i wiele innych. Do tej pory jedynie dwie szczepionki pozytywnie przeszły testy kliniczne i zostały dopuszczone do użytku (Dietrich i wsp., 2003). Pierwsza z nich, szczepionka Ty21 uodparniająca na dur brzuszny, zawiera żywe atenuowane bakterie *Salmonella* ser. Typhi podawane doustnie w 3 dawkach w formie płynu lub kwasoodpornych kapsułek. Drugą dostępną szczepionką jest CVD 103-HgR immunizująca przeciw cholerze, która niesie atenuowane komórki *Vibrio cholerae* podawane w płynnej formie w jednej dawce. Obecnie trwają testy kliniczne kilku innych szczepionek przeciw patogenom wewnątrzkomórkowym lub nowotworom. Warta uwagi jest szczepionka VPM1002 będąca w fazie II a badań klinicznych, która poprawia immunogenność szczepu BCG. Opiera się ona na szczepie BCG zmodyfikowanym poprzez wstawienie genu *hly* kodującego główny czynnik patogenyzy *L. monocytogenes*, listeriolizynę O oraz delecję genu *ureC* kodującego ureazę C ( $BCG\Delta ureChly^+$ ). Listeriolizyna O (LLO) umożliwia ucieczkę z wakuoli do cytoplazmy zainfekowanej komórki, natomiast delecja ureazy powoduje odpowiednie dla aktywności LLO zakwaszenie wakuoli komórki. Dzięki wprowadzonym zmianom szczep BCG efektywnie ucieka z fagosomu zainfekowanej komórki i przyczynia się do wzmożonej prezentacji antygeny (Grode i wsp., 2013). Zakończyła się również druga faza badań klinicznych szczepionki terapeutycznej ADXS-HPV bazującej na bakterii *L. monocytogenes*, która ma na celu leczenie pacjentek chorujących na raka szyjki macicy wywołanego przez wirus HPV. Atenuowany szczep bakteryjny wydzielający jednocześnie fuzyjne białko kodujące antygen E7 w fuzji z niehemolityczną częścią LLO i adiuwant okazał się mieć skuteczność porównywalną do chemioterapii (Maciag i wsp., 2009).

W toku licznych badań opracowywane są metody trwałej atenuacji, która w jak najmniejszym stopniu wpływa na immunogenność szczepów bakteryjnych. Ten proces

w wielu przypadkach jest jednak bardzo trudny, długotrwały i żmudny, a największe wyzwanie stanowi zachowanie równowagi między minimalną patogennością szczepu a maksymalną zdolnością do indukcji odpowiedzi immunologicznej. Podczas opracowywania nowych wektorów dużą uwagę należy zwracać na fakt, że w zależności od typu modyfikacji można uzyskać zróżnicowaną reakcję odpornościową, np. doustne podanie mutantu PhoP *Salmonella* skutkuje indukcją wrodzonych mechanizmów, podczas gdy mutanty *aroA* wzmacniają odpowiedź limfocytów Th1 (VanCott i wsp., 2004). Co więcej, atenuowane szczepy nie są odpowiednimi wektorami szczepionkowymi dla osób o niskiej lub upośledzonej odporności takich jak dzieci, ludzie starsi czy zakażeni wirusem HIV czy dla pacjentów skłonnych do chorób autoimmunologicznych.

#### **1.10. Bakterie niepatogenne jako wektory szczepionkowe**

W związku z licznymi zagrożeniami związanymi z wykorzystaniem patogennych bakterii do konstrukcji szczepionek, uwaga badaczy zwróciła się ku wykorzystaniu niewirulentnych gatunków. W przeciwieństwie do atenuowanych, zazwyczaj gramujemnych patogennych szczepów bakterii takich jak *Shigella* czy *Salmonella*, gramdodatnie niewirulentne gatunki są bezpieczne, ponieważ stanowią naturalny składnik flory bakteryjnej człowieka lub są powszechnie wykorzystywane przez człowieka w przemyśle. W opracowaniu wektorów z ich użyciem często wykorzystywana jest unikalna cecha bakterii gramdodatnich jaką jest zdolność do tworzenia endospor. Obecnie najczęściej podejmowane są próby konstrukcji niewirulentnych wektorów bakteryjnych z wykorzystaniem wegetatywnych bakterii kwasu mlekowego (LAB), m.in. *Lactococcus lactis* (Robinson i wsp., 1997; Zhang i wsp., 2005), *Lactobacillus plantarum* (Grangette i wsp., 2001), *Lactobacillus casei* (Lee i wsp., 2006) czy *Streptococcus gordonii* (Beninati i wsp., 2000), a także spor modelowej bakterii gramdodatniej, *B. subtilis*.

Główną wadą systemów wykorzystujących niewirulentne gatunki jest brak inwazyjności, co sprawia, że dostarczanie antygeny może być mniej efektywne niż w przypadku wykorzystania patogennych bakterii. Sposobem na rozwiązanie tego problemu może być ekspresja determinantów patogenezы wirulentnych szczepów w gatunkach niepatogennych. Wśród białek, których aktywność prowadzi do wnikięcia do komórki eukariotycznej oraz ucieczki z fagosomu do cytoplazmy są czynniki wirulencji wewnątrzkomórkowego patogenu

*L. monocytogenes*. Guimaraes i wsp. (2005) opracowali szczep *L. lactis* produkujący zakotwiczoną w ścianie komórkowej internalinę A *L. monocytogenes*, który był zdolny do inwazji do komórek eukariotycznych *in vitro* i *in vivo*. Samo wnikięcie wektora do komórki gospodarza nie wystarcza jednak do tego, aby antygen był zaprezentowany w MHC klasy I i by w konsekwencji wzbudzona została odpowiedź limfocytów CD8<sup>+</sup>. Jednym ze sposobów na dostarczenie antygeny do cytoplazmy komórki APC jest ekspresja listeriolizyny O, głównego czynnika patogeny *L. monocytogenes*, który umożliwia translokację komórki bakteryjnej z wakuoli komórki gospodarza do jej cytoplazmy (toksyna zostanie szerzej scharakteryzowana w podrozdziale „Charakterystyka obiektu badań”). Drugim sposobem umożliwiającym dostarczanie antygenów do cytoplazmy jest wykorzystanie systemu sekrecji typu 3 (T3SS). T3SS jest skomplikowanym aparatem, który umożliwia wielu gramujemnym bakteriom, takim jak: *S. enterica*, *Yersinia* spp., *Shigella* spp., *E. coli* czy *Pseudomonas aeruginosa* dostarczanie białek efektorowych do cytoplazmy komórki gospodarza. Stworzenie minimalnego, funkcjonalnego systemu wymaga ekspresji ponad 20 genów. Pomimo to, z powodzeniem są one klonowane w niepatogennych bakteriach takich jak *E. coli* K12 (Akeda i wsp., 2012) czy *P. putida* (Wilson i Nickerson, 2006), stając się narzędziem do dostarczania antygenów i indukcji odpowiedzi limfocytów Tc.

### Charakterystyka obiektu badań

*Bacillus subtilis* jest gramodatnią, niepatogenną bakterią glebową szeroko stosowaną w przemyśle do wydajnej produkcji białek o immunologicznym lub farmaceutycznym znaczeniu (Harwood, 1992). Do cech umożliwiających takie wykorzystanie *B. subtilis* należą: a) brak błony zewnętrznej umożliwiający efektywny transport sekrecyjnych białek poza komórkę bakteryjną, b) dobrze udokumentowana niepatogenność, c) zdolność do produkcji spor umożliwiających przetrwanie w niesprzyjających warunkach, d) niskie koszty hodowli oraz e) możliwość izolacji białka z pożywki hodowlanej bez zanieczyszczeń innymi związkami i f) duża dostępność wiedzy z dziedzin genetyki i fizjologii tego gatunku. Bardzo istotną właściwością *B. subtilis* jest również posiadanie bardzo sprawnego systemu sekrecji, który umożliwia osiągnięcie wysokich stężeń heterologicznych białek sekrecyjnych w pożywce

hodowlanej, np. ludzkiego interferonu  $\beta$  (hINF- $\beta$ ) w stężeniu 4 g/l (Kakeshita i wsp., 2011), interleukiny-3 (IL-3) w stężeniu 0,1 g/l (Westers i wsp., 2006) czy proinsuliny PI w stężeniu 1 g/l (Olmos-Soto i Contreras-Flores, 2003).

Biorąc pod uwagę liczne zalety *B. subtilis*, gatunek ten jest zaskakująco rzadko stosowany do produkcji heterologicznych białek na dużą skalę (Westers i wsp., 2004). Za ten stan odpowiadają głównie: obecność związanych ze ścianą komórkową proteaz kontrolnych i zewnątrzkomórkowych proteaz degradujących białko transportowane do pożywki hodowlanej (feeding proteases), a także trzeciorzędowa struktura wydzielanego antygeny, od której zależy powodzenie translokacji poza komórkę bakteryjną. W celu pokonania pierwszej z wymienionych przeciwności konstruowane są szczepy, w których geny kodujące kontrolne lub wydzielane do podłoża proteazy poddawane są delecji. Pohl i wsp. (2013) wykazali, że usunięcie 7 zewnątrzkomórkowych proteaz NprB, AprE, Epr, Bpr, NprE, Mpr i Vpr znacząco wpływa na stabilność heterologicznego białka sekrecyjnego rPA *B. anthracis* wydzielanego przez *B. subtilis*, nie przyczyniając się jednocześnie do zmiany żywotności czy tempa wzrostu komórek. Kodama i wsp. (2012) udowodnili natomiast, że szczep *B. subtilis*, w którym usunięto 8 proteaz zewnątrzkomórkowych (AprE, Bpr, Epr, Mpr, NprB, NprE, Vpr i WprA), jedną proteazę wewnątrzkomórkową AprX wydostającą się poza komórkę oraz 2 proteazy kontrolne (HtrA i HtrB) znacznie poprawia sekrecję lipazy A. Drugie ograniczenie sekrecji heterologicznych białek może być pokonane poprzez modyfikację ich struktury. Ze względu na to, że większość białek *B. subtilis* ulega sekrecji z wykorzystaniem systemu Sec, istnieje potrzeba poddania białka fuzji ze specyficzną N-terminalną sekwencją sekrecyjną kierującą do transportu poza komórkę. Nie istnieje uniwersalna reguła pozwalająca na wybór odpowiedniej sekwencji sygnałnej, w związku z czym dla każdego białka musi być ona wytypowana w toku indywidualnych badań. Ten proces może być przyspieszony dzięki wykorzystaniu metody zaproponowanej przez Brockmeiera i wsp. (2006), która uwzględnia przeszukiwanie biblioteki wszystkich znanych sekwencji sygnałnych *B. subtilis*. Trwałość wydzielanego białka może być również przedłużona dzięki odniesieniu się do wyników innych badań, w których dowiedziono, że delecja C-końcowej części chaperonu SecA *B. subtilis* kierującego białka do translokacji na ścieżce Sec nie jest mutacją letalną oraz nie hamuje transportu z udziałem ścieżki Sec, a co więcej wpływa na niemal 2-krotne zwiększenie sekrecji białek heterologicznych. Ustalono, że obszar DNA, którego usunięcie wpływa na poprawę zewnątrzkomórkowej produkcji białek heterologicznych dotyczy



sekwencji kodującej aminokwasy od 780 do 819 (Kakeshita i wsp., 2011). Do zwiększonego stężenia białka heterologicznego przyczynić się może również jego koekspresja z wewnątrzkomórkowym chaperonem PrsA, który pośredniczy w zwijaniu białka na jego późnych etapach, co udowodnili między innymi Kakeshita i wsp. (2011) w badaniach z zastosowaniem szczepu *B. subtilis* wytwarzającego ludzki INF- $\beta$ .

Komórki *B. subtilis* mogą być wykorzystane przy opracowywaniu szczepionek na trzy sposoby. Pierwszym z nich i najczęściej do tej pory stosowanym jest zaangażowanie komórek bakteryjnych w wewnątrz- lub zewnątrzkomórkową produkcję związków, które są następnie oczyszczane i zużytkowane przy produkcji szczepionek podjednostkowych. Wadą systemów opartych na wykorzystywanej powszechnie bakterii *E. coli* jest bowiem produkcja i gromadzenie heterologicznych białek w cytoplazmie, co stwarza potrzebę ich odzyskiwania z ciał inkluzyjnych oraz zajęcia etapu ponownego zwijania. Wykorzystanie *B. subtilis* jest więc dobrym, tanim i szybkim sposobem na syntezę białek w rozpuszczalnej formie. Skonstruowano między innymi szczep *B. subtilis* wytwarzający antygen protekcyjny PA *B. anthracis*, dzięki któremu udało się opracować dużo bezpieczniejszą metodę syntezy niż przy wykorzystaniu laseczki węgliką. Oczyszczone w ten sposób białko było immunogenne względem myszy i świnek morskich, które poddano infekcji przy zastosowaniu śmiertelnej dawki *B. anthracis* (McBride i wsp., 1998). Przy zastosowaniu plazmidowych wektorów ekspresyjnych udało się również uzyskać *B. subtilis* produkujący podjednostki toksyny PT *B. pertussis* (Saris i wsp., 1990) czy białko błony zewnętrznej P1 *N. meningitidis* (Idänpään-Heikkilä i wsp., 1995), przy czym w obu wypadkach zaszła potrzeba wykonania modyfikacji poprzez, odpowiednio, izolację białka z ciał inkluzyjnych czy zastosowanie liposomów. Wadami zastosowania *B. subtilis* do produkcji podjednostek szczepionek mogą być: niska stabilność plazmidów kodujących antygen, obecność tzw. proteaz kontrolnych wydzielanych poza komórkę bakteryjną i degradujących pożądany antygen i w końcu potencjał do indukcji jedynie humoralnej odpowiedzi komórkowej. Szczepionki podjednostkowe nie dostarczają bowiem antygeny do cytoplazmy komórek, co uniemożliwia jego wejście na endogenną ścieżkę prezentacji.

Innym sposobem wykorzystania *B. subtilis* w wakcynologii, który zyskuje coraz większą popularność, jest zastosowanie form przetrwalnikowych. Spory *B. subtilis*, w przeciwieństwie do białkowych produktów metabolizmu bakterii, umożliwiają indukcję zarówno odporności

systemowej, jak i odporności związanej z błonami śluzowymi (Nizard i wsp., 2014), a także pozwalają na generowanie obu typów odpowiedzi immunologicznej – humoralnej i komórkowej. Wykorzystanie spor eliminuje potrzebę oczyszczania antygeny i znacznie upraszcza procedurę immunizacji ze względu na możliwość podania szczepionki drogą pokarmową. Przetrawalniki *B. subtilis* są otaczane przez wielowarstwową strukturę płaszczka formowaną przez białka Cot, które wykorzystuje się do tworzenia fuzji z antygenami obcego pochodzenia. Spory *B. subtilis* zastosowano między innymi w konstrukcji wektorów dostarczających antygeny, takie jak: białko FliD (Negri i wsp., 2013) czy fragment C toksyny tężcowej (TTFC) *C. tetani* (Mauriello i wsp., 2004), białko UreA *Helicobacter acinonychis* (Hinc i wsp., 2010) czy VP28 wirusa WSSV (Ning i wsp. 2011). Obszerny przegląd heterologicznych antygenów ekspresowanych na sporach *B. subtilis* został przedstawiony w pracy Ferreiry i Schumanna (2012). Pomimo potwierdzonej immunogenności tego typu szczepionek istnieją problemy, które muszą być rozwiązane, np. niski poziom systemowej odpowiedzi humoralnej i komórkowej, w szczególności podczas stosowania doustnej metody podania szczepionki. Przyczyną takiego stanu rzeczy może być powszechna obecność spor w środowisku i ich struktura pozbawiona obecności wzorców molekularnych wywołujących odpowiedź prozapalną u ssaków. To sprawia, że należy powtarzać szczepienia i podawać niezwykle wysokie dawki bakterii (Duc i wsp., 2003).

Ze względu na potrzebę uzyskania preparatów o wyższej immunogenności oraz ryzyko związane w rewersją atenuowanych patogenów do wirulentnego fenotypu i wytworzeniem auto-reaktywnych przeciwciał u szczepionych osób podatnych na choroby autoimmunologiczne, obiecująca wydaje się być perspektywa wykorzystania komórek wegetatywnych jako nośniki obcych białek. Nawiązując do Titballa (2008) jedynie żywe, rekombinowane szczepy mikroorganizmów są w stanie indukować silną odpowiedź limfocytów CD8<sup>+</sup>. Podejmowane są nieliczne próby zaangażowania wegetatywnych komórek *B. subtilis* do immunizacji, jednakże do tej pory brak jest dowodów na ich zdolność do indukcji komórkowej odpowiedzi immunologicznej. Przeprowadzone eksperymenty tego typu potwierdziły zdolność do wywoływania jedynie humoralnych mechanizmów odpowiedzi. Luiz i wsp. (2008) dowiedli, że *B. subtilis* kodujący białko CfaB będące składnikiem fimbrii enterotoksycznych szczepów *E. coli* (ETEC) stanowi skuteczny preparat wzmacniający efekt uprzedniego szczepienia z użyciem szczepionki DNA. Lee i wsp. (2010)

wykorzystali natomiast komórki wegetatywne *B. subtilis* ekspresyjnie białko VP6 kapsydu rotawirusa do immunizacji myszy, dowodząc skuteczności wektora do indukcji systemowej odpowiedzi przeciwciał IgG. W toku badań wykazano również, że *B. subtilis* wytwarzający Stx2B, podjednostkę toksyny enterokrwotocznych szczepów *E. coli* (EHEC) po podaniu drogą pokarmową przyczynia się do specyficznej odpowiedzi przeciwciał IgG oraz zwiększonego poziomu przeciwciał IgA w kale świadczących o przebyciu odpowiedzi w błonach śluzowych myszy BALB/c. Zastosowanie spor *B. subtilis* wywoływało ten sam efekt jedynie przy pozajelitowym podaniu szczepionki (Gomes i wsp., 2009).

Immunogenność szczepionek opartych na żywych, niepatogennych bakteriach może być wzmocniona poprzez ekspresję genów kodujących czynniki wirulencji znanych wewnątrzkomórkowych patogenów takich jak *S. enterica* czy *L. monocytogenes*. Za początek badań w tym obszarze uznaje się odkrycie prof. Bieleckiego i wsp. (1990), którzy dowiedli, że *B. subtilis* wytwarzający główny czynnik patogenności *L. monocytogenes*, LLO, jest zdolny do wniknięcia do nefagocytujących i fagocytujących komórek eukariotycznych, ucieczki z ich wakuoli do cytoplazmy komórki gospodarza i przetrwania w jej wnętrzu. *L. monocytogenes* jest gramdodatnim wewnątrzkomórkowym patogenem odnajdywanym w żywności, który jest czynnikiem etiologicznym infekcji zwanych listeriozami u ludzi i zwierząt, dotyczących głównie osoby o osłabionej odporności. Większość sfagocytowanych przez komórki eukariotyczne bakterii jest zabijana i degradowana w fagolisosomie, jednak 5-10% bakterii ucieka do cytoplazmy dzięki aktywności LLO tworzącej pory w błonie wakuoli. Bakterie *L. monocytogenes* pozbawione genu *hly* nie są patogene i wykazują niską immunogenność nawet przy zastosowaniu wysokich dawek infekcyjnych (Hamilton i wsp., 2006).

Toksyna swoje właściwości zawdzięcza specyficznej strukturze. Białko o masie 58 kDa ulega sekrecji poza komórkę bakteryjną w postaci rozpuszczalnych w wodzie monomerów, które mogą wiązać się do błon biologicznych zawierających cholesterol i oligomeryzować do struktury  $\beta$ -baryłki, tworząc w błonie pory. LLO jest aktywna jedynie w kwaśnym pH, co ogranicza zakres jej działalności do wakuoli komórki gospodarza i w ten sposób chroni ją przed śmiercią (Sun i Liu, 2013). W trakcie infekcji *L. monocytogenes* odpowiedź limfocytów Th i Tc jest skierowana przeciwko LLO (Geginat i wsp., 2001). Permeabilizująca aktywność toksyny umożliwia dostęp heterologicznych antygenów do cytozolu i ich wejście na egzogenną TAP-zależną ścieżkę prezentacji genu. W wyniku prezentacji antygeny w kontekście MHC klasy I aktywacji ulegają zarówno limfocyty CD4<sup>+</sup> jak i CD8<sup>+</sup>, co prowadzi

do kompleksowej odpowiedzi komórkowej. Koekspresja LLO z innymi antygenami jest intensywnie wykorzystywana w badaniach nad konstrukcją żywych szczepionek. Bahey-el-Din i wsp. (2010) w badaniach z wykorzystaniem mysiego modelu infekcji wykazali, że jednoczesna ekspresja LLO z białkiem p60 w *L. lactis* skutecznie wyzwała odpowiedź limfocytów Tc, a także zapewnia odporność na infekcje *L. monocytogenes*. Trwają także zaawansowane badania kliniczne nad modyfikowaną szczepionką przeciwgruźliczą BCG $\Delta$ ureChly<sup>+</sup>, w której toksyna dzięki swej aktywności wzmacnia prezentację antygenów *M. tuberculosis* i generowaną dzięki niej pamięć immunologiczną (Grode i wsp., 2013). Aktywność LLO wykorzystywana jest również przy opracowywaniu szczepionek przeciwnowotworowych – Radford i wsp. (2002) wykazali, że komórki *Escherichia coli* produkujące LLO oraz owoalbuminę jaja kurzego (OVA) są zdolne do eradykacji komórek czerniaka linii B16-OVA oraz skutecznie zapobiegają wzrostowi nowotworu.

Bardzo interesującą cechą listeriolizyny O jest fakt, że jednocześnie stanowi ona główny czynnik patogenezы oraz główny immunogen, co sprawia, że jest ona idealnym kandydatem na adiuwant szczepionkowy. Poddanie komórek APC działaniu nanomolarnych, niemających cytotoksycznego efektu, stężeń cytolizyny powodowało aktywację limfocytów CD8<sup>+</sup>, podczas gdy pikomolarne stężenia wystarczały do zaobserwowania aktywacji komórek CD4<sup>+</sup> (Carrero i wsp., 2012). Co więcej, zainfekowane komórki i rozpoznające je limfocyty w obecności LLO produkują szerokie spektrum cytokin i chemokin takich jak IL-1, IL-6, IL-12, CCL2, IFN- $\beta$  czy TNF- $\alpha$ , które aktywują komórki APC i wzmacniają wrodzoną odpowiedź immunologiczną oraz odpowiedź limfocytów Th1 (Pamer, 2004). Huang i wsp. (2008) potwierdzili wpływ LLO na poprawę immunologicznej odpowiedzi w badaniach z wykorzystaniem spor *B. subtilis* koeksprymujących LLO z antygenem protekcyjnym PA *Bacillus anthracis*. Zaobserwowali, że spory powodowały wzrost poziomu przeciwciał IgG2a rozpoznających PA oraz poziomu INF- $\gamma$  i IL-12 przy jednocześnie obniżonej aktywności IL-4 w splenocytach, co świadczy o wzmożonej odpowiedzi typu Th1. Brak związku między cytotoksycznością a immunogennością czyni ponadto z LLO wyjątkowe białko do immunoterapii nowotworów. Aktywność cytotoksyczna może posłużyć do bezpośredniego zabijania komórek rakowych, natomiast ze względu na swoją immunogenność LLO może mieć również aktywność adiuwantową wykorzystaną przy indukcji trwałej odporności komórki na proces nowotworowy. Obie te cechy z powodzeniem mogą być wykorzystane jednocześnie. Stachowiak i wsp. (2014) w swoich badaniach analizowali aktywność oczyszczonej LLO

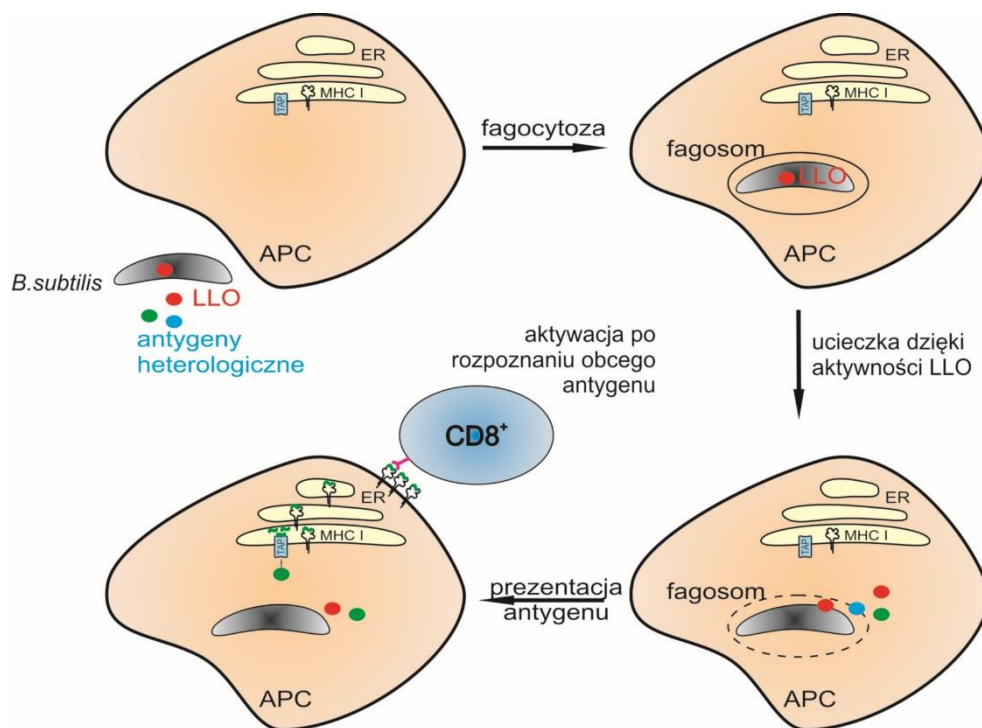
względem komórek białaczkowych komórek T Jurkat, dowodząc wysokiej niespecyficzej toksyczności, która z powodzeniem może być zastosowana do eradykacji nowotworów przy zawężeniu obszaru działania do miejsc zawierających zmienione chorobowo komórki.

Inną cechą LLO, która wspiera jej użycie w dostarczaniu antygenów do cytoplazmy komórek gospodarza jest obecność sekwencji PEST-podobnej w strukturze toksyny (Decatur i Portnoy, 2000). Ta N-końcowa, 26-aminokwasowa sekwencja kieruje LLO na ścieżkę degradacji w proteasomie, w ten sposób ograniczając aktywność cytolizyny do wakuoli i chroniąc komórkę gospodarza przed uszkodzeniem (Schnupf i wsp., 2006). Sekwencja PEST-podobna zawierająca prolinę (P), kwas glutaminowy (E), serynę (S) i treoninę (T) wykazuje bardzo duże podobieństwo do eukariotycznych sekwencji PEST, które w wielu przypadkach ulegają ubikwitynylacji i służą jako znacznik degradacji. Schnupf i wsp. (2000) dowiedli, że wewnątrzkomórkowa LLO jest degradowana w sposób zależny od proteasomu, a także, że przed zajściem degradacji ulega ubikwitynylacji i fosforylacji w obrębie PEST-podobnej sekwencji. Immunogeny potencjał tej sekwencji został również zbadany przez Sewell'a i wsp. (2004), którzy wykazali, że jej koekspresja z antygenem E7 wirusa HPV-16 w *L. monocytogenes* wzmacnia immunogenność i prowadzi do regresji nowotworu w modelu mysim. Do tej pory nie przeprowadzono jednak badań nad zdolnością fuzyjnych antygenów niosących sekwencję PEST-podobną, produkowanych przez niepatogenne bakteryjne wektory do indukcji odpowiedzi cytotoksycznych limfocytów T.

Wyniki badań zapoczątkowanych w Zakładzie Mikrobiologii Stosowanej UW oraz analiz przeprowadzanych z wykorzystaniem innych niepatogennych gatunków bakterii zasugerowały, że *B. subtilis* wytwarzający listeriolizynę O mógłby być obiecującym kandydatem dostarczającym antygeny do cytozolu komórek APC. Duże pokrewieństwo genów kodujących składniki systemów sekrecyjnych *B. subtilis* i *L. monocytogenes* oraz zbliżona konstrukcja aparatów sekrecyjnych obu gatunków sprawiły, że możliwe jest konstruowanie tego typu niepatogennych wektorów wykazujących zdolność do inwazji. Główną ścieżką sekrecji w przypadku obu gatunków bakterii jest Sec – na jej drodze zachodzi transport LLO u *L. monocytogenes* (Desvaux i Hébraud, 2006). Te podobieństwa umożliwiają wysoce skuteczną ekspresję i sekrecję LLO w *B. subtilis*.

Istotnym walorem wykorzystania komórek *B. subtilis* wytwarzających LLO jest perforująca aktywność toksyny, która może prowadzić do uwolnienia innych sekrecyjnych

białek do cytozolu komórki gospodarza, umożliwiając jednocześnie ich prezentację w kompleksach z cząsteczkami MHC klasy I (rysunek 1.7). Wyniki wstępnych badań przeprowadzanych w Zakładzie Mikrobiologii Stosowanej Uniwersytetu Warszawskiego potwierdzają, że *B. subtilis* jest dobrym kandydatem na wektor do produkcji heterologicznych antygenów. Wykazano bowiem, że toksyna LLO jest wydajnie wydzielana do pożywki hodowlanej i zachowuje swoją aktywność, co może być wykorzystane między innymi do kontroli rozwoju nowotworów (Stachowiak i wsp., 2012). Wykorzystanie komórek *B. subtilis* produkujących LLO dałoby możliwość analizy skomplikowanych procesów, jakimi są sekrecja białek heterologicznych w *B. subtilis*, prezentacja antygeny czy wywołana nią indukcja odpowiedzi limfocytów CD8<sup>+</sup>.



**Rysunek 1.7. Idea wykorzystania *B. subtilis* wytwarzającego listeriolizynę O do wywołania komórkowej odpowiedzi immunologicznej.** Komórka *B. subtilis* wydzielająca LLO oraz antygeny heterologiczne jest fagocytowana przez komórkę APC. Po znalezieniu się na terenie wakuoli LLO uzyskuje aktywność i prowadzi do perforacji błony wakuoli, co skutkuje wydostaniem się bakterii do cytozolu komórki APC. Wydzielane do cytozolu antygeny są przetwarzane na drodze ścieżki TAP, a następnie prezentowane w kompleksach z cząsteczkami MHC I, co umożliwi ich rozpoznanie przez limfocyty cytotoksyczne i zajęcie komórkowej odpowiedzi immunologicznej. APC – komórka prezentująca antygen; ER – retikulum endoplazmatyczne; CD8<sup>+</sup> - limfocyt cytotoksyczny.

Podsumowując, konstrukcja wektorów na bazie niepatogennych gatunków bakterii umożliwia poszerzenie wiedzy na temat mechanizmów warunkujących wzbudzenie odpowiedzi immunologicznej, co jest niezbędne do opracowywania nowych metod indukcji odporności przeciw różnym typom patogenów. Głównymi celami współczesnej wakcynologii są bowiem obecnie: a) identyfikacja nowych dróg dostarczania antygenów do środowiska cytoplazmatycznego, b) poszukiwanie antygenów zdolnych do indukcji komórkowych mechanizmów odpowiedzi, c) odnajdywanie immunodominujących peptydów i d) poszukiwanie adiuwantów modulujących odpowiedź limfocytów Tc. Te cele podyktowane są silną potrzebą opracowania technik immunizacji przeciw organizmom o wewnątrzkomórkowym trybie życia, będących przyczyną coraz większej śmiertelności (np. HIV, *M. tuberculosis*). W przeciwieństwie do patogenów zewnątrzkomórkowych są one niewidoczne dla układu immunologicznego, co sprawia, że odpowiedź humoralna za pośrednictwem przeciwciał jest nieskuteczna. Poszerzenie znajomości mechanizmów interakcji bakterii z ich gospodarzami w trakcie infekcji i opracowanie skutecznych metod dostosowywania bakteryjnych wektorów do potrzeb farmakologii prowadzi do opracowania innowacyjnych leków czy szczepionek. Analiza zdolności *B. subtilis* do produkcji heterologicznych antygenów oraz indukcji komórkowej odpowiedzi immunologicznej może zatem przyczynić się do poszerzenia wiedzy z dziedziny wakcynologii i opracowania nowych metod immunizacji.

---

## 2. Cele pracy

---

### Cel poznawczy

Celem poznawczym prezentowanej rozprawy doktorskiej było zbadanie potencjału wegetatywnych komórek *B. subtilis* do produkcji antygenów heterologicznych i ich dostarczania do cytoplazmy komórek eukariotycznych, a także ocena zdolności bakterii do wzbudzania odpowiedzi immunologicznej.

### Cel praktyczny

Ogólnym celem praktycznym przeprowadzonych badań było skonstruowanie wektora szczepionkowego opartego na *B. subtilis*, który umożliwi produkcję heterologicznych białek na terenie komórki eukariotycznej i w konsekwencji indukcję skierowanej przeciw nim odpowiedzi immunologicznej. Z tak sformułowanego celu ogólnego wynikają zebrane poniżej cele szczegółowe:

- konstrukcja plazmidowych wektorów integracyjnych umożliwiających ekspresję genów kodujących heterologiczne białka w *B. subtilis*,
- uzyskanie serii szczepów *B. subtilis* wytwarzających pełnej długości owoalbuminę jaja kurzego – modelowy antygen eukariotyczny lub jej epitop SIINFEKL oraz analiza prezentacji antygeny na infekowanych bakteriami komórkach,
- uzyskanie szczepu *B. subtilis* produkującego główny antygen *M. tuberculosis* Ag85B oraz analiza jego potencjału do indukcji komórkowej i humoralnej odpowiedzi immunologicznej *in vivo*.



## 3. Materiały

### 3.1. Szczepy bakteryjne

**Tabela 3.1.** Szczepy *E. coli* wykorzystane i skonstruowane w tej pracy

Nazwa	Charakterystyka	Pochodzenie
1117	plazmid pUR101 wprowadzony do Top10	prezentowana praca
1118	plazmid pUR102 wprowadzony do Top10	prezentowana praca
1119	plazmid pUR103 wprowadzony do Top10	prezentowana praca
1120	plazmid pUR104 wprowadzony do Top10	prezentowana praca
12ABMIYP	plazmid pMA-RQ_p-rbs38-gfp-t wprowadzony do Top10	GeneArt
1331	plazmid pAG58-1- <i>ble</i> wprowadzony do MC1061	Youngman i wsp., 1989
1405	plazmid pUK10 wprowadzony do Top10	prezentowana praca
1407	plazmid pUK10_Ag85B wprowadzony do Top10	prezentowana praca
1415	plazmid pUR101GFP wprowadzony do Top10	prezentowana praca
1416	plazmid pUR102GFP wprowadzony do Top10	prezentowana praca
1417	plazmid pUR103GFP wprowadzony do Top10	prezentowana praca
1418	plazmid pUR104GFP wprowadzony do Top10	prezentowana praca
1460	plazmid pKG10 wprowadzony do Top10	prezentowana praca
1461	plazmid pKG11 wprowadzony do Top10	prezentowana praca
1462	plazmid pUR10 wprowadzony do Top10	prezentowana praca
1463	plazmid pDriveKm wprowadzony do GM2163 ( <i>dam</i> -)	ZMS, UW
1464	plazmid pDrive_ <i>spcS</i> wprowadzony do Top10	prezentowana praca
1465	plazmid pDrive_ <i>secA</i> -STOP_ <i>spcS</i> wprowadzony do Top10	prezentowana praca
1466	plazmid pDrive $\Delta$ CTL wprowadzony do Top10	prezentowana praca
1467	plazmid pUR10_Ag85B wprowadzony do Top10	prezentowana praca
BP1	plazmid pET29b- <i>hly</i> wprowadzony do BL21	ZMS, UW
ECE83	plazmid pIC156 wprowadzony do Top10	BGSC
GM2163	<i>F dam-13::Tn 9 dcm-6 hsdR2 leuB6 his-4 thi-1 ara-14 lacY1 galK2 galT22 xyl-5 mtl-1 rpsL136 tonA31 tsx-78 supE44McrA<sup>-</sup> McrB<sup>-</sup></i>	Fermentas

<b>K12 XL10 Gold</b>	<i>endA1 glnV44 recA1 thi-1 gyrA96 relA1 lac Hte Δ(mcrA)183 Δ(mcrCB-hsdSMR-mrr)173 tet<sup>R</sup> F'[proAB lac<sup>q</sup>ZΔM15 Tn10(Tet<sup>R</sup> Amy Cm<sup>R</sup>)]</i>	Stratagene
<b>MAT1</b>	plazmid pMA-T1 wprowadzony do Top10	prezentowana praca
<b>MAT2</b>	plazmid pMA-T2 wprowadzony do Top10	prezentowana praca
<b>MAT3-1</b>	plazmid pMA-T3_1 wprowadzony do Top10	prezentowana praca
<b>MAT3-2</b>	plazmid pMA-T3_2 wprowadzony do Top10	prezentowana praca
<b>MCS_pAG</b>	plazmid MCSpAG09 wprowadzony do K12 XL10 Gold	prezentowana praca
<b>Top10</b>	F- <i>mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) φ80lacZ ΔM15 ΔlacX74 deoR nupG recA1 araD139 Δ(ara-leu)7697 galU galK rpsL(strR) endA1 λ-</i>	Invitrogen

**Tabela 3.2.** Szczepy *B. subtilis* wykorzystane i skonstruowane w tej pracy

Nazwa	Charakterystyka	Pochodzenie
<b>1E6</b>	plazmid pUB110	BGSC
<b>BR1C</b>	MB4::pUK10	prezentowana praca
<b>BR1C_Ag85B</b>	BR1C::pUK10_Ag85B	prezentowana praca
<b>BR1S</b>	MB4::pAG58-1- <i>ble-hly</i>	Stachowiak i wsp., 2011
<b>BR1S_Ag85B</b>	BR1S::pUR10_Ag85B	prezentowana praca
<b>BR1SΔCTL</b>	BR1S <i>secAΔCTL::spcS</i> (integracja plazmidu pDriveΔCTL)	prezentowana praca
<b>MB4</b>	168 SPβ <i>c2 del2::Tn917::pSK10Δ6, spoII E::Tn917ΩHU181::lac55</i>	Bielecki i wsp., 1990
<b>MB4ΔCTL</b>	MB4 <i>secAΔCTL::spcS</i> (integracja plazmidu pDriveΔCTL)	prezentowana praca
<b>R_OVA1</b>	MB4::pUR101	prezentowana praca
<b>R_OVA1GFP</b>	MB4::pUR101GFP	prezentowana praca
<b>R_OVA2</b>	MB4::pUR102	prezentowana praca
<b>R_OVA2GFP</b>	MB4::pUR102GFP	prezentowana praca
<b>R_OVA3</b>	MB4::pUR103	prezentowana praca
<b>R_OVA3GFP</b>	MB4::pUR103GFP	prezentowana praca
<b>R_OVA3ΔCTL</b>	R_OVA3 <i>secAΔCTL::spcS</i> (integracja plazmidu pDriveΔCTL)	prezentowana praca
<b>R_OVA4</b>	MB4::pUR104	prezentowana praca
<b>R_OVA4GFP</b>	MB4::pUR104GFP	prezentowana praca

**Tabela 3.3.** Szczepy *L. monocytogenes* wykorzystane w tej pracy

Nazwa	Charakterystyka	Pochodzenie
10403S	Szczep serotypu 1/2a	Bishop i Hinrichs, 2009

### 3.2. Komórki eukariotyczne

a) **IC-21** – linia mysich otrzewnowych makrofagów wyprowadzona ze szczepu C57BL/6, kolekcja ATCC (TIB 186)

b) **JAWS II** – linia mysich niedojrzałych komórek dendrytycznych wyprowadzona ze szczepu C57BL/6, kolekcja ATCC (CRL-11904); dzięki uprzejmości prof. Nadziei Dreli z Zakładu Immunologii UW

### 3.3. Zwierzęta

a) **OT-I** – transgeniczne myszy, których receptor TCR rozpoznaje jedynie epitop białka OVA (257-264) w kontekście cząsteczek H2K<sup>b</sup>; linia wyprowadzona ze szczepu C57BL/6; The Jackson Laboratory (USA)

b) **C57BL/6** – powszechnie stosowana linia myszy laboratoryjnych; The Jackson Laboratory (USA)

c) **C57BL/6 x DBA2** – linia mieszana wyprowadzona w ramach prezentowanych badań w Trójmiejskiej Akademickiej Zwierzętarni Doświadczalnej poprzez krzyżowanie myszy C57BL/6 z myszami DBA2

### 3.4. Plazmidy bakteryjne

#### Plazmidy użyte w pracy

**Tabela 3.4.** Spis plazmidów użytych w pracy

Nazwa	Charakterystyka	Pochodzenie
<b>MCSpAG09</b>	Ap <sup>R</sup> ; 2,7 kb; wektor niosący rozbudowane miejsce MCS do klonowania w modyfikowanym wektorze pAG58-1- <i>ble</i> (GeneArt, 0949880)	GeneArt
<b>pDriveKm</b>	Ap <sup>R</sup> , Kan <sup>R</sup> ; 5,5 kb; wektor powstały przez sklonowanie genu oporności na kanamycynę dla bakterii gramodatnich w komercyjnym wektorze pDrive (Qiagen)	ZMS, UW
<b>pIC156</b>	Ap <sup>R</sup> , Erm <sup>R</sup> ; ~ 4 kb; wektor niosący kasetę oporności na spektynomycynę z genem <i>spcS</i>	BGSC
<b>pUB110</b>	Kan <sup>R</sup> , Ble <sup>R</sup> ; 4,6 kb; wektor <i>B. subtilis</i> nieintegrujący do chromosomu	Keggins i wsp., 1978
<b>pAG58-1-<i>ble</i></b>	Ap <sup>R</sup> , Ble <sup>R</sup> ; 8,5 kb; wektor integracyjny; klonowane w miejscu MCS geny znajdują się pod kontrolą indukowanego IPTG promotora p <sub>spac</sub>	Youngman i wsp., 1989

## Plazmidy skonstruowane w pracy

Tabela 3.5. Spis plazmidów skonstruowanych w pracy

Nazwa	Charakterystyka
<b>PLAZMIDY DO KLONOWANIA HETEROLOGICZNYCH GENÓW I ICH INTEGRACJI DO CHROMOSOMU <i>B. subtilis</i> MB4</b>	
pKG10	Ap <sup>R</sup> , Ble <sup>R</sup> ; 6,5 kb; plazmid pochodny pAG58-1- <i>ble</i> , z którego usunięto 2 kb fragment nieistotnej sekwencji; <b>wektor wykorzystany do konstrukcji wektora pUR10;</b>
pKG11	Ap <sup>R</sup> , Kan <sup>R</sup> , Ble <sup>R</sup> ; 7,4 kb; plazmid pochodny pKG10, do którego sklonowano fragment DNA wielkości 1,6 kb niosący geny oporności na Kan i Ble; fragment uzyskano w reakcji PCR z wykorzystaniem starterów <b>KanBleR</b> i <b>KanBleL</b> na matrycy wektora <b>pUB110; wektor wykorzystany do konstrukcji wektora pUR10;</b>
pUK10	Ap <sup>R</sup> , Kan <sup>R</sup> , Ble <sup>R</sup> ; 6 kb; plazmid pochodny pUR10, z którego usunięto 1,6 kb fragment sekwencji zawierający gen <i>lacI</i> ; <b>wektor integracyjny do insercji genów heterologicznych do chromosomu <i>B. subtilis</i> MB4, umożliwia konstytutywną ekspresję klonowanych w miejscu MCS genów znajdujących się pod kontrolą promotora p<sub>spac</sub>;</b>
pUR10	Ap <sup>R</sup> , Kan <sup>R</sup> , Ble <sup>R</sup> ; 7,6 kb; plazmid pochodny pKG11, do którego sklonowano nowe, rozbudowane miejsce MCS o wielkości 0,25 kb uzyskane poprzez wycięcie enzymami NheI i RsrII z komercyjnego wektora MCSpAG09 zsyntetyzowanego na zamówienie przez firmę GeneArt; <b>wektor integracyjny do insercji genów heterologicznych do chromosomu <i>B. subtilis</i> MB4, umożliwia fakultatywną ekspresję klonowanych w miejscu MCS genów znajdujących się pod kontrolą promotora p<sub>spac</sub> w zależności od induktora IPTG;</b>
<b>PLAZMIDY DO EKSPRESJI ANTYGENU FUZYJNEGO LLO-OVA W <i>B. subtilis</i> MB4</b>	
pMA-T1	Ap <sup>R</sup> ; 2,8 kb; plazmid zsyntetyzowany przez firmę Mr. Gene w oparciu o wektor pMA-T; <b>wektor niosący wstawkę 0,25 kb do wektora pUR101 zaprojektowaną jako element do fuzji translacyjnej genu <i>hly</i> i epitopu OVA, SIINFEKL;</b>
pMA-T2	Ap <sup>R</sup> ; 2,7 kb; plazmid zsyntetyzowany przez firmę Mr. Gene w oparciu o wektor pMA-T; <b>wektor niosący wstawkę 0,2 kb do wektora pUR102 zaprojektowaną jako fuzja translacyjna genu <i>hly</i> (N-końcowej części kodującej RBS, sekwencję sygnałową i PEST-podobną) i epitopu OVA, SIINFEKL;</b>
pMA-T3_1	Ap <sup>R</sup> ; 2,9 kb; plazmid zsyntetyzowany przez firmę Mr. Gene w oparciu o wektor pMA-T; <b>wektor niosący wstawkę 0,4 kb do wektora pUR103 zaprojektowaną jako element do fuzji translacyjnej genu <i>hly</i> i genu OVA OVA (N-końcowa sekwencja genu <i>hly</i> kodująca RBS, sekwencję sygnałową i PEST-podobną poddana fuzji do N-końcowego fragmentu genu OVA do miejsca EcoRV);</b>

pMA-T3_2	Ap <sup>R</sup> ; 2,9 kb; plazmid zsyntetyzowany przez firmę Mr. Gene w oparciu o wektor pMA-T; <b>wektor niosący wstawkę 0,9 kb do wektora pUR103 zaprojektowaną jako element do fuzji translacyjnej genu <i>hly</i> i genu OVA (sekwencja OVA od miejsca EcoRV do końca genu);</b>
pUR101	Ap <sup>R</sup> , Kan <sup>R</sup> , Ble <sup>R</sup> ; 7,5 kb; plazmid pochodny pUR10, powstały przez sklonowanie sekwencji kodującej C-końcową część genu <i>hly</i> poddaną fuzji translacyjnej do sekwencji epitopu OVA, SIINFEKL w miejsca NheI i RsrII. Wstawka powstała przez trawienie wektora <b>pMA-T1</b> enzymami NheI i RsrII (0,25 kb); <b>wektor integracyjny do uzyskania szczepu <i>B. subtilis</i> wytwarzającego antygen fuzyjny LLO-OVA;</b>
pUR102	Ap <sup>R</sup> , Kan <sup>R</sup> , Ble <sup>R</sup> ; 7,7 kb; plazmid pochodny pUR10, powstały przez sklonowanie w miejsce MCS sekwencji kodującej N-końcową część genu <i>hly</i> (sekwencja RBS, sygnałowa i PEST-podobna) poddaną fuzji translacyjnej do sekwencji epitopu OVA, SIINFEKL. Wstawka powstała przez trawienie wektora <b>pMA-T2</b> enzymami Sall i NotI (0,2 kb); <b>wektor integracyjny do uzyskania szczepu <i>B. subtilis</i> wytwarzającego antygen fuzyjny LLO-OVA;</b>
pUR103	Ap <sup>R</sup> , Kan <sup>R</sup> , Ble <sup>R</sup> ; 8,9 kb; plazmid pochodny pUR10, powstały przez sklonowanie w miejsce MCS dwóch sekwencji. Pierwsza z nich kodowała N-końcową część genu <i>hly</i> (sekwencja RBS, sygnałowa i PEST-podobna) poddaną fuzji translacyjnej do N-końcowej sekwencji OVA do jej miejsca EcoRV (wycinana enzymami EcoNI i EcoRV z wektora <b>pMA-T3_1</b> , 0,4 kb). Druga natomiast niosła sekwencję fuzji translacyjnej C-końcowej sekwencji OVA od miejsca EcoRV (wycinana enzymami EcoRV i XhoI z wektora <b>pMA-T3_2</b> , 0,9 kb). Wektor powstał poprzez 3-elementową ligację wektora pUR10 trawionego enzymami EcoNI i XhoI, wstawki wyciętej z wektora pMA-T3_1 i wstawki wyciętej z wektora pMA-T3_2; <b>wektor integracyjny do uzyskania szczepu <i>B. subtilis</i> wytwarzającego antygen fuzyjny LLO-OVA;</b>
pUR104	Ap <sup>R</sup> , Kan <sup>R</sup> , Ble <sup>R</sup> ; 8,9 kb; plazmid pochodny pUR10, powstały przez sklonowanie w miejsce MCS wstawki kodującej skrócony gen <i>hly</i> odpowiadający 420 aminokwasom, poddany fuzji do sekwencji epitopu OVA, SIINFEKL. Wstawkę uzyskano poprzez amplifikację DNA na matrycy chromosomu <i>L. monocytogenes</i> 10403S z wykorzystaniem starterów pL420aaLLO i pR420aaLLO niosącego sekwencję oktapeptydu SIINFEKL (produkt 1,4 kb); <b>wektor integracyjny do uzyskania szczepu <i>B. subtilis</i> wytwarzającego antygen fuzyjny LLO-OVA;</b>
<b>PLAZMIDY DO EKSPRESJI ANTYGENU FUZYJNEGO LLO-OVA-GFP W <i>B. subtilis</i> MB4</b>	
pMA-RQ_p-rbs38-gfp-t	Ap <sup>R</sup> ; 3,3 kb; plazmid zsyntetyzowany na zamówienie przez firmę GeneArt na bazie wektora pMA-RQ. Wstawkę stanowi gen <i>gfpmut3b</i> z miejscem RBS 38, którego sekwencja została zoptymalizowana pod kątem „codon usage” dla <i>B. subtilis</i> za pomocą oprogramowania Codon Adaptation Tool (JCAT); <b>wektor niosący sekwencję białka reporterowego GFP;</b>

**pUR101GFP**

Ap<sup>R</sup>, Kan<sup>R</sup>, Ble<sup>R</sup>; 8 kb; plazmid pochodny pUR10, do którego sklonowano fuzyjny gen *hly-OVA-gfpmut3b* o wielkości 1 kb uzyskany na drodze dwuetapowej reakcji PCR. W pierwszym etapie w dwóch oddzielnych reakcjach PCR amplifikowano fragment fuzyjnego genu *hly-OVA* kodujący C-końcową sekwencję genu *hly* poddaną fuzji do epitopu OVA, SIINFEKL (matryca: **pUR101**, startery **pL1.1GFP**, **pR1.1GFP**, produkt 0,25 kb) oraz gen *gfpmut3b* (matryca: wektor **pMA-RQ\_p-rbs38-gfp-t**, startery: **pL1.2GFP**, **pR1.2GFP**, produkt 0,8 kb). W kolejnej reakcji PCR używając jako matrycy równomolarnej mieszaniny powstałych produktów i pary starterów **pL1.1GFP** i **pR1.2GFP** namnożono sklonowany fragment DNA zawierający fuzję *hly-OVA-gfpmut3b*; **wektor integracyjny do uzyskania szczepu *B. subtilis* wytwarzającego antygen fuzyjny LLO-OVA-GFP;**

**pUR102GFP**

Ap<sup>R</sup>, Kan<sup>R</sup>, Ble<sup>R</sup>; 8,5 kb; plazmid pochodny pUR10, do którego sklonowano fuzyjny gen *hly-OVA-gfpmut3b* o wielkości 0,95 kb uzyskany na drodze dwuetapowej reakcji PCR. W pierwszym etapie w dwóch oddzielnych reakcjach PCR amplifikowano fragment fuzyjnego genu *hly-OVA* kodujący N-końcowy fragment genu *hly* poddany fuzji do epitopu OVA, SIINFEKL (matryca: **pUR102**, startery **pL2.1GFP**, **pR1.2GFP**, produkt 0,2 kb) oraz gen *gfpmut3b* (matryca: wektor **pMA-RQ\_p-rbs38-gfp-t**, startery: **pL1.2GFP**, **pR1.2GFP**, produkt 0,8 kb). W kolejnej reakcji PCR używając jako matrycy równomolarnej mieszaniny powstałych produktów i pary starterów **pL2.1GFP** i **pR1.2GFP** namnożono sklonowany fragment DNA zawierający fuzję *hly-OVA-gfpmut3b*; **wektor integracyjny do uzyskania szczepu *B. subtilis* wytwarzającego antygen fuzyjny LLO-OVA-GFP;**

**pUR103GFP**

Ap<sup>R</sup>, Kan<sup>R</sup>, Ble<sup>R</sup>; 9,5 kb; plazmid pochodny pUR10, do którego sklonowano fuzyjny gen *hly-OVA-gfpmut3b* o wielkości 2,2 kb uzyskany na drodze dwuetapowej reakcji PCR. W pierwszym etapie w dwóch oddzielnych reakcjach PCR amplifikowano fragment fuzyjnego genu *hly-OVA* kodujący N-końcowy fragment genu *hly* poddany fuzji do pełnej długości genu OVA (matryca: **pUR103**, startery **pL3.1GFP**, **pR3.1GFP**, produkt 1,5 kb) oraz gen *gfpmut3b* (matryca: wektor **pMA-RQ\_p-rbs38-gfp-t**, startery: **pL3.2GFP**, **pR1.2GFP**, produkt 0,8 kb). W kolejnej reakcji PCR używając jako matrycy równomolarnej mieszaniny powstałych produktów i pary starterów **pL3.1GFP** i **pR1.2GFP** namnożono sklonowany fragment DNA zawierający fuzję *hly-OVA-gfpmut3b*; **wektor integracyjny do uzyskania szczepu *B. subtilis* wytwarzającego antygen fuzyjny LLO-OVA-GFP;**

**pUR104GFP**

Ap<sup>R</sup>, Kan<sup>R</sup>, Ble<sup>R</sup>; 9,6 kb; plazmid pochodny pUR10, do którego sklonowano fuzyjny gen *hly-OVA-gfpmut3b* o wielkości 2,1 kb uzyskany na drodze dwuetapowej reakcji PCR. W pierwszym etapie w dwóch oddzielnych reakcjach PCR amplifikowano fragment fuzyjnego genu *hly-OVA* kodujący skrócony gen *hly* poddany fuzji do epitopu OVA, SIINFEKL (matryca: **pUR104**, startery **pL4.1GFP**, **pR1.1GFP**, produkt 1,4 kb) oraz gen *gfpmut3b* (matryca: wektor **pMA-RQ\_p-rbs38-gfp-t**, startery: **pL1.2GFP**, **pR1.2GFP**, produkt 0,8 kb). W kolejnej reakcji PCR używając jako matrycy równomolarnej mieszaniny powstałych produktów i pary starterów **pL4.1GFP** i **pR1.2GFP** namnożono sklonowany fragment DNA zawierający fuzję *hly-OVA-gfpmut3b*; **wektor integracyjny do uzyskania szczepu *B. subtilis* wytwarzającego antygen fuzyjny LLO-OVA-GFP;**

PLAZMIDY DO MUTAGENIZACJI GENU <i>secA</i> W <i>B. subtilis</i> MB4	
<b>pDrive_<i>secA</i>-STOP-<i>spcS</i></b>	Ap <sup>R</sup> , Kan <sup>R</sup> ; 5,5 kb; plazmid pochodny pDrive_ <i>spcS</i> do którego sklonowano fragment genu <i>secA</i> znajdujący się powyżej kodonu 780 i do którego dołączono kodon STOP. Sekwencję amplifikowano przy pomocy starterów pL_ <i>secA</i> _STOP i pP_ <i>secA</i> _STOP na matrycy chromosomu <i>B. subtilis</i> MB4 (0,4 kb); <b>wektor do uzyskania konstrukcji do mutagenizacji genu <i>secA</i> <i>B. subtilis</i> (delecji linkera CTL);</b>
<b>pDrive_<i>spcS</i></b>	Ap <sup>R</sup> , Kan <sup>R</sup> ; 5,1 kb; plazmid pochodny pDriveKm, do którego sklonowano gen <i>spcS</i> , wycięty przy pomocy enzymów EcoRI i XbaI z wektora pIC156 (1,3 kb); <b>wektor do uzyskania konstrukcji do mutagenizacji genu <i>secA</i> <i>B. subtilis</i> (delecji linkera CTL);</b>
<b>pDriveΔCTL</b>	Ap <sup>R</sup> , Kan <sup>R</sup> ; 5,9 kb; plazmid pochodny pDrive_ <i>secA</i> -STOP- <i>spcS</i> , do którego sklonowano fragment genu <i>secA</i> znajdujący się poniżej kodonu 780. Sekwencję amplifikowano przy pomocy starterów pL_ <i>secA</i> _down i pP_ <i>secA</i> _down na matrycy chromosomu <i>B. subtilis</i> MB4 (0,4 kb); <b>wektor do mutagenizacji genu <i>secA</i> <i>B. subtilis</i> (delecji linkera CTL);</b>
PLAZMIDY DO EKSPRESJI ANTYGENU FUZYJNEGO LLO-Ag85B W <i>B. subtilis</i> MB4	
<b>pUK10_Ag85B</b>	Ap <sup>R</sup> , Kan <sup>R</sup> , Ble <sup>R</sup> ; 6,9 kb; plazmid pochodny pUK10, do którego sklonowano fuzyjny gen <i>hly-fbpB</i> o wielkości 1,2 kb uzyskany na drodze dwuetapowej reakcji PCR. W pierwszym etapie w dwóch oddzielnych reakcjach PCR amplifikowano fragment genu <i>hly</i> kodujący RBS, sekwencję sygnałową oraz PEST-podobną (matryca: <b>pUR102</b> , startery <b>pL-SP-0114</b> , <b>pP-SP-0114</b> , produkt 0,2 kb) oraz gen <i>fbpB</i> kodujący Ag85B (matryca: chromosom <i>M. tuberculosis</i> H37Rv, startery: <b>pL-Ag85-0114</b> , <b>pP-Ag85-0114</b> , produkt 1 kb). W kolejnej reakcji PCR używając jako matrycy równomolarnej mieszaniny powstałych produktów i pary starterów <b>pL-SP-0114</b> i <b>pP-Ag85-0114</b> namnożono sklonowany fragment DNA zawierający fuzyję N-końcowej sekwencji genu <i>hly</i> i <i>fbpB</i> ; <b>wektor integracyjny do uzyskania szczepu <i>B. subtilis</i> wytwarzającego antygen fuzyjny LLO-Ag85B;</b>
<b>pUR10_Ag85B</b>	Ap <sup>R</sup> , Kan <sup>R</sup> , Ble <sup>R</sup> ; 8,5 kb; plazmid pochodny pUR10, do którego sklonowano fuzyjny gen <i>hly-fbpB</i> o wielkości 1,2 kb uzyskany poprzez wycięcie fuzyji translacyjnej z wektora <b>pUK10_Ag85B</b> enzymami SpeI i XhoI; <b>wektor integracyjny do uzyskania szczepu <i>B. subtilis</i> wytwarzającego antygen fuzyjny LLO-Ag85B;</b>

### 3.5. Startery do reakcji PCR

#### Startery do amplifikacji DNA / RNA

Tabela 3.6. Spis starterów do amplifikacji DNA / RNA

Miejsca restrykcyjne zaznaczono przez podkreślenie, natomiast **pogrubienie** oznacza sekwencję komplementarną do amplifikowanego genu lub jego otoczenia. Nazwę genu umieszczano w **(nawiasie)** przy każdej nazwie startera.

