

Agnieszka Wyszyńska¹, Patrycja Kobierecka¹,
Elżbieta Katarzyna Jagusztyn-Krynicka^{1*}

¹Zakład Genetyki Bakterii, Instytut Mikrobiologii, Wydział Biologii, Uniwersytet Warszawski

Wpłynęło w październiku 2014 r.

1. Charakterystyka bakterii kwasu mlekowego o potencjalnym zastosowaniu w immunoprofilaktyce. 2. LAB jako nośniki heterologicznych antygenów bakteryjnych, pasożytniczych i wirusowych. 2.1. Porównanie drogi podania. 2.2. Rola lokalizacji i ilości antygeny. 2.3. Porównanie skuteczności działania żywych szczepów LAB i cząstek GEM (*Gram-positive Enhancer Matrix*). 3. LAB jako szczepionki DNA. 4. Modulacja działania układu odpornościowego. 5. LAB w immunoterapiach chorób nowotworowych. 6. Podsumowanie

LAB (lactic acid bacteria) as live vectors for the development of safe mucosal vaccines

Abstract: Lactic acid bacteria are a group of Gram-positive bacteria that include many species, such as *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc* and others. They have health benefits such as immunomodulation and production of antimicrobial substances active against gastric and intestinal pathogens and other microbes. Over the past decade, there has been increasing interest in the use of LAB as mucosal delivery vectors. They represent an attractive alternative for vaccinations employing attenuated bacterial pathogens. In this review, we focused on recent results on the use of lactic acid bacteria as delivery vehicles for heterologous antigens, cytokines, and DNA vaccines. To date, many bacterial, parasitic and viral antigens have been successfully expressed in LAB strains, mainly in *L. lactis* and *Lb. plantarum*, and their positive immunological outcomes were documented using mainly mouse model and oral, intragastric or intranasal route of immunization.

1. Characterization of lactic acid bacteria with immunoprophylactic effects. 2. LAB as delivery vehicles for bacterial, parasitic and viral antigens. 2.1. Comparison of administration routes. 2.2. Amount and localization of antigens. 2.3. Comparison of live and killed LAB vaccines – GEM (*Gram-positive Enhancer Matrix*) particles, 3. LAB as a DNA vaccine. 4. Modulation of immune system. 5. LAB in cancer therapy. 6. Conclusions

Słowa kluczowe: antygeny, bakterie kwasu mlekowego, cząstki GEM, immunoprofilaktyka, szczepionka DNA

Key words: antigens, DNA vaccine, GEM particles, immunoprophylaxis, Lactic acid bacteria

1. Charakterystyka bakterii kwasu mlekowego – potencjalne zastosowanie w immunoprofilaktyce

Bakterie kwasu mlekowego (*Lactic Acid Bacteria* – LAB) to Gram-dodatnie, nie wytwarzające spor bakterie o niskiej zawartości par GC w genomie. Grupa ta została wyodrębniona ze względu na zdolność do przeprowadzania fermentacji węglowodanów z wytworzeniem kwasu mlekowego, nie zaś ze względu na powiązania filogenetyczne. Choć większość z nich to beztlenowce, niektóre gatunki tolerują niewielkie stężenie tlenu. Bakterie z grupy LAB charakteryzuje silna auksotrofia, w związku z tym występują w środowiskach uwzględniających ich duże wymagania pokarmowe, a więc bogatych w aminokwasy, puryny i pirymidyny. Można je odnaleźć w mleku i jego pochodnych, są również składnikami flory fizjologicznej (mikrobiota) m.in. płazów, ptaków, wielu ssaków, w tym człowieka. Do tej grupy mikroorganizmów zalicza się gatunki należące do rodzajów: *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc* i *Lactobacillus*. I choć LAB otrzymały status organizmów bezpiecznych dla zdrowia ludzkiego (*Generally Regarded as Safe* – GRAS), należy pamiętać,

że należą do nich również bakterie patogenne, takie jak *Streptococcus pyogenes* i *Streptococcus pneumoniae* [20].

Wartość światowego rynku wykorzystującego właściwości bakterii kwasu mlekowego szacowana jest na 100 miliardów Euro. Do niedawna bakterie z grupy LAB były używane głównie w produkcji i konserwacji produktów spożywczych. Coraz większe zainteresowanie budzą jednak jako organizmy probiotyczne [23], które – zgodnie z definicją zaproponowaną przez WHO – po podaniu w odpowiednich ilościach, wywołują korzystne skutki zdrowotne [26]. Spośród wielu mikroorganizmów produkujących kwas mlekowy w procesie fermentacji cukrów, jedynie nieliczne są uważane za gatunki probiotyczne. Bakterie te modulują florę bakteryjną jelita i tym samym utrzymują jego homeostazę. Zapewniają ochronę przed chorobotwórczymi bakteriami konkurując z nimi o kolonizowaną powierzchnię. Mogą przy tym wydzielać związki hamujące wzrost patogenów (kwas mlekowy, krótkołańcuchowe kwasy tłuszczowe, nadtlenuk wodoru, substancje o charakterze bakteriocyn) [39]. Dodatkowo stymulują działanie układu odpornościowego oraz obniżają ryzyko wystąpienia reakcji alergicznych. Obecnie probiotyczne

* Autor korespondencyjny: Zakład Genetyki Bakterii, Instytut Mikrobiologii, Wydział Biologii, Uniwersytet Warszawski, ul. Miecznikowa 1, 02-096 Warszawa; tel. 22 5541216; e-mail: kjkryn@biol.uw.edu.pl

szczepy mają największe znaczenie we wspomaganiu leczenia chorób układu pokarmowego (głównie biegunek o etiologii wirusowej, jak też biegunek poantybiotykowych) oraz zaburzeń autoimmunologicznych [28, 39]. Dostrzeżono również ich pozytywny wpływ na przebieg chorób metabolicznych (hiperlipidemia, cukrzyca, otyłość) [1]. Probiotykom przypisuje się także łagodzenie objawów nietolerancji laktozy, zwiększenie wchłaniania składników odżywczych przez jelita, obniżenie poziomu cholesterolu, poprawę perystaltyki jelit, a także zmniejszenie aktywności enzymów związanych z powstawaniem nowotworów [28].

Najlepiej scharakteryzowanym gatunkiem należącym do grupy LAB jest zdolny do przeprowadzania homofermentacji, mezofilny *Lactococcus lactis*. Poznanie pełnych sekwencji nukleotydowych genomów przedstawicieli tego gatunku, łatwość ich hodowli, jak również opracowanie szerokiej gamy narzędzi inżynierii genetycznej sprawiły, że *L. lactis* jest wykorzystywany jako organizm modelowy [11, 94]. W badaniach najczęściej stosowane są bezplazmidowe szczepy *L. lactis* subsp. *lactis* IL1403 i *L. lactis* subsp. *cremoris* MG1363, których genomy poznano odpowiednio w 1999 i 2007 roku [23]. Genom szczepu MG1363 ponownie zsekwencjonowano w roku 2010, co pozwoliło skorygować liczne błędy powstałe w wyniku pierwszego sekwencjonowania [49].

W ciągu ostatnich lat wzrosło również zainteresowanie bakteriami z rodzaju *Lactobacillus*. Do rodzaju tego zaliczono ponad 180 gatunków [63], jednakże największa uwaga skupia się na szczepach o potwierdzonych właściwościach probiotycznych, a więc m.in. bakteriach z gatunków: *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus salivarius*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus acidophilus* i *Lactobacillus helveticus* [28]. Zsekwencjonowanie genomów 20 wybranych przedstawicieli rodzaju *Lactobacillus* pozwoliło dostrzec duże zróżnicowanie materiału genetycznego w obrębie tego rodzaju. Tak na przykład genomy przebadanych gatunków różnią się wielkością (od 1,78 Mbp w przypadku *Lactobacillus johnsonii* FI9785 do 3,3 Mbp w przypadku *Lb. plantarum* WCFS1) a zawartość par GC waha się w zakresie od 33% do 51% [42]. Badania przeprowadzone przez Kanta i wsp. doprowadziły do zdefiniowania pangenu *Lactobacillus*. Spośród tworzących go 14000 genów, 383 z nich zaliczono do genów rdzeniowych (LCG, *Lactobacillus core genome*) [42].

Od ponad dwudziestu lat trwają intensywne badania nad możliwością wykorzystania bakterii kwasu mlekowego w charakterze bakteryjnego nośnika związków o działaniu terapeutycznym lub profilaktycznym, między innymi związków modulujących aktywność układu immunologicznego, antygenów czy enzymów [7]. LAB umożliwiają przeprowadzenie immunizacji drogą ślu-

zówkową, co jest bardziej praktyczne od standardowej iniekcji i co zwiększa skuteczność walki z patogenami, dla których to właśnie śluzówka jest główną drogą wnikania do organizmu człowieka. Dostarczenie antygeny przy użyciu szczepów bakterii kwasu mlekowego może zaindukować odpowiedź immunologiczną zarówno w błonach śluzowych (sIgA), jak i ogólnoustrojową reakcję układu odpornościowego [7]. O atrakcyjności bakterii kwasu mlekowego w immunoprofilaktyce lub terapii decyduje również ich oporność na działanie niskiego pH soku żołądkowego oraz zdolność przylegania do powierzchni nabłonka jelitowego. Ponadto niektóre ze szczepów LAB mają właściwości adiuwantów, co oznacza, że mogą wzmacniać odpowiedź immunologiczną zaindukowaną przez przenoszony antygen. Zaletą LAB może być również zdolność do produkcji bakteriocyn, czyli małych białek o właściwościach antybakteryjnych. Tak na przykład rozważana jest możliwość wykorzystania szczepów *Lb. salivarius* NRRL B-50053 i *Lb. salivarius* SMXD51 do opracowania szczepionki przeciwko kampylobakteriozie dla kurcząt. Wymienione szczepy produkują bakteriocyny o działaniu antagonistycznym wobec bakterii rodzaju *Campylobacter* (odpowiednio L-1077 i SMXD51) [56, 85]. Możliwość liofilizacji bakterii kwasu mlekowego sprawia także, że nie wymagają one przechowywania w niskiej temperaturze, a w celu podania preparatu nie jest wymagany wyspecjalizowany personel.

Wszystkie wyżej wymienione cechy bakterii kwasu mlekowego a w szczególności prozdrowotne właściwości oraz wysoki stopień bezpieczeństwa powodują, że są one atrakcyjną alternatywą dla innych wektorów stosowanych do konstrukcji szczepionek, takich jak atenuowane szczepy różnych gatunków mikroorganizmów patogennych, liposomów czy mikrocząstek. Prezentowana publikacja stanowi przegląd dotychczasowych osiągnięć dotyczących zastosowania LAB w immunoprofilaktyce.

