

Paweł Łaniewski¹, Elżbieta Katarzyna Jagusztyn-Krynicka*¹

¹Zakład Genetyki Bakterii, Instytut Mikrobiologii, Wydział Biologii, Uniwersytet Warszawski,
ul. Miecznikowa 1, 02-096 Warszawa

Wpłynęło w grudniu 2012 r.

Spis treści: 1. Charakterystyka patogenu i epidemiologia zakażeń. 2. Objawy chorobowe i źródła zakażeń. 3. Szczepionki anty-*Campylobacter*. 4. Podjednostkowe szczepionki anty-*Campylobacter* skonstruowane z użyciem atenuowanych szczepów *S. enterica*. 5. Podsumowanie

Anti-*Campylobacter* immunoprophylaxis

Abstract: *Campylobacter jejuni* is currently recognized as a major cause of food-borne human gastroenteritis worldwide. In developed countries the majority of *Campylobacter* infections are associated with the consumption of undercooked poultry meat. Although a disease lasts only several days and is very often self-limiting, campylobacteriosis constitutes a serious medical and socioeconomic problem. In patients, especially from developed countries, who have not encountered the pathogen before the infection can result in severe gastroenteritis accompanied with long-lasting bloody or mucus diarrhea. Moreover, *C. jejuni* can cause septicemia in immunocompromised individuals or induce autoimmune neurological disorders. Rapidly increasing antibiotic resistance of *Campylobacter* strains compels us to develop alternative therapeutic strategies. Implementation of immunoprophylaxis for humans or chickens seems to be the most effective strategy to decrease the number of human infections. Subunit vaccines are the safest, but mildly immunogenic, prophylactic method therefore, heterologous antigens are frequently delivered to a host by special delivery vectors i.e. attenuated *Salmonella* strains, to induce protective immune response. Avirulent *Salmonella* strains were also successfully used as a carrier to construct anti-*Campylobacter* subunit vaccines. Up till now, only several *Campylobacter* genes encoding immunogenic proteins: Peb1A, CjaA, Pal, Cj0420 and bacterioferritin, were cloned in *Salmonella* cells and the immune response and protection efficiency of constructed vaccine were determined on animal models. Here, we discuss the recent developments in the field of *Salmonella*-based anti-*Campylobacter* vaccines.

Contents: 1. Pathogen characteristics and infection epidemiology. 2. The symptoms and source of infections. 3. Anti-*Campylobacter* vaccines. 4. Anti-*Campylobacter* subunit vaccines constructed with attenuated *S. enterica* cells. 5. Conclusions

Słowa kluczowe: antygen, *Campylobacter*, *Salmonella*, szczepionka podjednostkowa

Key words: antigen, *Campylobacter*, *Salmonella*, subunit vaccine

1. Charakterystyka patogenu i epidemiologia zakażeń

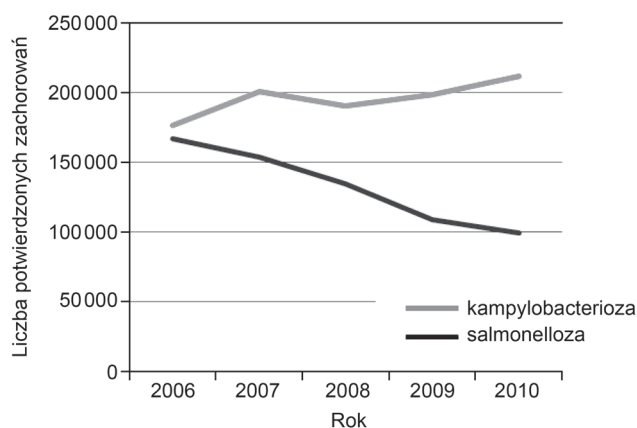
Bakterie z rodzaju *Campylobacter* to Gram-ujemne, mikroaerofilne, spiralne, ruchliwe pałeczki należące do klasy ϵ -*Proteobacteria*. Aktualnie mikroorganizmy te są najczęściej izolowanym czynnikiem etiologicznym stanów zapalnych przewodu pokarmowego u ludzi zarówno w krajach rozwiniętych jak i rozwijających się [3,33]. Infekcje wywoływane są głównie przez dwa nierozróżnialne pod względem klinicznym gatunki: *Campylobacter jejuni* i *Campylobacter coli*. Wg raportu EFSA (Europejski Urząd ds. Bezpieczeństwa Żywności, *European Food Safety Agency*) i ECDC (Europejskie Centrum Zapobiegania i Kontroli Chorób, *European Center for Disease Control and Prevention*) odpowiadają one za 35,7% i 2,3% odnotowanych przypadków kampanylobakteriozy w Unii Europejskiej (UE) w 2010 r. [6].

Dane epidemiologiczne wskazują, iż liczba przypadków kampanylobakteriozy w skali światowej sięga aż 400 milionów rocznie (48). Wg danych CDC (Centrum Zwalczania i Zapobiegania Chorób, *Center for Disease Control and Prevention*) każdego roku infekcje *Campylobacter* powodują ok. 2–3 miliona przypadków zachorowań w USA

(<http://www.cdc.gov/nczved/divisions/dfbmd/diseases/campylobacter/technical.html#incidence>). W UE liczba przypadków kampanylobakteriozy szacowana jest na przynajmniej 2 miliony, a może sięgać nawet 20 milionów rocznie [7]. Wg raportów EFSA w UE od 2005 do 2010 r. kampanylobakterioza była nieprzerwanie najczęściej występującą chorobą odzwierzęcą. We wszystkich krajach członkowskich w 2010 r. odnotowano 212 064 przypadków zakażeń *Campylobacter* sp. [6]. W porównaniu do roku poprzedniego był to wzrost o 6,7%. W tym samym czasie odnotowano 99 020 przypadków salmonellozy, drugiej najczęściej występującej zoonozy. Jednakże w przypadku zakażeń pałeczkami *Salmonella* ich liczba od 5 lat systematycznie się obniża (w 2010 r. spadek o 8,8% w porównaniu do roku poprzedniego) (Rys. 1).

Liczba zdiagnozowanych przypadków kampanylobakteriozy w poszczególnych krajach UE ze względu na odmienne systemy monitorowania zakażeń bakteryjnych znacznie się różniła i wynosiła od 0,04 do 200,58 przypadków zachorowań na 100 000 mieszkańców. W Polsce w 2010 r. potwierdzono jedynie 367 przypadków kampanylobakteriozy (0,96 zachorowań na 100 000 osób). Tak niski poziom wynika prawdopodobnie z faktu, iż

* Autor korespondencyjny: Zakład Genetyki Bakterii, Instytut Mikrobiologii, Wydział Biologii, Uniwersytet Warszawski, ul. Miecznikowa 1, 02-096 Warszawa; e-mail: kjkryn@biol.uw.edu.pl



Rys. 1. Kinetyka zachorowań na kampylobakteriozę i salmonellozę w Unii Europejskiej w latach 2006–2010 wg [6]

w Polsce dopiero od niedawna rejestruje się przypadki kampylobakteriozy jako wyodrębnionej jednostki chorobowej. Co więcej szacuje się, że tylko co dziesiąty przypadek kampylobakteriozy jest odnotowywany, reszta zakażonych osób ze względu na łagodny przebieg infekcji prawdopodobnie nie zgłasza się do lekarza.

2. Objawy chorobowe i źródła zakażeń

Kliniczna manifestacja zakażeń *Campylobacter* spp. bywa bardzo różnorodna i waha się od przypadków asymptomatycznych do ostrych stanów zapalnych jelit, którym towarzyszy długotrwała, krwawa lub śluzowata biegunka [1]. Te ostatnie symptomy chorobowe charakterystyczne są dla osób zakażonych z krajów rozwiniętych, które w przeszłości nie zetknęły się z patogenem. W większości przypadków stan chorobowy trwa kilka dni, a infekcje mają tendencję do samowyleczenia. Jednakże u ludzi z obniżoną odpornością (dzieci w wieku poniżej 2 lat, osoby starsze, osoby po przebytych chorobach nowotworowych czy zakażeni wirusem HIV) infekcje *Campylobacter* są często przyczyną zakażeń ogólnoustrojowych oraz posocznicy [20]. Dodatkowo udokumentowano, że infekcje *Campylobacter* mogą prowadzić do rozwoju chorób autoimmunizacyjnych i neurologicznych: reaktywnego artretyzmu i neuropatii obwodowego układu nerwowego tj. zespół Guillaina-Barrégo (GBS) czy chorób zapalnych jelit (IBD, *inflammatory bowel diseases*, tj. choroba Leśniowskiego-Crohna [18, 22, 29]. *Campylobacter* jest także drugą po zakażeniach enterotoksycznymi szczepami *E. coli* (ETEC) przyczyną biegunek podróźnych [8].

W krajach rozwiniętych do zakażeń pałeczkami *Campylobacter* u ludzi dochodzi najczęściej przez spożycie zanieczyszczonego pałeczkami patogenu mleka, wody lub mięsa, zwłaszcza nieodpowiednio przygotowanego drobiu [17]. Niewątpliwie głównym źródłem patogenu są kurczęta ulegające kolonizacji we

wczesnym okresie życia. Potwierdza to ostatni raport EFSA i ECDC, który wskazuje, że w 2010 r. w UE aż 2/3 (17 z 27) ognisk epidemiologicznych (*outbreak*) kampylobakteriozy o udokumentowanym źródle powiązanych było z zanieczyszczonym *Campylobacter* mięsem drobiowym [6]. Mechanizm zapoczątkowania infekcji kurcząt na fermach pozostaje niewyjaśniony, lecz niezależnie od źródła zakażenia *Campylobacter* rozprzestrzenia się w stadach kurcząt bardzo szybko doprowadzając do zakażenia nawet 100% ptaków [30]. Chociaż poziom kolonizacji jelit kurcząt jest bardzo wysoki (nawet 10^{10} CFU na gram zawartości jelit), nie wywołuje to u ptaków objawów chorobowych. Fakt ten uniemożliwia eliminację ze stad osobników zainfekowanych [17]. Do dalszego zanieczyszczenia mięsa drobiowego dochodzi w rzeźniach, stąd wysoki procent tusz kurcząt znajdujących się na rynku zawiera duże liczby komórek tego drobnoustroju. Podczas przetwarzania mięsa komórki patogenu przedostają na skórę tusz drobiowych poprzez zanieczyszczenie zawartością przewodu pokarmowego. Specyficzne mikrośrodowisko na powierzchni tusz sprzyja przetrwaniu pałeczek w temperaturze 4°C, a nawet po zamrożeniu. Dodatkowo wykazano, iż patogen w przypadku nieodpowiedniego przechowywania mięsa może ulec w tymże środowisku namnożeniu [41]. Wg danych EFSA i ECDC w 2010 r. 29,6% tusz drobiowych w UE było zanieczyszczonych pałeczkami *Campylobacter* [6]. W poszczególnych krajach członkowskich udział zakażonego świeżego mięsa wynosił od 3,1% aż do 90,0%. Ponieważ dawka infekcyjna dla człowieka jest względnie niska (10^2 CFU), do zakażeń człowieka może dochodzić stosunkowo łatwo i często [20].

Dodatkowym problemem z medycznego punktu widzenia jest zjawisko nasilającej się antybiotykooporności bakterii z rodzaju *Campylobacter* wynikające z nadmiernego i często nieuzasadnionego stosowania antybiotyków w praktyce weterynaryjnej jak i terapii ludzi. Jak wcześniej wspomniano w większości przypadków zakażenia *Campylobacter* przebiegają w łagodny sposób i wymagają jedynie leczenia objawowego (obserwacja, uzupełnienie płynów i elektrolitów). Antybiotykoterapię stosuje się jedynie w przypadku ciężkiego przebiegu choroby. Badania epidemiologiczne pokazują jednak gwałtowny wzrost oporności na powszechnie stosowane terapeutyki (tj. makrolidy, fluorochinolony i tetracyklinę) zarówno wśród klinicznych szczepów *C. jejuni/coli* jak i szczepów izolowanych z pożywienia [10, 26, 27]. Wykazano także rosnącą liczbę szczepów wieloopornych, co niewątpliwie utrudnia zwalczanie przypadków kampylobakteriozy, wydłużając okres leczenia lub powodując całkowitą nieskuteczność stosowanej terapii. W przypadku ogólnoustrojowych infekcji spowodowanej przez szczepy *Campylobacter* odporne na makrolidy i fluorochinolony jedyną alternatywą wydaje się zastosowanie gentamycyny [31, 41].

3. Szczepionki anty-*Campylobacter*

Ograniczenie liczby przypadków kampylobakteriozy u ludzi można osiągnąć na drodze obniżenia poziomu zakażeń stad drobiu. W ramach multidyscyplinarnego programu CARMA (*Campylobacter Risk Management and Assessment*) badano wprowadzanie różnego rodzaju interwencji w procesie produkcji, przetwarzania i spożycia mięsa drobiowego (*from farm to fork*) tj. podniesienie poziomu higieny na fermach, rzeźniach i przedsiębiorstwach procesujących żywność czy edukacja społeczeństwa [14]. Metody te okazały się jednak nieskuteczne, stąd wprowadzenie do powszechnego stosowania szczepień ochronnych ludzi lub kurcząt wydaje się najwłaściwszą strategią zapobiegania ludzkim przypadkom kampylobakteriozy.

