

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.

Drugą dostępną szczepionką – 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 węglik (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 biosyn-tezie 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 *pml*, 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 *pml* 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 niekoniugacyjne, 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 addytywny 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 uniemożliwia produkcję toksyny. W przypadku utraty przez komórkę plazmidu zawiera

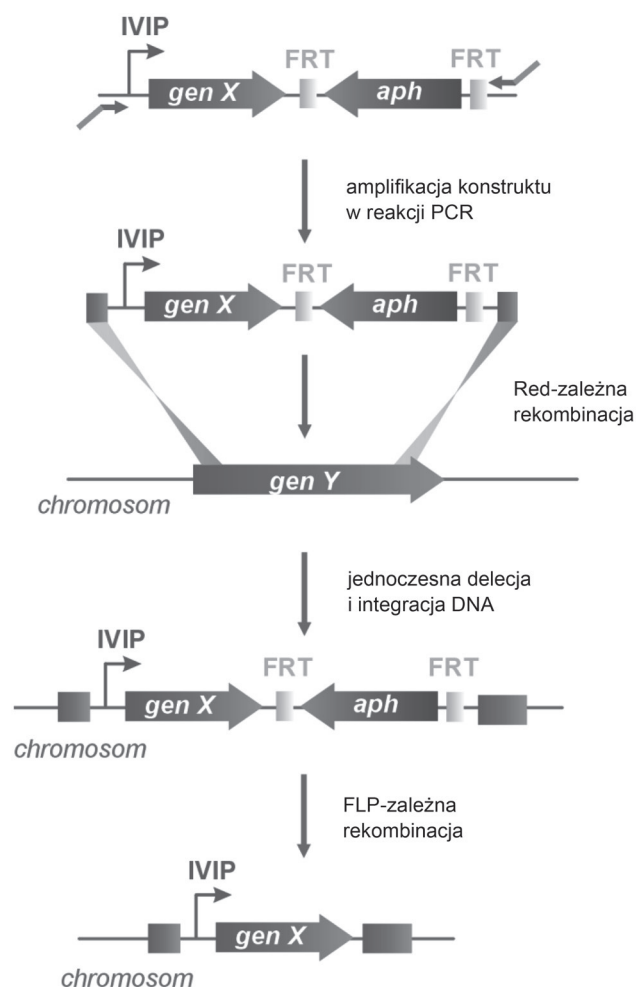
ona otrzymane w wyniku podziału zarówno cząsteczki mRNA trucizny jak i antidotum. Antysensowny RNA *sok* w przeciwieństwie do mRNA *mok-hok* jest mniej stabilny i szybciej ulega degradacji. W ten sposób w komórce gen *hok* ulega transkrypcji, syntetyzowana toksyna depolaryzuje błonę cytoplazmatyczną, 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 nukleotydowej 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.

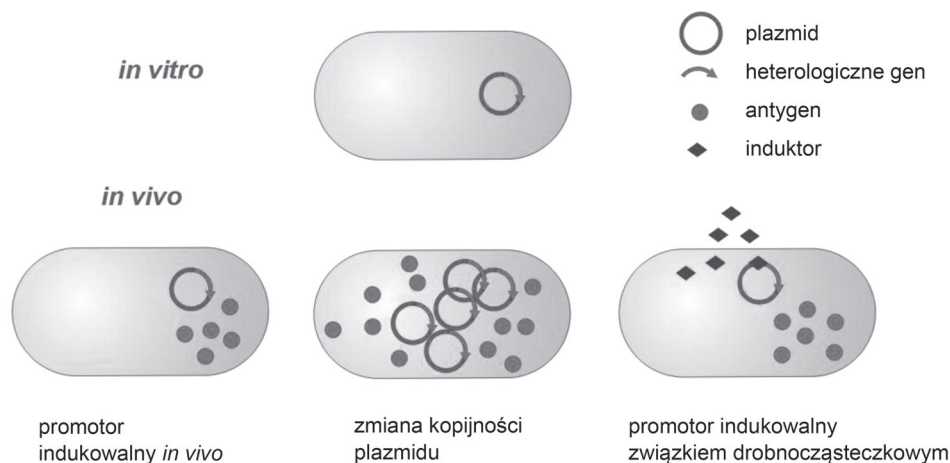
Wpływ indukcji produkcji antygeny tylko w warunkach *in vivo* na efektywność immunizacji badano z udziałem różnych promotorów wielokrotnie. Porównywano m.in. dwa regulowane przez białko FNR (*fuma-*

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.