2. Bakterie LAB jako nośniki heterologicznych antygenów bakteryjnych, pasożytniczych i wirusowych

W ostatnich latach opracowano wiele strategii pozwalających na wydajną ekspresję genów kodujących bakteryjne, wirusowe i pasożytnicze antygeny w szczepach LAB, głównie rodzajów *Lactococcus* i *Lactobacillus*. Z wykorzystaniem różnych modeli zwierzęcych (głównie model myszy) udokumentowano pozytywny, immunologiczny efekt aplikowania tego typu prototypów szczepionek, niezależnie od drogi podania. W niektórych badaniach analizowano także efekt ochronny immunizacji. Liczba publikacji dotyczących tego tematu znacznie przekroczyła liczbę 100.

Bakterie kwasu mlekowego cechuje olbrzymia różnorodność fizjologiczna i genetyczna. Różna jest ich zdolność do utrzymywania się i namnażania w uodpornianym organizmie. Ponadto często odmienny skład osłon komórkowych u bakterii z grupy LAB warunkuje różnice w stymulowanej odpowiedzi immunologicznej. Dlatego też schematy immunizacji opracowane dla szczepionek powstałych w oparciu o zastosowanie jako nośnika obcych antygenów jednych gatunków często nie są odpowiednie gdy do immunizacji wykorzystujemy inny gatunek LAB. Dane uzyskiwane przez różne grupy badawcze nie są spójne, a trudności z ich porównywaniem wynikają z zastosowania w eksperymentach różnych antygenów, różnych nośników i odmiennych schematów immunizacji. W dalszym fragmencie tego podrzdziału omówione zostaną parametry mające wpływ na odpowiedź odpornościową indukowaną prototypami szczepionek LAB.

2.1. Porównanie drogi podania i szerepu nośnikowego

Pierwsze doniesienie dotyczące wykorzystania LAB jako wektora szczepionkowego pochodzi z 1990 roku i dotyczy immunizacji przeciwko *Lactococcus mutans*. W eksperymencie wykorzystano zabite komórki *Lactococcus lactis* produkujące białko PAC (antygen I/II) zlokalizowane na powierzchni komórki. Dożołądkowa immunizacja myszy skutkowała produkcją specyficznych przeciwciał IgG i IgA, tak więc po raz pierwszy pokazano, że LAB mogą stanowić atrakcyjną alternatywę dla klasycznych nośników bakteryjnych [40]. Liczne badania dotyczące roli przedstawicieli grupy LAB jako bakteryjnego nośnika zostały wykonane z zastosowaniem jako antygeny C-końcowego fragmentu toksyny tężca (TTFC). Ten fragment toksyny jest silnie immunogennym białkiem intensywnie badanym jako potencjalny składnik skojarzonej szczepionki DTP (przeciwko tężcowi, błonicy i krztuścowi) mający zastąpić inaktywowaną toksynę. Antygen był produkowany w komórkach różnych gatunków bakterii z grupy LAB (*L. lactis*, *Lactobacillus* spp. oraz *Streptococcus gordonii*), różniących się przeżywalnością w kolonizowanych niszach ekologicznych. Badania przeprowadzone z wykorzystaniem *L. lactis* i *Lb. plantarum* w charakterze nośników TTFC mogą sugerować wyższą skuteczność szczepów rodzaju *Lactobacillus*, szczególnie przy zastosowaniu szczepów zmutowanych w genie kodującym racemazę alaniny, enzym biorący udział w syntezie ściany komórkowej. Wniosek ten jednak nie jest jednoznaczny ponieważ gen kodujący TTFC był w obu nośnikach wyrażany z trudnych do porównania promotorów (promotor indukowany niziną i konstytutywny promotor) [32].

Wpływ nośnika na poziom odpowiedzi immunologicznej i skuteczność immunizacji analizowano także

w odniesieniu do potencjalnej szczepionki antymalarycznej. W eksperymencie opracowano szczep produkujący MSA2 (*merozoite surface antigen*), białko powierzchniowe *Plasmodium falciparum*, dobrze scharakteryzowany antygen, do ekspresji którego dochodzi na etapie merozoitu (jedna z form rozwojowych w cyklu życiowym pasożyta). Eksperyment przeprowadzono w kilku wariantach: antygen produkowany w komórkach *L. lactis*, *Lactobacillus reuteri* i *Lb. salivarius* był związany z peptydoglikanem za pomocą wiązań kowalencyjnych lub niekowalencyjnych oraz zlokalizowany na powierzchni komórek traktowanych TCA. Dodatkowo w badaniach wykorzystano różne genetyczne linie myszy. Zaobserwowano znaczące różnice w poziomie indukcji i rodzaju indukowanej odpowiedzi odpornościowej, zależne od rodzaju gospodarza, rodzaju nośnika jak i lokalizacji antygeny [60]. Również do immunizacji anty-*Helicobacter* wykorzystywano szczep *L. lactis* lub *Lb. plantarum* (*alr*⁻). Stosowanym antygenem był gen kodujący podjednostkę B ureazy (UreB). Pozytywny efekt (indukcję specyficznych przeciwciał i obniżenie poziomu kolonizacji myszy przez *H. felis*) zaobserwowano jedynie w przypadku zastosowania szczepu *Lactobacillus* [19, 46].

Wpływ nośnika na poziom indukcji układu odpornościowego i skuteczność działania prototypu szczepionki analizowano również w odniesieniu do szczepionek przeciwko *S. pneumoniae*. Badania przeprowadzono głównie na modelu mysim po donosowej immunizacji. Zakażenia *S. pneumoniae* są odpowiedzialne za około 11% przypadków zgonów dzieci do lat pięciu w skali światowej. Pneumokoki wywołują głównie zapalenie płuc, mogą być również przyczyną ogólnoustrojowych, inwazyjnych infekcji, takich jak np. sepsa czy zapalenie opon mózgowych. Licencjonowane szczepionki anty-*S. pneumoniae* zawierają polisacharydy bakteryjne (*polysaccharide vaccine* – PSV), które w niektórych preparatach skoniugowane są z białkiem nośnikowym (CMR197 – nieaktywna zmutowana toksyna błonicy). Rolą białka nośnikowego jest włączenie do odpowiedzi immunologicznej limfocytów T, co skutkuje indukcją odporności u dzieci poniżej drugiego roku życia. Szczepy *S. pneumoniae* charakteryzują się olbrzymią różnorodnością serotypową (opisano ponad 90 serotypów), tak więc szczepionki są skuteczne tylko przeciwko tym serotypom, których polisacharydy wchodziły w skład preparatu. Do najczęściej stosowanych aktualnie szczepionek należy siedmiowalentna szczepionka PCV7 zawierająca białko CMR197 oraz PCV23 złożona z polisacharydów 23 serotypów *S. pneumoniae* [57]. Ze względu na wielolekooporność tego patogena oraz różną geograficzną dystrybucję serotypów prowadzone są liczne badania dotyczące opracowania skutecznych preparatów w oparciu o konserwowane białkowe antygeny. Jednym z kandydatów do zastosowania

jako wektor dostarczający antygeny są szczepy LAB. Jako antygeny stosowane są polisacharydy otoczkowe (CPS) oraz liczne antygeny białkowe (*pneumococcal surface antigen* – PsaA; *pneumococcal surface protein* – PspA; *pneumococcal protective protein* – PppA) produkowane przez gatunki rodzajów *Lactobacillus* i *Lactococcus* jako białka o różnej lokalizacji. Wyczerpujące informacje o zastosowaniu LAB w immunizacji anty – *S. pneumoniae* znajdują się w pracy przeglądowej autorstwa Villena i wsp. [92]. Wstępne eksperymenty udokumentowały, że donosowe podanie szczepu *L. lactis* produkującego wewnątrzkomórkowy antygen PspA jest skuteczniejsze niż donosowa lub podskórna immunizacja oczyszczonym rekombinowanym białkiem [35]. Pierwsze próby immunizacji z zastosowaniem szczepu *Lb. casei* zawierającego gen *pspA* *S. pneumoniae* sklonowany na plazmidzie pod kontrolą indukcyjnego laktozowego promotora nie wykazały stymulacji odpowiedzi odpornościowej, prawdopodobnie ze względu na niski poziom antygeny. Dlatego w badaniach porównujących immunogenność szczepów LAB niosących gen *pspA* zastosowano konstytutywny silny promotor. Z przebadanych czterech szczepów (*L. lactis*, *Lb. casei*, *Lb. plantarum* i *Lb. helveticus*) najniższy poziom odpowiedzi odpornościowej zaobserwowano dla *L. lactis*, co było skorelowane z niskim poziomem antygeny i krótkim czasem obecności w śluzówce nosa. Szczepy rodzaju *Lactobacillus* kolonizowały śluzówkę nosa przez około trzy dni i stymulowały znaczący poziom zarówno IgG jak i IgA, choć był on zależny od gatunku użytego nośnika. Badania zwróciły uwagę na różnice pomiędzy gatunkami *Lactobacillus* dotyczące ich aktywności adiuwantowej [65]. Adiuwantowy efekt działania *Lb. plantarum* zaobserwowano także przy analizie skuteczności działania dwu rodzajów LAB będących nośnikami antygeny E7 wirusa HPV jako szczepionek terapeutycznych. Choć *Lb. plantarum* indukował niższy poziom odpowiedzi odpornościowej niż *L. lactis*, to podanie tego szczepu skutkowało znacznie szybszą regresją nowotworu [18]. Skuteczność nośnika może być jednak uzależniona od rodzaju antygeny, jego prezentacji i sposobu ekspresji badanego genu. Szczep *L. lactis* wyrażający antygen PppA *S. pneumoniae* jako białko powierzchniowe po donosowej immunizacji indukował silną odpowiedź śluzówkową oraz w znaczący sposób podwyższał poziom odporności myszy na infekcję kilkoma serotypami *S. pneumoniae*. Został on wykorzystany w eksperymentach doustnej immunizacji anty – *S. pneumoniae* (patrz niżej) [55].

Większość prototypów szczepionek opracowywanych z zastosowaniem szczepów LAB jako nośników dotyczy chorób zakaźnych przeciwko patogenom wnikającym do naszego organizmu poprzez błony śluzowe przewodu pokarmowego, oddechowego lub układu moczopłciowego. Z tego powodu stosowane są różne drogi

podania. I tak np. w przypadku *S. pneumoniae* analizowano skuteczność głównie szczepionek podawanych donosowo, w wypadku *H. pylori* głównie doustnie lub dożołądkowo. W niektórych przypadkach stosowano także iniekcje domięśniowe lub podanie preparatu dootrzewnowo. Ponieważ układ odpornościowy związany z błonami śluzowymi MALT (*mucosa-associated lymphoid tissue*) stanowi wspólną sieć obejmującą cały organizm, doustna immunizacja, dzięki zdolności limfocytów do migracji, zapewnia także ogólnoustrojową odporność na błonach śluzowych innych narządów.

