Politechnika Gdańska

Wydział Chemiczny



Mgr inż. Artur Gąsior

Rozprawa doktorska pt.

Konstrukcja i wstępna ocena użyteczności szczepionki anty-Toxoplasma gondii opartej na chimerycznych fimbriach Escherichia coli typu Dr z epitopami antygenów SAG1, GRA1 lub MAG1

Promotor: prof. dr hab. Józef Kur

Katedra Mikrobiologii Wydziału Chemicznego Politechniki Gdańskiej

Gdańsk 2007

Lucynie, której zawsze mogłem "podbierać" bufory Składam serdeczne podziękowania mojemu promotorowi panu profesorowi Józefowi Kur za przekazanie mi tematu pracy, cennej i bogatej wiedzy oraz wnikliwą korektę niniejszej pracy.

Dziękuję także wszystkim koleżankom i kolegom z Katedry Mikrobiologii Wydziału Chemicznego Politechniki Gdańskiej za życzliwość i wspaniałą atmosferę pracy.

Lucynie za cierpliwość, współpracę, nieocenioną pomoc oraz uśmiech każdego dnia. Za trud wykształcenia, wsparcie (nie tylko duchowe) i wiarę we mnie, moim Rodzicom i Siostrom.

Spis treści

1.	Cel Pracy			
2.	Streszczenie			
3.	Wstęp	12		
3.1 3.2 3.3 3.4 3.5 3.6	 Taksonomia <i>Toxoplasma gondii</i> Cykl rozwojowy pasożyta <i>T. gondii</i> Budowa <i>T. gondii</i> Bioróżnorodność pasożyta Inwazja <i>T. gondii</i> Charakterystyka antygenowa pasożyta 3.6.1. Definicja antygenu 3.6.2. Antygeny <i>T. gondii</i> 3.6.3 Antygeny charakterystyczne dla tachyzoitów. 	12 12 15 18 19 22 22 22 22		
	 3.6.4. Antygeny charakterystyczne dla bradyzoitów	23 24 25 27		
3.7	 Toksoplazmoza	27 28 29 29 30 30		
3.8 3.8	 3.7.6. Leczenie toksoplazmozy	32 33 35 40 40		
3.9 3.1 3 3	 Bakteryjne systemy heterologiczne jako szczepionki	44 45 47 48 50 51		
3.1 3.1 3 3	 Charakterystyka adhezyn rodziny Dr	52 53 54 57 60 62		
4.	Materiały	65		
4.1 4.2 4.3 4.4 4.5	 Szczepy bakteryjne Materiał genetyczny Pożywki i podłoża bakteriologiczne Antybiotyki Enzymy i bufory 	65 65 66 67 67		
4.6 4.7 4.8 4.9 4.1	 Bufory i odczynniki do reakcji PCR Markery wielkości Roztwory i bufory do elektroforezy agarozowej Roztwory i bufory do elektroforezy poliakrylamidowej Inne bufory i roztwory 	68 70 70 71 71		