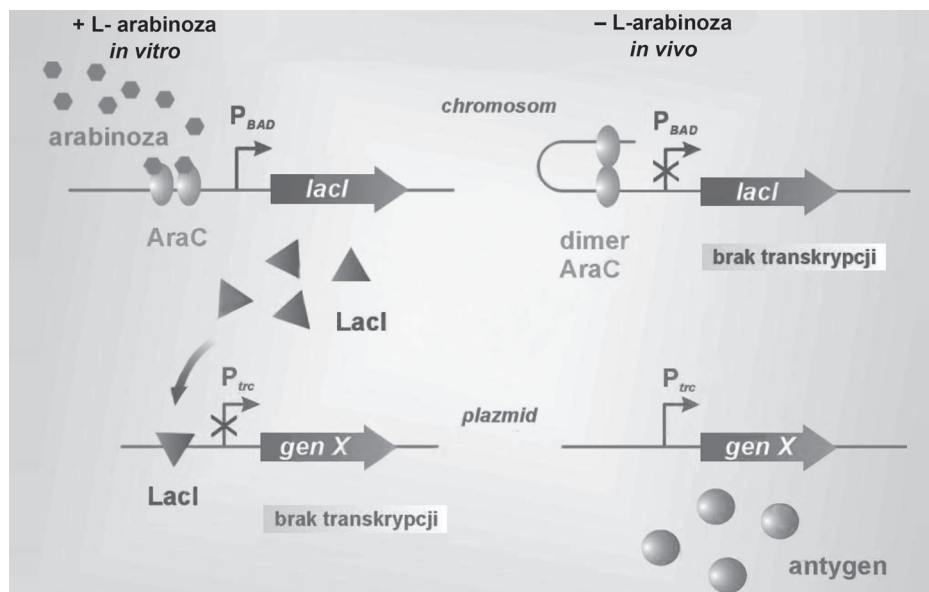
Podobną strategię zwaną także „*runaway-like replication*”, opartą na bardziej skomplikowanym mechanizmie regulacji kopijności plazmidu, zastosowano do nadprodukcji przez komórki *S. Typhimurium* w warunkach *in vivo* antygeny LcrV *Y. pestis* [74]. Immunizacja myszy skonstruowanym szczepem indukowała 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 arabinozą 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 arabinozy 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.

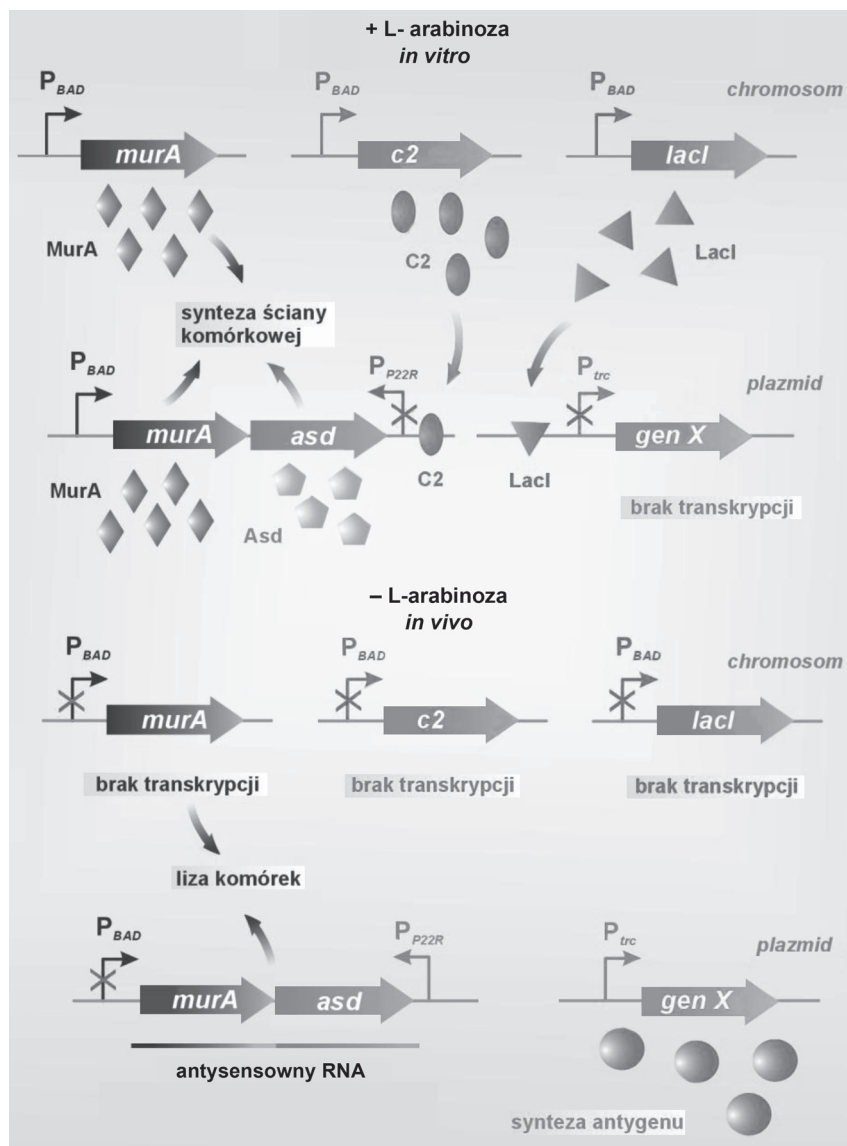
W konstrukcji szczepionek podjednostkowych wykorzystywane są także pęcherzyki zewnątrzkomórkowe OMV (*outer membrane vesicle*). OMV, będące naturalnymi proteoliposomami, produkowane są przez wiele gatunków mikroorganizmów, głównie gramujemnych, w różnych fazach wzrostu. Ich liczba wzrasta znacząco w 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