Nazwa	Sekwencja nukleotydowa (5' → 3')	Miejsce restrykcyjne	Temp. topnienia [°C] sekwencja komplementarna / rozszerzona
KanBleR	GCGGTCGACGAATAAGAACGGTGTCTCC ( <i>kan</i> )	Sall	52 / 66
KanBleL	GCGACGCATGCTTACCGAAAGCCAGACTCAG ( <i>ble</i> )	SphI	52 / 67
pLhly1203	GCTCTAGAAGAGAGGGGTGGCAAACGGT ( <i>hly</i> )	XbaI	56 / 64
pRhly2200	CAGTCGACGCGGCCGCTGTGTGTTAAGCGTTTTATTC ( <i>hly</i> )	Sall, NotI	59 / 68
pL420aaLLO	GGGTACCGAGCACTGTGTGAGACTAGT ( <i>hly</i> )	SpeI	41 / 71
pR420aaLLO	TCTATCATCAACTTCGAAAACTTCGGACCGT ( <i>hly</i> )	RsrII	52 / 72
pPokta0510	GACGGTCCGAAGTTTTTCGAAGTTG ( <i>OVA</i> )	RsrII	58
SP-hly	GATCGCAGATCCTAGGC ( <i>hly</i> )	-	50
C-term-ova	CATATGGGCCTCACCTG ( <i>OVA</i> )	-	50
pL1.1GFP	TTGTTCAAGCAAGCTAGCTCATTT ( <i>hly</i> )	NheI	46 / 54
pR1.1GFP	CTTCGCCTTTTCTAAGTTTTTCGAAGTTGATG ( <i>hly</i> )	-	43 / 59
pL1.2GFP	TTCGAAAACTTAGAAAAAGGCGAAGAACTG ( <i>gfpmut3b</i> )	-	46 / 58
pR1.2GFP	AAACTCGAGTCACACTTCTTCTCTCTAG ( <i>gfpmut3b</i> )	XhoI	49 / 58
pL2.1GFP	TTTGCGGCCGCAAGGAGAG ( <i>hly</i> )	NotI	55
pL3.1GFP	GCACTGTGTGAGACTAGTGTGG ( <i>hly</i> )	SpeI	57
pR3.1GFP	TTCGCCTTTTCTAGGAGAAACGCAACGG ( <i>hly</i> )	-	46 / 61
pL3.2GFP	GTTGCGTTTCTCCTAGAAAAGGCGAAGAACTG ( <i>gfpmut3b</i> )	-	46 / 63
pL4.1GFP	GTTACTAGTCGAAAGGTACCGAGCACTGTG ( <i>hly</i> )	SpeI	56 / 63
pR1.1GFPs	CTTCGCCTTTACGAAGTTTTTCGAAGTTGATG ( <i>hly</i> )	-	68
pL_secA_STOP	TTGCGGCCGCCTGAGGAGTGGAAGC ( <i>secA</i> )	NotI	45 / 66
pP_secA_STOP	GGCCTCTAGATTACTAAATCTCAGCTTTCATCAC ( <i>secA</i> )	XbaI	45 / 62
pL_secA_down	TTGCATGCATCGGACGAAATGCCCATGC ( <i>secA</i> )	SphI	45 / 64
pP_secA_down	TTGGTACCGTGTCCGGCTCTTCTTTC ( <i>secA</i> )	KpnI	45 / 61
pLbsu_up_1008	CTGGTACCACGATTCGATGACAGATCTGG ( <i>secA</i> )	KpnI	55 / 64
pRbsu_down_1008	TTGCGGCCGCATCATACGGCTCGCTGAGAAG ( <i>secA</i> )	NotI	54 / 68
pL-SP-0114	TTTCGTGGGTACCAAGGAGAGTGAAACCCATG ( <i>hly</i> )	KpnI	50 / 64
pP-SP-0114	CGGCTCACGTCTGTTTTAGGAGAAGCAGGAGGAGA ( <i>hly</i> )	-	50 / 68
pL-Ag85-0114	TGCTTCTCCTAAAACAGACGTGAGCCGAAAG ( <i>fbpB</i> )	-	56 / 63



pP-Ag85-0114	TTTTTGGGGT <u>CGACTTATTAGCCGGCGCCTAAC</u> ( <i>fbpB</i> )	Sall	51 / 66
pRT2Rev	GAGAAGCAGGAGGAGAAGCA ( <i>hly-OVA</i> )	-	54
pRT2Fw	CGTCCATCTATTGCCTGGT ( <i>hly-OVA</i> )	-	52

Tabela 3.7. Startery do sekwencjonowania

Nazwa	Sekwencja nukleotydowa (5' - 3')	Temp. topnienia [°C]
C-term-OVA	CATATGGGCCTCACCTG	50
pL1.2GFP	TTCGAAAACTTAGAAAAGGCGAAGAAGCTG	58
pL3.2GFP	GTTGCGTTTCTCCTAGAAAAGGCGAAGAAGCTG	63
pR1.1GFP	CTTCGCCTTTTCTAAGTTTTTCGAAGTTGATG	59
pR3.1GFP	TTCGCCTTTTCTAGGAGAAACGCAACGG	61
Saft-ble	CCGACAACAATTTGATTAGC	48
Saft-hly	GGCACCACGCTTTATCCGA	53
Saft-MCS	GAAAGGTACCGAGCACTG	50
Sin-ColEI	AAGGGAGAAAGGCGGACAGG	56
Sin-hly	ACAACGCAGTAAATACATTAGTGGA	53
SinL	CGCTCTGGAAGTGAACCTTG	54
SinP	GCCGAAAGATTCGAGCTTGG	54
SP6	ATTTAGGTGACACTATAG	41
SP-hly	GATCGCAGATCCTAGGC	50
Sup-kan	GAGAGCACCGTTCTTATTCG	52
T7	TAATACGACTCACTATAGG	45

### 3.6. Podłoża i dodatki do podłoży

#### Podłoża do hodowli bakteryjnych

##### Podłoże LB (Miller)

skład: baktotrypton – 10 g/l, ekstrakt drożdżowy - 5 g/l, NaCl - 10 g/l; pH 7,0; płynne półpłynne: zestalone 0,4% (w/v) agarem

stałe: zestalone 1,5% (w/v) agarem (podłoże LA)

### **Podłoże BHI (Brain-Heart Infusion)**

skład: wyciąg mózgowo-sercowy – 8 g/l, pepton - 27,5 g/l, glukoza - 2 g/l, NaCl - 5 g/l, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> - 2,5 g/l; pH 7,4; płynne

stałe: zestalone 1,5% (w/v) agarem

### **Podłoże minimalne Spizizen'a (SMM)**

skład: (w/v): K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 3%, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1%, NH<sub>4</sub>Cl 0,5%, NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> 0,1%, Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,1%, MgSO<sub>4</sub> x 7 H<sub>2</sub>O 0,01%, MnSO<sub>4</sub> x 4 H<sub>2</sub>O 0,001%, FeSO<sub>4</sub> x 7 H<sub>2</sub>O 0,001%, CaCl<sub>2</sub> 0,0005%; pH 7,2

- suplementowane tryptofanem – stężenie końcowe 2 mg/ml

### **Dodatki do podłoży do hodowli bakteryjnych**

W zależności od potrzeb, pożywki hodowlane uzupełniano:

- IPTG (izopropyl-β-tiogalaktopiranozyd) – stężenie końcowe 1 mM
- antybiotykami do odpowiedniego stężenia końcowego:
  - ampicylina – 100 µg/ml
  - kanamycyna – 30 µg/ml w hodowlach *E. coli* i 10 µg/ml w hodowlach *B. subtilis*
  - bleomycyna – 3,2 µg/ml

### **Podłoża do hodowli komórkowych**

**Pełna pożywka RPMI-1640** (22400, Life Technologies) suplementowana:

- płodową surowicą bydlęcą (FBS) – stężenie końcowe 10%
- pirogronianem sodu – stężenie końcowe 1 mM
- penicyliną – stężenie końcowe 100 U/ml
- streptomycyną – stężenie końcowe 100 µg/ml

### **Dodatki do podłoży do hodowli komórkowych**

W zależności od potrzeb, pożywki hodowlane uzupełniano:

- IPTG (izopropyl-β-tiogalaktopiranozyd) – stężenie końcowe 10 mM
- interferonem-γ (INF-γ) – stężenie końcowe 20 – 40 mg/ml
- GM-CSF – stężenie końcowe 5 ng/ml

### **Podłoże do mrożenia**

skład: pełna pożywka RPMI-1640 suplementowana FBS, pirogronianem sodu, penicyliną i streptomycyną uzupełniona dimetylosulfotlenkiem (DMSO) do końcowego stężenia 10% (v/v)

### 3.7. Roztwory i bufony

#### **Bufor PBS**

137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM bufor fosforanowy; pH 7,4

#### **Bufor TM**

10 mM Tris-HCl, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, pH 7,5

#### **Roztwór soli fizjologicznej**

0,9% (w/v) NaCl

#### **Roztwór do zamrażania hodowli bakteryjnych**

20% glicerol (v/v) w pożywce BHI

#### **Bufory i roztwory do elektroforezy DNA w żelach agarozowych**

**bufor TBE:** 89 mM Tris, 89 mM kw. borowy, 2 mM EDTA

**żel agarozowy:** 0,8 – 1,5% (w/v) agaroz w buforze TBE

**bufor obciążający do prób Loading Buffer (6x stężony):** 0,25% (w/v) błękit bromofenolowy, 30% (v/v) glicerol

**roztwór do barwienia DNA:** bromek etydyny - 0,5 µg/ml

#### **Bufor SET**

25% (w/v) sacharoza, 50 mM EDTA, 50 mM Tris pH 8,0, 5mg/ml lizozymu

#### **Bufor SSC**

150 mM NaCl, 15 mM cytrynian sodu

### **Bufor lizujący dla *L. monocytogenes***

10 mM Tris pH 7,0, 20% (w/v) sacharoza, lizozym 2,5 mg/ml

### **Roztwory do przygotowywania komórek chemokompetentnych *E. coli***

**roztwór T 1:** 10 mM MOPS pH 7,0, 10 mM RbCl

**roztwór T 2:** 100 mM MOPS pH 6,5, 50 mM CaCl<sub>2</sub>, 10 mM RbCl

### **Roztwory do transformacji *B. subtilis***

**SMM:** 0,2% (w/v) NH<sub>4</sub>SO<sub>4</sub>, 1,4% (w/v) K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,6% (w/v) KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,1% (w/v) cytrynian sodu dwuwodny, 0,02% (w/v) MgSO<sub>4</sub> x 7H<sub>2</sub>O

<b>Sp I:</b>	SMM	10 ml
	40% glukoza (w/v)	0,125 ml
	1 M MgSO <sub>4</sub>	0,06 ml
	20% Casamino Acids	0,01 ml
	0,22% cytrynian amonu żelaza (III)	0,005 ml
<b>Sp II:</b>	SMM	10 ml
	40% glukoza (w/v)	0,125 ml
	1 M MgSO <sub>4</sub>	0,06 ml

Podłoża Sp I i Sp II suplementowano tryptofanem do uzyskania stężenia końcowego 50 µg/ml.

## **3.8. Bufory i roztwory do analizy białek**

### **Bufor Laemmli'ego**

50 mM Tris-HCl pH 6.8, 2% (v/v) SDS, 10% (v/v) glicerol, 1% (v/v) β-merkaptioetanol, 12,5 mM EDTA, 0.02% (w/v) błękit bromofenolowy

### **Bufory do oczyszczania białek z metryczką 6xHis**

#### **Bufor kolumnowy**

50 mM Tris-HCl pH 8, 300 mM NaCl, 50 mM imidazol

#### **Bufor do elucji**

50 mM MES pH 6, 300 mM NaCl, 0,5 M imidazol; pH=6

**Bufor magazynowy (do dializy)**

50 mM MES, 300 mM NaCl; pH=6

**Bufor do przechowywania białka**

15% glicerol, 5 mM cysteina, 1 mM AEBF, 10 mM EDTA w buforze magazynowym; pH 5,5

**Bufory i roztwory do elektroforezy białek w żelu SDS-PAGE****Żele poliakrylamidowe****Tabela 3.8.** Skład żeli poliakrylamidowych

	Rozdzielający (10 ml)			Zagęszczający (5 ml)
	10%	12%	15%	4%
H <sub>2</sub> O	4,0	3,3	2,3	3,4
30% akrylamid	3,3	4,0	5,0	0,83
1,5 M Tris pH 8,8	2,5	2,5	2,5	-
1 M Tris pH 6,8	-	-	-	0,63
10% SDS	0,1	0,1	0,1	0,05
10% APS	0,1	0,1	0,1	0,05
TEMED	0,004	0,004	0,004	0,005

**Bufor SDS-PAGE**

250 mM Tris, 1,92 M glicyna, 1% SDS; pH 8,3

**Żele tricinowe****Tabela 3.9.** Skład żeli tricinowych

	Rozdzielający (7 ml)			Zagęszczający (2 ml)
	10%	12%	15%	4%
H <sub>2</sub> O	2,5	2,2	1,8	1,33
akrylamid mix	1,4	1,7	2,1	0,16
bufor do żelu	2,3	2,3	2,3	0,50
glicerol	0,8	0,8	0,8	-
10% APS	0,03	0,03	0,03	0,01
TEMED	0,01	0,01	0,01	0,005

**Bufory do żeli tricinowych****Bufor do żelu:** 3 M Tris-NH<sub>3</sub>, 0,3% (w/v) SDS; pH 8,45**Akrylamid mix:** akrylamid - 48% (w/v), bisakrylamid - 1,5% (w/v) - 49,5%T, 3% C**Bufor anodowy:** 0,2 M Tris-NH<sub>3</sub>, pH 8,9**Bufor katodowy:** 0,1 M Tricina, 0,1 M Tris-NH<sub>3</sub>, 0,1% (w/v) SDS, pH 8,25

## **Bufory do barwienia żeli białkowych**

### **Bufor barwiący**

0,1% (w/v) Coomassie Blue R-250, 20% (v/v) metanol, 10% (v/v) kw. octowy

### **Bufor odbarwiający**

50% (v/v) metanol, 10% (v/v) kw. octowy

## **Bufor do transferu białek na membranę nitrocelulozową**

25 mM Tris-HCl, 192 mM glicyna, 20% metanol; pH 8,3

## **Bufory do immunodetekcji metodą Western-blot**

### **Bufor TBS**

50 mM Tris-HCl pH 7,6, 150 mM NaCl

### **Bufor TBS-T**

1 ml/l Tween-20 w buforze TBS

### **Bufor TBS-T z 5% mlekiem**

5% odtłuszczone mleko krowie (w/v) w buforze TBS-T

### **Substrat dla alkalicznej fosfatazy**

0,42 g/l błękit nitrotetrazolowy (NBT), 0,21 g/l 5-bromo-4-chloro-3-indolilofosforan (BCIP) w 0,1 M roztworze 2-amino-2-metylopropanolu (AMP)

## **Roztwory stosowane przy infekcji komórek eukariotycznych bakteriami**

1% (w/v) Triton X-100

### **Bufor ACK do izolacji splenocytów**

155 mM NH<sub>4</sub>Cl, 10 mM KHCO<sub>3</sub>, 37 mg/l EDTA

## **Bufory do wykrywania przeciwciał IgG metodą ELISA**

### **PBS-T**

1 ml/l Tween-20 w buforze PBS

**Bufor blokujący do ELISA**

1% BSA (w/v) w buforze PBS-T

**bufor węglanowy pH 9,5**29 mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 71 mM NaHCO<sub>3</sub>, pH 9,5**bufor dla peroksydazy chrzanowej (fosforanowo – cytrynianowy)**51 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 24 mM kw. cytrynowy, pH 5 (bezpośrednio przed użyciem na każde 100 ml buforu dodawano 40 µl 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)**kwasy cytrynowy**

1 M kw. cytrynowy

**3.9. Specyficzne odczynniki, materiały i przeciwciała****Tabela 3.10.** Spis wykorzystanych odczynników chemicznych

Odczynnik	Producent
AEBSF, inhibitor proteaz	Sigma Aldrich, USA
Ag85B białko	Abcam, Wielka Brytania
agar	BioShop, Kanada
agarozą	BioShop, Kanada
akrylamid	Merck, Niemcy
akrylamid/bis-akrylamid 30%	Sigma Aldrich, USA
ampicylina	Sigma Aldrich, USA
APS (nadsiarżan amonu)	BioShop, Kanada
azotan amonu, NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	Sigma Aldrich, USA
azydek sodu	Sigma Aldrich, USA
bisakrylamid	Merck, Niemcy
bleomycyna (bleocyna / phleocyna)	Calbiochem, USA
błękit bromofenolowy	Sigma Aldrich, USA
błękit brylantyny Coomassie Blue R-250	Sigma Aldrich, USA
błękit trypanu 0,4%	Sigma Aldrich, USA
Bradford Reagent	Thermo Scientific, USA
bromek etydyny	Sigma Aldrich, USA
Casamino acids	Difco, USA
CellWash	BD Biosciences, USA
CFSE (ester fluoresceiny)	Sigma Aldrich, USA
chlerek amonu, NH <sub>4</sub> Cl	POCh, Polska
chlerek magnezu, MgCl <sub>2</sub>	Calbiochem, USA
chlerek rubidu, RbCl	Merck, Niemcy
chlerek sodu, NaCl	BioShop, Kanada
chlerek wapnia, CaCl <sub>2</sub>	Calbiochem, USA
chloroform	POCh, Polska
cysteina	Merck, Niemcy
cytrynian amonu żelaza (III)	Loba Chemie, Indie

cytrynian sodu dwuwodny	Merck, Niemcy
deoksurybonukleaza I (DNaza I)	A&A Biotechnology, Polska
DEPC (pirowęglan dietylu)	Sigma Aldrich, USA
D-głukoza	BioShop, Kanada
diwodorofosforan potasu, $\text{KH}_2\text{PO}_4$	Calbiochem, USA
DMSO	BioShop, Kanada
dNTP	Thermo Scientific, , USA
EDTA (wersenian disodu)	Sigma Aldrich, USA
enzymy restrykcyjne	Thermo Scientific, USA
etanol	POCh, Polska
fragment Klenowa polimerazy I DNA	Boehringer Mannheim, Niemcy
gentamycyna	Sigma Aldrich, USA
glicerol	BioShop, Kanada
glicyna	BioShop, Kanada
GM-CSF (czynnik stymulujący rozwój granulocytów i makrofagów)	Life Technologies, USA
imidazol	Merck, Niemcy
interferon- $\gamma$ , INF- $\gamma$ (zrekombinowany, myszy)	PeproTech, Wlk. Brytania
IPTG (izopropyl- $\beta$ -D-1-tiogalaktopiranozyd)	BioShop, Kanada
izopropanol	Merck, Niemcy
kanamycyna	Boehringer Mannheim
konkanawalina A	Sigma Aldrich, USA
krew końska odwłókniona	Pro Animal, Polska
kwask borowy	Sigma Aldrich, USA
kwask cytrynowy	POCh, Polska
kwask octowy	Merck, Niemcy
kwask trichlorooctowy, TCA	Acros Organics, Belgia
ligaza faga T4	Thermo Scientific, USA
lizozym	Merck, Niemcy
Loading Buffer 6x	Thermo Scientific, USA
L-tryptofan	Roanal, Węgry
marker białkowy PageRuler Plus Prestained Protein Ladder	Thermo Scientific, USA
marker białkowy PageRuler Prestained	Life Technologies, USA
marker białkowy Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder	Thermo Scientific, USA
marker DNA GeneRuler 1 kb DNA Ladder	Thermo Scientific, USA
MES (kwask 2-(N-morfolino)-etanosulfonowy)	BioShop, Kanada
metanol	Merck, Niemcy
mleko odtłuszczone krowie	Mlekovita, Polska
MOPS	Calbiochem, USA
nadtlenek wodoru, perhydrol, $\text{H}_2\text{O}_2$	POCh, Polska
NBT/BCIP (substrat dla alkalicznej fosfatazy)	BioShop, Kanada
odczynnik Bradford	Thermo Scientific, USA
OPD (o-fenylendiamina)	Sigma Aldrich, USA
owoalbumina jaja kurzego, białko (OVA)	Sigma Aldrich, USA
PBS	BioShop, Kanada
penicylina-streptomycyna (100x stężona)	Life Technologies, USA
pirogronian sodu	Life Technologies, USA
podłoże BHI	BD Biosciences, USA



podłoże LB (Miller)	BioShop, Kanada
podłoże RPMI-1640 z HEPES	Life Technologies, USA
polimeraza DNA faga T4	EURx, Polska
sacharoza	Merck, Niemcy
SDS (dodecylosiarczan sodu)	Merck, Niemcy
siarczan amonu, $\text{NH}_4\text{SO}_4$	Merck, Niemcy
siarczan magnezu uwodniony, $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	Merck, Niemcy
siarczan manganu uwodniony, $\text{MnSO}_4 \times 4\text{H}_2\text{O}$	Sigma Aldrich, USA
siarczan sodu, $\text{Na}_2\text{SO}_4$	Sigma Aldrich, USA
siarczan żelaza (II) uwodniony, $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	Sigma Aldrich, USA
SIINFEKL peptyd	www.peptydy.pl, Polska
spektynomycyna	Calbiochem, USA
surowica płodowa bydlęca termicznie inaktywowana, FBS	Life Technologies
TBE	BioShop, Kanada
TEMED (N,N,N',N'-tetrametyloetylenodiamina)	Sigma Aldrich, USA
Tricina	Sigma Aldrich, USA
Tris-base (Tris- $\text{NH}_3$ )	BioShop, Kanada
Tris-HCl	Merck, Niemcy
Triton X-100	Sigma Aldrich, USA
TRIzol	Invitrogen, USA
Tween-20	Sigma Aldrich, USA
węglan sodu, $\text{Na}_2\text{CO}_3$	Sigma Aldrich, USA
wodorofosforan dipotasu, $\text{K}_2\text{HPO}_4$	BioShop, Kanada
wodorofosforan disodu, $\text{Na}_2\text{HPO}_4$	BioShop, Kanada
wodorowęglan potasu, $\text{KHCO}_3$	POCh, Polska
wodorowęglan sodu, $\text{NaHCO}_3$	Reachim, Rosja
$\beta$ -merkaptoetanol	Merck, Niemcy

**Tabela 3.11.** Spis wykorzystanych materiałów

<b>Materiał</b>	<b>Producent</b>
bibuła Whatman	Whatman, USA
filtry strzykawkowe nitrocelulozowe	VWR, USA
hemocytometr Neubauer Improved	Carl Roth, Niemcy
kolumny dializacyjne D-Tube Dialyzer Maxi (6-8 kDa)	Novagen, Niemcy
kolumny nikielowe do izolacji białka ze znacznikiem 6xHis (His-Bind Ni Column)	Novagen, Niemcy
membrana nitrocelulozowa	Amersham Pharmacia, Szwecja
membrana PVDF	BIO-RAD, USA
płytki do ELISA (Nunc-Immuno™ MicroWell™ 96 well solid plates)	Sigma Aldrich
płytki do zliczania komórek AccuChip	Nano EnTeK Inc., Korea
płytki ELISpot (2 Pre-coated BD™ ELISPOT plates)	BD Biosciences, USA
sitka filtracyjne nylonowe	BD Biosciences, USA
strzykawki insulinowe z igłą 29-G	BD Biosciences, USA

**Tabela 3.12.** Spis wykorzystanych przeciwciał

<b>Przeciwciało</b>	<b>Producent</b>
chomicze monoklonalne anty-CD28	BD Biosciences, USA
chomicze monoklonalne anty-CD3e	BD Biosciences, USA
koźłące anty-mysie IgG skoniugowane z HRP	Sigma Aldrich, USA
koźłące poliklonalne anty-królicze IgG skoniugowane z AP	Abcam, Wlk. Brytania
królicze poliklonalne anty-Ag85B	Abcam, Wlk. Brytania
królicze poliklonalne anty-LLO	Abcam, Wlk. Brytania
królicze poliklonalne anty-OVA	Abcam, Wlk. Brytania
mysie monoklonalne anty-H-2Kb-SIINFEKL(25-D1.16) skoniugowane z APC	eBioscience, USA
mysie monoklonalne anty-mysie MHC I skoniugowane z PE	BD Biosciences, USA
mysie monoklonalne IgG1 $\kappa$ skoniugowane z APC (kontrola izotypowa)	eBioscience, USA
szczurze monoklonalne anty-mysie CD4 skoniugowane z APC	BD Biosciences, USA
szczurze monoklonalne anty-mysie CD8a skoniugowane z PE	BD Biosciences, USA

**Tabela 3.13.** Spis wykorzystanych zestawów odczynników

<b>Zestaw</b>	<b>Producent</b>
zestaw deoksyrybonukleazy I (DNazy I)	EURx, Polska
zestaw do ELISpot „Mouse IFN- $\gamma$ ELISPOT Kit”	BD Biosciences, USA
zestaw do izolacji fragmentów DNA z żelów agarozowych „Gel out”	A&A Biotechnology, Polska
zestaw do izolacji plazmidowego DNA „Plasmid Midi AX”	A&A Biotechnology, Polska
zestaw do izolacji plazmidowego DNA „Plasmid Mini”	A&A Biotechnology, Polska
zestaw do oczyszczania fragmentów DNA „Clean up”	A&A Biotechnology, Polska
zestaw do oznaczania żywotności komórek ssaczych „LIVE/DEAD Viability/Cytotoxicity Kit, for mammalian cells”	Life Technologies, USA
zestaw do PCR „DreamTaq Green PCR Master Mix (2X)”	Thermo Scientific, USA
zestaw do PCR „Pfu Polymerase”	Thermo Scientific, USA
zestaw do PCR „Phusion High-Fidelity DNA Polymerase”	Thermo Scientific, USA
zestaw do PCR „TopTaq Master Mix Kit”	QIAGEN, Holandia
zestaw do RT-PCR „OneStep RT-PCR kit”	EURx, Polska
zestaw do transfekcji „PULSin”	Polyplus, Francja
zestaw do zliczania komórek i określania ich żywotności „ADAM AccuChip Kit”	Nano EnTeK Inc., Korea

---

## 4. Metody

---

Prezentowane eksperymenty wykonano w oparciu o metody stosowane w Zakładzie Mikrobiologii Stosowanej Instytutu Mikrobiologii UW, Zakładzie Immunologii Instytutu Zoologii UW i w Zakładzie Bakteriologii Molekularnej GUMed.

### 4.1. Hodowla szczepów bakteryjnych, pomiar CFU, przechowywanie

Szczepy *E. coli* hodowano na podłożu stałym LA lub w podłożu płynnym LB z wytrząsaniem 120 RPM w warunkach tlenowych w temperaturze 37°C przez noc lub do osiągnięcia określonej fazy wzrostu. Podłoża selekcyjne uzupełniano odpowiednimi antybiotykami.

Szczepy *B. subtilis* hodowano na podłożu stałym LA lub w podłożu płynnym LB w warunkach tlenowych z w temperaturze 30°C z wytrząsaniem 120 RPM. Hodowle nocne prowadzono przez 18 godzin, natomiast ich odmładzanie trwało do uzyskania odpowiedniej gęstości optycznej. Podłoża selekcyjne uzupełniano odpowiednimi antybiotykami.

Szczepy *L. monocytogenes* hodowano na podłożu płynnym BHI w warunkach tlenowych w temperaturze 37°C z wytrząsaniem 120 RPM przez czas 18 h.

Indukcję ekspresji genów będących pod kontrolą fakultatywnych promotorów przeprowadzano poprzez dodatek do hodowli IPTG do uzyskania stężenia końcowego 1 mM. Indukcję wykonywano w różnych momentach hodowli w zależności od przeprowadzanego eksperymentu. W testach, w których analizowano produkcję białka, cytotoksyczność, inwazyjność lub dostarczanie antygeny, szczepy produkujące dany antygen były hodowane do OD<sub>600</sub> równej 1,5. Bakterie z odmłodzonych hodowli były zbierane poprzez wirowanie, dwukrotnie przepłukiwane PBS pH 7,4 lub buforem TM i rozcieńczane do osiągnięcia odpowiedniego stężenia komórek w zawiesinie. Pomiar CFU następował poprzez seryjne rozcieńczenia bakterii w 0,9% NaCl i wysiew na płytce z agarem odżywczym (LA).

Wszystkie szczepy bakteryjne przechowywano w -70°C w roztworze do zamrażania hodowli bakteryjnych.

### 4.2. Analiza kwasów nukleinowych

#### Izolacja DNA plazmidowego

DNA plazmidowy izolowano za pomocą zestawów „Plasmid Mini” i „Plasmid Midi AX” zgodnie z instrukcją załączoną przez producenta.

#### Izolacja DNA chromosomalnego

DNA chromosomalne izolowano za pomocą zestawu „Genomic Mini”. Instrukcję załączoną przez producenta poddano modyfikacji, gdyż do efektywnej izolacji konieczne było uprzednie zastosowanie procedury naruszania osłon komórkowych bakterii gramdodatnich. W przypadku izolacji chromosomu *B. subtilis*, osad z 1,5 ml hodowli nocnej zawieszano

w 100 µl buforu SET i inkubowano przez 30 min w temp. 37°C. Pomijano etap zawieszania osadu bakteryjnego w buforze Tris będącym składnikiem zestawu i przechodzono do punktu 1 protokołu izolacji DNA.

Również DNA chromosomalne *L. monocytogenes* izolowano wykorzystując zmodyfikowany protokół zestawu „Genomic Mini”. Osad z 1,5 ml hodowli przepłukiwano 1 ml buforu 0,1 x SSC, a następnie zawieszano w buforze lizującym dla *L. monocytogenes*. Po godzinnej inkubacji w temperaturze 37°C i zwirowaniu prób przy 6000 RPM (5 min) w wirówce MiniSpin Plus (Eppendorf), przechodzono do punktu 1 instrukcji zestawu.

### **Amplifikacja DNA w reakcjach PCR**

Reakcje łańcuchowe polimerazy DNA (PCR) przeprowadzono w aparacie Labcycler (Sensoquest, Niemcy) przy użyciu zestawów odczynników: „TopTaq Master Mix Kit”, „TopTaq DNA Polymerase”, „DreamTaq Green PCR Master Mix (2X)”, „Phusion High-Fidelity DNA Polymerase” lub „Pfu Polymerase” zgodnie z instrukcjami załączonymi przez producentów. Mieszanina reakcyjna (50 µl) standardowej reakcji PCR zawierała: matrycę (DNA chromosomowy lub plazmidowy – 50 ng), startery (stężenie końcowe 1 pmol/µl (**tabela 3.6**), mieszaninę dNTP (końcowe stężenie 0,4 mM), odpowiednią polimerazę (1u), bufor do polimerazy (1x stężony) oraz 2 mM MgCl<sub>2</sub>, a całość uzupełniano dejonizowaną wodą. Reakcja PCR składała się z następujących etapów: wstępnej denaturacji DNA matrycowego (30 s – 5 min w temp. 94-98°C), 34 cykli następujących po sobie: denaturacja DNA (30 s w temp. 94°C lub 10 s w temp. 98°C dla polimerazy Phusion), przyłączanie się starterów do matrycy (10-30 s w temp 48-65°C), elongacja produktu (w temp. 72°C; 1min/kb dla polimeraz Taq, 2 min/kb dla polimeraz Pfu oraz 30 s/kb dla polimerazy Phusion); końcowa elongacja (10 min w temp. 72°C). Produkty reakcji PCR rozdzielano w żelu agarozowym.

**PCR kolonijny** przeprowadzono w celu identyfikacji rekombinowanych plazmidów zawierających określony fragment DNA. Niewielką ilość materiału bakteryjnego zawieszano w 100 µl dejonizowanej, jałowej wody. Intensywnie mieszano i gotowano przez 10 min w 100°C. Przekładano próbkę do lodu na 1 min, a następnie wirowano 5 min przy 14 000 RPM w wirówce MiniSpin Plus (Eppendorf, Niemcy)). Supernatant będący matrycą do reakcji PCR stanowił 10% objętości mieszaniny reakcyjnej, przygotowanej jak opisano wyżej.

### **Trawienie enzymami restrykcyjnymi, modyfikacja końców, ligacja DNA**

Trawienie DNA enzymami restrykcyjnymi, wypełnianie „lepkich” końców z użyciem fragmentu Klenowa polimerazy I DNA lub polimerazy faga T4 oraz ligację fragmentów DNA przy użyciu ligazy DNA bakteriofaga T4 przeprowadzono zgodnie z instrukcjami załączonymi przez producenta. W zależności od potrzeb eksperymentu DNA po obróbce enzymatycznej poddawano elektroforezie w żelu agarozowym lub oczyszczano wykorzystując zestaw „Clean-up”.

### **Elektroforeza w żelach agarozowych**

Elektroforezę DNA prowadzono w żelach agarozowych w buforze TBE w temp. pokojowej przy stałym napięciu 100 V. Zwyczajowo stosowano żele o zawartości agarozy

wynoszącej 0,8%, jednak dla uwidocznienia małych fragmentów przygotowywano 1,5% żele. Jako obciążnik prób i wskaźnik szybkości migracji DNA stosowano roztwór błękitu bromofenolowego z glicerolem. Żele barwiono wodnym roztworem bromku etydydy. DNA wizualizowano w transiluminatorze ImageMaster VDS (Amersham Pharmacia Biotech, USA) w świetle UV o długości fali 300 nm.

### **Izolacja fragmentów DNA z żelu agarozowego**

Fragmenty restrykcyjne DNA uzyskane po trawieniu DNA plazmidowego lub fragmenty DNA namnożone metodą PCR rozdzielano w żelu agarozowym w buforze TBE. Po wycięciu bloczku agarozowego zawierającego odpowiedni fragment DNA z żelu, przeprowadzano izolację DNA za pomocą zestawu „Gel-out” zgodnie z instrukcją załączoną przez producenta.

### **Sekwencjonowanie DNA**

DNA plazmidowy lub produkty PCR przeznaczone do sekwencjonowania oczyszczano za pomocą zestawu „Plasmid Mini” lub „Clean-up” i zawieszano w wodzie dejonizowanej. Odpowiednie startery do reakcji sekwencjonowania dostarczano w stężeniu 5 pmol/ $\mu$ l. Analizy przeprowadzała firma Genomed (Polska).

### **Izolacja totalnego RNA z komórek bakteryjnych**

Osad bakteryjny pochodzący z 10 ml nocnej hodowli *B. subtilis* prowadzonej w podłożu LB, zawieszano w 500  $\mu$ l buforu SET i inkubowano przez 30 min. Do każdej próby dodawano następnie 0,8 g szklanych kulek wielkości 400  $\mu$ m i wytrząsano przez 3 min przy 2 000 RPM. Próby zwirowywano przy 8 000 RPM (3 min) w wirówce MiniSpin Plus (Eppendorf, Niemcy), po czym zbierano 500  $\mu$ l supernatantu i dodawano do niego 1 ml odczynnika TRIzol. Po 5 min w temp. pokojowej, do prób dodawano 200  $\mu$ l chloroformu, intensywnie mieszano i kontynuowano inkubację w temp. pokojowej przez 15 min. Następnie preparat wirowano przez 15 min przy 12 000 RPM w temp. 4°C w wirówce Micro22R (Hettich, Niemcy). Górną fazę (wodną) przenoszono do nowej probówki, dodawano 500  $\mu$ l izopropanolu i inkubowano przez 10 min w temp. pokojowej. Preparat ponownie wirowano przez 8 min w 12 000 RPM w temp. 4°C. Osad RNA przemywano 1 ml 70% etanolu, suszono, zawieszano w 25  $\mu$ l wody traktowanej DEPC i inkubowano przez 10 min w temp. 60°C. Następnie próby RNA traktowano DNazą w celu usunięcia zanieczyszczeń DNA przez czas 2 h w temperaturze 37°C. Skład mieszaniny reakcyjnej oraz przebieg reakcji był zgodny z instrukcją producenta. Po reakcji enzym inaktywowano poprzez ogrzewanie przez 10 min w temp. 75°C. Próby przechowywano do dalszych analiz w temp. -70°C.

### **RT-PCR**

Reakcje RT-PCR (reverse transcriptase PCR) przeprowadzano w aparacie Labcycler (Sensoquest, Niemcy) przy użyciu zestawu odczynników: „OneStep RT-PCR kit”. W pierwszym etapie mieszaninę oczyszczonego DNazą RNA (0,2  $\mu$ g), dNTP i startera (10 pmol) uzupełniano wodą traktowaną DEPC do objętości 20  $\mu$ l i inkubowano stosując

następujący profil temp.: 5 min w temp. 65°C, 1 min w temp. 4°C. W kolejnym etapie do mieszaniny reakcyjnej dodawano 5 x stężony bufor do odwrotnej transkrypcji, inhibitor RNazy, DTT i odwrotną transkryptazę dART i inkubowano stosując następujący profil temp.: 2 min w 70°C, po 1 min w spadającej o 5 stopni temp. między 65 a 40°C, 50 min w temp. 42°C; 5 cykli (1 min w temp. 50°C, 1 min w temp. 53°C, 1 min w temp. 56°C); 5 min w temp. 85°C. Zastosowanie powyższych warunków zapobiegało przedwczesnej terminacji reakcji odwrotnej transkrypcji. Dodatkowo otrzymany w ten sposób cDNA nie wymagał traktowania mieszaniną RNaz w celu usunięcia matrycowego RNA, gdyż używana odwrotna transkryptaza posiadała aktywność RNazy H. Następnie otrzymany w reakcji odwrotnej transkrypcji cDNA wykorzystywano jako matrycę w reakcji PCR (25-30 cykli; w mieszaninie reakcyjnej cDNA stanowiło maksymalnie 10% końcowej objętości). Ostatecznie produkty amplifikacji rozdzielano w żelu agarozowym.

### 4.3. Wprowadzanie DNA do komórek bakteryjnych

#### Transformacja komórek *E. coli* metodą rubidowo-wapniową

##### **Przygotowanie komórek chemokompetentnych**

Bakteriami z nocnej hodowli *E. coli* zaszczepiano świeże podłoże LB do uzyskania OD<sub>600</sub> równej 0,05 i inkubowano z wytrząsaniem 120 RPM w 37°C do osiągnięcia OD<sub>600</sub> równej 0,4. Hodowle wirowano przez 5 min w temp. 4°C przy 8 000 RPM w wirówce Micro22R (Hettich, Niemcy). Osad delikatnie zawieszano w 1 ml zimnego roztworu do transformacji T 1. Ponownie wirowano przez 5 min w tych samych warunkach. Osad delikatnie zawieszano w 0,2 ml schłodzonego roztworu do transformacji T 2. Do każdej próby dodawano 7 µl DMSO i inkubowano w lodzie przez 15 min (krok ten powtarzano dwukrotnie). Uzyskane komórki chemokompetentne przechowywano w temp. -70°C.

##### **Transformacja**

Do 200 µl rozmrożonych w lodzie komórek chemokompetentnych dodawano DNA plazmidowy lub mieszaninę ligacyjną (100 ng) i inkubowano przez 15 min w lodzie. Następnie komórki poddawano szokowi cieplnemu w 44°C przez 50 s, po czym przekładano próbkę z powrotem do lodu na 1 min, a następnie do mieszaniny dodawano 1 ml płynnego podłoża LB. Inkubowano przez 60 min w temp. 37°C bez wytrząsania. Bakterie wysiewano na podłoże stałe LA uzupełnione odpowiednimi antybiotykami selekcyjnymi.

#### Transformacja komórek *B. subtilis* (Young i Spizizen, 1961)

Nocną hodowlę *B. subtilis* prowadzono w 10 ml podłoża Sp I przez czas 18 h. 10 ml świeżego podłoża Sp I zaszczepiano 600 µl hodowli nocnej i inkubowano przez 3 h w temperaturze 37°C przy 120 RPM. Do odmłodzonej hodowli dodawano następnie 10 ml ogrzanego do temp. 37°C podłoża Sp II i wytrząsano ją przez następne 2 h. Kolejno, do próbek typu eppendorf pobierano po 400 µl hodowli i dodawano do nich 1 µg DNA plazmidowego. Kontrolę negatywną transformacji stanowiły komórki bakteryjne bez dodatku DNA, natomiast kontrolę pozytywną – komórki *B. subtilis* inkubowane z nieintegrującym do

chromosomu plazmidem pUB110. Bakterie inkubowano przez czas 3 h w temp. 37°C z wytrząsaniem 120 RPM, po czym wysiewano na podłoże selekcyjne LA uzupełnione odpowiednimi antybiotykami.

#### 4.4. Analiza białek

##### **Izolacja białek sekrecyjnych (Antelmann i wsp., 2003)**

Komórkami pochodzącymi z nocnej hodowli *B. subtilis* zaszczipiano świeże podłoże płynne LB lub minimalne podłoże Spizizen'a do uzyskania OD<sub>600</sub> równej 0,05. Bakterie hodowano z wytrząsaniem 120 RPM w temp. 37°C do uzyskania pożądanej gęstości optycznej. Hodowlę zwirowywano w temp. pokojowej przy 8 000 RPM w wirówce Sorvall RC-5B (DuPont, USA). Do supernatantu hodowlanego dodawano 100% TCA do uzyskania 10% stężenia końcowego i inkubowano przez noc w temp. 4°C. Następnie próby wirowano w temp. 4°C w wirówce RC-5B przez czas 45 min. Białkowy osad zdrapywano ze ścianek probówek wirowniczych szpatułką, przenoszono przy użyciu pipety automatycznej do probówek eppendorf i przepłukiwano go trzykrotnie 96% etanolem, po każdym płukaniu odwirowując przez 10 min w temp. 4°C w wirówce Micro22R (Hettich, Niemcy). Przepłukany osad suszono w temp. pokojowej przez 10 min i zawieszano go w wodzie dejonizowanej lub buforze Laemmli'ego.

##### **Nadprodukcja i oczyszczanie LLO**

Oczyszczona listeriolizyna O niosąca metryczkę histydynową (6x His) używana jako kontrola pozytywna w analizach Western-blot została otrzymana w procesie chromatografii powinowactwa na kolumnkach niklowych. Bakterie *E. coli* BP1 pochodzące z hodowli nocnej prowadzonej w podłożu LB odmładzano do OD<sub>600</sub> równej 0,8 - 1,0, dodawano IPTG do stężenia 1 mM i inkubowano dalsze 2-3 h. Hodowlę wirowano przy 8 000 RPM przez 10 min w 4°C, a osad rozpuszczano w 2 ml zimnego buforu kolumnowego. Bakterie poddawano trzykrotnej sonikacji przez 30 s, po czym wirowano przy 14 000 RPM przez 10 min w 4°C. Supernatant rozcieńczano w 5 ml buforu kolumnowego i przepuszczano przez kolumnkę uprzednio zwilżoną tym buforem. Ponownie przepłukiwano kolumnkę buforem kolumnowym, a następnie dokonywano elucji przy użyciu 10 ml buforu do elucji. Frakcje zawierające białko LLO (2 i 3) poddawano dializie w 1 l buforu magazynowego przez czas 3 h w temp. 4°C.

##### **Oznaczanie stężenia białka**

Ilość białka w preparatach białkowych *B. subtilis* oraz w preparacie oczyszczonej LLO określano dzięki zastosowaniu metody Bradford. Wykorzystywano w tym celu Bradford Reagent i postępowano zgodnie z instrukcją załączoną przez producenta. W skrócie, do 1,5 ml odczynnika Bradford dodawano 50 µl badanej próby lub jej odpowiedniego rozcieńczenia. Po dokładnym zmieszaniu składników próby inkubowano przez czas 5 min, po czym mierzono ich absorbancję przy fali długości 595 nm względem ślepej próby zawierającej

wodę zamiast preparatu białkowego. Ilość białka określano względem krzywej sporządzonej na podstawie absorbancji rozcieńczeń białka standardowego - surowiczej albuminy bydlęcej (BSA).

### **Rozdział białek w żelach poliakrylamidowych metodą SDS-PAGE**

Elektroforezę białek prowadzono w zależności od eksperymentu w 10%, 12% lub 15% żelach poliakrylamidowych (4% żel zagęszczający) w aparacie Mini-PROTEAN Tetra Cell (Bio-Rad, USA), w buforze SDS-PAGE, w temp. pokojowej przy stałym napięciu prądu: 100 V w żelu zagęszczającym i 200 V w żelu rozdzielającym. Tempo migracji białek w żelu śledzono dzięki obecności w buforze Laemmli'ego błękitowi bromofenolowemu. Rozdzielone w żelach białka poddawano barwieniu błękitem brylantowym Coomassie lub analizie Western-blot.

### **Rozdział białek w żelach tricinowych metodą SDS-PAGE**

Elektroforezę białek prowadzono w zależności od eksperymentu w 10%, 12% lub 15% żelach tricinowych (4% żel zagęszczający) w aparacie miniVE Vertical Electrophoresis System (Hofer, USA), w buforze katodowym (górnym) i anodowym (dolnym), w temp. pokojowej przy stałym napięciu prądu 100 V w żelu zagęszczającym i rozdzielającym. Tempo migracji białek w żelu śledzono dzięki obecności w buforze Laemmli'ego błękitowi bromofenolowemu. Rozdzielone w żelach białka poddawano barwieniu błękitem brylantowym Coomassie lub analizie Western-blot.

### **Barwienie białek błękitem brylantowym Coomassie (Sambrook i Russell, 2001)**

Żel białkowy umieszczano na 20 min w roztworze błękitu brylantowego Coomassie R-250. Żel odbarwiano poprzez kilkukrotne płukanie w roztworze odbarwiacza.

### **Transfer na membranę nitrocelulozową**

Żel poliakrylamidowy z rozdzielonymi białkami umieszczono w wodzie w celu odpłukania nadmiaru SDS. W kasecie aparatu do transferu Mini Trans-Blot (Bio-Rad, USA) do mokrego transferu układano kolejno nasączone buforem do transferu: gąbkę, 2 warstwy bibuły Whatman, membranę nitrocelulozową, żel poliakrylamidowy, 2 warstwy bibuły Whatman i gąbkę. Elektrotransfer prowadzono przez 1 godz. w temp. pokojowej z chłodzeniem zapewnianym przez zmrożoną część chłodzącą przy stałym natężeniu prądu 350 mA.

### **Western-blot**

Membranę nitrocelulozową po transferze umieszczano na 1 h w buforze do blokowania (TBS-T z 5% mlekiem), po czym membranę przenoszono do świeżej porcji buforu TBS-T z 5% mlekiem zawierającego przeciwciała pierwszorzędowe rozcieńczone 1:1000 (mono- lub poliklonalne królicze przeciwciała skierowane przeciwko określonemu antygenowi) i inkubowano w temp. pokojowej przez 1 h z wytrząsaniem na kołyszce. W celu usunięcia nadmiaru przeciwciał pierwszorzędowych membranę płukano trzy razy w buforze do płukania (TBS-T). Następnie membranę przenoszono do buforu do blokowania (TBS-T



z 5% mlekiem) zawierającego rozcieńczone 1:5000 przeciwciała drugorzędowe (koźłęce przeciwciała skierowane przeciwko króliczym IgG, skoniugowanym z alkaliczną fosfatazą) i inkubowano przez 1 h w temp. pokojowej. Nadmiar przeciwciał drugorzędowych usuwano poprzez trzykrotne płukanie membrany buforem do płukania (TBS-T). Immunopoztywne białka wizualizowano przy użyciu odczynnika NBT/BCIP. Reakcję barwną zatrzymywano poprzez płukanie membrany w wodzie dejonizowanej.

### **Analizy dot-blot**

Bakteriami *B. subtilis* pochodzącymi z nocnej hodowli w podłożu LB zaszczepiano świeże podłoże do uzyskania OD<sub>600</sub> równej 0,1. Bakterie hodowano w 30°C z wytrząsaniem 120 RPM do uzyskania gęstości optycznej 0,8 ( $\lambda = 600$ ). Z każdej analizowanej hodowli pobierano próby o objętości 200  $\mu$ l przeznaczone do pomiaru ilości toksyny w supernatancie. W tym momencie dodawano IPTG do hodowli szczepów fakultatywnie produkujących LLO (czas „0”). W godzinnych odstępach (czasy „1”, „2” i „3”) pobierano kolejne próby hodowli. Następnie, pobrane wirowano je w temp. pokojowej przy 8 000 RPM, a supernatant zbierano do czystych probówek, które do czasu dalszych analiz przechowywano w lodzie.

Seryjne rozcieńczenia preparatu oczyszczonej LLO o znanym stężeniu oraz supernatanty pozyskane z hodowli *B. subtilis* nanoszono w objętości 2  $\mu$ l na membranę nitrocelulozową. Membranę suszono w temp. pokojowej przez 20 min, a następnie blokowano w buforze do blokowania (TBS-T z 5% mlekiem) przez noc w temp. 4°C. Następnie membranę znakowano przez 1 h króliczym przeciwciałem I-rzędowym skierowanym przeciwko LLO, rozcieńczonym 1:1000 w buforze TBS-T z 5% mlekiem. Po dwukrotnym płukaniu membrany w buforze TBS-T w celu usunięcia przeciwciał, membranę inkubowano przez czas 1 h w temp. pokojowej z kozim, sprzężonym z alkaliczną fosfatazą przeciwciałem II-rzędowym rozpoznającym królicze IgG w buforze TBS-T z 5% mlekiem (1:5000). Po dwukrotnym płukaniu buforem TBS-T, membranę suszono i wywoływano przy pomocy odczynnika NBT/BCIP. Reakcję zatrzymywano przez płukanie membrany wodą dejonizowaną. Wyznakowaną membranę skanowano, a uzyskany obraz analizowano przy pomocy oprogramowania ImageJ (National Institute of Health, USA).

## **4.5. Hodowla komórek eukariotycznych**

### **Warunki hodowli**

Komórki eukariotyczne linii IC-21 oraz JAWS II kultywowano w hodowli ciągłej, stacjonarnej w szalkach 100 mm lub butelkach do hodowli tkankowych (Sarstedt, Niemcy) w inkubatorze IG150 (Jouan, Hiszpania) w atmosferze zawierającej 5% CO<sub>2</sub> i w temperaturze 37°C do momentu uzyskania przez hodowlę 80% konfluencji. Komórki hodowano w podłożu RPMI-1640 suplementowanym 10% FBS, 1mM pirogronianem sodu, penicyliną 100 U/ml i streptomycyną 100  $\mu$ g/ml. Pożywkę dla komórek dendrytycznych JAWS II uzupełniano GM-CSF do końcowego stężenia 5 ng/ml. W eksperymentach dotyczących analizy prezentacji antygeny OVA na komórkach dendrytycznych, hodowle suplementowano mysim INF- $\gamma$  (w stężeniu 20 lub 40 ng/ml).

Pasażowanie komórek eukariotycznych odbywało się poprzez ich odklejenie od porastanej powierzchni w buforze PBS pH 7,4. Odklejone komórki przenoszono do probówek Falcon i wirowano w wirówce 5804R (Eppendorf, Niemcy) w temp. 4°C przez 8 min przy 1 600 RPM. Osad zawieszano w świeżym podłożu hodowlanym, zliczano liczbę żywych komórek po wybarwieniu błękitem trypanu w komorze hemocytometru Neubauer Improved i w odpowiedniej liczbie nanoszono do naczyń hodowlanych zawierających świeże podłoże.

### **Przechowywanie komórek eukariotycznych**

Zamrożone komórki eukariotyczne, które pochodziły z pierwotnych pasażów, przechowywane były w -80°C w podłożu do mrożenia. Jedna próba zawierała  $2 \times 10^6$  komórek. Komórki były rozmrażane i dwukrotnie odwirowywane w wirówce 5804R (Eppendorf, Niemcy) w temp. 4°C przez 8 min przy 1 600 RPM, z etapem płukania osadu świeżym podłożem między kolejnymi wirowaniami. Osad zawieszano w podłożu RPMI-1640 i przenoszono do naczyń hodowlanych.