4	.11	. Bufory stosowane do oczyszczania białek metodą chromatografii	
		metalopowinowactwa i do regeneracji złoża	72
4	.12	. Bufory i odczynniki do techniki Western blotting	72
4	.13	. Bufory i odczynniki do testu ELISA	73
4	.14	. Odczynniki do izolacji białek podjednostkowych natywnych fimbrii Dr oraz	
		chimerycznych fimbrii Dr-epitop	74
4	.15	. Bufory i odczynniki do mikroskopii immunofluorescencyjnej	74
4	.16	. Materiały wykorzystane do badań na liniach komórkowych	74
4	.17	. Aparatura	75
5.	N	lletody	76
5	.1.	Hodowle baktervine	76
5	.2.	Amplifikacja fragmentu genu draE kodującego N-końcową część białka	
		adhezyny DraE z wprowadzonym epitopem białka SAG1, GRA1 lub MAG1	
	_	T. gondii	76
5	.3.	Amplifikacja fragmentu genu draE kodującego C-końcową część białka	
		adhezyny DraE	77
5	.4.	Techniki wykorzystywane przy klonowaniu fragmentów DNA	78
	5.4	4.1. Izolacja DNA plazmidowego wysokiej czystości	78
	5.4	4.2. Oczyszczanie DNA po reakcji trawienia enzymami restrykcyjnymi	78
	5.4	4.3. Izolacja fragmentu DNA z żelu agarozowego	78
	5.4	4.4. Reakcja trawienia DNA (insertów i wektorów do klonowania) enzymami	
		restrykcyjnymi	78
	5.4	4.5. Reakcja ligacji DNA wektora z insertem	78
5	.5.	Sekwencjonowanie DNA plazmidowego	79
5	.6.	Transformacja komórek <i>E. coli</i> plazmidowym DNA	79
5	.7.	Techniki elektroforetyczne	79
	5.	7.1. Elektroforeza w żelu agarozowym	79
	5.	7.2. Elektroforeza białek w żelu poliakrylamidowym w warunkach	
	_	denaturujacych (SDS-PAGE)	79
5	.8.	Ekspresja genów kodujących poszczególne białka rekombinantowe T. gondii	
_	_	w układzie Tabora-Studiera	79
5	.9.	Oczyszczanie białek rekombinantowych metodą chromatografii	
_		metalopowinowactwa	80
5	.10	Elektrotransformacja komorek <i>E. coli</i> BL21(DE3) DNA plazmidu pCC90 lub	~ 4
_		E. coli BL21(DE3)pCC90D54Stop DNA plazmidu pDraE-epitop	81
5	.11	. Ekspresja i izolacja natywnych fimbrii typu Dr i chimerycznych fimbrii	~ .
_		Dr-epitop	81
5	.12		82
5	.13	. Oznaczanie stężenia białka	82
5	.14		82
	5.	14.1. Test Western blotting	82
	5.	14.2. Test ELISA	83
_	5.	14.3. Mikroskopia immunofulorescencyjna	84
5	.15	. Badania na liniach komorkowych	85
	5.	15.1. Prowadzenie hodowli komorek HeLa	85
	5.	15.2. Badanie zdolności adhezji komorek <i>E. coli</i> do powierzchni komorek HeLa	86
	5.	15.3. Badanie zdolności wiązania chimerycznego białka DraE-epitop do	~~
_		powierzchni komorek HeLa	86
5	.16	. Badania na zwierzętach	87
5	.17	. Programy komputerowe	88
6.	V	Vyniki	89
6	.1.	Fimbrie jako szczepionka	89
6	.2.	Konstrukcja ekspresyjnego plazmidu rekombinantowego pDraE-epitop	90

(6.2.1.	Amplifikacja DNA fragmentów genu <i>draE</i> kodujących C- i N-końcową cześć białka adhezyny DraE z wprowadzona sekwencja kodujaca	
		odpowiedni epitop białek pasożyta <i>T. gondii</i>	90
(6.2.2.	Konstrukcia DNA plazmidów rekombinantowych pUC19-epitopA	93
(5.2.3.	Konstrukcja DNA plazmidów rekombinantowych pUC19-epitopB	94
(6.2.4.	Konstrukcja DNA rekombinantowych plazmidów ekspresyjnych pDraE-	
		epitop	95
6.3	3. Eks	spresja genu kodującego rekombinantowe białko DraE-epitop w	
	kor	mórkach <i>E. coli</i> BL21(DE3)	101
6.4	Imr	munoidentyfikacja białek DraE-epitop metodą Western blotting	102
6.5	5. Pro	odukcja natywnych fimbrii typu Dr i chimerycznych fimbrii typu Dr-epitop	
	ora	zizolacja fimbrialnych białek podjednostkowych DraE i DraE-epitop	103
6.6	6. Imr	munoidentyfikacja białka DraE-epitop metodą ELISA z wykorzystaniem	
	prz	eciwciał anty-epitop	106
6.7	. Ва	danie zdolności tworzenia struktur fimbrialnych przez białka DraE-epitop	407
~ ~		/ykorzystaniem metody western blotting	107
6.8	з. ва	danie zdoiności tworzenia struktur fimorialnych przez białka DraE-epitop	100
6.0		/ykorzystaniem metody sączenia molekularnego	100
0.8	7. Da	udille zuolilosci twoizenia struktur nindilainych pizez diatka Diae-epitop	111
6 1	2 W 0 Ra	danie zdolpości adbezujnych chimerycznych białek DraE-enitop do	
0.1	no. Da	wierzchni komórek Hel a	112
6 1	1 Ba	danie skuteczności chimerycznych fimbrii Dr oraz białek rekombinantowy	
0.1	SA	G1. MAG1 i GRA1 jako szczepionki	.115
(6.11.1	. Otrzymanie białek do szczepień zwierzat.	
(6.11.2	. Immunizacia myszy oraz przeprowadzenie testu ELISA	118
(6.11.3	. Immunizacja myszy i zarażenie <i>T. gondii</i> szczepem DX	125
6.1	2. Prć	bba uzyskania preparatów fimbrialnych DraE-epitop o wysokim stopniu	
	pol	imeryzacji	128
(6.12.1	. Konstrukcja DNA plazmidu rekombinantowego pDraE-GRA1N oraz	
		pDraE-SAG1N	131
(6.12.2	. Ekspresja genu kodującego chimeryczne fimbrie typu DraE-epitop-now	y134
(6.12.3	. Badanie zdolności tworzenia struktur polimerycznych przez białka DraE	-
		epitop-nowe z wykorzystaniem metody Western blotting	134
(5.12.4	. Badanie zdolności tworzenia struktur fimbrialnych przez białka	
		DraE-epitop-nowy z wykorzystaniem metody sączenia molekularnego	135
7.	Pods	umowanie i wnioski końcowe	137
8.	Doro	bek naukowy. Nagrody i wyróżnienia	139
9.	Opis	stosowanych skrótów	142
10.	Litera	atura	143