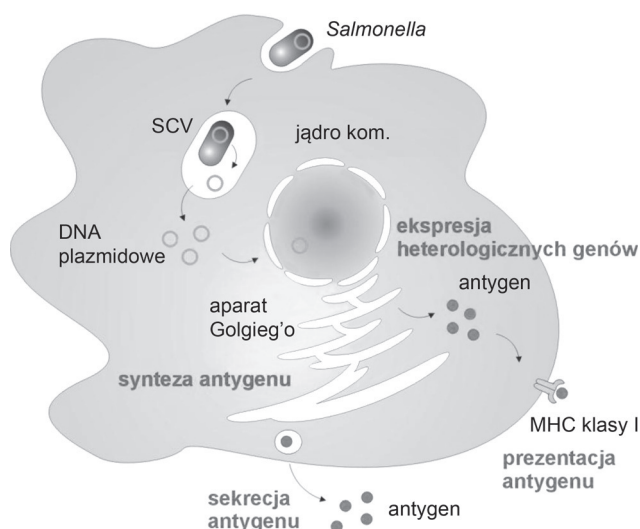
Rys. 4. Schemat „programowanej lizy” komórek *Salmonella* w warunkach *in vivo*.

W warunkach *in vitro* w podłożu uzupełnionym arabinozą ekspresji ulegają geny sklonowane pod kontrolą promotora *BAD* tj. *murA* i *asd*, kodujące enzymy niezbędne do syntezy ściany komórkowej oraz *c2* i *lacI*, kodujące represory blokujące syntezę antysensownego mRNA *murA-asd* oraz heterologicznego antygenu. W warunkach *in vivo* przy braku arabinozy zablokowana zostaje ekspresja genów *murA*, *asd*, których produkty są niezbędne do przeżycia komórek. Jednocześnie w komórce zahamowaniu ulega produkcja represorów C2 i LacI, co umożliwia ekspresję sklonowanego pod kontrolą promotora *P22R* antysensowny RNA *murA-asd* oraz sklonowanego pod kontrolą promotora *trc* genu kodujący antygen. W konsekwencji prowadzi to do lizy komórek i uwolnienia dużej ilości antygenu.

Salmonella niosącym fuzje białka Gag wirusa HIV i SopE *Salmonella* nie skutkowało indukcją odpowiedzi immunologicznej skierowanej przeciwko antygenowi Gag [49]. Różnice w efektach eksperymentów mogą wynikać zarówno z użytego modelu doświadczalnego (immunizacja kurcząt, myszy lub ludzi) jak i innych szczepów nośnikowych. Skuteczność działania fuzji translacyjnych domen translokacyjnych pięciu białek efektorowych SPI-2 (SiFA, SteC, SseL, SceJ i SseF) z modelowymi antygenami (owoalbumina i listeriolizyna) wykazała, że choć *in vitro* wszystkie fuzje ulegały translokacji do cytozolu komórek gospodarza to w eksperymentach *in vivo* na modelu mysim tylko dwie indukowały znaczący poziom odpowiedzi komórkowej

[29, 36]. Prezentowane dane wskazują, jak wnikliwie musi być doborany system transportu heterologicznych antygenów. Poznanie mechanizmów indukcji odpowiedzi immunologicznej związanej z prezentacją antygenów za pomocą MHC klasy I przez komórki *Salmonella* będące nośnikami antygenów zapoczątkowało badania nad ich wykorzystaniem jako szczepionek antynowotworowych [57].

Ciekawym rozwiązaniem pozwalającym na prezentację antygenów za pomocą MHC klasy I oraz jednocześnie uniknięcie niedogodnień związanych z nadprodukcją heterologicznych antygenów na terenie komórki nośnikowej tj. zaburzeń metabolizmu, toksyczności czy zmniejszenia immunogenności, jest zastosowanie



Rys. 5. Schemat działania szczepionki DNA skonstruowanej z użyciem komórek *Salmonella* jako nośnika. Opis w tekście.

układu pozwalającego na ekspresję antygenów na terenie komórek eukariotycznych. Do tej pory komórki *Salmonella* zostały z powodzeniem wykorzystane jako nośnik szczepionek DNA przeciwko wielu patogenom zarówno wirusowym tj. HIV [41], wirusy odry [59], opryszczki [17] czy zapalenia wątroby typu B i C [6,83] jak i bakteryjnym tj. *Chlamydia trachomatis* [5], *Clostridium tetani* [58], *L. monocytogenes* [14] czy *M. tuberculosis* [33].