Jak dotąd na świecie nie ma dostępnej na rynku skutecznej szczepionki anty-*Campylobacter*, pomimo iż od kilkunastu lat europejskie i amerykańskie ośrodki naukowe wraz z firmami biotechnologicznymi prowadzą intensywne badania w tym kierunku. Szczepionka anty-*Campylobacter* dla ludzi przeznaczona będzie prawdopodobnie tylko dla osób z grupy podwyższonego ryzyka tj. personelu medycznego, osób podróżujących do regionów świata, gdzie kampylobakterioza jest chorobą endemiczną lub osób zagrożonych rozwojem chorób autoimmunizacyjnych [46]. Ze względu na występujące zjawisko mimikry molekularnej pomiędzy lipooligosacharydem (LOS) *C. jejuni* a ludzkimi gangliozydami badania kliniczne prototypów szczepionek na ludzkich ochotnikach wiązały się z ryzykiem wystąpienia u pacjentów chorób autoimmunizacyjnych. Identyfikacja szczepu *C. jejuni* CG8421, niewywołującego u ludzi GBS, niewątpliwie ułatwi testowanie tego rodzaju szczepionek [45].

Badane prototypy szczepionek anty-*Campylobacter* przeznaczone zarówno dla ludzi jak i kurcząt ogólnie można podzielić na szczepionki skonstruowane w oparciu o zabite komórki drobnoustroju tzw. CWC (*Campylobacter whole-cell vaccines*) oraz szczepionki podjednostkowe zawierające jedynie wybrane antygeny *Campylobacter* [5, 19]. Charakterystykę ostatnio badanych szczepionek anty-*Campylobacter* przedstawiono w Tab. I.

Szczepionki anty-*Campylobacter* zawierające całe komórki patogenu mają kilka ograniczeń. Najważniejszym z nich jest wysoki poziom zmienności genetycznej *C. jejuni* [11, 34]. Mikroorganizmy te posiadają się tzw. „otwarty” pangenom (pula wszystkich genów obecna w genomach przedstawicieli danego gatunku lub rodzaju). Oznacza to, że poznanie materiału genetycznego kolejnych szczepów *C. jejuni* wzbogaca pangenom gatunku o kolejne unikatowe geny. Porównanie materiału genetycznego 13 szczepów *C. jejuni* wykazało, że jedynie 2/3 genów stanowią tzw. geny podstawowe (*core genes*), występujące w genomach wszystkich przedstawicieli gatunku. Reszta genów była specyficzna dla poszczególnych szczepów lub kilku przedstawicieli gatunku (*dispensable/auxillary genes*). Przykładowo genom *C. jejuni* M1 składa się z 1080 genów podstawowych i aż 547 genów dodatkowych [9]. Analiza materiału genetycznego 5 blisko spokrewnionych szczepów ST-21 wyizolowanych z różnych źródeł (tj. klinicznych i środowiskowych) i scharakteryzowanych za pomocą techniki MLST (*multi locus sequence typing*) wykazała ich wysoką zmienność fenotypową i genetyczną, co niewątpliwie warunkuje ich zdolność przystosowawczą do różnych środowisk [13]. Ostatnio przeprowadzone analizy transkryptomów oraz proteomów *C. jejuni* wykazały także olbrzymią zmienność profilu

Tabela I

Prototypy podjednostkowych szczepionek anty-*Campylobacter* skonstruowanych z wykorzystaniem atenuowanych szczepów *S. enterica*

Badany antygen	Rodzaj atenuacji	Lokalizacja transgenu	Model zwierzęcy	Efekt szczepienia	Piśmiennictwo
Peb1A	$\Delta phoPQ$	plazmid	myszy	indukcja specyficznych przeciwciał klasy IgG; brak protekcji	[42]
CjaA	$\Delta crp \Delta cya$	plazmid	kurczęta	indukcja specyficznych przeciwciał klasy IgY i IgA; obniżenie kolonizacji o 6 log	[50]
	$\Delta aroA$	plazmid	kurczęta	indukcja specyficznych przeciwciał; obniżenie poziomu kolonizacji o 1,4 log	[2]
	$\Delta aroA \Delta htr$	chromosom	kurczęta	indukcja specyficznych przeciwciał klasy IgY i IgA; obniżenie poziomu kolonizacji o 2 log	[23]
Pal	$\Delta aroA \Delta htr$	chromosom	kurczęta	indukcja specyficznych przeciwciał klasy IgY i IgA; obniżenie poziomu kolonizacji o 4 log	[23]
	$\Delta crp \Delta cya$	plazmid	kurczęta	indukcja specyficznych przeciwciał klasy IgY i IgA; brak protekcji	(Łaniewski i wsp. dane niepublikowane)
Cj0420	$\Delta aroA \Delta htr$	chromosom	kurczęta	indukcja specyficznych przeciwciał klasy IgY i IgA; obniżenie poziomu kolonizacji o 1 log	[23]
Cj1534c	$\Delta P_{fur33}::TT \text{ araC } P_{BAD} \text{ fur } \Delta pmi \Delta (gmd-fcl) \Delta asdA$	plazmid	kurczęta	obniżenie poziomu kolonizacji o 3,6 log	[21]

białkowego mikroorganizmu w zależności od warunków i fazy wzrostu [25, 49]. Dodatkowo badania wykazały, iż kurczęta w trakcie swojego życia wielokrotnie ulegają kolonizacji przez różne szczepy *Campylobacter* spp. [43], stąd skonstruowanie skutecznej szczepionki CWC dla kurcząt wydaje się bardzo trudne. W przypadku ludzi użycie takiej szczepionki, bez dokładnego poznania mechanizmów patogenezы pałeczek *C. jejuni* jest dość ryzykowne, gdyż może prowadzić do rozwoju chorób autoimmunizacyjnych.

Szczepionki podjednostkowe uważane są za najbezpieczniejsze, lecz ich immunogenność w porównaniu do szczepionek zawierających żywe atenuowane komórki jest dużo niższa. W procesie konstrukcji tego typu szczepionek krytyczny jest wybór antygenów. Pałeczki *C. jejuni* posiadają wiele białek o właściwościach immunogennych, jednakże niewiele z nich posiada odpowiedni potencjał ochronny. Rozwój badań z dziedziny genomiki, transkryptomiki i proteomiki w ostatnich latach niewątpliwie przyczynił się do dużego postępu w identyfikacji nowych antygenów. Jednakże do tej pory na zwierzętach laboratoryjnych testowano tylko kilka potencjalnych kandydatów do konstrukcji szczepionki – głównie w postaci oczyszczonych rekombinowanych białek lub produkowanych w żywych atenuowanych szczepach bakteryjnych [19].

4. Podjednostkowe szczepionki anty-*Campylobacter* skonstruowane z użyciem atenuowanych szczepów *S. enterica*

Jako nośnik genów *C. jejuni* z powodzeniem wykorzystano m.in. atenuowane szczepy *S. enterica*. Zastosowana strategia powinna podwyższyć lub/i ukierunkować

odpowieź immunologiczną szczepionego gospodarza i zapewnić efekt ochronny. W celu dostarczenia antygenów *C. jejuni* do komórek układu immunologicznego stosowano zarówno szczepy *S. enterica* sv. Typhimurium jak i Enteritidis zmutowane w genach kodujących białka regulatorowe ($\Delta phoPQ$, $\Delta crp \Delta cya$), białka szlaków syntezy związków aromatycznych ($\Delta aroA$) czy białka szoku cieplnego (Δhtr). Do konstrukcji tego rodzaju prototypów szczepionek podjednostkowych wykorzystano następujące białka *Campylobacter*: Peb1A (Cj0921c), CjaA (Cj0982c), Pal (Cj0113), Cj0420 i bakterioferytynę (Cj1534c) (Tab. II).

Białko Peb1A jest jednym z ważnych czynników wirulencji *C. jejuni*. Początkowo zostało zidentyfikowane jako adhezyna. Inaktywacja kodującego go genu *cj0921c* powodowała ok. 100-krotne obniżenie poziomu adhezji zmutowanego szczepu *C. jejuni* do komórek eukariotycznych i wpływała na kolonizację jelita myszy [36]. Białko Peb1A pełni w komórce *C. jejuni* także inną funkcję. Leon-Kempis Mdel i wsp. [24] wykazali, że Peb1A bierze udział w transporcie do wnętrza komórki bakteryjnej dwóch aminokwasów: glutamianu i asparagianu. Badania wykazały, że białko to stanowi składnik wiążący ligand systemu transportu typu ABC i jest niezbędne dla *C. jejuni* do wykorzystania tychże aminokwasów jako źródła węgla. Warto podkreślić, że transport aminokwasów jest niezwykle ważny w fizjologii komórek *C. jejuni*. Mikroorganizm ten nie posiada genu kodującego 6-fosfofruktokinazę – enzymu niezbędnego w katabolizmie glukozy, stąd aminokwasy *in vivo* stanowią dla *C. jejuni* główne źródło węgla i energii [15, 44, 47]. Białko Peb1A w komórkach *C. jejuni* zlokalizowane jest głównie w peryplazmie, jednakże odnajdywane było także na powierzchni komórki

Tabela II

Rodzaje testowanych szczepionek anty-*Campylobacter* [19]

Rodzaj szczepionki	Skład	Droga podania	Model	Efekt szczepienia
Szczepionki CWC				
<i>C. jejuni</i> 81-176	komórki inaktywowane formaliną	doustna	fretki	protekcja 40-89%
<i>C. jejuni</i> FIMCB	komórki inaktywowane formaliną	doustna	kurczęta	protekcja 16-93%
Campyvax®	komórki przygotowane wg <i>Nutriment Signal Technology</i>	doustna	ludscy ochotnicy	III faza kliniczna (wyniki niedostępne)
Szczepionki podjednostkowe				
rekombinowane białka	oczyszczone z komórek <i>E. coli</i> rekombinowane białka tj. FlaA-MBP, LivK, Cj1643, Cj0092, Cj0420, FlaC, FspA1, FspA2	donosowa lub podskórna	myszy	redukcja kolonizacji; protekcja w zależności od użytego białka: 17-89%
koniugaty polisacharydowe	CPS-CRM: polisacharyd otoczkowy <i>C. jejuni</i> 81-176 skoniugowany z inaktywowaną toksyną błoniczą	podskórna	myszy; małpy (<i>Aotus nancymae</i>)	brak objawów chorobowych przy jednoczesnej kolonizacji
szczepy <i>S. enterica</i> jako nośniki antygenów <i>Campylobacter</i>	białka Peb1A, Pal, CjaA, Cj420 produkowane w atenuowanych komórkach <i>S. enterica</i>	doustna	myszy; kurczęta	redukcja kolonizacji

[4, 24]. Ze względu na różną lokalizację Peb1A może pełnić w komórce podwójną rolę tj. adhezyny i białka wiążącego ligand.

Szczepki *S. Typhimurium* produkujące antygen Peb1A zostały skonstruowane przez amerykańską firmę biotechnologiczną AVANT Immunotherapeutics [42]. W tym celu fragmenty genu *cj0921c* (kodujące białko Peb1A bez sekwencji sygnałnej) sklonowano w trzech różnych plazmidach serii *Asd*⁺ i wprowadzono do komórek *S. Typhimurium* Δ *phoPQ*. W dwóch pierwszych przypadkach użyte wektory zapewniały wewnątrzkomórkową produkcję białka. Plazmidy te różniły się jedynie liczbą kopii. Pierwszy posiadał *ori* replikacji pBR, drugi zaś dwa systemy replikacji: pSC101 i indukowalny *in vivo* system replikacji pUC. Trzeci z użytych wektorów zapewniał zaś sekrecję antygeny do środowiska za pomocą systemu transportu hemolizyny. Skonstruowanymi prototypami szczepionek produkującymi antygen Peb1A immunizowano doustnie myszy BALB/c. Pomimo, iż analizy Western blot w surowicy szczepionych zwierząt, wykazały indukcję produkcji specyficznych przeciwciał anti-Peb1A klasy IgG, immunizacja nie chroniła myszy przed zakażeniem pałeczkami *C. jejuni*.

Antygen CjaA (Cj0982c) został zidentyfikowany przez naszą grupę badawczą jako białko silnie reagujące z przeciwciałami anti-*Campylobacter* [35]. CjaA, podobnie jak Peb1A, jest zewnątrzkomórkowym białkiem *C. jejuni*, będącym składnikiem systemu transportu typu ABC, niezbędne w transporcie aminokwasów. Analiza krystalograficzna białka wykazała, że posiada ono silne powinowactwo do cysteiny [28]. Ze względu na fakt, iż ekspresja genu *cjaA* wrasta w warunkach obniżonego dostępu żelaza a także na podłożu stałym, jego produkt może brać udział w procesach kolonizacji i wirulencji [16,38]. Dodatkowo wykazano, iż białko CjaA występuje w większej ilości w komórkach świeżych klinicznych izolatów niż w komórkach wielokrotnie pasażowanych szczepów laboratoryjnych (4). Białko CjaA zostało także zidentyfikowane jako rozpoznawane przez przeciwciała matczyne, chroniące kurczęta przez pierwsze tygodnie życia przed zakażeniem *C. jejuni* [40].