1. Cel Pracy

Celem pracy było otrzymanie preparatów chimerycznych fimbrii typu Drepitop zbudowanych z podjednostek białkowych adhezyny DraE z wprowadzonymi sekwencjami epitopowymi pochodzącymi z białek pasożyta *Toxoplasma gondii*, produkowanych na powierzchni komórek bakteryjnych *Escherichia coli*. Otrzymane preparaty chimerycznych fimbrii testowano na ich przydatność jako szczepionki przeciwko zarażeniu *T. gondii* na liniach komórkowych oraz na zwierzętach.

2. Streszczenie

Toksoplazmoza wywoływana przez pierwotniaka pasożytniczego Toxoplasma gondii jest jednym z najbardziej rozpowszechnionych zarażeń na świecie. Inwazja ta występuje u wszystkich zwierząt stałocieplnych i u 1/3 ludności świata. Stanowi ponadto bardzo poważny problem weterynaryjny, ponieważ jest główną przyczyną strat reprodukcyjnych w hodowli zwierząt (głównie owiec). Najlepszą formą walki z tą inwazją pasożytniczą byłyby szczepienia ochronne, ponieważ leczenie zarażenia jest skomplikowane i długotrwałe. Próby opracowania skutecznych szczepionek przeciwko T. gondii dla ludzi i zwierząt były jak dotychczas mało pomyślne. Nie udało się opracować szczepionki skutecznie chroniącej człowieka przed zarażeniem T. gondii. Natomiast jedyną szczepionką stosowaną w weterynarii jest preparat zawierający atenuowane tachyzoity pasożyta. Szczepionka ta jednak nie chroni przed pionową transmisją choroby, ponadto jest kosztowana i powoduje efekty uboczne, a ochrona zwierząt nie trwa dłużej niż 3 lata. Wraz z rozwojem inżynierii genetycznej i biologii molekularnej pojawiła się możliwość nowych strategii w konstruowaniu "idealnej" szczepionki, która będzie całkowicie bezpieczna dla gospodarza, tania, łatwa w podawaniu oraz zdolna do indukcji szerokiej odpowiedzi immunologicznej.

W oparciu o modelowy system konstrukcji chimerycznych fimbrii *Escherichia coli* opracowany w Katedrze Mikrobiologii Politechniki Gdańskiej otrzymano systemy ekspresji chimerycznych fimbrii typu DraE-epitop, zbudowanych z podjednostek białkowych adhezyny DraE z epitopami pochodzącymi z antygenów SAG1, MAG1 oraz GRA1 *T. gondii.*