W przypadku konstrukcji tego typu szczepionek heterologiczny gen musi znajdować się na plazmidzie pod kontrolą promotora funkcjonalnego w komórkach eukariotycznych – najczęściej promotora CMV (wirusa cytomegalii) lub SV40 (*simian virus 40*), a rolą *Salmonella* jest jedynie dostarczenie DNA plazmidowego do komórek prezentujących antygen (APC). Po liście bakterii w fagosomie cząsteczki wektora zawierający heterologiczny gen są transportowane do jądra komórkowego (Rys. 5). Mechanizm tego procesu pozostaje nadal nieznan, co niewątpliwie utrudnia prace nad optymalizacją szczepionek DNA. Na terenie jądra komórkowego heterologiczny gen ulega ekspresji. Syntetyzowany antygen traktowany jest jako endogenne białko i prezentowany przez komórki prezentujące antygen z udziałem cząsteczek MHC klasy I, co stymuluje odpowiedź komórkową związaną z limfocytami T CD8⁺. Wykazano jednak, że szczepionki DNA stymulują także odpowiedź humoralną i komórkową związaną z limfocytami Th, co wynika ze zjawiska krzyżowej prezentacji antygenów (*cross-presentation*) [65].

6. Podsumowanie

Opisane powyżej strategię używane w konstrukcji szczepionek podjednostkowych opartych na awirulentnych szczepach *Salmonella* pozwalają na zróżnicowaną

modulację odpowiedzi odpornościowej immunizowanego gospodarza. Jednakże należy podkreślić, iż wybór odpowiedniej strategii nie jest prosty, a efekt immunizacji jest często trudny do przewidzenia. W konstrukcji tego typu szczepionek musi być brane pod uwagę wiele elementów: od wyboru odpowiedniego zestawu antygenów protekcyjnych, przez genotyp i właściwości atenuowanego szczepu nośnikowego, rodzaj stosowanych promotorów do wyrażania heterologicznych genów, strategię prezentacji antygenów komórkom prezentującym antygen, po dobranie odpowiedniego modelu zwierzęcego.

Podziękowania

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

Piśmiennictwo

1. Agbor T.A., McCormick B.A.: *Salmonella* effectors: important players modulating host cell function during infection. *Cell Microbiol.* **13**, 1858–1869 (2011)
2. Ameiss K., Ashraf S., Kong W., Pekosz A., Wu W.H., Milich D., Billaud J.N., Curtiss R., 3rd: Delivery of woodchuck hepatitis virus-like particle presented influenza M2e by recombinant attenuated *Salmonella* displaying a delayed lysis phenotype. *Vaccine*, **28**, 6704–6713 (2010)
3. Attridge S.R., Davies R., LaBrooy J.T.: Oral delivery of foreign antigens by attenuated *Salmonella*: consequences of prior exposure to the vector strain. *Vaccine*, **15**, 155–162 (1997)
4. Branger C.G., Sun W., Torres-Escobar A., Perry R., Roland K.L., Fetherston J., Curtiss R., 3rd: Evaluation of Psn, HmuR and a modified LcrV protein delivered to mice by live attenuated *Salmonella* as a vaccine against bubonic and pneumonic *Yersinia pestis* challenge. *Vaccine*, **29**, 274–282 (2011)
5. Brunham R.C., Zhang D.: Transgene as vaccine for chlamydia. *Am. Heart J.* **138**, S519–522 (1999)
6. Cao J., Chen Z., Ren Y., Luo Y., Cao M., Lu W., Zhao P., Qi Z.: Oral immunization with attenuated *Salmonella* carrying a co-expression plasmid encoding the core and E2 proteins of hepatitis C virus capable of inducing cellular immune responses and neutralizing antibodies in mice. *Vaccine*, **29**, 3714–3723 (2011)
7. Cheminay C., Hensel M.: Rational design of *Salmonella* recombinant vaccines. *Int. J. Med. Microbiol.* **298**, 87–98 (2008)
8. Chen D.J., Osterrieder N., Metzger S.M., Buckles E., Doody A.M., DeLisa M.P., Putnam D.: Delivery of foreign antigens by engineered outer membrane vesicle vaccines. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **107**, 3099–3104 (2010)
9. Chen H., Schifferli D.M.: Enhanced immune responses to viral epitopes by combining macrophage-inducible expression with multimeric display on a *Salmonella* vector. *Vaccine*, **19**, 3009–3018 (2001)
10. Covone M.G., Brocchi M., Palla E., Dias da Silveira W., Rappuoli R., Galeotti C.L.: Levels of expression and immunogenicity of attenuated *Salmonella enterica* serovar Typhimurium strains expressing *Escherichia coli* mutant heat-labile enterotoxin. *Infect. Immun.* **66**, 224–231 (1998)
11. Curtiss R., 3rd, Galan J.E., Nakayama K., Kelly S.M.: Stabilization of recombinant avirulent vaccine strains *in vivo*. *Res. Microbiol.* **141**, 797–805 (1990)