Podanie antygeny doustnie jest najprostszą i najkorzystniejszą z ekonomicznego punktu widzenia drogą aplikacji szczepionek. Obniżenie śmiertelności wśród dzieci z powodu infekcji *S. pneumoniae* wymaga zaszczepienia dużej liczby dzieci w krajach rozwijających się. Fakt ten w połączeniu z obserwowaną skutecznością działania szczepów LAB jako nośników antygenów *S. pneumoniae* przy immunizacji donosowej zainspirował do badania skuteczności tych szczepionek po podaniu doustnym. W tych eksperymentach szczep *L. lactis* zawierający gen *pppA* wyrażany z promotora indukowanego nizyną został użyty do immunizacji dorosłych jak i młodych myszy. Stwierdzono indukcję zarówno specyficznych przeciwciał w jelitach jak i stymulację ogólnoustrojowej odpowiedzi odpornościowej (IgG w surowicy). Immunizacja podnosiła poziom odporności myszy na infekcję choć efekt był zależny od serotypu szczepu zastosowanego w eksperymencie ochronnym [90, 91].

2.2. Rola lokalizacji i ilości antygeny

Wpływ lokalizacji antygeny w komórce szczepu nośnikowego na efektywność immunizacji badano wielokrotnie. Obok drogi podania, zastosowanego schematu immunizacji, rodzaju szczepu nośnikowego oraz rodzaju i ilości antygeny jest to z pewnością jeden z czynników determinujących poziom i rodzaj indukowanej odpowiedzi immunologicznej gospodarza. Dotychczasowe wyniki nie pozwalają jednak jednoznacznie stwierdzić, w którym przedziale komórkowym powinien być umiejscowiony antygen, by efekt immunizacji był skuteczny.

Obce białka zlokalizowane w cytoplazmie LAB, nawet jeśli w naturalnym gospodarzu są wydzielane na zewnątrz komórki (np. fragment C toksyny tężca), wywołują zwykle zadowalający poziom odpowiedzi immunologicznej (humoralnej i komórkowej) [30, 73]. Taka lokalizacja pozwala antygenom na uniknięcie degradacji przez proteazy występujące w układzie pokarmowym, ale jednocześnie sprawia, że stają się one dostępne dla układu odpornościowego gospodarza dopiero po lizie komórek szczepu nośnikowego. Uwalnianie większej ilości cytoplazmatycznego antygeny

in vivo umożliwia zastosowanie szczepów z mutacją w genie *alr*, kodującym racemazę alaninową. Enzym ten katalizuje reakcję izomeryzacji L-alaniny do D-alaniny i jest niezbędny w procesie syntezy peptydoglikanu i kwasów teichojowych. Zastosowanie szczepów LAB przechodzących liżę w środowisku pozbawionym alaniny wykorzystano z powodzeniem kilkakrotnie [19, 32, 36]. Tak na przykład wprowadzenie mutacji *alr* do genomu szczepu *L. lactis* produkującego TTFC skutkowało 20–30-krotnym wzrostem specyficznej odpowiedzi immunologicznej w porównaniu do szczepu dzikiego niosącego dokładnie ten sam rekombinowany plazmid [32]. Cytoplazmatyczna lokalizacja antygeny czasem bywa letalna dla komórki bakterii nośnikowej. Wewnątrzkomórkowa produkcja białka E7 ludzkiego papillomawirusa typu 16 (HPV-16) prowadziła do szybkiej jego degradacji. Sytuacji nie poprawiło użycie szczepu *L. lactis* niezdolnego do produkcji proteazy ClpP. Dopiero konstrukcja rekombinowanego plazmidu umożliwiającego zakotwiczenie kodowanego antygeny E7 w osłonach bądź jego wydzielenie do środowiska doprowadziło do produkcji większej ilości natywnego białka E7 [9, 17]. Nadprodukcja białka umiejscowionego w cytoplazmie może więc wywoływać efekt toksyczny i często stanowi obciążenie metaboliczne dla komórek nośnika.

Opracowano kilka strategii mających na celu „wysyłanie” heterologicznych białek na powierzchnię komórek szczepów LAB lub do otaczającego je środowiska. Do sekrecji antygeny powszechnie wykorzystywana jest sekwencja sygnałowa białka Usp45 (*unknown secreted protein of 45 kDa*) – jedyne białko *Lactococcus lactis* wydzielanego w znaczących ilościach do środowiska [87]. Generalnie stosowane są dwie strategie prezentacji obcych antygenów na powierzchni komórek LAB; wykorzystujących wytworzenie wiązań kowalencyjnych lub niekowalencyjnych. Pierwsza z nich prowadzi do umieszczenia na C-końcu heterologicznego antygeny tzw. sekwencji kotwiczącej, która składa się z konserwowanego motywu LPXTG (Leu-Pro – dowolny aminokwas – Thr-Gly), regionu hydrofobowego i fragmentu zbudowanego z pozytywnie naładowanych aminokwasów, co umożliwia kowalencyjne związanie hybrydowego białka z peptydoglikanem w procesie zależnym od aktywności sortazy A (SrtA) [15]. Jak dotąd do zapewnienia powierzchniowej lokalizacji różnych antygenów wykorzystano motyw LPXTG proteinazy PrtP *Lactococcus* [69], proteinazy PrtB *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* [43], białka M6 *S. pyogenes* [25, 74, 95] oraz białka A *Staphylococcus aureus* [83]. Powierzchniową lokalizację antygeny umożliwia również dołączenie do jego C-końca domeny LysM. Powtórzone motywy LysM mają zdolność niekowalencyjnego wiązania się z peptydoglikanem a ich najczęstszym źródłem w badaniach aplikacyjnych jest autolizyna *L. lactis* AcmA [12,

48, 64, 69, 71]. W 2011 roku zidentyfikowano lipoproteinę BmpA, składnik klasycznego transportera typu ABC, odpowiedzialną za import puryn [5]. Aktualnie badana jest możliwość zastosowania tego białka jako nośnika antygenów, który jednocześnie zapewni ich powierzchniową lokalizację [96].

Pierwsza praca, której celem było ustalenie znaczenia lokalizacji antygeny w indukcji odpowiedzi immunologicznej powstała z wykorzystaniem wspomnianego wcześniej fragmentu C toksyny tężca (TTFC) [73]. Autorzy oceniali immunogenność rekombinowanych szczepów *Lb. plantarum* NCIMB8826 produkujących TTFC w trzech komórkowych lokalizacjach (cytoplazma, forma wydzielana do środowiska, forma zakotwiczona w osłonach komórkowych) po podaniu preparatu myszom podskórnie, dożołądkowo bądź donosowo. Odpowiedź immunologiczna (specyficzne IgG w surowicy) powstała po aplikacji podskórnej nie zależała od umiejscowienia antygeny w komórce nośnika. Natomiast przy podaniu rekombinowanych szczepów *Lb. plantarum* na powierzchnię śluzową żołądka lub nosa najlepszy efekt uzyskano w przypadku cytoplazmatycznej lokalizacji antygeny. W tym układzie fragment C toksyny tężca powstawał w największej ilości i w tym upatruje się przyczynę obserwowanych różnic. Również badania Grangette i wsp. wskazują na znaczenie ilości powstającego w komórkach nośnika antygeny przy podaniu dożołądkowym. Znacząca odpowiedź immunologiczna powstawała po podaniu szczepu *Lactobacillus* NCIMB8826/pMEC127, produkującego duże ilości białka TTFC [30]. Przy mniejszej ilości antygeny o lokalizacji cytoplazmatycznej obserwowano wzrost poziomu przeciwciał klasy IgG tylko w sytuacji gdy szczep podano donosowo. Niemniej jednak przeciwciała te nie neutralizowały toksyny tężca. Efekt ochronny obserwowano tylko wtedy, gdy na śluzówkę nosa podawano szczepy LAB produkujące wyższe stężenia antygeny, co przemawia za tym, że ilość antygeny ma znaczenie w indukcji przeciwciał o wyższej awidności [30, 31].

Zastosowanie różnych szczepów nośnikowych czy odmiennej drogi podania często uniemożliwia porównanie i jednoznaczny ocenę znaczenia lokalizacji antygeny w indukcji odpowiedzi immunologicznej. Dlatego na uwagę zasługują badania Marelli'ego i wsp. dotyczące zastosowania *L. lactis* jako nośnika białka VP8 rotawirusa. U myszy doustnie immunizowanych szczepem *L. lactis* produkującym cytoplazmatyczną formę antygeny VP8 obserwowano znaczący poziom jelitowych przeciwciał klasy IgA. U zwierząt, którym aplikowano *L. lactis* z białkiem VP8 zakotwiczonym w osłonach, oprócz wzrostu specyficznych przeciwciał klasy sIgA odnajdywanych w błonach śluzowych przewodu pokarmowego, odnotowano również indukcję przeciwciał klasy IgG. Przy wykorzystaniu linii komórkowej

MA-104 badano następnie zdolności infekcyjne cząstek wirusowych inkubowanych z przeciwciałami izolowanymi od immunizowanych zwierząt. Okazało się, że podanie immunizowanym zwierzętom szczepu *L. lactis* z białkiem VP8 umiejscowionym w osłonach zapewniało powstanie przeciwciał umożliwiających 100% neutralizację właściwości infekcyjnych cząstek wirusowych, podczas gdy lokalizacja cytoplazmatyczna antygeny doprowadzała do powstania przeciwciał wywołujących 50% redukcję infekcyjności wirusa [51]. Użycie innego antygeny rotawirusa, mianowicie białka VP7, dostarczyło odmiennych danych. Przeciwciała zaindukowane formą białka zakotwiczoną w osłonach nie mają właściwości neutralizujących cząstek wirusowych. Najwyższą immunogenność wykazywał natomiast szczep *L. lactis* wydzielający białko VP7 do środowiska [66].

Nie ma wątpliwości że zarówno ilość powstającego antygeny jak i jego umiejscowienie w komórkach nośnika muszą być brane pod uwagę w procesie konstruowania szczepionek. Trudno jednak rozstrzygnąć, która z zastosowanych strategii przyniesie oczekiwane rezultaty. Publikacje z ostatnich lat zwracają też uwagę na znaczenie losów antygeny po przeniesieniu do uodparnianego organizmu. Tak na przykład niezwykle pozytywny efekt uzyskano tworząc fuzję antygeny PA *Bacillus anthracis* (*protective antigen*) z peptydem umożliwiającym jego dostarczenie do komórek dendrytycznych (DC). Doustna aplikacja szczepów *Lb. acidophilus* NCFM i *Lactobacillus gasseri* ATCC 33323 produkujących taką fuzję zapewniła 100% ochronę myszy przed infekcją wąglikiem, podczas gdy wykorzystanie szczepów LAB kodujących antygen PA pozbawiony sygnału kierującego do DC skutkowało jedynie 30% efektem ochronnym [58, 59].