Fimbrie typu Dr produkowane są przez uropatogenne szczepy *Escherichia coli* odpowiedzialne za infekcje układu moczowego u ludzi. Biorąc pod uwagę fakt, że są to organella powierzchniowe oraz, że ich liczba na powierzchni pojedynczej komórki wynosi około 500, można przypuszczać, że będą one bardzo dobrymi immunogenami. Fimbria typu Dr jest homopolimerem zbudowanym z białka podjednostkowego DraE, które zawiera silnie zakonserwowane sekwencje aminokwasowe na N- i C-końcu białka. Między tymi zakonserwowanymi sekwencjami znajduje się region, którego zamiana w układzie modelowym nie powoduje zaburzenia w biogenezie fimbrii. W trakcie

produkcję prowadzonych badań chimerycznych białek DraE-epitop potwierdzono metodą Western blotting z użyciem przeciwciał anty-DraE, a sekwencji obecność wprowadzonych epitopowych z wykorzystaniem przeciwciał anty-epitop i metody ELISA. Analiza właściwości chimerycznych białek DraE z wykorzystaniem mikroskopii immunofluorescencyjnej, sączenia molekularnego, a także badań na liniach komórkowych wykazała znacznie niższe zdolności polimeryzacyjne białek DraE-epitop w porównaniu z białkiem DraE dzikiego typu. Wykazano jednak, że chimeryczne białka DraE-epitop nie straciły naturalnej zdolności wiązania się z receptorem komórkowym DAF (ang. decay-accelerating factor). Dzięki temu możliwe było ich wykorzystanie do immunizacji zwierząt. Jednakże, uzyskane wyniki wykazały słabe właściwości protekcyjne i dużą toksyczność chimerycznych fimbrii typu Dr, co może wskazywać na ich nieprzydatność jako szczepionka przeciwko toksoplazmozie. Znaczne lepsze właściwości protekcyjne uzyskano dla preparatów rekombinantowych antygenów T. gondii.

Summary

Toxoplasmosis caused by intracellular protozoan parasite Toxoplasma gondii is widespread throughout the world. T. gondii infected all warm-blooded animals and nearly one-third of human population. This infects occurs asymptomatically in most individuals, but causes serious morbidity and mortality in fetuses and adult immunocompromised patients and livestock. Toxoplasmosis is very serious veterinary problem, which causes reproduction waste of domestic animals (especially sheep). Treatment of T. gondii infection is long-lasting and expensive and for this reason vaccination would be the best way to prevent toxoplasmosis. Attempts to construct effective vaccines against T. gondii infection for human and animals were not successful. There is the only one anti-parasite vaccine for sheep commercially available, consist of live attenuated T. gondii strain S48 tachyzoites. Production of this vaccine is labourintensive and expensive and protection persists only three years. Development of molecular biology and genetics engineering methods allows for construction of completely safe for host vaccines easy to use and able to induce wide range of immunological response vaccines in cheaper way. The wealth of information in genomics, proteomics and immunology creates new possibilities for vaccine production.

The model expression system for Dr chimeric fimbriae previously, established at Department of Microbiology of Gdansk University of Technology was elaborated. This system was applied to create a new chimeric fimbriae (DraE-epitops) consist of DraE fimbrial structural subunits with epitopes derived from SAG1, MAG1 and GRA1 antigens of *T. gondii.*

E. coli strains bearing Dr fimbriae are associated with human urinary tract infections. Fimbriae are long, thread-like surface organelles, found in as many as 500 copies per cell. Each fimbrial fiber is a polymer composed of hundreds of structural subunits. Thus, expression of a foreign epitope in a fimbrial structural subunit may result in the production of an enormous number of copies of the antigen of interest. For this reason fimbriae can be a very good immunogens.

Dr fimbriae has N- and C-terminal conserved sequences. The insertion between these sequences was not critical in the subunit-subunit interaction or in

bioassembly of the fimbriae in model system. Expression of gene encoding DraE-epitope subunit was confirmed by Western blotting analysis with anti-DraE antibodies. The inserted epitopes was recognized by specific anti-epitopes antibodies as evidenced by ELISA test. However, immunofluorescence microscopy, gel filtration chromatography analysis and cell binding assay between HeLa cells and *E. coli* strains expressing native Dr fimbriae and chimeric Dr fimbriae demonstrated worse polymerization properties of chimeric DraE-epitope than native DraE adhesin. The possibility of binding of DraE-epitopes protein to DAF receptor (decay-accelerating factor) was proved in this study. Therefore this construct might be useful to animal's immunization. However, the preliminary results demonstrated weak protective property of potential vaccine and considerable toxicity. Much better results for recombinant antigens of *T. gondii* were obtained.