12. Curtiss R., 3rd, Wanda S.Y., Gunn B.M., Zhang X., Tinge S.A., Ananthnarayan V., Mo H., Wang S., Kong W.: *Salmonella enterica* serovar typhimurium strains with regulated delayed attenuation *in vivo*. *Infect. Immun.* **77**, 1071–1082 (2009)
13. Curtiss R., 3rd, Lee I.S. i wsp.: Induction of host immune responses using *Salmonella*-vectored vaccines (w) Virulence Mechanisms of Bacterial Pathogens, red. Brogden K.A., Minion F.C., Cornick N., ASM Press, Washington, D.C., 2007, s. 297–313
14. Darji A., zur Lage S., Garbe A.I., Chakraborty T., Weiss S.: Oral delivery of DNA vaccines using attenuated *Salmonella typhimurium* as carrier. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **27**, 341–349 (2000)
15. DiPetrillo M.D., Tibbetts T., Kleanthous H., Killeen K.P., Hohmann E.L.: Safety and immunogenicity of *phoP/phoQ*-deleted *Salmonella typhi* expressing *Helicobacter pylori* urease in adult volunteers. *Vaccine*, **18**, 449–459 (1999)
16. Ellis T.N., Kuehn M.J.: Virulence and immunomodulatory roles of bacterial outer membrane vesicles. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **74**, 81–94 (2010)
17. Flo J., Tisminetzky S., Baralle F.: Oral transgene vaccination mediated by attenuated *Salmonellae* is an effective method to prevent Herpes simplex virus-2 induced disease in mice. *Vaccine*, **19**, 1772–1782 (2001)
18. Fraillery D., Baud D., Pang S.Y., Schiller J., Bobst M., Zosso N., Ponci F., Nardelli-Haeffliger D.: *Salmonella enterica* serovar Typhi Ty21a expressing human papillomavirus type 16 L1 as a potential live vaccine against cervical cancer and typhoid fever. *Clin. Vaccine Immunol.* **14**, 1285–1295 (2007)
19. Galen J.E., Chinchilla M., Pasetti M.F., Wang J.Y., Zhao L., Arciniega-Martinez I., Silverman D.J., Levine M.M.: Mucosal immunization with attenuated *Salmonella enterica* serovar Typhi expressing protective antigen of anthrax toxin (PA83) primes monkeys for accelerated serum antibody responses to parenteral PA83 vaccine. *J. Infect. Dis.* **199**, 326–335 (2009)
20. Galen J.E., Nair J., Wang J.Y., Wasserman S.S., Tanner M.K., Szein M.B., Levine M.M.: Optimization of plasmid maintenance in the attenuated live vector vaccine strain *Salmonella typhi* CVD 908-*htrA*. *Infect. Immun.* **67**, 6424–6433 (1999)
21. Galen J.E., Pasetti M.F., Tennant S., Ruiz-Olvera P., Szein M.B., Levine M.M.: *Salmonella enterica* serovar Typhi live vector vaccines finally come of age. *Immunol. Cell Biol.* **87**, 400–412 (2009)
22. Galen J.E., Wang J.Y., Chinchilla M., Vindurampulle C., Vogel J.E., Levy H., Blackwelder W.C., Pasetti M.F., Levine M.M.: A new generation of stable, nonantibiotic, low-copy-number plasmids improves immune responses to foreign antigens in *Salmonella enterica* serovar Typhi live vectors. *Infect. Immun.* **78**, 337–347 (2010)
23. Galen J.E., Zhao L., Chinchilla M., Wang J.Y., Pasetti M.F., Green J., Levine M.M.: Adaptation of the endogenous *Salmonella enterica* serovar Typhi *clyA*-encoded hemolysin for antigen export enhances the immunogenicity of anthrax protective antigen domain 4 expressed by the attenuated live-vector vaccine strain CVD 908-*htrA*. *Infect. Immun.* **72**, 7096–7106 (2004)
24. Garmory H.S., Brown K.A., Titball R.W.: *Salmonella* vaccines for use in humans: present and future perspectives. *FEMS Microbiol. Rev.* **26**, 339–353 (2002)
25. Garmory H.S., Leckenby M.W., Griffin K.F., Elvin S.J., Taylor R.R., Hartley M.G., Hanak J.A., Williamson E.D., Cranenburgh R.M.: Antibiotic-free plasmid stabilization by operator-repressor titration for vaccine delivery by using live *Salmonella enterica* Serovar typhimurium. *Infect. Immun.* **73**, 2005–2011 (2005)
26. Gerdes K., Wagner E.G.: RNA antitoxins. *Curr. Opin. Microbiol.* **10**, 117–124 (2007)
27. Germanier R., Furer E.: Isolation and characterization of Gal E mutant Ty 21a of *Salmonella typhi*: a candidate strain for a live, oral typhoid vaccine. *J. Infect. Dis.* **131**, 553–558 (1975)
28. Germanier R., Furer E.: Characteristics of the attenuated oral vaccine strain “*S. typhi*” Ty 21a. *Dev. Biol. Stand.* **53**, 3–7 (1983)
29. Hegazy W.A., Xu X., Metelitsa L., Hensel M.: Evaluation of *Salmonella enterica* type III secretion system effector proteins as carriers for heterologous vaccine antigens. *Infect. Immun.* **80**, 1193–1202 (2012)
30. Hessel L., Debois H., Fletcher M., Dumas R.: Experience with *Salmonella typhi* Vi capsular polysaccharide vaccine. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **18**, 609–620 (1999)
31. Hohmann E.L., Oletta C.A., Killeen K.P., Miller S.I.: *phoP/phoQ*-deleted *Salmonella typhi* (Ty800) is a safe and immunogenic single-dose typhoid fever vaccine in volunteers. *J. Infect. Dis.* **173**, 1408–1414 (1996)
32. Hohmann E.L., Oletta C.A., Loomis W.P., Miller S.I.: Macrophage-inducible expression of a model antigen in *Salmonella typhimurium* enhances immunogenicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **92**, 2904–2908 (1995)
33. Huang J.M., Sali M., Leckenby M.W., Radford D.S., Huynh H.A., Delogu G., Cranenburgh R.M., Cutting S.M.: Oral delivery of a DNA vaccine against tuberculosis using operator-repressor titration in a *Salmonella enterica* vector. *Vaccine*, **28**, 7523–7528 (2010)
34. Hussein M.I., Hensel M.: Evaluation of *Salmonella* live vaccines with chromosomal expression cassettes for translocated fusion proteins. *Vaccine*, **27**, 3780–3787 (2009)
35. Hussein M.I., Hensel M.: Rapid method for the construction of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium vaccine carrier strains. *Infect. Immun.* **73**, 1598–1605 (2005)
36. Hussein M.I., Wartha F., Hensel M.: Recombinant vaccines based on translocated effector proteins of *Salmonella* Pathogenicity Island 2. *Vaccine*, **25**, 185–193 (2007)
37. Juarez-Rodriguez M.D., Arteaga-Cortes L.T., Kader R., Curtiss R., 3rd, Clark-Curtiss J.E.: Live attenuated *Salmonella* vaccines against *Mycobacterium tuberculosis* with antigen delivery via the type III secretion system. *Infect. Immun.* **80**, 798–814 (2012)
38. Juarez-Rodriguez M.D., Yang J., Kader R., Alamuri P., Curtiss R., 3rd, Clark-Curtiss J.E.: Live attenuated *Salmonella* vaccines displaying regulated delayed lysis and delayed antigen synthesis to confer protection against *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect. Immun.* **80**, 815–831 (2012)
39. Kang H.Y., Curtiss R., 3rd: Immune responses dependent on antigen location in recombinant attenuated *Salmonella typhimurium* vaccines following oral immunization. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **37**, 99–104 (2003)
40. Kang H.Y., Srinivasan J., Curtiss R., 3rd: Immune responses to recombinant pneumococcal PspA antigen delivered by live attenuated *Salmonella enterica* serovar typhimurium vaccine. *Infect. Immun.* **70**, 1739–1749 (2002)
41. Karpenko L.I., Danilenko A.V., Bazhan S.I., Danilenko E.D., Sysoeva G.M., Kaplina O.N., Volkova O.Y., Oreshkova S.F., Ilyichev A.A.: Attenuated *Salmonella enteritidis* E23 as a vehicle for the rectal delivery of DNA vaccine coding for HIV-1 polyepitope CTL immunogen. *Microb. Biotechnol.* **5**, 241–250 (2012)
42. Keitel W.A., Bond N.L., Zahradnik J.M., Cramton T.A., Robbins J.B.: Clinical and serological responses following primary and booster immunization with *Salmonella typhi* Vi capsular polysaccharide vaccines. *Vaccine*, **12**, 195–199 (1994)
43. Kim J.Y., Doody A.M., Chen D.J., Cremona G.H., Shuler M.L., Putnam D., DeLisa M.P.: Engineered bacterial outer membrane vesicles with enhanced functionality. *J. Mol. Biol.* **380**, 51–66 (2008)