### **Gentamycynowy test inwazyjności i proliferacji (Russell i wsp., 2007)**

Zdolność zrekombinowanych szczepów *B. subtilis* do wnikania do eukariotycznych komórek prezentujących antygen określano z wykorzystaniem mysich makrofagów IC-21 lub mysich komórek dendrytycznych JAWS II. Wykorzystano metodę opisaną wcześniej przez Russel'a i wsp. (2007), którą poddano modyfikacjom. W skrócie, komórki eukariotyczne nanoszono do dołków 24-dołkowej płytki ( $1-2 \times 10^5$  komórek) i hodowano przez czas 24-72 h w suplementowanym 10% FBS i 1 mM pirogronianem sodu podłożu RPMI-1640 bez dodatku antybiotyku do uzyskania 80% konfluencji. W dniu infekcji bakteriami, podłoże hodowlane było wymieniane na świeże, a do dołków infekowanych szczepami *B. subtilis* wymagającymi indukcji dodawano IPTG do stężenia 10 mM. Komórki eukariotyczne infekowano bakteriami do uzyskania pożądanej wartości MOI. Po dodaniu bakterii płytki 24-dołkowe wirowano w wirówce Sorvall RT-7 (DuPont, USA) przez 3 min przy 1 000 RPM, po czym płytki inkubowano przez czas 30 min. Kolejno, komórki eukariotyczne trzykrotnie płukano przy użyciu buforu PBS i przez 1 h inkubowano w pełnym podłożu RPMI-1640 zawierającym gentamycynę o stężeniu 100 µg/ml (bez penicyliny i streptomycyny) w celu usunięcia zewnątrzkomórkowych bakterii. Każdą inkubację przeprowadzano w inkubatorze CO<sub>2</sub> w 37 °C. Następnie, zainfekowane komórki eukariotyczne trzykrotnie płukano buforem PBS pH 7,4 i poddawano lizie przy użyciu 100 µl 1% Tritonu X-100 w celu uwolnienia wewnątrzkomórkowych bakterii. Po dodaniu do lizatów 400 µl buforu PBS pH 7,4, seryjne rozcieńczenia prób wysiewano na płytki z podłożem LA w celu określenia liczby sfagocytowanych bakterii.

Proliferację bakterii we wnętrzu komórek eukariotycznych badano poprzez dalszą inkubację zainfekowanych komórek w podłożu RPMI-1640 zawierającym 5 µg/ml gentamycynę. W różnych przedziałach czasowych zliczano wewnątrzkomórkowe bakterie zgodnie z procedurą opisaną powyżej.

## Określenie żywotności komórek eukariotycznych

Do określenia cytotoksycznego wpływu zrekombinowanych szczepów *B. subtilis* wytwarzających antygeny heterologiczne wykorzystano 2 metody. Pierwszą z nich było znakowanie komórek błękitem trypanu wnikającym jedynie do komórek martwych i wybarwiającym je na kolor niebieski. Wybarwione komórki żywe (białe) i martwe (niebieskie) zliczano przy użyciu mikroskopu Olympus IX70 (Japonia) w hemocytometrze Neubauer Improved.

Kolejną wykorzystaną metodą było zastosowanie zestawu LIVE/DEAD Viability/Cytotoxicity Assay zgodnie z instrukcją dostarczoną przez producenta. Testy przeprowadzono wykorzystując 1  $\mu\text{M}$  kalceinę AM oraz 2  $\mu\text{M}$  homodimer etydydy (EthD-1). Próby zawierające wszystkie komórki zabite przy użyciu 70% metanolu i wszystkie komórki żywe (nie traktowane alkoholem lub bakteriami) służyły jako kontrole. Fluorescencja prób była odczytywana w przezroczystych płytkach 96-dołkowych (Corning Costar, USA) z wykorzystaniem czytnika Tecan Infinite M200 Pro (Tecan, Szwajcaria). Odczyty wykonywano przy fali wzbudzenia długości 485 nm dla kalceiny AM i 530 nm dla EthD-1, podczas gdy emisję mierzono przy fali długości 530 nm dla kalceiny AM i 645 nm dla EthD-1.

## 4.6. Metody specyficzne

### Test hemolityczny (Stachowiak i Bielecki, 2001)

Weryfikacja zrekombinowanych szczepów *B. subtilis* pod kątem produkcji hemolitycznej toksyny LLO przeprowadzana była na drodze testu z wykorzystaniem erytrocytów krwi końskiej, zgodnie z procedurą opisaną przez Stachowiaka i Bieleckiego (2001). Do erytrocytów krwi końskiej zawieszonych w buforze PBS pH 7,4 dodawano supernatanty hodowlane szczepów *B. subtilis*, po czym mieszaninę inkubowano statycznie w 37°C przez 30 min. Następnie próby wirowano w temp. 4°C w wirówce Micro22R (Hettich, Niemcy) przy 1 200 RPM i mierzono absorbancję supernatantów przy  $\lambda = 410$  nm. Aktywność hemolityczną wyrażano w jednostkach procentowych, definiowanych w stosunku do próby wykazującej całkowitą hemolizę, uzyskanej poprzez dodanie SDS.

### Pomiar fluorescencji GFP

Produkcję zrekombinowanego białka GFP monitorowano poprzez pomiar fluorescencji w 96-dołkowych, czarnych płytkach (Sigma Aldrich, USA) w czytniku płytek Infinite M200 Pro (Tecan, Szwajcaria). Pomiarów dokonywano przy fali wzbudzenia  $\lambda = 485$  nm i fali emisji  $\lambda = 535$  nm. Z hodowli bakteryjnych odmłodzonych w podłożu LB do OD<sub>600</sub> równej 3 pobierano 1 ml hodowli, a pobrane próby wirowano. W celu uwidocznienia wewnątrzkomórkowej ekspresji GFP, osad komórkowy przepłukiwano 1 ml buforu PBS pH 7,4 i zawieszano w 100  $\mu\text{l}$  PBS. Zewnątrzkomórkową ekspresję białka reporterowego badano poprzez pobranie 100  $\mu\text{l}$  supernatantu. Próby odniesienia stanowił bufor PBS (dla komórek *B. subtilis*) oraz podłoże LB (dla supernatantów hodowlanych). Próby przenoszono do dołków w czarnej płytce 96-dołkowej i odczytywano ich fluorescencję za pomocą fluorymetru.

## 4.7. Metody immunologiczne

### Modele prezentacji antygeny OVA

Prezentację antygeny weryfikowano zarówno metodą *in vitro*, jak i *ex vivo*. W analizie *in vitro* komórki dendrytyczne JAWS II wysiewano w dołkach płytki 24-dołkowej ( $1-2 \times 10^5$  komórek/dołek) w wolnym od antybiotyków podłożu RPMI-1640 z 10% FBS i INF- $\gamma$  w stężeniu 20 ng/ml. Mysie komórki infekowano bakteriami *B. subtilis* przy wskazanej wartości MOI. Komórki JAWS II stymulowane przez syntetyczny epitop SIINFEKL o końcowym stężeniu 1  $\mu\text{g/ml}$ , podłoże bez bakterii lub infekowane komórkami *B. subtilis* MB4 (o fenotypie dzikim) bądź BR1S (produkującym LLO i nie wytwarzającym OVA) stanowiły kontrole testu. Po 30 min infekcji komórki przepłukiwano i inkubowano przez 1 h w podłożu zawierającym gentamycynę 100  $\mu\text{g/ml}$ , co prowadziło do usunięcia zewnątrzkomórkowych bakterii. Następnie komórki dendrytyczne inkubowano przez 24 h w inkubatorze CO<sub>2</sub> w 37°C, a po upływie czasu inkubacji odklejano je w buforze PBS od ścian naczynia i poddawano procedurze znakowania immunocytochemicznego przeciwciałem monoklonalnym rozpoznającym kompleks MHC I-SIINFEKL (APC-H2K<sup>b</sup>OVA<sub>257-264</sub>), sprzężonym z fluorochromem APC. Fluorescencję oznaczano w cytometrze przepływowym FACSCalibur (BD Biosciences, USA).

W eksperymencie analizującym prezentację antygeny *ex vivo*, komórki JAWS II infekowano szczepami *B. subtilis* LLO-OVA zgodnie z procedurą opisaną dla testów *in vitro*. Mysie limfocyty CD8<sup>+</sup> OT-izolowano z węzłów podkolanowych myszy OT-I, po czym znakowano je 10  $\mu\text{M}$  CFSE w 0,1% BSA w buforze PBS (pH = 7,4). Po 10 min inkubacji w 37°C, wyznakowane limfocyty OT-I dodawano do hodowli JAWS II uprzednio infekowanych *B. subtilis*. Po 3 dniach hodowli z dołków szalki 24-dołkowej zbierano komórki, które następnie znakowano szczurzym przeciwciałami anti-CD8 skoniugowanym z fluorochromem PE i anti-CD4 skoniugowanym z fluorochromem APC. Fluorescencję CFSE komórek OT-I oznaczano na drodze cytometrii przepływowej w cytometrze FACSCalibur (BD Biosciences, USA).

### Znakowanie immunocytochemiczne i cytometria przepływowa

Komórki stymulowane do prezentacji antygeny odklejano od powierzchni naczynia hodowlanego przy pomocy buforu PBS pH 7,4. Po dwukrotnym przepłukaniu zawierającym azydek sodu roztworem CellWash z 0,5% BSA, komórki zawieszano w tym samym roztworze niosącym przeciwciała monoklonalne sprzężone z odpowiednim fluorochromem. Po 30 min inkubacji w lodzie i ciemności, komórki dwukrotnie przepłukiwano roztworem CellWash z 0,5% BSA i oznaczano w cytometrze przepływowym FACSCalibur. Uzyskane dane analizowano z wykorzystaniem oprogramowania FCS Express 4 Flow (De Novo Software, USA) lub CellQuest (BD Biosciences, USA).

### Pomiar dawki LD<sub>50</sub>

Nocne hodowle *B. subtilis* prowadzone w płynnym podłożu LB (30°C, 120 RPM) odnawiano poprzez zaszczepienie 20 ml świeżej pożywki do uzyskania OD<sub>600</sub> równej 0,05. Bakterie hodowano w takich samych warunkach jak w przypadku hodowli nocnej, do uzyskania przez hodowlę OD<sub>600</sub> równej 1 (logarytmicznej fazy wzrostu). Na godzinę przed

końcem odmładzania do hodowli szczepów BR1S i R\_Ag85B dodawano IPTG do stężenia 1 mM. Następnie zwirowywano pożądaną objętość hodowli niosącą zamierzoną liczbę komórek bakteryjnych (8 000 RPM, 3 min, temp. pokojowa). Osady bakteryjne przepłukiwano 1 ml buforu TM i po kolejnym wirowaniu w takich samych warunkach końcowo zawieszano w świeżym buforze w objętości 200 µl/dawkę infekcyjną.

6 – 10 tygodniowe samice myszy C57BL/6 w 3-osobnikowych grupach podlegały tygodniowej aklimatyzacji w jednej klatce. Dla każdego badanego szczepu *B. subtilis* szczepiono 3 grupy po 3 myszy. 5 grup myszy zaszczepiono dootrzewnowo dawkami zawierającymi  $2 \times 10^6$ ,  $5 \times 10^7$  i  $5 \times 10^8$  komórek bakteryjnych w 200 µl buforu TM. Jedną, kontrolną grupę myszy szczepiono dootrzewnowo 200 µl sterylnego buforu TM. Liczebność bakterii w podanych myszom preparatach bakteryjnych oszacowywano poprzez sporządzenie seryjnych rozcieńczeń w 0,9% NaCl, wysiew na płytki z podłożem LA i zliczanie kolonii wyrosłych po nocnej inkubacji. Przeżywalności myszy monitorowano każdego dnia przez czas 7 dni. Wszystkie myszy, które przeżyły uśmiercano 8 dnia po inokulacji. 50% dawkę letalną dla każdego szczepu wyliczano na podstawie danych na temat śmiertelności myszy i pomiarów CFU.

### **Immunizacja myszy**

W celu sprawdzenia zdolności szczepów *B. subtilis* do dostarczania białka Ag85B do cytozolu komórek prezentujących antygen i wywołania odpowiedzi immunologicznej, przeprowadzono seryjną immunizację myszy. Przygotowanie dawek infekcyjnych i przygotowanie zwierząt odbywało się według protokołu opisanego w punkcie **Pomiar dawki LD<sub>50</sub>**. CFU dawek infekcyjnych było analizowane przez posiewy rozcieńczeń na płytki LA po każdej przeprowadzonej immunizacji.

Immunizacji poddano siedem 6-osobnikowych grup myszy C57BL/6 x DBA/2 (samice w wieku powyżej 6 tygodni). 5 grup szczepiono dootrzewnowo 4 dawkami komórek wegetatywnych *B. subtilis* w dawce 0,1 LD<sub>50</sub> / mysz, co odpowiadało  $5 \times 10^7$  komórek bakteryjnych. Dwie grupy stanowiły kontrole – jedna z nich dootrzewnowo otrzymywała sterylny bufor TM, druga natomiast roztwór oczyszczonego białka Ag85B w roztworze TM (5 µg / dawkę). Zwierzęta szczepiono w dniach 0, 14, 28 i 42, po czym 63 dnia były one uśmiercane. Analizowano zarówno komórkowe, jak i humoralne mechanizmy odpowiedzi immunologicznej. Krew oraz śledziony immunizowanych zwierząt stanowiły materiał badawczy do dalszych testów.

### **Izolacja splenocytów (Hinc i wsp., 2014)**

Immunizowane myszy uśmiercono i w sterylnych warunkach izolowano z nich śledziony. Zawiesiny splenocytów uzyskano poprzez wypłukiwanie komórek ze śledzion podłożem RPMI-1640 suplementowanym 10% FBS, 1 mM pirogronianem sodu, 100 IU/ml penicyliną oraz 100 mg/ml streptomycyną. Użyto w tym celu 5 ml strzykawkę insulinowych z igłą 29 G. Zawiesiny splenocytów wirowano następnie przy 3000 g przez 25 min w temp. 4°C. Erytrocyty usunięto poprzez inkubację osadów komórkowych w buforze lizującym ACK przez 5 min w temp. pokojowej. Kolejno, komórki były trzykrotnie przemywane w celu usunięcia zlizowanych erytrocytów i składników buforu ACK. Po zawieszeniu splenocytów

w świeżej pełnej pożywce RPMI-1640, określano liczebność i żywotność komórek z wykorzystaniem zestawu AccuChip Kit i aparatury ADAM-MC™ Automatic Cell Counter (NanoEnTek, Korea).

### **Analiza produkcji INF- $\gamma$ w teście ELISPOT**

Liczbę splenocytów wydzielających INF- $\gamma$  określano wykorzystując zestaw Mouse INF- $\gamma$  ELISpot Kit. Analizę przeprowadzono w oparciu o instrukcję załączoną przez producenta. Splenocyty ( $1 \times 10^5$  / dołek) hodowano bez lub w obecności oczyszczonego antygeny Ag85B o stężeniu 2  $\mu\text{g}/\text{ml}$  przez 48 h. Kontrolę pozytywną stanowiły splenocyty inkubowane z konkanawaliną A (ConA) o stężeniu końcowym 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , natomiast kontrolą negatywną były niestymulowane komórki. Testy ELISpot zostały przeprowadzone w 3 powtórzeniach dla każdej szczepionej myszy. Ze względu na wynik testu, przeprowadzono jedynie wizualną ocenę płytek, bez użycia specjalistycznego czytnika ImmunoSpot S6 Micro Analyzer (CTL, USA).

### **Uzyskanie surowicy krwi**

Krew immunizowanych myszy pobrano w 2 punktach czasowych. W dniu 0 (przed pierwszą immunizacją) poprzez pobranie z żyły ogonowej uzyskano około 50  $\mu\text{l}$  próbki krwi 6 myszy z nieszczepionej grupy kontrolnej. W dniu 56 immunizacji dokonano natomiast skrwawiania całkowitego wszystkich myszy ze wszystkich immunizowanych grup na drodze otwarcia klatki piersiowej i pobrania krwi z wnętrza serca (około 1 ml). Uzyskane próby krwi inkubowano przez 1 h w temp. 37°C, a następnie przez noc w temp. 4°C. Następnie wirowano je przy 20000 g w 4°C przez 1 h. Do uzyskanych supernatantów dodawano azydek sodu do stężenia 0,03% (w/v), po czym surowice zamrażano w -80°C.

### **Wykrywanie przeciwciał IgG za pomocą testu ELISA (Hinc i wsp., 2014)**

Płytki 96-dołkowe pokrywano antygenem Ag85B (2  $\mu\text{g}/\text{ml}$  w buforze węglanowym pH 9,5) i inkubowano w temp. pokojowej przez noc. Po trzykrotnym przemyciu płytek buforem PBS-T, płytki blokowano przez 2 h z wytrząsaniem w buforze blokującym ELISA. Do płytek dodawano następnie po 100  $\mu\text{l}$  próby surowicy zawieszona w buforze blokującym ELISA rozcieńczona seryjnie 1:50, 1:100, 1:200. Po 2 h inkubacji w temp. 37°C, próby pięciokrotnie płukano buforem PBS-T, a następnie dodawano po 100  $\mu\text{l}$  przeciwciała II-rzędowego (anty-mysiego IgG skoniugowanego z peroksydazą chrzanową, HRP) rozcieńczonego 1:10000 w buforze do blokowania. Niespecyficzne wiązanie przeciwciała II-rzędowego ze związanym antygenem kontrolowano poprzez jego naniesienie na dołki nie zawierające surowicy. Płytki inkubowano w temp. 37°C przez 1 h, po czym pięciokrotnie je przepłukiwano buforem PBS-T. Do wszystkich dołków dodawano po 100  $\mu\text{l}$  substratu HRP, OPD o stężeniu 0,4 mg/ml, w buforze dla peroksydazy chrzanowej. Po 15 min wywoływania w ciemności, reakcję barwną zatrzymywano poprzez dodanie 50  $\mu\text{l}$  1 M kwasu cytrynowego do każdego dołka. Wyniki odczytywano poprzez pomiar absorbancji przy fali  $\lambda = 492 \text{ nm}$  w czytniku płytek Infinite M200 Pro (Tecan, Szwajcaria).

#### 4.8. Analiza komputerowa sekwencji nukleotydowych i aminokwasowych

Projektowanie starterów do reakcji PCR, analizy nukleotydowych sekwencji DNA oraz porównywanie sekwencji nukleotydowych (*sequence alignment*) wykonywano z użyciem programu Clone Manager Professional Suite 8 (Sci-Ed Software, USA). Wizualizacji chromatogramów sekwencji nukleotydowych DNA otrzymanych w wyniku reakcji sekwencjonowania dokonywano w programie FinchTV (Geospiza, USA). Porównywania analizowanych sekwencji nukleotydowych i aminokwasowych z danymi zgromadzonymi w bazie danych GenBank (NCBI) wykorzystano dostępne na stronach internetowych programy typu BLAST. Sekwencje nukleotydowe DNA i aminokwasowe białek analizowano także innymi programami dostępnymi na serwerach NCBI, EMBL-EBI, Expasy, KEGG i TIGR. Optymalizację kodonów przeprowadzano przy użyciu narzędzia Codon Adaptation Tool (JCAT, Niemcy).

#### 4.9. Analizy statystyczne

Analizy statystyczne wykonywano za pomocą oprogramowania Microsoft Excel. Dane o rozkładzie normalnym przedstawiono w postaci średniej arytmetycznej i odchylenia standardowego. W przypadku niektórych analiz przeprowadzano również porównanie dwóch niezależnych grup wyników za pomocą testu t-Studenta. Za statystycznie istotne uznawano różnice, dla których wartość p była mniejsza niż 0,05 ( $p < 0,05$ ).

---

## 5. Wyniki

---

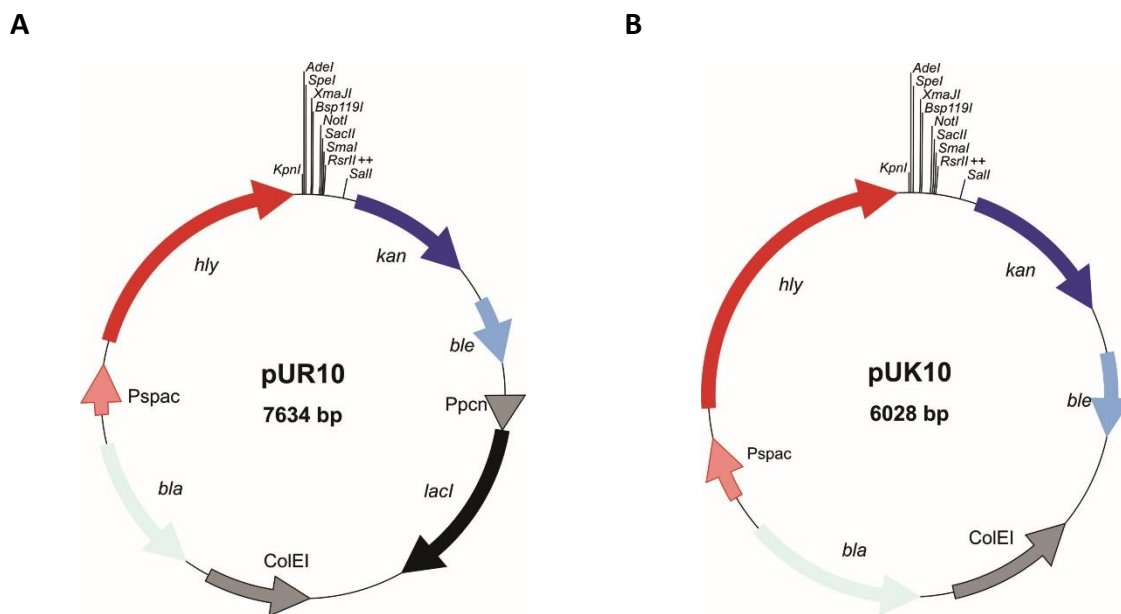
### 5.1. Konstrukcja plazmidowych wektorów integracyjnych umożliwiających ekspresję genów kodujących heterologiczne białka w *B. subtilis*

Chromosomalna ekspresja klonowanych w *B. subtilis* genów zapewnia stabilność wektora szczepionkowego i ochronę przed utratą jego immunogenności. Właściwość ta sprawia, że zastosowanie plazmidowych wektorów integracyjnych jest powszechną metodą insercji genów w obręb niekodujących sekwencji lub genów, których ekspresja nie jest niezbędna do zachowania prawidłowych czynności komórki bakteryjnej. Wybór plazmidowego wektora integracyjnego zależy od szczepu bakterii, który został wytypowany do konstrukcji. Za bazę do opracowania wszystkich wykorzystanych w toku badań wektorów kodujących heterologiczne antygeny wybrano asporogenny szczep MB4 niosący insercję *spoIIIE::Tn917ΩHU181::lac55* (Bielecki i wsp., 1990). Brak możliwości sporulacji uniemożliwił niekontrolowane rozprzestrzenianie się bakterii oraz ograniczył zakres badań do analizy komórek wegetatywnych *B. subtilis*. Ze względu na zróżnicowane zastosowanie uzyskanych szczepów *B. subtilis* w badaniach *in vitro* na liniach komórkowych oraz *in vivo* na modelu mysim, skonstruowano dwa wektory plazmidowe pUR10 i pUK10, umożliwiające odpowiednio indukowaną przez IPTG lub konstytutywną ekspresję klonowanych antygenów.

Wektor pUR10 (**rysunek 5.1 A**) uzyskano poprzez modyfikację znanego wektora pAG58-1-*ble* (Youngman i wsp., 1989), do którego wstawiono gen *hly* kodujący listeriolizynę O. Wektor ten posiada zdolność do integracji do chromosomu *B. subtilis* wynikającą z obecności sekwencji SP  $\beta$  profaga *B. subtilis* (Jaacks i wsp., 1989). Szczegóły konstrukcji plazmidu pUR10 znajdują się w **załączniku 8.1**. Wstawienie rozbudowanego miejsca MCS (multicloning site) umożliwiło użycie szerszego spektrum enzymów restrykcyjnych do klonowań wykonywanych w dalszych etapach pracy doktorskiej, natomiast wstawienie kasety oporności na kanamycynę wyeliminowało potrzebę selekcji transformantów *B. subtilis* na podłożu zawierającym bleomycynę. Podatność nowego

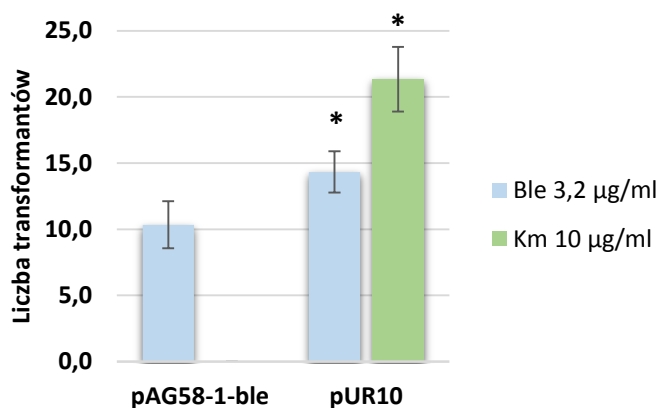


wektora na transformację do komórek kompetentnych *B. subtilis* oraz zdolność do indukcji oporności na kanamycynę została potwierdzona w toku transformacji komórek kompetentnych *B. subtilis* MB4 z selekcją na podłożu zawierającym 10 µg/ml antybiotyku z użyciem plazmidu pAG58-1-*ble* jako kontroli negatywnej oraz pUB110 jako kontroli pozytywnej. Trzecim etapem modyfikacji było usunięcie zbędnej sekwencji genu *cat* warunkującego oporność na chloramfenikol (szczep MB4 jest naturalnie odporny na ten antybiotyk), dzięki czemu uzyskano plazmid o 867 bp mniejszy niż plazmid wyjściowy.



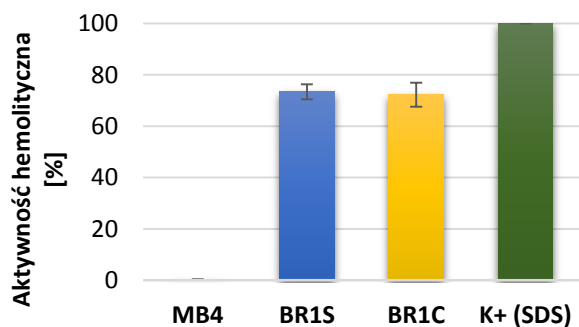
**Rysunek 5.1. Konstrukcja integracyjnych wektorów plazmidowych pUR10 (A) i pUK10 (B).**  $p_{spac}$  – promotor indukowany IPTG, *hly* – gen kodujący listeriolizynę O, *kan* – gen oporności na kanamycynę, *ble* – gen oporności na bleomycynę,  $p_{pcn}$  – promotor penicyliny, *lacI* – gen represora operonu laktozowego, ColEI – miejsce startu replikacji, *bla* – gen oporności na ampicylinę.

Efektywność transformacji plazmidem pUR10 porównano z efektywnością transformacji plazmidem pAG58-1-*ble*, dowodząc że zmodyfikowany wektor pUR10 jest skuteczniej pobierany do komórek kompetentnych *B. subtilis*. Analizę przeprowadzono zarówno na podłożu selekcyjnym z bleomycyną o stężeniu 3,2 µg/ml, jak i z kanamycyną (10 µg/ml), przy czym większą efektywność transformacji wektorem pUR10 udokumentowano przy analizie na pożywce z kanamycyną. Wyniki przedstawiono na **rysunku 5.2.**



**Rysunek 5.2. Porównanie efektywności transformacji komórek kompetentnych *B. subtilis* MB4 plazmidami pAG58-1-ble i pUR10.** Komórki kompetentne *B. subtilis* hodowano z 1 µg DNA plazmidowego przez czas 3 h, a następnie wysiewano na płytki z podłożem selekcyjnym. Na wykresie przedstawiono wartości średnie z 3 pomiarów liczby kolonii transformantów, wyniki poddano analizie za pomocą testu t-Studenta. Gwiazdki oznaczają grupy o wartości  $p < 0,05$  w porównaniu do grupy transformowanej plazmidem pAG58-1-ble.

Plazmid pUK10 umożliwiający konstytutywną ekspresję genów klonowanych w miejscu MCS (**rysunek 5.1 B**) uzyskano poprzez usunięcie z wektora pUR10 genu represora *lacI* z promotorem  $p_{pcn}$ , znajdujących się pomiędzy genem *ble* oraz sekwencją ColEI. Na drodze transformacji komórek kompetentnych *B. subtilis* MB4 wektorem pUK10 otrzymano szczep BR1C zdolny do konstytutywnej ekspresji genu *hly*. Szczegółowy opis drogi uzyskania wektora pUK10 oraz szczepu BR1C przedstawiono w **załączniku 8.2**. Produkcję LLO niezależną od obecności induktora potwierdzono w toku testu hemolitycznego z wykorzystaniem erytrocytów krwi końskiej. Porównano w nim hemolityczność szczepów MB4 o fenotypie dzikim, BR1S fakultatywnie ekspresyjnego genu *hly* w obecności induktora IPTG uzyskanego poprzez transformację plazmidem wyjściowym pAG58-1-*ble* oraz nieindukowanego IPTG szczepu BR1C. Bakterie hodowano w podłożu BHI do osiągnięcia gęstości optycznej równej 3 przy  $\lambda = 600$  nm ( $OD_{600}$ ). Wykazano, że gen *hly* w szczepie BR1C ulega konstytutywnej ekspresji, przy czym nie wykazano istotnych różnic w poziomie produkcji toksyny LLO między szczepem BR1S i BR1C (**rysunek 5.3**).

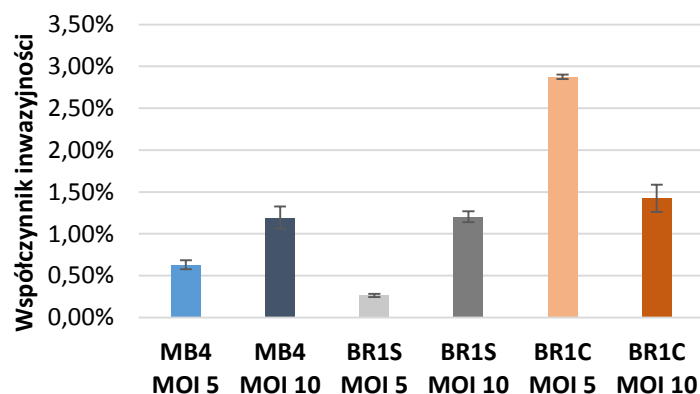


**Rysunek 5.3. Aktywność hemolityczna szczepów *B. subtilis* BR1S i BR1C** mierzona w teście hemolitycznym wykorzystującym erytrocyty krwi końskiej. Analizie poddano próbki supernatantu pochodzące z hodowli odmładzanych w podłożu BHI do  $OD_{600}$  równej 3. Hodowlę szczepu BR1S prowadzono w obecności 1 mM IPTG, natomiast BR1C hodowano bez dodatku induktora. Test powtarzano trzykrotnie, słupki błędów przedstawiają odchylenie standardowe badanych prób. Szczep MB4 stanowił kontrolę negatywną, a SDS – kontrolę pozytywną.

## 5.2. Ocena inwazyjności i cytotoksyczności szczepów *B. subtilis* wytwarzających LLO

### Inwazyjność szczepów *B. subtilis* BR1S i BR1C

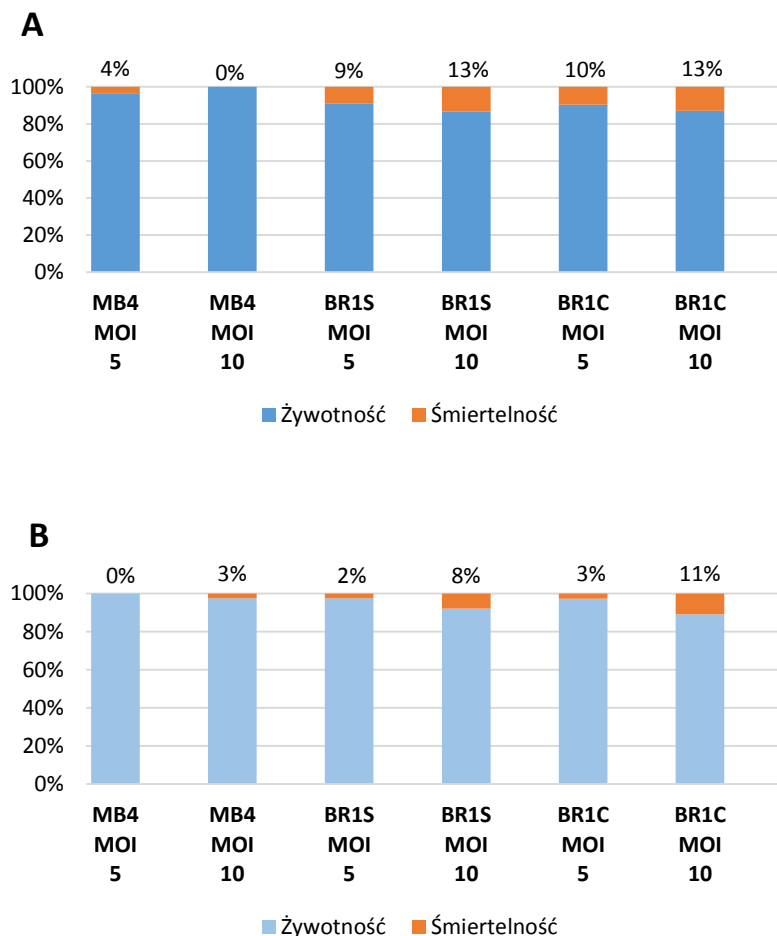
Wstępnych pomiarów inwazyjności szczepów względem komórek APC dokonano z wykorzystaniem szczepu MB4 o fenotypie dzikim oraz szczepów BR1S i BR1C wytwarzających listeriolizynę O, których pochodnymi będą otrzymane w kolejnych punktach szczepy produkujące antygeny fuzyjne. Do eksperymentów wybrano linię mysich makrofagów IC-21, które cechują duże zdolności fagocytarne. Pierwszym zadaniem było ustalenie wartości parametru MOI (multiplicity of infection), mówiącego o ilości komórek bakteryjnych przypadających na jedną komórkę dendrytyczną w trakcie infekcji. Różne jego wartości wpływają na inwazyjność bakterii oraz ich cytotoksyczność względem komórek APC. Bakterie hodowano w podłożu LB do osiągnięcia wartości  $OD_{600}$  równej 1. Następnie, komórki makrofagów infekowano bakteriami przy różnych wartościach MOI wynoszących 5 lub 10 przez czas 30 minut. Niskie wartości parametru MOI wybrano ze względu na cytotoksyczną aktywność LLO produkowanej przez szczepy BR1S i BR1C. Przy użyciu gentamycyny z podłoża usuwano bakterie, które nie wniknęły do środka komórek eukariotycznych i dokonywano pomiaru liczby bakterii, które zostały sfagocytowane. Inwazyjność określano po czasie godzinnej inkubacji w pożywce z gentamycyną, w którym wszystkie zewnątrzkomórkowe bakterie zostały zabite (dane nie prezentowane). Z przeprowadzonych analiz wynika, że jedynie szczep BR1C wykazuje większą inwazyjność przy zastosowaniu MOI 5. Szczep o fenotypie dzikim MB4 oraz wytwarzający LLO w obecności induktora IPTG szczep BR1S izolowano w większej liczbie z cytoplazmy makrofagów infekowanych przy wartości MOI równej 10. Wyniki przedstawia **rysunek 5.4**.



**Rysunek 5.4. Liczba komórek *B. subtilis* MB4, BR1S i BR1C wyizolowanych z cytoplazmy zainfekowanych makrofagów.** Makrofagi mysiej linii IC-21 infekowano bakteriami przy MOI równym 5 lub 10, a następnie bakterie, które nie zostały zinternalizowane usuwano poprzez inkubację w podłożu z gentamycyną o stężeniu 100 µg/ml. Zainfekowane komórki poddawano dysrupcji Tritonem X-100, a uzyskane preparaty wysiewano na szalki z LB w celu policzenia liczby bakterii odzyskanych z wnętrza komórek eukariotycznych. Współczynnik inwazyjności obliczano jako stosunek liczby bakterii wyizolowanych z komórek eukariotycznych do liczby infekowanych komórek eukariotycznych. Wykres przedstawia wartości średnie z 3 niezależnych pomiarów.

### Cytotoksyczność szczepów *B. subtilis* BR1S i BR1C

Kolejnym etapem było zbadanie poziomu cytotoksyczności *B. subtilis* względem komórek mysich makrofagów linii IC-21 poprzez barwienie uprzednio zainfekowanych uprzednio makrofagów błękitem trypanu w dwóch różnych punktach czasowych od początku infekcji. W analizie tego typu wykorzystywany jest fakt, że komórki żywe pozostają niewybarwione, natomiast komórki martwe są wyznakowane na niebiesko. Pomiar liczebności komórek obu grup wykonano w 3 niezależnych pomiarach w hemocytometryrze Neubauer'a przy udziale mikroskopu świetlnego. Dowiedziono, że zarówno niehemolityczny szczep MB4, jak i hemolityczne szczepy BR1S i BR1C powodowały śmiertelność na podobnym poziomie, która wahała się od 0 do 13% w czasie 0 (po zakończeniu inkubacji z gentamycyną) i od 0 do 11% w czasie 2 godzin od końca inkubacji z gentamycyną, niezależnie od zastosowanej wartości MOI (5 lub 10) (**rysunek 5.5**). Niższa cytotoksyczność obserwowana w czasie 2 godzin od końca inkubacji z gentamycyną może świadczyć o tym, że komórki martwe są szybko usuwane dzięki silnym właściwościom fagocytującym makrofagów. Ze względu na większą inwazyjność szczepów, w dalszych badaniach testy inwazyjności i cytotoksyczności szczepów *B. subtilis* produkujących immunogenne białka przeprowadzono przy MOI = 10.



**Rysunek 5.5. Cytoksyteczność szczepów *B. subtilis* MB4, BR1S i BR1C względem makrofagów mysich linii IC-21.** Komórki linii IC-21 infekowano bakteriami przy MOI równym 5 lub 10, a następnie bakterie, które nie zostały zinternalizowane usuwano poprzez inkubację w podłożu z gentamycyną o stężeniu 100 µg/ml. Makrofagi wybarwiano błękitem trypanu, a następnie przy użyciu mikroskopu świetlnego oznaczano liczebność komórek żywych i martwych. Wykres przedstawia wartości średnie z 3 niezależnych pomiarów. **A** – czas 0 (po zakończeniu inkubacji z gentamycyną), **B** – czas 2 (2 godzin od końca inkubacji z gentamycyną).

### 5.3. Analiza ekspresji owoalbuminy jaja kurzego (OVA) w *B. subtilis* oraz określenie potencjału szczepów *B. subtilis*-OVA do indukcji komórkowej odpowiedzi immunologicznej

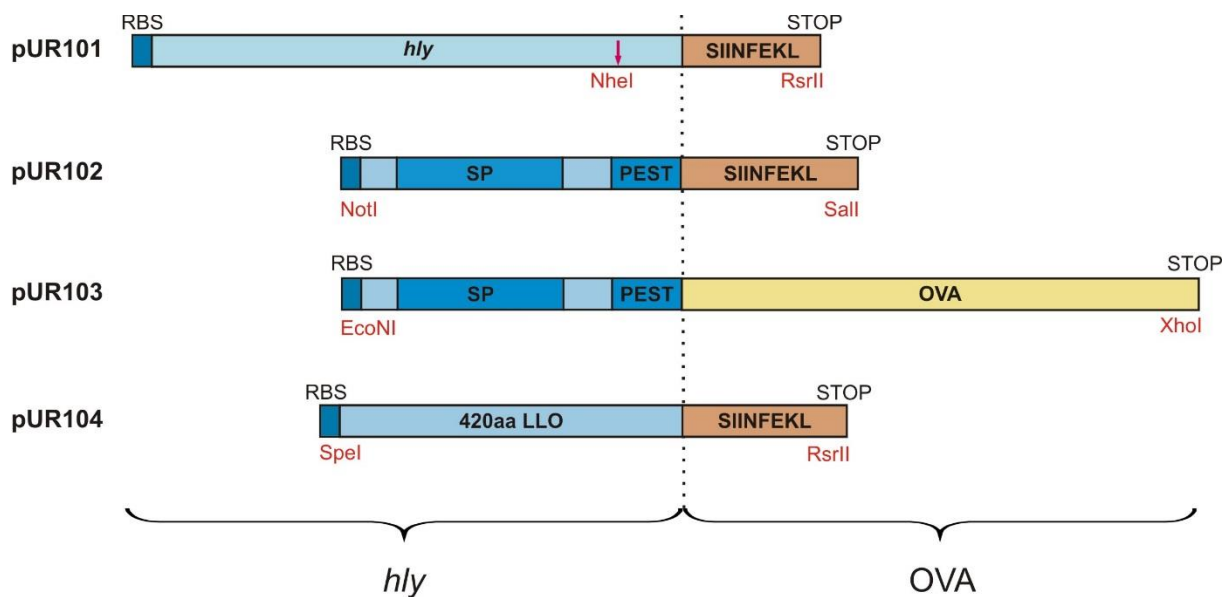
#### Konstrukcja szczepów *B. subtilis* LLO-OVA i LLO-OVA-GFP

Konstrukcje genetyczne kodujące fuzję N-końcowego fragmentu LLO niosącego sekwencję sygnałową oraz PEST-podobną LLO zostały sporządzone tak, aby umożliwić ocenę przydatności określonych domen białka OVA we wspomaganie sekrecji antygeny

heterologicznego przez *B. subtilis* oraz jego prezentacji w kontekście cząsteczek układu zgodności tkankowej na infekowanych komórkach eukariotycznych. W celu zbadania znaczenia długości eksprymowanego antygeny modelowego, zaplanowano fuzje translacyjne N-końcowej sekwencji listeriolizyny O z pełnej długości sekwencją owoalbuminy bądź sekwencją kodującą jedynie 8-aminokwasowy epitop SIINFEKL. Sekwencje kodujące antygeny fuzyjne sklonowano w wektorze pUR10, uzyskując wektory pUR101, pUR102, pUR103 i pUR104. Wszystkie powstałe wektory zostały wprowadzone do komórek kompetentnych według protokołu transformacji Young'a i Spizizen'a, co doprowadziło do uzyskania następujących szczepów *B. subtilis*:

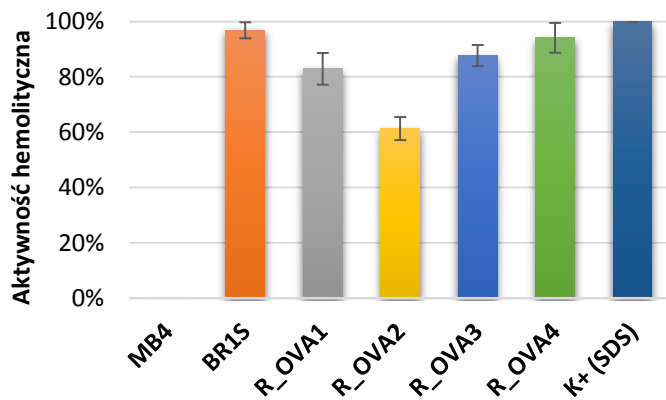
1. R\_OVA1 uzyskany poprzez transformację wektorem pUR101: kodujący LLO z przyłączonym w C-końcu epitopem SIINFEKL,
2. R\_OVA2 uzyskany poprzez transformację wektorem pUR102: kodujący LLO oraz fuzyjne białko LLO-OVA (N-terminalna sekwencja LLO zawierająca miejsce RBS, sekwencję sygnałową SP i PEST-podobną LLO poddana fuzji do sekwencji epitopu OVA, SIINFEKL),
3. R\_OVA3 uzyskany poprzez transformację wektorem pUR103: kodujący LLO oraz fuzyjne białko LLO-OVA (N-terminalna sekwencja LLO zawierająca miejsce RBS, sekwencję sygnałową SP i PEST-podobną LLO poddana fuzji do pełnej długości sekwencji OVA),
4. R\_OVA4 uzyskany poprzez transformację wektorem pUR104: kodujący LLO i dodatkową skróconą, 420-aminokwasową formę LLO, do której C-końca przyłączono epitop OVA, SIINFEKL.

Schemat konstrukcji genetycznych został przedstawiony na **rysunku 5.6**, a dokładny opis konstrukcji wektorów plazmidowych oraz uzyskania szczepów *B. subtilis* za ich pomocą został przedstawiony w **załączniku 8.3**.



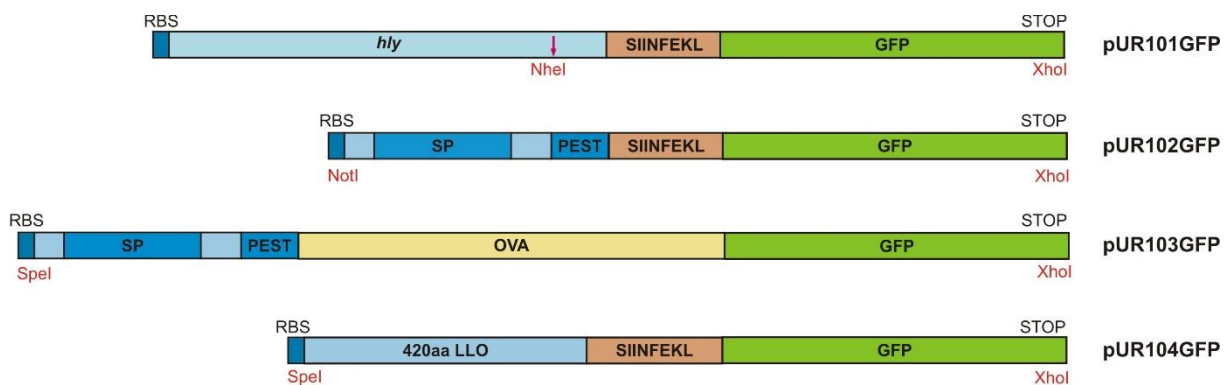
**Rysunek 5.6. Schemat konstrukcji genetycznych wektorów kodujących białka fuzyjne LLO-OVA klonowanych w wektorze pUR10.** Fragmenty genu *hly* kodującego białko LLO zostały oznaczone odcieniami koloru niebieskiego, natomiast genu *OVA* zaznaczono odcieniami koloru pomarańczowego. Nazwy enzymów restrykcyjnych użytych do klonowania oznaczono kolorem czerwonym.

Ocenę ekspresji fuzyjnych białek LLO-OVA przeprowadzono poprzez analizę aktywności listeriolizyny O w supernatantach hodowlanych modyfikowanych szczepów. Cały plazmid kodujący zarówno LLO, jak i fuzyjne antygeny ulega integracji do chromosomu *B. subtilis*. Zarówno główny czynnik patogenezy, jak i fuzyjne antygeny ulegają ponadto ekspresji spod jednego promotora  $p_{spac}$  znajdującego się na plazmidzie, co umożliwia śledzenie ich równoczesnej ekspresji. Przeprowadzone testy hemolityczności z wykorzystaniem erytrocytów krwi końskiej wykazały, że wszystkie cztery uzyskane szczepy przy  $OD_{600}$  równej 3 wykazywały wysoką aktywność hemolityczną. Wyniki zostały zaprezentowane na **rysunku 5.7**. Najniższą aktywność cytolityczną względem erytrocytów krwi końskiej wykazywał szczep R\_OVA2, który wytwarza krótki antygen fuzyjny będący połączeniem N-końcowej sekwencji LLO i epitopu OVA, SIINFEKL (62%). Pozostałe szczepy *B. subtilis*-OVA nie wykazywały istotnych różnic w aktywności hemolitycznej, a ich aktywność hemolityczna wahała się między 88 a 97%.



**Rysunek 5.7. Aktywność hemolityczna szczepów *B. subtilis* LLO-OVA** mierzona w teście hemolitycznym wykorzystującym erythrocyty krwi końskiej. Analizie poddano próbki supernatantu pochodzące z hodowli odmładzanych w podłożu LB do OD<sub>600</sub> równej 3. Test powtarzano trzykrotnie, słupki błędów przedstawiają odchylenie standardowe badanych prób. Szczep MB4 stanowił kontrolę negatywną, a SDS - kontrolę pozytywną.

Równocześnie, aby umożliwić lokalizację fuzyjnych białek, skonstruowano szczepy R\_OVA1GFP, R\_OVA2GFP, R\_OVA3GFP i R\_OVA4GFP wytwarzające białka fuzyjne LLO-OVA-GFP. Posiadają one sekwencję jak w przedstawionych powyżej konstrukcjach zaprojektowanych do syntezy białek LLO-OVA, ale dodatkowo głównego członu kodującego antygen metodą „overlapping extension PCR” dodano sekwencję genu reporterowego GFP (*gfpmut3b*) (rysunek 5.8).

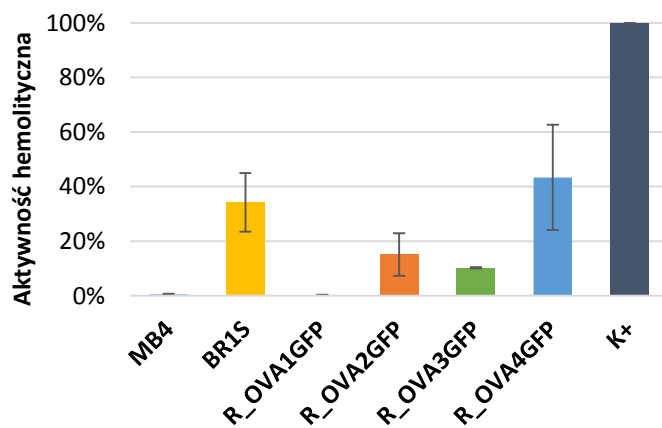


**Rysunek 5.8. Schemat konstrukcji genetycznych wektorów kodujących białka fuzyjne LLO-OVA-GFP uzyskanych na bazie wektora pUR10.** Fragmenty genu *hly* kodującego LLO zostały oznaczone odcieniami koloru niebieskiego, genu *OVA* – koloru pomarańczowego, natomiast białko reporterowe GFP – zielonego. Nazwy enzymów restrykcyjnych użytych do klonowania oznaczono kolorem czerwonym.

Szczepy uzyskano na drodze transformacji kompetentnych komórek *B. subtilis* szczepu MB4 wektorami pUR101GFP – pUR104GFP metodą Young’a i Spizizen’a. Dokładny opis konstrukcji znajduje się w załączniku 8.4. Wszystkie transformanty, z wyjątkiem szczepu R\_OVA1GFP, zostały pozytywnie zweryfikowane poprzez sprawdzenie aktywności



hemolitycznej w teście wykorzystującym erythrocyty krwi końskiej, którego wyniki przedstawia **rysunek 5.9**. Test wykazał obniżony stopień hemolityczności szczepów LLO-OVA-GFP w stosunku do szczepów nie produkujących białka reporterowego. Średnia aktywność hemolityczna wahała się między 20 a 40%, co stanowi wartości o minimum 50% niższe niż w przypadku szczepów LLO-OVA.

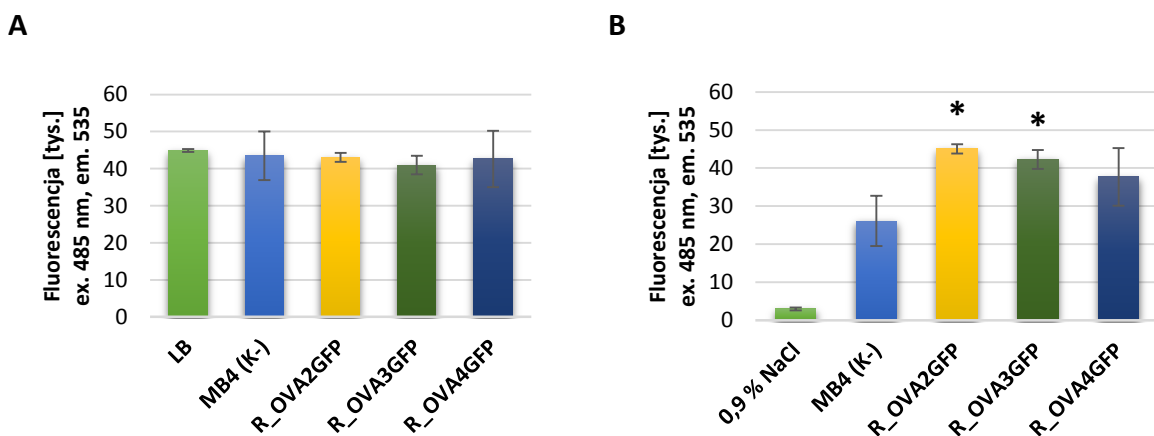


**Rysunek 5.9. Aktywność hemolityczna szczepów *B. subtilis* LLO-OVA-GFP** mierzona w teście hemolitycznym wykorzystującym erythrocyty krwi końskiej. Analizie poddano próbki supernatantu pochodzące z hodowli odmładzanych w podłożu LB do OD<sub>600</sub> równej 3. Test powtarzano trzykrotnie, słupki błędów przedstawiają odchylenie standardowe badanych prób. Szczep MB4 stanowił kontrolę ujemną, a SDS - kontrolą pozytywną (K+).

Niepowodzenia w indukcji aktywności hemolitycznej szczepu *B. subtilis* R\_OVA1GFP skłoniły do sprawdzenia poprawności sekwencji genu *hly* za pomocą reakcji PCR na matrycy DNA chromosomalnego z użyciem starterów pLhly1203 i pRhly2200 okalających gen. Z analizy kolejnych szczepów *B. subtilis* transformowanych plazmidem pUR101GFP wynikało, że amplifikowany fragment ma około dwukrotnie większy rozmiar w stosunku do oczekiwanego (dane nie zamieszczone). Należy zaznaczyć, że sekwencja genu *hly* oraz wstawki na wektorze plazmidowym pUR101GFP były uprzednio analizowane na drodze reakcji PCR, trawienia restrykcyjnego oraz sekwencjonowania, a wyniki powyższych analiz były pozytywne. Niepowodzenia w kolejnych próbach uzyskania prawidłowego szczepu sprawiły, że szczep R\_OVA1GFP wykluczono z dalszych badań. Dla pozostałych szczepów R\_OVA2GFP, R\_OVA3GFP i R\_OVA4GFP uzyskiwano poprawny produkt reakcji PCR przeprowadzanej na matrycy genomowego DNA.

Kolejnym etapem badań była analiza czy produkowane przez *B. subtilis* LLO-OVA-GFP białka fuzyjne ulegają sekrecji do podłoża hodowlanego. Wszystkie fuzyjne proteiny niosą sekwencję sygnałową listeriolizyny O – jej skuteczność w warunkowaniu sekrecji LLO w *B. subtilis* została potwierdzona w toku wcześniejszych badań przeprowadzonych w Zakładzie Mikrobiologii Stosowanej UW. W celu zbadania lokalizacji białek przeprowadzono testy fluorescencji białka GFP z wykorzystaniem czytnika płytek. Pomiaru

dokonywano przy fali wzbudzenia równej 485 nm oraz fali emisji równej 535 nm. Analizowano zarówno fluorescencję pożywki hodowlanej, z której odwirowano komórki bakteryjne, jak i fluorescencję komórek bakteryjnych odseparowanych od medium. Fluorescencja supernatantu mierzona była w odniesieniu do podłoża hodowlanego LB, natomiast próbą odniesienia dla fluorescencji modyfikowanych szczepów był 0,9% roztwór NaCl, w którym zawieszano komórki *B. subtilis*. Pomiarów dokonywano po odpowiednim zaindukowaniu hodowli 1 mM IPTG. Testy wykazały, że we wszystkich analizowanych szczepach R\_OVA2GFP, R\_OVA3GFP i R\_OVA4GFP zachodzi ekspresja fuzyjnych białek. Istotną statystycznie różnicę w poziomie fluorescencji między szczepami LLO-OVA-GFP (R\_OVA2GFP i R\_OVA3GFP) a szczepem o fenotypie dzikim MB4 obserwowano jedynie w przypadku analizy komórek bakteryjnych. Supernatanty hodowlane rekombinowanych szczepów wykazywały natomiast fluorescencję na poziomie zbliżonym do autofluorescencji supernatantu szczepu MB4 (**rysunek 5.10**). Taki wynik świadczy o tym, że białko fuzyjne powstaje, ale nie ulega sekrecji, bądź też ulega sekrecji na bardzo niskim poziomie, w związku z czym supernatanty wykazują fluorescencję na poziomie zbliżonym do fluorescencji podłoża hodowlanego szczepu MB4 nie wytwarzającego białka reporterowego. W związku z wysokim prawdopodobieństwem zajścia blokady sekrecji białek fuzyjnych tą drogą, do dalszych eksperymentów postanowiono wykorzystać jedynie szczepy wytwarzające białka LLO-OVA nie poddane fuzji z białkiem reporterowym.