3. Wstęp

3.1. Taksonomia Toxoplasma gondii

Pierwotniaka *Toxoplasma gondii* wykryto w 1908 roku u afrykańskiego gryzonia *Ctenodactylus gondii*. Jest to kosmopolityczny, wewnątrzkomórkowy pasożyt, który rozwija się w komórkach wielu gatunków zwierząt stałocieplnych oraz człowieka. Podział systematyczny umieszcza go w typie Apicomplexa (Rys. 1).

Nadkrólestwo: Eucaryota				
Królestwo:	Protista=Protocista			
Dział:	Protozoa (Pierwotniaki)			
Тур:	Apicomplexa			
Gromada:	Coccidea			
Rząd:	Eimerida			
Rodzina:	Eimeriidea			
Rodzaj:	Toxoplasma			
Gatunek:	gondii			

Rys. 1. Taksonomia T. gondii.

3.2. Cykl rozwojowy pasożyta T. gondii

W cyklu życiowym *T. gondii* wyróżniamy trzy zasadnicze formy rozwojowe: wegetatywną, szybko namnażającą się zwaną tachyzoitem (*tachos* gr. szybki), cystę tkankową zawierającą wewnątrz bradyzoity (*bradys* gr. powolny) oraz formę przetrwalną pasożyta zwaną oocystą (Rys. 2). Rozwój *T. gondii* w organizmie żywiciela może przebiegać dwoma drogami: płciową i bezpłciową.

Rozwój bezpłciowy pierwotniaka nazwany *schizogonią*, zachodzi w komórkach wielu gatunków zwierząt stałocieplnych, w tym także człowieka. W organizmie żywiciela pośredniego w wyniku podziału pasożyta powstaje kilka osobników zwanych schizontami lub merozoitami. Natomiast rozwój płciowy obejmujący dwie fazy (*gametogonię* i *sporogonię*) może zachodzić tylko w komórkach nabłonkowych błony śluzowej jelita cienkiego zwierząt należących do rodziny kotowatych, które są żywicielami ostatecznymi *T. gondii.* Rezerwuarem pasożyta jest kot, ale także człowiek oraz pozostałe ssaki (m.in. szczury, myszy zające, świnie, kozy). Oocysty znajdujące się w odchodach kota są odporne na czynniki środowiska i zdolne są do przetrwania w ziemi w niekorzystnych warunkach przez ponad rok [Krupa i Bartoszcze, 1990].



Rys. 2. Trzy zasadnicze formy rozwojowe pasożyta *T. gondii*: A) bradyzoit [Caramello, 2001], B) oocysta [Dubey i wsp., 1998], C) tachyzoit [Caramello, 2001].

Cykl rozwojowy *T. gondii* zaczyna się od wydalonej przez kota z kałem oocyty (formy przetrwanej pasożyta), w której znajdują się sporozoity. Po około 1 do 5 dni od momentu wydalenia do środowiska zewnętrznego, oocysta przechodzi sporulację tworząc dwie sporocysty. Sporocysty dzielą się następnie dalej na 4 sporozoity, które stanowią formę infekcyjną dla człowieka i innych organizmów będących żywicielami pośrednimi. Kiedy oocysta dostanie się do organizmu żywiciela pośredniego rozpada się w dwunastnicy uwalniając 8 sporozoitów, które przechodzą przez ścianę jelita do układu krwionośnego i krążą po całym ustroju atakując różne komórki. Wewnątrz komórki sporozoit ulega przekształceniu do formy wegetatywnej – tachyzoitu, będącej tzw. postacią "agresywną" pasożyta, zdolną do bezpłciowego rozmnażania przez podział mitotyczny. Po namnożeniu tachyzoity uwalniają się rozrywając błonę komórkową i atakują inne komórki powodując tak zwaną ostrą fazę toksoplazmozy. Następnie rozprzestrzeniają się do węzłów chłonnych i innych

tkanek atakując także komórki nerwowe w mózgu. W wyniku rozwoju odpowiedzi immunologicznej, u żywiciela z prawidłowo funkcjonującym układem odpornościowym, tachyzoity ulegają przemianie w bradyzoity, których pojawienie się związane jest z przejściem wczesnej fazy choroby w przewlekłą. Bradyzoity rosną w cystach tkankowych, które najczęściej znajdują się w mózgu (ośrodkowym układzie nerwowym), oku i mięśniach (głównie szkieletowych i mięśniu serca). Mogą tam pozostawać do końca życia ssaka, albo ujawnić się w wypadku osłabienia układu odpornościowego (np. immunosupresja, radioterapia, AIDS). Zarażenie innego organizmu możliwe jest nie tylko przez sporozoity znajdujące się w oocystach, ale także po spożyciu cyst zawierających bradyzoity.