44. Kirkpatrick B.D., Taylor D.N. i wsp.: Evaluation of *Salmonella enterica* serovar Typhi (Ty2 *aroC-ssaV-*) M01ZH09, with a defined mutation in the *Salmonella* pathogenicity island 2, as a live, oral typhoid vaccine in human volunteers. *Vaccine*, **24**, 116–123 (2006)
45. Kong W., Wanda S.Y., Zhang X., Bollen W., Tinge S.A., Roland K.L., Curtiss R., 3rd: Regulated programmed lysis of recombinant *Salmonella* in host tissues to release protective antigens and confer biological containment. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **105**, 9361–9366 (2008)
46. Konjufca V., Jenkins M., Wang S., Juarez-Rodriguez M.D., Curtiss R., 3rd: Immunogenicity of recombinant attenuated *Salmonella enterica* serovar Typhimurium vaccine strains carrying a gene that encodes *Eimeria tenella* antigen SO7. *Infect. Immun.* **76**, 5745–5753 (2008)
47. Konjufca V., Wanda S.Y., Jenkins M.C., Curtiss R., 3rd: A recombinant attenuated *Salmonella enterica* serovar Typhimurium vaccine encoding *Eimeria acervulina* antigen offers protection against *E. acervulina* challenge. *Infect. Immun.* **74**, 6785–6796 (2006)
48. Kopecko D.J., Dietrich G. i wsp.: Genetic stability of vaccine strain *Salmonella* Typhi Ty21a over 25 years. *Int. J. Med. Microbiol.* **299**, 233–246 (2009)
49. Kotton C.N., Hohmann E.L. i wsp.: Safety and immunogenicity of attenuated *Salmonella enterica* serovar Typhimurium delivering an HIV-1 Gag antigen via the *Salmonella* Type III secretion system. *Vaccine*, **24**, 6216–6224 (2006)
50. Levine M.M., Ferreccio C., Abrego P., Martin O.S., Ortiz E., Cryz S.: Duration of efficacy of Ty21a, attenuated *Salmonella typhi* live oral vaccine. *Vaccine*, **17**, Suppl. 2, S22–27 (1999)
51. Li Y., Wang S., Scarpellini G., Gunn B., Xin W., Wanda S.Y., Roland K.L., Curtiss R., 3rd: Evaluation of new generation *Salmonella enterica* serovar Typhimurium vaccines with regulated delayed attenuation to induce immune responses against PspA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **106**, 593–598 (2009)
52. Loessner H., Endmann A., Leschner S., Bauer H., Zelmer A., zur Lage S., Westphal K., Weiss S.: Improving live attenuated bacterial carriers for vaccination and therapy. *Int. J. Med. Microbiol.* **298**, 21–26 (2008)
53. Mastroeni P., Grant A.J.: Spread of *Salmonella enterica* in the body during systemic infection: unravelling host and pathogen determinants. *Expert Rev. Mol. Med.* **13**, e12 (2011)
54. Micoli F., Martin L.B. i wsp.: Vi-CRM 197 as a new conjugate vaccine against *Salmonella* Typhi. *Vaccine*, **29**, 712–720 (2011)
55. Miller V.L., Beer K.B., Loomis W.P., Olson J.A., Miller S.I.: An unusual *pagC::TnphoA* mutation leads to an invasion- and virulence-defective phenotype in *Salmonellae*. *Infect. Immun.* **60**, 3763–3770 (1992)
56. Orr N., Galen J.E., Levine M.M.: Novel use of anaerobically induced promoter, *dmsA*, for controlled expression of fragment C of tetanus toxin in live attenuated *Salmonella enterica* serovar Typhi strain CVD 908-*htrA*. *Vaccine*, **19**, 1694–1700 (2001)
57. Panthel K., Meinel K.M., Sevil Domenech V.E., Trulzsch K., Russmann H.: *Salmonella* type III-mediated heterologous antigen delivery: a versatile oral vaccination strategy to induce cellular immunity against infectious agents and tumors. *Int. J. Med. Microbiol.* **298**, 99–103 (2008)
58. Pasetti M.F., Anderson R.J., Noriega F.R., Levine M.M., Szein M.B.: Attenuated *deltaguaBA Salmonella typhi* vaccine strain CVD 915 as a live vector utilizing prokaryotic or eukaryotic expression systems to deliver foreign antigens and elicit immune responses. *Clin. Immunol.* **92**, 76–89 (1999)