W celu oceny potencjału protekcyjnych białka CjaA w Zakładzie Genetyki Bakterii UW skonstruowano szczep *S. Typhimurium* Δ *crp* Δ *cya* produkujący antygen [50]. Gen *cjaA* sklonowano do wysokokopijnego plazmidu *Asd*⁺ i wprowadzono do komórek nośnika zawierającego dodatkowo chromosomową delecję genu *asd*. Skonstruowanym prototypem szczepionki immunizowano kurczęta dwukrotnie w 1-szym i 14-tym dniu życia. Przeprowadzone eksperymenty wykazały indukcję przeciwciał anti-*Campylobacter* klasy IgY (IgG) w surowicy oraz sIgA w śluzie jelitowym szczepionych kurcząt. Uodpornianie kurcząt skonstruowanym prototypem szczepionki prowadziło także do obniżenia poziomu kolonizacji jelita ptaków przez heterologiczny szczep *C. jejuni* aż o 6 rzędów wielkości.

Skuteczność zastosowania antygeny CjaA potwierdziły też eksperymenty z użyciem innego atenuowanego szczepu *S. Typhimurium* uszkodzonego w szlakach syntezy aminokwasów aromatycznych [2]. W tychże badaniach gen *cjaA* sklonowano na plazmidzie pod kontrolą indukowalnego *in vivo* promotora *nirB* w fuzji translacyjnej z fragmentem DNA kodującym C-terminalny fragment toksyny tężca. Plazmid zawierający gen *cjaA* wprowadzono do komórek *S. Typhimurium* Δ *aroA*, po czym dwukrotnie szczepiono nim kurczęta. Eksperyment ochronny wykazał obniżenie poziomu kolonizacji ptaków o 1,4 rzędu wielkości w 3. i 4. tygodniu od zakażenia pałeczkami *C. jejuni*. Analiza odpowiedzi immunologicznej wykazała, iż protekcja związana jest ściśle z indukcją specyficznych przeciwciał zarówno klasy IgY jak i IgA rozpoznających białko CjaA. Plazmid zawierający gen *cjaA* wprowadzono także do innych atenuowanych szczepów *S. Typhimurium* tj. Δ *spaS* i Δ *ssaU*. Zmiana rodzaju atenuacji komórek nośnika przyczyniła się do zwiększenia efektu protekcyjnego, co prawdopodobnie wynikało z ich dłuższej przeżywalności w organizmie ptaków w porównaniu do stosowanego wcześniej szczepu Δ *aroA*.

W identyczny sposób badano także potencjał ochronny innych antygenów *C. jejuni* tj. Peb1A, GlnH i ChuA. Jedynie zastosowanie szczepu *S. Typhimurium* Δ *aroA* produkującego białko Peb1A obniżało poziomu kolonizacji przewodu pokarmowego kurcząt do poziomu obserwowanego w przypadku użycia antygeny CjaA.

Kolejnym antygenem *C. jejuni* zidentyfikowanym i testowanym przez naszą grupę badawczą było białko Pal (*peptidoglycan-associated lipoprotein*). Lipoproteina ta zwana także CjaD lub Omp18 zakotwiczona jest w błonie zewnętrznej komórek *C. jejuni*. Poprzez oddziaływanie z kompleksem białek Tol odpowiada za utrzymanie integralności osłon komórkowych [12]. Prawdopodobnie białko Pal jest niezbędne do przeżycia komórek *C. jejuni* – wielokrotne próby skonstruowania w naszym laboratorium mutantu delecyjnego w kodującym je genie *cj0113* kończyły się niepowodzeniem (dane niepublikowane). W celu oceny właściwości ochronnych antygeny gen *cj0113* sklonowano na wysokokopijnym plazmidzie *Asd*⁺ i wprowadzono do komórek *S. Typhimurium* Δ *crp* Δ *cya* Δ *asd*. Białko w komórkach heterologicznego gospodarza lokalizowało się w osłonach komórkowych (głównie w błonie zewnętrznej). Badania na modelu kurzym wykazały, iż pomimo indukcji humoralnej odpowiedzi odpornościowej anti-*Campylobacter*, immunizacja nie prowadziła do obniżenia poziomu kolonizacji przewodu pokarmowego kurcząt przez pałeczki *C. jejuni* (dane niepublikowane).

Analizowano także przydatność do konstrukcji szczepionki białka Cj0420 (ACE393) zidentyfikowanego technikami proteomicznymi przez duńską firmę farmaceutyczną ACE BioSciences jako silny immunogen zlokalizowany na powierzchni komórek *C. jejuni* [37].

Analiza siewstwa przeprowadzona na modelu mysim potwierdziła potencjał ochronny białka Cj0420. Zwierzęta szczepione podskórnie oczyszczonym rekombinowanym białkiem były kolonizowane przez pałeczki *C. jejuni* znacznie rzadziej w stosunku do kontroli [39].

L a y t o n i wsp. [23] zastosowali odmienną strategię immunizacji, produkując w komórkach nośnika jedynie wybrane epitopy białek Pal, CjaA i Cj0420. W badaniach jako nośnika heterologicznych genów użyto szczepu *S. Enteritidis* Δ aroA Δ htr. DNA kodujący wybrane fragmenty białek Pal, CjaA i Cj0420 wprowadzono do chromosomu szczepu nośnikowego w obręb genu *lamB*, kodującego zewnątrzkomórkową porynę. Dzięki integracji DNA i uzyskanym fuzjom epitopy wybranych białek były prezentowane na powierzchni komórek *S. Enteritidis*. Użyty szczep nośnikowy oprócz antygeny w celu stymulacji komórkowej odpowiedzi odpornościowej produkował także peptyd CD154 (CD40L), będące ligandem czynnika TNF (*tumor necrosis factor*) [32]. Skonstruowane w powyższy sposób prototypy szczepionek podano *per os* kurczętom w dniu wyklucia. Ptaki zakażano pałeczkami *C. jejuni* 3 tygodnie później. Analiza odpowiedzi odpornościowej wykazały we wszystkich przypadkach indukcję w surowicy specyficznych przeciwciał klasy IgY (IgG). Najwyższe miano przeciwciał anty-*Campylobacter* uzyskano po immunizacji kurcząt szczepem produkującym epitop białka Pal. W tym przypadku widoczna była także indukcja wydzielniczych przeciwciał klasy IgA. Eksperyment ochronny na modelu kurzym wykazał, że szczepionka zawierająca epitop Pal obniża poziom kolonizacji kurcząt przez *C. jejuni* aż o 4 rzędy wielkości tj. poniżej poziomu kolonizacji wykrywalnego za pomocą stosowanej techniki qPCR – ilościowej reakcji PCR w czasie rzeczywistym (*quantitative real-time PCR*). Produkcja w komórkach *S. Enteritidis* epitopów białek Cj0420 i CjaA także przyczyniła się do obniżenia poziomu kolonizacji kurcząt odpowiednio o ok. 1 i 2 rzędy wielkości.

5. Podsumowanie

Podsumowując, przeprowadzone eksperymenty na modelach zwierzęcych sugerują, iż z badanych dotąd antygenów *Campylobacter* białka CjaA i Peb1A mają największy potencjał ochronny, który powinien być wykorzystany w konstrukcji szczepionki anty-*Campylobacter* przeznaczonej dla drobiu. Niezbędne jest jednak kontynuowanie badań mających na celu identyfikację nowych skutecznych antygenów – białek konserwowanych w obrębie wielu serotypów, występujących w komórce w dużej ilości i indukujących silną odpowiedź odpornościową. Jednocześnie powinno się opracowywać nowe rodzaje strategii mające na celu wzmocnienie/modulację odpowiedzi odpornościowej kurcząt.

Podziękowania

Artykuł został sfinansowany ze środków grantu MNiSW N N302 236838, decyzja 2368/B/P01/2010/38.

Piśmiennictwo

- Blaser M.J., Wells J.G., Feldman R.A., Pollard R.A., Allen J.R.: *Campylobacter* enteritis in the United States. A multicenter study. *Ann. Intern. Med.* **98**, 360–365 (1983)
- Buckley A.M., Wang J., Hudson D.L., Grant A.J., Jones M.A., Maskell D.J., Stevens M.P.: Evaluation of live-attenuated *Salmonella* vaccines expressing *Campylobacter* antigens for control of *C. jejuni* in poultry. *Vaccine*, **28**, 1094–1105 (2010)
- Coker A.O., Isokpehi R.D., Thomas B.N., Amisu K.O., Obi C.L.: Human campylobacteriosis in developing countries. *Emerg. Infect. Dis.* **8**, 237–244 (2002)
- Cordwell S.J., Len A.C., Touma R.G., Scott N.E., Falconer L., Jones D., Connolly A., Crossett B., Djordjevic S.P.: Identification of membrane-associated proteins from *Campylobacter jejuni* strains using complementary proteomics technologies. *Proteomics*, **8**, 122–139 (2008)
- de Zoete M.R., van Putten J.P., Wagenaar J.A.: Vaccination of chickens against *Campylobacter*. *Vaccine*, **25**, 5548–5557 (2007)
- EFSA: The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2010. *EFSA J.* **10**, 2597 (2012)
- EFSA: Scientific opinion on quantification of the risk posed by broiler meat to human campylobacteriosis in the EU. *EFSA J.* **8**, 1437–1526 (2010)
- Ekdahl K., Giesecke J.: Travellers returning to Sweden as sentinels for comparative disease incidence in other European countries, campylobacter and giardia infection as examples. *Euro. Surveill.* **9**, 6–9 (2004)
- Friis C., Ussery D.W. i wsp.: Genomic characterization of *Campylobacter jejuni* strain M1. *PLoS One*, **5**, e12253 (2010)
- Gallay A., Megraud F. i wsp.: *Campylobacter* antimicrobial drug resistance among humans, broiler chickens, and pigs, France. *Emerg. Infect. Dis.* **13**, 259–266 (2007)
- Gilbreath J.J., Cody W.L., Merrell D.S., Hendrixson D.R.: Change is good: variations in common biological mechanisms in the epsilonproteobacterial genera *Campylobacter* and *Helicobacter*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **75**, 84–132 (2011)
- Godlewska R., Wisniewska K., Pietras Z., Jagusztyn-Krynicka E.K.: Peptidoglycan-associated lipoprotein (Pal) of Gram-negative bacteria: function, structure, role in pathogenesis and potential application in immunoprophylaxis. *FEMS Microbiol. Lett.* **298**, 1–11 (2009)
- Gripp E. i wsp.: Closely related *Campylobacter jejuni* strains from different sources reveal a generalist rather than a specialist lifestyle. *BMC Genomics*, **12**, 584 (2011)
- Havelaar A.H. i wsp.: Effectiveness and efficiency of controlling *Campylobacter* on broiler chicken meat. *Risk Anal.* **27**, 831–844 (2007)
- Hofreuter D., Novik V., Galan J.E.: Metabolic diversity in *Campylobacter jejuni* enhances specific tissue colonization. *Cell Host Microbe*, **4**, 425–433 (2008)
- Holmes K., Mulholland F., Pearson B.M., Pin C., McNicholl-Kennedy J., Ketley J.M., Wells J.M.: *Campylobacter jejuni* gene expression in response to iron limitation and the role of Fur. *Microbiology*, **151**, 243–257 (2005)
- Humphrey T., O'Brien S., Madsen M.: *Campylobacter* as zoonotic pathogens: a food production perspective. *Int. J. Food Microbiol.* **117**, 237–257 (2007)
- Jacobs B.C., van Belkum A., Endtz H.P.: Guillain-Barré syndrome and *Campylobacter* infection (w) *Campylobacter*, red.