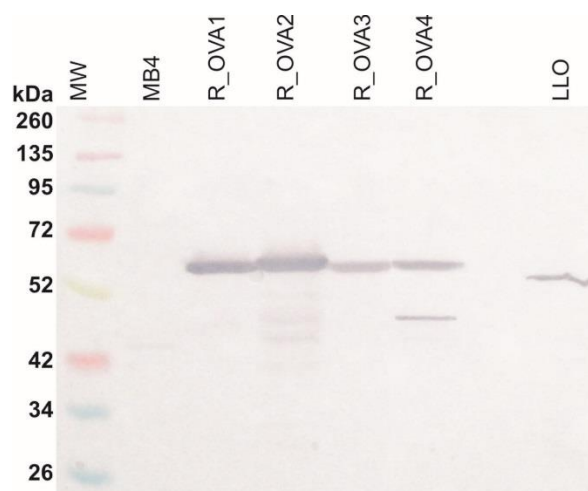


**Rysunek 5.10. Fluorescencja białka GFP obecnego w supernatantach hodowlanych (A) i komórkach bakteryjnych *B. subtilis* LLO-OVA-GFP (B) mierzona za pomocą czytnika płytek Infinite 200 Pro (Tecan). Testy przeprowadzono trzykrotnie, a wyniki poddano analizie za pomocą testu t-Studenta. Gwiazdki oznaczają grupy o wartości  $p < 0,05$  w porównaniu do grupy kontrolnej MB4. **A** – Preparat przygotowywano przez odwirowanie bakterii z 1 ml hodowli zaindukowanej 1 mM IPTG, a tłem fluorescencji było podłoże LB. **B** – Bakterie pochodzące z 1 ml zaindukowanej 1 mM IPTG hodowli odwirowywano i zawieszano w 1 ml 0,9% NaCl, a fluorescencję mierzono względem roztworu 0,9% NaCl.**

### **Detekcja białek fuzyjnych w supernatantach hodowli szczepów *B. subtilis* LLO-OVA**

W zależności od analizowanego szczepu zastosowano różne metody weryfikacji produkcji immunogennych białek. Białka sekrecyjne izolowano metodą precypitacji TCA i etanolem, a następnie rozdzielano w 10% żelu poliakrylamidowym metodą SDS-PAGE. Białka transferowano następnie na membranę nitrocelulozową, którą w technice Western-blot znakowano odpowiednimi przeciwciałami I- oraz II-rzędowymi sprzężonymi z alkaliczną fosfatazą.

Białka fuzyjne LLO-OVA szczepów R\_OVA1 i R\_OVA4 *B. subtilis* zostały zidentyfikowane na podstawie testu Western-blot z wykorzystaniem przeciwciała poliklonalnego anti-LLO. Ze względu na obecność w obrębie białek fuzyjnych jedynie 8-aminokwasowego fragmentu owoalbuminy (epitopu SIINFEKL) nie było możliwe wykorzystanie przeciwciała skierowanego przeciwko owoalbuminie. Szczep R\_OVA1, w przeciwieństwie do innych szczepów *B. subtilis* LLO-OVA, niesie tylko jedną kopię genu *hly* poddanego fuzji do sekwencji epitopu SIINFEKL, który koduje białko LLO-OVA. Nie sklonowano w nim również innych fuzyjnych genów zawierających jego fragment, w związku z czym jedynym białkiem, które mogło być oznaczone w teście było białko fuzyjne LLO-OVA. Przy użyciu narzędzia ExpASy ustalono jego masę molekularną, która wyniosła 59,6 kDa, a więc była zbliżona do masy niezmodyfikowanej listeriolizyny O (58 kDa). Szczep R\_OVA4 niosący dwie kopie genu *hly*, z których jeden ma dołączoną w C-końcu sekwencję epitopu OVA, wytwarza 2 formy toksyny LLO. Jedna z nich jest niezmodyfikowanym białkiem wielkości 58 kDa, natomiast druga to forma skrócona zawierająca fragment białka OVA o wielkości ustalonej w programie ExpASy na 51 kDa. Analizy Western-blot wykonane dla wszystkich uzyskanych szczepów LLO-OVA potwierdziły zdolność do produkcji hemolizyny oraz dowiodły obecności antygenów fuzyjnych LLO-OVA w puli białek sekrecyjnych izolowanych z podłoża hodowlanego szczepów *B. subtilis* R\_OVA1 (białko wielkości około 59 kDa) i R\_OVA4 (białko wielkości około 58 kDa oraz 51 kDa). Membrana została przedstawiona na **rysunku 5.11**.

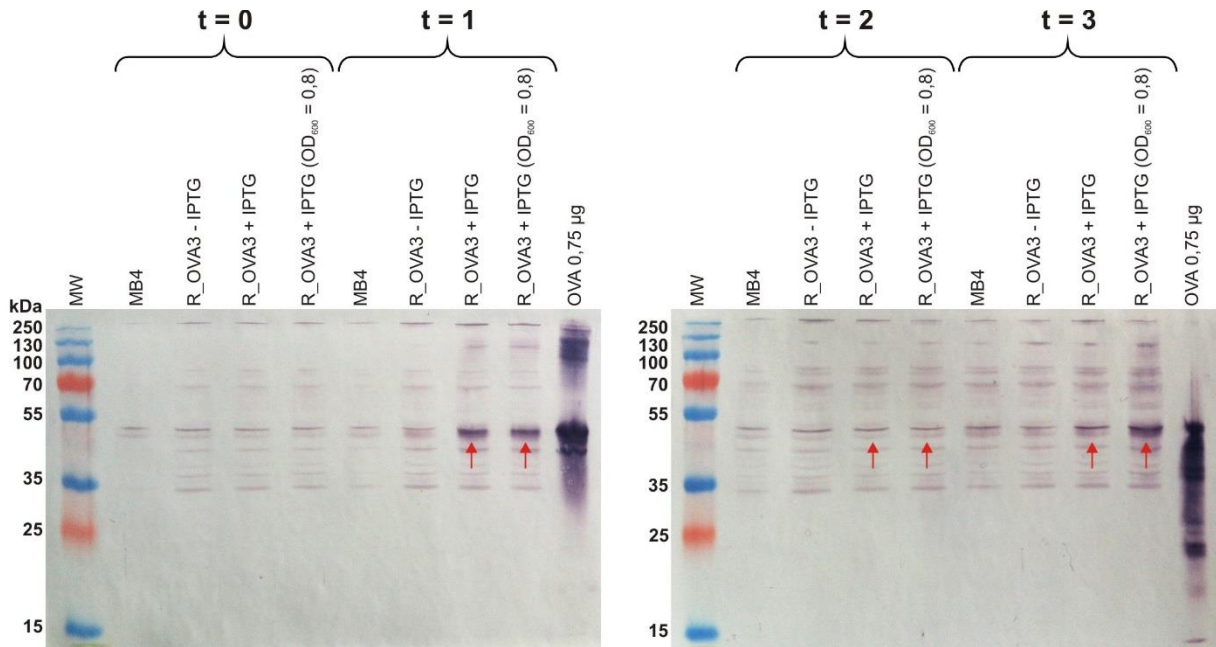


**Rysunek 5.11. Analiza Western-blot białka LLO w supernatantach hodowlanych szczepów *B. subtilis* LLO-OVA.** Bakterie hodowano na podłożu LB z 1 mM IPTG. Białka sekrecyjne izolowano metodą precypitacji TCA i etanolem, po czym rozdzielano je w 10% żelu poliakrylamidowym i poddawano transferowi na membranę nitrocelulozową. Membranę inkubowano z I-rzędowym króliczym poliklonalnym przeciwciałem anti-LLO i II-rzędowym, anti-króliczym przeciwciałem sprzężonym z alkaliczną fosfatazą. Oczyszczone białko LLO stanowiło kontrolę pozytywną. MW – Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder (Thermo Scientific).

Wydzielanie białka fuzyjnego do supernatantu hodowlanego przez szczep R\_OVA3 produkujący pełnej długości owoalbuminę poddaną fuzji do N-końcowego fragmentu LLO potwierdzano poprzez izolację sekrecyjnego proteomu i jego analizę Western-blot z wykorzystaniem poliklonalnego przeciwciała anti-OVA. Masę molekularną białka określono przy użyciu narzędzia ExPASy na 48,2 kDa. Oczyszczona owoalbumina jaja kurzego o masie molekularnej 45 kDa stanowiła kontrolę pozytywną analiz. Wobec niepowodzeń w detekcji białka przy hodowli bakterii w podłożu LB, zastosowano pożywkę minimalną Spizizen'a. Zoptymalizowano również warunki, w których poziom białka w supernatancie hodowlanym jest najwyższy. W tym celu przeprowadzono weryfikację obecności owoalbuminy w różnych przedziałach czasowych od momentu dodania induktora IPTG o końcowym stężeniu 1 mM.

Analizie poddano również czas trwania indukcji – od początku hodowli bądź po osiągnięciu przez nią odpowiedniej gęstości optycznej. Wykazano, że największy poziom ekspresji fuzyjnego antygeny LLO-OVA obserwowany jest po godzinie od dodania induktora IPTG do hodowli odmłodzonej o  $OD_{600}$  równym 0,8. W przypadku szczepu R\_OVA3 indukowanego od początku prowadzenia hodowli, w kolejnych analizowanych godzinach następuje znaczny spadek stężenia białka w supernatancie, o czym świadczy niższa intensywność zabarwienia prążków odpowiadających owoalbuminie. Indukcja po osiągnięciu  $OD_{600}$  równej 0,8 skutkuje natomiast trwalszą ekspresją fuzyjnego białka, które dobrze

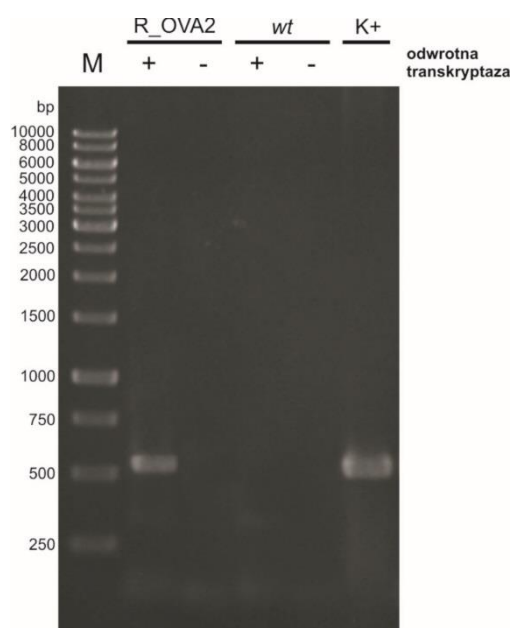
wyznakowane zostało w supernatancie nawet po 3 godzinach od momentu podania induktora. Wyniki przedstawiono na **rysunku 5.12**.



**Rysunek 5.12. Analiza produkcji antygeny fuzyjnego LLO-OVA przez *B. subtilis* R\_OVA3.** Bakterie hodowano na podłożu minimalnym Spizizen'a. Analizowano różne czasy indukcji przez 1 mM IPTG oraz różne momenty dodania induktora. Białka sekrecyjne izolowano metodą precypitacji TCA i etanolem, po czym rozdzielano je w 10% żelu poliakrylamidowym i poddawano transferowi na membranę nitrocelulozową. Membranę inkubowano z I-rzędowym króliczym poliklonalnym przeciwciałem anti-OVA i II-rzędowym, anty-króliczym przeciwciałem sprzężonym z alkaliczną fosfatazą. Oczyszczone białko OVA (Sigma Aldrich) o masie 45 kDa stanowiło kontrolę pozytywną. Czerwone strzałki wskazują prążki odpowiadające owoalbuminie. Czasy (t) zostały podane w odniesieniu do momentu dodania IPTG do hodowli *B. subtilis* R\_OVA3 po osiągnięciu  $OD_{600} = 0,8$ , przy czym t = 0 oznacza moment dodania induktora. MW - PageRuler Plus Prestained Protein Ladder (Thermo Scientific).

Ostatnim szczepem, który zweryfikowano pod kątem zdolności do produkcji antygeny fuzyjnego był *B. subtilis* R\_OVA2. Koduje on krótkie białko o niskiej przewidywanej masie molekularnej (6,2kDa), będące fuzją sekwencji sygnałowej i PEST-podobnej LLO z epitopem SIINFEKL OVA. Ze względu na niewielki rozmiar białka, przeprowadzono rozdzielanie SDS-PAGE w 15% żelu tricinowym oraz transfer na membranę PVDF, jednakże próby wizualizacji prążka odpowiadającego fuzji LLO-OVA w reakcji Western-blot z użyciem przeciwciał anti-LLO i anti-OVA nie przyniosły oczekiwanych rezultatów (dane nie zamieszczone). Za metodę weryfikacji ekspresji fuzyjnego genu przyjęto reakcję odwrotnej transkrypcji. Z komórek bakteryjnych szczepu kontrolnego MB4 oraz R\_OVA2 kodującego antygen hodowanych

w obecności 1 mM IPTG izolowano całkowite RNA, którego integralność potwierdzano w żelu MOPS z 2,2 M formaldehydem. Następnie, RNA poddawano reakcji PCR z użyciem odwrotnej transkryptazy. Za pomocą starterów pRT2Rev przyłączającego się w obrębie sekwencji SIINFEKL i pRT2Fw komplementarnego do końca genu *hly* amplifikowano cDNA o wielkości 514 bp. W eksperymencie potwierdzono obecność transkryptu genu fuzyjnego LLO-OVA w przypadku szczepu R\_OVA2 (rysunek 5.13). Taki wynik sugeruje, że ekspresja białka zachodzi i że szczep może być wykorzystywany w dalszych badaniach mających na celu sprawdzenie potencjału *B. subtilis* do wzbudzania odpowiedzi immunologicznej skierowanej przeciw owoalbuminie jaja kurzego.

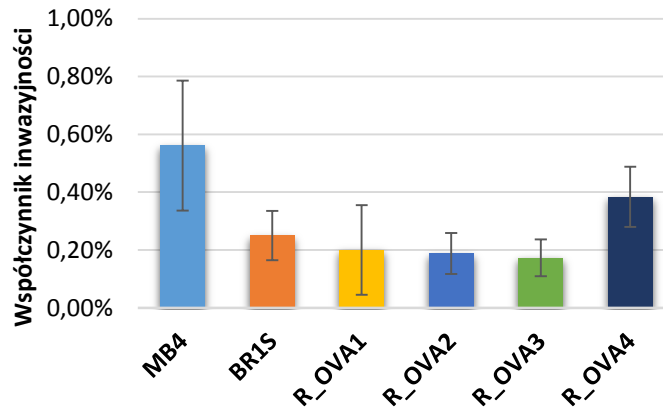


**5.13. Analiza transkrypcji genu fuzyjnego LLO-OVA w komórkach *B. subtilis* R\_OVA2.** Rozdział elektroforetyczny przeprowadzono w 1% żelu agarozowym. Poszczególne ścieżki zawierają produkty reakcji odwrotnej transkrypcji (514 bp) namnożone z użyciem starterów pRT2Rev i pRT2Fw na matrycy cDNA uzyskanego w reakcji odwrotnej transkrypcji z użyciem startera pRT2Rev, z dodatkiem lub bez dodatku odwrotnej transkryptazy. Kontrolę pozytywną stanowił produkt PCR uzyskany przez amplifikację DNA z użyciem polimerazy Taq na matrycy wektora pUR102. M – marker GeneRuler 1 kb DNA Ladder (Thermo Scientific)

### Zdolność szczepów *B. subtilis*-OVA do wnikania do wnętrza komórek APC

Kolejnym etapem analiz niezbędnym do ustalenia parametrów infekcji było określenie inwazyjności szczepów *B. subtilis* produkujących fuzyjne antygeny LLO-OVA. Zdolność do wnikania do wnętrza komórek APC oznaczono na drodze testów gentamycynowych, w których mysie komórki dendrytyczne linii JAWS II infekowano komórkami bakteryjnymi pochodzącymi z odmładzanej w podłożu LB hodowli ( $OD_{600}$  równa 1). W testach stosowano parametr MOI równy 10 oraz czas infekcji równy 30 minut. Z przeprowadzonych eksperymentów wynika, że największą inwazyjnością charakteryzuje się niewytwarzający antygeny LLO-OVA szczep MB4 o fenotypie dzikim. Wszystkie szczepy

wytwarzające toksynę LLO wykazują niższą zdolność do wnikania do komórek eukariotycznych, przy czym nie zaobserwowano istotnych statystycznie różnic między szczepami (rysunek 5.15).



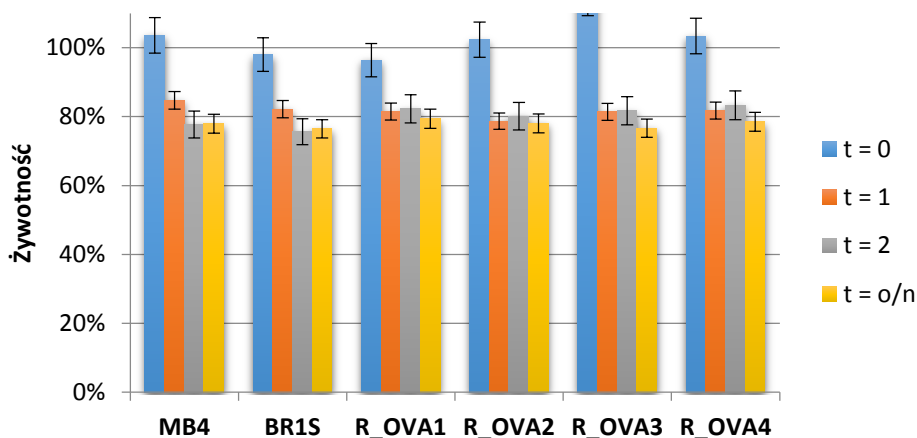
**Rysunek 5.15. Współczynnik inwazyjności (Invasion Index) szczepów *B. subtilis*-OVA.** Mysie komórki dendrytyczne linii JAWS II infekowano bakteriami przy MOI równym 10, a następnie bakterie, które nie zostały zinternalizowane usuwano poprzez inkubację w podłożu z gentamycyną o stężeniu 100 µg/ml. Zainfekowane komórki poddawano dysrupcji Tritonem X-100, a uzyskane preparaty wysiewano na szalki z LB w celu policzenia liczby bakterii odzyskanych z wnętrza komórek eukariotycznych. Współczynnik inwazyjności obliczano jako stosunek liczby bakterii wyizolowanych z komórek eukariotycznych do liczby infekowanych komórek eukariotycznych. Wykres przedstawia wartości średnie z 3 niezależnych pomiarów.

### Żywotność komórek APC infekowanych szczepami *B. subtilis*-OVA

W celu określenia żywotności zainfekowanych komórek eukariotycznych, przeprowadzono analizę z wykorzystaniem barwników fluorescencyjnych kalceiny AM i homodimeru etydyny, będących składnikami zestawu „LIVE/DEAD Viability/Cytotoxicity Kit”. W żywych komórkach wewnątrzkomórkowe esterazy powodują hydrolizę niefluorescencyjnej kalceiny AM do formy emitującej zieloną fluorescencję, co pozwala na oszacowanie żywotności. Homodimer etydyny przenika natomiast jedynie do martwych komórek. Eksperyment przeprowadzono z wykorzystaniem mysich, niedojrzałych komórek dendrytycznych JAWS II. Komórki dendrytyczne infekowano bakteriami pochodzącymi z hodowli odmładzanej do osiągnięcia gęstości optycznej równej 1 ( $\lambda = 600 \text{ nm}$ ) przy MOI równym 10. Parametr MOI został wybrany zgodnie z uzyskanymi wcześniej wynikami wstępnych badań cytotoksyczności i inwazyjności z użyciem szczepu BR1S (rozdział 5.2) – wszystkie szczepy *B. subtilis*-OVA są szczepami pochodnymi BR1S i różnią się od niego tym, że niosą geny kodujące białka fuzyjne LLO-OVA. Bakterie, które nie uległy internalizacji



usuowano poprzez dodatek gentamycyny do podłoża hodowlanego do stężenia 100 µg/ml, po czym komórki eukariotyczne wybarwiano fluorescencyjnymi barwnikami w różnych punktach czasowych, począwszy od momentu zakończenia inkubacji z gentamycyną (czas 0). Żywotność komórek określano jako stosunek komórek żywych, wykazujących fluorescencję kalceiny AM w próbach traktowanych bakteriami w stosunku do próby nieinfekowanych komórek JAWS II, w której wszystkie komórki były żywe. Wykazano, że po godzinie od zakończenia inkubacji komórek z antybiotykiem następuje spadek ich żywotności o około 20% bez względu na zastosowany szczep. Dalsza inkubacja nie powoduje postępującego spadku żywotności komórek dendrytycznych. Dowiedziono także, że nie ma istotnych statystycznie różnic w cytotoksyczności indukowanej przez różne szczepy *B. subtilis*-OVA, w związku z czym w kolejnych etapach badań można stosować takie same parametry infekcji niezależnie od stosowanego szczepu. Wyniki zebrano na **rysunku 5.14**.



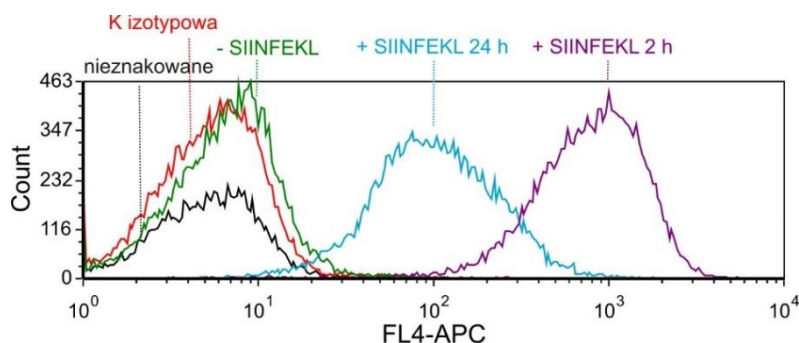
**5.14. Żywotność mysich komórek dendrytycznych linii JAWS II infekowanych bakteriami *B. subtilis*-OVA.** Komórki dendrytyczne infekowano bakteriami odmładzanymi w podłożu LB do osiągnięcia OD<sub>600</sub> równej 1 przy MOI równym 10, a następnie bakterie, które nie zostały zinternalizowane usuwano poprzez inkubację w pożywce z gentamycyną o stężeniu 100 µg/ml. Komórki dendrytyczne znakowano kalceiną AM w różnych przedziałach czasowych, a fluorescencję komórek odczytywano za pomocą fluorymetru. Próbę odniesienia stanowiły komórki dendrytyczne nie poddawane infekcji. Moment zakończenia inkubacji z gentamycyną oznaczony jest jako t = 0, natomiast próby pochodzące z całonocnej inkubacji komórek zostały oznaczone jako t = o/n. Wykres przedstawia wartości średnie z 3 niezależnych pomiarów.



## **Prezentacja epitopu SIINFEKL białka OVA na komórkach dendrytycznych infekowanych *B. subtilis*-OVA**

Jednym z głównych celów przeprowadzonych badań było określenie potencjału szczepów *B. subtilis*-OVA do dostarczania antygenów fuzyjnych LLO-OVA do komórek dendrytycznych i indukcji komórkowej odpowiedzi immunologicznej. Prezentacja antygeny w kontekście MHC I na powierzchni komórek APC jest czynnikiem niezbędnym do zajścia odpowiedzi tego typu, w związku z czym zaplanowano analizę prezentacji epitopu OVA (SIINFEKL) w kontekście MHC klasy I na komórkach dendrytycznych infekowanych szczepami *B. subtilis*-OVA. Jedną z metod oceny prezentacji jest wykorzystanie przeciwciał rozpoznających kompleks prezentowanego peptydu z MHC I. Do znakowania komórek dendrytycznych użyto przeciwciała 25-D1.16 rozpoznającego kompleksy H-2K<sup>b</sup>-OVA<sub>257-264</sub> sprzężonego z fluorochromem APC, a następnie oznaczano fluorescencję przy użyciu cytometru przepływowego FACSCalibur (Porgador i wsp., 1997). Przeciwciała 25-D1.16 umożliwia detekcję kompleksu epitopu owoalbuminy, SIINFEKL prezentowanego w kontekście MHC I, w związku z czym wyeliminowane zostało ryzyko niespecyficznego rozpoznania peptydu niezwiązanego z kompleksami zgodności tkankowej klasy I lub związanego z MHC klasy II.

Pierwszym zadaniem niezbędnym do realizacji eksperymentu i oceny czułości testu było uzyskanie odpowiedniej kontroli pozytywnej, jaką są komórki APC prezentujące oktapeptyd SIINFEKL w kompleksach z cząsteczkami MHC I. Dobrze znanymi sposobami dostarczenia peptydu do cytoplazmy komórki eukariotycznej są elektroporacja bądź transfekcja wykorzystująca nośnik DNA. Przeprowadzono liczne próby elektroporacji z wykorzystaniem elektroporatora BIO-RAD i transfekcji z wykorzystaniem zestawu PULSin (Polyplus), jednak metody te okazały się nieskuteczne w odniesieniu do linii JAWS II ze względu na indukowanie wysokiej śmiertelności komórek (dane nie prezentowane). Alternatywną metodą jest inkubacja komórek w podłożu hodowlanym zawierającym odpowiednie stężenie peptydu – może być on wówczas zaprezentowany na drodze prezentacji krzyżowej w MHC klasy I. Analizie poddano komórki inkubowane z peptydem SIINFEKL przez czas 2 lub 24 godzin, znakowane przeciwciałem 25-D1.16. Ustalono, że krótszy czas inkubacji przyczynia się do uzyskania wyższego poziomu fluorescencji niż w przypadku komórek rosnących w obecności peptydu przez 24 godziny (**rysunek 5.16**).

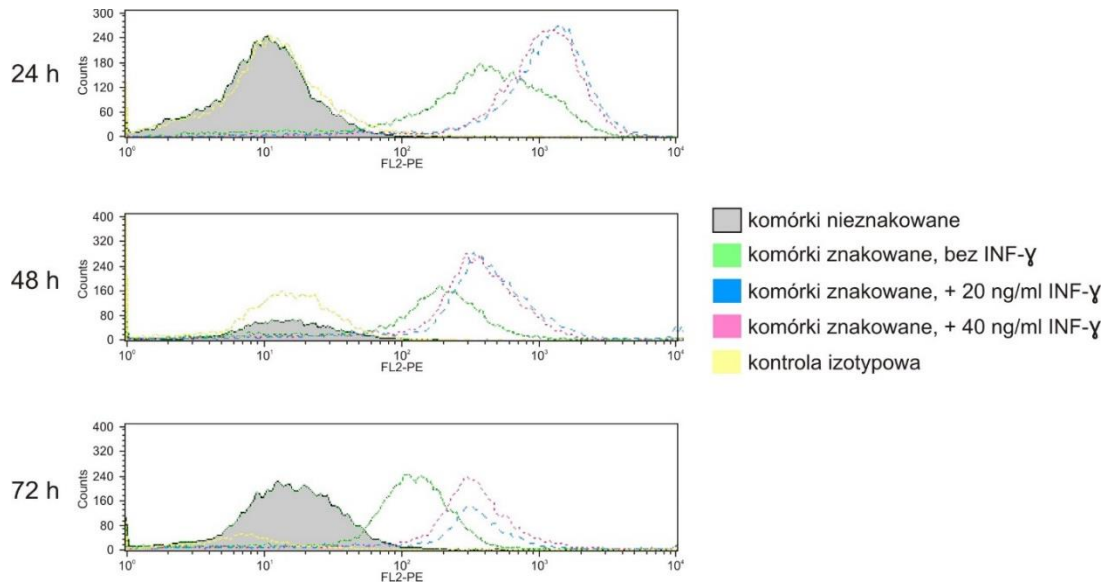


**Rysunek 5.16.** Ekspresja kompleksów MHC I-SIINFEKL na komórkach dendrytycznych JAWS II w zależności od czasu inkubacji z peptydem SIINFEKL. Komórki dendrytyczne hodowano w obecności syntetycznego peptydu SIINFEKL o końcowym stężeniu 1 µg/ml lub bez jego udziału. W czasie 2 lub 24 h od dodania cytokiny komórki znakowano przeciwciałem anti-H2K<sup>b</sup>-SIINFEKL-APC (eBiosciences) i oznaczano ich fluorescencję przy użyciu cytometru przepływowego FACSCalibur. Analizę przeprowadzono w programie FCS Express.

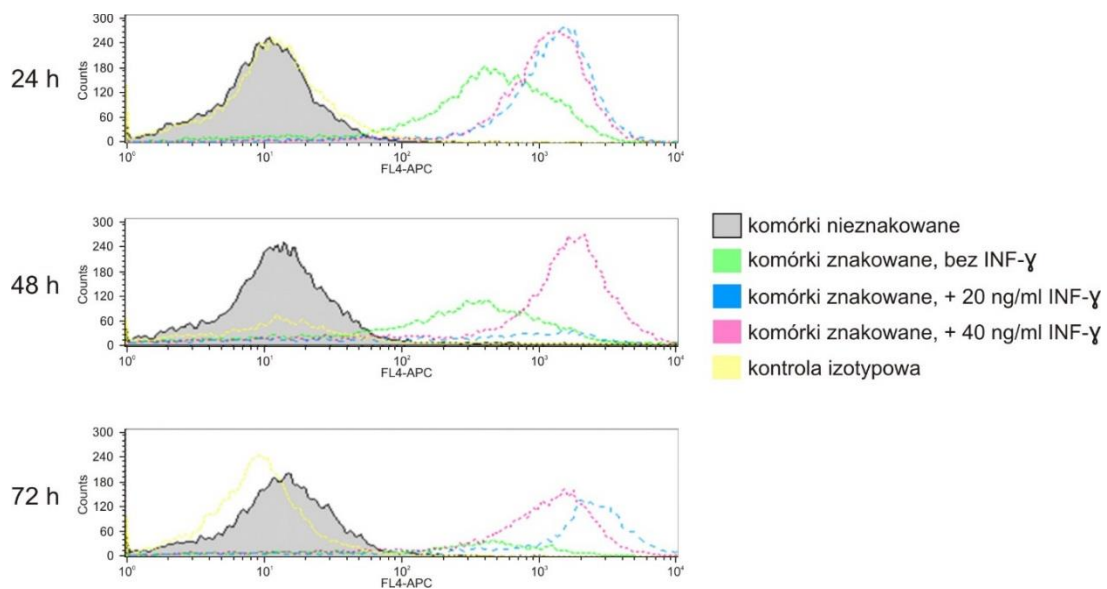
Wstępne analizy prezentacji epitopu OVA na infekowanych *B. subtilis* komórkach dendrytycznych nie przyniosły pozytywnych rezultatów. Za jedną z możliwych przyczyn niepowodzenia uznano niski poziom ekspresji kompleksów MHC na powierzchni. Jedną z cytokin, która znacząco wpływa na ekspresję MHC jest interferon- $\gamma$  (INF- $\gamma$ ). Przeprowadzono analizę ekspresji MHC w zależności od czasu inkubacji z cytokiną oraz jej stężenia w hodowli. Komórki dendrytyczne hodowano w obecności INF- $\gamma$  przez czas 24, 48 lub 72 godzin, następnie znakowano komórki przeciwciałami rozpoznającymi MHC I (anty-H-2K<sup>b</sup>) lub kompleks MHC I-SIINFEKL (anty-H-2K<sup>b</sup>-OVA<sub>257-264</sub>) i oznaczano fluorescencję komórek przy użyciu cytometru przepływowego. Analizy z wykorzystaniem przeciwciała rozpoznającego cząsteczki MHC I dowiodły, że już 24-godzinna inkubacja z INF- $\gamma$  powodowała wzrost ekspresji molekuł MHC I na powierzchni komórek dendrytycznych, przy czym jego wartość była niezależna od zastosowanego stężenia cytokiny (20 lub 40 ng/ml). Dalsza inkubacja komórek JAWS II z INF- $\gamma$  nie spowodowała natomiast dalszego wzrostu ekspresji MHC I, co obserwowano zarówno w przypadku mniejszego, jak i większego stężenia cytokiny. Wyniki zebrano na **rysunku 5.17**.

Równocześnie przeprowadzono analizę ekspresji kompleksów MHC I-SIINFEKL na komórkach dendrytycznych inkubowanych z syntetycznym peptydem SIINFEKL w zależności od stężenia INF- $\gamma$  i czasu inkubacji z cytokiną. Podobnie jak w przypadku analiz ekspresji cząsteczek MHC I, już 24-godzinna hodowla z INF- $\gamma$  znacznie podniosła ekspresję kompleksów MHC I-SIINFEKL na komórkach JAWS II. Oba analizowane stężenia cytokiny przyczyniły się ponadto do jednakowego wzrostu ekspresji kompleksów, a dalsza hodowla

z cytokiną nie spowodowała postępującego zwiększania liczby cząsteczek MHC I–SIINFEKL (rysunek 5.18).

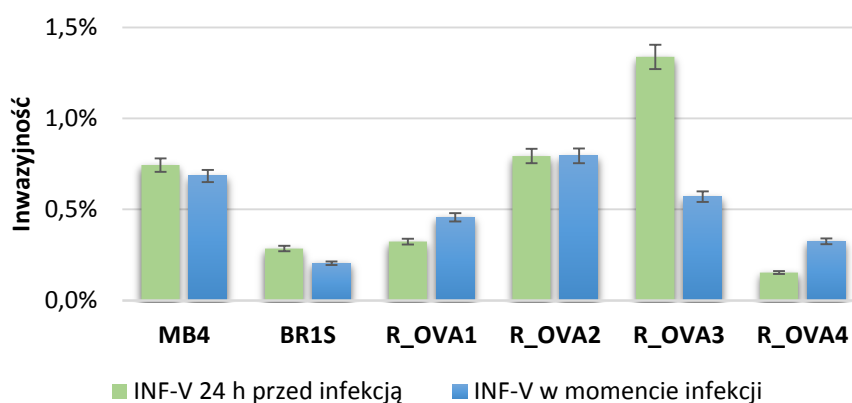


**Rysunek 5.17. Ekspresja cząsteczek MHC klasy I na komórkach dendrytycznych JAWS II w zależności od obecności INF-γ.** Komórki dendrytyczne hodowano w obecności INF-γ (o stężeniu 20 lub 40 ng/ml) lub bez jego udziału. W czasie 24, 48 lub 72 h od dodania cytokiny komórki znakowano przeciwciałem anti-MHC I–PE (H-2K<sup>b</sup>) BD Biosciences i oznaczano ich fluorescencję przy użyciu cytometru przepływowego FACSCalibur. Analizę przeprowadzono w programie CellQuest.



**Rysunek 5.18. Ekspresja cząsteczek MHC klasy I w kompleksie z epitopem SIINFEKL OVA na komórkach dendrytycznych JAWS II w zależności od obecności INF-γ.** Komórki dendrytyczne hodowano z peptydem SIINFEKL w obecności INF-γ (o stężeniu 20 lub 40 ng/ml) lub bez cytokiny. W czasie 24, 48 lub 72 h od dodania cytokiny komórki znakowano przeciwciałem anti-H2Kb–SIINFEKL-APC (eBiosciences) i oznaczano ich fluorescencję przy użyciu cytometru przepływowego FACSCalibur. Analizę przeprowadzono w programie CellQuest.

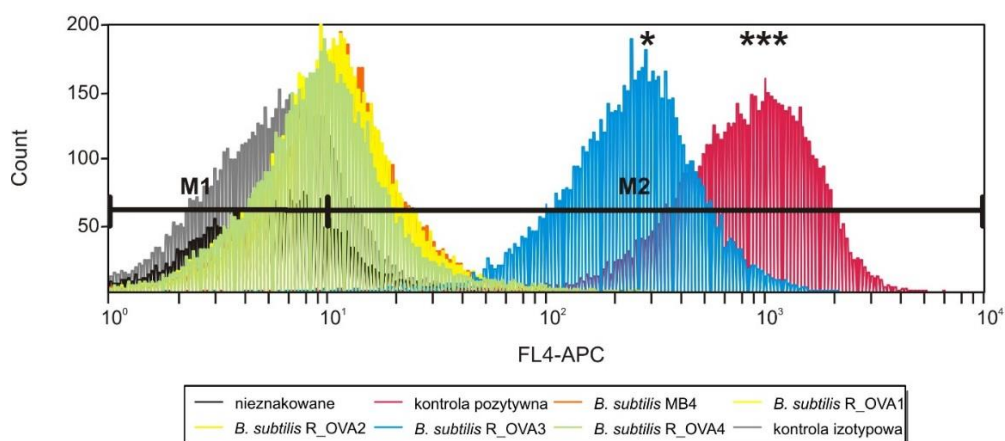
INF- $\gamma$  jest cytokiną, która stymuluje dojrzewanie komórek dendrytycznych i przez to może powodować obniżenie ich właściwości fagocytarnych. W celu ustalenia czy cytokina powinna być dodawana już przed infekcją komórek JAWS II bakteriami czy dopiero po infekcji, przeprowadzono analizę inwazyjności szczepów w zależności od momentu dodania interferonu- $\gamma$ . W eksperymencie cytokinę dodawano do hodowli komórek eukariotycznych 24 godziny przed infekcją lub wraz z jej początkiem. W obu wariantach po infekcji komórki dendrytyczne hodowano w obecności INF- $\gamma$  przez dalsze 24 godziny. Nie zaobserwowano znaczących różnic w inwazyjności szczepów *B. subtilis* LLO-OVA względem analizowanych wariantów komórek dendrytycznych. Uzyskane w toku powyższych analiz wyniki doprowadziły do opracowania nowego protokołu przygotowania komórek do infekcji i dalszej analizy prezentacji antygenów produkowanych przez *B. subtilis*. Ustalono, że w dalszych eksperymentach stosowana będzie wcześniejsza, 24-godzinna inkubacja komórek dendrytycznych z INF- $\gamma$  stymulującą ich dojrzewanie oraz zwiększenie ekspresji MHC klasy na ich powierzchni, co ułatwi detekcję kompleksów MHC I-SIINF EKL na infekowanych *B. subtilis* komórkach. Wyniki przedstawia rysunek 5.19.



**Rysunek 5.19. Współczynnik inwazyjności (Invasion Index) szczepów *B. subtilis*-OVA w zależności od momentu dodania INF- $\gamma$ .** Cytokinę dodawano do hodowli mysich komórek dendrytycznych linii JAWS II 24 h przed infekcją lub w jej momencie, a inkubację kontynuowano przez czas 24 h od momentu dodania bakterii. Komórki dendrytyczne infekowano przy MOI równym 10, a następnie bakterie, które nie zostały zinternalizowane usuwano poprzez inkubację w podłożu z gentamycyną o stężeniu 100  $\mu\text{g/ml}$ . Zainfekowane komórki poddawano dysrupcji Tritonem X-100, a uzyskane preparaty wysiewano na szalki z LB w celu policzenia liczby bakterii odzyskanych z wnętrza komórek eukariotycznych. Współczynnik inwazyjności obliczano jako stosunek liczby bakterii wyizolowanych z komórek eukariotycznych do liczby infekowanych komórek eukariotycznych. Wykres przedstawia wartości średnie z 3 niezależnych pomiarów.

W głównej części eksperymentu, komórki dendrytyczne infekowano szczepami *B. subtilis*-OVA zgodnie z ustalonymi wcześniej parametrami, zewnątrzkomórkowe bakterie

usuowano i kontynuowano hodowlę przez 24 godziny. Komórki dendrytyczne znakowano przeciwciałem 25-D1.16, a następnie określano fluorescencję przy użyciu cytometru przepływowego FACSCalibur. Każdemu pomiarowi prezentacji epitopu OVA w kontekście MHC klasy I towarzyszyła analiza aktywności hemolitycznej oraz inwazyjności wszystkich stosowanych w eksperymencie szczepów, co przynosiło kompleksowe informacje na temat przebiegu eksperymentu i aktywacji szczepów. Analizy dowiodły, że przy zachowanej inwazyjności i hemolityczności jedynie szczep R\_OVA3 *B. subtilis* wytwarzający pełnej długości białko OVA poddane fuzji do N-terminalnej sekwencji listeriolizyny O przyczynia się do prezentacji peptydu SIINFEKL w kompleksach z cząsteczkami MHC I, co wyrażało się w znacznym wzroście fluorescencji fluorochromu APC na infekowanych tym szczepem komórkach względem komórek niezakażanych bakteriami. Obserwowano również znaczny poziom prezentacji epitopu OVA na komórkach JAWS II hodowanych w obecności syntetycznego peptydu SIINFEKL (**rysunek 5.20**). Pozostałe szczepy, które wytwarzają białka fuzyjne zawierające jedynie epitop OVA nie powodują prezentacji w kontekście MHC I, pomimo że w eksperymencie potwierdzono ich inwazyjność na drodze testu gentamycynowego oraz indukcję ekspresji spod promotora  $p_{spac}$  na drodze testu hemolitycznego.



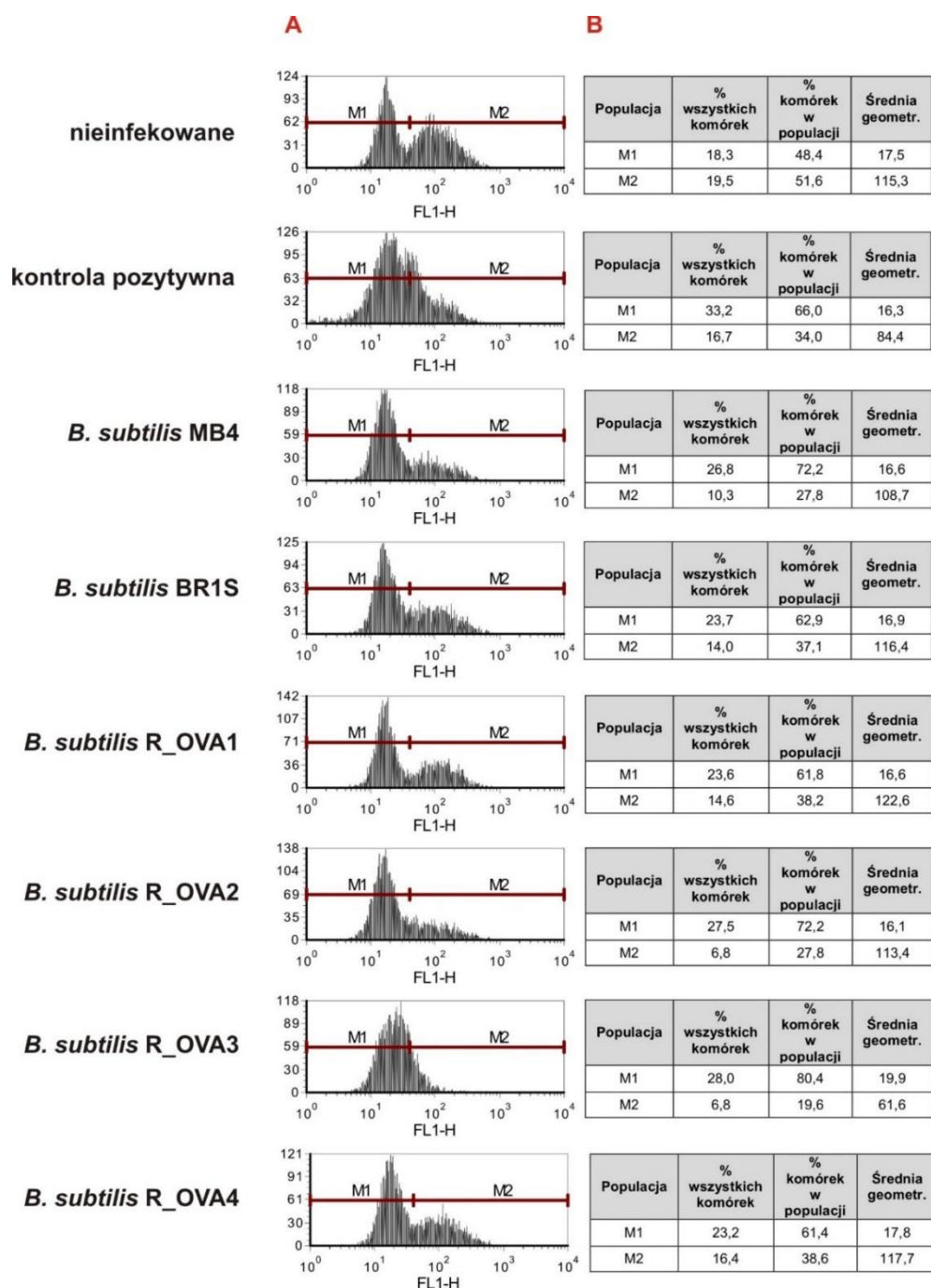
**Rysunek 5.20. Prezentacja epitopu SIINFEKL OVA w kontekście MHC klasy I na komórkach dendrytycznych JAWS II infekowanych szczepami *B. subtilis* produkującymi białka fuzyjne LLO-OVA.** Komórki dendrytyczne infekowano bakteriami, a po 24-godzinnej inkubacji znakowano przeciwciałem anti-H-2K<sup>b</sup>-SIINFEKL-APC (eBiosciences) i oznaczano ich fluorescencję przy użyciu cytometru przepływowego FACSCalibur. Kontrolę pozytywną stanowiły komórki JAWS II inkubowane z syntetycznym peptydem SIINFEKL. Eksperyment przeprowadzono w trzech powtórzeniach, a analizę statystyczną sporządzono w oparciu o test t-Studenta. Gwiazdki oznaczają grupy o wartości  $p < 0,05$  (\*) i  $p < 0,001$  (\*\*\*) w porównaniu do grupy kontrolnej MB4. **M1** i **M2** – bramki określające populacje limfocytów OT-I różniące się poziomem fluorescencji APC. Na rysunku przedstawiono reprezentacyjny histogram. Analizę przeprowadzono w programie FCS Express.

## **Aktywacja limfocytów CD8<sup>+</sup> w odpowiedzi na prezentację epitopu SIINFEKL na komórkach dendrytycznych infekowanych *B. subtilis*-OVA**

W celu dalszego zbadania potencjału szczepów wytwarzających białka LLO-OVA do indukcji odpowiedzi komórkowej, przeprowadzono analizę *ex vivo*, w której oznaczano proliferację cytotoksycznych limfocytów T w odpowiedzi na prezentację peptydu SIINFEKL na infekowanych bakteriami komórkach. Limfocyty OT-I izolowane z węzłów chłonnych myszy OT-I posiadają transgeniczny receptor TCR, który został zaprojektowany tak, aby rozpoznawać aminokwasy 257 – 264 owoalbuminy jaja kurzego (SIINFEKL), prezentowane w kontekście cząsteczek H-2K<sup>b</sup> (Albaghdadi i wsp., 2012). Limfocyty znakowano umożliwiającym śledzenie proliferacji barwnikiem CFSE, a następnie inkubowano je z komórkami dendrytycznymi uprzednio zainfekowanymi przez szczepy *B. subtilis*-OVA. Bardzo istotny był wybór linii komórek APC o genotypie zgodnym z genotypem limfocytów użytych w doświadczeniu. W przypadku niezgodności niemożliwe byłoby rozpoznanie kompleksów MHC I i aktywacja limfocytów T. Prezentacja epitopu SIINFEKL w kontekście MHC I powoduje aktywację limfocytów OT-I, która prowadzi do proliferacji i postępującego z kolejnymi podziałami rozcieńczania CFSE akumulowanego w cytoplazmie komórek dendrytycznych, co można zaobserwować na histogramie w postaci pików o niższej fluorescencji.

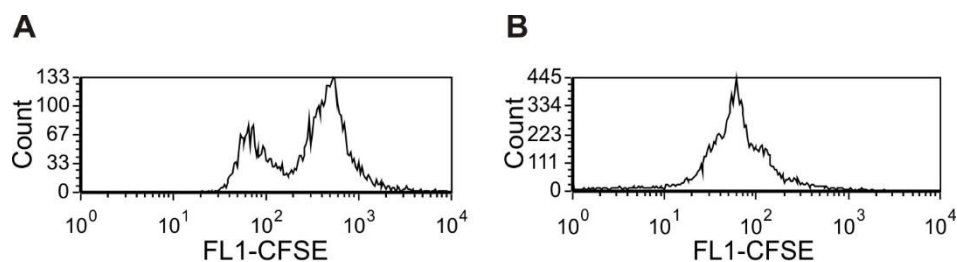
Po zakończeniu inkubacji komórek APC ze znakowanymi komórkami OT-I, zebrane limfocyty barwiono przeciwciałami anti-CD4 i anti-CD8, aby zawęzić obszar badań do limfocytów cytotoksycznych (CD8<sup>+</sup>), po czym cytometrycznie oznaczano ich fluorescencję. Fluorescencję CFSE oznaczano w populacji komórek CD8<sup>+</sup> CD4<sup>-</sup>. W toku badań zaobserwowano, że po 72 godzinach od momentu infekcji i dodania limfocytów do hodowli JAWS II, jedynie komórki infekowane szczepem R\_OVA3 lub inkubowane z peptydem SIINFEKL (kontrola pozytywna) ulegają podziałom (**rysunek 5.21**). Znakiem zajścia podziałów komórkowych jest obecność jednego, a nie dwóch pików fluorescencji na histogramie w porównaniu do kontroli negatywnej (limfocytów inkubowanych z nieinfekowanymi komórkami lub komórkami zakażanymi szczepem MB4 o fenotypie dzikim). W celu sprawdzenia czy taki nietypowy wzór fluorescencji świadczy o proliferacji, badania *ex vivo* zostały powtórzone, potwierdzając wyniki poprzednich eksperymentów. Dodatkowo, przeprowadzono analizę modelu proliferacji komórek JAWS II, wykorzystując przeciwciała

aktywujące proliferację limfocytów CD8<sup>+</sup> łączące się markerami powierzchniowymi CD3 i CD28. Miała ona na celu wykluczenie błędu pomiarowego i potwierdzenie nietypowego wzoru proliferacji użytych limfocytów Tc (rysunek 5.22).



**Rysunek 5.21. Proliferacja limfocytów OT-I w odpowiedzi na prezentację epitopu OVA na komórkach dendrytycznych JAWS II infekowanych *B. subtilis*-OVA.** Limfocyty OT-I znakowane CFSE inkubowano przez 72 h z komórkami dendrytycznymi uprzednio infekowanymi bakteriami. Kontrolę negatywną stanowiły limfocyty inkubowane z komórkami JAWS II nieinfekowanymi bakteriami, a kontrolę pozytywną – limfocyty hodowane z komórkami dendrytycznymi w obecności syntetycznego peptydu SIINFEKL. Analizę przeprowadzono w programie FCS Express. **A** – histogram prezentujący fluorescencję CFSE limfocytów CD8<sup>+</sup>. **B** – analiza statystyczna. **M1** i **M2** – bramki określające populacje limfocytów OT-I różniące się poziomem fluorescencji CFSE.





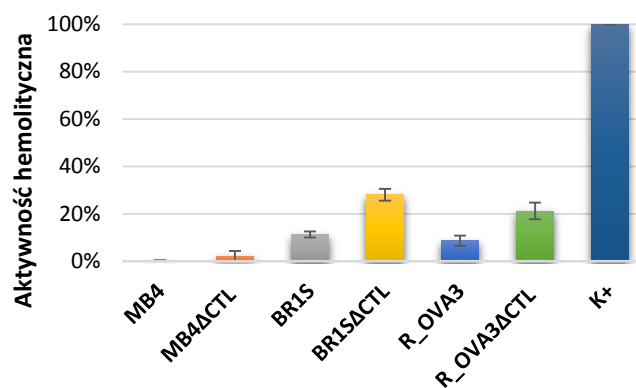
**Rysunek 5.22. Analiza modelu aktywacji limfocytów OT-I.** Limfocyty OT-I znakowane CFSE inkubowano z przeciwciałami anti-CD3 i anti-CD28. Kontrolę negatywną stanowiły nieaktywowane limfocyty. Po aktywacji komórki znakowano przeciwciałami anti-CD4 i anti-CD8 i poddawano pomiarom w cytometrze przepływowym. Analizę przeprowadzono w programie FCS Express. **A** – fluorescencja CFSE nieaktywowanych limfocytów OT-I, **B** – fluorescencja CFSE aktywowanych limfocytów CFSE. Analizę przeprowadzono w programie FCS Express.

#### 5.4. Analiza wpływu delekcji linkera CTL w chaperonie SecA na sekrecję OVA

##### Uzyskanie szczepów pochodnych *B. subtilis* BR1S i R\_OVA3 niosących mutację w genie *secA*

Badania przeprowadzone przez Kakeshita i wsp. (2010) dowiodły, że delekcja C-końcowej części 841-aminokwasowego białka *SecA* *B. subtilis* (części CTL, C-terminalnego linkera) nie jest mutacją letalną oraz nie hamuje transportu z udziałem ścieżki Sec, a co więcej, wpływa na niemal 2-krotne zwiększenie sekrecji białek heterologicznych. Ustalili oni również, że obszar DNA, którego usunięcie wpływa na poprawę zewnątrzkomórkowej produkcji białek heterologicznych dotyczy sekwencji kodującej aminokwasy od 780 do 819. W celu uzyskania wektora jeszcze wydajniej transportującego białko OVA poza komórkę bakteryjną, dokonano delekcji linkera CTL w szczepie R\_OVA3, uzyskując szczep R\_OVA3ΔCTL. Uzyskano również szczepy kontrolne MB4ΔCTL i BR1SΔCTL pozbawione linkera. Dokładny opis konstrukcji znajduje się w **załączniku 8.5**. Zmodyfikowane szczepy poddano ocenie zdolności do lizy erytrocytów na podstawie testu hemolitycznego z wykorzystaniem erytrocytów krwi końskiej (bakterie odmładzano w LB do osiągnięcia gęstości optycznej OD<sub>600</sub> równej 2). Wyniki testu zebrano na **rysunku 5.23**. Wykazano, że szczepy posiadające delekcję linkera CTL w chaperonie SecA wykazują ponad 2-krotnie wyższą aktywność hemolityczną w stosunku do szczepów wyjściowych nie niosących delekcji.

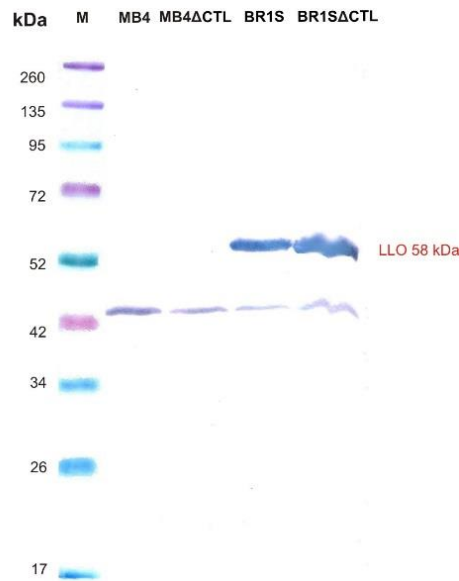




**Rysunek 5.23. Aktywność hemolityczna deletantów CTL w genie *secA*** mierzona w teście hemolitycznym wykorzystującym erythrocyty krwi końskiej. Analizie poddano próbki supernatantu pochodzące z hodowli odmładzanych w podłożu LB do OD<sub>600</sub> równej 2. Test powtarzano trzykrotnie, słupki błędów przedstawiają odchylenie standardowe badanych prób. Szczep MB4 stanowił kontrolę ujemną, a SDS - kontrolą pozytywną.