2.3. Porównanie skuteczności działania żywych szczepów LAB i cząstek GEM

W 2005 roku opracowano system nośnikowy, który opiera się na wykorzystaniu niemodyfikowanych genetycznie bakterii z grupy LAB [12]. Komórki *L. lactis* traktowane są gorącym kwasem trójchlorooctowym (TCA), co pozbawia je białek powierzchniowych oraz zawartości cytoplazmy. Peptydoglikan pozostaje natomiast nietknięty zapewniając kształt cząstek zbliżony do żywych komórek. Powstałe cząstki nazwano GEM (*Gram-positive Enhancer Matrix*). Utrata kwasów lipoteichojoyowych zapewnia cząstkom GEM, w porównaniu do szczepów żywych, możliwość związania większej ilości heterologicznych hybrydowych białek posiadających na C-końcu domenę LysM pochodzącą z białek LAB. Brak w tej procedurze rekombinowanego DNA eliminuje ryzyko jego niekontrolowanego rozpowszechnienia w środowisku. Dodatkową zaletą tej strategii jest

stabilność cząstek GEM i możliwość długiego ich przechowywania [12, 88]. Jednak przewagą użycia w procesie immunizacji niektórych żywych szczepów LAB (np. *Lactobacillus*) jest ich zdolność do kolonizowania jelit, co zmniejsza liczbę dawek szczepiennych i w znaczący sposób upraszcza procedury immunizacji. Cząstki GEM są usuwane z organizmu gospodarza, przez co indukcja odpowiedzi immunologicznej o podobnej sile wymaga kilkukrotnego podania preparatu.

GEM-y, choć pozbawione białek powierzchniowych, zachowują właściwości prozapalne charakterystyczne dla żywych bakterii. Indukują proces dojrzewania komórek dendrytycznych i makrofagów, produkcję cytokin prozapalnych oraz czynnika martwicy nowotworu (TNF α) [2, 3]. Jak dotąd cząstki GEM zastosowano jako nośniki w procesach uodparniania dla trzech antygenów *S. pneumoniae* (*IgA1 protease* – IgA1p, *putative proteinase maturation protein A* – PpmA, *streptococcal lipoprotein* – SlrA), białka LcrV *Yersinia pestis* oraz antygeny MSA2 (*merozoit surface antigen*) *Plasmodium falciparum* [2, 3, 69, 70]. U myszy, którym podano odpowiednio zmodyfikowane cząstki GEM obserwowano podwyższoną odpowiedź immunologiczną (IgG, IgA).

Badania Saluja i wsp. wykazały, że cząstki GEM mają właściwości adiuwantu. Większość dostępnych na rynku szczepionek przeciw grypie, podawana domięśniowo bądź podskórną, indukuje ogólnoustrojową odpowiedź immunologiczną. Szczepionki te nie są jednak zdolne do zaindukowania niezbędnej do ochrony górnych dróg oddechowych odpowiedzi śluzówkowej. Analizując właściwości adiuwantowe cząstek GEM donosowo zaaplikowano myszom komercyjnie dostępną, monowalentną szczepionkę H3N2 zawierającą hemaglutyninę oraz cząstki GEM. W odróżnieniu od innych doświadczeń antygen wirusa grypy nie był zakotwiczony na powierzchni GEM-ów, a stanowił oddzielny składnik szczepionki. U zwierząt tych odnotowano podobną odpowiedź ogólnoustrojową (IgG) jak u myszy, którym domięśniowo podano samą szczepionkę przeciwko grypie. Jednakże odpowiedź śluzówkowa (slgA) była znacząco wyższa. Zaobserwowano również podwyższoną liczbę komórek produkujących INF- γ , co wskazuje na dominującą odpowiedź typu Th1 [75]. Przy zastosowaniu cząstek GEM jako adiuwantu nawet 5-krotnie zmniejszona dawka hemaglutyniny wywoływała efekt ochronny u myszy [76].

Obiecujące wyniki badań prowadzonych z wykorzystaniem cząstek GEM wywołały zainteresowanie firmy biotechnologicznej Mucosis. Obecnie kończy się I faza badań klinicznych opracowanej przez tą firmę szczepionki przeciwko grypie (FluGEM) przeznaczonej dla ludzi. Jest to jak dotąd jedyna szczepionka bazująca na wykorzystaniu jako nośnika bakterii kwasu mlekowego na tak zaawansowanym etapie badań.

3. Bakterie LAB jako szczepionki DNA

W prowadzonych od ponad 20 lat badaniach udokumentowano, że genetyczna immunizacja z zastosowaniem plazmidowego DNA stanowi obiecującą strategię nie tylko immunoprofilaktyki chorób infekcyjnych ale i immunoterapii chorób nowotworowych. Immunizacja DNA prowadzi do indukcji zarówno humoralnej jak i komórkowej odpowiedzi immunologicznej. Ta druga jest szczególnie interesująca ponieważ jest to typ odpowiedzi immunologicznej odgrywający istotną rolę w immunoterapii chorób nowotworowych jak i immunoprofilaktyce chorób wywoływanych przez bakterie wewnątrzkomórkowe, zdolne do inwazji do nefagocytujących eukariotycznych komórek. Plazmidowy DNA może być dostarczany do organizmu uodpornianego drogą domięśniowej iniekcji (tzw. nagi DNA – *naked DNA*) lub przy użyciu odpowiednich bakteryjnych nośników. Ten drugi proces, w znaczący sposób zwiększający ilość DNA docierającego do komórek prezentujących antygen (*antigen presenting cells* – APC) nosi nazwę bakteriofektacji. Dodatkowo produkcja antygeny w komórkach eukariotycznych zapewnia przeprowadzenie potranslacyjnych modyfikacji antygenów lub ich epitopów – procesów, które często nie zachodzą w komórkach prokariotycznych. Prowadzone jak dotąd intensywne badania koncentrowały się na zastosowaniu jako nośników DNA atenuowanych bakterii enteroinwazyjnych takich jak *Salmonella* spp., *Yersinia enterocolitica* czy *Listeria monocytogenes* lub też odpowiednio zmodyfikowanych komórek *Escherichia coli* produkujących listeriolizynę O *L. monocytogenes* lub/i inwazyjną *Y. enterocolitica* [21, 77]. Rozwój inżynierii genetycznej oraz nowych strategii sekwencjonowania otworzył możliwości wykorzystania również bakterii kwasu mlekowego w immunizacji DNA. Pierwsze badania wykazały, że efektem trzygodzinnej inkubacji niemodyfikowanego genetycznie nieinwazyjnego szczepu *L. lactis* MG1363, niosącego plazmidowy DNA, z komórkami CaCo-2 jest przekazanie DNA do komórek eukariotycznych i ekspresja jego genów. W tych eksperymentach zastosowano eukariotyczną kasetę ekspresyjną zawierającą ulegającą transkrypcji pod kontrolą promotora wirusa CMV cDNA kodujący białko BLG (krowia β -laktoglobulina, główny alergen krowiego mleka) umieszczoną na wahadłowym plazmidzie zdolnym do replikacji w komórkach *E. coli* i *L. lactis* [33]. Proces przekazania DNA miał także miejsce *in vivo* po doustnym podaniu myszom szczepu produkującego badany alergen. W komórkach jelita cienkiego zwierząt stwierdzono obecność cDNA, produkcję białka oraz dodatkowo odnotowano produkcję specyficznych przeciwciał klasy IgG i IgA. Mechanizm warunkujący obecność genu *blg* w komórkach eukariotycznych nie został wyjaśniony. Istnieją co najmniej dwie możliwości: albo

komórki eukariotyczne pobierają uwolniony w jelicie z komórek *L. lactis* plazmidowy DNA albo *L. lactis*, jest zdolny, z niedużą częstością, do inwazyjności [16].

Kilka czynników uznawane jest za krytyczne w procesie uzyskania skutecznych szczepionek DNA. Plazmidowy DNA powinien być ze stosunkowo dużą wydajnością uwalniany z komórek bakterii nośnikowej do cytozolu komórki eukariotycznej, chroniony przed degradacją, by ostatecznie dotrzeć do jądra komórkowego, gdzie podlega procesowi transkrypcji. Powstały mRNA po transporcie do cytozolu ulega translacji a produkowane białko rozpoznawane jako endogenny antygen prezentowane jest z cząsteczkami MHC klasy I indukując odpowiedź komórkową. Część antygeny uwalniana z komórek pobierana jest przez APC, co skutkuje indukcją odpowiedzi humoralnej. Ponieważ bakterie LAB nie są raczej zdolne do inwazyjności podjęto próby konstrukcji szczepów zdolnych do kontaktu z komórkami eukariotycznymi zakładając, że ten proces powinien skutkować ich internalizacją. Intensywnie przebadano proces przekazywania plazmidowego DNA do komórek eukariotycznych stosując dwa typy rekombinowanych *L. lactis*: wyrażających zewnątrzkomórkowo białko FnBPA (białko A wiążące fibronektynę *S. aureus*) ora InlA (internalina *L. monocytogenes*). Jako geny reporterowe (cDNA) stosowano, wyżej opisany gen *blg* oraz *gfp* (gen kodujący białko zielonej fluorescencji). Doświadczenia, w których badano wpływ FnBPA na wydajność procesu zarówno w eksperymentach *in vitro* jak i *in vivo* wykazały, podwyższenie ilości DNA genu reporterowego na terenie komórek eukariotycznych, co jednak nie powodowało podwyższenia ilości produkowanego białka. Dodatkowo przedstawione dane sugerują różny mechanizm procesu w warunkach *in vitro* i *in vivo* [68]. Podobnie podwyższony poziom inwazyjności i dostarczania plazmidu kodującego GFP obserwowano w eksperymentach *in vitro* w wypadku *L. lactis* wyrażającego główną inwazyjną InlA *Listeria monocytogenes*. Receptorem dla internaliny A jest E-kadheryna. Ze względu na strukturę różnych E-kadheryn InlA rozpoznaje ludzką ale nie mysią E-kadherynę. Skonstruowanie szczepu *L. lactis* NZ9000 wyrażającego zmutowaną co do miejsca, powierzchniową InlA pozwoliło na przeprowadzenie eksperymentów *in vivo*, które udokumentowały raz jeszcze podwyższoną inwazyjność szczepu *in vitro*, choć *in vivo* nie zaobserwowano podwyższonego poziomu produkcji analizowanego białka (BLG) [22, 38]. Przedstawione wyżej analizy *in vitro* oraz dane z eksperymentów *in vivo* dotyczące uodporniania przeciwko *S. pneumoniae* czystym plazmidowym DNA [27, 86] sugerują duży potencjał aplikacyjny bakterii kwasu mlekowego jako szczepionek DNA. Aczkolwiek wiele problemów pozostaje nadal do wyjaśnienia szczególnie w świetle ostatnich badań wskazujących na różnice w rodzaju

indukowanej odpowiedzi immunologicznej pomiędzy natywnymi a rekombinowanymi szczepami jak i zależności rodzaju odpowiedzi immunologicznej od drogi podania szczepionki DNA [67].