- Nachamkin I., Szymanski C.M., Blaser M.J., Washington, D.C., 2008, s. 168–189
19. Jagusztyn-Krynicka E.K., Laniewski P., Wyszynska A.: Update on *Campylobacter jejuni* vaccine development for preventing human campylobacteriosis. *Expert Rev. Vaccines*, **8**, 625–645 (2009)
 20. Janssen R., Krogfelt K.A., Cawthraw S.A., van Pelt W., Wagenaar J.A., Owen R.J.: Host-pathogen interactions in *Campylobacter* infections: the host perspective. *Clin. Microbiol. Rev.* **21**, 505–518 (2008)
 21. Joens L.A.: Reduction of *Campylobacter jejuni* in poultry using Cj1534 in an attenuated *Salmonella* vaccine. Med-Vet-Net Workpackage 34: Workshop on immunity to and vaccination against *Campylobacter jejuni* in chickens, Surrey, Wielka Brytania, 2009
 22. Kalischuk L.D., Inglis G.D., Buret A.G.: *Campylobacter jejuni* induces transcellular translocation of commensal bacteria via lipid rafts. *Gut Pathog.* **1**, 2 (2009)
 23. Layton S.L., Morgan M.J., Cole K., Kwon Y.M., Donoghue D.J., Hargis B.M., Pumford N.R.: Evaluation of *Salmonella*-vectored *Campylobacter* peptide epitopes for reduction of *Campylobacter jejuni* in broiler chickens. *Clin. Vaccine Immunol.* **18**, 449–454 (2011)
 24. Leon-Kempis Mdel R., Guccione E., Mulholland F., Williamson M.P., Kelly D.J.: The *Campylobacter jejuni* PEB1a adhesin is an aspartate/glutamate-binding protein of an ABC transporter essential for microaerobic growth on dicarboxylic amino acids. *Mol. Microbiol.* **60**, 1262–1275 (2006)
 25. Liu X., Gao B., Novik V., Galan J.E.: Quantitative proteomics of intracellular *Campylobacter jejuni* reveals metabolic reprogramming. *PLoS Pathog.* **8**, e1002562 (2012)
 26. Mazi W., Senok A., Al-Mahmeed A., Arzese A., Bindayna K., Botta G.: Trends in antibiotic sensitivity pattern and molecular detection of *tet(O)*-mediated tetracycline resistance in *Campylobacter jejuni* isolates from human and poultry sources. *Jpn. J. Infect. Dis.* **61**, 82–84 (2008)
 27. Moore J.E. i wsp.: The epidemiology of antibiotic resistance in *Campylobacter*. *Microbes Infect.* **8**, 1955–1966 (2006)
 28. Muller A., Thomas G.H., Horler R., Brannigan J.A., Blagova E., Levdivok V.M., Fogg M.J., Wilson K.S., Wilkinson A.J.: An ATP-binding cassette-type cysteine transporter in *Campylobacter jejuni* inferred from the structure of an extracytoplasmic solute receptor protein. *Mol. Microbiol.* **57**, 143–155 (2005)
 29. Nachamkin I., Allos B.M., Ho T.: *Campylobacter* species and Guillain-Barre syndrome. *Clin. Microbiol. Rev.* **11**, 555–567 (1998)
 30. Newell D.G., Fearnley C.: Sources of *Campylobacter* colonization in broiler chickens. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**, 4343–4351 (2003)
 31. Newell D.G., Kruse H. i wsp.: Food-borne diseases – the challenges of 20 years ago still persist while new ones continue to emerge. *Int. J. Food Microbiol.* **139**, Suppl. 1, S3–15 (2010)
 32. O'Meara K.M., Kremer C.J., Layton S.L., Berghman L.R., Hargis B.M., Cole K.: Evaluation of recombinant *Salmonella* expressing CD154 for persistence and enhanced antibody response in commercial turkeys. *Poult. Sci.* **89**, 1399–1405 (2010)
 33. Olson C.K., Ethelberg S., van Pelt W., Tauxe R.V.: Epidemiology of *Campylobacter jejuni* infections in industrialized nations (w) *Campylobacter*, red. Nachamkin I., Szymanski C.M., Blaser M.J., AMS, Washington, D.C., 2008, s. 163–189
 34. Parkhill J., Barrell B.G. i wsp.: The genome sequence of the food-borne pathogen *Campylobacter jejuni* reveals hypervariable sequences. *Nature*, **403**, 665–668 (2000)
 35. Pawelec D., Rozynek E., Popowski J., Jagusztyn-Krynicka E.K.: Cloning and characterization of a *Campylobacter jejuni* 72Dz/92 gene encoding a 30 kDa immunopositive protein, component of the ABC transport system; expression of the gene in avirulent *Salmonella typhimurium*. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **19**, 137–150 (1997)
 36. Pei Z., Burucoa C., Grignon B., Baqar S., Huang X.Z., Kopecko D.J., Bourgeois A.L., Fauchere J.L., Blaser M.J.: Mutation in the *peb1A* locus of *Campylobacter jejuni* reduces interactions with epithelial cells and intestinal colonization of mice. *Infect. Immun.* **66**, 938–943 (1998)
 37. Prokhorova T.A., Nielsen P.N., Petersen J., Kofoed T., Crawford J.S., Morsczech C., Boysen A., Schrotz-King P.: Novel surface polypeptides of *Campylobacter jejuni* as traveller's diarrhoea vaccine candidates discovered by proteomics. *Vaccine*, **24**, 6446–6455 (2006)
 38. Sampathkumar B., Napper S., Carrillo C.D., Willson P., Taboada E., Nash J.H., Potter A.A., Babiuk L.A., Allan B.J.: Transcriptional and translational expression patterns associated with immobilized growth of *Campylobacter jejuni*. *Microbiology*, **152**, 567–577 (2006)
 39. Schrotz-King P., Prokhorova T.A., Nielsen P.N., Crawford J.S., Morsczech C.: *Campylobacter jejuni* proteomics for new travellers' diarrhoea vaccines. *Travel. Med. Infect. Dis.* **5**, 106–109 (2007)
 40. Shoaf-Sweeney K.D., Larson C.L., Tang X., Konkel M.E.: Identification of *Campylobacter jejuni* proteins recognized by maternal antibodies of chickens. *Appl. Environ. Microbiol.* **74**, 6867–6875 (2008)
 41. Silva J., Leite D., Fernandes M., Mena C., Gibbs P.A., Teixeira P.: *Campylobacter* spp. as a foodborne pathogen: a review. *Front. Microbiol.* **2**, 200 (2011)
 42. Sizemore D.R., Warner B., Lawrence J., Jones A., Killeen K.P.: Live, attenuated *Salmonella typhimurium* vectoring *Campylobacter* antigens. *Vaccine*, **24**, 3793–3803 (2006)
 43. Skanseng B., Trosvik P., Zimonja M., Johnsen G., Bjerrum L., Pedersen K., Wallin N., Rudi K.: Co-infection dynamics of a major food-borne zoonotic pathogen in chicken. *PLoS Pathog.* **3**, e175 (2007)
 44. Thompson S.A., Gaynor E.C.: *Campylobacter jejuni* host tissue tropism: a consequence of its low-carb lifestyle? *Cell Host Microbe*, **4**, 409–410 (2008)
 45. Tribble D.R. i wsp.: *Campylobacter jejuni* strain CG8421: a refined model for the study of campylobacteriosis and evaluation of *Campylobacter* vaccines in human subjects. *Clin. Infect. Dis.* **49**, 1512–1519 (2009)
 46. Tribble D.R. i wsp.: Diagnostic approach to acute diarrheal illness in a military population on training exercises in Thailand, a region of campylobacter hyperendemicity. *J. Clin. Microbiol.* **46**, 1418–1425 (2008)
 47. Velayudhan J., Kelly D.J.: Analysis of gluconeogenic and anaerobic enzymes in *Campylobacter jejuni*: an essential role for phosphoenolpyruvate carboxykinase. *Microbiology*, **148**, 685–694 (2002)
 48. Walker R.I.: Considerations for development of whole cell bacterial vaccines to prevent diarrheal diseases in children in developing countries. *Vaccine*, **23**, 3369–3385 (2005)
 49. Wright J.A., Grant A.J., Hurd D., Harrison M., Guccione E.J., Kelly D.J., Maskell D.J.: Metabolite and transcriptome analysis of *Campylobacter jejuni* *in vitro* growth reveals a stationary-phase physiological switch. *Microbiology*, **155**, 80–94 (2009)
 50. Wyszynska A., Raczko A., Lis M., Jagusztyn-Krynicka E.K.: Oral immunization of chickens with avirulent *Salmonella* vaccine strain carrying *C. jejuni* 72Dz/92 *cjaA* gene elicits specific humoral immune response associated with protection against challenge with wild-type *Campylobacter*. *Vaccine*, **22**, 1379–1389 (2004)

KONSTRUKCJA SZCZEPIONEK PODJEDNOSTKOWYCH Z WYKORZYSTANIEM KOMÓREK *SALMONELLA ENTERICA* JAKO NOŚNIKA HETEROLOGICZNYCH GENÓW

Paweł Łaniewski¹, Elżbieta Katarzyna Jagusztyn-Krynicka^{1*}

¹Zakład Genetyki Bakterii, Instytut Mikrobiologii, Wydział Biologii, Uniwersytet Warszawski,
ul. Miecznikowa 1, 02-096 Warszawa

Wpłynęło w grudniu 2012 r.

Spis treści: 1. *Salmonella* jako idealny nośnik heterologicznych antygenów. 2. Atenuacja komórek *S. enterica*. 3. Stabilność utrzymania transgeny. 4. Poziom ekspresji transgeny. 5. Lokalizacja antygeny a typ odpowiedzi immunologicznej. 6. Podsumowanie

Subunit vaccine construction using *Salmonella enterica* cells as a carrier of heterologous genes

Abstract: *Salmonella enterica* strains are widely employed as a live delivery vector for subunit vaccine construction. Vaccine strains must be safe but still immunogenic; therefore, it is crucial to obtain a proper balance between the attenuation and the reactogenicity of the constructed strains. *Salmonella* strains used in immunoprophylaxis are mainly constitutively disrupted in genes involved in auxotrophy, virulence or regulation. A novel promising concept of the *Salmonella*-based vaccine design is a regulated delayed attenuation *in vivo* combined with a delayed antigen expression system. Using this approach bacteria display features of a wild-type strain at the time of oral vaccination to effectively colonize the lymphoid tissue and the fully attenuated phenotype after host tissue colonization. Expression of heterologous genes in *Salmonella* cells is mainly achieved by introducing recombinant plasmids harboring gene of interest. Alternatively, a transgene can be integrated into a chromosomal DNA. Diverse strategies were developed to control plasmid maintenance and foreign gene expression. Among them the most frequently used are the balanced-lethal and toxin-antidote systems or operator-repressor titration technology. Overproduction of a recombinant protein often causes a metabolic burden in vaccine cells resulting in the loss of their viability. To overwhelm the problem, the transgene expression is kept under control of an *in vivo* inducible promoter or a promoter which activity is regulated by appropriate small molecules. Alternatively, plasmids with a regulated copy number or a delayed antigen synthesis system have been employed by various research groups. Localization of an antigen in a carrier cell is also critical for the strength and type of immune response. A programmed lysis of carrier cells is used to deliver the antigen to host immune cells. Moreover, *Salmonella* is used to carry DNA vaccines. Here, we review the latest strategies in the design of *Salmonella*-based subunit vaccines.

Contents: 1. *Salmonella* as a perfect carrier of heterologous antigens. 2. Attenuation of *S. enterica* cells. 3. Transgene stability. 4. Transgene expression level. 5. Antigen localization and the type of immune response. 6. Conclusions

Słowa kluczowe: atenuacja, nośnik, *Salmonella*, szczepionka podjednostkowa

Key words: attenuation, carrier, *Salmonella*, subunit vaccine

1. *Salmonella* jako idealny nośnik heterologicznych antygenów

Bakterie *Salmonella enterica* posiadają wiele cech predysponujących je do użycia jako nośnik heterologicznych antygenów w konstrukcji szczepionek podjednostkowych. Mikroorganizmy tego gatunku w zależności od serotypu wywołują u ludzi różne choroby. *S. enterica* sv. Typhi (*S. Typhi*) jest czynnikiem etiologicznym duru brzuszego, natomiast infekcje ludzi *S. enterica* sv. Typhimurium (*S. Typhimurium*) oraz *S. enterica* sv. Enteritidis (*S. Enteritidis*) są często przyczyną tzw. zatruc pokarmowych [53]. Pomimo, iż szczepy *S. enterica* są wysoce wirulentne, wystarczy inaktywacja kilka genów aby uzyskać wystarczająco bezpieczny poziom atenuacji komórek patogenu. Większość narzędzi genetycznych używanych do badań na modelowym organizmie jakim jest *Escherichia coli*, ze względu na bliskie pokrewieństwo obu bakterii, można zastosować także do manipulacji genetycznych komórek *Salmonella*. Szczepionki podjednostkowe skonstruowane w opar-

ciu o atenuowane szczepy *Salmonella* silnie stymulują zarówno odpowiedź humoralną jak i komórkową. Dodatkowo podane drogą doustną lub donosową indukują mechanizmy odpornościowe w błonach śluzowych. Ten łatwy i nie wymagający użycia strzykawek sposób podania szczepionki umożliwia w przypadku zwierząt jednoczesną immunizację całych stad poprzez rozpylenie bakterii lub dodanie ich do wody pitnej. Kluczową kwestią są też niskie koszty produkcji tego typu szczepionek, a także możliwość liofilizacji i przechowywania preparatu w temperaturze pokojowej, co jest niesłychanie istotną zaletą szczepionki w przypadku użycia jej w krajach rozwijających się.

2. Atenuacja komórek *S. enterica*

Obecnie na rynku znajdują się dwa licencjonowane rodzaje szczepionek przeciwko durowi brzuszemu. Tylko jedna z nich – o nazwie handlowej Vivotif® (Berna Biotech AG) – zawiera żywe komórki *S. Typhi* Ty21a.