### **Analiza sekrecji białek heterologicznych w zmutowanych szczepach *B. subtilis* BR1SΔCTL oraz R\_OVA3ΔCTL**

W celu dokonania analizy różnic w sekrecji białek heterologicznych przez uzyskane szczepy *B. subtilis*, przeprowadzono izolację białek supernatantu metodą precypitacji kwasem trichlorooctowym (TCA) oraz etanolem. Hodowle bakteryjne odmładzano do OD = 2 – każdy analizowany szczep musiał posiadać równą gęstość optyczną, aby możliwe było uwidocznienie różnic w transporcie białek na zewnątrz komórki bakteryjnej. Oba hodowane szczepy wykazywały takie same tempo wzrostu jak szczepy o niezmienionym fenotypie, co sugeruje, że domena CTL nie warunkuje żywotności komórek bakteryjnych. Pomiar ilości białka był wykonany metodą Bradford. Próbkę zawierającą taką samą ilość pozakomórkowych białek rozdzielano metodą SDS-PAGE w 10% żelu poliakrylamidowym i następnie poddawano je transferowi na membranę nitrocelulozową. Białka egzoproteomu były wizualizowane metodą Western-blot z wykorzystaniem przeciwciał I rzędowych anti-LLO i oraz II-rzędowych sprzężonych z alkaliczną fosfatazą, wiążących przeciwciała I-rzędowe. Wykonana za pomocą programu ImageJ analiza intensywności zabarwienia prążków wyznakowanej przeciwciałami listeriolizyny O o masie cząsteczkowej 58 kDa dowiodła, że szczep BR1SΔCTL wytwarza niemal 2 razy więcej toksyny niż szczep z niemodyfikowanym chaperonem SecA (**rysunek 5.24**). O zwiększonym wydzielaniu listeryjnego białka do podłoża hodowlanego świadczy również intensywniejsze wybarwienie prążka LLO w żelu SDS-PAGE.



**Rysunek 5.24. Analiza produkcji toksyny LLO przez szczepy *B. subtilis* niosące delecję w genie CTL.** Bakterie hodowano na podłożu LB do osiągnięcia  $OD_{600}$  równej 0,8. Białka sekrecyjne izolowano metodą precypitacji TCA i etanolem, po czym rozdzielano je w 10% żelu poliakrylamidowym i poddawano transferowi na membranę nitrocelulozową. Membranę inkubowano z I-rzędowym króliczym poliklonalnym przeciwciałem anti-LLO i II-rzędowym, anty-króliczym przeciwciałem sprzężonym z alkaliczną fosfatazą. M – Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder (Thermo Scientific).

Mimo licznych prób i modyfikacji warunków immunodetekcji metodą Western-blot, w przeprowadzonych doświadczeniach nie udało się doprowadzić do wyznakowania owoalbuminy produkowanej przez szczepy R\_OVA3ΔCTL. Na membranie uwidocznione było jedynie niespecyficzne wiązanie przeciwciała do wielu białek supernatantu zarówno szczepu o fenotypie dzikim MB4, jak i szczepów produkujących heterologiczne białko. Ze względu na niepowodzenie w uzyskaniu szczepu wydajniej wydzielającego białko OVA, nie przeprowadzono dalszych eksperymentów z wykorzystaniem R\_OVA3ΔCTL i mających na celu zbadanie potencjału do wzbudzenia prezentacji antygeny OVA na komórkach APC.

## 5.5. Analiza ekspresji Ag85B *M. tuberculosis* w *B. subtilis* oraz potencjału szczepów *B. subtilis*-Ag85B do immunizacji myszy

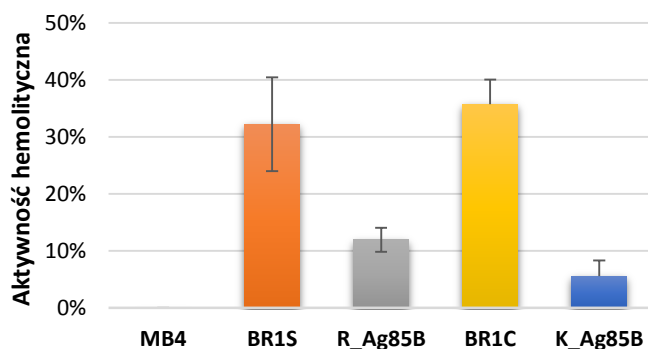
### Konstrukcja szczepów *B. subtilis* wytwarzających Ag85B *M. tuberculosis*

Wyniki badań nad ekspresją modelowego antygeny OVA w *B. subtilis* posłużyły do opracowania konstrukcji służącej do uzyskania szczepu produkującego antygen

prokariotyczny - sekrecyjną formę głównego antygeny *M. tuberculosis*, Ag85B. Ustalono, że stworzony zostanie szczep o konstrukcji analogicznej do R\_OVA3, wytwarzający pełnej długości białko poddane fuzji do N-terminalnej części LLO zawierającej sekwencję sygnałną oraz PEST-podobną. Stworzono dwa szczepy: R\_Ag85B produkujący antygen w obecności induktora IPTG oraz K\_Ag85B konstytutywnie wytwarzający białko. Opis konstrukcji wektorów plazmidowych oraz uzyskania szczepów *B. subtilis* za ich pomocą został przedstawiony w załączniku 8.6.

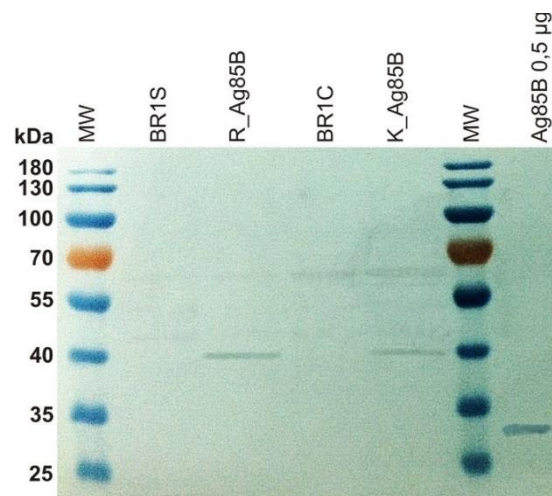
### Analiza aktywności hemolitycznej i sekrecji Ag85B

Kolejnym krokiem było przeprowadzenie testu hemolitycznego, który miał na celu sprawdzenie zdolności transformantów do produkcji listeriolizyny O i zbadanie czy zachodzi ekspresja spod promotora  $p_{spac}$ . Bakterie hodowano w 30°C w pożywce LB do uzyskania gęstości optycznej równej 2 ( $\lambda = 600$  nm). Analiza potwierdziła aktywność hemolityczną obu uzyskanych szczepów (rysunek 5.25), przy czym szczep konstytutywnie produkujący antygen wykazywał dwukrotnie niższą aktywność (6%) niż szczep indukowalny (12%). Ponadto, szczepy produkujące antygen gruźliczy cechowała obniżona aktywność hemolityczna w stosunku do odpowiadającym im szczepów BR1S (32%) i BR1C (36%) nie wytwarzających białka Ag85B.



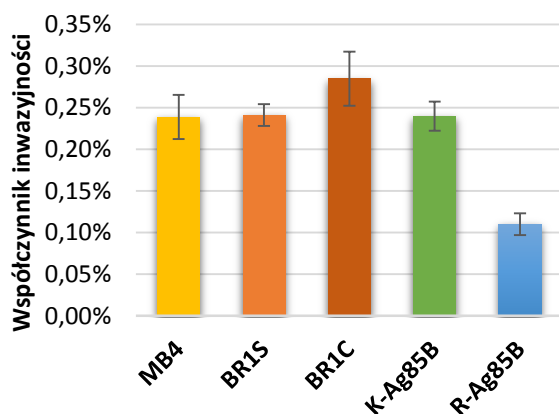
**Rysunek 5.25. Aktywność hemolityczna szczepów *B. subtilis* wytwarzających białko Ag85B** mierzona w teście hemolitycznym wykorzystującym erythrocyty krwi końskiej. Analizie poddano próbki supernatantu pochodzące z hodowli odmładzanych w podłożu LB do  $OD_{600}$  równej 2. Test powtarzano trzykrotnie, słupki błędów przedstawiają odchylenie standardowe badanych prób. Szczep MB4 stanowił kontrolę ujemną, a SDS - kontrolę pozytywną.

Następnie potwierdzono obecność immunogennego białka w supernatantach hodowlanych *B. subtilis*. Z podłoża hodowlanego metodą precypitacji TCA i etanolem izolowano sekrecyjne białka, które rozdzielano w 10% żelu poliakrylamidowym i poddawano transferowi na membranę nitrocelulozową. Membranę znakowano następnie przeciwciałem anti-Ag85B w technice Western-blot. Analizy dowiodły, że białko Ag85B o przewidzianej za pomocą oprogramowania ExPASy masie molekularnej 39,7 kDa jest obecne w supernatantach hodowlanych obu szczepów niosących fuzyjny gen *hly-fbpB* (rysunek 5.26).



**Rysunek 5.26. Analiza Western-blot białka Ag85B w supernatantach hodowlanych szczepów *B. subtilis* LLO-Ag85B.** Bakterie hodowano na podłożu LB z 1 mM IPTG (szczepy BR1S i R\_Ag85B). Białka sekrecyjne izolowano metodą precypitacji TCA i etanolem, po czym rozdzielano je w 10% żelu poliakrylamidowym i poddawano transferowi na membranę nitrocelulozową. Membranę inkubowano z I-rzędowym króliczym poliklonalnym przeciwciałem anti-Ag85B i II-rzędowym, anti-króliczym przeciwciałem sprzężonym z alkaliczną fosfatazą. Oczyszczone białko Ag85B (Abcam) o masie 30 kDa stanowiło kontrolę pozytywną. MW - PageRuler Prestained Protein Ladder (Life Technologies).

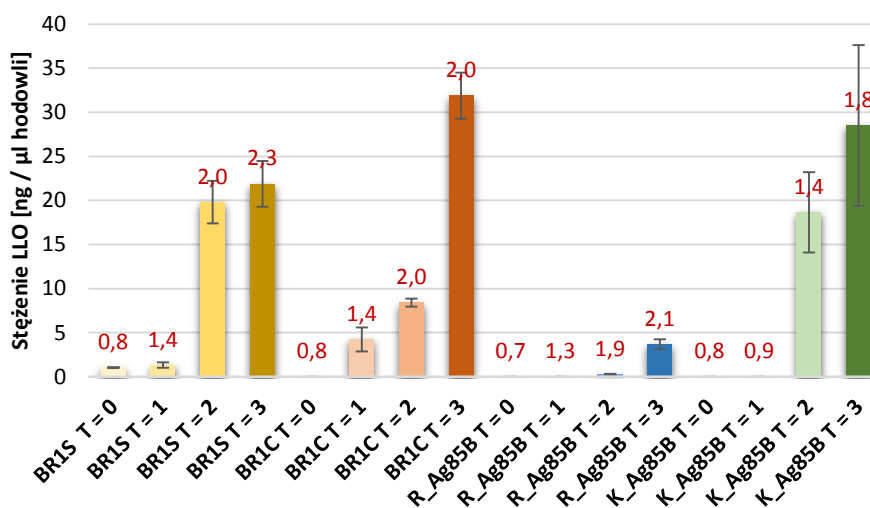
Weryfikacji poddano również inwazyjność szczepów *B. subtilis* wytwarzających Ag85B, gdyż zdolność do wnikania do komórek eukariotycznych warunkuje skuteczne dostarczanie antygeny do cytoplazmy komórek APC i wywołanie odpowiedzi immunologicznej. Wyniki testu gentamycynowego z udziałem komórek dendrytycznych JAWS II świadczą o tym, że oba produkujące gruźlicze białko szczepy są z powodzeniem fagocytowane przez komórki APC. Szczep K\_Ag85B wykazuje inwazyjność wynoszącą 0,24% nie różniącą się od inwazyjności szczepów wytwarzających jedynie LLO (BR1S – 0,24% i BR1C – 0,29%). Obniżoną podatność na fagocytozę wykazuje natomiast szczep R\_Ag85B indukowany IPTG (0,10%). Wyniki zebrano na **rysunku 5.27**.



**Rysunek 5.27. Współczynnik inwazyjności (Invasion Index) szczepów *B. subtilis*-OVA.** Mysie komórki dendrytyczne linii JAWS II infekowano bakteriami przy MOI równym 10, a następnie bakterie, które nie zostały zinternalizowane usuwano poprzez inkubację w podłożu z gentamycyną o stężeniu 100 µg/ml. Zainfekowane komórki poddawano dysrupcji Tritonem X-100, a uzyskane preparaty wysiewano na szalki z LA w celu policzenia liczby bakterii odzyskanych z wnętrza komórek eukariotycznych. Współczynnik inwazyjności obliczano jako stosunek liczby bakterii wyizolowanych z komórek eukariotycznych do liczby infekowanych komórek eukariotycznych. Wykres przedstawia wartości średnie z 3 niezależnych pomiarów.

### Pomiar stężenia LLO w supernatantach hodowlanych

Określenie ilości toksyny LLO w supernatantach hodowlanych *B. subtilis* ze względu na jej cytotoksyczność było niezbędne do prawidłowego dobrania parametrów zaplanowanych dalej analiz, takich jak pomiar dawki letalnej LD<sub>50</sub> czy szczepienie myszy. Przeprowadzono testy dot-blot, w których analizowano ilość LLO w supernatantach hodowlanych pochodzących z różnych punktów czasowych. Ilość LLO określano w odniesieniu do preparatu oczyszczonej toksyny o znanym stężeniu (**rysunek 5.28**).



**Rysunek 5.28. Stężenie LLO w supernatantach hodowlanych *B. subtilis*.** Bakterie hodowano w podłożu LB do osiągnięcia OD<sub>600</sub> równej 0,8 (T = 0). W tym czasie dodawano IPTG do hodowli BR1S i R\_Ag85B. W czasie T = 0 i po upływie kolejnych godzin (T = 1, 2 i 3) pobierano próbki supernatantu, które poddawano procedurze dot-blot z wykorzystaniem przeciwciała anty-LLO. Próbkę odniesienia stanowił preparat LLO o znanym stężeniu. Intensywność zabarwienia punktów określano za pomocą programu ImageJ. **Wartości** nad słupkami przedstawiają wartości OD hodowli w momencie pobrania prób. Wykres przedstawia wartości średnie z 3 niezależnych pomiarów.

Wyniki analiz dot-blot zostały wykorzystane w eksperymencie określenia dawek infekcyjnych testowanych w eksperymencie mierzącym dawkę letalną LD<sub>50</sub>. Dawka ta określa, jaka liczba komórek bakteryjnych powoduje śmierć 50% zainfekowanych osobników. Jej wytypowanie jest niezbędne, aby prawidłowo dobrać dawkę szczepienną przy testowaniu nowych wektorów szczepionkowych – dawka powinna być wytypowana tak, aby nastąpiła skuteczna immunizacja, która nie powoduje toksycznego lub letalnego efektu dla szczepionych organizmów. Eksperyment przeprowadzono na myszach C57BL/6, których genotyp odpowiada genotypowi komórek wykorzystanych w poprzednich etapach badań. Pięć grup myszy szczepiono bakteriami *B. subtilis* MB4, BR1S, BR1C, R\_Ag85B i K\_Ag85B. Czynnikiem letalnym testowanych szczepów *B. subtilis* jest listeriolizyna O. Według danych literaturowych (Geoffroy i wsp., 1987) dawka LD<sub>50</sub> listeriolizyny wynosi 0,8 µg. Wykorzystując oznaczone stężenie LLO w supernatantach hodowlanych i wyniki pomiaru CFU hodowli przy określonym OD, określono, jaka ilość toksyny jest produkowana przez określoną liczbę komórek bakteryjnych. Przy założeniu, że bakterie po wnikięciu do komórek gospodarza przeżyją 2 godziny i z wykorzystaniem wyników pomiaru ilości toksyny określono, że aby osiągnąć dawkę LD<sub>50</sub> do infekcji myszy należy użyć podanych poniżej dawek infekcyjnych: BR1S –  $2,0 \times 10^7$ , BR1C –  $4,8 \times 10^7$ , R\_Ag85B –  $1,0 \times 10^7$  i K\_Ag85B –  $8,7 \times 10^7$ . Przetestowano 3 różne dawki infekcyjne:  $2 \times 10^6$ ,  $5 \times 10^7$  i  $5 \times 10^8$  komórek. Ustalono, że najwyższa testowana dawka przyczyniła się do śmierci 50% myszy we wszystkich grupach, a więc LD<sub>50</sub> wynosi  $5 \times 10^8$  bakterii.

### **Pomiar komórkowej odpowiedzi immunologicznej indukowanej przez szczepy R\_Ag85B i K\_Ag85B – testy ELISpot**

W tej części eksperymentu służącej ocenie zdolności *B. subtilis* do immunizacji oceniano proces generowania populacji limfocytów CD8<sup>+</sup> specyficznych względem epitopu Ag85B prezentowanego w MHC klasy I. W dwutygodniowych odstępach czasu wykonano 4 serie dootrzewnowych szczepień 7 grup myszy. 5 grupom podano szczepy *B. subtilis* (MB4, BR1S, BR1C, R\_Ag85B i K\_Ag85B), natomiast dwie pozostałe grupy immunizowano roztworem TM (kontrola negatywna) lub roztworem TM z białkiem Ag85B (kontrola pozytywna). Myszom podawano dawkę  $5 \times 10^7$  komórek bakteryjnych, co odpowiada 0,1 LD<sub>50</sub>. Po upływie 21 dni od ostatniego szczepienia myszy uśmiercano, po czym izolowano

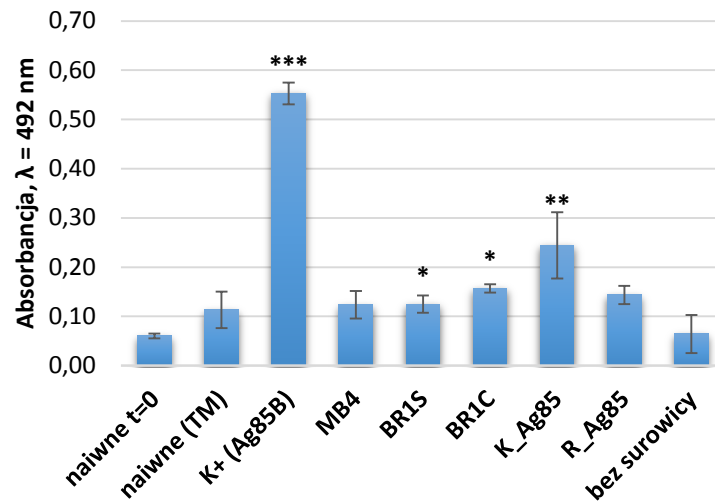
ich śledziona, które posłużyły do uzyskania limfocytów oraz testów ELISpot. Badano w nich potencjał limfocytów pochodzących ze szczepionych myszy do wydzielania INF- $\gamma$  w odpowiedzi na aktywację przez antygen Ag85B. Splenocyty wyizolowane ze śledzion immunizowanych myszy stymulowano *in vitro* przez czas 48 godzin białkiem Ag85B na płytkach ELISPOT opłaszczonych uprzednio przeciwciałem rozpoznającym INF- $\gamma$ , a po upływie tego czasu oceniono obecność wybarwionych punktów na membranie płytek. Nie zaobserwowano obecności aktywowanych limfocytów cytotoksycznych produkujących interferon wśród komórek pozyskiwanych z myszy szczepionych bakteriami *B. subtilis* R\_Ag85B i K\_Ag85B0 wytwarzającymi główny antygen *M. tuberculosis* (dane nie prezentowane). Barwny produkt reakcji widoczny był jedynie w dołkach, w których splenocyty aktywowano przy pomocy mitogenu, konkanawaliny A (ConA). Takie wyniki świadczą o tym, że komórkowa odpowiedź immunologiczna nie zaszła lub generowana przez nią pamięć immunologiczna była bardzo krótkotrwała, co uniemożliwiło zaobserwowanie aktywacji cytotoksycznych limfocytów T przy ponownym kontakcie z Ag85B *in vitro*.

### **Humoralna odpowiedź immunologiczna indukowana przez szczepy R\_Ag85B i K\_Ag85B**

Wobec niepowodzenia w detekcji komórkowej odpowiedzi immunologicznej, podjęto decyzję o sprawdzeniu czy na skutek szczepienia myszy bakteriami wytwarzającymi antygen Ag85B zaszła odpowiedź humoralnego typu związana z obecnością specyficznych przeciwciał anti-Ag85B. Za pomocą metody ELISA zbadano całkowity poziom przeciwciał IgG. Analizie poddano surowice pozyskane 21 dni od ostatniego szczepienia, rozcieńczone 1:50.

Znaczącą różnicę w poziomie specyficznych przeciwciał IgG rozpoznających Ag85B w porównaniu do surowicy myszy naiwnych, szczepionych buforem TM ( $Abs_{492\text{ nm}} = 0,11 \pm 0,04$ ) zaobserwowano w surowicy myszy szczepionych *B. subtilis* K\_Ag85B konstytutywnie wytwarzającym gruźlicze białko ( $Abs_{492\text{ nm}} = 0,24 \pm 0,07$ ). Grupa immunizowana szczepem fakultatywnie produkującym antygen Ag85B, R\_Ag85B, nie wykazała istotnych statystycznie różnic w stosunku do grupy myszy naiwnych ( $Abs = 0,14 \pm 0,02$ ). Kontrolna grupa myszy szczepionych oczyszczonym białkiem wytwarzała wysoki poziom immunoglobulin anti-Ag85B ( $Abs_{492\text{ nm}} = 0,55 \pm 0,02$ ). Zaobserwowano również niespecyficznie podwyższony poziom Ag85B-specyficznych IgG w surowicy myszy szczepionych bakteriami szczepów BR1S

i BR1C wytwarzających LLO, lecz niewytwarzającymi gruźliczego białka. Absorbancja prób wynosiła odpowiednio  $0,12 \pm 0,02$  i  $0,16 \pm 0,01$ . Wyniki przedstawiono na **rysunku 5.29**.



**Rysunek 5.29. Odpowiedź humoralna przeciwciał IgG indukowana poprzez immunizację myszy szczepami *B. subtilis*.** Poziom immunoglobulin IgG w grupach myszy immunizowanych bakteriami ( $n = 6$ ) lub białkiem Ag85B określano po czwartej immunizacji (dzień 56) na drodze testu ELISA. Analizie poddano surowice rozcieńczone 1:50. Wyniki zostały przedstawione jako średnie wartości z każdej immunizowanej grupy. Kontrolę specyficzności przeciwciał drugorzędowych skoniugowanych z HRP stanowiły próby nie zawierające surowicy. Słupki błędów określają odchylenie standardowe. Statystycznie istotne różnice w porównaniu do grupy kontrolnej (myszy naiwne, szczepione buforem TM) określono w oparciu o test t-Studenta (\*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ ).



---

## 6. Wnioski

---

**W prezentowanej rozprawie doktorskiej udokumentowano, że:**

1. Wektory plazmidowe pUR10 i pUK10 umożliwiają efektywne uzyskiwanie modyfikowanych, hemolitycznych szczepów *B. subtilis* i wprowadzanie do ich chromosomu obcych antygenów eukariotycznego i prokariotycznego pochodzenia.

Wniosek ten opieram na następujących danych eksperymentalnych:

- a. Wynikach analiz efektywności transformacji komórek kompetentnych *B. subtilis* MB4 przeprowadzanych w porównaniu do transformacji z użyciem plazmidu wyjściowego pAG58-1-ble (Rozdział 5.1);
  - b. Analizie hemolityczności szczepów *B. subtilis* uzyskiwanych za ich pomocą lub za pomocą plazmidów pochodnych (Rozdział 5.1);
  - c. Pomyślnym uzyskaniu szczepów wytwarzających sekrecyjne formy antygenów fuzyjnych LLO-OVA (Rozdział 5.3) lub LLO-Ag85B (Rozdział 5.5) i ich udokumentowanym wpływie na indukcję różnych mechanizmów odpowiedzi immunologicznej.
2. Szczep *B. subtilis* R\_OVA3 wytwarzający owoalbuminę jaja kurzego w fuzji z N-terminalną sekwencją listeriolizyny O jest zdolny do efektywnego dostarczania antygeny do cytoplazmy komórek prezentujących antygen i indukcji komórkowej odpowiedzi immunologicznej. Wniosek ten opieram na następujących danych eksperymentalnych (Rozdział 5.3):
    - a. Detekcji fuzyjnego antygeny w supernatancie hodowlany szczepu;
    - b. Wynikach analiz inwazyjności i cytotoksyczności szczepu *in vitro*;
    - c. Wynikach pomiarów prezentacji antygeny OVA w kompleksach z cząsteczkami MHC klasy I na infekowanych bakteriami komórkach dendrytycznych *in vitro*;
    - d. Obserwowany potencjał szczepu do aktywacji cytotoksycznych limfocytów T specyficznych względem owoalbuminy jaja kurzego w kompleksie z MHC I *ex vivo*.

3. Szczep *B. subtilis* K\_Ag85B wytwarzający gruźliczy antygen Ag85B w fuzji z N-terminalną sekwencją listeriolizyny O nie indukuje komórkowej odpowiedzi immunologicznej, jednak przyczynia się do zajścia humoralnych mechanizmów odpornościowych. Wniosek ten opieram na następujących danych eksperymentalnych (*Rozdział 5.5*):
- a. Wynikach pomiaru syntezy interferonu- $\gamma$  przez splenocyty izolowane z myszy szczepionych bakteriami;
  - b. Odnotowanym wzroście poziomu immunoglobuliny G specyficznej względem Ag85B w surowicy krwi immunizowanych szczepem myszy.

---

## 7. Dyskusja

---

Skuteczne preparaty szczepionkowe, którymi dysponuje współczesna wakcynologia chronią przed chorobami wywoływanymi głównie przez patogeny prowadzące zewnątrzkomórkowy cykl życia, spędzające większą jego część poza komórkami gospodarza lub których toksyny wywołują objawy chorobowe. Przyczyną takiego stanu rzeczy jest fakt, że odporność organizmu przeciw tym patogenom skierowana jest zwykle przeciw pojedynczemu antygenowi lub ich ograniczonej liczbie. Ponadto, opiera się ona na humoralnych mechanizmach immunologicznych związanych z syntezą przeciwciał przez limfocyty B (Titball, 2008).

Opracowanie efektywnych metod szczepienia przeciw patogenom wewnątrzkomórkowym wywołującym choroby takie jak gruźlica, malaria i zakażenia wirusem HIV czy chroniących przed nowotworzeniem jest znacznie bardziej problematyczne (Delany i wsp., 2014). W trakcie wewnątrzkomórkowej infekcji patogen wykorzystuje cały szereg czynników wirulencji, w związku z czym identyfikacja pojedynczego produktu białkowego pełniącego główną rolę w patogenezie jest trudna. Co więcej, organizmy o wewnątrzkomórkowym trybie życia cechuje często wysoki poziom zmienności genetycznej i morfologicznej, co dodatkowo utrudnia opracowanie skutecznej szczepionki. W przypadku tworzenia szczepionek przeciwnowotworowych, newralgicznym punktem jest ponadto przełamanie tolerancji immunologicznej organizmu względem antygenów związanych z nowotworami (TAA). Głównym wyzwaniem w tworzeniu tego rodzaju terapeutyków jest indukcja komórkowych mechanizmów odpowiedzi immunologicznej. Odpowiedź tego typu ma miejsce, gdy dochodzi do prezentacji obcego antygeny w kompleksach z cząsteczkami układu zgodności tkankowej typu I (MHC I). Prezentacja taka jest możliwa tylko wówczas, gdy antygen znajdzie się na terenie cytoplazmy komórki gospodarza. Istnieją liczne sposoby dostarczania antygenów do cytozolu, tj.: wykorzystanie nanocząstek czy wirusów, jednak żywe, bakteryjne wektory stanowią obecnie najbardziej obiecującą i najsilniej eksplorowaną w nauce strategię.

Zaletami ich użycia są: naśladowanie naturalnej drogi wnikania organizmu patogennego, możliwość zastosowania różnych dróg podania, ekonomiczność i łatwość

przygotowania szczepionki oraz silne właściwości adiuwantowe zapewniane przez obecność molekularnych wzorów PAMP i ligandów TLR (Detmer i Glenting, 2006; Le Gouëllec i wsp., 2012). Najczęściej badanymi wektorami do aktywnej immunoterapii są atenuowane patogenne szczepy bakteryjne, posiadające naturalną zdolność do inwazji do komórek eukariotycznych. Ze względu na ryzyko rewersji do szczepu wirulentnego oraz wytworzenia stanu chorobowego u szczepionych osób z obniżoną odpornością podejmuje się jednak coraz więcej prób zaangażowania gatunków bakterii niepatogennych. Jednym z nich jest *B. subtilis* będący przedmiotem przedstawianej rozprawy doktorskiej.

W ramach badań opisanych w rozprawie doktorskiej stworzono zarówno konstrukcje genetyczne służące do otrzymywania wektorów szczepionkowych na bazie *B. subtilis*, jak i szereg rekombinowanych szczepów, które zbadano pod kątem zdolności do dostarczania antygenów do cytozolu komórek prezentujących antygen. Nowe konstrukcje zostały oparte na poprzednich doniesieniach na temat mechanizmów działania listeriolizyny O, a także dotyczących immunogennego potencjału zarówno całej toksyny (Pamer i wsp., 1991; Safley i wsp., 1991), jak i jej N-terminalnej, PEST-podobnej sekwencji (Decatur i Portnoy, 2000; Sewell i wsp., 2004). Toksyna warunkuje zdolność *B. subtilis* do wnikania do eukariotycznych komórek prezentujących antygen i dzięki perforacji błony wakuoli umożliwia uwolnienie bakterii do cytozolu. Zgodnie z przyjętą hipotezą badawczą prowadzi to do prezentacji dostarczanych przez ekspresyjny LLO wektor szczepionkowy antygenów w kompleksach z cząsteczkami MHC na powierzchni komórki APC oraz wpływa na zajęcie komórkowej odpowiedzi immunologicznej przeciw tym antygenom. Jedynie białka znajdujące się w cytoplazmie wchodzi na ścieżkę prezentacji TAP i ulegają kompleksowaniu z MHC klasy I. Immunogenność LLO jest powszechnie wykorzystywana do poszukiwania nowych dróg dostarczania antygenów do komórek eukariotycznych, zarówno przez naturalnego gospodarza, *L. monocytogenes* (Detmer i Glenting, 2006), jak i gatunki bakterii heterologicznie produkujące toksynę (Radford i wsp., 2002; Huang i wsp., 2008).

Opierając się na wynikach dostępnych badań wykorzystujących komórki wegetatywne *B. subtilis* jako nośnik antygenów (Luiz i wsp., 2008; Lee i wsp., 2010), za cel badawczy przyjęto stworzenie szczepu koekspresyjnego LLO oraz antygen heterologiczny, przeciw któremu generowana ma być odpowiedź immunologiczna. Założono, że zastosowanie fuzyjnej konstrukcji antygenów, będących połączeniem sekwencji sygnałowej LLO i danego białka umożliwi ich dostarczenie bezpośrednio do cytoplazmy komórki APC

i indukcję komórkowej odpowiedzi immunologicznej. Wysokie podobieństwo aparatów sekrecyjnych *B. subtilis* i *L. monocytogenes* umożliwia skuteczny transport białek *L. monocytogenes* w *B. subtilis*. Większość wydzielniczych protein obu gatunków bakterii jest bowiem transportowana na zewnątrz komórki bakteryjnej za pomocą aparatu sekrecyjnego Sec budowanego przez białka o zbliżonym pochodzeniu i budowie – sekwencja aminokwasowa wewnątrzkomórkowego chaperonu SecA *L. monocytogenes* kierującego białka wydzielnicze na ścieżkę sekrecji wykazuje aż 81% podobieństwa w stosunku do tego samego białka w *B. subtilis* (Rigel i Braunstein, 2008).

W celu opracowania uniwersalnego, wygodnego i prostego systemu otrzymywania rekombinowanych szczepów *B. subtilis* wytwarzających dowolne heterologiczne antygeny, stworzono integracyjne wektory plazmidowe umożliwiające konstytutywną i fakultatywną ekspresję klonowanych w nich genów. Modyfikacjom poddano wektor pAG58-1-*ble*, z którego usunięto nieistotną informację genetyczną i do którego wklonowano rozbudowane miejsce MCS oraz kasetę oporności na kanamycynę. Skonstruowany został plazmid pUR10 niosący gen *hly* kodujący LLO, za pomocą którego uzyskiwano o 50% więcej transformantów *B. subtilis* przy selekcji na bleomycynie oraz o 100% więcej transformantów przy zastosowaniu kanamycyny niż w przypadku transformacji wektorem pAG58-*ble*. Zwiększoną efektywność transformacji nowym wektorem można tłumaczyć zmniejszonym rozmiarem względem plazmidu wyjściowego, co idzie w parze z wynikami badań Ohse i wsp. (1995) czy Vojcic i wsp. (2012), którzy ustalili, że efektywność transformacji *B. subtilis* spada wraz ze zwiększaniem się rozmiaru wprowadzanego wektora. Zastosowanie kanamycyny do selekcji transformantów jest natomiast podyktowane względami praktycznymi i ekonomicznymi - bleomycyna często selekcjonuje fałszywie pozytywne transformanty, a ponadto jej koszty są znacznie wyższe. Rozbudowany polilinker również przyczynił się do zwiększenia uniwersalności wektora, umożliwiając zastosowanie bardzo szerokiego spektrum enzymów restrykcyjnych do klonowania.

Usunięcie z wektora pUR10 genu *lacI* doprowadziło do uzyskania plazmidu pUK10, który umożliwia ekspresję klonowanych w miejscu MCS genów niezależnie od obecności IPTG. Zastosowanie indukcji w organizmie żywym niesie za sobą liczne trudności, do których można zaliczyć brak szczelności systemu ekspresji, niewystarczający poziom indukcji czy wyciszenia ekspresji, ograniczoną zdolność induktora do penetracji tkanek czy jego niesprzyjającą farmakokinetykę (Grespi i wsp., 2011). Transformując komórki kompetentne

*B. subtilis* wektorem pUK10 uzyskano nowy szczep BR1C konstytutywnie wytwarzający listeriolizynę O. W teście hemolitycznym z wykorzystaniem erytrocytów krwi końskiej wykazano, że ekspresuje on gen *hly* kodujący LLO na takim samym poziomie jak szczep indukowalny BR1S. Szczep ten stanowi zatem dobrą kontrolę we wszystkich testach, w których porównywane będą szczepy fakultatywnie i stale produkujące obce antygeny.

Oba skonstruowane plazmidy z powodzeniem integrują do chromosomu *B. subtilis* MB4, zapewniając stabilną ekspresję antygenów i tym samym stałą immunogenność wektora szczepionkowego. Wprowadzanie obcych genów na nieintegrującym plazmidzie może bowiem skutkować sukcesywnym obniżaniem ekspresji lub zupełnym jej zanikiem w związku z niestabilnością genetyczną ruchomego elementu genetycznego. Wang i wsp., (2013) w swojej pracy dotyczącej ekspresji białka GFP w *S. enterica* serowar Typhi donoszą, że sposobem na jeszcze skuteczniejsze poprawienie ekspresji genów heterologicznych w żywych wektorach szczepionkowych może być integracja genów w powtarzające się w chromosomalne *loci*. W przyszłych badaniach nad tworzeniem wektorów szczepionkowych na bazie wegetatywnych komórek *B. subtilis* można więc rozważyć zastosowanie tego typu integracji. Zarówno plazmid pUR10, jak i pUK10 stały się przedmiotem zgłoszenia patentowego nr PL400016 opublikowanego w Biuletynie Polskiego Urzędu Patentowego 20. 01. 2014.

W celu zweryfikowania hipotezy o możliwości wykorzystania wegetatywnych komórek *B. subtilis* koksprymujących LLO i heterologiczne białka do immunizacji organizmów ssaczych, przeprowadzono wstępne testy inwazyjności i cytotoksyczności *in vitro*. Eksperymenty przeprowadzono w oparciu o linię mysich makrofagów IC-21, którą cechują wysokie zdolności fagocytarne i która jest z powodzeniem stosowana w badaniach nad procesowaniem antygenów dostarczanych przez bakterie (Alvarez-Domínguez i wsp., 2000; Rosales-Reyes i wsp., 2005). Kluczem do opracowania skutecznego wektora szczepionkowego dostarczającego antygeny do cytoplazmy komórek prezentujących antygen jest takie dobranie parametrów infekcji, aby inwazyjność komórek bakteryjnych była jak najwyższa przy stosunkowo niskiej cytotoksyczności względem komórek gospodarza. Czynnikiem mogącym wpływać negatywnie na przeżywalność komórek APC jest listeriolizyna O produkowana przez wszystkie konstruowane w ramach opisywanych badań szczepy *B. subtilis*.

Analizie poddano szczep MB4 o fenotypie dzikim oraz produkujące LLO szczepy: BR1S i BR1C. Testowano dwie różne wartości MOI równe 5 i 10 – ich niewysoka wartość została wytypowana ze względu na cytotoksyczność LLO i możliwość wywoływania efektu letalnego w komórkach eukariotycznych (Geoffroy i wsp., 1987; Stachowiak i wsp., 2012). Najwięcej komórek bakteryjnych izolowano z makrofagów infekowanych przy wartości MOI równej 10 (10 bakterii przypadających na 1 komórkę makrofaga) w czasie 2 godzin od początku infekcji, natomiast jedynie szczep BR1C konstytutywnie produkujący LLO wykazywał wyższą inwazyjność przy MOI 5 w momencie startu infekcji i po upływie kolejnej godziny.

W celu dalszej optymalizacji warunków infekcji zbadano cytotoksyczność szczepów *B. subtilis* w zależności od wartości MOI oraz czasu. Odnotowano, że liczebność żywych makrofagów jest wyższa w próbach analizowanych po 2 godzinach od początku infekcji, za co odpowiedzialne mogą być makrofagi fagocytykujące inne, martwe na skutek aktywności toksyny komórki. Zaobserwowano również, że szczep BR1C zarówno w czasie 0, jak i po upływie 2 godzin od początku infekcji przy MOI równym 10 wywołuje nieco większą śmiertelność makrofagów niż szczep BR1S, co może tłumaczyć jego większą inwazyjność przy MOI równym 5 w czasie 0 i 1 odnotowaną w opisanym powyżej teście inwazyjności. Jednakże, różnice w żywotności komórek eukariotycznych dla różnych wartości MOI są minimalne, w związku z czym w dalszych eksperymentach z wykorzystaniem szczepów *B. subtilis* kodujących obce eukariotyczne i prokariotyczne białka postanowiono wykorzystywać schemat infekcji przy czynniku MOI równym 10, gwarantującym wyższą inwazyjność bakterii.

Głównym założeniem prezentowanej rozprawy doktorskiej było uzyskanie uniwersalnego wektora szczepionkowego, dostarczającego dowolne białka do cytoplazmy komórki APC. Uniwersalność nośnika zakłada, że możliwe będzie indukowanie odpowiedzi immunologicznej skierowanej przeciw organizmom prokariotycznym, jak i przeciw komórkom eukariotycznym, które ulegają nowotworzeniu lub innemu procesowi chorobowemu. Pierwszym z antygenów heterologicznych, których ekspresję analizowano w wektorach na bazie *B. subtilis* była owoalbumina jaja kurzego. Antygen został wybrany ze względu na dostępność narzędzi molekularnych zezwalających na detekcję prezentacji epitopu OVA, peptydu SIINFEKL oraz śledzenie aktywacji OVA-specyficznych limfocytów cytotoksycznych (Carreño i wsp., 2007; Albaghdadi i wsp., 2009). OVA jest jednym z najczęściej używanych modeli badań nad dostarczaniem antygeny, odpowiedzą

immunologiczną czy immunoterapią nowotworów. Znane są przykłady wykorzystania koekspresji listeryjnej toksyny z białkiem OVA. Opisana jest zarówno ekspresja obu białek w naturalnym producencie LLO, *L. monocytogenes* (Albaghdadi i wsp., 2009), jak i heterologiczna ekspresja w *E. coli* (Radford i wsp., 2003; Higgins i wsp., 1999). W żadnym z dotychczasowych badań nie analizowano jednak ekspresji obu białek poddanych fuzji translacyjnej, jak również nie rozpatrywano wpływu fuzji tworzonej przez fragmentaryczne ich części. Przedstawiane w przedstawianej rozprawie doktorskiej badania po raz pierwszy analizują także wpływ sekrecyjnych form białek na indukcję odpowiedzi immunologicznej i po raz pierwszy wykorzystują bakterię gramdodatnią, jaką jest *B. subtilis*, jako wektor szczepionkowy.

W celu zbadania czy LLO może kierować modelowy antygen na ścieżkę prezentacji w MHC klasy I i aby wykazać, jakie sekwencje są potencjalnie bardziej immunogenne, zaprojektowano cztery różne fuzje OVA z wybranymi sekwencjami LLO. Pełnej długości lub fragmentaryczny gen *hly* poddawano fuzji do pełnej długości genu OVA lub sekwencji oktapeptydu SIINFEKL kodującej epitop białka. Trzy z czterech przygotowanych konstrukcji niosły jedynie epitop SIINFEKL, podczas gdy jedna z nich kodowała fuzję z pełnej długości OVA. Decyzja o wykonaniu fuzji z jedynie 8-aminokwasowym fragmentem eukariotycznego białka podyktowana była doniesieniami potwierdzającymi immunogenność tego typu konstrukcji, o ile na ich N-końcu dołączona zostanie przynajmniej 3-aminokwasowa sekwencja białkowa (Wei i Sherman, 2007). W badaniach zastosowano fuzję epitopu OVA do pełnej długości LLO lub jej sekwencji sygnałnej, gdyż bardzo małe białka kodujące jedynie epitop byłyby narażone na zbyt szybką degradację oraz wykazywałyby krótki okres półtrwania (Rasmussen i wsp., 2001). W szczepie R\_OVA4 zastosowano konstrukcję, w której epitop SIINFEKL był poddany fuzji do skróconej wersji LLO o długości 420 aminokwasów. W toku opisanych wcześniej badań nad wektorami szczepionkowymi na bazie *L. monocytogenes* udowodniono, że LLO pozbawiona 4 domeny odpowiedzialnej za wiązanie cholesterolu zachowuje zdolność do skutecznej indukcji komórkowych mechanizmów immunologicznych, podlegając jednocześnie atenuacji i obniżeniu zdolności hemolitycznych (Kohda i wsp., 2002; Singh i wsp., 2005). Jednocześnie zaprojektowano 4 analogiczne szczepy, w których do fuzji LLO-OVA dołączono białko markerowe GFP, mające ułatwić lokalizację fuzyjnych antygenów.



Pierwszym istotnym etapem badań z wykorzystaniem szczepów *B. subtilis* LLO-OVA i LLO-OVA-GFP było potwierdzenie ekspresji fuzyjnych genów oraz detekcja sekrecyjnych, fuzyjnych białek w podłożu hodowlanym. Pośrednim dowodem na zajście ekspresji genów kodujących heterologiczne antygeny była aktywność hemolityczna uzyskanych szczepów analizowana w oparciu o test wykorzystujący erythrocyty krwi końskiej. Zarówno gen *hly*, jak i gen fuzyjny znajdują się bowiem pod kontrolą tego samego promotora  $p_{\text{spac.}}$ . Wszystkie cztery szczepy LLO-OVA powodowały lizę krwinek, przy czym jedynie szczep R\_OVA2 indukował obniżony w stosunku do pozostałych szczepów poziom hemolizy. Wśród szczepów LLO-OVA-GFP jedynie szczep R\_OVA1 nie wykazywał aktywności cytolitycznej. Amplifikacja genu *hly* w reakcji PCR z wykorzystaniem starterów okalających gen w tym szczepie dowiodła, że sekwencja ma podwojoną wielkość, przy czym gen wprowadzany do szczepu *B. subtilis* na plazmidzie pUR101GFP miał poprawną sekwencję. Sytuacja powtarzała się w trakcie kolejnych prób uzyskania mutantu R\_OVA1GFP, w związku z czym wysnuto hipotezę o zachodzeniu rekombinacji homologicznej między genem *hly* a genem fuzyjnym niosącym fragment *hly* po wprowadzeniu do komórek *B. subtilis* i zaniechano wykorzystania szczepu R\_OVA1GFP w dalszych eksperymentach. Hemolityczność pozostałych szczepów LLO-OVA-GFP była dwukrotnie obniżona w stosunku do hemolityczności wykazywanej przez szczepy nie wytwarzające fuzji z białkiem GFP. Przyczyny można upatrywać w metabolicznym obciążeniu szczepów *B. subtilis* LLO-OVA-GFP spowodowanym syntezą białek o znacznej masie cząsteczkowej i niższym tempem ich sekrecji lub tworzeniem agregatów blokujących wydostawanie się białka poza komórkę bakteryjną.

W celu dalszej analizy ekspresji fuzyjnych antygenów LLO-OVA-GFP określono fluorescencję zarówno supernatantów hodowlanych, w których spodziewano się ich obecności, jak również fluorescencję komórek bakteryjnych. Niezgodnie z oczekiwaniami, wyniki pomiarów wskazują, że białka fuzyjne ulegają akumulacji wewnątrz komórek bakteryjnych i nie podlegają sekrecji do podłoża hodowlanego. Badania procesu zwijania chromoforów przeprowadzone przez Iizuka i wsp. (2011) dowodzą, że białka GFP będące produktem genu *gfpmut3* dojrzewają siedmiokrotnie szybciej niż niemodyfikowana forma GFP (*wt*). Zwijanie się antygenów fuzyjnych zawierających GFP następujące już w cytoplazmie *B. subtilis* uniemożliwiłoby transport na ścieżce Sec, gdyż sekrecji tą drogą ulegają jedynie niesfałdowane białka (Harwood i Cranenburg, 2008), co może wyjaśniać przyczynę detekcji fluorescencji GFP jedynie w komórkach bakteryjnych. Istnieją liczne

doniesienia dotyczące prób indukcji sekrecji GFP z wykorzystaniem systemu Tat, który uczestniczy w transporcie zwiniętych białek, jednak wiele z nich również kończy się niepowodzeniem. Dowiedziono, że ekspresja translokazy Tat *B. subtilis* w *E. coli* umożliwia sekrecję GFP poddanego fuzji do sekwencji sygnałowych systemu Tat gospodarza, uzyskanie tego samego efektu nie jest jednak możliwe w *B. subtilis* (van der Ploeg, 2012). Dalsze eksperymenty opisane przez zespół wykazały, że sekrecja tych białek zachodzi na ścieżce innej niż Tat (hipotetycznie Sec) i ulega wzmocnieniu przy zastosowaniu bogatych w sól podłoży hodowlanych. W związku z powyższym, dalsze badania nad uzyskaniem sekrecji antygenów LLO-OVA-GFP w *B. subtilis* prowadzone w Zakładzie Mikrobiologii Stosowanej UW powinny objąć analizę w podłożu bogatym w NaCl. Należy również rozważyć zastosowanie innego modelu sekrecji, w którym białka fuzyjne będą ulegały transportowi z wykorzystaniem systemu Tat.

Z powodzeniem przeprowadzono natomiast detekcję immunogennych, nie będących w fuzji z GFP białek wytwarzanych przez szczepy R\_OVA1, R\_OVA3 i R\_OVA4. Dzięki zastosowaniu techniki Western-blot w supernatantach hodowlanych uwidocznione zostały pożądane białka. Najbardziej problematyczna była detekcja białka LLO-OVA produkowanego przez szczep R\_OVA3. Dopiero zastosowanie minimalnego podłoża hodowlanego oraz indukcji IPTG prowadzonej od momentu uzyskania przez hodowlę OD<sub>600</sub> równej 0,8 doprowadziło do zaobserwowania antygeny w analizowanym egzoproteomie. Najwyższy poziom sekrecji białka obserwuje się, gdy *B. subtilis* jest hodowany w bogatej pożywce, w szczególności z końcem fazy wykładniczego wzrostu. Co więcej, po ustaleniu fazy równowagi hodowli, w supernatantach odnajduje się relatywnie większe ilości pozakomórkowych białek (Tjalsma i wsp., 2004). Wzrost ilości białek sekrecyjnych jest jednak proporcjonalny do wzrostu ilości pozakomórkowych proteaz *B. subtilis* odpowiedzialnych za degradację nie tylko źle zwiniętych lub powoli zwijających białek, ale również antygenów heterologicznych wytwarzanych przez dany szczep. Bakteria *B. subtilis* koduje trzy proteazy kontrolne aktywne w ścianie komórkowej lub w przestrzeni między błoną a ścianą komórkową (HtrA, HtrB i WprA) oraz siedem sekrecyjnych proteaz (AprE, Bpr, Epr, Mpr, NprB, NprE i Vpr) (Pohl i wsp., 2013). Badania transkryptomiczne dowiodły, że ekspresja genów kodujące te degradacyjne enzymy jest kontrolowana przez system dwuskładnikowy DegS-DegU odpowiedzialny za regulację przechodzenia z fazy wykładniczej do stacjonarnej wzrostu, co przekłada się na znaczny wzrost ich ekspresji w fazie stacjonarnej hodowli

(Mäder i wsp., 2002). Wobec powyższych faktów, hodowla na podłożu minimalnym poprzez spowolnienie tempa wzrostu hodowli mogła prowadzić do ograniczenia aktywności proteaz kontrolnych, co z kolei mogło mieć przełożenie na większą stabilność heterologicznych białek wydzielanych do podłoża i w ten sposób umożliwić ich detekcję. Zastosowanie późniejszej indukcji ekspresji przez IPTG odsunęło w czasie sekrecję antygeny LLO-OVA, chroniąc białko przed aktywnością kontrolnych proteaz. Planując kontynuację badań z wykorzystaniem komórek wegetatywnych *B. subtilis* jako wektory szczepionkowe, należy rozważyć zastosowanie modyfikowanego szczepu pozbawionego pozakomórkowych proteaz jako bazy do ekspresji heterologicznych białek. Udowodniono, że delecja proteaz w szczepach *B. subtilis*: WB600, WB700, WB800 czy WB800N przyczynia się do zwiększonej sekrecji obcych białek (Pohl i wsp., 2013; Nguyen i wsp., 2011; Yang i wsp., 2011). Pozwoliłoby to na znaczne zminimalizowanie ryzyka nieuprawnionej degradacji i przyczyniło się do zwiększonej ekspresji immunogennych protein.

Niepowodzeniem zakończyły się próby uwidocznienia sekrecji białka LLO-OVA przez szczep R\_OVA2. Kodowane przez szczep białko ma przewidywaną masę cząsteczkową równą 6,2 kDa. W odniesieniu do protein o niewielkich masach cząsteczkowych powszechną praktyką jest zastosowanie rozdzielców w wysokoprocentowych żelach tricinowych (Shägger i Jagow, 1987). Przy planowanych dalszych analizach Western-blot, szczególną uwagę należy też poświęcić samemu procesowi transferu na membranę. Istotne jest dobranie zarówno czasu transferu oraz wielkości porów membrany, aby białka zostały unieruchomione na membranie. W przypadku szczepu R\_OVA2, zastosowanie rozdzielcy w żelu tricinowym oraz transferu na membranę PVDF o znacznie wyższej czułości niż membrana nitrocelulozowa i o minimalnej wielkości porów nie dało pozytywnego rezultatu. Ekspresję genu fuzyjnego w szczepie R\_OVA2 z powodzeniem potwierdzono natomiast metodą odwrotnej transkrypcji, co w połączeniu z pozytywnym wynikiem testu hemolitycznego może stanowić podstawę do przyjęcia hipotezy, że antygen jest produkowany. Nie została jednak ostatecznie potwierdzona sekrecja poza komórkę bakteryjną, w związku z czym nie można całkowicie wykluczyć możliwego wpływu pozakomórkowych proteaz *B. subtilis* czy tego, że niewielkie białko może posiadać bardzo krótki okres półtrwania i samoistnie degradować.

W opisywanych kolejno etapach badań określano immunogeny potencjał szczepów LLO-OVA *in vitro* i *ex vivo*. Wszystkie eksperymenty prowadzono na linii mysich komórek dendrytycznych JAWS II. Ta linia komórkowa jest powszechnie stosowana w badaniach nad

konstrukcją immunogennych wektorów ze względu na duże zdolności do fagocytozy oraz wysoki poziom ekspresji molekuł MHC klasy I i II na powierzchni. Komórki dendrytyczne odnajduje się zarówno w limfatycznych, jak i nielimfatycznych tkankach, gdzie ich głównym zadaniem jest prezentacja antygenów (Steinman i Cohn, 1973). Pełnią centralną rolę w indukcji odpowiedzi zależnej od limfocytów T i B (Steinman, 1991). Niedojrzałe komórki dendrytyczne indukują tolerancję względem antygenów, podczas gdy dojrzałe wywołują odpowiedź immunologiczną. Ze względu na swoje unikalne funkcje, komórki dendrytyczne z powodzeniem angażuje się w badania nad nowymi wektorami szczepionkowymi czy immunoterapeutykami (Otsu i wsp., 2006; Jiang i wsp., 2008). We wcześniejszych badaniach dotyczących oceny inwazyjności kontrolnych szczepów *B. subtilis* wykorzystano linię innych fagocytujących komórek, makrofagów IC-21. Makrofagi są zdolne do prezentacji antygenów w kompleksach z MHC I i MHC II, jednak prezentacja ta jest mało skuteczna i nie prowadzi do wywołania pierwotnej odpowiedzi immunologicznej. Komórki dendrytyczne są natomiast jedynymi fagocytami zdolnymi do aktywacji spoczynkowych limfocytów T i zainicjowania procesu generowania pamięci immunologicznej (Savina i Amigorena, 2007). Linia komórek dendrytycznych JAWS II, podobnie jak wykorzystywana wcześniej w badaniach linia IC-21, została wyprowadzona z myszy szczepu C57BL/6, co jest istotnym czynnikiem ze względu zaplanowane przyszłe eksperymenty wykorzystujące inne komórki tego samego pochodzenia.

W celu ustalenia odpowiednich parametrów analizy prezentacji antygenów OVA na komórkach JAWS II, wykonano pomiary cytotoksyczności i inwazyjności szczepów *B. subtilis* LLO-OVA. Zastosowano infekcję według modelu zaproponowanego w badaniach z udziałem makrofagów linii IC-21 – komórki zakażano przy MOI równym 10. Pomiary przy użyciu różnicującego barwienia fluorescencyjnego dowiodły, że wszystkie analizowane szczepy powodują taki sam spadek żywotności komórek dendrytycznych, niezależnie od czasu trwania infekcji. Co więcej, ustalono, że szczep MB4 o fenotypie dzikim generuje taki sam poziom śmiertelności. Świadczyć to może o minimalnym cytotoksycznym działaniu LLO na komórki JAWS II. Ustalono również, że wszystkie szczepy LLO-OVA są z powodzeniem fagocytowane przez komórki dendrytyczne. W świetle powyższych wyników przyjęto, że ze względu na niską cytotoksyczność oraz wykazaną inwazyjność testowane szczepy *B. subtilis* mogą zostać z powodzeniem użyte w eksperymentach określających ich potencjał do

dostarczania antygenów do kompleksów MHC klasy I i indukcji komórkowej odpowiedzi immunologicznej.