59. Pasetti M.F., Levine M.M. i wsp.: Attenuated *Salmonella enterica* serovar Typhi and *Shigella flexneri* 2a strains mucosally deliver DNA vaccines encoding measles virus hemagglutinin, inducing specific immune responses and protection in cotton rats. *J. Virol.* **77**, 5209–5217 (2003)
60. Patel J.C., Galan J.E.: Manipulation of the host actin cytoskeleton by *Salmonella* – all in the name of entry. *Curr. Opin. Microbiol.* **8**, 10–15 (2005)
61. Rinaudo C.D., Telford J.L., Rappuoli R., Seib K.L.: Vaccinology in the genome era. *J. Clin. Invest.* **119**, 2515–2525 (2009)
62. Roberts M., Li J., Bacon A., Chatfield S.: Oral vaccination against tetanus: comparison of the immunogenicities of *Salmonella* strains expressing fragment C from the *nirB* and *htrA* promoters. *Infect. Immun.* **66**, 3080–3087 (1998)
63. Rondini S., Micoli F., Lanzilao L., Hale C., Saul A.J., Martin L.B.: Evaluation of the immunogenicity and biological activity of the *Citrobacter freundii* Vi-CRM197 conjugate as a vaccine for *Salmonella enterica* serovar Typhi. *Clin. Vaccine Immunol.* **18**, 460–468 (2011)
64. Salam M.A., Katz J., Zhang P., Hajishengallis G., Michalek S.M.: Immunogenicity of *Salmonella* vector vaccines expressing SBR of *Streptococcus mutans* under the control of a T7-*nirB* (dual) promoter system. *Vaccine*, **24**, 5003–5015 (2006)
65. Schoen C., Stritzker J., Goebel W., Pilgrim S.: Bacteria as DNA vaccine carriers for genetic immunization. *Int. J. Med. Microbiol.* **294**, 319–335 (2004)
66. Shi H., Santander J., Brennen K.E., Wanda S.Y., Wang S., Senechal P., Sun W., Roland K.L., Curtiss R.: Live recombinant *Salmonella* Typhi vaccines constructed to investigate the role of *rpoS* in eliciting immunity to a heterologous antigen. *PLoS One*, **5**, e11142 (2010)
67. Stokes M.G., Atkins H.S. i wsp.: Oral administration of a *Salmonella enterica*-based vaccine expressing *Bacillus anthracis* protective antigen confers protection against aerosolized *B. anthracis*. *Infect. Immun.* **75**, 1827–1834 (2007)
68. Stratford R., Khan S.A. i wsp.: Optimization of *Salmonella enterica* serovar typhi Delta aroC Delta ssaV derivatives as vehicles for delivering heterologous antigens by chromosomal integration and *in vivo* inducible promoters. *Infect. Immun.* **73**, 362–368 (2005)
69. Tacket C.O., Levine M.M. i wsp.: Safety and immune responses to attenuated *Salmonella enterica* serovar typhi oral live vector vaccines expressing tetanus toxin fragment C. *Clin. Immunol.* **97**, 146–153 (2000)
70. Tacket C.O., Levine M.M.: CVD 908, CVD 908-*htrA*, and CVD 909 live oral typhoid vaccines: a logical progression. *Clin. Infect. Dis.* **45**, Suppl. 1, S20–23 (2007)
71. Thiem V.D., Szu S.C. i wsp.: The Vi conjugate typhoid vaccine is safe, elicits protective levels of IgG anti-Vi, and is compatible with routine infant vaccines. *Clin. Vaccine Immunol.* **18**, 730–735 (2011)
72. Torres-Escobar A., Juarez-Rodriguez M.D., Branger C.G., Curtiss R., 3rd: Evaluation of the humoral immune response in mice orally vaccinated with live recombinant attenuated *Salmonella enterica* delivering a secreted form of *Yersinia pestis* PsaA. *Vaccine*, **28**, 5810–5816 (2010)
73. Torres-Escobar A., Juarez-Rodriguez M.D., Curtiss R., 3rd: Biogenesis of *Yersinia pestis* PsaA in recombinant attenuated *Salmonella* Typhimurium vaccine (RASV) strain. *FEMS Microbiol. Lett.* **302**, 106–113 (2010)
74. Torres-Escobar A., Juarez-Rodriguez M.D., Gunn B.M., Branger C.G., Tinge S.A., Curtiss R., 3rd: Fine-tuning synthesis of *Yersinia pestis* LcrV from runaway-like replication balanced-lethal plasmid in a *Salmonella enterica* serovar Typhimurium vaccine induces protection against a lethal *Y. pestis* challenge in mice. *Infect. Immun.* **78**, 2529–2543 (2010)
75. Tran T.H., Dolecek C. i wsp.: A randomised trial evaluating the safety and immunogenicity of the novel single oral dose typhoid