4. Modulacja działania układu immunologicznego

Szczepy bakterii kwasu mlekowego, w szczególności te o udokumentowanych właściwościach probiotycznych, mogą wpływać na działanie układu immunologicznego gospodarza. Mechanizm leżący u podstaw tych oddziaływań nie został do końca wyjaśniony, zwłaszcza, że każdy ze szczepów LAB może modulować funkcjonowanie układu immunologicznego w sposób charakterystyczny jedynie dla siebie.

Przegląd badań wykazuje, że probiotyczne szczepy LAB hamują produkcję prozapalnych cytokin (np. IL-8, *tumor necrosis factor* α – TNF- α) powstających w odpowiedzi na kontakt komórek nabłonkowych jelita z patogenami [41, 54, 98]. Jednocześnie indukują wytwarzanie przeciwzapalnych czynników takich jak TGF- β (*transforming growth factor* β) oraz TSLP (*thymic stromal lymphopoietin*), co prowadzi do różnicowania niedojrzałych komórek dendrytycznych [97]. Wśród cytokin wydzielanych przez komórki dendrytyczne i makrofagi w odpowiedzi na obecność szczepów probiotycznych na szczególną uwagę zasługują dwie z nich: IL-12 i IL-10. Pierwsza prowadzi do różnicowania komórek T CD4⁺ w komórki typu Th1 oraz zwiększa aktywność cytotoksyczną komórek NK (*natural killers*). Druga zaś działa immunosupresyjnie i przeciwzapalnie [78].

Szczepy indukujące produkcję IL-12 wydają się bardziej skuteczne w zapobieganiu infekcjom, hamowaniu alergii i obniżaniu ryzyka wystąpienia nowotworów. Zaś szczepy, które stymulują produkcję IL-10 skutecznie przeciwdziałają nadmiernej odpowiedzi immunologicznej, co może znaleźć zastosowanie w leczeniu IBD (*inflammatory bowel diseases*), chorób autoimmunologicznych oraz alergii. Opisano również szczepy, które prawdopodobnie w zależności od rodzaju komórek zaangażowanych w odpowiedź immunologiczną i bodźców pochodzących od mikroflory komensalnej, mogą indukować wytwarzanie zarówno IL-10 jak i IL-12, a tym samym wykazywać skuteczność w terapii różnych chorób. Przykładem takich wielofunkcyjnych probiotyków są: *Lactobacillus casei* Shirota (LcS) i *Lb. rhamnosus* GG [79]. I choć coraz więcej badań klinicznych wskazuje na zasadność stosowania preparatów probiotycznych w leczeniu wymienionych wyżej schorzeń [24, 45, 50, 78], istnieją także doniesienia o niekorzystnym ich wpływie na zdrowie pacjentów [10].

Zdecydowanie największą uwagę poświęca się możliwości zastosowania bakterii z grupy LAB w terapii przewlekłych stanów zapalnych przewodu pokarmo-

wego (*inflammatory bowel disease* – IBD), takich jak choroba Crohna (*Crohn's disease* – CD) czy wrzodzące zapalenie jelita grubego (*ulcerative colitis* – UC). Dane eksperymentalne wskazują, że choroby te uwarunkowane są niewłaściwą odpowiedzią immunologiczną na fizjologiczną florę bakteryjną a w ich rozwoju odgrywają rolę czynniki zarówno środowiskowe jak i genetyczne [47]. Schorzenia IBD wymagają stałego stosowania leków immunosupresyjnych i przeciwzapalnych [79]. Zaobserwowano, że podanie osobom chorym na UC szczepu *E. coli* Nissle 1917 czy też *Lb. rhamnosus* GG zapobiega równie skutecznie nawrotom choroby, co mesalazyna, przeciwzapalny lek stosowany w terapii IBD [72, 99]. Dokładny mechanizm działania probiotyków, który prowadzi do złagodzenia objawów stanu zapalnego jelit nie jest dokładnie poznany. Przypuszcza się, że szczepy probiotyczne przywracają różnorodność mikroflory jelitowej, zapobiegając dominacji gatunków, które są zaangażowane w patogenezę UC [44]. Nie można również wykluczyć, że polepszenie stanu zdrowia pacjentów związane jest z oddziaływaniem przyjmowanych szczepów probiotycznych na ich układ immunologiczny [50].

Podejmowane są również próby wykorzystania szczepów LAB do przenoszenia cząstek umożliwiających sterowanie rodzajem indukowanej odpowiedzi immunologicznej. Badania prowadzone przez Steidlera w 2000 roku wykazały, że podanie myszom IL-10^{-/-} szczepu *L. lactis* wydzielającego zachowującą biologiczną aktywność myszą IL-10 (mIL-10) zapobiegało rozwojowi zapalenia jelita grubego. Pozytywny efekt – redukcję objawów chorobowych – uzyskano również podając ten sam szczep myszom ze stanem zapalnym jelita zaindukowanym DSS (*dextran sulfate sodium*) [80]. Wyniki uzyskane na modelu zwierzęcym zachęciły badaczy do sprawdzenia skuteczności powyższego preparatu u ludzi. Małej grupie pacjentów cierpiących na chorobę Crohna podano szczep *L. lactis*, w genomie którego gen kodujący syntetazę tymidylanu (*thyA*) zastąpiono przez sekwencję nukleotydową kodującą dojrzałą ludzką IL-10 (hIL-10). Tak przygotowane komórki bakteryjne (*LL-Thy12*) nie przeżywają w środowisku pozbawionym tyminy bądź tymidyny. U pacjentów nie obserwowano efektów ubocznych, które pojawiały się podczas podskórnej aplikacji rekombinowanej hIL-10 (Tenovil). Niewielka grupa chorych, jak też brak odpowiednich kontroli nie pozwolił jednak na wiarygodną ocenę skuteczności *LL-Thy12* [13, 14, 81]. W 2009 roku zakończono II etap badań klinicznych. Nie odnotowano istotnych statystycznie różnic w gojeniu śluzówki pomiędzy grupą badaną i grupą otrzymującą placebo [53]. I choć szereg eksperymentów demonstruje użyteczność terapii z wykorzystaniem IL-10 w chorobach o charakterze zapalnym na mysich modelach [29, 52], u ludzi wyniki dotychczasowych

badania wskazują na dużo mniejszą rolę tej interleukiny w leczeniu stanów zapalnych. Naukowcy nie ustają jednak w poszukiwaniu sposobu zwalczania chorób IBD przy wykorzystaniu szczepów z grupy LAB. Są one m.in. wykorzystywane do przenoszenia innych cząstek odgrywających ważną rolę w ochronie i naprawie śluzówki jelitowej, np. peptydów TFF (*trefoils factors*) [89]. Intensywnie bada się możliwość dostarczania do miejsc objętych stanem zapalnym za pośrednictwem LAB enzymów antyoksydacyjnych (katalaza, dysmutaza nadtlenkowa) [93], jak również inhibitorów proteaz (elafina) [61] a więc czynników oddziałujących na elementy układu immunologicznego. Dodatkowo poszukuje się nowych szczepów kolonizujących śluzówkę jelita, użycie których umożliwiłoby połączenie naturalnych własności z właściwościami przenoszonych heterologicznych białek. Świetnym przykładem jest komensal okrężnicy *Bacteroides ovatus*. Zdolność wykorzystywania ksyłanu przez *Bacteroides ovatus* pozwala na regulowaną produkcję białek terapeutycznych dla IBD: KGF-2 (*keratinocyte growth factor-2*) bądź TGF- β 1 (*transforming growth factor- β 1*), w odpowiedzi na obecność tego polisacharydu w diecie [34].

Cytokiny odgrywają ważną rolę w sygnalizacji komórkowej, przesyłaniu bodźców i kierowaniu odpowiedzią układu immunologicznego. Zastosowanie wektorów LAB eksprymujących antygeny patogennych mikroorganizmów oraz wydzielane do środowiska cytokiny powinny zagwarantować skuteczniejszą reakcję układu odpornościowego. Pierwsze badania dotyczące zastosowania cytokin w immunizacji z wykorzystaniem *L. lactis* prowadził Steidler i wsp. Donosowe podanie myszom szczepu *L. lactis* produkującego jednocześnie fragment C toksyny tężca (TTFC) i jedną z biologicznie aktywnych mysich cytokin: IL-2 lub IL-6 indukowało znacząco wyższy poziom specyficznych przeciwciał IgG w porównaniu do *L. lactis* produkującego jedynie TTFC [82, 84]. W ostatnich latach intensywnie badane jest oddziaływanie IL-12 na układ odpornościowy. Biologicznie aktywna interleukina 12 jest heterodimerem składającym się z dwóch różnych podjednostek: p35 i p40. Stymuluje proliferację, aktywację i cytotoksyczność limfocytów Th1 i komórek NK oraz wytwarzanie przez te komórki IFN- γ i TNF. Jednym z obiecujących przykładów zastosowania IL-12 w immunoprofilaktyce jest opracowanie szczepionki przeciwko leiszmaniozie. Jest to pasożytnicza choroba ludzi i zwierząt, której czynnikiem etiologicznym są jednokomórkowe wiciowce z rodzaju *Leishmania*. Każdego roku notuje się 50 tys. przypadków śmierci powodowanych przez leiszmaniozę na całym świecie. Opracowano szczep *L. lactis* umożliwiający ekspresję antygeny pochodzącego z *L. major*: homologa aktywowanej kinazy C (LACK), oraz szczep zdolny do sekrecji aktywnej mysiej IL-12. W efekcie podskórnego poda-

nia myszom obu tych szczepów rozwijała się swoista odpowiedź Th1 [37]. Obiecujące wyniki zachęciły badaczy do stworzenia szczepu zdolnego do jednoczesnej ekspresji antygeny LACK oraz IL-12. Jego aplikacja prowadzi do rozwoju odpowiedzi immunologicznej chroniącej myszy przed kolejną infekcją *L. major* [36].