Limfocyty CD8<sup>+</sup> rozpoznają antygeny w formie krótkich peptydów związanych z cząsteczkami układów zgodności tkankowej. Jedną z dróg określenia prezentacji antygeny w kompleksach z MHC I *in vitro*, niewymagającą udziału izolowanych z żywych organizmów komórek, jest wykorzystanie specyficznych przeciwciał. Analizę prezentacji antygeny OVA w kontekście MHC klasy I na komórkach dendrytycznych infekowanych bakteriami *B. subtilis* przeprowadzono z wykorzystaniem przeciwciała 25-D1.16 rozpoznającego cały kompleks, a nie sam peptyd, w związku z czym zminimalizowane było ryzyko niespecyficznego wyznakowania (Porgador i wsp., 1997). Wobec niepowodzeń pierwszych prób w detekcji sygnału świadczącego o prezentacji zdecydowano się na zastosowanie w eksperymencie cytokiny, jaką jest interferon- $\gamma$ . Decyzja podyktowana była faktem, że wykorzystywana linia JAWS II jest linią niedojrzałych komórek dendrytycznych. Komórki takie cechują się wysokimi zdolnościami fagocytarnymi, jednak nie są zdolne do aktywacji limfocytów T (Savina i Amigorena, 2007). Antygen prezentowany przez niedojrzałą komórkę dendrytyczną prowadzi do wytworzenia tolerancji. INF- $\gamma$  jest cytokiną prozapalną wydzielaną przez limfocyty pomocnicze (Th1), cytotoksyczne oraz komórki NK. Nieobecność tych komórek w warunkach *in vitro* może przyczyniać się do zahamowania dojrzewania komórek dendrytycznych i tym samym do zablokowania procesu prezentacji antygeny i indukcji komórkowej odpowiedzi immunologicznej. Funkcje INF- $\gamma$  są sprzeczne, gdyż bierze on udział zarówno w indukcji odpowiedzi immunologicznej, jak i generowaniu tolerancji (Rojas i Krishnan, 2010). W toku przeprowadzonych eksperymentów ustalono, że najwyższy wzrost ekspresji cząsteczek MHC I oraz kompleksów MHC I – SIINFEKL obserwuje się już po 24 h inkubacji z 20 ng/ml INF- $\gamma$ , dlatego zdecydowano się na zastosowanie takich warunków w dalszych eksperymentach badających prezentację OVA. Przyjęte wartości są zgodne z opisanymi przez He i wsp. (2007) w publikacji dotyczącej wpływu INF- $\gamma$  na dojrzewanie niedojrzałych komórek dendrytycznych linii DC2.4. Ze względu na ryzyko ograniczenia właściwości fagocytarnych komórek JAWS II mogącego obniżyć inwazyjność szczepów *B. subtilis* i wpłynąć negatywnie na prezentację antygeny OVA, przeprowadzono również testy gentamycynowe, w których komórki dendrytyczne hodowano w różnych przedziałach czasowych z cytokiną. Dowiedziono, że komórki bakteryjne są tak samo podatne na

fagocytozę bez względu na to czy komórki dendrytyczne poddane były wcześniejszemu działaniu interferonu.

Spośród testowanych szczepów LLO-OVA, jedynie R\_OVA3 wytwarzający pełnej długości owoalbuminę spowodował wygenerowanie fluorescencyjnego sygnału, dowodząc prezentacji epitopu SIINFEKL. Pomimo, że inne szczepy *B. subtilis* dostarczały epitop SIINFEKL poddany fuzji do listeriolizyny O, nie wywołały one prezentacji w MHC I. Potwierdzeniem uzyskanych wyników dotyczących prezentacji OVA w MHC I są rezultaty eksperymentu *ex vivo*, w którym analizowano proliferację limfocytów OT-I specyficznych względem epitopu SIINFEKL prezentowanego w kontekście cząsteczek H-2K<sup>b</sup> na komórkach APC (Schüller i Blankenstein, 2003). Jedynie szczep R\_OVA3 wytwarzający pełnej długości OVA w fuzji z sekwencją sygnałową LLO przyczynił się do proliferacji limfocytów cytotoksycznych OT-I. Uzyskane wyniki jednoznacznie wskazują, że dostarczenie jedynie epitopu białka OVA jest niewystarczające do tego, aby zaszło odpowiednie procesowanie peptydu i jego kompleksowanie z cząsteczkami układów zgodności tkankowej. Naturalne otoczenie sekwencji SIINFEKL w białku OVA musi być zatem niezbędne, by zaszła skuteczna prezentacja antygeny. W celu potwierdzenia tej hipotezy, należałoby skonstruować szczepy produkujące fuzje, w których epitop OVA z obu stron byłby otoczony naturalnie sąsiadującymi sekwencjami OVA różnej długości.

Powodzenie w detekcji epitopu OVA na komórkach dendrytycznych infekowanych szczepem R\_OVA3 wytwarzającym pełnej długości białko OVA świadczy jednak o tym, że opisany w rozprawie doktorskiej wektor może być sprawnym narzędziem do dostarczania eukariotycznych antygenów do komórek APC i indukcji komórkowej odpowiedzi immunologicznej. Uzyskane wyniki idą w parze z dotychczasowymi doniesieniami na temat koekspresji LLO i OVA, w których opisane jest dostarczanie jedynie pełnej długości białek LLO i OVA (Albaghdadi i wsp., 2009; Radford i wsp., 2002), które nie są jednak eksportowane poza komórkę bakteryjną. Co więcej, opisane w rozprawie doktorskiej badania kładą nowe światło na zastosowanie wegetatywnych komórek *B. subtilis* do immunizacji, gdyż stanowią pierwsze doniesienie, w którym przedstawiony został wpływ na aktywację komórek efektorowych komórkowej odpowiedzi immunologicznej. Wyniki dotychczasowych badań opisywały jedynie pozytywny wpływ żywych komórek *B. subtilis* na indukcję humoralnych mechanizmów, związanych z produkcją przeciwciał (Luiz i wsp., 2008; Lee i wsp., 2010). Wzmoczonej uwagi wymaga również hipotetyczne zastosowanie opisanego w rozprawie

doktorskiej wektora na bazie *B. subtilis* do eradykacji nowotworów. Radford i wsp. (2002) opisali, że komórki dendrytyczne infekowane bakteriami *E. coli* wytwarzającymi LLO i OVA po wszczępieniu *in vivo* są zdolne do wywołania lizy komórek czerniaka ekspresujących OVA (B16-OVA) i ograniczenia wielkości nowotworu. Ten sam zespół udowodnił rok później, że bakterie *E. coli* wytwarzające LLO oraz antygen MART1 ludzkiego czerniaka przyczyniają się do jego prezentacji na ludzkich komórkach dendrytycznych. Perspektywa podobnego wykorzystania wegetatywnych komórek *B. subtilis* wytwarzających główny czynnik patogenez *L. monocytogenes* wydaje się być bardzo obiecująca i powinna być poddana dalszej weryfikacji.

Poziom prezentacji antygeny na infekowanych żywymi wektorami komórkach APC zależy w dużej mierze od ilości wytwarzanego antygeny. Wpływ na to ma nie tylko liczba kopii danego genu w komórce bakteryjnej czy siła zastosowanego w ekspresji promotora, ale również, w przypadku białek sekrecyjnych, sprawność sekrecji. Powodzenie w transporcie poza komórkę bakteryjną zależy natomiast nie tylko od zastosowanej sekwencji sygnałowej, ale również od mechanizmu działania aparatu sekrecyjnego. Podążając za wynikami badań Kakeshita i wsp. (2010), w celu usprawnienia sekrecji antygenów w opisanych w rozprawie szczepach *B. subtilis*, dokonano delecji linkera CTL. Pozytywne efekty w postaci zwiększenia heterologicznej ekspresji uzyskano jedynie w przypadku szczepu BR1S heterologicznie wytwarzającego LLO. Nie udało się jednak uzyskać wzmożonej ekspresji OVA w szczepie R\_OVA3. Uzyskanie szczepu *B. subtilis* wydajnie wydzielającego OVA wymaga dalszej pracy, przyczyną niepowodzenia w detekcji owoalbuminy może być bowiem jej podatność na działanie zewnątrzkomórkowych proteaz *B. subtilis*, scharakteryzowana już w części dyskusji dotyczącej detekcji białka w supernatancie hodowlanym szczepu (Yun i wsp., 1993).

W celu dalszej weryfikacji uniwersalności wektorów szczepionkowych na bazie *B. subtilis*, uzyskano szczepy wytwarzające główny antygen wywołującej gruźlicę bakterii *M. tuberculosis*, Ag85B. Każdego roku na gruźlicę zapada 8,6 miliona osób, z czego 1,3 miliona umiera. Bakterie *M. tuberculosis* wypracowały skuteczną strategię przetrwania – ich komórki otoczone są bogatą w woski i lipidy, wysoce trwałą ścianą komórkową, która umożliwia bytowanie w wysoce niesprzyjających warunkach środowiskowych. Mechanizm rozprzestrzeniania się infekcji jest bardzo efektywny, czego dowodem jest ogólna liczba nosicieli na świecie wynosząca potencjalnie nawet 2 miliardy. Jedyną skuteczną szczepionką przeciw gruźlicy jest opracowana na początku XX wieku szczepionka BCG oparta na *M. bovis*.

Ochrona zapewniana przez nią trwa jednak zaledwie kilka lat, a sama szczepionka nie powstrzymuje zachorowań dorosłych na najbardziej powszechną w dzisiejszych czasach, płucną formę gruźlicy. Wyzwaniem dzisiejszej wakcynologii jest wobec tego opracowanie szczepionek, które będą mogły być podawane ludziom dorosłym oraz ludziom z upośledzoną odpornością (np. zakażonych wirusem HIV), wśród których stale wzrasta liczba zachorowań (Weiner i Kaufmann, 2014). Najwięcej uwagi poświęca się opracowaniu preparatów dostarczanych przez wirusowe bądź bakteryjne wektory – w zaawansowanej fazie badań klinicznych znajduje się m. in. szczepionka VPM1002 oparta na szczepie BCG z delecją ureazy C i wytwarzającym LLO (Kaufmann i Gegenbacher, 2012) czy Crucell Ad35 angażująca adenowirus serotypu 35 do dostarczania 3 gruźliczych antygenów: Ag85A, Ag85B i TB10.4 (Kagina i wsp., 2014). Transferaza mykolyłowa Ag85B jest jednym z najczęściej stosowanych antygenów do konstrukcji szczepionek przeciwgruźliczych, co podyktowane jest silnym potencjałem do indukcji komórkowej odpowiedzi immunologicznej limfocytów Th1 (Huygen, 2014). Kluczowymi typami odpowiedzi mającymi na celu rozpoznanie infekcji *M. tuberculosis* jest odpowiedź limfocytów cytotoksycznych (Woodworth i Behar, 2006) oraz, w początkowej fazie zakażenia, limfocytów Th17 (Korn i wsp., 2009). *B. subtilis* ekspresyjny LLO i dostarczający gruźliczy antygen bezpośrednio do cytoplazmy komórek APC byłby wobec tego idealnym kandydatem na przeciwgruźliczy wektor szczepionkowy.

W toku opisanych w rozprawie doktorskiej badań stworzono dwa konstytutywnie i fakultatywnie wytwarzające Ag85B w fuzji z N-końcową sekwencją LLO szczepu *B. subtilis* o potwierdzonej aktywności hemolitycznej, inwazyjności względem mysich komórek dendrytycznych i wykazujące zdolność do sekrecji antygenów do pożywki hodowlanej. Immunogenność wektorów analizowano *in vivo* na modelu mysim. Zaskakującym wynikiem był brak wykrywalnej odpowiedzi komórkowej, wyrażającej się poprzez produkcję INF- $\gamma$  przez stymulowane *ex vivo* limfocyty cytotoksyczne. W surowicy myszy szczepionych konstytutywnie wytwarzającym Ag85B szczepem K\_Ag85B wykryto natomiast podwyższony poziom przeciwciał IgG, świadczący o zajściu humoralnej odpowiedzi immunologicznej. Podobnego wpływu na zajście humoralnej odpowiedzi immunologicznej nie zaobserwowano jednak w przypadku szczepu R\_Ag85B fakultatywnie wytwarzającego antygen. Szczep ten wykazywał niższą inwazyjność względem komórek dendrytycznych *in vitro*, co może być przyczyną obniżonej immunogenności.



Jednej z przyczyn przesunięcia odpowiedzi z typu Th1 na Th2 zaindukowanego przez drugi szczep K\_Ag85B można upatrywać w innym od zamierzonego losie komórek bakteryjnych wewnątrz komórek APC w szczepionych myszach. Założeniem eksperymentu było uwolnienie się sfagocytowanych bakterii z wakuoli komórek prezentujących antygen do ich cytoplazmy dzięki aktywności listeriolizyny O. Obecne w cytoplazmie antygeny powinny wejść na ścieżkę prezentacji TAP i tym samym zostać zaprezentowane w kontekście MHC I, wywołując komórkową odpowiedź immunologiczną. Przy założeniu, że nastąpiło strawienie uwieczonych w wakuoli bakterii, powstałe w wyniku trawienia peptydy byłyby kompleksowane z cząsteczkami MHC II, co mogłoby skutkować indukcją odpowiedzi humoralnej i syntezą przeciwciał. Innym powodem niewykrycia indukcji limfocytów Tc może być również krótkotrwałość generowanej pamięci immunologicznej. Myszy poddane były czterem szczepieniom następującym w dwutygodniowych odstępach, natomiast ich splenocyty izolowano po upływie trzech tygodni od ostatniego szczepienia. Przy założeniu, że generowana odporność była krótkotrwała, detekcja aktywowanych limfocytów Tc przy ponownej stymulacji Ag85B byłaby niemożliwa. Baldwin i wsp. (2013) w swojej pracy nad przeciwgruźliczą szczepionką opartą na adenowirusie Ad5-ID93 dokumentują, że długotrwałą pamięć immunologiczną uzyskiwali jedynie, gdy preparat był podawany jako tzw. „booster” po uprzednim szczepieniu inną szczepionką ID93/GLA-SE niosącą adiuwant.

Pomimo niepowodzeń w detekcji odpowiedzi limfocytów cytotoksycznych, przeprowadzone eksperymenty z wykorzystaniem produkujących Ag85B szczepów dowiodły, że *B. subtilis* jest dobrym wektorem do produkcji i sekrecji nie tylko antygenów prokariotycznych, ale również eukariotycznych białek takich jak OVA. Badania mające na celu dalszą analizę zdolności wektora na bazie produkującego LLO szczepu *B. subtilis* do indukcji odpowiedzi immunologicznej będą kontynuowane w Zakładzie Mikrobiologii Stosowanej UW. Powinny one objąć zbadanie przeżywalności i proliferacji komórek bakteryjnych *in vivo*, a także uwzględnić pomiar odpowiedzi limfocytów cytotoksycznych w różnych przedziałach czasowych. Analizą należy również objąć aktywację limfocytów Th17, które odgrywają istotną rolę w kontroli infekcji *M. tuberculosis*.

Podsumowując, uzyskane wyniki stanowią unikalny dowód na to, że modyfikowane wegetatywne komórki *B. subtilis* wytwarzające listeriolizynę O oraz heterologiczne antygeny mogą być wektorami szczepionkowymi dostarczającymi antygeny do komórek prezentujących antygen. Uniwersalny, skonstruowany w pracy wektor jest nie tylko zdolny

do sekrecji prokariotycznych i eukariotycznych białek, ale również posiada potencjał do wywoływania odpowiedzi immunologicznej komórkowego lub humoralnego typu. Rodzaj generowanej odpowiedzi niewątpliwie różni się jednak w zależności od typu produkowanego antygeny, w związku z czym niezbędna jest dalsza optymalizacja zarówno sekrecji białek, jak i samej procedury immunizacji oraz określania poziomu odpowiedzi immunologicznej.

---

## 8. Załączniki

---

### 8.1. Konstrukcja wektora pUR10 umożliwiającego fakultatywną ekspresję genów sklonowanych w miejscu MCS

W celu uzyskania plazmidu integrującego do chromosomu *B. subtilis* MB4 umożliwiającego indukowaną przez IPTG ekspresję antygenów sklonowanych w miejscu MCS, modyfikacjom poddano plazmid **pAG58-1-ble** niosący gen *hly* kodujący listeriolizynę O. Pierwszą modyfikacją wyjściowego wektora było zmniejszenie jego rozmiarów. W tym celu wektor pAG58-1-ble trawiono enzymami restrykcyjnymi BamHI i AaNI, w wyniku czego usunięto z niego fragment DNA o długości 2028 bp niosący sekwencję nukleotydową nieistotną w procesie replikacji, stabilnym utrzymaniu plazmidu w komórce gospodarza czy selekcji antybiotykowej. Mieszaninę po trawieniu rozdzielono elektroforetycznie w żelu agarozowym, z którego wycięto i oczyszczono odcinek DNA o długości 6473 bp niosący niezbędną do powstania wektora informację genetyczną. Otrzymaną strukturę otwartą poddano ligacji do formy kolistej, w wyniku której powstał wektor o mniejszym rozmiarze (6477 bp), zwany **pKG10**. Produktem ligacji transformowano komórki *E. coli* MC1061, transformanty selekcjonowano na podłożu z ampicyliną o stężeniu 100 µg/ml, a następnie wyizolowano z nich DNA plazmidowe w celu dokonania analizy restrykcyjnej wektora, potwierdzającej poprawność sekwencji. Wektor pKG10 trawiono kolejno enzymami restrykcyjnymi Sall oraz SphI, wycinano z żelu fragment o wielkości 5766 bp pozbawiony genu *ble*, a zlinearyzowany wektor poddano ligacji z trawionym tymi samymi enzymami produktem PCR wielkości 1620 bp niosącym geny oporności na kanamycynę oraz bleomycynę, amplifikowanym na matrycy plazmidu **pUB110** przy użyciu starterów KanBleR i KanBleL. W wyniku tego powstał wektor o nazwie **pKG11** o wielkości 7394 bp, do którego, po uprzednim sprawdzeniu poprawności konstrukcji i namnożeniu w komórkach *E. coli* Top10 oraz trawieniu enzymami restrykcyjnymi KpnI i Sall, możliwe było wstawienie w miejsce MCS fragmentu DNA wielkości 256 bp niosącego sekwencje rozpoznawane przez liczne komercyjne i mniej komercyjne restryktazy (sekwencja przedstawiona została na

**rysunku 8.1).** Źródłem tej sekwencji był plazmid MCSpAG09 zsyntetyzowany przez firmę GeneArt, z którego wycięto MCS przy pomocy enzymów używanych do cięcia wektora pKG11. DNA poddano ligacji, której produktem transformowano komórki *E. coli* Top10. Potwierdzenia insercji MCS dokonano po izolacji wektora z komórek *E. coli* i analizie restrykcyjnej. Otrzymany ostateczny wektor o wielkości 7634 bp nazwano **pUR10**. Schemat przedstawiający konstrukcję plazmidu integracyjnego **pUR10** przedstawiono na **rysunku 8.2**.

```

      KpnI      DraIII      SpeI      AscI      AsiSI      BlnI
      -+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
1  gggtagccgag cactgtgtga gactagtgtg gcgcgccatg gcgatcgcag atcctaggct
   cccatggctc gtgacacact ctgatcacac cgcgcggtac cgctagcgtc taggatccga

                                     EagI
                                     -+-----
      BstBI      Bsu36I      BlpI      EcoNI      NotI      SacII
      -+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
61  ttcgaaaacc ctcaggtagc tcagcacacc tgactgaggt gtgcgggccgc gaccgcggtg
   aagcttttgg gagtccatcg agtcgtgtgg actgactcca cacgccggcg ctggcgccac

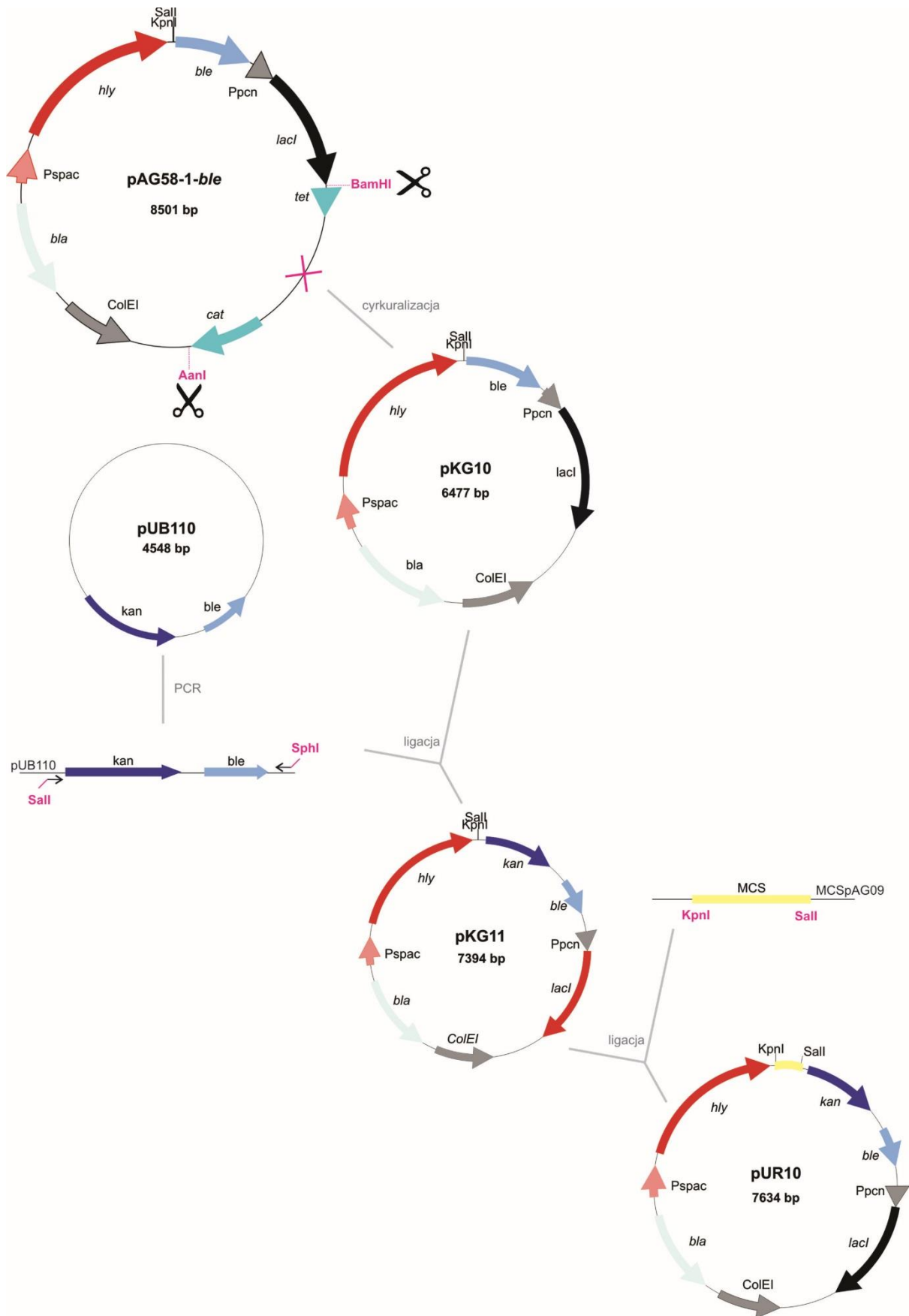
      XmaI      RsrII      SacI      PacI      XhoI      PasI
      -+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
121  cccgggctcg gaccgtcgag ctcatgttaa ttaatgcctc gagatcccag ggtgaccctg
   gggccccgagc ctggcagctc gagtacaatt aattacggag ctctagggtc ccaactgggac

      SbfI      SfiI      Sse232I      PmlI      PshAI
      -+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
181  caggtgaggc ccatatggcc agctcgccgg cgatgcacgt gtagagacat ctgtctgatc
   gtccactccg ggtataccgg tcgagcggcc gctacgtgca catctctgta gacagactag

      NruI      SalI
      -+-----+-----+
241  gcgaacagtc gacatg
   cgcttgtcag ctgtac

```

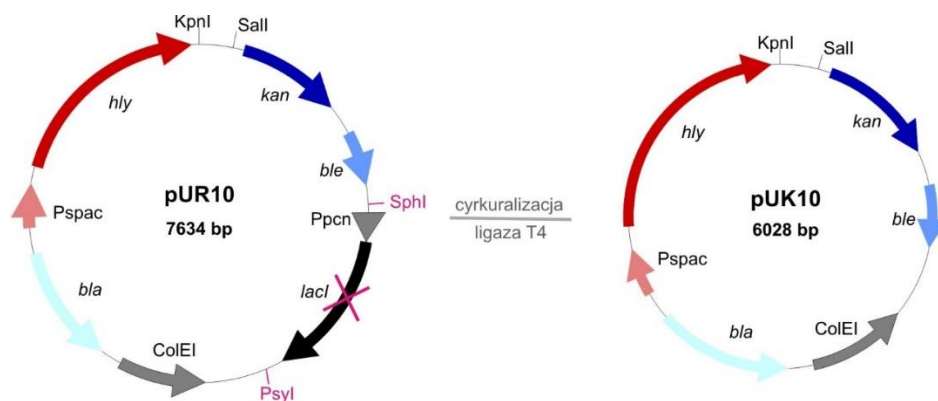
**Rysunek 8.1. Sekwencja nukleotydowa miejsca MCS plazmidu pUR10.** Kolorem niebieskim zaznaczono nazwy enzymów restrykcyjnych, natomiast znak „+” oznacza miejsce cięcia restryktazy.



Rysunek 8.2. Schemat konstrukcji wektora integracyjnego pUR10.

## 8.2. Konstrukcja wektora pUK10 umożliwiającego konstytutywną ekspresję genów sklonowanych w miejscu MCS i uzyskanie szczepu *B. subtilis* BR1C konstytutywnie wydzielającego LLO

Mając na uwadze potencjalne zastosowanie wektorów na bazie *B. subtilis* MB4 w immunizacji *in vivo*, skonstruowano analogiczny do pUR10 wektor pUK10, który umożliwia ekspresję sklonowanych w nim antygenów niezależnie od obecności induktora IPTG. Podanie induktora żywym organizmom nie byłoby możliwe i stanowiłoby ingerencję w analizowany układ doświadczalny. W celu uzyskania wektora pUK10, z wektora pUR10 usunięto gen represora *lacI*. W tym celu plazmid pUR10 trawiono restryktazami *SphI* i *PsyI*, uzyskując fragmenty DNA o wielkości 6028 bp i 1606 bp. DNA poddano rozdzielni elektroforetycznemu, po czym z żelu agarozowego wycięto większy fragment. Lepkie końce uzyskanego wektora wytępiono przy użyciu polimerazy Klenowa oraz polimerazy T4, po czym poddano go cyrkularyzacji przy pomocy ligazy faga T4 w standardowych warunkach, uzyskując ostateczny wektor pUK10 o wielkości 6028 bp. Produktem ligacji o wielkości 6028 bp transformowano komórki kompetentne *E. coli* Top10, izolowano DNA plazmidowe i analizowano restrykcyjnie w celu potwierdzenia poprawności sekwencji. Poprawność uzyskanej konstrukcji genetycznej zweryfikowano również poprzez sekwencjonowanie za pomocą starterów Saft-ble i Sin-ColEI, które okalają wycięty region plazmidu pUR10. Schemat przedstawiający konstrukcję plazmidu integracyjnego pUK10 przedstawiono na rysunku 8.3.



Rysunek 8.3. Schemat konstrukcji wektora integracyjnego pUK10.

Kolejnym krokiem było uzyskanie szczepu *B. subtilis*, który posiada zdolność do konstytutywnej sekrecji białka LLO do podłoża hodowlanego. Szczep ten stanowił kontrolę we wszystkich eksperymentach, w których analizowano produkcję LLO lub immunogenność szczepów pochodnych, konstytutywnie wytwarzających antygeny heterologiczne. Wektorem pUK10 transformowano komórki kompetentne *B. subtilis* MB4, a transformanty selekcjonowano na podłożu zawierającym kanamycynę o stężeniu 10 µg/ml. Na podstawie testu hemolitycznego określono ich zdolność do syntezy toksyny LLO bez udziału induktora IPTG. Wybrany szczep oznaczony został jako BR1C. Wyniki porównania hemolityczności szczepu BR1C i BR1S indukowanego przez IPTG przedstawiono na **rysunku 5.2** w rozdziale **Wyniki**.

### 8.3. Konstrukcja szczepów *B. subtilis* wytwarzających antygeny fuzyjne LLO-OVA

#### **Sekwencje nukleotydowe genów wykorzystywanych przy konstrukcji wektorów niosących antygen fuzyjny LLO-OVA**

Przedstawione sekwencje nukleotydowe prezentują nić kodującą DNA (w innym przypadku zaznaczony jest typ cząsteczki). Kolorem **niebieskim** przedstawiono odpowiadające im sekwencje aminokwasowe. Podkreślono i **pogrubiono** kodon start i kodon stop translacji każdej przedstawionej ramki odczytu.

- a) **N-końcowa sekwencja genu *hly* kodującego listeriolizynę O zoptymalizowana dla *B. subtilis* pod względem częstości wykorzystania kodonów** (przygotowana według sekwencji genu *hly* *L. monocytogenes* 10403S opisanej w **załączniku 8.3**)

**RBS**

sekwencja sygnałowa

sekwencja PEST-podobna

```

1 ggtacctgac tgaggagga gaggagagtgaaacc catgatgaaaaaaaa atcatgcttg ttttcatcac acttatcctt
>>.....hly.....>
m k k i m l v f i t l i l

```

```

071 gtttctcttc ctatcgtca aaaaactgaa gctaagaatg cgtctgcggt caacaagaa aattctatct
>.....hly.....>
   v s l p i a q q t e a k d a s a f n k e n s i

141 ctctatggc tcctcctgct tctcctctg ctctcctaa a...
>.....hly.....>>
   s s m a p p a s p p a s p k...

```

## b) Sekwencja cDNA genu OVA kodująco owoalbuminę jaja kurzego

### SIINFEKL

```

1  atgggctcca tcggcgcagc aagcatggaa ttttgtttg atgtattcaa ggagctcaaa gtcaccatg
>>.....ova.....>
   m g s i g a a s m e f c f d v f k e l k v h h

71  ccaatgagaa catcttctac tgccccattg coactcatgct agctctagcc atggatatacc tgggtgcaaa
>.....ova.....>
   a n e n i f y c p i a i m s a l a m v y l g a

141 agacagcacc aggacacaga taaataaggt tgctcgcttt gataaacttc caggattcgg agacagtatt
>.....ova.....>
   k d s t r t q i n k v v r f d k l p g f g d s i

211 gaagctcagt gtggcacatc tgtaaacggt cactcttcac ttagagacat cctcaaccaa atcaccaaac
>.....ova.....>
   e a q c g t s v n v h s s l r d i l n q i t k

281 caaatgatgt ttatttgctc agccttgcca gtagacttta tgctgaagag agatacccaa tcttgccaga
>.....ova.....>
   p n d v y s f s l a s r l y a e e r y p i l p

351 atacttcagc tgggtgaagc aactgtatag aggaggcttg gaacctatca actttcaaac agctgcagat
>.....ova.....>
   e y l q c v k e l y r g g l e p i n f q t a a d

421 caagccagag agctcatcaa ttctgggta gaaagtcaga caaatggaat tatcagaaat gtccttcagc
>.....ova.....>
   q a r e l i n s w v e s q t n g i i r n v l q

491 caagctccgt ggattctcaa actgcaatgg tcttggttaa tgccattgct ttcaaaggac tgtgggagaa
>.....ova.....>
   p s s v d s q t a m v l v n a i v f k g l w e

561 aacatttaag gatgaagaca cacaagcaat gcctttcaga gtgactgagc aagaaagcaa acctgtgcag
>.....ova.....>
   k t f k d e d t q a m p f r v t e q e s k p v q

631 atgatgtacc agattgggtt atttagagtg gcatcaatgg ctctgagaa aatgaagatc ctggagcttc
>.....ova.....>
   m m y q i g l f r v a s m a s e k m k i l e l

701 catttgccag tgggacaatg agcatgttg tgctgttgcc tgatgaagtc tcaggccttg agcagcttga
>.....ova.....>
   p f a s g t m s m l v l l p d e v s g l e q l

771 gagtataatc aactttgaaa aactgactga atggaccagt tctaagtta tggagagag gaagatcaaa
>.....ova.....>
   e s i i n f e k l t e w t s s n v m e e r k i k

841 gtgtacttac ctgcgatgaa gatggaggaa aaatacaacc tcacatctgt cttaatggct atgggcatta
>.....ova.....>
   v y l p r m k m e e k y n l t s v l m a m g i

911 ctgacgtggt tagctcttca gccaatctgt ctggcatctc ctgagcagag agcctgaaga tatctcaagc
>.....ova.....>
   t d v f s s s a n l s g i s s a e s l k i s q

```



981 tgtccatgca gcacatgcag aaatcaatga agcaggcaga gaggtggtag ggtcagcaga ggctggagtg  
 >.....ova.....>  
 a v h a a h a e i n e a g r e v v g s a e a g v

1051 gatgctgcaa gcgtctctga agaatttagg gctgaccatc cattcctctt ctgtatcaag cacatcgcaa  
 >.....ova.....>  
 d a a s v s e e f r a d h p f l f c i k h i a

1121 ccaacgccgt tctcttcttt ggcagatgtg tttccctta a  
 >.....ova.....>>  
 t n a v l f f g r c v s p -

**c) Sekwencja cDNA genu kodującego owoalbuminę jaja kurzego zoptymalizowana dla *B. subtilis* pod względem częstości wykorzystania kodonów**

**SIINFEKL**

1 atgggctcta tcggcgctgc ttctatggaa ttctgcttcg atgttttcaa agaacttaa gttcatcatg  
 >>.....OVA-Bs.....>  
 m g s i g a a s m e f c f d v f k e l k v h h

71 ctaacgaaaa catcttctac tgcctatcg ctatcatgtc tgctcttget atggtttacc ttggcgctaa  
 >.....OVA-Bs.....>  
 a n e n i f y c p i a i m s a l a m v y l g a

141 agattctaca cgtacacaaa tcaataaagt tgtaggttc gataaacttc caggttcgg cgattctatc  
 >.....OVA-Bs.....>  
 k d s t r t q i n k v v r f d k l p g f g d s i

211 gaagctcaat gcggcacatc tgtaacggt cattcttctc ttctgatat ccttaaccaa atcacaaaa  
 >.....OVA-Bs.....>  
 e a q c g t s v n v h s s l r d i l n q i t k

281 ctaacgatgt ttactcttctc tctcttgctt ctctgcttta cgctgaagaa cgttacceta tcttctctga  
 >.....OVA-Bs.....>  
 p n d v y s f s l a s r l y a e e r y p i l p

351 ataccttcaa tgggttaaag aactttaccg tggcgccctt gaacctatca acttccaaac agctgctgat  
 >.....OVA-Bs.....>  
 e y l q c v k e l y r g g l e p i n f q t a a d

421 caagctcgtg aacttatcaa ctcttgggtt gaatctcaaa caaacggcat catccgtaac gttcttcaac  
 >.....OVA-Bs.....>  
 q a r e l i n s w v e s q t n g i i r n v l q

491 cttcttctgt tgattctcaa acagctatgg ttcttggtaa cgctatcgtt ttcaaaggcc ttgggaaaa  
 >.....OVA-Bs.....>  
 p s s v d s q t a m v l v n a i v f k g l w e

561 aacattcaaa gatgaagata cacaagctat gcctttccgt gttacagaac aagaatctaa acctgttcaa  
 >.....OVA-Bs.....>  
 k t f k d e d t q a m p f r v t e q e s k p v q

631 atgatgtacc aaatcgccct tttccgtggt gcttctatgg cttctgaaaa aatgaaaac cttgaacttc  
 >.....OVA-Bs.....>  
 m m y q i g l f r v a s m a s e k m k i l e l

701 ctttgccttc tggcacaatg tctatgcttg ttcttctccc tgacgaagta agcggccttg aacaacttga  
 >.....OVA-Bs.....>  
 p f a s g t m s m l v l l p d e v s g l e q l

771 atctatcatc aacttcgaaa aacttacaga atggacatct tctaacgta tggagaacg taaaatcaaa  
 >.....OVA-Bs.....>  
 e s i i n f e k l t e w t s s n v m e e r k i k

```

841 gtttaccttc ctcgatgaa aatggaagaa aaatacaacc ttacatctgt tcttatgggt atgggcataa
>.....OVA-Bs.....>
  v y l p r m k m e e k y n l t s v l m a m g i

911 ctgatgtatt cagctcttct gctaaccttt ctggcatctc ttctgctgaa tctcttaaaa tctctcaagc
>.....OVA-Bs.....>
  t d v f s s s a n l s g i s s a e s l k i s q

981 tgttcatgct gctcatgctg aaatcaacga agctggcctg gaagttggtg gctctgctga agctggcgtt
>.....OVA-Bs.....>
  a v h a a h a e i n e a g r e v v g s a e a g v

1051 gatgctgctt ctgtttctga agaattccgt gctgatcctc ctttctcttt ctgcatcaaa catatcgcta
>.....OVA-Bs.....>
  d a a s v s e e f r a d h p f l f c i k h i a

1121 caaacgctgt tcttttcttc ggccgttgcg tttctcctta_a
>.....OVA-Bs.....>>
  t n a v l f f g r c v s p -

```

### **Uzyskanie plazmidowych wektorów niosących fuzyjne antygeny LLO-OVA**

W celu zbadania znaczenia długości eksprymowanego antygeny modelowego w indukcji odpowiedzi komórkowej, zaplanowano fuzje translacyjne N-końcowej sekwencji listeriolizyny O z pełnej długości sekwencją owoalbuminy bądź sekwencją kodującą jedynie 8-aminokwasowy epitet SIINFEKL. Zaplanowano wykonanie 4 wektorów plazmidowych kodujących odpowiednio:

- a) pUR101 – LLO z przyłączonym w C-końcu epitetem SIINFEKL OVA,
- b) pUR102 – LLO oraz fuzyjne białko LLO-OVA (N-terminalna sekwencja LLO zawierająca miejsce RBS, sekwencję sygnałową SP i PEST-podobną LLO poddana fuzji do sekwencji epitetu SIINFEKL OVA),
- c) pUR103 – LLO oraz fuzyjne białko LLO-OVA (N-terminalna sekwencja LLO zawierająca miejsce RBS, sekwencję sygnałową SP i PEST-podobną LLO poddana fuzji do pełnej długości sekwencji OVA),
- d) pUR104 – LLO i dodatkową skróconą, 420-aminokwasową formę LLO, do której C-końca przyłączono epitet SIINFEKL OVA.

Wszystkie fuzje genetyczne, z wyjątkiem fuzji sklonowanej w plazmidzie pUR104, zostały komercyjnie zsyntetyzowane przez firmę Mr. Gene i dostarczone w postaci wstawek na plazmidach pMA-T. Przedstawione poniżej sekwencje nukleotydowe prezentują nić kodującą DNA. Pod odpowiednimi fragmentami sekwencji oznaczone zostało ich pochodzenie (gen *hly* lub OVA). Kolorem **niebieskim** przedstawiono odpowiadające im sekwencje aminokwasowe. Podkreślono i **pogrubiono** kodon start i kodon stop translacji

każdej przedstawionej ramki odczytu. Oznaczone zostały również istotne elementy sekwencji: **RBS**, sekwencja sygnałowa *hly*, sekwencja PEST-podobna *hly* oraz **epitop SIINFEKL OVA**. Granatowa czcionka została wykorzystana do oznaczenia miejsc cięcia restryktaz użytych do klonowania. Przy planowaniu konstrukcji posłużono się sekwencjami LLO i owoalbuminy jaja kurzego zoptymalizowanymi za pomocą bioinformatycznego narzędzia CodonAdaptationTool pod względem częstości wykorzystania kodonów dla *B. subtilis* 168. Optymalizacja tzw. „codon usage” jest metodą zwiększającą szansę na osiągnięcie skutecznej sekrecji heterologicznych białek w *B. subtilis*.

a) Sekwencja fuzyjnej wstawki LLO-OVA klonowanej w plazmidzie pUR101 (pMA-T1):

```

NheI
--+----
1  gctagctcat ttcacatcgt ccacatctattt gctcggtaac gcgagaaata ttaatgttta cgctaaagaa
   >>.....hly.....>
      l a h f t s s i y l p g n a r n i n v y a k e

71  tgcactgggt tagcttgga atggtggaga acggaattg atgaccgaa cttaccactt gtgaaaata
   >.....hly.....>
      c t g l a w e w w r t v i d d r n l p l v k n

141  gaaatatctc catctggggc accacgttt atccgaaata tagtaataaa gtagataatc caatcgaatc
   >.....hly.....>
      r n i s i w g t t l y p k y s n k v d n p i e
                                                    OVA >>

                                     RsrII
                                     --+----
211  tatcatcaac ttcgaaaaac ttaataata aacggaccg
   >.....OVA.....>
      s i i n f e k l - - -

```

b) Sekwencja fuzyjnej wstawki LLO-OVA klonowanej w plazmidzie pUR102 (pMA-T2):

```

NotI
--+----
1  gcggccgcaa ggagagtgaa acccatgaaa aaaatcatgc ttgttttcat cacacttatc cttgtttctc
   >>.....hly.....>
      m k k i m l v f i t l i l v s

71  ttcctatcgc tcaacaaact gaagctaaag atgcgtctgc gttcaacaaa gaaaatteta tctctctat
   >.....hly.....>
      l p i a q q t e a k d a s a f n k e n s i s s
                                                    SalI
                                                    --+----
141  ggctcctcct gcttctcctc ctgcttctcc taaatctatc atcaacttgc aaaaacttta ataataagtc gac
   >.....hly.....>
      m a p p a s p p a s p k
   >>.....OVA.....>
      s i i n f e k l - - -

```

c) Sekwencja fuzyjnej wstawki LLO-OVA klonowanej w plazmidzie pUR103:

Ze względu na duży rozmiar, fuzyjna wstawka została zsyntetyzowana w dwóch fragmentach niesionych na wektorach pMA-T3\_1 i pMA-T3\_2.

**pMA-T3\_1:**

```

      KpnI
      ----+
1  ggtacctgac tgaggaagga gagtgaacc catgaaaaaaaa atcatgcttg ttttcatcac acttaccctt
      >>.....hly.....>
      m k k i m l v f i t l i l

071 gttttctcttc ctatcgctca acaaactgaa gctaaagatg cgtctgcggt caacaagaa aattctatct
      >.....hly.....>
      v s l p i a q q t e a k d a s a f n k e n s i

141 cttctatggc tctcctgct tctcctcctg cttctcctaa aatgggctct atcggcgctg cttctatgga
      >.....hly.....>
      s s m a p p a s p p a s p k
      >>.....OVA.....>
      m g s i g a a s m

211 attctgcttc gatgttttca aagaacttaa agttcatcat gctaacgaaa acatcttcta ctgccctatc
      >.....OVA.....>
      e f c f d v f k e l k v h h a n e n i f y c p i

281 gctatcatgt ctgctcttgc tatggtttac ctggcgcta aagattctac acgtacacaa atcaataaag
      >.....OVA.....>
      a i m s a l a m v y l g a k d s t r t q i n k

351 ttgttaggtt cgataaactt ccaggettgc gcgattctat cgaagctcaa tgcggcacat ctgtaacgt
      >.....OVA.....>
      v v r f d k l p g f g d s i e a q c g t s v n

      EcoRV
      ----+
421 tcattcttct cttcgtgata tc
      >.....OVA.....>
      v h s s l r d i
  
```

**pMA-T3\_2:**

```

      EcoRV
      ----+
1  gatatcctta accaaatcac aaaacctaac gatgtttact ctttctctct tgcttctcgt ctttacgctg
      >.....OVA.....>
      d i l n q i t k p n d v y s f s l a s r l y a

71  aagaacgtta ccctatcctt cctgaatacc ttcaatgcgt taaagaactt taccgtggcg gccttgaacc
      >.....OVA.....>
      e e r y p i l p e y l q c v k e l y r g g l e

141 tatcaacttc caaacagctg ctgatcaagc tctggaactt atcaactctt gggttgaatc tcaaacaaac
      >.....OVA.....>
      p i n f q t a a d q a r e l i n s w v e s q t n

211 ggcacatcc gtaacgttct tcaaccttct tctgttgatt ctcaaacagc tatggttctt gtaacgcta
      >.....OVA.....>
      g i i r n v l q p s s v d s q t a m v l v n a

281 tcgttttcaa aggccttttg gaaaaaacat tcaaagatga agatacacia gctatgcctt tccgtgttac
      >.....OVA.....>
      i v f k g l w e k t f k d e d t q a m p f r v

351 agaacaagaa tctaaactg ttcaaatgat gtaccaaate ggccttttcc gtgttgcttc tatgcttct
      >.....OVA.....>
      t e q e s k p v q m m y q i g l f r v a s m a s

421 gaaaaaatga aaatccttga acttcctttc gcttctggca caatgtctat gcttgttctt ctcctgacg
      >.....OVA.....>
      e k m k i l e l p f a s g t m s m l v l l p d
  
```

```

491 aagtaagcgg ccttgaacaa cttgaa tcta tcatcaactt cgaaaaactt acagaatgga catcttctaa
>.....OVA.....>
e v s g l e q l e s i i n f e k l t e w t s s

561 cgttatgtaa gaacgtaaaa tcaaagtta ccttctcgt atgaaaatgg aagaaaaata caaccttaca
>.....OVA.....>
n v m e e r k i k v y l p r m k m e e k y n l t

631 tctgttctta tggctatggg cataactgat gtattcagct cttctgctaa cttttctggc atctctctg
>.....OVA.....>
s v l m a m g i t d v f s s s a n l s g i s s

701 ctgaatctct taaaatctct caagctgttc atgctgctca tgctgaaatc aacgaagctg gccgtgaagt
>.....OVA.....>
a e s l k i s q a v h a a h a e i n e a g r e

771 tgttgctct gctgaagctg gcgttgatgc tgcttctggt tctgaagaat tccgtgctga tcatccttc
>.....OVA.....>
v v g s a e a g v d a a s v s e e f r a d h p f

841 cttttctgca tcaaacatat cgctacaac gctgttcttt tcttcggcgg ttgcgtttct ccttaataat
>.....OVA.....>>
l f c i k h i a t n a v l f f g r c v s p - -

XhoI
-+----
911 aactcgag
-

```

d) Sekwencja fuzyjnej wstawki LLO-OVA klonowanej w plazmidzie pUR104:

```

SpeI
-+----
1 actagtatgt aga aggagag tgaaacccat gaaaaaata atgctagttt ttattacact tatattagtt
>>.....hly.....>
m k k i m l v f i t l i l v

71 agtctaccaa ttgcgcaaca aactgaagca aaggatgcatt ctgcattcaa taaagaaaat tcaatttcat
>.....hly.....>
s l p i a q q t e a k d a s a f n k e n s i s

141 ccatggcacc accagcatct cgcctgcaa gtcttaagac gccaatcgaa aagaaacacg cggatgaaat
>.....hly.....>
s m a p p a s p p a s p k t p i e k k h a d e

211 cgataagtat atacaaggat tggattacaa taaaacaat gtattagtat accacggaga tgcagtgaca
>.....hly.....>
i d k y i q g l d y n k n n v l v y h g d a v t

281 aatgtgccgc caagaaaagg ttacaaagat ggaatgaat atattgttgt ggagaaaaag aagaaatcca
>.....hly.....>
n v p p r k g y k d g n e y i v v e k k k k s

351 tcaatcaaaa taatgcagac attcaagttg tgaatgcaat ttcgagccta acctatccag gtgctctcgt
>.....hly.....>
i n q n n a d i q v v n a i s s l t y p g a l

421 aaaagcgaat tcggaattag tagaaaatca accagatggt ctcctgtaa aacgtgattc attaactc
>.....hly.....>
v k a n s e l v e n q p d v l p v k r d s l t l

491 agcattgatt tgccaggtat gactaatcaa gacaataaaa tagttgtaaa aaatgccact aaatcaaacg
>.....hly.....>
s i d l p g m t n q d n k i v v k n a t k s n

561 ttaacaacgc agtaaataca ttagtgaaa gatggaatga aaaatatgct caagcttatc caaatgtaag
>.....hly.....>
v n n a v n t l v e r w n e k y a q a y p n v

```

```

631  tgcaaaaatt gattatgatg acgaaatggc ttacagtgaa tcacaattaa ttgcgaaatt tggtacagca
>.....hly.....>
s a k i d y d d e m a y s e s q l i a k f g t a

701  tttaaagctg taaataatag cttgaatgta aacttcggcg caatcagtga agggaaaatg caagaagaag
>.....hly.....>
f k a v n n s l n v n f g a i s e g k m q e e

771  tcattagttt taaacaaatt tactataacg tgaatgttaa tgaacctaca agaccttcca gatttttcgg
>.....hly.....>
v i s f k q i y y n v n v n e p t r p s r f f

841  caaagctggt actaaagagc agttgcaagc gcttggagtg aatgcagaaa atcctcctgc atatatctca
>.....hly.....>
g k a v t k e q l q a l g v n a e n p p a y i s

911  agtgtggcgt atggccgtca agtttatttg aaattatcaa ctaattccca tagtactaaa gtaaaagctg
>.....hly.....>
s v a y g r q v y l k l s t n s h s t k v k a

981  cttttgatgc tgccgtaagc ggaaaatctg tctcaggtga tgtagaacta acaaatatca tcaaaaattc
>.....hly.....>
a f d a a v s g k s v s g d v e l t n i i k n

1051  ttcttcaaaa gccgtaattt acggaggttc cgcaaaagat gaagttcaaa tcatcgacgg caacctcgga
>.....hly.....>
s s f k a v i y g g s a k d e v q i i d g n l g

1211  gacttacgcg atattttgaa aaaaggcgct acttttaate gagaaacacc aggagttccc attgcttata
>.....hly.....>
d l r d i l k k g a t f n r e t p g v p i a y

1191  caacaaactt cctaaaagac aatgaattag ctgttattaa aaacaactca gaatatattg aaacaacttc
>.....hly.....>
t t n f l k d n e l a v i k n n s e y i e t t

1261  aaaagcttat acagatggaa aaattaacat cgatcactct ggaggatagc ttctatcat caacttcgaa
>.....hly.....>>
s k a y t d g k i n i d h s g g y v
RsrII
-+-----
>>.....OVA.....>
s i i n f e

1331  aaacttcgga ccg
>...>> OVA
k l

```

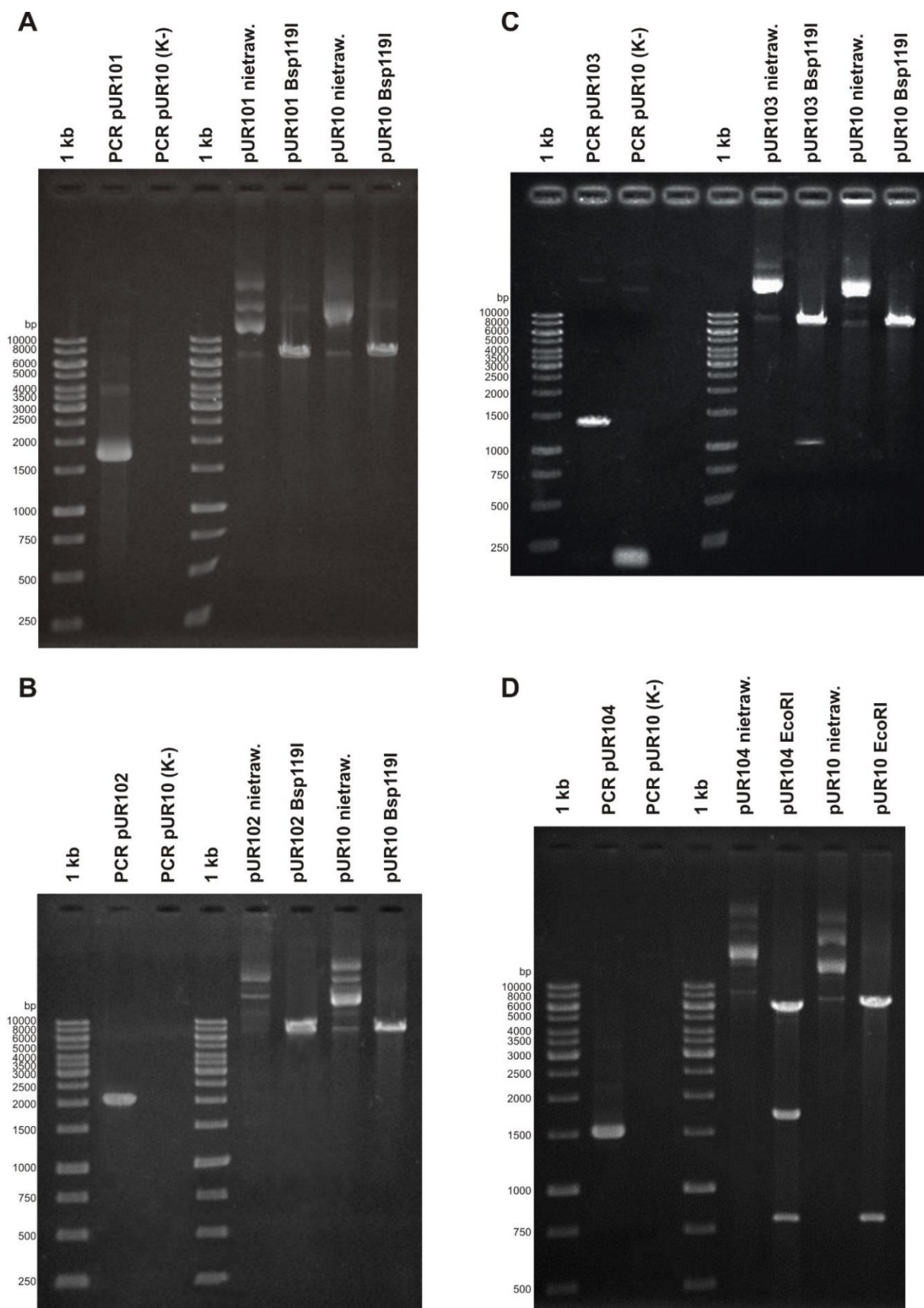
Konstrukcje pUR101, pUR102 i pUR103 uzyskano poprzez wycięcie syntetycznych sekwencji fuzyjnych z komercyjnych wektorów GeneArt i wklonowanie ich do miejsca MCS w wektorze pUR10, natomiast wstawkę do konstrukcji pUR-OVA4 stanowił produkt reakcji PCR przeprowadzonej na matrycy chromosomu *L. monocytogenes* 10403S z wykorzystaniem starterów, z których lewy niósł sekwencję oktapeptydu SIINFEKL. Schemat konstrukcji przedstawia **tabela 8.1**. Poprawność konstrukcji otrzymanych wektorów potwierdzono w toku trawień restrykcyjnych, analizy PCR oraz sekwencjonowania (**rysunek 8.4**). **Tabela 8.2** przedstawia użyte do analizy enzymy restrykcyjne, wielkości powstałych w trawieniu fragmentów DNA, startery użyte do reakcji PCR i sekwencjonowania oraz wielkości powstałych produktów amplifikacji.