- vaccine M01ZH09 in healthy Vietnamese children. *PLoS One*, **5**, e11778 (2010)
76. van Damme P., Podda A. i wsp.: Safety, immunogenicity and dose ranging of a new Vi-CRM conjugate vaccine against typhoid fever: randomized clinical testing in healthy adults. *PLoS One*, **6**, e25398 (2011)
77. Wai S.N., Uhlin B.E. i wsp.: Vesicle-mediated export and assembly of pore-forming oligomers of the enterobacterial ClyA cytotoxin. *Cell*, **115**, 25–35 (2003)
78. Wanda S.Y., Konjufca V., Curtiss R., 3rd: Stability of protective antigen expression *in vivo* is essential for recombinant vaccine efficacy. ASM 107th General Meeting, Toronto, Kanada, 2007
79. Wang S., Curtiss R., 3rd i wsp.: *Salmonella* vaccine vectors displaying delayed antigen synthesis *in vivo* to enhance immunogenicity. *Infect. Immun.* **78**, 3969–3980 (2010)
80. Wang S., Li Y., Shi H., Scarpellini G., Torres-Escobar A., Roland K.L., Curtiss R., 3rd: Immune responses to recombinant pneumococcal PsaA antigen delivered by a live attenuated *Salmonella* vaccine. *Infect Immun* **78**, 3258–3271 (2010)
81. Wang S., Li Y., Shi H., Sun W., Roland K.L., Curtiss R., 3rd: Comparison of a regulated delayed antigen synthesis system with *in vivo*-inducible promoters for antigen delivery by live attenuated *Salmonella* vaccines. *Infect. Immun.* **79**, 937–949 (2011)
82. Waterman S.R., Holden D.W.: Functions and effectors of the *Salmonella* pathogenicity island 2 type III secretion system. *Cell Microbiol.* **5**, 501–511 (2003)
83. Woo P.C., Wong L.P., Zheng B.J., Yuen K.Y.: Unique immunogenicity of hepatitis B virus DNA vaccine presented by live-attenuated *Salmonella typhimurium*. *Vaccine*, **19**, 2945–2954 (2001)
84. 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)