* Autor korespondencyjny: Zakład Genetyki Bakterii, Instytut Mikrobiologii, Wydział Biologii, Uniwersytet Warszawski, ul. Miecznikowa 1, 02-096 Warszawa; e-mail: kjkryn@biol.uw.edu.pl

Szczep ten został otrzymany w latach 70. ubiegłego wieku w wyniku niespecyficznego chemicznego mutageny wirulentnych komórek szczepu *S. Typhi* Ty2 przy użyciu nitrozoguanidyny [27]. Początkowo został scharakteryzowany jako mutant w genie *galE*, kodującym 4-epimerazę UDP-galaktozową – enzym odpowiedzialny za wytwarzanie pełnego lipopolisacharydu (LPS). Dalsze badania wykazały, że nie produkuje on także antygeny Vi i posiada w genomie ponad 30 innych mutacji odróżniających jego materiał genetyczny od wyjściowego szczepu Ty2 [28, 48]. Szczepionka ta jest dobrze tolerowana i bezpieczna w użyciu. W ciągu 25 lat zaszczepiono nią ponad 200 milionów ludzi i obserwowano stosunkowo niedużą liczbę odczynów poszczepiennych. Jednakże nie jest ona całkowicie skuteczna i w celu zapewnienia długotrwałego efektu ochronnego musi być podawana doustnie co najmniej w 3 dawkach.

Druga dostępna szczepionka – Typhim Vi® (Sanofi Pasteur) – zawiera oczyszczony polisacharyd otoczkowy Vi, który jest charakterystyczny dla serowarów Typhi, Paratyphi C i Dublin [30]. Szczepionka ta podawana jest domięśniowo jednokrotnie, gdyż dawki przypominające, tak jak w przypadku stosowania innych szczepionek polisacharydowych, nie wzmacniały odpowiedzi immunologicznej. Podobnie jak Vivotif® szczepionka ta charakteryzuje się tylko 55–70% skutecznością. Dodatkowo nie wykazuje efektu ochronnego u dzieci poniżej 2 roku życia [42,50]. Ta jej wada zostanie prawdopodobnie w najbliższym czasie przezwyciężona poprzez wprowadzenie na rynek szczepionek zawierających polisacharyd Vi skoniugowany z białkiem nośnikowym tj. nietoksyczną rekombinowaną egzotoksyną *A Pseudomonas aeruginosa* (szczepionka Vi-rEPA) lub nieaktywną toksyną błoniczą CRM₁₉₇ (*cross reacting material*). Szczepionka Vi-CRM₁₉₇, opracowana przez firmę Novartis, zawiera jako białko nośnikowe CRM₁₉₇, aktualnie już licencjonowany do stosowania w szczepionkach dla ludzi preparat, oraz polisacharyd Vi otrzymany ze szczepu *Citrobacter freundii* WR7011. Polisacharyd Vi *C. freundii* jest strukturalnie zbliżony i immunologicznie nierozróżnialny od Vi *S. Typhi* [54, 63, 71, 76].

Rozwój technik inżynierii genetycznej oraz dokładne poznanie mechanizmów patogeny *S. enterica* pozwoliło na skonstruowanie wielu awirulentnych szczepów zawierających w przeciwieństwie do *S. Typhi* Ty21a kilka zdefiniowanych mutacji. Najważniejsze prototypy szczepionek przeciwko durowi brzuszemu będące obecnie w fazie badań klinicznych przedstawiono w Tab. I. Jednocześnie szczepy te są wykorzystywane jako nośniki heterologicznych antygenów m.in. ureazy *Helicobacter pylori* (Ty800) [15], C-terminalnego fragmentu toksyny tężca [69], podjednostki PA83 toksyny węgliką (CVD 908-*htrA*) [21] czy antygenów wirusa HPV (*human papilloma virus*) (Ty21a, CVD 908-*htrA*, Ty800 [18] w celu konstrukcji biwalentnych szczepionek.

Najczęściej wprowadzanymi zmianami w chromosomie powodującymi utratę wirulencji przez komórki *S. enterica*, zarówno *S. Typhi* jak i *S. Typhimurium*, były delekcje następujących genów:

- *pur*, *aro*, *gua* – kodujących białka niezbędne w biosyntezie puryn, aminokwasów aromatycznych i guanidyny (mutacje auksotroficzne);
- *htrA* – kodującym peryplazmatyczną proteazę serynową, indukowaną w warunkach stresowych i niezbędną dla komórek *S. enterica* do przetrwania w makrofagach;
- *ssaV*, *cdt* – kodujących czynniki wirulencji (*ssaV* koduje białko strukturalne budujące aparat sekrecyjny typu III wyspy patogenności SPI-2 a *cdt* białko warunkujące kolonizację głębiej położonych tkanek);
- *phoPQ*, *cya*, *crp*, *fur*, *rpoS*, *rhoE*, *rfaH*, *dam* – kodujących białka regulatorowe, alternatywne czynniki σ , antyterminatory transkrypcji lub metylazy DNA;
- *galE*, *pml*, *rfaH*, *rfc* – kodujących białka niezbędne w biogenezie lipopolisacharydu.

Wprowadzenie wyżej wymienionych mutacji w szczepach *S. enterica* używanych jako nośniki heterologicznych genów powinno zapewniać odpowiedni poziom atenuacji komórek. Ważne jest, aby skonstruowany szczep *Salmonella* był jednocześnie bezpieczny w użyciu tzn. nie wywoływał objawów poszczepiennych nawet u osób z osłabionym układem immunologicznym a jed-

Tabela I
Obecnie badane szczepionki nowej generacji przeciwko durowi brzuszemu

Nazwa	Genotyp	Faza badań	Piśmiennictwo
CVD 908- <i>htrA</i>	<i>S. Typhi</i> Ty2 Δ <i>aroC</i> Δ <i>aroD</i> Δ <i>htrA</i>	II	[70]
CVD 909 (HoloVax-Typhoid®)	<i>S. Typhi</i> Ty2 Δ <i>aroC</i> Δ <i>aroD</i> Δ <i>htrA</i> P _{tac} <i>viaB</i> (produkujący konstytutywnie antygen Vi)*	II	[70]
M01ZH09	<i>S. Typhi</i> Ty2 Δ <i>aroC</i> Δ <i>ssaV</i>	II	[44, 75]
Ty800	<i>S. Typhi</i> Ty2 Δ <i>phoPQ</i>	I	[31]

* Geny kodujące antygen Vi znajdują pod kontrolą ściśle regulowanego promotora. Ich ekspresja jest indukowana jedynie w środowisku zewnątrzkomórkowym, natomiast gdy komórki *Salmonella* znajdują się wewnątrz makrofagów i komórek dendrytycznych geny kodujące białka niezbędne do produkcji antygeny Vi nie są wyrażane. W celu stymulacji odpowiedzi immunologicznej wobec antygeny Vi, w szczepie CVD 909 *viaB* sklonowano pod kontrolą konstytutywnego promotora *tac*.

nocześnie był silnie immunogeny w celu zapewnienia długotrwałego efektu ochronnego (najlepiej po zażyciu już jednej dawki preparatu). Przykładem nieprawidłowego zbalansowania poziomu atenuacji i immunogenności jest aktualnie używany jako szczepionka przeciwko durowi brzuszemu szczep *S. Typhi* Ty21. Jego niska skuteczność prawdopodobnie wynika z nadatenuacji, braku aktywnego genu *rpoS* kodującego jeden z alternatywnych czynników σ polimerazy RNA. Z drugiej strony szczepy zawierające unieczynnione pojedyncze geny lub szlaki metaboliczne niezbędne do infekcji komórek gospodarza mogą wykazywać nadal zbyt wysoki poziom wirulencji. Szczep CVD 908 skonstruowano mutując wirulentne komórki *S. Typhi* Ty2 w genach *aroC* i *aroD*, których produkty są niezbędne do biosyntezy aminokwasów aromatycznych [70]. W rezultacie szczep ten nie namnaża się wewnątrz komórek eukariotycznych, jednak jest w stanie przetrwać wewnątrz ich na tyle długo, aby zaindukować silną odpowiedź immunologiczną. Badania kliniczne na ludzkich ochotnikach wykazały, że szczep CVD 908 rzeczywiście indukuje wysoki poziom przeciwciał anty-LPS klasy IgG w surowicy jak i stymuluje powstawanie limfocytów B produkujących przeciwciała anty-LPS klasy IgA już po zażyciu pojedynczej dawki. Jednak szczepionka była dobrze tolerowana przez pacjentów tylko w przypadku doustnego podania pojedynczej dawki zawierającej 5×10^4 lub 5×10^5 CFU. Podanie wyższych dawek powodowało u pacjentów asymptomatyczną poszczepienną bakteremię. Okazało się, że dopiero wprowadzenie dodatkowej mutacji w genie *htrA*, zwiększającej wrażliwość komórek *Salmonella* na stres oksydacyjny, pozwoliło na osiągnięcie odpowiedniego poziomu atenuacji. Badania wykazały, że w ten sposób skonstruowany szczep CVD 908-*htrA* w porównaniu do poprzedniego nadal jest silnie immunogeny i nie jest odnajdywany we krwi pacjentów, nawet przy zastosowaniu wysokich dawek preparatu (tj. 5×10^9 CFU). Przykład ten ilustruje jak ważne jest w konstrukcji awirulentnych szczepów *Salmonella* odpowiednie zbilansowanie poziomu atenuacji i immunogenności komórek. Jedną z przyczyn utrudniających otrzymanie odpowiednio atenuowanych i wysoce immunogennych szczepów *S. Typhi* jest brak modelu zwierzęcego do badań, ze względu na silny tropizm gatunkowy *S. Typhi*. *S. Typhi* jest patogenem wyłącznie ludzi. Początkowe badania oceniające atenuację i immunogenność zmienionych genetycznie szczepów *Salmonella* przeprowadzane są z wykorzystaniem *S. Typhimurium* na modelu mysim. Infekcja myszy *S. Typhimurium* wywołuje u tych zwierząt objawy chorobowe podobne do ludzkiego duru brzuszego. Jednak w większości przypadków wprowadzenie identycznych mutacji do genomu *S. Typhi* skutkuje niecałkowitą ich atenuacją i niemożliwym do zaakceptowania poziomem reaktogenności lub też ich nadatenuacją. Trzeba

pamiętać, że u ludzi te dwa serotypy charakteryzują się innym przebiegiem infekcji, zakażenie *S. Typhi* wywołuje ogólnoustrojową infekcję, a zakażenie *S. Typhimurium* infekcję lokalną ze stanem zapalnym. Jednym z przykładów są podane wyżej badania dotyczące serii szczepów *S. Typhi* CVD, innym badania mające na celu skonstruowanie szczepów *S. Typhi* RASTyV (*recombinant attenuated S. Typhi vaccine*). W tym drugim przypadku wprowadzenie na plazmidzie genu *rpoS*, który był nieaktywny w wyjściowym szczepie *S. Typhi* Ty2 w znaczący sposób zwiększyło skuteczność immunizacji [66]. Należy też wnikliwie przeanalizować fenotypy szczepów wyjściowych stosowanych do otrzymania wersji atenuowanych. Znaczące różnice w genomach występujące nie tylko pomiędzy różnymi serotypami, ale także pomiędzy szczepami tych samych serotypów *Salmonella*, skutkują różnym rodzajem i różnym poziomem odpowiedzi immunologicznej [10, 66].

Optymalnie atenuowane szczepy *S. Typhi* lub *S. Typhimurium* wykorzystane jako nośniki heterologicznych antygenów mogą nie funkcjonować idealnie z powodu zaburzenia metabolizmu komórek nośnika związanego z ekspresją transgeny. W wyniku nadprodukcji heterologicznego białka komórki *Salmonella* stają się często nadatenuowane i zbyt słabo immunogenne. Nowatorskim rozwiązaniem tego problemu jest wykorzystanie strategii „regulowanej opóźnionej atenuacji *in vivo*” (*regulated delayed attenuation in vivo*) [12]. Klasyczna konstrukcja awirulentnych szczepów *Salmonella* polegała na ich konstytutywnej atenuacji, nowa metoda opiera się zaś na warunkowej atenuacji. Szczep skonstruowany według tej metody w momencie przygotowania preparatu i szczepienia posiada dziki fenotyp, dzięki czemu nie ma obniżonego potencjału kolonizacyjnego i potrafi spenetrować głębokie warstwy tkanki GALT oraz odpowiednie narządy limfatyczne immunizowanego gospodarza. Dopiero w momencie oddziaływania z komórkami prezentującymi antygen (tj. makrofagami czy komórkami dendrytycznymi) komórki *Salmonella* ulegają atenuacji.