**Tabela 8.1**Schemat konstrukcji na bazie wektora pUR10 niosących fuzje genowe *hly*-OVA

Nazwa wektora	Schemat konstrukcji	Metoda otrzymania fuzji	Wielkość uzyskanego wektora
pUR101	Fuzja genu <i>hly</i> i sekwencji kodującej epitop OVA - SIINFEKL	Wycięcie N-końcowej fuzyjnej sekwencji genu <i>hly</i> z dołączoną sekwencją epitopu SIINFEKL z syntetycznego wektora pMA-T1 (NheI / RsrII, 242 bp) i wstawienie w miejsca NheI / RsrII w trawionym wektorze pUR10 (7245 bp)	7487 bp
pUR102	Fuzja sekwencji sygnałnej, sekwencji PEST-podobnej genu <i>hly</i> z sekwencją epitopu OVA - SIINFEKL	Wycięcie sekwencji fuzyjnej z syntetycznego wektora pMA-T2 (Sall / NotI, 206 bp) i wstawienie w miejsca Sall / NotI w trawionym wektorze pUR10 (7490 bp)	7696 bp
pUR103	Fuzja sekwencji sygnałnej, sekwencji PEST-podobnej genu <i>hly</i> z sekwencją całego genu OVA	Wycięcie fragmentu genu <i>hly</i> z wektora syntetycznego pMA-T3_1 (EcoNI / EcoRV, 430 bp) i sekwencji OVA z wektora syntetycznego pMA-T3_2 (EcoRV / XhoI, 910 bp) i wstawienie obu fragmentów w miejsca EcoNI / XhoI trawionego wektora pUR10 (7569 bp)	8909 bp
pUR104	Fuzja sekwencji genu <i>hly</i> odpowiadającej 420 pierwszym aminokwasom LLO z sekwencją epitopu OVA - SIINFEKL	Amplifikacja fragmentu genu <i>hly</i> na matrycy chromosomu <i>L. monocytogenes</i> 10403S ze użyciem starterów pL420aaLLO (SpeI) i pR420aaLLO (sekwencja SIINFEKL + RsrII) (produkt 1367 bp) i wstawienie go w miejsce SpeI / RsrII w trawionym wektorze pUR10 (7634 bp)	8863 bp

**Tabela 8.2**Schemat analizy uzyskanych wektorów na bazie pUR10 niosących fuzje genowe *hly*-OVA

Nazwa wektora	Analiza restrykcyjna			Analiza PCR			Sekwencjonowanie - startery	Wynik analizy
	Enzym	Wzór cięcia wektora ze wstawką [bp]	Wzór cięcia wektora bez wstawki [bp]	Startery	Produkt PCR – wektor ze wstawką [bp]	Produkt PCR – wektor bez wstawki [bp]		
pUR101	Bsp119I	Linearyzacja (7847)	Linearyzacja (7634)	pLhly1203 pPokta0510	1693	-	SP-hly C-term-OVA	Rys. 8.6 a
pUR102	Bsp119I	7468 228	Linearyzacja (7634)	pLhly1203 pPokta0510	2021	-	Saft-hly Sup-kan	Rys. 8.6 b
pUR103	Bsp119I	7921 988	Linearyzacja (7634)	SP-hly C-term-OVA	1430	-	Saft-MCS Sup-kan	Rys. 8.6 c
pUR104	EcoRI	6402 1688 773	6861 773	pLhly420aaLLO pPokta0510	1366	-	Saft-hly Sup-kan	Rys. 8.6 d



Rysunek 8.4. Potwierdzenie poprawności konstrukcji genetycznych plazmidów pUR101 – pUR104 niosących geny fuzyjne *hly-OVA*. A – pUR101, B – pUR102, C – pUR103, D – pUR104.



### **Uzyskanie szczepów *B. subtilis* produkujących białka fuzyjne LLO-OVA**

Uzyskane wektory plazmidowe były wprowadzane na drodze transformacji według protokołu Younge'a i Spizizen'a do kompetentnych komórek *B. subtilis* MB4. Wyselekcjonowane na podłożu z kanamycyną 10 µg/ml transformanty *B. subtilis* o nazwach R\_OVA1, R\_OVA2, R\_OVA3, R\_OVA4 pozytywnie zweryfikowano pod względem poprawności kodowanych genów fuzyjnych poprzez amplifikację wstawek za pomocą starterów zebranych w **tabeli 8.3** oraz sekwencjonowanie produktów PCR z wykorzystaniem tych samych starterów.

Szczep <i>B. subtilis</i>	Starter zgodny	Starter komplementarny
R_OVA1	SP-hly	C-term-OVA
R_OVA2	Saft-hly	Sup-kan
R_OVA3	Saft-hly	Sup-kan
R_OVA4	Saft-hly	Sup-kan

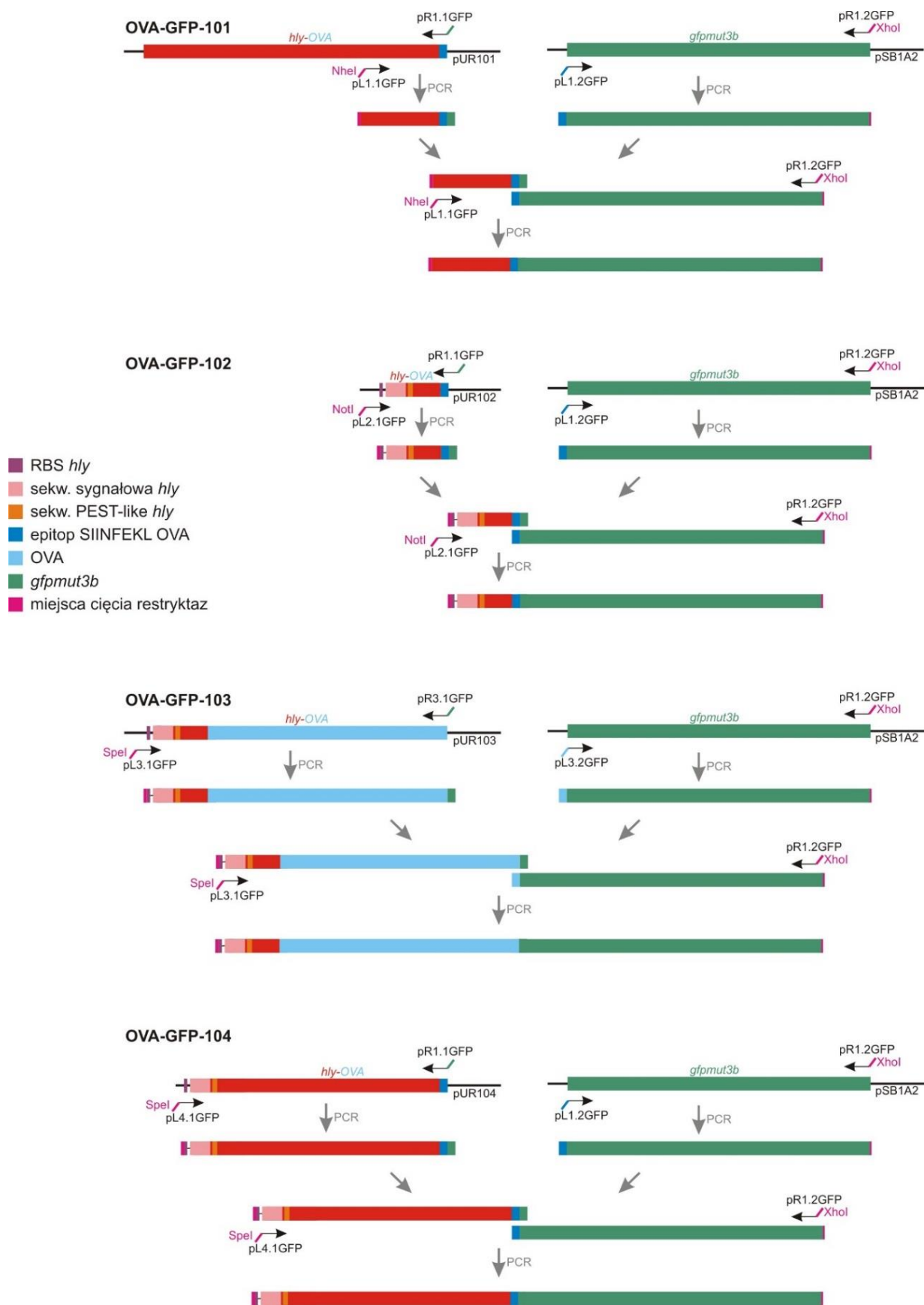
**Tabela 8.3**

Startery użyte do sekwencjonowania genów fuzyjnych *hly*-OVA zintegrowanych z chromosomem *B. subtilis*

### **8.4. Konstrukcja szczepów *B. subtilis* wytwarzających antygeny fuzyjne LLO-OVA-GFP**

#### **Uzyskanie plazmidowych wektorów niosących fuzyjne antygeny LLO-OVA-GFP**

Konstrukcję plazmidowych wektorów kodujących fuzyjny antygen LLO-OVA-GFP zaplanowano analogicznie do konstrukcji plazmidów pUR101 – pUR104. Sekwencja genu reporterowego GFP została dołączona do istniejących już wstawek na drodze Overlap Extension PCR. Na matrycy otrzymanych uprzednio wektorów pUR101 – pUR104 amplifikowano sekwencje fuzyjne *hly*-OVA, natomiast plazmid pMA-RQ\_p-rbs38-gfp-t (GeneArt) posłużył jako matryca do powielenia genu kodującego GFP (gen *gfpmut3b*), zoptymalizowanego pod względem częstości wykorzystania kodonów dla *B. subtilis*. Otrzymane fuzyjne wstawki po trawieniu odpowiednimi enzymami restrykcyjnymi wklonowywano do wektora pUR10. Schemat konstrukcji przedstawiono na **rysunku 8.5**, natomiast informacje na temat użytych w reakcjach PCR starterów, matryc DNA i wielkości amplifikowanych produktów zostały zebrane w **tabeli 8.4**. Analogicznie do poprzedniego etapu zadania opisanego w **załączniku 8.3**, wektory poddano analizie restrykcyjnej, PCR oraz sekwencjonowaniu (**tabela 8.5**). Z powodzeniem uzyskano plazmidy o poprawnej konstrukcji. Wyniki analiz zebrano w obrębie **rysunku 8.6**.



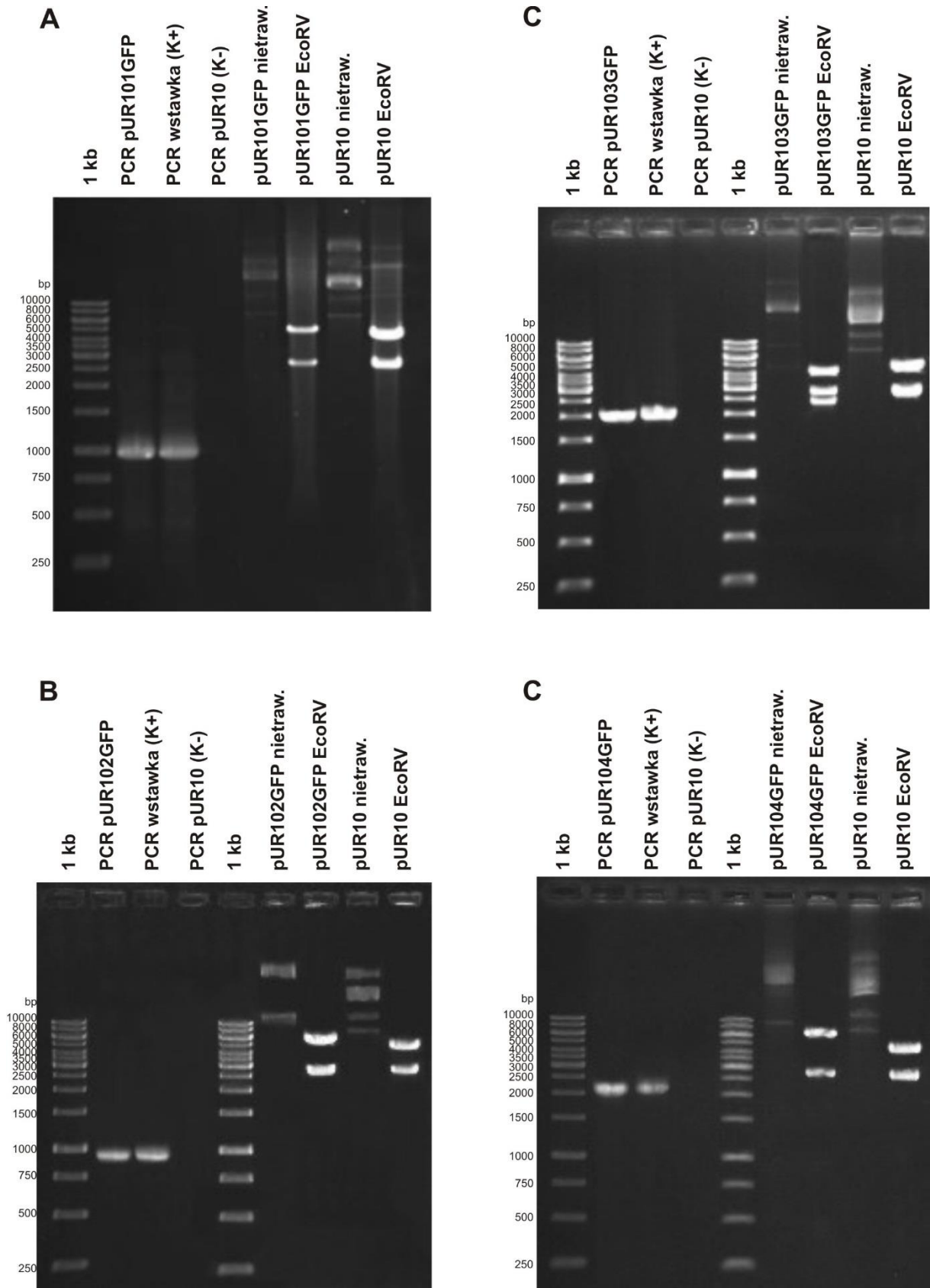
Rysunek 8.5. Schemat konstrukcji wstawek niosących sekwencje fuzyjnych białek LLO-OVA\_GFP klonowanych do wektora pUR10.

**Tabela 8.4**  
**Schemat konstrukcji na bazie wektora pUR10 niosących fuzje genowe *hly-OVA-GFP***

Wektor	Konstrukcja
pUR101GFP	<p><b>Amplifikacja wstawki:</b>  <u>Produkt 1:</u> amplifikacja genu fuzyjnego <i>hly-OVA</i> na matrycy pUR101 (pL1.1GFP, pR1.1GFP), produkt 256 bp  <u>Produkt 2:</u> amplifikacja genu GFP na matrycy pMA-RQ_p-rbs38-gfp-t (pL1.2GFP, pR1.2GFP), produkt 760 bp  <u>PCR OE</u> na matrycy produktu 1 i 2 (pL1.1GFP, pR1.2GFP), produkt 991 bp</p> <p><b>Klonowanie:</b>  Trawienie wstawki (967 bp) i wektora pUR10 (7217 bp) enzymami NheI i XhoI, ligacja ( produkt 8184 bp)</p>
pUR102GFP	<p><b>Amplifikacja wstawki:</b>  <u>Produkt 1:</u> amplifikacja genu fuzyjnego <i>hly-OVA</i> na matrycy pUR102 (pL2.1GFP, pR1.1GFP), produkt 214 bp  <u>Produkt 2:</u> amplifikacja genu GFP na matrycy pMA-RQ_p-rbs38-gfp-t (pL1.2GFP, pR1.2GFP), produkt 760 bp  <u>PCR OE</u> na matrycy produktu 1 i 2 (pL2.1GFP, pR1.2GFP), produkt 949 bp</p> <p><b>Klonowanie:</b>  Trawienie wstawki (932 bp) i wektora pUR10 (7580 bp) enzymami NotI i XhoI, ligacja ( produkt 8512 bp)</p>
pUR103GFP	<p><b>Amplifikacja wstawki:</b>  <u>Produkt 1:</u> amplifikacja genu fuzyjnego <i>hly-OVA</i> na matrycy pUR103 (pL3.1GFP, pR3.1GFP), produkt 1462 bp  <u>Produkt 2:</u> amplifikacja genu GFP na matrycy pMA-RQ_p-rbs38-gfp-t (pL3.2GFP, pR1.2GFP), produkt 762 bp  <u>PCR OE</u> na matrycy produktu 1 i 2 (pL3.1GFP, pR1.2GFP), produkt 2162 bp</p> <p><b>Klonowanie:</b>  Trawienie wstawki (2065 bp) i wektora pUR10 (7498 bp) enzymami SpeI i XhoI, ligacja ( produkt 9563 bp)</p>
pUR104GFP	<p><b>Amplifikacja wstawki:</b>  <u>Produkt 1:</u> amplifikacja genu fuzyjnego <i>hly-OVA</i> na matrycy pUR104 (pL4.1GFP, pR1.1GFP), produkt 1426 bp  <u>Produkt 2:</u> amplifikacja genu GFP na matrycy pMA-RQ_p-rbs38-gfp-t (pL1.2GFP, pR1.2GFP), produkt 760 bp  <u>PCR OE</u> na matrycy produktu 1 i 2 (pL4.1GFP, pR1.2GFP), produkt 2105 bp</p> <p><b>Klonowanie:</b>  Trawienie wstawki (2071 bp) i wektora pUR10 (7498 bp) enzymami SpeI i XhoI, ligacja ( produkt 9569 bp)</p>

**Tabela 8.5**  
**Schemat analizy uzyskanych wektorów na bazie pUR10 niosących fuzje genowe *hly-OVA-GFP***

Nazwa wektora	Analiza restrykcyjna			Analiza PCR			Sekwencjonowanie - startery	Wynik analizy
	Enzym	Wzór cięcia wektora ze wstawką [bp]	Wzór cięcia wektora bez wstawki [bp]	Startery	Produkt PCR – wektor ze wstawką [bp]	Produkt PCR – wektor bez wstawki [bp]		
pUR101GFP	EcoRV	5340	4790	pL1.1GFP	990	-	SP-hly	Rys. 8.8 a
		2844	2844	pR1.2GFP			C-term-OVA	
pUR102GFP	EcoRV	5668	4790	pL2.1GFP	949	-	Saft-hly	Rys. 8.8 b
		2844	2844	pR1.2GFP			Sup-kan	
pUR103GFP	EcoRV	4398	4790	pL3.1GFP	2083	-	Saft-MCS	Rys. 8.8 c
		2844	2844	pR1.2GFP			Sup-kan	
		2321						
pUR104GFP	EcoRV	6725	4790	pL4.1GFP	2102	-	Saft-hly	Rys. 8.8 d
		2844	2844	pR1.2GFP			Sup-kan	



Rysunek 8.6. Potwierdzenie poprawności konstrukcji genetycznych plazmidów pUR101GFP – pUR104GFP niosących geny fuzyjne *hly-OVA-gfpmut3b*. A – pUR101GFP, B – pUR102GFP, C – pUR103GFP, D – pUR104GFP.

### Uzyskanie szczepów *B. subtilis* produkujących białka fuzyjne LLO-OVA-GFP

Uzyskane wektory plazmidowe były wprowadzane na drodze transformacji według protokołu Younge'a i Spizizen'a do kompetentnych komórek *B. subtilis* MB4. Wyselekcjonowane transformanty *B. subtilis* o nazwach R\_OVA1GFP, R\_OVA2GFP, R\_OVA3GFP, R\_OVA4GFP pozytywnie zweryfikowano pod względem poprawności kodowanych genów fuzyjnych poprzez amplifikację wstawek za pomocą starterów zebranych w tabeli 8.6 oraz sekwencjonowanie produktów PCR z wykorzystaniem tych samych starterów.

Szczep <i>B. subtilis</i>	Starter zgodny	Starter komplementarny
R_OVA1GFP	Sin-hly, pL1.2GFP	pR1.1GFP, C-term-OVA
R_OVA2GFP	Saft-MCS, pL1.2GFP	pR1.1GFP, C-term-OVA
R_OVA3GFP	Saft-MCS, pL3.2GFP	pR3.1GFP, Sup-kan
R_OVA4GFP	Saft-MCS, pL1.2GFP	pR1.1GFP, Sup-kan

**Tabela 8.6**

Startery użyte do sekwencjonowania genów fuzyjnych *hly*-OVA-GFP zintegrowanych z chromosomem *B. subtilis*

### 8.5. Konstrukcja szczepów *B. subtilis* pozbawionych linkera CTL w białku SecA

#### Sekwencje genów wykorzystanych przy konstrukcji

Przedstawione poniżej sekwencje nukleotydowe prezentują nić kodującą DNA. Pod odpowiednimi fragmentami sekwencji oznaczone zostało ich pochodzenie (gen *secA* lub *spcS*). Kolorem niebieskim przedstawiono odpowiadające im sekwencje aminokwasowe. Podkreślono i **pogrubiono** kodon start i kodon stop translacji każdej przedstawionej ramki odczytu. W czerwonej ramce oznaczono również istotny element sekwencji: **kodon 780** **secA**. Czerwona czcionka została wykorzystana do oznaczenia miejsc przyłączania się starterów, natomiast granatowa do oznaczenia miejsc cięcia restryktaz użytych do klonowania.

a) Gen *secA* *B. subtilis* 168 (+ 414 bp):

```
1  atgcttggaat ttttaataa aatgttgat ccaacaaaac gtacgctgaa tagatagcaa aaaattgcta
   >>.....secA.....>
   m l g i l n k m f d p t k r t l n r y e k i a
```

71 acgatattga tgcgattcgc ggagactatg aaaatctctc tgacgacgca ttgaaacata aaacaattga  
>.....secA.....>  
n d i d a i r g d y e n l s d d a l k h k t i

141 atttaaagag cgtcttgaaa aaggggocgac aacggatgat cttcttggtg aagctttcgc tgttgttcga  
>.....secA.....>  
e f k e r l e k g a t t d d l l v e a f a v v r

211 gaagcttcac gccgcgtaac aggcattgtt cgttttaaag tccagctcat gggggcgtg gcgcttcacg  
>.....secA.....>  
e a s r r v t g m f p f k v q l m g g v a l h

281 acggaaatat agcggaaatg aaaacagggg aagggaaaac attaactgtc acctgcctg tttattttaa  
>.....secA.....>  
d g n i a e m k t g e g k t l t s t l p v y l

351 tgcgttaacc ggtaaaggcg tacacgtcgt gactgtcaac gaatacttgg caagccgtga cgctgagcaa  
>.....secA.....>  
n a l t g k g v h v v t v n e y l a s r d a e q

421 atggggaaaa ttttcgagtt tctcggttg actgtcggtt tgaatttaa ctcaatgtca aaagacgaaa  
>.....secA.....>  
m g k i f e f l g l t v g l n l n s m s k d e

491 aacgggaagc ttatgccgct gatattactt actccacaaa caacgagctt ggcttcgact atttgcgtga  
>.....secA.....>  
k r e a y a a d i t y s t n n e l g f d y l r

561 caatatgggt cttataaag agcagatggt tcagcgcccg cttcattttg cggtaataga tgaagttgac  
>.....secA.....>  
d n m v l y k e q m v q r p l h f a v i d e v d

631 tctattttaa ttgatgaagc aagaacaccg cttatcattt ctggacaagc tgcaaaatcc actaagctgt  
>.....secA.....>  
s i l i d e a r t p l i i s g q a a k s t k l

701 acgtacaggc aatgctttt gtccgcacgt taaaagcggg gaaggattac acgtacgata tcaaaacaaa  
>.....secA.....>  
y v q a n a f v r t l k a e k d y t y d i k t

771 agctgtacag cttactgaag aaggaatgac gaaggcggaa aaagcattcg gcatcgataa cctctttgat  
>.....secA.....>  
k a v q l t e e g m t k a e k a f g i d n l f d

841 gtgaagcatg tgcgctcaa ccaccatc aaccaggcct taaaagctca cgttgcatg caaaaggacg  
>.....secA.....>  
v k h v a l n h h i n q a l k a h v a m q k d

911 ttgactatgt agtgaagac ggacaggtt ttattgttga ttccttcacg ggacgtctga tgaaggccg  
>.....secA.....>  
v d y v v e d g q v v i v d s f t g r l m k g

981 ccgctacagt gaggggcttc accaagcgt tgaagcaaag gaaggcctg agattcaaaa cgaaagcatg  
>.....secA.....>  
r r y s e g l h q a i e a k e g l e i q n e s m

1051 accttgccga cgattacgtt ccaaaactac ttccgaatgt acgaaaaact tgccggatg acgggtacag  
>.....secA.....>  
t l a t i t f q n y f r m y e k l a g m t g t

1121 ctaagacaga ggaagaagaa ttccgcaaca tctacaacat gcaggtgtc acgatcccta ccaacaggcc  
>.....secA.....>  
a k t e e e e f r n i y n m q v v t i p t n r

1191 tgttgccgt gatgaccgcc cggatttaat ttaccgcacg atggaaggaa agtttaaggc agttgcccag  
>.....secA.....>  
p v v r d d r p d l i y r t m e g k f k a v a e

1261 gatgtgcac agcgttacat gacgggacag cctgttctag tccgtacggt tgccgttgaa acatctgaat  
>.....secA.....>  
d v a q r y m t g q p v l v g t v a v e t s e

```

1331 tgatttctaa gctgcttaa aacaaaggaa ttcgcatca agtgtaaataat gccaaaaacc atgaacgtga
>.....secA.....>
l i s k l l k n k g i p h q v l n a k n h e r

1401 agcgagatc attgaagagg cgggcaaaa aggcgagtt acgattgcca ctaacatggc ggggcgcgga
>.....secA.....>
e a q i i e e a g q k g a v t i a t n m a g r g

1471 acggacatta agcttgccga aggtgtaaaa gagcttgccg ggctcgctgt agtcggaaca gaacgacatg
>.....secA.....>
t d i k l g e g v k e l g g l a v v g t e r h

1541 aatcacgccg gattgacaat cagcttcgag gtcgttcgag acgtcagggg gaccggggga ttactcaatt
>.....secA.....>
e s r r i d n q l r g r s g r q g d p g i t q

1611 ttatctttct atggaagatg aattgatgag cagattcggg gctgagcgga caatggcgat gcttgaccgc
>.....secA.....>
f y l s m e d e l m r r f g a e r t m a m l d r

1681 ttcgcatggc acgactctac tccaatccaa agcaaatggc tatctcgccg ggttgaatcg tctcaaaaac
>.....secA.....>
f g m d d s t p i q s k m v s r a v e s s q k

1751 gcgtcgaagg caataacttc gattcgcgta aacagcttct gcaatatgat gatgtttctcc gccagcagcg
>.....secA.....>
r v e g n n f d s r k q l l q y d d v l r q q

1821 tgaggtcatt tataagcagc gctttgaagt cattgactct gaaaacctgc gtgaaatcgt tgaaaaatag
>.....secA.....>
r e v i y k q r f e v i d s e n l r e i v e n m
pL_secA_STOP →

1891 atcaagtctt ctctcgaacg cgcaattgca gcctatacgc caagagaaga gcttcctgag gagtggaagc
>.....secA.....>
i k s s l e r a i a a y t p r e e l p e e w k

1961 ttgacggtct agttgatctt atcaacacaa cttatcttga tgaagtgca cttgagaaga gcgatatctt
>.....secA.....>
l d g l v d l i n t t y l d e g a l e k s d i

2031 cggcaaagaa cgggatgaaa tgcttgagct cattatggat cgcacatca caaaatataa tgagaaggaa
>.....secA.....>
f g k e p d e m l e l i m d r i i t k y n e k e

2101 gagcaattcg gcaaagagca aatgcgcgaa ttcgaaaaag ttatcgttct tcgtgccgtt gattctaaat
>.....secA.....>
e q f g k e q m r e f e k v i v l r a v d s k

2171 ggatgatca tattgatgag atggatcagc tccgccaagg gattcacctt cgtgcttacg cgcagacgaa
>.....secA.....>
w m d h i d a m d q l r q g i h l r a y a q t

2241 cccgcttcgt gagtatcaaa tggaaggttt tcgatgttt gagcatatga ttgaatcaat tgaggacgaa
>.....secA.....>
n p l r e y q m e g f a m f e h m i e s i e d e
← pP_secA_STOP

2311 gtcgcaaat ttgtgatgaa agctgagatt gaaaacaatc tggagcgtga agaggttgta caaggtcaaa
>.....secA.....>
v a k f v m k a e i e n n l e r e e v v q g q

2381 caacagctca tcagccgcaa gaaggcgagc ataacaaaaa agcaaagaaa gcaccgggttc gcaaagtggt
>.....secA.....>
t t a h q p q e g d d n k k a k k a p v r k v
pL_secA_down →

2451 tgatcggg cgaatgccc catgccactg cggaagcggg aaaaaatata aaaattgctg cggccgtact
>.....secA.....>
v d i g r n a p c h c g s g k k y k n c c g r t

2521 gaatagttcg ccccgcaag tttactgacc gcggcgctg caggcgctg cggatctttt aatgaggtga
>...>> secA
e -

```

2591 atgaaatgga attatcagaa attagagcag agctcgaaaa tatggcttct cgtttagcgg actttagggg  
 2661 gtctctttga cctcgaatca aaggaggccc gcattgctga gctagatgaa caaatggctg atccggaatt  
 2731 ctggaatgat cagcaaaaag ctcaaacggt tataaatgaa gcaaacggtt taaaggatta tgtcaattcg  
 2801 tataaaaaat tgaatgaatc ccacgaagaa ttacaaatga ctcatgatct tttgaaagaa gagccggaca  
 2871 ctgatctcca gcttgagctt gaaaaagaac taaagtcatt aacaaaagag ttcaatgagt ttgagcttca

← pP\_secA\_down

b) Sekwencja kasety oporności na spektynomycynę z genem *spcS* znajdująca się na plazmidzie PIC156 (literą „n” oznaczono nukleotydy o nieznannej sekwencji):

1 nnnnnngaa ttcnnnnnnn gagctcnnnn nnnnggcccg ggnnnnnntc tagannnnnn aagcttnnnn  
 XbaI  
 +-+-----  
 71 nnctgcagnn nnnngtcgac nnnnnntcta gannnnnnga atcccttctg gagcgtcaaa taacagcaaa  
 141 tgtagtctca aaaccaaga aaagtctctg ttcggaggaa atccttatta aaacctaaa aagaagagta  
 211 atggaattag aaaaagaaaa taaaaaatta cagaaccaa ttcaaaaatt atatggagtt ctgtataata  
 281 aagaataatt attaatctgt agacaaattg tgaagagatg tacttaaacg ctaacggtca gctttattga  
 351 acagtaattt aagtatatgt ccaatctagg gtaagtaaat tgagtatcaa tataaacttt atatgaacat  
 421 aatcaacgag gtgaaatcat gagcaatttg attaacggaa aaataccaaa tcaacgatt caaacattaa  
 >>.....spcS.....>  
 m s n l i n g k i p n q a i q t l  
 491 aaatcgtaaa agatttattt ggaagttcaa tagttggagt atatctattt gggtcagcag taaatggagg  
 >.....spcS.....>  
 k i v k d l f g s s i v g v y l f g s a v n g  
 561 tttacgcatt aacagcgatg tagatgttct agtcgtctgt aatcatagtt tacctcaatt aactcgaaaa  
 >.....spcS.....>  
 g l r i n s d v d v l v v v n h s l p q l t r k  
 631 aaactaacag aaagactaat gactatatca ggaagattg gaaatacga ttctgttaga ccacttgaag  
 >.....spcS.....>  
 k l t e r l m t i s g k i g n t d s v r p l e  
 701 ttacggttat aataggagt gaagtgttc cttggcaata tcctcaaaa agagaattta tatacggtga  
 >.....spcS.....>  
 v t v i n r s e v v p w q y p p k r e f i y g  
 771 gtggctcagg ggtgaatttg agaatggaca aattcaggaa ccaagctatg atcctgattt ggctattggt  
 >.....spcS.....>  
 e w l r g e f e n g q i q e p s y d p d l a i v  
 841 ttagcacaag caagaaagaa tagtatttct ctatttggtc ctgattcttc aagtatactt gtctccgtac  
 >.....spcS.....>  
 l a q a r k n s i s l f g p d s s s i l v s v  
 911 ctttgacaga tattcgaaga gcaattaagg attcctttgcc agaactaatt gaggggataa aaggatga  
 >.....spcS.....>  
 p l t d i r r a i k d s l p e l i e g i k g d  
 981 gcgtaatgta attttaaccc tagctcgaat gtggcaaaaca gtgactactg gtgaaattac ctcgaaagat  
 >.....spcS.....>  
 e r n v i l t l a r m w q t v t t g e i t s k d  
 1051 gtcgctgcag aatgggctat acctctttta ctaaaagac atgtaacttt actggatata gctagaaaag  
 >.....spcS.....>  
 v a a e w a i p l l p k e h v t l l d i a r k



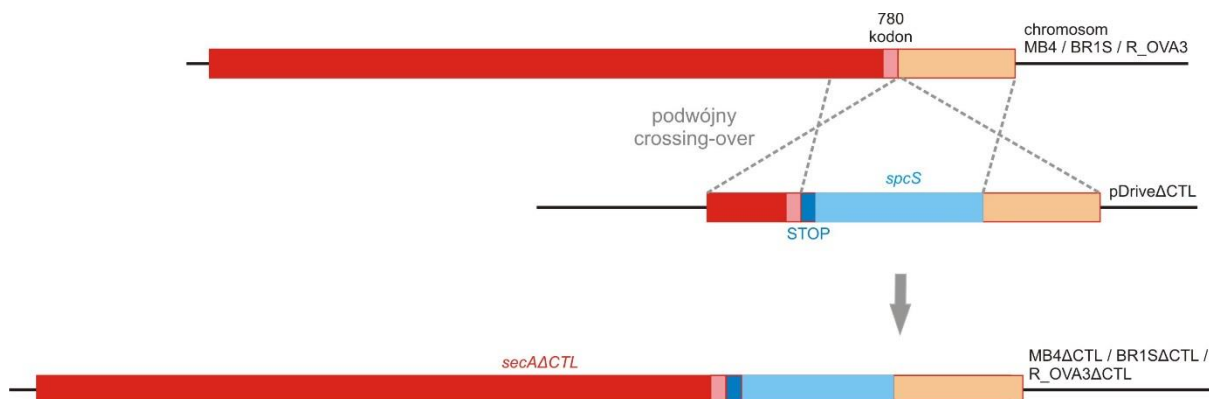
```

1121 gctatcgggg agagtgtgat gataagtggg aaggactata ttcaaaggtg aaagcactcg ttaagtatat
>.....spcS.....>
   g y r g e c d d k w e g l y s k v k a l v k y
1191 gaaaaattct atagaaactt ctctcaattaggctaatttt attgcaataa caggtgctta cttttaaaac
>.....spcS.....>
   m k n s i e t s l n -
1261 tactgattta ttgataaata ttgaacaatt tttgggaaga ataaagcgtc ctcttgtgaa attagagaac
                                     EcoRI
                                     -+----
1331 gctttattac tttgatccn nnaatttan nnnnnncccg gnnnnnnnnn gagctcnnnn gaattcnnnn

```

### Uzyskanie szczepów *BR1SΔCTL* i *R\_OVA3ΔCTL* z delecją linkera CTL w białku *SecA*

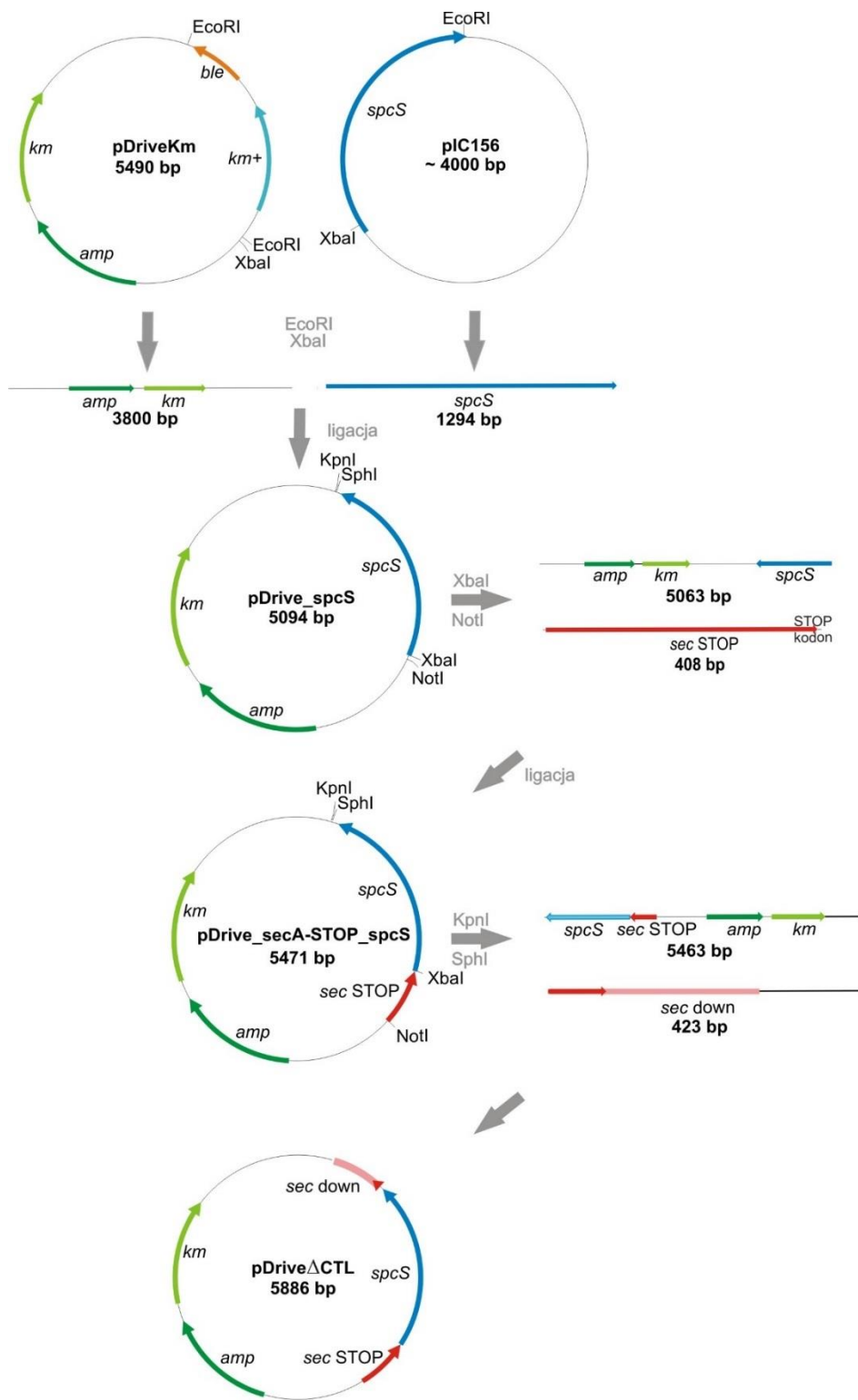
W celu dokonania delecji kodonów 780 – 819 kodujących linker CTL genu *secA*, w miejsce MCS plazmidu pDriveKm zostały kolejno wklonowane następujące elementy: a) kasetę oporności na spektynomycynę pochodząca z wektora pIC156 (miejsca restrykcyjne XbaI i EcoRI), b) sekwencja *secA* długości 423 bp znajdująca się powyżej kodonu 780, do której dołączono kodon STOP (miejsca restrykcyjne NotI i XbaI) c) sekwencja długości 408 bp znajdująca się poniżej 819 kodonu *secA* (miejsca restrykcyjne SphI i KpnI). Konstrukcja została zaprojektowana w taki sposób, aby dwa fragmenty genu *secA* rozdzielone były kasetą oporności antybiotykowej, umożliwiając zajście rekombinacji homologicznej i powstanie genu kodującego krótsze białko SecA pozbawione domeny CTL (**rysunek 8.7**).



Rysunek 8.7. Schemat mutagenyzy genu *secA* w chromosomie *B. subtilis* szczepów MB4, BR1S i R\_OVA3.

Fragmenty genu *secA* amplifikowano w reakcji PCR na matrycy chromosomu *B. subtilis* MB4 o fenotypie dzikim z użyciem starterów pL\_*secA*\_STOP (z miejscem restrykcyjnym NotI w końcu 5') i pP\_*secA*\_STOP (z kodonem STOP w końcu 5') dla górnej części *secA* klonowanej powyżej kasety oporności antybiotykowej oraz pL\_*secA*\_down

i pP\_secA\_down (z miejscem restrykcyjnym KpnI w końcu 5') dla sekwencji *secA* leżącej poniżej 780 kodonu. Schemat konstrukcji wektora pDrive $\Delta$ CTL przedstawiono na **rysunku 8.8**.



Rysunek 8.8. Schemat konstrukcji wektora pDrive $\Delta$ CTL do mutagenizacji genu *secA* w szczepach MB4, BR1S i R\_OVA3 *B. subtilis*.

Uzyskanym wektorem o wielkości 5886 bp transformowano komórki kompetentne *E. coli* GM2163 (*dam*-), a poprawność konstrukcji potwierdzono na drodze : a) analizy restrykcyjnej enzymem BlnI (wektor pDrive $\Delta$ CTL ulegał linearyzacji, podczas gdy wektor wyjściowy pDrive\_secA-STOP-spcS nie był trawiony), b) reakcji PCR z wykorzystaniem starterów pL\_secA\_STOP i pP\_secA\_down (produkt wielkości 2168 bp obecny jedynie w reakcji na matrycy pDrive $\Delta$ CTL) oraz c) sekwencjonowania przy użyciu starterów SP6 i T7. Następnie poprzez wprowadzenie wektora pDrive $\Delta$ CTL do komórek kompetentnych, uzyskano deletanty CTL w szczepach *B. subtilis* MB4, BR1S i R\_OVA3. Integrację kasety spektynomycynowej potwierdzono w reakcji PCR z użyciem starterów umożliwiających amplifikację całego genu *secA* (pLbsu\_up\_1008, pRbsu\_down\_1008) – na matrycy chromosomów deletantów uzyskiwano produkt wielkości 4779 bp, podczas gdy mniejszy produkt wielkości 3555 bp obserwowano w przypadku reakcji na matrycy chromosomów niemodyfikowanych szczepów.

## 8.6. Konstrukcja szczepów *B. subtilis* wytwarzających antygeny fuzyjne LLO-Ag85B

### **Sekwencje nukleotydowe genów wykorzystywanych przy konstrukcji wektorów niosących antygen fuzyjny LLO-Ag85B**

Przedstawione poniżej sekwencje nukleotydowe prezentują nić kodującą DNA. Pod odpowiednimi fragmentami sekwencji oznaczone zostało ich pochodzenie (gen *hly* lub *fbpB*). Kolorem **niebieskim** przedstawiono odpowiadające im sekwencje aminokwasowe. **Podkreślono** i **pogrubiono** kodon start i kodon stop translacji każdej przedstawionej ramki odczytu. **Czerwona czcionka** została wykorzystana do oznaczenia miejsc przyłączania się starterów, natomiast **granatowa** do oznaczenia miejsc cięcia restryktaz użytych do klonowania. Oznaczone zostały również istotne elementy sekwencji: **RBS**, **sekwencja sygnałowa *hly***, **sekwencja PEST-podobna *hly***.

a) N-końcowa sekwencja genu *hly* kodującego LLO

```

1  gcggccgcapL-SP-0114 ggagagtgaa accatgaaa aaaatcatgc ttgttttcat cacacttata ctgtttctc
    >>.....hly.....>
      m k k i m l v f i t l i l v s
  
```

```

71 ttctatcgc tcaacaaact gaagctaaag atgcgctctgc gttcaacaaa gaaaattcta tctcttctat
>.....hly.....>
l p i a q q t e a k d a s a f n k e n s i s s
      ← pP-SP-0114
141 ggctcctcct gctctctctc ctgcttctcc taaa...
>.....hly.....>
m a p p a s p p a s p k...

```

b) Sekwencja genu *fbpB* *M. tuberculosis* kodującego główny antygen Ag85B

```

      pL-Ag85-0114 →
1  atgacagacg tgagccgaaa gattcgagct tggggacgcc gattgatgat cggcacggca gcggctgtag
>>.....fbpB.....>
m t d v s r k i r a w g r r l m i g t a a a v

71 tccttcggg cctgggtggg ctgcccggc gagcggcaac cgcgggcgcg ttctcccggc cggggctgcc
>.....fbpB.....>
v l p g l v g l a g g a a t a g a f s r p g l

141 ggtcgagtac ctgcaggtgc cgtcgccgtc gatgggccgc gacatcaagg ttcagttcca gagcgggtggg
>.....fbpB.....>
p v e y l q v p s p s m g r d i k v q f q s g g

211 aacaactcac ctgcggttta tctgctcgac ggctcgccgc cccaagacga ctacaacggc tgggatatca
>.....fbpB.....>
n n s p a v y l l d g l r a q d d y n g w d i

281 acaccocggc gttcgagtgg tactaccagt cgggactgtc gatagtcatg ccggtcggcg ggcagtcocag
>.....fbpB.....>
n t p a f e w y y q s g l s i v m p v g g q s

351 ctctacagc gactgttaca gcccggcctg cggtaaggct ggctgccaga cttacaagtg gaaaccttc
>.....fbpB.....>
s f y s d w y s p a c g k a g c q t y k w e t f

421 ctgaccagcg agctgccgca atggttgtcc gccaacaggg ccgtgaagcc caccggcagc gctgcaatcg
>.....fbpB.....>
l t s e l p q w l s a n r a v k p t g s a a i

491 gcttgtcgat ggccggctcg tcggcaatga tcttgccgc ctaccacccc cagcagttca tctacgccgg
>.....fbpB.....>
g l s m a g s s a m i l a a y h p q q f i y a

561 ctcgctgtcg gccctgtgg acccctctca ggggatgggg ctagcctga tcggcctcgc gatgggtgac
>.....fbpB.....>
g s l s a l l d p s q g m g p s l i g l a m g d

631 gccggcggtt acaaggccgc agacatgtgg ggtccctcga gtgaccggc atgggagcgc aacgacccta
>.....fbpB.....>
a g g y k a a d m w g p s s d p a w e r n d p

701 cgcagcagat cccaagctg gtcgcaaaca acaccggct atgggtttat tgcgggaacg gcaccccgaa
>.....fbpB.....>
t q q i p k l v a n n t r l w v y c g n g t p

771 cgagttgggc ggtgccaaca taccgccga gttcttgag aacttcgttc gtagcagcaa cctgaagttc
>.....fbpB.....>
n e l g g a n i p a e f l e n f v r s s n l k f

841 caggatgctg acaacgccgc gggcgggcac aacgcctgt tcaacttccc gcccaacggc acgcacagct
>.....fbpB.....>
q d a y n a a g g h n a v f n f p p n g t h s

911 gggagtactg gggcgtcag ctcaacgcca tgaagggtga cctgcagagt tcgtagggcg ccggctga
>.....fbpB.....>
w e y w g a q l n a m k g d l q s s l g a g -
      ← pP-Ag85-0114

```

c) Sekwencja amplifikowanej wstawki fuzyjnej *hly-fbpB*

```

          KpnI
          -----+
1  tttcgtgggt accaaggaga gtgaaaccga tgaaaaaaat catgcttggt ttcacacac ttatccttgg
    >>.....hly.....>
    m k k i m l v f i t l i l

71  ttctcttct atcgtctaac aaactgaagc taaagatgcg tctgcttca caaagaaaa ttctatctct
    >.....hly.....>
    v s l p i a q q t e a k d a s a f n k e n s i s

141  ttctatggetc ctctctctc tctctctgct tctctctaaa cagacgtgag ccgaaagatt cgagcttggg
    >.....hly.....>
    s m a p p a s p p a s p k
    >>.....fbpB.....>
    t d v s r k i r a w

211  gacgccgatt gatgatcggc acggcagcgg ctgtagtctt tccgggcttg gtggggcttg ccggcggagc
    >.....fbpB.....>
    g r r l m i g t a a a v v l p g l v g l a g g

281  ggcaaccgcg ggcgcgttct cccggcgggg gctgcccgtc gagtacctgc aggtgccctc gccgtcgatg
    >.....fbpB.....>
    a a t a g a f s r p g l p v e y l q v p s p s m

351  ggccgcgaca tcaaggttca gttccagagc ggtgggaaca actcacctgc ggtttatctg ctgcacggcc
    >.....fbpB.....>
    g r d i k v q f q s g g n n s p a v y l l d g

421  tgcgcgcca agacgactac aacggctggg atatcaacac cccggcgttc gagtggctact accagtcggg
    >.....fbpB.....>
    l r a q d d y n g w d i n t p a f e w y y q s

491  actgtcgata gtcatgccgg tcggcgggca gtccagcttc tacagcgact ggtacagccc ggctcggcgt
    >.....fbpB.....>
    g l s i v m p v g g q s s f y s d w y s p a c g

561  aaggctggct gccagactta caagtgggaa accttctga ccagcgagct gccgcaatgg ttgtccgcca
    >.....fbpB.....>
    k a g c q t y k w e t f l t s e l p q w l s a

631  acagggcctg gaagcccacc ggcagcgtcg caatcggctt gtcgatggcc ggctcgtcgg caatgatctt
    >.....fbpB.....>
    n r a v k p t g s a a i g l s m a g s s a m i

701  ggccgcctac caccgccagc agttcatcta cgccgctcgt ctgtcggccc tgctggacc ctctcagggg
    >.....fbpB.....>
    l a a y h p q q f i y a g s l s a l l d p s q g

771  atggggccta gcctgatcgg cctcgcgatg ggtgacgccg gcggttaca gcccgagac atgtggggtc
    >.....fbpB.....>
    m g p s l i g l a m g d a g g y k a a d m w g

841  cctcgagtga cccggcatgg gagcgcaacg accctacgca gcagatcccc aagctggctg caaacaacac
    >.....fbpB.....>
    p s s d p a w e r n d p t q q i p k l v a n n

911  ccgctatgg gtttattgcg ggaacggcac cccgaacgag ttgggctgtg ccaacatacc cgccgagttc
    >.....fbpB.....>
    t r l w v y c g n g t p n e l g g a n i p a e f

981  ttggagaact tcgttcgtag cagcaactcg aagttccagg atgcgtacaa cgccggggc gggcacaacg
    >.....fbpB.....>
    l e n f v r s s n l k f q d a y n a a g g h n

1051  ccgtgttcaa cttcccgcc aacggcacgc acagctggga gtactggggc gctcagctca acgcatgaa
    >.....fbpB.....>
    a v f n f p p n g t h s w e y w g a q l n a m

```

```

                                SalI
                                -+-----
1121  gggtgacctg cagagttcgt taggcgccgg ctaataagtc gacccccaaa aa
      >.....fbpB.....>>
      k g d l q s s l g a g - -

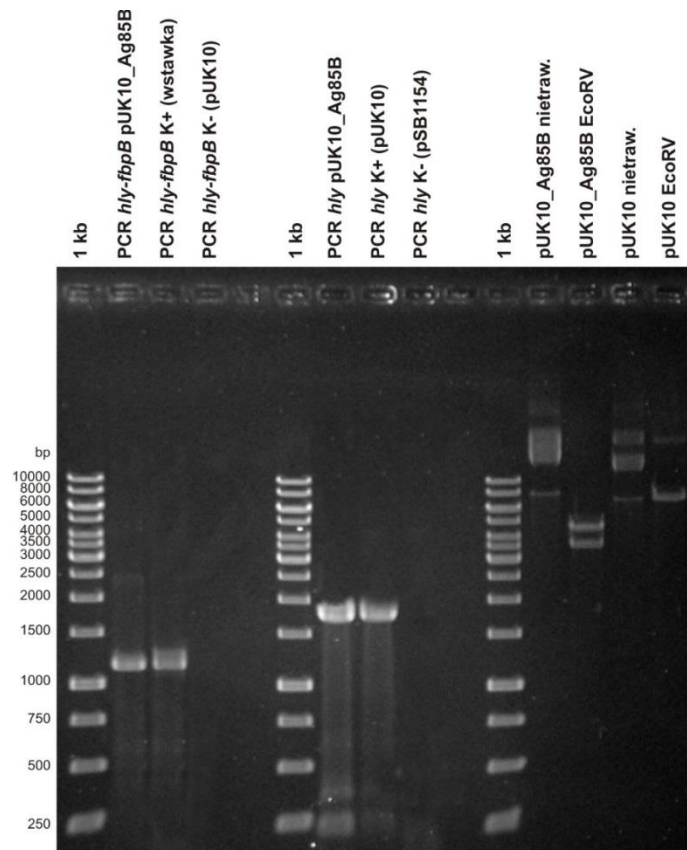
```

### Uzyskanie plazmidowych wektorów niosących fuzyjne antygeny LLO-OVA

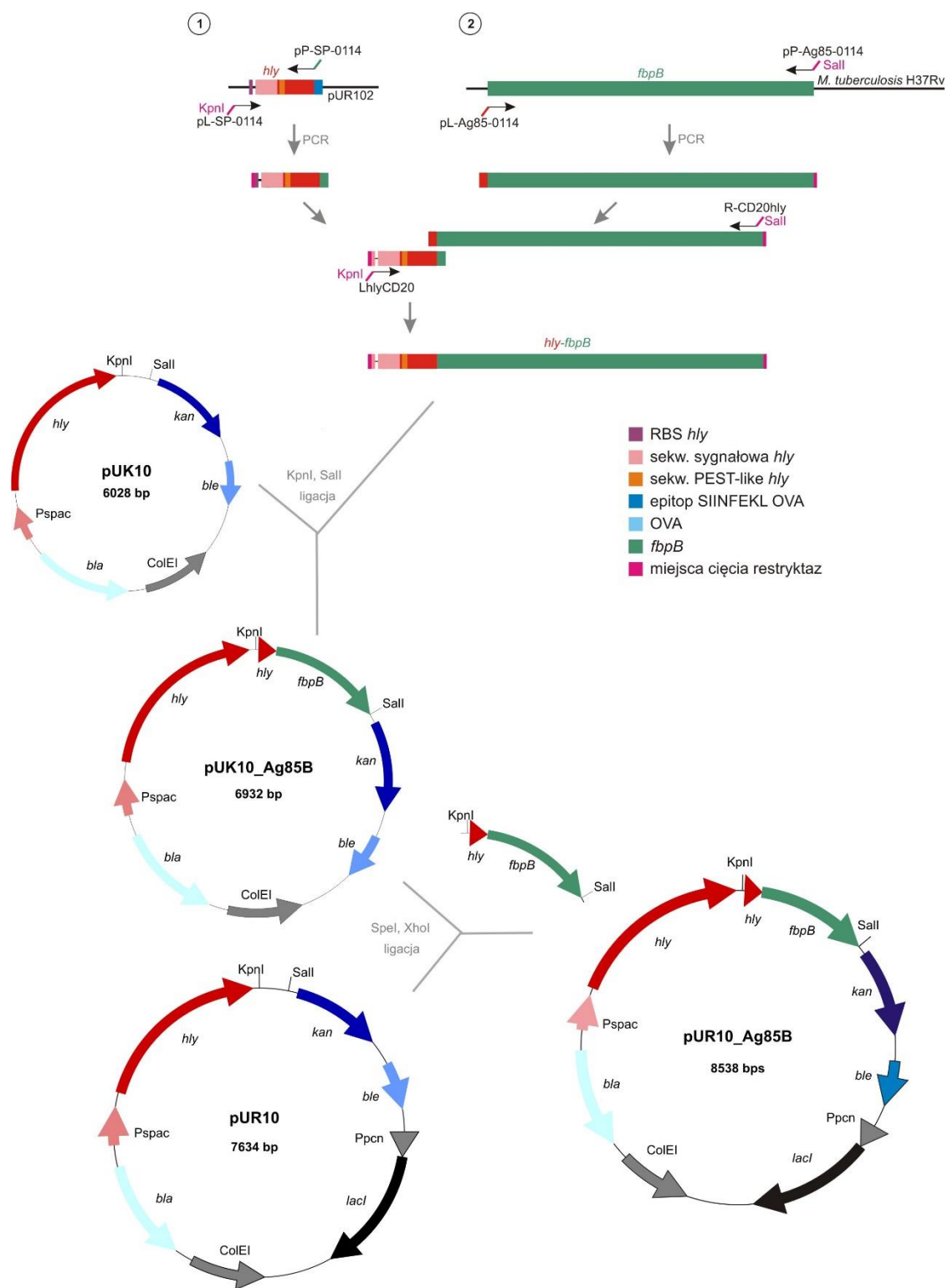
Konstrukcje genetyczne kodujące antygen Ag85B *M. tuberculosis* poddany fuzji do N-końcowej części toksyny LLO zostały zaplanowane według schematu najbardziej immunogennej konstrukcji kodującej białko OVA, niesionej na plazmidzie pUR103 (sekwencja sygnałna i PEST-podobna LLO poddana fuzji do pełnej długości białka). Zaprojektowano dwa wektory integracyjne kodujące fuzję LLO-Ag85B oparte na plazmidzie pUK10 umożliwiającym konstytutywną ekspresję oraz pUR10 umożliwiającym ekspresję w obecności induktora IPTG (**rysunek 8.9**). Sekwencję RBS-SP-PEST genu *hly* amplifikowano przy użyciu starterów pL-SP-0114 i pP-SP-0114 na matrycy plazmidu pUR102. Wielkość produktu wyniosła 193 bp. Gen *fbpB* amplifikowano na matrycy chromosomu *M. tuberculosis* H37Rv (Abcam) wykorzystując startery pL-Ag85-0114 i pP-Ag85-0114, otrzymując amplikon wielkości 1006 bp. Fuzyjny gen o wielkości 1172 bp powstał przez ligację powyższych fragmentów przy wykorzystaniu techniki OE PCR (Overlap Extension PCR). Fuzyjna wstawka zawierała na 5' końcu miejsce restrykcyjne enzymu KpnI, zaś na 3' końcu miejsce rozpoznawane przez enzym Sall.