5. Bakterie LAB w immunoterapiach chorób nowotworowych

Rak szyjki macicy (*cervical cancer* – CxCa) jest jednym z najczęściej powodujących śmierć kobiet nowotworów. Czynnikiem ryzyka wystąpienia zmian nowotworowych jest zakażenie genitalnymi typami ludzkiego wirusa brodawczaka (*human papilloma virus* – HPV). Aktualnie dostępna jest szczepionka profilaktyczna przeciw onkogennym typom HPV, która – podana przed inicjacją seksualną – wykazuje wysoką skuteczność. Niemniej jednak w dalszym ciągu poszukuje się nowych sposobów ochrony przed zakażeniami wirusem brodawczaka, jak też podejmowane są próby stworzenia preparatów o charakterze terapeutycznym. W badania te wpisuje się wykorzystanie szczepu *L. lactis* do ekspresji genu onkoproteiny E7 papilloma wirusa HPV-16. Eksperymenty przeprowadzone przez grupę badawczą Cortés-Pérez wykazały, że donosowa immunizacja samic myszy komórkami *L. lactis* eksponującymi na swej powierzchni antygen E7 indukuje wysoki poziom odpowiedzi komórkowej (IL-2 oraz IFN- γ) [17]. Użyty prototyp szczepionkowy nieco zmodyfikowano, co doprowadziło do znaczącego wzrostu specyficznej odpowiedzi immunologicznej typu komórkowego. Razem z komórkami *L. lactis* prezentującymi na swojej powierzchni białko E7 podano komórki *L. lactis* produkujące rekombinowaną IL-12 [8]. Cytokina ta wywiera silne immunomodulujące działanie obejmujące stymulację wydzielania IFN- γ , hamowanie gałęzi Th2 i stymulację Th1 [4, 62]. IL-12 przeciwdziała również angiogenezie i podana miejscowo powoduje regresję istniejących guzów i ograniczenie przerzutów na modelu mysim. Takie jej właściwości powodują, że jest ona brana pod uwagę w immunoterapii nowotworów. Podanie myszom donosowo szczepów *L. lactis* (scIL-12) i *L. lactis* (E7) zapewniło znaczącą ochronę przeciwko rozwojowi raka u myszy, którym podano podskórnice TC1/E7 (*E7-expressing TC-1 tumor cell line*) – komórki nowotworowe, które umożliwiają ekspresję białka E7 na letalnym poziomie [6]. Zaobserwowano również, że aplikacja tych szczepów zwierzętom z nowotworami zaindukowanymi przez podanie TC1/E7 prowadzi do znaczącej regresji nowotworów w porównaniu z grupą kontrolną [6]. Wskazuje to na możliwość zastosowania LAB zarówno w profilaktyce jak i terapii antynowotworowej.

6. Podsumowanie

Od pierwszego doniesienia dotyczącego wykorzystania bakterii kwasu mlekowego jako wektora szczepionkowego minęło wiele lat. W ciągu tego czasu opublikowano wiele badań, w których stosowano bakterie kwasu mlekowego jako nośniki obcych antygenów do immunizacji głównie przeciwko patogenom wnikającym do organizmu człowieka poprzez błony śluzowe układu oddechowego oraz pokarmowego. Prezentowane wyniki badań są trudne do porównywania oraz interpretacji ze względu na ogromną różnorodność fizjologii w obrębie bakterii z grupy LAB. Charakteryzuje je różna zdolność do przetrwania w środowisku jelitowym. Interakcje bakterii z powierzchnią nabłonkową oraz komórkami układu limfatycznego także mogą być odmienne u poszczególnych szczepów nawet tego samego gatunku. Podsumowując, należy podkreślić, że prawdopodobnie dla różnych szczepionek wykorzystujących LAB jako nośniki antygenów konieczne będzie opracowywanie odmiennych pod względem lokalizacji antygeny w komórce nośnika konstruktów genetycznych oraz schematów immunizacji.

Podziękowania

Praca powstała w wyniku realizacji projektu badawczego o nr 2011/03/B/NZ1/00592 finansowanego ze środków Narodowego Centrum Nauki.

Piśmiennictwo

- Aggarwal J., Swami G., Kumar M.: Probiotics and their Effects on Metabolic Diseases: An Update. *J. Clin. Diagn. Res.* **7**, 173–177 (2013)
- Audouy S.A., van Roosmalen M.L., Neef J., Kanninga R., Post E., van Deemter M., Metselaar H., van Selm S., Robillard G.T., Leenhouts K.J. *et al.*: *Lactococcus lactis* GEM particles displaying pneumococcal antigens induce local and systemic immune responses following intranasal immunization. *Vaccine*, **24**, 5434–5441 (2006)
- Audouy S.A., van Selm S., van Roosmalen M.L., Post E., Kanninga R., Neef J., Esteveo S., Nieuwenhuis E.E., Adrian P.V., Leenhouts K. *et al.*: Development of lactococcal GEM-based pneumococcal vaccines. *Vaccine*, **25**, 2497–2506 (2007)
- Barth H., Klein R., Berg P.A., Wiedenmann B., Hopf U., Berg T.: Induction of T helper cell type 1 response and elimination of HBeAg during treatment with IL-12 in a patient with therapy-refractory chronic hepatitis B. *Hepatogastroenterology*, **48**, 553–555 (2001)
- Berlec A., Zadavec P., Jevnikar Z., Strukelj B.: Identification of candidate carrier proteins for surface display on *Lactococcus lactis* by theoretical and experimental analyses of the surface proteome. *Appl. Environ. Microbiol.* **77**, 1292–1300 (2011)
- Bermudez-Humaran L.G., Cortes-Perez N.G., Lefevre F., Guimaraes V., Rabot S., Alcocer-Gonzalez J.M., Gratadoux J.J., Rodriguez-Padilla C., Tamez-Guerra R.S., Corthier G. *et al.*: A novel mucosal vaccine based on live Lactococci expressing E7 antigen and IL-12 induces systemic and mucosal immune responses and protects mice against human papillomavirus type 16-induced tumors. *J. Immunol.* **175**, 7297–7302 (2005)
- Bermudez-Humaran L.G., Kharrat P., Chatel J.M., Langella P.: Lactococci and lactobacilli as mucosal delivery vectors for therapeutic proteins and DNA vaccines. *Microb. Cell Fact.* **10** Suppl 1, S4 (2011)
- Bermudez-Humaran L.G., Langella P., Cortes-Perez N.G., Gruss A., Tamez-Guerra R.S., Oliveira S.C., Saucedo-Cardenas O., Montes de Oca-Luna R., Le Loir Y.: Intranasal immunization with recombinant *Lactococcus lactis* secreting murine interleukin-12 enhances antigen-specific Th1 cytokine production. *Infect. Immun.* **71**, 1887–1896 (2003)
- Bermudez-Humaran L.G., Langella P., Miyoshi A., Gruss A., Guerra R.T., Montes de Oca-Luna R., Le Loir Y.: Production of human papillomavirus type 16 E7 protein in *Lactococcus lactis*. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**, 917–922 (2002)
- Besselink M.G., van Santvoort H.C., Buskens E., Boermeester M.A., van Goor H., Timmerman H.M., Nieuwenhuijs V.B., Bollen T.L., van Ramshorst B., Witteman B.J. *et al.*: Probiotic prophylaxis in predicted severe acute pancreatitis: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet*, **371**, 651–659 (2008)
- Bolotin A., Mauger S., Malarme K., Ehrlich S.D., Sorokin A.: Low-redundancy sequencing of the entire *Lactococcus lactis* IL1403 genome. *Antonie Van Leeuwenhoek*, **76**, 27–76 (1999)
- Bosma T., Kanninga R., Neef J., Audouy S.A., van Roosmalen M.L., Steen A., Buist G., Kok J., Kuipers O.P., Robillard G. *et al.*: Novel surface display system for proteins on non-genetically modified Gram-positive bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**, 880–889 (2006)
- Braat H., Rottiers P., Hommes D.W., Huyghebaert N., Remaut E., Remon J.P., van Deventer S.J., Neiryck S., Peppelenbosch M.P., Steidler L.: A phase I trial with transgenic bacteria expressing interleukin-10 in Crohn's disease. *Clin. Gastroenterol. Hepatol.* **4**, 754–759 (2006)
- Buruiana F.E., Solà I., Alonso-Coello P.: Recombinant human interleukin 10 for induction of remission in Crohn's disease. *Cochrane Database of Systematic Reviews* (2010)
- Call E.K., Klaenhammer T.R.: Relevance and application of sortase and sortase-dependent proteins in lactic acid bacteria. *Front. Microbiol.* **4**, 73 (2013)
- Chatel J.M., Pothelune L., Ah-Leung S., Corthier G., Wal J.M., Langella P.: *In vivo* transfer of plasmid from food-grade transiting lactococci to murine epithelial cells. *Gene Ther.* **15**, 1184–1190 (2008)
- Cortes-Perez N.G., Bermudez-Humaran L.G., Le Loir Y., Rodriguez-Padilla C., Gruss A., Saucedo-Cardenas O., Langella P., Montes-de-Oca-Luna R.: Mice immunization with live lactococci displaying a surface anchored HPV-16 E7 oncoprotein. *FEMS Microbiol. Lett.* **229**, 37–42 (2003)
- Cortes-Perez N.G., Lefevre F., Corthier G., Adel-Patient K., Langella P., Bermudez-Humaran L.G.: Influence of the route of immunization and the nature of the bacterial vector on immunogenicity of mucosal vaccines based on lactic acid bacteria. *Vaccine*, **25**, 6581–6588 (2007)
- Corthes B., Boris S., Isler P., Grangette C., Mercenier A.: Oral immunization of mice with lactic acid bacteria producing *Helicobacter pylori* urease B subunit partially protects against challenge with *Helicobacter felis*. *J. Infect. Dis.* **192**, 1441–1449 (2005)
- Daniel C., Roussel Y., Kleerebezem M., Pot B.: Recombinant lactic acid bacteria as mucosal biotherapeutic agents. *Trends Biotechnol.* **29**, 499–508 (2011)
- Daudel D., Weidinger G., Spreng S.: Use of attenuated bacteria as delivery vectors for DNA vaccines. *Expert Rev. Vaccines*, **6**, 97–110 (2007)