Konstrukcję szczepu o opóźnionej atenuacji można osiągnąć na kilka sposobów. Jednym z nich jest delecja genu *pmi*, kodującego izomerazę mannozo-6-fosforanową [13]. Enzym ten, katalizujący reakcję konwersji fruktozo-6-fosforanu do mannozo-5-fosforanu, jest niezbędny do syntezy pełnego antygeny O lipopolisacharydu. Komórki mutanty w genie *pmi* hodowane w obecności mannozy syntetyzują pełen LPS (*smooth LPS*), jednak po skolonizowaniu tkanek gospodarza po 7–8 podziałach tracą antygen O, stając się bardziej podatne na fagocytozę i działanie układu dopełniacza. W celu zapewnienia wykorzystania mannozy przez komórki podczas hodowli *in vitro* tylko do syntezy LPS dodatkowo zinktywowano geny *gmd-fcl*. Produkty tych genów umożliwiają przekształcenie GDP-mannozy

w GDP-fukozę i syntezę polisacharydowego kwasu kolonowego (*colanic acid*). Wykazano, że mutacja obniża także zdolność do tworzenia biofilmu i kolonizację powierzchni kamieni żółciowych, jednak nie ma wpływu na immunogenność szczepu.

Inną strategią uzyskania opóźnionej atenuacji jest konstrukcja warunkowych mutantów z użyciem kasyety *araC* P_{BAD} zawierającej regulator i promotor arabinozowy [12]. Delecja w chromosomie nukleotydowej sekwencji promotorowej wybranego genu lub genów i zastąpienie jej kasetą arabinozową skutkuje transkrypcją genu/ów tylko w obecności arabinozy. Po skolonizowaniu tkanek gospodarza, ekspresja tychże genów ze względu na brak induktora, zostaje zahamowana.

Badania z użyciem szczepu *S. Typhimurium* o opóźnionej atenuacji produkującego antygen PspA *Streptococcus pneumoniae* na modelu mysim wykazały, że kolonizuje on wątrobę i śledzionę z 10-krotnie wyższą częstością niż szczepy atenuowane w standardowy sposób [51]. Użyty w tych badaniach szczep zawierał wiele zmian w chromosomie, a jego opóźniona atenuacja wynikała z delecji genu *pmi* oraz wprowadzeniu kaset arabinozowych powyżej genów *fur* lub *i crp*, kodujące istotne dla wirulencji białka regulatorowe. Immunizacja myszy szczepem o opóźnionej atenuacji indukowała wyższy poziom specyficznych przeciwciał anty-PspA klasy IgG oraz wyższy poziom cytokin charakterystycznych zarówno dla odpowiedzi immunologicznej typu Th1 jak i Th2 tj. IFN- γ i IL-4. Co więcej jego zastosowanie prowadziło do podwyższenia skuteczności szczepionki z 21% aż do 71–86% (odsetek przeżycia myszy zakażanych wirulentnym szczepem *S. pneumoniae*). Wyniki eksperymentu potwierdziły, że rodzaj atenuacji szczepu nośnikowego ma ogromny wpływ na immunogenność heterologicznego antygeny.

3. Stabilność utrzymania transgeny

Najczęstszym narzędziem wykorzystywanym do ekspresji heterologicznych genów w komórkach bakteryjnych są rekombinowane plazmidy. W celu zapewnienia ich stabilnego utrzymania w komórce w warunkach *in vitro* stosuje się antybiotykową presję selekcyjną. Jednakże w trakcie immunizacji w warunkach *in vivo* plazmid może być spontanicznie tracony, ponieważ ekspresja heterologicznego genu zlokalizowanego na plazmidzie stanowi spore obciążenie metaboliczne dla komórek nośnikowych. Komórki w środowisku pozbawionym presji selekcyjnej mogą utracić plazmid i zdobyć przewagę w populacji, co niewątpliwie drastycznie obniżałoby efektywność immunizacji. Ze względów bezpieczeństwa odpowiednie agencje wprowadziły także regulacje zabraniające używania kaset niosących geny warunkujące antybiotykooporność w konstruk-

cji szczepionek przeznaczonych dla ludzi lub zwierząt. Dodatkowo stosowane do konstrukcji szczepów szczepionkowych rekombinowane plazmidy powinny być niekonjugacyjne, niemobilizowane i charakteryzować się wąskim zakresem gospodarza. Uniemożliwia to przeniesienie transgeny do innych bakterii na drodze horyzontalnego transferu genów.

W celu stabilnego utrzymywania plazmidów w komórkach *Salmonella* bez konieczności stosowania antybiotykowej presji selekcyjnej skonstruowano tzw. „*balanced-lethal host-vector system*” lub „*conditional-lethal system*”. W układach tych szczep nośnikowy zawiera chromosomową delecję genu metabolizmu podstawowego (*house-keeping gene*). Mutacja (najczęściej warunkująca auksotrofizm) jest komplementowana przez funkcjonalny allel genu zlokalizowany na rekombinowanym plazmidzie; tak więc, do przeżycia komórek niezbędne jest posiadanie plazmidowej kopii genu. Komórki, który utracą plazmid są eliminowane z populacji w wyniku zaburzenia prawidłowego metabolizmu. Jednym z genów wykorzystanych z powodzeniem w konstrukcji takiego układu jest gen *asd*, kodujący dehydrogenazę semialdehydu asparaginianowego – enzymu niezbędnego do biosyntezy m.in. kwasu diaminopimelinowego, składnika peptydoglikanu [11]. Plazmidy zawierające sklonowany i zoptymalizowany pod kątem poziomu ekspresji gen *asd* wykorzystano z powodzeniem do produkcji w komórkach *S. Typhimurium* m.in. antygenów PspA i PsaA *S. pneumoniae* [40, 80], PsaA i LcrV *Yersinia pestis* [4, 72, 73], CjaA *Campylobacter jejuni* [84] czy też ESAT-6 i CFP-10 *Mycobacterium tuberculosis* [38].

Inne geny wykorzystane do konstrukcji tego typu systemu to m.in. *dadB* i *murA* kodujące także enzymy niezbędne do syntezy peptydoglikanu, odpowiednio racemazę alaninową i transferazę enoilopirogronianową [78], *thyA*, kodujący syntezę tymidylanową niezbędną w biosyntezie tymidyny [3] czy też *ssb* (*single-stranded binding protein*) kodujący białko biorące udział w procesach replikacji, rekombinacji i naprawy DNA [22].

Inną strategią mającą na celu zapobieganie utracie plazmidów jest wykorzystanie występującego naturalnie w komórkach bakteryjnych mechanizmu posegregacyjnej eliminacji bezplazmidowych komórek (*post-segregational killing system*) *hok-sok* [20]. Ten system addycyjny zwany systemem „trucizna-antidotum” składa się z trzech genów: *hok* (*host killing*), *mok* (*mediation of killing*) i *sok* (*suppression of killing*). W komórkach zawierających plazmid transkrypcji ulegają gen *hok*, kodujący białko o toksycznych dla komórki właściwościach (trucizna) jak i gen *sok*, kodujący krótki antysensowny RNA (antidotum). Oddziaływanie RNA *sok* z transkryptem mRNA zachodzących na siebie genów *mok-hok* prowadzi do degradacji powstałej dwuniciowej struktury przez RNazę III, co uniemożliwi produkcję toksyny. W przypadku utraty przez komórkę plazmidu zawiera

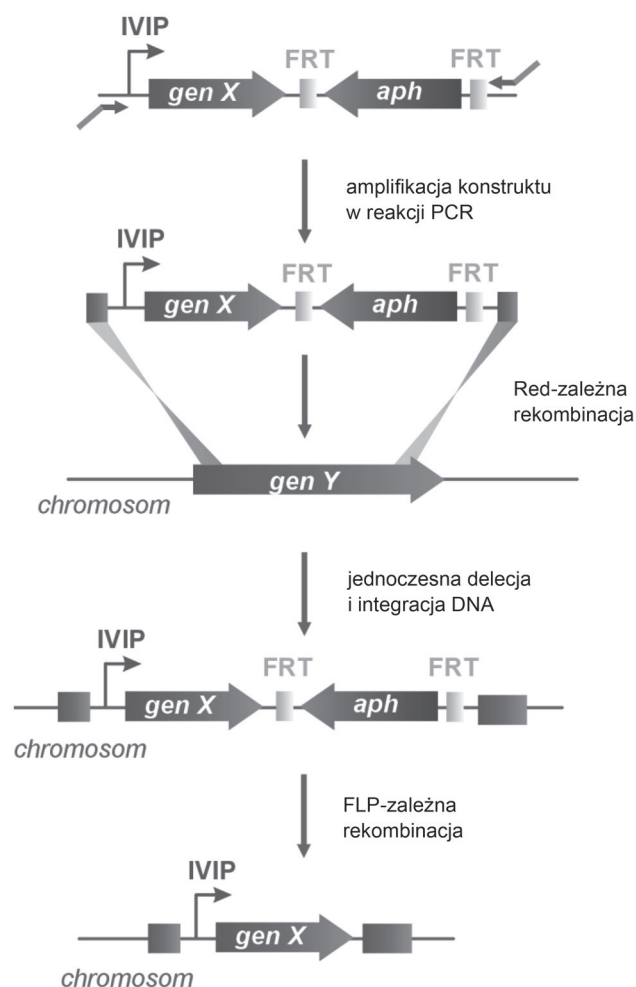
ona otrzymane w wyniku podziału zarówno cząsteczki mRNA trucizny jak i antidotum. Antysensowny RNA *sok* w przeciwieństwie do mRNA *mok-hok* jest mniej stabilny i szybciej ulega degradacji. W ten sposób w komórce gen *hok* ulega transkrypcji, syntetyzowana toksyna depolaryzuje błonę cytoplazmatyczną, co prowadzi do śmierci komórki [26]. System ten wykorzystano m.in. w badaniach przedklinicznych do stabilnego utrzymywania przez komórki *S. Typhi* CVD 908-*htrA* plazmidu kodującego podjednostkę toksyny węgla PA83 w fuzji z białkiem ClyA [19].

Ciekawym rozwiązaniem jest także strategia utrzymywania plazmidów opierająca się na oddziaływaniu sekwencji operatorowych *lacO* z represorem LacI tzw. ORT („operator-repressor titration technology”) [24]. W celu jej zastosowania niezbędna była konstrukcja szczepu *S. Typhimurium* zawierającego zlokalizowany na chromosomie gen metabolizmu podstawowego tj. *dapD*, kodujący enzym niezbędny do syntezy lizyny, pod kontrolą promotora laktozowego. Wprowadzenie do komórek rekombinowanego plazmidu zawierającego sekwencje operatora *lacO* powoduje wysycenie represora LacI, co umożliwia syntezę białka niezbędnego do przeżycia komórek. W przypadku utraty plazmidu, nadmiar produkowanego represora LacI blokuje syntezę białka DapD, co prowadzi do śmierci komórki. System ten został wykorzystany do konstrukcji szczepu *S. Typhimurium* produkującego antygen F1 *Y. pestis* [25]. Badanie na modelu mysim wykazało stabilne utrzymanie plazmidu, co przyczyniło się do uzyskania efekt protekcyjnego po jednokrotnym szczepieniu zwierząt. Ostatnio technologię tą z powodzeniem wykorzystano także do konstrukcji prototypu szczepionki DNA przeciwko prątkom gruźlicy [33]. Za pomocą mikroskopii immunofluorescencyjnej wykazano skuteczność systemu ORT w dostarczaniu heterologicznego DNA (tj. genu *mpt64 M. tuberculosis*) do wnętrza mysich makrofagów.

Alternatywnym sposobem utrzymywania transgeny w komórkach *Salmonella* jest integracja heterologicznego DNA do chromosomu szczepu nośnikowego. Niewątpliwą zaletą tej strategii jest możliwość jednoczesnej inaktywacji genu prowadzącej do atenuacji szczepu nośnikowego wraz z wprowadzeniem kasety ekspresyjnej. Integracja do DNA zapewnia wysoką stabilność utrzymania transgeny, gdyż geny zlokalizowane na chromosomie bardzo rzadko ulegają spontanicznym delecjom.

Do niedawna ta genetycznie skomplikowana metoda, opierająca się głównie na rekombinacji homologicznej Rec, wymagała przeprowadzenia wielu manipulacji *in vitro* oraz stosowania kaset niosących geny warunkujące antybiotykooporność. Opracowanie nowego narzędzia do konstrukcji mutantów wykorzystującego rekombinazę Red faga λ (*recombineering*) niewątpliwie ułatwi i przyspieszy konstrukcję szczepów zawierających

zintegrowany z chromosomem heterologiczny DNA [35]. System z użyciem fagowej rekombinazy pozwala na efektywniejsze i bardziej precyzyjne manipulowanie materiałem genetycznym *Salmonella*. W przeciwieństwie do bakteryjnego systemu rekombinacji Rec wymaga on jedynie krótkich nukleotydowych sekwencji homologicznych (30–50 pz). Daje też możliwość usunięcia kasety „antybiotykooporności” po selekcji mutantów, co jest istotnym elementem w konstrukcji szczepów szczepionkowych. Usunięcie niepożądanego nukleotydowego sekwencji DNA jest możliwe, dzięki wykorzystaniu aktywności enzymatycznej rekombinazy specyficznej co do miejsca FLP (tzw. flipazy) wycinającej dowolną nukleotydową sekwencję położoną między dwoma sekwencjami FRT (*FLP recombinase target*) o zgodnej orientacji. Użycie w konstrukcji mutantów kasety „antybiotykoopornościowej” oflankowanej sekwencjami FRT pozwala na jej skuteczne usunięcie za pomocą rekombinazy FLP. Poszczególne etapy opisanej wyżej metody integracji transgeny do chromosomowego DNA przedstawia Rys. 1.