Plazmid pUK10 oraz fuzyjną wstawkę trawiono enzymami KpnI i Sall. Produkty trawienia rozdzielono w żelu agarozowym, z którego zostały wycięte, a następnie oczyszczano je za pomocą komercyjnego zestawu do izolacji DNA. Otrzymane fragmenty poddano ligacji przy użyciu ligazy faga T4, uzyskując zrekombinowany plazmid pUK10\_Ag85B o wielkości 6932 bp. Wektor wprowadzono do komórek kompetentnych *E. coli* Top10. Poprawność uzyskanego wektora potwierdzono poprzez amplifikację wstawki na matrycy plazmidu, amplifikację genu hemolizyny na matrycy plazmidu, analizę restrykcyjną (**rysunek 8.10**) oraz sekwencjonowanie fuzyjnej wstawki. Amplifikacja wstawki została przeprowadzona z wykorzystaniem starterów pL-SP-0114 i pP-Ag85-0114. Otrzymano produkt o wielkości 1172 bp, odpowiadającej wielkości fuzyjnego insertu. Zrekombinowany plazmid oraz wektor pUK10 poddano również analizie restrykcyjnej z wykorzystaniem

enzymu EcoRV. W przypadku pUK10\_SP-PEST-*fbpB* restryktaza znajdowała dwa miejsca cięcia, w związku z czym uzyskano 2 produkty o wielkości 4616 bp i 2316 bp. Plazmid wyjściowy pUK10 uległ natomiast linearyzacji (otrzymano produkt o wielkości 6028 bp). Przeprowadzono również reakcję amplifikacji genu *hly* na matrycy zrekombinowanego wektora z wykorzystaniem starterów pLhly1203 i pRhly2200, uzyskując produkt o wielkości 1724 bp. Ostatecznie poprawność lokalizacji oraz brak mutacji w uzyskanym wektorze została potwierdzona dzięki sekwencjonowaniu fuzyjnej wstawki z wykorzystaniem starterów Saft-hly i Sup-kan okalających MCS, w obrębie którego zostały wstawiony gen fuzyjny.



**Rysunek 8.10. Potwierdzenie poprawności konstrukcji plazmidu pUK10\_Ag85B niosącego gen fuzyjny – *hly-fbpB*.**

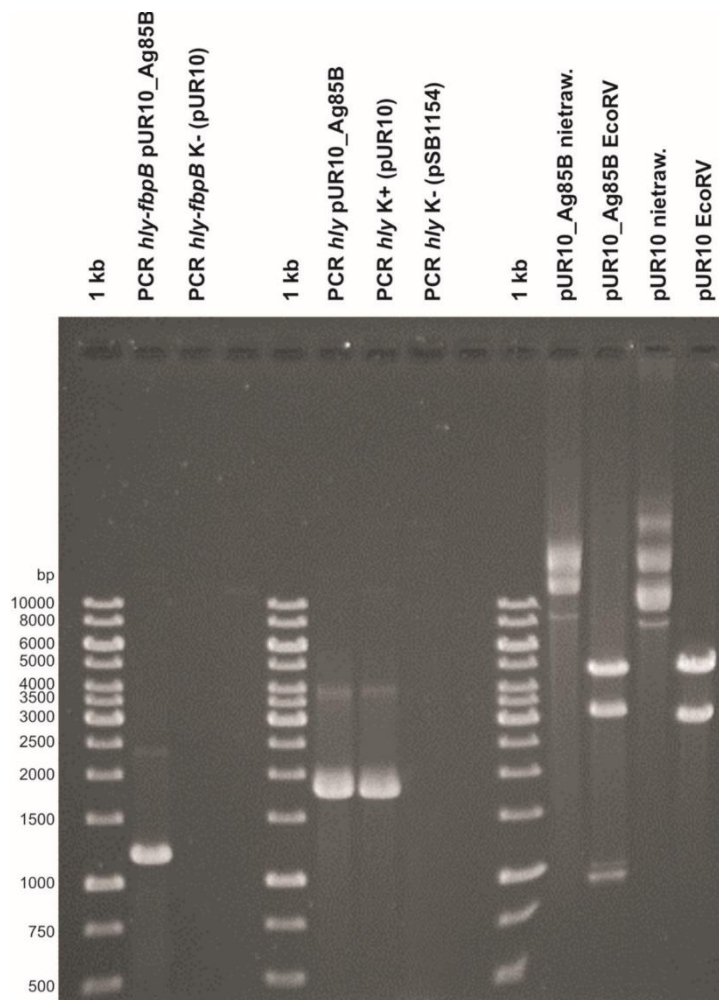


Rysunek 8.9. Konstrukcja wektorów pUK10\_Ag85B i pUR10\_Ag85B kodujących antygen fuzyjny LLO-Ag85B.

W celu uzyskania plazmidu pUR10\_Ag85B, dokonano wycięcia wstawki *hly-fbpB* z wektora pUK10\_Ag85B enzymami KpnI i Sall. Tymi samymi restryktazami trawiono również



wektor pUR10. Po oczyszczeniu DNA wstawki o wielkości 1146 bp i wycięciu trawionego plazmidu z żelu agarozowego (7392 bp), oba fragmenty poddano ligacji za pomocą ligazy faga T4 i produktem reakcji transformowano komórki kompetentne *E. coli* Top10. Uzyskano szczep *E. coli* niosący zrekombinowany wektor wielkości 8538 bp, którego poprawność zweryfikowano poprzez trawienie restrykcyjne enzymem PstI. Trawienie plazmidu pUR10\_Ag85B skutkowało powstaniem 3 produktów o wielkości 4651 bp, 3086 bp i 801 bp, podczas gdy wektor pUR10 trawiony był na 2 fragmenty 4691 bp i 2943 bp. Ponadto, wykonano analizę obecności wstawki na plazmidzie, przeprowadzając reakcję PCR z użyciem starterów pP-SP-0114 i pL-Ag85-0114 (produkt 1172 bp). Wyniki przedstawia **rysunek 8.11**. Sekwencjonowanie wstawki z użyciem starterów Saft-hly, Sup-kan, SinL i SinP potwierdziło poprawność klonowanej sekwencji.



**Rysunek 8.11.** Potwierdzenie poprawności konstrukcji plazmidu pUR10\_Ag85B niosącego gen fuzyjny – *hly-fbpB*.

### **Uzyskanie szczepów *B. subtilis* produkujących białka fuzyjne LLO-Ag85B**

Otrzymane w poprzednim etapie wektory pUK10\_Ag85B i pUR10\_Ag85B wprowadzono do komórek kompetentnych *B. subtilis* MB4 metodą transformacji według protokołu Younge'a i Spizizen'a, uzyskując szczepy BR1C\_Ag85B konstytutywnie wytwarzający antygen *M. tuberculosis* i BR1S\_Ag85B produkujący go w obecności IPTG. Pozytywnie zweryfikowano obecność fuzyjnego antygeny na chromosomie transformantów, przeprowadzając reakcję PCR z wykorzystaniem starterów pL-SP-0114 i pP-Ag85-0114 (produkt 1172 bp). Przeprowadzono również sekwencjonowanie produktu PCR o wielkości 1279 bp otrzymanego w reakcji amplifikacji DNA przy udziale starterów Saft-hly i Sup-kan okalających insert, które potwierdziło poprawność sekwencji.

---

## 9. Literatura

---

1. **Aguilar J. C., Rodriguez E. G.** 2007. Vaccine adjuvants revisited. *Vaccine* 25:3752-3762.
2. **Akeda Y., Kimura T., Yamasaki A., Kodama T., Iida T., Honda T., Oishi K.** 2012. Functional cloning of *Vibrio parahaemolyticus* type III secretion system 1 in *Escherichia coli* K-12 strain as a molecular syringe. *Biochem Biophys Res Commun* 427(2):242-247.
3. **Al Mariri A., Tibor A., Lestrade P., Mertens P., De B. X., Letesson J. J.** 2002. *Yersinia enterocolitica* as a vehicle for a naked DNA vaccine encoding *Brucella abortus* bacterioferritin or P39 antigen. *Infect Immun* 70:1915-1923.
4. **Albaghdadi H., Robinson N., Finlay B., Krishnan L., Sad S.** 2009. Selectively reduced intracellular proliferation of *Salmonella enterica* serovar typhimurium within APCs limits antigen presentation and development of a rapid CD8 T cell response. *J Immunol* 183(6):3778-3787.
5. **Alberts B., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter P.** 2002. Chapter 24: Helper T cells and lymphocyte activation, str.: 1589-1601. W: *Molecular Biology of the Cell*. 4<sup>th</sup> Edition. Garland Science, Nowy Jork, Stany Zjednoczone.
6. **Alvarez-Domínguez C., Carrasco-Marín E., López-Mato P., Leyva-Cobián F.** 2000. The contribution of both oxygen and nitrogen intermediates to the intracellular killing mechanisms of C1q-opsonized *Listeria monocytogenes* by the macrophage-like IC-21 cell line. *Immunology* 101(1):83-89.
7. **Ansel K. M., Lee D. U., Rao A.** 2003. An epigenetic view of helper T cell differentiation. *Nat Immunol* 4:616-623.
8. **Antelmann H., Darmon E., Noone D., Veening J.-W., Westers H., Bron S., Kuipers O. P., Devine K. M., Hecker M., van Dijk J. M.** 2003. The extracellular proteome of *Bacillus subtilis* under secretion stress conditions. *Molecular Microbiology* 49(1): 143-156.
9. **Araki K., Turner A. P., Shaffer V. O., Gangappa S., Keller S. A., Bachmann M. F., Larsen C. P., Ahmed R.** 2009. mTOR regulates memory CD8 T-cell differentiation. *Nature* 460:108-112.
10. **Arbues A., Aguilo J. I., Gonzalo-Asensio J., Marinova D., Uranga S., Puentes E., Fernandez C., Parra A., Cardona P. J., Vilaplana C., Ausina V., Williams A., Clark S., Malaga W., Guilhot C., Gicquel B., Martin C.** 2013. Construction, characterization and preclinical evaluation of MTBVAC, the first live-attenuated *M. tuberculosis*-based vaccine to enter clinical trials. *Vaccine* 31:4867-4873.

11. **Ashtekar A. R., Katz J., Xu Q., Michalek S. M.** 2012. A mucosal subunit vaccine protects against lethal respiratory infection with *Francisella tularensis* LVS. *PLoS ONE* 7:e05046.
12. **Auranen K., Rinta-Kokko H., Halloran M. E.** 2013. Estimating strain-specific and overall efficacy of polyvalent vaccines against recurrent pathogens from a cross-sectional study. *Biometrics* 69(1):235–244.
13. **Bachmann M. F., Zinkernagel R. M., Oxenius A.** 1998. Immune responses in the absence of costimulation: viruses know the trick. *J Immunol* 161:5791-5794.
14. **Bagarazzi M. L., Yan J., Morrow M. P., Shen X., Parker R. L., Lee J. C., Giffear M., Pankhong P., Khan A. S., Broderick K. E., Knott C., Lin F., Boyer J. D., Draghia-Akli R., White C. J., Kim J. J., Weiner D. B., Sardesai N. Y.** 2012. Immunotherapy against HPV16/18 generates potent TH1 and cytotoxic cellular immune responses. *Sci Transl Med* 4(155):155ra138.
15. **Bahey-El-Din M., Casey P. G., Griffin B. T.** 2010. Expression of two *Listeria monocytogenes* antigens (P60 and LLO) in *Lactococcus lactis* and examination for use as live vaccine vectors. *J Med Microbiol* 59:904-912.
16. **Baldwin S. L., Ching L. K., Pine S. O., Moutaftsi M., Lucas E., Vallur A., Orr M. T., Bertholet S., Reed S. G., Coler R. N.** Protection against tuberculosis with homologous or heterologous protein/vector vaccine approaches is not dependent on CD8+ T cells. *J Immunol* 191(5):2514-2525.
17. **Beninati C., Oggioni M. R., Boccanera M., Spinosa M. R., Maggi T., Conti S., Magliani W., De Bernardis F., Teti G., Cassone A., Pozzi G., Polonelli L.** 2000. Therapy of mucosal candidiasis by expression of an anti-idiotypic in human commensal bacteria. *Nat Biotechnol* 18:1060-1064.
18. **Berche P.** 2012. Louis Pasteur, from crystals of life to vaccination. *Clin Microbiol Infect.* 18(Suppl. 5):1–6.
19. **Bielecki J., Youngman P., Connelly P., Portnoy D. A.** 1990. *Bacillus subtilis* expressing a haemolysin gene from *Listeria monocytogenes* can grow in mammalian cells. *Nature* 345:175–176.
20. **Bishop D. K., Hinrichs D. J.** 1987. Adoptive transfer of immunity to *Listeria monocytogenes*: the influence of in vitro stimulation on lymphocyte subset requirements. *J Imm* 139(6):2005-2009.
21. **Brockmeier U., Caspers M., Freudl R., Jockwer A., Noll T., Eggert T.** 2006. Systematic screening of all signal peptides from *Bacillus subtilis*: a powerful strategy in optimizing heterologous protein secretion in Gram-positive bacteria. *J Mol Biol* 362(3):393-402.
22. **Carreño L. J., Bueno S. M., Bull P., Nathenson S. G., Kalergis A. M.** 2007. The half-life of the T-cell receptor/peptide-major histocompatibility complex interaction can

- modulate T-cell activation in response to bacterial challenge. *Immunology* 121(2):227-237.
23. **Carrero J. A., Vivanco-Cid H., Unanue E. R.** 2012. Listeriolysin O is strongly immunogenic independently of its cytotoxic activity. *PLoS One* 7(3):e32310.
  24. **Casadevall A., Pirofski L. A.** 2006. Antibody-mediated protection against intracellular pathogens. *Trends Microbiol* 6:102-107.
  25. **Chen W., Jin W., Hardegen N., Lei K. J., Li L., Marinos N., McGrady G., Wahl S. M.** 2003. Conversion of peripheral CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> naive T cells to CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells by TGF-beta induction of transcription factor Foxp3. *J Exp Med* 198(12):1875-1886.
  26. **Chirmule N., Propert K., Magosin S., Qian R. Wilson J.** 1999. Immune responses to adenovirus and adeno-associated virus in humans. *Gene Ther* 6:1574-1583.
  27. **Darji A., Guzman C. A., Gerstel B., Wachholz P., Timmis K. N., Wehland J., Chakraborty T., Weiss S.** 1997. Oral somatic transgene vaccination using attenuated *S. typhimurium*. *Cell* 91:765-775.
  28. **Decatur A. L., Portnoy D. A.** 2000. A PEST-like sequence in listeriolysin O essential for *Listeria monocytogenes* pathogenicity. *Science* 290(5493):992-995.
  29. **Delany I., Rappuoli R., De Gregorio E.** 2014. Vaccines for the 21st century. *EMBO Molecular Medicine* 6(6):708-720.
  30. **Desvaux M., Hébraud M.** 2006. The protein secretion systems in *Listeria*: inside out bacterial virulence. *FEMS Microbiol Rev*, 30:774–805.
  31. **Detmer A., Glenting J.** 2006. Live bacterial vaccines – a review and identification of potential hazards. *Microb Cell Fact* 5:23.
  32. **Dietrich G., Griot-Wenk M., Metcalfe I. C., Lang A. B., Viret J. F.** 2003. Experience with registered mucosal vaccines. *Vaccine* 21:678-683.
  33. **Dong C.** 2008. TH17 cells in development: an updated view of their molecular identity and genetic programming. *Nat Rev Immunol* 8:337–348.
  34. **Duc L. H., Hong H. A., Fairweather N., Ricca E., Cutting S. M.** 2003. Bacterial spores as vaccine vehicles. *Infect Immun* 71:2810-2818.
  35. **Duhen T., Geiger R., Jarrossay D., Lanzavecchia A., Sallusto F.** 2009. Production of interleukin 22 but not interleukin 17 by a subset of human skin-homing memory T cells. *Nat Immunol* 10:857–863.
  36. **Ferreira L. C., Schumann W.** 2012. Expression of recombinant proteins using *Bacillus subtilis* spores, str.: 263-272. W: Bacterial spores. Abel-Santos E. (red.) Caister Academic Press, Norfolk, Wielka Brytania.

37. **Flingai S., Czerwonko M, Goodman J., Kudchokar S. B., Muthumani K., Weiner D. B.** 2013. Synthetic DNA vaccines: improved vaccine potency by electroporation and co-delivered genetic adjuvants. *Front Immunol* 4:354.
38. **Foged C., Hansen J., Agger E. M.** 2012. License to kill: Formulation requirements for optimal priming of CD8<sup>+</sup> CTL responses with particulate vaccine delivery systems. *Eur J Pharm Sci* 45:482-491.
39. **Garver K. A., LaPatra S. E., Kurath G.** 2005. Efficacy of an infectious hematopoietic necrosis (IHNV) virus DNA vaccine in Chinook *Oncorhynchus tshawytscha* and sockeye *O. nerca* salmon. *Dis Aquat Organ* 64:13-22.
40. **Geginat G., Schenk S., Skoberne M., Goebel W., Hof H.** 2001. A novel approach of direct ex vivo epitope mapping identifies dominant and subdominant CD4 and CD8 T cell epitopes from *Listeria monocytogenes*. *J Immunol* 166:1877-1184.
41. **Geoffroy C., Gaillard J. L., Alouf J. E., Berche P.** 1987. Purification, characterization, and toxicity of the sulfhydryl-activated hemolysin listeriolysin O from *Listeria monocytogenes*. *Infect Immun.* 55(7):1641-1646.
42. **Gerlach C., van Heijst J. W., Swart E., Sie D., Armstrong N., Kerkhoven R. M., Zehn D., Bevan M. J., Schepers K., Schumacher T. N.** 2010. One naive T cell, multiple fates in CD8<sup>+</sup> T cell differentiation. *J Exp Med* 207(6):1235-1246.
43. **Giannini S. L., Hanon E., Moris P., Van Mechelen M., Morel S., Dessy F., Fourneau M. A., Colau B., Suzich J., Losonksy G Martin M. T., Dubin G., Wettendorff M. A.** 2006. Enhanced humoral and memory B cellular immunity using HPV16/18 L1 VLP vaccine formulated with the MPL/aluminium salt combination (AS04) compared to aluminium salt only. *Vaccine* 24:5937-5949.
44. **Giuliani M.M., Adu-Bobie J., Comanducci M., Arico B., Savino S., Santini L., Brunelli B., Bambini S., Biolchi A.,Capecchi B., Cartocci E., Ciocchi L., Di Marcello F., Ferlicca F., Galli B., Luzzi E., Masignani V., Serruto D., Veggi D., Contorni M., Morandi M., Bartalesi A., Cinotti V., Mannucci D., Titta F., Ovidi E., Welsch J. A., Granoff D., Rappuoli R., Pizza M.** 2006. A universal vaccine for serogroup B meningococcus. *Proc Natl Acad Sci USA* 103:10834-10839.
45. **Gomes P. A., Bentancor L. V., Pacciez J. D., Sbrogio-Almeida M. E., Palermo M. S., Ferreira R. C., Ferreira L. C.** 2009. Antibody responses elicited in mice immunized with *Bacillus subtilis* vaccine strains expressing Stx2B subunit of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Braz J Microbiol* 40(2):333-338.
46. **Grangette C., Muller-Alouf H., Goudercourt D., Geoffroy M. C., Turneer M., Mercenier A.** 2001. Mucosal immune responses and protection against tetanus toxin after intranasal immunization with recombinant *Lactobacillus plantarum*. *Infect Immun* 69:1547-1553.

47. **Grespi F., Ottina E., Yannoutsos N., Geley S., Villunger A.** 2011. Generation and evaluation of an IPTG-regulated version of *Vav*-gene promoter for mouse transgenesis. *PLoS One* 6(3):e18051.
48. **Grode L., Ganoza C. A., Brohm .C, Weiner J., Eisele B., Kaufmann S. H. E.** 2013. Safety and immunogenicity of the recombinant BCG vaccine VPM1002 in a phase 1 open-label randomized clinical trial. *Vaccine* 31:1340-1348.
49. **Grosenbaugh D. A., Leard A. T., Bergman P. J, Klein M. K., Meleo K., Susaneck S., Hess P. R., Jankowski M. K., Jones P. D., Leibman N. F., Johnson M. H., Kurzman I.D., Wolchok J. D.** 2011. Safety and efficacy of a xenogeneic DNA vaccine encoding for human tyrosinase as adjunctive treatment for oral malignant melanoma in dogs following surgical excision of the primary tumor. *Am J Vet Res* 72:1631-1638.
50. **Guimaraes V. D., Gabriel J. E., Lefevre F., Cabanes D., Gruss A., Cossart P., Azevedo V., Langella P.** 2005. Internalin-expressing *Lactococcus lactis* is able to invade small intestine of guinea pigs and deliver DNA into mammalian epithelial cells. *Microbes Infect* 7:836-844.
51. **Hamilton S. E., Badovinac V. P., Khankolar A., Harty J. T.** 2006. Listeriolysin O-deficient *Listeria monocytogenes* as a vaccine delivery vehicle: antigen-specific CD8 T cell priming and protective immunity. *J Immunol* 177:4012-4020.
52. **Haribhai D., Williams J. B., Jia S., Nickerson D., Schmitt E. G., Edwards B., Ziegelbauer J., Yassai M., Li S. H., Relland L. M., Wise P. M., Chen A., Zheng Y. Q., Simpson P. M., Gorski J., Salzman N. H., Hessner M. J., Chatila T. A., Williams C. B.** 2011. A requisite role for induced regulatory T cells in tolerance based on expanding antigen receptor diversity. *Immunity* 35(1):109-22.
53. **Harrington L. E., Hatton R. D., Mangan P. R., Turner H., Murphy T. L., Murphy K. M., Weaver C. T.** 2005. Interleukin 17-producing CD4<sup>+</sup> effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. *Nat Immunol* 6(11):1123-1132.
54. **Harwood C. R.** 1992. *Bacillus subtilis* and its relatives: molecular biological and industrial workhorses. *Trends Biotech* 10:247–256.
55. **Harwood C. R., Cranenburgh R.** 2008. Bacillus protein secretion: an unfolding story. *Trends Microbiol* 16(2):73-79.
56. **He T., Tang C., Xu S., Moyana T., Xiang J.** 2007. Interferon gamma stimulates cellular maturation of dendritic cell line DC2.4 leading to induction of efficient cytotoxic T cell responses and antitumor immunity. *Cell Mol Immunol* 4(2):105-111.
57. **Higgins D. E., Shastri N., Portnoy D. A.** 1999. Delivery of protein to the cytosol of macrophages using *Escherichia coli* K-12. *Mol Microbiol* 31(6):1631-1641.
58. **Hinc K., Isticato R., Dembek M., Karczewska J., Iwanicki A., Peszyńska-Sularz G., De Felice M., Obuchowski M., Ricca E.** 2010. Expression and display of UreA of

*Helicobacter acinonychis* on the surface of *Bacillus subtilis* spores. *Microb Cell Fact* 9:2.

59. **Hinc K., Stasiłojć M., Piątek I., Peszyńska-Sularz G., Isticato R., Ricca E., Obuchowski M., Iwanicki A.** 2014. Mucosal adjuvant activity of IL-2 presenting spores of *Bacillus subtilis* in a murine model of *Helicobacter pylori* vaccination. *PLoS One*. 9(4):e95187.
60. **Hoft D. F., Blazevic A., Stanley J., Landry B., Sizemore D., Kpamegan E., Gearhart J., Scott A., Kik S., Pau M. G., Goudsmit J., McClain J. B., Sadoff J.** 2012. A recombinant adenovirus expressing immunodominant TB antigens can significantly enhance BCG-induced human immunity. *Vaccine* 30(12):2098-2108.
61. **Huang J. M., La Ragione R. M., Cooley W. A., Todryk S., Cutting S. M.** 2008. Cytoplasmic delivery of antigens, by *Bacillus subtilis* enhances Th1 responses. *Vaccine* 26:6043-6052.
62. **Huygen K.** 2014. The immunodominant T-cell epitopes of the mycolyl-transferases of the antigen 85 complex of *M. tuberculosis*. *Front Immunol* 5:321.
63. **Idänpään-Heikkilä I., Mutttilainen S., Wahlström E., Saarinen L., Leinonen M., Sarvas M., Mäkelä P.H.** 1995. The antibody response to a prototype liposome vaccine containing *Neisseria meningitidis* outer membrane protein P1 produced in *Bacillus subtilis*. *Vaccine* 13:1501–1508.
64. **Iizuka R., Yamagishi-Shirasaki M., Funatsu T.** 2011. Kinetic study of de novo chromophore maturation of fluorescent proteins. *Anal Biochem* 414(2):173-178.
65. **Jaacks K. J., Healy J., Losick R., Grossman A. D.** 1989. Identification and characterisation of genes controlled by the sporulation-regulatory gene *spo0H* in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* 171(8):4121-4129.
66. **Jiang X., Shen C., Rey-Ladino J., Yu H., Brunham R. C.** 2008. Characterization of murine dendritic cell line JAWS II and primary bone marrow-derived dendritic cells in *Chlamydia muridarum* antigen presentation and induction of protective immunity. *Infect Immun* 76(6):2392-2401.
67. **Kagina B. M., Tameris M. D., Geldenhuys H., Hatherill M., Abel B., Hussey G. D., Scriba T. J., Mahomed H., Sadoff J. C., Hanekom W. A., Mansoor N., Hughes J., de Kock M., Whatney W., Africa H., Krohn C., Veldsman A., Kany A. L., Douoguih M., Pau M. G., Hendriks J., McClain B., Benko J., Snowden M. A., Hokey D. A.** 2014. The novel tuberculosis vaccine, AERAS-402, is safe in healthy infants previously vaccinated with BCG, and induces dose-dependent CD4 and CD8T cell responses. *Vaccine* 32(45):5908-5917.
68. **Kakeshita H., Kageyama Y., Katsutoshi A., Ozaki K, Nakamura K.** 2010. Enhanced extracellular production of heterologous proteins in *Bacillus subtilis* by deleting the C-terminal region of the SecA Secretory Machinery. *Mol Biotechnol* 46(3):250-257.



69. **Kakeshita H., Kageyama Y., Endo K., Tohata M., Ara K., Ozaki K., Nakamura K.** 2011. Secretion of biologically-active human interferon- $\beta$  by *Bacillus subtilis*. *Biotechnol Lett* 33(9):1847-1852.
70. **Kanampalliwar A. M., Soni R., Girdhar A., Tiwari A.** 2013. Reverse vaccinology: basics and applications. *J Vaccines Vaccin* 4(6):194-198.
71. **Kanno Y., Vahedi G., Hirahara K., Singleton K., O'Shea J. J.** 2012. Transcriptional and epigenetic control of T helper cell specification: molecular mechanisms underlying commitment and plasticity. *Annu Rev Immunol* 30:707–731.
72. **Kaufmann S. H. E., Gegenbacher M.** 2012. Recombinant live vaccine candidates against tuberculosis. *Curr Opin Biotechnol* 23(6):900-907.
73. **Kaur T., Sobti R. C., Kaur S.** 2011. Cocktail of gp63 and Hsp70 induces protection against *Leishmania donovani* in BALB/c mice. *Parasite Immunol* 33:95-103.
74. **Keggins K. M., Lovett P. S., Duvall E. J.** 1978. Molecular cloning of genetically active fragments of *Bacillus* DNA in *Bacillus subtilis* and properties of the vector plasmid pUB110. *PNAS USA* 75(3):1423-1427.
75. **Khader S. A., Bell G. K., Pearl J. E., Fountain J. J., Rangel-Moreno J., Cilley G. E., Shen F., Eaton S. M., Gaffen S. L., Swain S. L., Locksley R. M., Haynes L., Randall T. D., Cooper A. M.** 2007. IL-23 and IL-17 in the establishment of protective pulmonary CD4+ T cell responses after vaccination and during *Mycobacterium tuberculosis* challenge. *Nat Immunol* 8:369-377.
76. **Kodama T., Manabe K., Kageyama Y., Liu S., Ara K., Ozaki K., Sekiguchi J.** 2012. Chapter 8: Approaches for improving protein production in multiple protease-deficient *Bacillus subtilis* host strains. W: Advances in applied biotechnology. Petre M. (Red.) InTech, Rijeka, Chorwacja
77. **Kohda C., Kawamura I., Baba H., Nomura T., Ito Y., Kimoto T., Watanabe I., Mitsuyama M.** 2002. Dissociated linkage of cytokine-inducing activity and cytotoxicity to different domains of listeriolysin O from *Listeria monocytogenes*. *Infect Immun* 70:1334-1341.
78. **Korn T., Bettelli E., Oukka M., Kuchroo V. K.** 2009. IL-17 and Th17 cells. *Annu Rev Immunol* 27:485-517.
79. **Le D.T., Brockstedt D. G., Nir-Paz R., Hampl J., Mathur S., Nemunaitis J., Serman D. H., Hassan R., Lutz E., Moyer B., Giedlin M., Louis J. L., Sugar E. A., Pons A., Cox A. L., Levine J., Murphy A. L., Illei P., Dubensky T. W. Jr, Eiden J. E., Jaffee E. M., Laheru D. A.** 2012. A live-attenuated *Listeria* vaccine (ANZ-100) and a live-attenuated *Listeria* vaccine expressing mesothelin (CRS-207) for advanced cancers: phase I studies of safety and immune induction. *Clin Cancer Res* 18:858-868.

80. **Le Gouëllec A., Chauchet X., Polack B., Buffat L., Toussaint B.** 2012. Bacterial vectors for active immunotherapy reach clinical and industrial stages. *Hum Vaccin Immunother* 8(10):1454-1458.
81. **Lee J. S., Poo H., Han D. P., Hong S. P., Kim K., Cho M. W., Kim E., Sung M. H., Kim C. J.** 2006. Mucosal immunization with surface-displayed severe acute respiratory syndrome coronavirus spike protein on *Lactobacillus casei* induces neutralizing antibodies in mice. *J Virol* 80:4079-4087.
82. **Lee S., Belitsky B. R., Brinker J. P., Kerstein K. O., Brown D. W., Clements J. D., Keusch G. T., Tzipori S., Sonenshein A. L., Herrmann J. E.** 2010. Development of a *Bacillus subtilis*-based rotavirus vaccine. *Clin Vaccine Immunol* 17(11):1647-1655.
83. **Lin P. L., Dietrich J., Tan E., Abalos R. M., Burgos J., Bigbee C., Bigbee M., Milk L., Gideon H. P., Rodgers M. Cochran C., Guinn K. M., Sherman D. R., Klein E., Janssen C., Flynn J. L., Andersen P.** 2012. The multistage vaccine H56 boosts the effects of BCG to protect cynomolgus macaques against active tuberculosis and reactivation of latent *Mycobacterium tuberculosis* infection. *J Clin Invest* 122:303-314.
84. **Tameris M. D., Hatherill M., Landry B. S., Scriba T. J., Snowden M. A., Lockhart S., Shea J. E., McClain J. B., Hussey G. D., Hanekom W. A., Mahomed H., McShane H.** 2013. Safety and efficacy of MVA85A, a new tuberculosis vaccine, in infants previously vaccinated with BCG: a randomised, placebo-controlled phase 2b trial. *Lancet* 381:1021-1028.
85. **Lopez A. L., Gonzales M. L. A., Aldaba J. G., Nair G. B.** 2014. Killed oral cholera vaccines: history, development and implementation challenges. *Ther Adv Vaccines* 2(5):123-136.
86. **Luiz W. B., Cavalcante R. C., Paccez J. D., Souza R. D., Sbrogio-Almeida M. E., Ferreira R. C., Ferreira L. C.** 2008. Boosting systemic and secreted antibody responses in mice orally immunized with recombinant *Bacillus subtilis* strains following parenteral priming with a DNA vaccine encoding the enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) CFA/I fimbriae B subunit. *Vaccine* 26(32):3998-4005.
87. **Lundegaard C., Lund O., Nielsen M.** 2012. Predictions versus high-throughput experiments in T-cell epitope discovery: competition or synergy? *Expert Rev Vaccines* 11:43-54.
88. **Łuksza M., Lässig M.** 2014. A predictive fitness model for influenza. *Nature* 507:57-61.
89. **Maciag P. C., Radulovic S., Rothman J.** 2009. The first clinical use of a live-attenuated *Listeria monocytogenes* vaccine: a phase I safety study of Lm-LLO-E7 in patients with advanced carcinoma of the cervix. *Vaccine* 27:3975-3983.
90. **Mäder U., Antelmann H., Buder T., Dahl M. K., Hecker M., Homuth G.** 2002. *Bacillus subtilis* functional genomics: genome-wide analysis of the DegS-DegU regulon by transcriptomics and proteomics. *Mol Genet Genomics* 268(4):455-467.

91. **Marrack P., McKee A. S., Munks M. W.** 2009. Towards an understanding of the adjuvant action of aluminium. *Nat Rev Immunol* 9(4):287-293.
92. **Mauriello E. M. F., Duc L. H., Isticato R., Cangiano G., Hong H. A., De Felice M., Ricca E., Cutting S. M.** 2004. Display of heterologous antigens on the *Bacillus subtilis* spore coat using CotC as a fusion partner. *Vaccine* 22:1177-1187.
93. **McBride B. W., Mogg A., Telfer J. L., Lever M. S., Miller J., Turnbull P. C. B., Baillie L.** 1998. Protective efficacy of a recombinant protective antigen against *Bacillus anthracis* challenge and assessment of immunological markers. *Vaccine* 16:810–817.
94. **Mescher M. F., Curtsinger J. M., Agarwal P., Casey K. A., Gerner M., Hammerbeck C. D., Popescu F., Xiao Z.** 2006. Signals required for programming effector and memory development by CD8+ T cells. *Immunol Rev* 211:81-92.
95. **Mohan T., Verma P., Nageswara Rao D.** 2013. Novel adjuvants & delivery vehicles for vaccines development: A road ahead. *Indian J Med Res* 138(5):779-795.
96. **Mosmann T. R., Cherwinski H., Bond M. W., Giedlin M. A., Coffman R. L.** 1986. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J Immunol* 136:2348–2357.
97. **Murphy C. A., Langrish C. L., Chen Y., Blumenschein W., McClanahan T., Kastelein R. A., Sedgwick J. D., Cua D. J.** 2003. Divergent pro- and antiinflammatory roles for IL-23 and IL-12 in joint autoimmune inflammation. *J Exp Med* 198:1951–1957.
98. **Neefjes J., Jongstra M. L. M., Paul P., Bakke O.** 2011. Towards a system understanding of MHC class I and MHC class II antigen presentation. *Nat Rev Immunol* 11(12):823-836.
99. **Negri A., Potocki W., Iwanicki A., Obuchowski M., Hinc K.** 2013. Expression and display of Clostridium difficile protein FliD on the surface of *Bacillus subtilis* spores. *J Med Microbiol* 62:1379-1385.
100. **Nguyen H. D., Phan T. T. P., Schumann W.** 2011. Analysis and application of *Bacillus subtilis* sortases to anchor recombinant proteins on the cell wall. *AMB Express* 1:22.
101. **Ning D., Leng X., Li Q., Xu W.** 2011. Surface-displayed VP28 on *Bacillus subtilis* spores induce protection against white spot syndrome virus in crayfish by oral administration. *J Appl Microbiol* 111: 1327-1336.
102. **Nizard M., Diniz M. O., Roussel H., Tran T., Ferreira L. C., Badoual C., Tartour E.** 2014. Mucosal vaccines: Novel strategies and applications for the control of pathogens and tumors at mucosal sites. *Hum Vaccin Immunother* 10(8):2175-2187.
103. **Ohse M., Takahashi K., Kadowaki Y., Kusaoke H.** 1995. Effects of plasmid DNA sizes and several other factors on transformation of *Bacillus subtilis* ISW1214 with plasmid DNA by electroporation. *Biosci Biotechnol Biochem* 59(8):1433-1437.

104. **Olmos-Soto J., Contreras-Flores R.** 2003. Genetic system constructed to overproduce and secrete proinsulin in *Bacillus subtilis*. *Appl Environ Microb* 62:369-373.
105. **Ota M. O., Odutola A. A., Owiafe P. K., Donkor S., Owolabi O. A., Brittain N. J., Williams N., Rowland-Jones S., Hill A. V., Adegbola R. A., McShane H.** 2011. Immunogenicity of the tuberculosis vaccine MVA85A is reduced by coadministration with EPI vaccines in a randomized controlled trial in Gambian infants. *Sci Transl Med* 3(88):ra56.
106. **Otsu S., Gotoh K., Yamashiro T., Yamagata J., Shin K., Fujioka T., Nishizono A.** 2006. Transfer of antigen-pulsed dendritic cells induces specific T-cell proliferation and a therapeutic effect against long-term *Helicobacter pylori* infection in mice. *Infect Immun* 74:984-993.
107. **Pamer E. G.** 2004. Immune responses to *Listeria monocytogenes*. *Nat Rev Immunol* 4:812-823.
108. **Pamer E. G., Harty J. T., Bevan M. J.** 1991. Precise prediction of a dominant class I MHC-restricted epitope of *Listeria monocytogenes*. *Nature* 353:852-855.
109. **Park H., Li Z., Yang X. O., Chang S. H., Nurieva R., Wang Y. H., Wang Y., Hood L., Zhu Z., Tian Q., Dong C.** 2005. A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17. *Nat Immunol* 6(11):1133-1141.
110. **Pohl S., Bhavsar G., Hulme J., Bloor A. E., Misirli G., Leckenby M. W., Radford D. S., Smith W., Wipat A., Williamson E. D., Harwood C. R., Cranenburgh R. M.** 2013. Proteomic analysis of *Bacillus subtilis* strains engineered for improved production of heterologous proteins. *Proteomics* 13(22):3298-3308.
111. **Porgador A., Yewdell J. W., Deng Y, Bennink J. R., Germain R. N.** 1997. Localization, quantitation, and in situ detection of specific peptide-MHC class I complexes using a monoclonal antibody. *Immunity* 6: 715-726.
112. **Portnoy D. A., Tweten R. K., Kehoe M., Bielecki J.** 1992. Capacity of listeriolysin O, streptolysin O, and perfringolysin O to mediate growth of *Bacillus subtilis* within mammalian cells. *Infect Immun* 60(7): 2710-2717.
113. **Pratama A., Vinuesa C. G.** 2014. Control of TFH cell numbers: why and how? *Immunol Cell Biol* 92(1):40-48.
114. **Radford K. J., Higgins D. E., Pasquini S., Cheadle E. J., Carta L., Jackson A. M., Lemoine N. R. Vassaux G.** 2002. A recombinant *E. coli* vaccine to promote MHC class I-dependent antigen presentation: application to cancer immunotherapy. *Gene Ther* 9:1455-1463.
115. **Radford K. J., Jackson A. M., Wang J. H., Vassaux G., Lemoine N. R.** 2003. Recombinant *E. coli* efficiently delivers antigen and maturation signals to human dendritic cells: presentation of MART1 to CD8+ T cells. *Int J Cancer* 105(6):811-9.

116. **Rasmussen I. B., Lunde E., Michaelsen T. E., Bogen B., Sandlie I.** 2001. The principle of delivery of T cell epitopes to antigen-presenting cells applied to peptides from influenza virus, ovalbumin, and hen egg lysozyme: implications for peptide vaccination. *Proc Natl Acad Sci USA* 98(18):10296-10301.
117. **Rigel N. W., Braunstein M.** 2008. A new twist on an old pathway – accessory Sec systems. *Mol Microbiol* 69(2):291-302.
118. **Roberts M., Chatfield S., Pickard D., Li J., Bacon A.** 2000. Comparison of abilities of *Salmonella enterica* serovar typhimurium aroA and aroD htrA mutants to act as live vectors. *Infect Immun* 68:6041-6043.
119. **Robinson K., Chamberlain L. M., Schofield K. M., Wells J. M., Le Page R. W.** 1997. Oral vaccination of mice against tetanus with recombinant *Lactococcus lactis*. *Nat Biotechnol* 15:653-657.
120. **Rock K. L., Shen L.** 2005. Cross-presentation: underlying mechanisms and role in immune surveillance. *Immunol Rev* 207:166-183.
121. **Rojas D., Krishnan R.** 2010. IFN-gamma generates maturation-arrested dendritic cells that induce T cell hyporesponsiveness independent of Foxp3+ T-regulatory cell generation. *Immunol Lett* 132(1-2):31-37.
122. **Rosales-Reyes R., Alpuche-Aranda C., Ramírez-Aguilar Mde L., Castro-Eguiluz A. D., Ortiz-Navarrete V.** 2005. Survival of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium within late endosomal-lysosomal compartments of B lymphocytes is associated with the inability to use the vacuolar alternative major histocompatibility complex class I antigen-processing pathway. *Infect Immun* 73(7):3937-3944.
123. **Rote N. S.** 2006. Adaptive immunity, str.: 143-165. W: McCance K., Huether S. (red.) Pathophysiology: The Biological Basis for Disease in Adults and Children, 5th Edition, Chapter 6, C.V. Mosby Co., St. Louis, Stany Zjednoczone.
124. **Russ B. E., Prier J. E., Rao S., Turner S. J.** 2013. T cell immunity as a tool for studying epigenetic regulation of cellular differentiation. *Front Genet* 4:218.
125. **Russell B. H., Vasan R., Keene D. R., Xu Y.** 2007. *Bacillus anthracis* internalization by human fibroblasts and epithelial cells. *Cell Microbiol* 9(5):1262-1274.
126. **Safley S. A., Cluff C. W., Marshall N. E., Ziegler H. K.** 1991. Role of listeriolysin-O (LLO) in the T lymphocyte response to infection with *Listeria monocytogenes*. Identification of T cell epitopes of LLO. *J Immunol* 146:3604-3616.
127. **Sallusto F., Lanzavecchia A., Araki K., Ahmed R.** 2010. From vaccines to memory and back. *Immunity* 33(4):451–63.
128. **Saris P., Taira S., Airaksinen U., Palva A., Sarvas M., Palva I.** 1990. Production and secretion of pertussis toxin subunits in *Bacillus subtilis*. *FEMS Microbiol Let* 68:143-148.

129. **Savina A., Amigorena S.** 2007. Phagocytosis and antigen presentation in dendritic cells. *Immunol Rev* 219:143-156.
130. **Schägger H., von Jagow G.** 1987. Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal Biochem* 166(2):368-379.
131. **Schnupf P., Portnoy D. A., Decatur A. L.** 2006. Phosphorylation, ubiquitination and degradation of listeriolysin O I mammalian cells: role of the PEST-like sequence. *Cell Microbiol* 8:353-364.
132. **Seder R. A., Hill A. V.** 2000. Vaccines against intracellular infections requiring cellular immunity. *Nature* 406:793-798.
133. **Sewell D. A., Shahabi V., Gunn G. R., Pan Z.-K., Dominiacki M. E., Paterson Y.** 2004. Recombinant *Listeria* vaccines containing PEST sequences are potent immune adjuvants for the tumor-associated antigen Human Papillomavirus-16 E7. *Cancer Res* 64:8821-8825.
134. **Singh R., Dominiacki M. E., Jaffee E. M., Paterson Y.** 2005. Fusion to Listeriolysin O and delivery by *Listeria monocytogenes* enhances the immunogenicity of HER-2/neu and reveals subdominant epitopes in the FVB/N mouse. *J Immunol* 175(6):3663-3673.
135. **Sivakumar S. M., Safhi M. M., Kannadasan M., Sukumaran N.** 2011. Vaccine adjuvants – Current status and prospects on controlled release adjuvancity. *SPJ* 19(4):197-206.
136. **Small F., Jeyanathan M., Smieja M., Medina M. F., Thantrige-Don N., Zganiacz A., Yin C., Heriazon A., Damjanovic D., Puri L., Hamid J., Xie F., Foley R., Bramson J., Gauldie J., Xing Z.** 2013. A human type 5 adenovirus-based tuberculosis vaccine induces robust T cell responses in humans despite preexisting anti-adenovirus immunity. *Sci Transl Med* 5(205):205ra134.
137. **Smith K. A.** 2013. Smallpox: can we still learn from the journey to eradication? *Indian J Med Res* 137(5):895–899.
138. **Stachowiak R., Bielecki J.** 2001. Contribution of hemolysin and phospholipase activity to cytolytic properties and viability of *Listeria monocytogenes*. *Acta Microbiol Pol* 50:243-50.
139. **Stachowiak R., Granicka L. H., Wiśniewski J., Łyżniak M., Kawiak J., Bielecki J.** 2011. Cytotoxicity of listeriolysin O produced by membrane-encapsulated *Bacillus subtilis* on leukemia cells. *J Microbiol Biotechnol* 21(11):1193-1198.
140. **Stachowiak R., Lyzniak M., Budziszewska B. K., Roeske K., Bielecki J., Hoser G., Kawiak J.** 2012. Cytotoxicity of bacterial metabolic products, including listeriolysin O, on leukocyte targets. *J Biomed Biotechnol* 954375.

141. **Stachowiak R., Łyżniak M., Grabowska M., Roeske K., Jagielski T., Bielecki J., Budziszewska B. K., Hoser G., Kawiak J.** 2014. Cytotoxicity of purified listeriolysin O on mouse and human leukocytes and leukaemia cells. *BMC Biotechnol* 14:77.
142. **Steinman R. M.** 1991. The dendritic cell system and its role in immunogenicity. *Annu Rev Immunol* 9:271-296.
143. **Steinman R. M., Cohn Z. A.** 1973. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution. *J Exp Med* 137:1142-1162.
144. **Sun H. X., Xie Y., Ye Y. P.** 2009. ISCOMs and ISCOMATRIX(TM). *Vaccine* 27:4388-4401.
145. **Sun J. C., Williams M. A., Bevan M. J.** 2004. CD4+ T cells are required for the maintenance, not programming, of memory CD8+ T cells after acute infection. *Nat Immunol* 5(9):927-933.
146. **Sun R., Liu Y.** 2013. Listeriolysin O as a strong immunogenic molecule for the development of new anti-tumor vaccines. *Hum Vaccin Immunother* 9(5):1058-1068.
147. **Surh C. D., Sprent J.** 2008. Homeostasis of naive and memory T cells. *Immunity* 29:848-862.
148. **Thomas C. E., Ehrhardt A., Kay M. A.** 2003. Progress and problems with the use of viral vectors for gene therapy. *Nat Rev Genet* 4:346-358.
149. **Tifrea D.F., Pal S., Toussi D. N., Massari P., de la Maza L. M.** 2013. Vaccination with major outer membrane protein proteasomes elicits protection in mice against a *Chlamydia* respiratory challenge. *Microbes Infect* 15(13):920-927.
150. **Titball R. W.** 2008. Vaccines against intracellular bacterial pathogens. *Drug Discov Today* 13:596-600.
151. **Tjalsma H., Antelmann H., Jongbloed J. D., Braun P. G., Darmon E., Dorenbos R., Dubois J. Y., Westers H., Zanen G., Quax W. J., Kuipers O. P., Bron S., Hecker M., van Dijl J. M.** 2004. Proteomics of protein secretion by *Bacillus subtilis*: separating the "secrets" of the secretome. *Microbiol Mol Biol Rev* 68(2):207-233.
152. **Torrado E., Fountain J. J., Robinson R. T., Martino C. A., Pearl J. E., Rangel-Moreno J., Tighe E., Dunn R., Cooper A. M.** 2013. Differential and site-specific impact of B cells in the protective immune response to *Mycobacterium tuberculosis* in the mouse. *PLoS ONE* 8:e61681.
153. **van der Ploeg R., Monteferrante C. G., Piersma S., Barnett J. P., Kouwen T. R., Robinson C., van Dijl J. M.** 2012. High-salinity growth conditions promote Tat-independent secretion of Tat substrates in *Bacillus subtilis*. *Appl Environ Microbiol* 78(21):7733-7744.

154. **VanCott J. L., Chatfield S. N., Roberts M., Hone M. D., Hohmann E. L., Pascual D. W.** 2004. Regulation of host immune responses by modification of *Salmonella* virulence genes. *Proc Natl Acad Sci* 4:1247-1252.
155. **Veldhoen M., Uyttenhove C., van Snick J., Helmby H., Westendorf A., Buer J., Martin B., Wilhelm C., Stockinger B.** 2008. Transforming growth factor-beta 'reprograms' the differentiation of T helper 2 cells and promotes an interleukin 9-producing subset. *Nat Immunol* 9(12):1341-1346.
156. **Vojcic L., Despotovic D., Martinez R., Maurer K. H., Schwaneberg U.** 2012. An efficient transformation method for *Bacillus subtilis* DB104. *Appl Microbiol Biotechnol* 94(2):487-943.
157. **Wang J. Y., Harley R. H., Galen J. E.** 2013. Novel methods for expression of foreign antigens in live vector vaccines. *Hum Vaccin Immunother* 9(7):1558-1564.
158. **Wei C-H, Sherman L. A.** 2007. N-Terminal trimer extension of nominal CD8 T cell epitopes is sufficient to promote cross-presentation to cognate CD8 T cells in vivo. *J Immunol* 179(12):8280-8286.
159. **Weiner J., Kaufmann S. H. E.** 2014. Recent advances in tuberculosis control. *J Intern Med* 275:467-480.
160. **Westers L., Dijkstra D. S., Westers H., van Dijk J. M., Quax W. J.** 2006. Secretion of functional human interleukin-3 from *Bacillus subtilis*. *J Biotechnol* 123:211-224.
161. **Westers L., Westers H., Quax W. J.** 2004. *Bacillus subtilis* as cell factory for pharmaceutical proteins: a biotechnological approach to optimize the host organism. *Biochim Biophys Acta* 1694:299-310.
162. **Whitmire J. K., Eam B., Whitton J. L.** 2008. Tentative T cells: memory cells are quick to respond, but slow to divide. *PLoS Pathog* 4(4):e1000041.
163. **Wilson E. B., Livingstone A. M.** 2008. Cutting edge: CD4+ T cell-derived IL-2 is essential for help-dependent primary CD8+ T-cell responses. *J Immunol* 181:7445-7448.
164. **Wilson J. W., Nickerson C. A.** 2006. Cloning of a functional *Salmonella* SPI-1 type III secretion system and development of a method to create mutations and epitope fusions in the cloned genes. *J Biotechnol* 122(2):147-160.
165. **Woodworth J. S., Behar S. M.** 2006. *Mycobacterium tuberculosis*-specific CD8+ T cells and their role in immunity. *Crit Rev Immunol* 26:317-352.
166. **Xu F., Hong M., Ulmer J. B.** 2003. Immunogenicity, of an HIV-I gag DNA vaccine carried by attenuated *Shigella*. *Vaccine* 21:644-648.
167. **Yang H., Liu L., Li J., Du G., Chen J.** 2011. Heterologous expression, biochemical characterization, and overproduction of alkaline  $\alpha$ -amylase from *Bacillus alcalophilus* in *Bacillus subtilis*. *Microb Cell Fact.* 10:77.



168. **Young F. E., Spizizen J.** 1961. Physiological and genetic factors affecting transformation of *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* 81: 823-829.
169. **Youngman P., Poth H., Green B., York K., Olmedo G., Smith K.** 1989. Methods for genetic manipulation, cloning, and functional analysis of sporulation genes in *Bacillus subtilis*, str. 65-87. W: Regulation of prokaryotic development. Smith I., Slepecky R. A., Setlow P. (red.) American Society for Microbiology, Washington, D.C., USA.
170. **Yun T., Yamashita H., Takahashi N., Hirose M.** 1993. Limited proteolysis of disulfide-reduced ovalbumin by subtilisin. *Biosci Biotechnol Biochem* 57(6):940-944.
171. **Zhang Z. H., Jiang P. H., Li N. J., Shi M., Huang W.** 2005. Oral vaccination of mice against rodent malaria with recombinant *Lactococcus lactis* expressing MSP-1(19). *World J Gastroenterol* 11:6975-6980.
172. **Zheng J. P., Zhang Z. S., Li S. Q., Liu X. X., Yuan S. L., Wang P., Zhan D. W., Wang L. C., Huang C. F.** 2005. Construction of a novel *Shigella* live-vector strain co-expressing CS3 and LTB/STm of enterotoxigenic *E. coli*. *World J Gastroenterol* 11:3411-3418.
173. **Zhu J., Yamane H., Paul W. E.** 2010. Differentiation of effector CD4 T cell populations. *Annu Rev Immunol* 28:445-489.
174. **Zuber P., Losick R.** 1987. Role of AbrB in Spo0A- and Spo0B-dependent utilization of a sporulation promoter in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 169:2223-2230.

---

## 10. Upowszechnienie wyników i finansowanie badań

---

### 1. Upowszechnienie wyników prezentowanych w niniejszej rozprawie doktorskiej

- Zgłoszenie patentowe pt.: „Zmodyfikowane plazmidowe wektory ekspresyjne, szczepki *B. subtilis* je obejmujące oraz ich zastosowania” nr 400016 (PK/1623/AGR); autorzy: R. Stachowiak, J. Bielecki, **K. Roeske**, T. Jagielski, M. Kamiński
- I Ogólnopolska Konferencja Młodych Naukowców Nauk Przyrodniczych „Wkraczając w świat nauki 2014”, Wrocław, Polska, 11 – 12 IX 2014  
Prezentacja ustna referatu „Listeriolizyna O *Listeria monocytogenes* jako czynnik wspomagający dostarczanie modelowego antygeny do komórek prezentujących antygen i jego ekspresję w kontekście MHC I”
- Konferencja BioMicroWorld 2013, Madryt, Hiszpania, 1 – 4 X 2013  
Prezentacja plakatowa „A recombinant *Bacillus subtilis* vaccine to induce CD8+ T cell response”; autorzy; **K. Roeske**, R. Stachowiak, M. Kamiński, T. Jagielski, Z. Bakula, J. Bielecki
- FEMS 2013, 5th Congress of European Microbiologists, Leipzig, Niemcy, 21 – 25 VII 2013  
Prezentacja plakatowa „A recombinant *Bacillus subtilis* vaccine to promote MHC class I-dependent antigen presentation – preliminary results”; autorzy: **K. Roeske**, R. Stachowiak, T. Jagielski, M. Kamiński, J. Bielecki
- XXVII Zjazd Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów, Lublin, 5 – 8 IX 2012  
Prezentacja plakatowa „Wpływ delekcji C-końcowej części białka SecA na ekspresję białek heterologicznych w szczepach *Bacillus subtilis*”; autorzy: **K. Roeske**, R. Stachowiak, T. Jagielski, J. Bielecki

### 2. Finansowanie badań

- Grant NCBR (N R13 0046 06): „Nowy uniwersalny wektor i jego zastosowania do konstrukcji szczepionki nowej generacji” – główny wykonawca projektu
- Grant NCN (2013/09/N/NZ1/00182): „Charakterystyka zdolności *Bacillus subtilis* do indukcji prezentacji antygenów na powierzchni komórek eukariotycznych” – kierownik i główny wykonawca projektu
- Grant uniwersytecki BW (projekt w ramach konkursu młodych pracowników i doktorantów na Wydziale Biologii UW w 2013 r.) nr 104914: „Ocena wpływu listeriolizyny O na prezentację modelowego antygeny owoalbuminy na komórkach dendrytycznych” – kierownik projektu
- Grant uniwersytecki BW (projekt w ramach konkursu młodych pracowników i doktorantów na Wydziale Biologii UW w 2011 r.) nr 100008: „Analiza wpływu delekcji C-końcowej części białka SecA na ekspresję białek heterologicznych w szczepach *Bacillus subtilis*” – kierownik projektu