22. de Azevedo M., Karczewski J., Lefevre F., Azevedo V., Miyoshi A., Wells J.M., Langella P., Chatel J.M.: *In vitro* and *in vivo* characterization of DNA delivery using recombinant *Lactococcus lactis* expressing a mutated form of *L. monocytogenes* Internalin A. *BMC Microbiol.* **12**, 299 (2012)
23. de Vos W.M.: Systems solutions by lactic acid bacteria: from paradigms to practice. *Microb. Cell Fact.* **10 Suppl 1**, S2 (2011)
24. Delcenserie V., Martel D., Lamoureux M., Amiot J., Boutin Y., Roy D.: Immunomodulatory effects of probiotics in the intestinal tract. *Curr. Issues Mol. Biol.* **10**, 37–54 (2008)
25. Dieye Y., Usai S., Clier F., Gruss A., Piard J.C.: Design of a protein-targeting system for lactic acid bacteria. *J. Bacteriol.* **183**, 4157–4166 (2001)
26. FAO/WHO: Health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria, http://www.who.int/foodsafety/publications/fs_management/en/probiotics.pdf (15 października 2014 roku)
27. Ferreira D.M., Miyaji E.N., Oliveira M.L., Darrieux M., Areas A.P., Ho P.L., Leite L.C.: DNA vaccines expressing pneumococcal surface protein A (PspA) elicit protection levels comparable to recombinant protein. *J. Med. Microbiol.* **55**, 375–378 (2006)
28. Fontana L., Bermudez-Brito M., Plaza-Diaz J., Munoz-Quezada S., Gil A.: Sources, isolation, characterisation and evaluation of probiotics. *Br. J. Nutr.* **109 Suppl 2**, S35–50 (2013)
29. Frossard C.P., Steidler L., Eigenmann P.A.: Oral administration of an IL-10-secreting *Lactococcus lactis* strain prevents food-induced IgE sensitization. *J. Allergy Clin. Immunol.* **119**, 952–959 (2007)
30. Grangette C., Muller-Alouf H., Geoffroy M., Goudercourt D., Turneer M., Mercenier A.: Protection against tetanus toxin after intragastric administration of two recombinant lactic acid bacteria: impact of strain viability and *in vivo* persistence. *Vaccine*, **20**, 3304–3309 (2002)
31. Grangette C., Muller-Alouf H., Goudercourt D., Geoffroy M.C., Turneer M., Mercenier A.: Mucosal immune responses and protection against tetanus toxin after intranasal immunization with recombinant *Lactobacillus plantarum*. *Infect. Immun.* **69**, 1547–1553 (2001)
32. Grangette C., Muller-Alouf H., Hols P., Goudercourt D., Delcour J., Turneer M., Mercenier A.: Enhanced mucosal delivery of antigen with cell wall mutants of lactic acid bacteria. *Infect. Immun.* **72**, 2731–2737 (2004)
33. Guimaraes V.D., Innocentin S., Lefevre F., Azevedo V., Wal J.M., Langella P., Chatel J.M.: Use of native lactococci as vehicles for delivery of DNA into mammalian epithelial cells. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**, 7091–7097 (2006)
34. Hamady Z.Z.: Novel xylan-controlled delivery of therapeutic proteins to inflamed colon by the human anaerobic commensal bacterium. *Ann. R. Coll. Surg. Engl.* **95**, 235–240 (2013)
35. Hanniffy S.B., Carter A.T., Hitchin E., Wells J.M.: Mucosal delivery of a pneumococcal vaccine using *Lactococcus lactis* affords protection against respiratory infection. *J. Infect. Dis.* **195**, 185–193 (2007)
36. Hugentobler F., Di Roberto R.B., Gillard J., Cousineau B.: Oral immunization using live *Lactococcus lactis* co-expressing LACK and IL-12 protects BALB/c mice against *Leishmania major* infection. *Vaccine*, **30**, 5726–5732 (2012)
37. Hugentobler F., Yam K.K., Gillard J., Mahbuba R., Olivier M., Cousineau B.: Immunization against *Leishmania major* infection using LACK- and IL-12-expressing *Lactococcus lactis* induces delay in footpad swelling. *PLoS One*, **7**, e30945 (2012)
38. Innocentin S., Guimaraes V., Miyoshi A., Azevedo V., Langella P., Chatel J.M., Lefevre F.: *Lactococcus lactis* expressing either *Staphylococcus aureus* fibronectin-binding protein A or *Listeria monocytogenes* internalin A can efficiently internalize and deliver DNA in human epithelial cells. *Appl. Environ. Microbiol.* **75**, 4870–4878 (2009)
39. Isolauri E., Salminen S., Ouwehand A.C.: Microbial-gut interactions in health and disease. Probiotics. *Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol.* **18**, 299–313 (2004)
40. Iwaki M., Okahashi N., Takahashi I., Kanamoto T., Sugita-Konishi Y., Aibara K., Koga T.: Oral immunization with recombinant *Streptococcus lactis* carrying the *Streptococcus mutans* surface protein antigen gene. *Infect. Immun.* **58**, 2929–2934 (1990)
41. Jijon H., Backer J., Diaz H., Yeung H., Thiel D., McKaigney C., De Simone C., Madsen K.: DNA from probiotic bacteria modulates murine and human epithelial and immune function. *Gastroenterology*, **126**, 1358–1373 (2004)
42. Kant R., Blom J., Palva A., Siezen R.J., de Vos W.M.: Comparative genomics of *Lactobacillus*. *Microb. Biotechnol.* **4**, 323–332 (2011)
43. Kim T.W., Igimi S., Kajikawa A., Kim H.Y.: Display of heterologous proteins on the surface of *Lactococcus lactis* using the H and W domain of PrtB from *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* as an anchoring matrix. *J. Appl. Microbiol.* **104**, 1636–1643 (2008)
44. Kuhbacher T., Ott S.J., Helwig U., Mimura T., Rizzello F., Kleessen B., Gionchetti P., Blaut M., Campieri M., Folsch U.R. *et al.*: Bacterial and fungal microbiota in relation to probiotic therapy (VSL#3) in pouchitis. *Gut*, **55**, 833–841 (2006)
45. Lee J., Seto D., Bielory L.: Meta-analysis of clinical trials of probiotics for prevention and treatment of pediatric atopic dermatitis. *J. Allergy Clin. Immunol.* **121**, 116–121 e111 (2008)
46. Lee M.H., Roussel Y., Wilks M., Tabaqchali S.: Expression of *Helicobacter pylori* urease subunit B gene in *Lactococcus lactis* MG1363 and its use as a vaccine delivery system against *H. pylori* infection in mice. *Vaccine*, **19**, 3927–3935 (2001)
47. Leone V.A., Cham C.M., Chang E.B.: Diet, gut microbes, and genetics in immune function: can we leverage our current knowledge to achieve better outcomes in inflammatory bowel diseases? *Curr. Opin. Immunol.* **31C**, 16–23 (2014)
48. Lim S.H., Jahanshahi F., Rahim R.A., Sekawi Z., Yusoff K.: Surface display of respiratory syncytial virus glycoproteins in *Lactococcus lactis* NZ9000. *Lett. Appl. Microbiol.* **51**, 658–664 (2010)
49. Linares D.M., Kok J., Poolman B.: Genome sequences of *Lactococcus lactis* MG1363 (revised) and NZ9000 and comparative physiological studies. *J. Bacteriol.* **192**, 5806–5812 (2010)
50. Lorea Baroja M., Kirjavainen P.V., Hekmat S., Reid G.: Anti-inflammatory effects of probiotic yogurt in inflammatory bowel disease patients. *Clin. Exp. Immunol.* **149**, 470–479 (2007)
51. Marelli B., Perez A.R., Banchio C., de Mendoza D., Magni C.: Oral immunization with live *Lactococcus lactis* expressing rotavirus VP8 subunit induces specific immune response in mice. *J. Virol. Methods*. **175**, 28–37 (2011)
52. Marinho F.A., Pacifico L.G., Miyoshi A., Azevedo V., Le Loir Y., Guimaraes V.D., Langella P., Cassali G.D., Fonseca C.T., Oliveira S.C.: An intranasal administration of *Lactococcus lactis* strains expressing recombinant interleukin-10 modulates acute allergic airway inflammation in a murine model. *Clin. Exp. Allergy*, **40**, 1541–1551 (2010)
53. Martin R., Miquel S., Ulmer J., Kechaou N., Langella P., Bermudez-Humaran L.G.: Role of commensal and probiotic bacteria in human health: a focus on inflammatory bowel disease. *Microb. Cell Fact.* **12**, 71 (2013)
54. Matsumoto S., Hara T., Hori T., Mitsuyama K., Nagaoka M., Tomiyasu N., Suzuki A., Sata M.: Probiotic *Lactobacillus*-induced improvement in murine chronic inflammatory bowel disease is associated with the down-regulation of pro-inflammatory cytokines in lamina propria mononuclear cells. *Clin. Exp. Immunol.* **140**, 417–426 (2005)