Rys. 1. Mechanizm integracji heterologicznego DNA do chromosomu *Salmonella* za pomocą systemu rekombinacji Red faga λ.

Opis w tekście. Objaśnienia: IVIP – promotor indukowalny *in vivo*; FLP – rekombinaza specyficzna co do miejsca (flipaza); FRT – sekwencja rozpoznawana przez flipazę; *aph* – gen oporności na kanamycynę.

Ze względu na fakt, iż w ten sposób wprowadzony gen posiada tylko jedną kopię w komórce ważne jest zapewnienie optymalnej produkcji heterologicznego białka w celu uzyskania odpowiedniej immunogenności [34].

4. Poziom ekspresji transgenu

Jak wspomniano wcześniej konstytutywna produkcja antygeny najczęściej z wysokokopijnego plazmidu powoduje zaburzenie metabolizmu komórki nośnika, co wpływa na infekcyjność szczepu *in vivo* i może prowadzić do obniżenia skuteczności immunizacji.

Jedną ze strategii ograniczającą ekspresję heterologicznych genów jest użycie promotorów indukowalnych *in vivo* – IVIP (*in vivo inducible promoter*) (Rys. 2). W tym przypadku antygen jest syntetyzowany przez komórki nośnika tylko w momencie oddziaływania z komórkami APC układu immunologicznego gospodarza. Do tej pory zastosowano promotory następujących genów *S. enterica* tj. *nirB*, *dmsA*, *pagC*, *spv*, *dps*, *phoP*, *ompC*, *htrA*, *groE*, *katG*, *sseA* czy *ssaG* [7].

Jednymi z najczęściej używanymi w konstrukcji szczepionek są promotory genów *pagC* i *ssaG*. Gen *pagC* koduje białko zlokalizowane w błonie zewnętrznej istotne dla komórek *S. enterica* do przetrwania wewnątrz makrofagów [55]. Natomiast białko SsaG stanowi składnik aparatu transportu typu III, kodowanego przez geny zlokalizowane na wyspie patogenności SPI-2. Promotory *pagC* i *ssaG* z powodzeniem wykorzystano do ekspresji heterologicznych genów, gdyż ulegają one indukcji w makrofagach, a w warunkach *in vitro* wykazują niski poziom ekspresji.

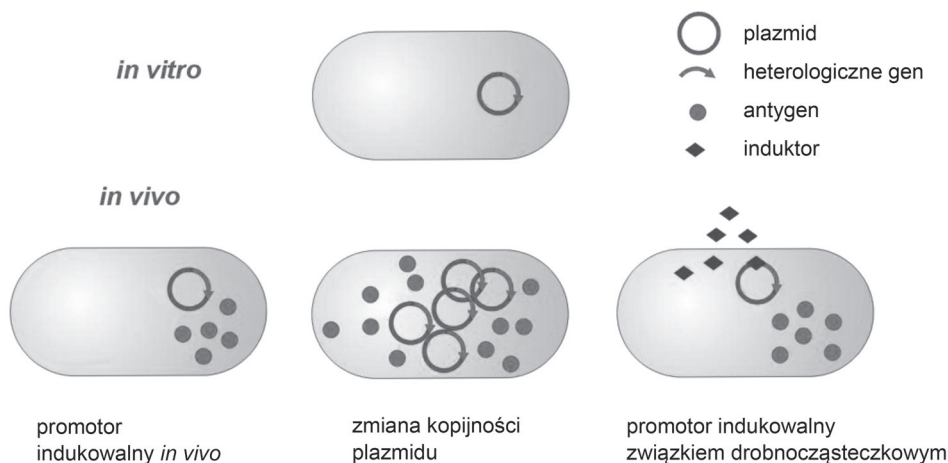
Wpływ indukcji produkcji antygeny tylko w warunkach *in vivo* na efektywność immunizacji badano z udziałem różnych promotorów wielokrotnie. Porównywano m.in. dwa regulowane przez białko FNR (*fuma-*

rate nitrate reduction) promotory *nirB* i *dmsA* użyte do ekspresji DNA kodującego C-fragment toksyny tężca [56]; promotor *nirB* i *htrA* zastosowane do ekspresji DNA kodującego C-fragment toksyny tężca [62]; promotor *nirB* ze sztucznie skonstruowanym podwójnym promotorem *nirB*-T7 użytym do ekspresji fuzji antygeny *Streptococcus mutans* z podjednostką B toksyny LT *E. coli* [64]; promotory *pagC* i *nirB* zastosowane do ekspresji epitopów białek wirusa TGEV (*transmissible gastroenteritis virus*) [9]. W większości przypadków ich zastosowanie zwiększa poziom odpowiedzi immunologicznej w stosunku do zastosowania promotorów aktywnych konstytutywnie, choć decyzja wyboru IVIP do kontroli konkretnego antygeny w konkretnym szczepie nośnikowym winna być dobrana eksperymentalnie.

Synteza owoalbuminy przez komórki *S. Typhimurium* Δ *sseC* (*SseC* – składnik kompleksu aparatu sekrecyjnego typu III SPI-2) w warunkach *in vivo*, wynikająca ze sklonowania heterologicznego genu na plazmidzie pod kontrolą promotora *sseA* (*SseA* – białko opiekuńcze systemu sekrecji typu III SPI-2), w porównaniu do konstytutywnej syntezy białka indukowała u myszy wyższy poziom specyficznych przeciwciał zarówno klasy IgG jak i IgA, ale także silniej stymulowała odpowiedź komórkową. Zastosowanie analogicznej produkcji antygeny p60 *Listeria monocytogenes* w tychże komórkach zapewniała wyższy poziom protekcji [35].

B u m a n n (2001) [cyt. wg. 7] wykazał zaś, że zarówno konstytutywna jak i regulowana (za pomocą promotora genu *pagC*) produkcja owoalbuminy przez komórki *S. Typhimurium* Δ *aroA* stymuluje u myszy podobny poziom odpowiedzi immunologicznej związany z limfocytami Th CD4⁺. Jednakże w przypadku produkcji białka z wykorzystaniem IVIP do stymulacji podobnego poziomu odpowiedzi komórkowej potrzebna była 1000-krotnie niższa dawka bakterii.

W przypadku transgenów zlokalizowanych na chromosomie zastosowanie konstytutywnych silnych pro-



Rys. 2. Strategie indukcji ekspresji heterologicznych genów w warunkach *in vivo* poprzez zastosowanie promotorów indukowalnych *in vivo*, zmiany kopijności plazmidu *in vivo* lub użycie odpowiedniego induktora ekspresji genu

motorów ma na celu zapewnienie wystarczającej ilości antygeny do stymulacji reakcji odpornościowej. Badania wykazały jednak, że i w tym przypadku zastosowanie promotorów indukowanych *in vivo* prowadzi do uzyskania lepszych rezultatów [32]. Pod kontrolą promotora genu *ssaG* sklonowano gen *eltB*, kodujący podjednostkę B toksyny LT enterotoksycznego szczepu *E. coli* (ETEC) [68]. Kasetę ekspresyjną wprowadzono do chromosomu szczepu *S. Typhi* M01ZH09. Wykazano, że ekspresja genu *eltB* w komórkach nośnika, które uległy fagocytozie przez ludzkie komórki U937 wzrasta aż 500-krotnie w porównaniu do poziomu jego ekspresji w komórkach *S. Typhi* hodowanych na sztucznej pożywce. Badanie poziomu odpowiedzi immunologicznej myszy immunizowanych donosowo pojedynczą dawką szczepionki wykazało indukcję specyficznych przeciwciał IgG jedynie w przypadku antygeny produkowanego *in vivo*. Jako kontrolę użyto szczepu produkującego antygen w sposób konstytutywny (gen *eltB* pod kontrolą promotora *tac*). Eksperyment ten dowodzi słuszności hipotezy mówiącej, że nie ilość produkowanego antygeny a odpowiedni czas jego produkcji i lokalizacja jest czynnikiem krytycznym w uzyskaniu odpowiedzi immunologicznej.

Indukcję ekspresji heterologicznego genu można także osiągnąć poprzez zastosowanie strategii opierającej się na kontrolowaniu liczby kopii cząsteczek plazmidu w komórce nośnika [52]. W tym celu stosuje się wektor ekspresyjny posiadający dwa różne systemy replikacji zapewniające różną liczbę jego kopii. W warunkach *in vitro* plazmid replikuje się dzięki konstytutywnemu systemowi replikacji warunkującemu jedną lub niewielką liczbę kopii w komórce. Sklonowanie genu kodującego białko inicjacyjne drugiego systemu replikacji pod kontrolą indukowalnego *in vivo* promotora umożliwia zwiększenie liczby kopii plazmidu, co skutkuje nadprodukcją heterologicznego białka w warunkach *in vivo* (Rys. 2). Dodatkowo sklonowanie heterologicznego genu na plazmidzie także pod kontrolą indukowalnego *in vivo* promotora może spotęgować zamierzony efekt.

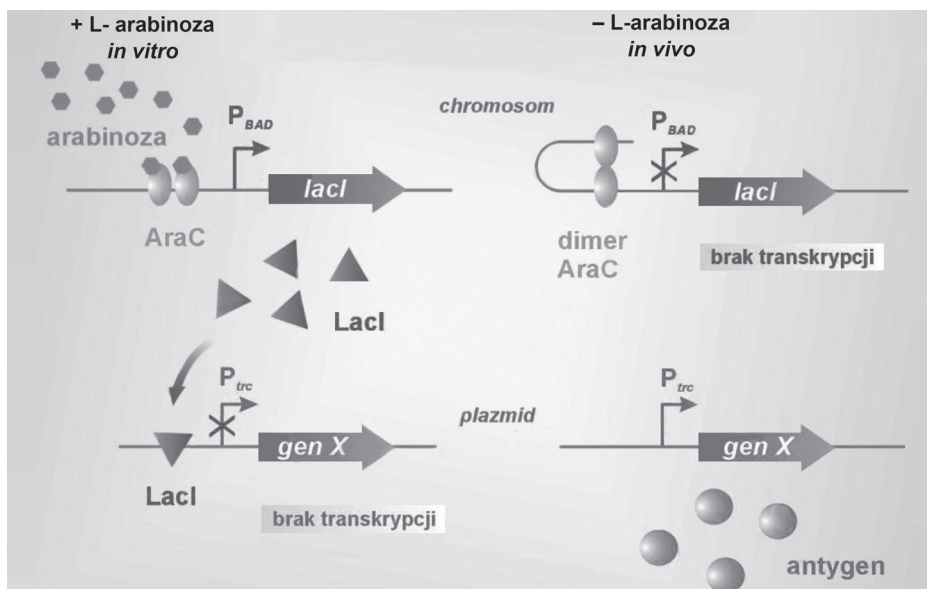
Podobną strategię zwaną także „*runaway-like replication*”, opartą na bardziej skomplikowanym mechanizmie regulacji kopijności plazmidu, zastosowano do nadprodukcji przez komórki *S. Typhimurium* w warunkach *in vivo* antygeny LcrV *Y. pestis* [74]. Immunizacja myszy skonstruowanym szczepem indukowała u zwierząt silną odpowiedź odpornościową zarówno typu Th1 jak i Th2, co chroniło je w eksperymencie protekcyjnym przed letalną dawką *Y. pestis*.

Inną metodą mającą na celu indukcję ekspresji heterologicznych genów w komórkach *Salmonella* w odpowiednim momencie infekcji jest zastosowanie promotorów ściśle regulowanych przez drobnocząsteczkowe substancje (Rys. 2) [52]. Jednym z promotorów, który umożliwia „zdalne sterowanie” ekspresją genów jest promotor arabinozowy. Wprowadzenie kasety zawierającej

gen kodujący białko regulatorowe oraz promotor (*araC* P_{BAD}) powyżej heterologicznego genu pozwala na kontrolowanie produkcji antygeny za pomocą induktora tj. arabinozy. W identyczny sposób można także sterować liczbą kopii cząsteczek plazmidu.