55. Medina M., Villena J., Vintini E., Hebert E.M., Raya R., Alvarez S.: Nasal immunization with *Lactococcus lactis* expressing the pneumococcal protective protein A induces protective immunity in mice. *Infect. Immun.* **76**, 2696–2705 (2008)
56. Messaoudi S., Kergourlay G., Dalgalarondo M., Choiset Y., Ferchichi M., Prevost H., Pilet M.F., Chobert J.M., Manai M., Dousset X.: Purification and characterization of a new bacteriocin active against *Campylobacter* produced by *Lactobacillus salivarius* SMXD51. *Food Microbiol.* **32**, 129–134 (2012)
57. Moffitt K.L., Malley R.: Next generation pneumococcal vaccines. *Curr. Opin. Immunol.* **23**, 407–413 (2011)
58. Mohamadzadeh M., Duong T., Sandwick S.J., Hoover T., Klaenhammer T.R.: Dendritic cell targeting of *Bacillus anthracis* protective antigen expressed by *Lactobacillus acidophilus* protects mice from lethal challenge. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **106**, 4331–4336 (2009)
59. Mohamadzadeh M., Durmaz E., Zadeh M., Pakanati K.C., Gramarossa M., Cohran V., Klaenhammer T.R.: Targeted expression of anthrax protective antigen by *Lactobacillus gasseri* as an anthrax vaccine. *Future Microbiol.* **5**, 1289–1296 (2010)
60. Moorthy G., Ramasamy R.: Mucosal immunisation of mice with malaria protein on lactic acid bacterial cell walls. *Vaccine*, **25**, 3636–3645 (2007)
61. Motta J.P., Bermudez-Humaran L.G., Deraison C., Martin L., Rolland C., Rousset P., Boue J., Dietrich G., Chapman K., Kharrat P. et al.: Food-grade bacteria expressing elafin protect against inflammation and restore colon homeostasis. *Sci. Transl. Med.* **4**, 158ra144 (2012)
62. Nastala C.L., Edington H.D., McKinney T.G., Tahara H., Nalesnik M.A., Brunda M.J., Gately M.K., Wolf S.F., Schreiber R.D., Storkus W.J. et al.: Recombinant IL-12 administration induces tumor regression in association with IFN- γ production. *J. Immunol.* **153**, 1697–1706 (1994)
63. National Center for Biotechnology Information, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?id=1578> (2 lutego 2015 roku)
64. Okano K., Zhang Q., Kimura S., Narita J., Tanaka T., Fukuda H., Kondo A.: System using tandem repeats of the cA peptidoglycan-binding domain from *Lactococcus lactis* for display of both N- and C-terminal fusions on cell surfaces of lactic acid bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **74**, 1117–1123 (2008)
65. Oliveira M.L., Areas A.P., Campos I.B., Monedero V., Perez-Martinez G., Miyaji E.N., Leite L.C., Aires K.A., Lee Ho P.: Induction of systemic and mucosal immune response and decrease in *Streptococcus pneumoniae* colonization by nasal inoculation of mice with recombinant lactic acid bacteria expressing pneumococcal surface antigen A. *Microbes Infect.* **8**, 1016–1024 (2006)
66. Perez C.A., Eichwald C., Burrone O., Mendoza D.: Rotavirus vp7 antigen produced by *Lactococcus lactis* induces neutralizing antibodies in mice. *J. Appl. Microbiol.* **99**, 1158–1164 (2005)
67. Pontes D., Azevedo M., Innocentin S., Blugeon S., Lefevre F., Azevedo V., Miyoshi A., Courtin P., Chapot-Chartier M.P., Langella P. et al.: Immune response elicited by DNA vaccination using *Lactococcus lactis* is modified by the production of surface exposed pathogenic protein. *PLoS One*, **9**, e84509 (2014)
68. Pontes D., Innocentin S., Del Carmen S., Almeida J.F., Leblanc J.G., de Moreno de Leblanc A., Blugeon S., Cherbuy C., Lefevre F., Azevedo V. et al.: Production of Fibronectin Binding Protein A at the surface of *Lactococcus lactis* increases plasmid transfer *in vitro* and *in vivo*. *PLoS One*, **7**, e44892 (2012)
69. Ramasamy R., Yasawardena S., Zomer A., Venema G., Kok J., Leenhouts K.: Immunogenicity of a malaria parasite antigen displayed by *Lactococcus lactis* in oral immunisations. *Vaccine*, **24**, 3900–3908 (2006)
70. Ramirez K., Ditamo Y., Rodriguez L., Picking W.L., van Roosmalen M.L., Leenhouts K., Pasetti M.F.: Neonatal mucosal immunization with a non-living, non-genetically modified *Lactococcus lactis* vaccine carrier induces systemic and local Th1-type immunity and protects against lethal bacterial infection. *Mucosal Immunol.* **3**, 159–171 (2010)
71. Ravnikar M., Strukelj B., Obermajer N., Lunder M., Berlec A.: Engineered lactic acid bacterium *Lactococcus lactis* capable of binding antibodies and tumor necrosis factor alpha. *Appl. Environ. Microbiol.* **76**, 6928–6932 (2010)
72. Rembacken B.J., Snelling A.M., Hawkey P.M., Chalmers D.M., Axon A.T.: Non-pathogenic *Escherichia coli* versus mesalazine for the treatment of ulcerative colitis: a randomised trial. *Lancet*, **354**, 635–639 (1999)
73. Reveneau N., Geoffroy M.C., Loch C., Chagnaud P., Mercenier A.: Comparison of the immune responses induced by local immunizations with recombinant *Lactobacillus plantarum* producing tetanus toxin fragment C in different cellular locations. *Vaccine*, **20**, 1769–1777 (2002)
74. Ribeiro L.A., Azevedo V., Le Loir Y., Oliveira S.C., Dieye Y., Piard J.C., Gruss A., Langella P.: Production and targeting of the *Brucella abortus* antigen L7/L12 in *Lactococcus lactis*: a first step towards food-grade live vaccines against brucellosis. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**, 910–916 (2002)
75. Saluja V., Amorij J.P., van Roosmalen M.L., Leenhouts K., Huckriede A., Hinrichs W.L., Frijlink H.W.: Intranasal delivery of influenza subunit vaccine formulated with GEM particles as an adjuvant. *AAPS J.* **12**, 109–116 (2010)
76. Saluja V., Visser M.R., Ter Veer W., van Roosmalen M.L., Leenhouts K., Hinrichs W.L., Huckriede A., Frijlink H.W.: Influenza antigen-sparing by immune stimulation with Gram-positive enhancer matrix (GEM) particles. *Vaccine*, **28**, 7963–7969 (2010)
77. Schoen C., Loeffler D.I., Frentzen A., Pilgrim S., Goebel W., Stritzker J.: *Listeria monocytogenes* as novel carrier system for the development of live vaccines. *Int. J. Med. Microbiol.* **298**, 45–58 (2008)
78. Shida K., Nanno M.: Probiotics and immunology: separating the wheat from the chaff. *Trends Immunol.* **29**, 565–573 (2008)
79. Shida K., Nanno M., Nagata S.: Flexible cytokine production by macrophages and T cells in response to probiotic bacteria: a possible mechanism by which probiotics exert multifunctional immune regulatory activities. *Gut Microbes*, **2**, 109–114 (2011)
80. Steidler L., Hans W., Schotte L., Neiryneck S., Obermeier F., Falk W., Fiers W., Remaut E.: Treatment of murine colitis by *Lactococcus lactis* secreting interleukin-10. *Science*, **289**, 1352–1355 (2000)
81. Steidler L., Neiryneck S., Huyghebaert N., Snoeck V., Vermeire A., Goddeeris B., Cox E., Remon J.P., Remaut E.: Biological containment of genetically modified *Lactococcus lactis* for intestinal delivery of human interleukin 10. *Nat. Biotechnol.* **21**, 785–789 (2003)
82. Steidler L., Robinson K., Chamberlain L., Schofield K.M., Remaut E., Le Page R.W., Wells J.M.: Mucosal delivery of murine interleukin-2 (IL-2) and IL-6 by recombinant strains of *Lactococcus lactis* coexpressing antigen and cytokine. *Infect. Immun.* **66**, 3183–3189 (1998)
83. Steidler L., Viaene J., Fiers W., Remaut E.: Functional display of a heterologous protein on the surface of *Lactococcus lactis* by means of the cell wall anchor of *Staphylococcus aureus* protein A. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**, 342–345 (1998)
84. Steidler L., Wells J.M., Raeymaekers A., Vandekerckhove J., Fiers W., Remaut E.: Secretion of biologically active murine interleukin-2 by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**, 1627–1629 (1995)

85. Svetoch E.A., Eruslanov B.V., Levchuk V.P., Perelygin V.V., Mitsevich E.V., Mitsevich I.P., Stepanshin J., Dyatlov I., Seal B.S., Stern N.J.: Isolation of *Lactobacillus salivarius* 1077 (NRRL B-50053) and characterization of its bacteriocin, including the antimicrobial activity spectrum. *Appl. Environ. Microbiol.* **77**, 2749–2754 (2011)
86. Vadesilho C.F., Ferreira D.M., Moreno A.T., Chavez-Olortegui C., Machado de Avila R.A., Oliveira M.L., Ho P.L., Miyaji E.N.: Characterization of the antibody response elicited by immunization with pneumococcal surface protein A (PspA) as recombinant protein or DNA vaccine and analysis of protection against an intranasal lethal challenge with *Streptococcus pneumoniae*. *Microb. Pathog.* **53**, 243–249 (2012)
87. van Asseldonk M., Rutten G., Oteman M., Siezen R.J., de Vos W.M., Simons G.: Cloning of *usp45*, a gene encoding a secreted protein from *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* MG1363. *Gene*, **95**, 155–160 (1990)
88. van Roosmalen M.L., Kanninga R., El Khattabi M., Neef J., Audouy S., Bosma T., Kuipers A., Post E., Steen A., Kok J. *et al.*: Mucosal vaccine delivery of antigens tightly bound to an adjuvant particle made from food-grade bacteria. *Methods*, **38**, 144–149 (2006)
89. Vandenbroucke K., Hans W., Van Huysse J., Neiryneck S., Demetter P., Remaut E., Rottiers P., Steidler L.: Active delivery of trefoil factors by genetically modified *Lactococcus lactis* prevents and heals acute colitis in mice. *Gastroenterology*, **127**, 502–513 (2004)
90. Villena J., Medina M., Racedo S., Alvarez S.: Resistance of young mice to pneumococcal infection can be improved by oral vaccination with recombinant *Lactococcus lactis*. *J. Microbiol. Immunol. Infect.* **43**, 1–10 (2010)
91. Villena J., Medina M., Raya R., Alvarez S.: Oral immunization with recombinant *Lactococcus lactis* confers protection against respiratory pneumococcal infection. *Can. J. Microbiol.* **54**, 845–853 (2008)
92. Villena J., Oliveira M.L., Ferreira P.C., Salva S., Alvarez S.: Lactic acid bacteria in the prevention of pneumococcal respiratory infection: future opportunities and challenges. *Int. Immunopharmacol.* **11**, 1633–1645 (2011)
93. Watterlot L., Rochat T., Sokol H., Cherbuy C., Bouloufa I., Lefevre F., Gratadoux J.J., Honvo-Hueto E., Chilmonczyk S., Blugeon S. *et al.*: Intragastric administration of a superoxide dismutase-producing recombinant *Lactobacillus casei* BL23 strain attenuates DSS colitis in mice. *Int. J. Food Microbiol.* **144**, 35–41 (2010)
94. Wegmann U., O'Connell-Motherway M., Zomer A., Buist G., Shearman C., Canchaya C., Ventura M., Goesmann A., Gasson M.J., Kuipers O.P. *et al.*: Complete genome sequence of the prototype lactic acid bacterium *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* MG1363. *J. Bacteriol.* **189**, 3256–3270 (2007)
95. Wiczorek A.S., Martin V.J.: Engineering the cell surface display of cohesins for assembly of cellulosome-inspired enzyme complexes on *Lactococcus lactis*. *Microb. Cell Fact.* **9**, 69 (2010)
96. Zadavec P., Mavric A., Bogovic Matijasic B., Strukelj B., Berlec A.: Engineering BmpA as a carrier for surface display of IgG-binding domain on *Lactococcus lactis*. *Protein Eng. Des. Sel.* **27**, 21–27 (2014)
97. Zeuthen L.H., Fink L.N., Frokiaer H.: Epithelial cells prime the immune response to an array of gut-derived commensals towards a tolerogenic phenotype through distinct actions of thymic stromal lymphopoietin and transforming growth factor-beta. *Immunology*, **123**, 197–208 (2008)
98. Zhang L., Li N., Caicedo R., Neu J.: Alive and dead *Lactobacillus rhamnosus* GG decrease tumor necrosis factor-alpha-induced interleukin-8 production in Caco-2 cells. *J. Nutr.* **135**, 1752–1756 (2005)
99. Zocco M.A., dal Verme L.Z., Cremonini F., Piscaglia A.C., Nista E.C., Candelli M., Novi M., Rigante D., Cazzato I.A., Ojetti V. *et al.*: Efficacy of *Lactobacillus* GG in maintaining remission of ulcerative colitis. *Aliment. Pharmacol. Ther.* **23**, 1567–1574 (2006)