Alternatywną strategią do stosowania indukowalnych *in vivo* promotorów genów *Salmonella* jest zastosowaniem systemu RDAS (*regulated delayed antigen synthesis*) polegającego na opóźnionej produkcji antygeny [79]. W układzie tym heterologiczny gen zlokalizowany na plazmidzie klonowany jest pod kontrolą promotora *trc*. Promotor ten zapewnia wysoki poziom ekspresji i jest ściśle regulowany przez represor LacI. Gen kodujący białko regulatorowe zlokalizowany na chromosomie znajduje się poniżej kasety arabinozowej (*araC* P_{BAD}). W warunkach *in vitro* bakterie hodowane w obecności arabinozy produkują represor LacI, który hamuje ekspresję heterologicznego genu. Natomiast w warunkach *in vivo*, w uodparnianym organizmie, gdzie bakterie nie mają dostępu do arabinozy, ekspresja genu *lacI* zostaje zablokowana. Stężenie represora w komórkach zmniejsza się z każdym podziałem, co powoduje stopniową indukcję syntezy heterologicznego antygeny. Schemat działania systemu RDAS przedstawia Rys. 3. W celu poprawy kontroli produkcji antygeny w komórkach nośnika, natywny gen *lacI* poddano różnym modyfikacjom genetycznym m.in. zmieniono jego kodon inicjacyjny, sekwencję RBS oraz zoptymalizowano niektóre kodony biorąc pod uwagę ich używalność w komórkach rodzaju *Salmonella*. Zmiany te przyczyniły się do ściślej-szej represji heterologicznego genu w warunkach *in vitro* i wyższej indukcji jego ekspresji w warunkach *in vivo*. Badanie na modelu mysim przy użyciu antygeny PspA *S. pneumoniae* wykazały wyższą skuteczność szczepu *S. Typhimurium* produkującej antygen z opóźnieniem od szczepu produkującego go w sposób konstytutywny.

Ostatnio porównano także skuteczność działania systemu RDAS z układami stosującymi promotory indukowalne *in vivo* [81]. W tym celu skonstruowane zostały trzy plazmidy zawierające gen *pspA* *S. pneumoniae* pod kontrolą różnych promotorów: *trc*, *pagC* i *ssaG*. Wektory wprowadzono do komórek *S. Typhimurium* produkujących i nieprodukujących represor LacI, a następnie immunizowano nimi myszy. Przeprowadzona analiza wykazała, że szczep *S. Typhimurium* z systemem RDAS indukuje u szczepionych zwierząt najwyższy poziom specyficznych przeciwciał klasy IgA i IgG rozpoznających antygen PspA. Uzyskana po immunizacji zwierząt odpowiedź humoralna była aż 100-krotnie wyższa od odpowiedzi immunologicznej uzyskanej w przypadku zastosowania do ekspresji genu *pspA* promotora *ssaG*. Poziom protekcji uodparnianych myszy po zakażeniu wirulentnym szczepem *S. pneumoniae* był porównywalny w przypadku użycia jako nośnika genu *pspA* *S. Typhimurium* RDAS i *S. Typhimurium* wyrażającej



Rys. 3. Schemat działania systemu opóźnionej produkcji antygeny (RDAS) w komórkach *Salmonella*.

W warunkach *in vitro* w podłożu uzupełnionym arabiniozą gen *lacI*, sklonowany pod kontrolą promotora *BAD* ulega ekspresji a produkowany represor LacI blokuje transkrypcję genu *x* sklonowanego pod kontrolą promotora *trc*. W warunkach *in vivo* przy braku arabiniozy dimer białka regulatorowego AraC uniemożliwia produkcję represora LacI co skutkuje ekspresją genu kodującego antygen.

PspA z promotora genu *pagC* w przeciwieństwie do użycia do ekspresji transgeny promotora genu *ssaG*. Zaobserwowane w tym eksperymencie różnice w produkcji heterologicznego antygeny z dwóch różnych indukowalnych *in vivo* promotorów mogą być spowodowane różnymi mechanizmami regulacyjnymi. Aktywność obu promotorów P_{pagC} i P_{ssaG} jest regulowana przez układ dwuskładnikowy PhoP-PhoQ, tak więc żaden z tych promotorów nie może być zastosowany do ekspresji heterologicznego genu w zczepie atenuowanym przez unieczynnienie genów kodujących białka tego układu dwuskładnikowego. Promotor P_{ssaG} jest dodatkowo regulowany przez mechanizmy warunkujące ekspresję genów wyspy patogenności SPI-2 jak np. układ dwuskładnikowy SsrA-SsrB, co może wpływać na skuteczność działania prototypu szczepionki. W tych eksperymentach wykazano, że system RDAS może być alternatywnym, do zastosowania promotorów indukowalnych *in vivo*, sposobem wzmocnienia immunogenności szczepionek opartych na żywych komórkach *Salmonella*. Jego zaletą jest zastosowanie mechanizmów regulatorowych „obcych” dla komórek rodzaju *Salmonella* i niezależnych od metodyki użytej do atenuacji szczepu nośnikowego.

5. Lokalizacja antygeny a typ odpowiedzi immunologicznej

Odpowiednia lokalizacja antygeny produkowanego w komórkach nośnikowych *Salmonella* jest istotna z kilku powodów. Heterologiczne białka w cytoplazmie, zwłaszcza ulegające nadprodukcji, mogą być toksyczne

dla komórek nośnikowych lub też mogą przyczynić się do obniżenia ich immunogenności. Białko o lokalizacji cytoplazmatycznej będzie dostępne dla komórek układu immunologicznego gospodarza dopiero po lizie komórek nośnika. Heterologiczne białka wybrane do konstrukcji szczepionek podjednostkowych to często białka zewnątrzkomórkowe, stąd ich lokalizacja w redukującym środowisku cytozolu może prowadzić do uzyskania nieprawidłowej konformacji. Ze względu na fakt, że wiele determinant antygenowych to epitopy konformacyjne, może się to przyczynić do braku indukcji specyficznych przeciwciał. Dodatkowo udokumentowano, że za pomocą różnych lokalizacji antygeny w komórkach *Salmonella* możliwe jest wzmocnienie i odpowiednie ukierunkowanie odpowiedzi immunologiczną gospodarza. Do tej pory opracowano bardzo wiele technologii mających na celu „wysyłanie” heterologicznych białek do peryplazmy, na powierzchnię komórek nośnika lub do otaczającego środowiska.

K a n g i wsp. [40] wykorzystali do sekrecji antygeny PspA *S. pneumoniae* sekwencję sygnałną β -laktamazy (Bla) *E. coli*. Badania wykazały że fuzyjne białko Bla_{ss}-PspA wydzielane do peryplazmy i na zewnątrz komórek *S. Typhimurium* indukuje aż 10 000-krotnie wyższą specyficzną odpowiedź humoralną w porównaniu do białka produkowanego na terenie cytoplazmy [39]. Immunizacji myszy skonstruowanym szczepem *S. Typhimurium* o opóźnionej atenuacji, wydzielającym antygen PspA przy użyciu sekwencji sygnałnej Bla, efektywnie chroniła zwierzęta przed zakażeniem *S. pneumoniae* [51].

Do sekrecji heterologicznych białek do peryplazmy komórek *Salmonella* używano także sekwencji syg-

nalnych białek MalE i PhoA, a do ich prezentacji na powierzchni komórek nośnika fuzji translacyjnych z białkami OmpA, Lpp, LamB, a także fimbrii i autoporterów AIDA i MisL [7]. Produkowane w komórkach szczepu nośnikowego antygeny pobudzają głównie odpowiedź humoralną poprzez prezentację antygenów limfocytom CD4⁺ przez MHC klasy II.

W konstrukcji szczepionek podjednostkowych wykorzystywane są także pęcherzyki zewnątrzkomórkowe OMV (*outer membrane vesicle*). OMV, będące naturalnymi proteoliposomami, produkowane są przez wiele gatunków mikroorganizmów, głównie gramujemnych, w różnych fazach wzrostu. Ich liczba wzrasta znacząco w warunkach stresowych. Zawierają głównie białka osłon komórkowych i białka peryplazmatyczne, w tym także czynniki wirulencji. Mechanizm segregacji białek do OMV nie został jak dotąd dokładnie wyjaśniony [16]. OMV mają zdolność do interakcji zarówno z komórkami prokariotycznymi jak i eukariotycznymi, są więc wykorzystywane do produkcji szczepionek podjednostkowych jako nośniki antygenów. Wchodzą m.in. w skład wieloskładnikowej podjednostkowej szczepionki anty-*Neisseria meningitidis* typu B (MenB) opracowanej przez firmę Novartis i będącej aktualnie w III fazie badań klinicznych [61].

Nietypową metodą mającą na celu sekrecję heterologicznych białek przez komórki *Salmonella* jest użycie fuzji z cytolizyną A (ClyA), nazywaną również SheA lub HlyE [23]. Nieznany jest mechanizm transportu tej toksyny przez błonę cytoplazmatyczną, udowodniono jednak, że w jej wydzielaniu poza komórkę bakteryjną biorą udział OMV [77]. Fuzje translacyjne heterologicznych antygenów z ClyA również wydajnie segregują do OMV, co umożliwia ich wydzielanie na zewnątrz komórki nośnika. Dodatkową zaletą tej specyficznej sekrecji antygenów może być pobudzenie wrodzonej odpowiedzi immunologicznej przez LPS znajdujący się na powierzchni OMV [8, 43].

Strategię tą wykorzystano m.in. w konstrukcji szczepionki przeciwko wągliкови. Badania wykazały, że immunizacja myszy szczepem *S. Typhimurium* produkującym fuzyjne białko ClyA-PA83 chroni zwierzęta przed zakażaniem sporami *B. anthracis* [67]. Podobnego efekty protekcyjnego nie uzyskano w przypadku zastosowania do sekrecji antygeny systemu sekrecji Hly (jednoetapowy system sekrecji typu I). Eksperyment przeprowadzony na małpach z wykorzystaniem szczepu szczepionkowego *S. Typhi* CVD 908-*htrA* jako nośnika potwierdził skuteczność immunizacji przy użyciu fuzyjnego białka ClyA-PA83 [19]. Efekt ten uzyskano niewątpliwie dzięki sekrecji antygeny na zewnątrz komórek *Salmonella*, którą potwierdzono za pomocą techniki mikroskopii elektronowej z użyciem przeciwciał znakowanych koloidalnym złotem (*immunogold staining*).

Interesującą niedawno opracowaną strategią mającą na celu uwolnienie z komórek nośnika produkowanego antygeny jest programowana liza komórek nośnika [45]. System ten jest dość skomplikowany i składa się z części kodowanej chromosomowo oraz wprowadzonej *in trans* na plazmidzie (Rys. 4). Szczep *S. Typhimurium* posiada w chromosomie m.in. gen *murA* pod kontrolą kasety arabinozowej (*araC P_{BAD}*) oraz delecję genu *asd*. Jak już wcześniej wspomniano produkty tych genów są niezbędne w syntezie peptydoglikanu. Na chromosomie pod kontrolą promotorów arabinozowych znajdują się także geny kodujące białka regulatorowe LacI (repressor promotora *trc*) i C2 (repressor promotora P22R). Na plazmidzie zaś znajdują się kopie genów *asd* oraz *murA* pod kontrolą promotora arabinozowego oraz pokrywającą się z nimi otwarta ramkę odczytu kodujący antysensowny RNA pod kontrolą promotora P22R. Plazmid zawiera także gen kodujący heterologiczny antygen pod kontrolą promotora *trc*. W warunkach *in vitro* w obecności arabinozy ekspresji ulegają geny *asd*, *murA*, *c2* i *lacI*, co zapewnia normalny wzrost komórek oraz blokuje ekspresję heterologicznego genu. W środowisku pozbawionym arabinozy, ekspresja wyżej wymienionych genów ulega zahamowaniu. Odblokowana zostaje zaś ekspresja genów kodujących antygen oraz antysensowny RNA *asd-murA*. Blokuje to całkowicie produkcję białek Asd i MurA w komórce, co w konsekwencji prowadzi do jej lizy i uwolnienia antygeny. Metodę to wykorzystano m.in. w konstrukcji prototypów szczepionek przeciwko *S. pneumoniae* [45], *M. tuberculosis* [38] czy wirusowi grypy [2].

Dla wzmocnienia odpowiedzi komórkowej skonstruowano szczep *Salmonella* wydzielające heterologiczne antygeny na zewnątrz komórki, do cytozolu komórek eukariotycznych. W tym celu wykorzystano systemy transportu typu III *S. enterica* kodowane przez geny zlokalizowane na SPI-1 i SPI-2. Te systemy sekrecji aktywne są na różnych etapach infekcji. SPI-1 warunkuje inwazję do komórek eukariotycznych, SPI-2 jest aktywny podczas wzrostu *Salmonella* wewnątrz komórek eukariotycznych i warunkuje biogenezę wakuoli (SCV – *Salmonella containing vacuole*). Oba przekazują do komórek eukariotycznych wiele białek efektorowych modulujących ich metabolizm [1, 60, 82]. Stworzenie fuzji translacyjnych heterologicznych antygenów z N-fragmentami białek efektorowych SPI-1 tj. SopE czy SptP przyczyniało się do zwiększenia prezentacji antygeny cytotoksycznym limfocytów T CD8⁺ z udziałem cząsteczek MHC klasy I. Skuteczność działania tego typu fuzji efektorów SPI-1 udokumentowano w stosunku do kilku antygenów *Eimeria* (czynnik etiologiczny kokcydiozy drobiu) [46,47] oraz w immunizacji myszy antygenami (ESAT-6 i CFP-10) *M. tuberculosis* [37]. Nie we wszystkich eksperymentach uzyskano efekty pozytywne. Immunizacja ochotników atenuowanym szczepem