Zupełnie inaczej przebiega rozwój *T. gondii* w organizmie kotowatych. Kiedy oocysta lub cysta tkankowa dostanie się do organizmu kota, sporozoity z oocysty lub bradyzoity z cysty tkankowej atakują komórki nabłonka jelita cienkiego. Tworzą się merozoity (czasami uznawane za czwartą formę rozwojową pasożyta), które są wynikiem bezpłciowego podziału w kocich enterocytach. Po kilkukrotnych podziałach część merozoitów przekształca się w gametocyty, a następnie w makro- i mikrogamety. Z nich po połączeniu powstają zygoty – oocysty, które wydalone są do światła jelita. Po około miesiącu od momentu zarażenia koty zaczynają wydalać miliony oocyst i cykl się zamyka (Rys. 3). Oocyty mogą pozostać zakaźne przez ponad rok, a przy odpowiedniej wilgotności i temperaturze mogą przetrwać w glebie nawet dwa lata [Johnson, 1997; Dubey, 1998; Black i Boothroyd, 2000].



Rys. 3. Cykl rozwojowy T. gondii zmodyfikowany na podstawie [Dubey, 1998; Caramello, 2001].

3.3. Budowa *T. gondii*

Pierwotniak *T. gondii* oprócz typowych organelli takich jak jądro komórkowe, retikulum endoplazmatyczne, aparat Golgiego, mitochondrium, rybosomy, posiada organelle charakterystyczne dla typu Apicomplexa, nazywane kompleksem apikalnym, w którego skład wchodzą roptrie, mikronemy, apikalne i polarne pierścienie oraz konoid. Roptrie i mikronemy są unikalnymi organellami wydzielniczymi zawierającymi produkty niezbędne przy adhezji pasożyta do komórek gospodarza, ich inwazji oraz przy tworzeniu wakuoli pasożytniczej. Konoid jest małą strukturą w kształcie stożka, złożoną ze spiralnych filamentów, która odgrywa rolę mechaniczną podczas wnikania pasożyta do komórek gospodarza. Apikalne i polarne pierścienie są częścią cytoszkieletu. Dodatkowo, poza kompleksem apikalnym, *T. gondii* posiada również takie struktury jak apikoplast, będący organellą chloroplastopodobną oraz rozproszone granule o dużej gęstości, które pełnią funkcję sekrecyjną (Rys. 4).



Rys. 4. Budowa T. gondii [Black i Boothroyd, 2000].

Cytoszkielet *T. gondii* stanowi złożony układ mikrotubul i innych struktur makromolekularnych nadających komórce polarność (Rys. 5). Na końcu komórki znajdują się dwa apikalne pierścienie (1 i 2 na Rys. 5). Konoid składa się z czternastu elementów, skręconych odwrotnie do kierunku wskazówek zegara, które powodują, że może się on obracać, przechylać, rozciągać i kurczyć. Od pierścieni apikalnych poprzez konoid do wnętrza komórki biegną dwie mikrotubule, stanowiące rusztowanie kierujące roptrie i mikronemy w stronę konoidu, aby ich zawartość uległa sekrecji z apikalnego końca komórki.



Rys. 5. A) cytoszkielet *T. gondii* [Black i Boothroyd, 2000], B) kompleks apikalny w powiększeniu [Dubey i wsp., 1998].

Poniżej konoidu znajdują się pierścienie polarne (1 i 2). Pierścień 1, otaczający konoid, jest zakończeniem kompleksu wewnątrzbłonowego. Pierścień 2 stanowi centrum, z którego odchodzą mikrotubule podpelikalne, biegnące do dwóch trzecich długości komórki. W połowie komórki znajduje się mikropor uważany za

główne miejsce endocytozy. Pomimo, że u *T. gondii* nie występują mikrofilamenty to w konoidzie, pierścieniach konoidalnych i mikrotubulach podpelikalnych wykryto aktynę.

Tachyzoity *T. gondii* mają sierpowaty kształt, 6 µm długości i 2 µm szerokości. Jeden biegun komórki jest zaokrąglony, a drugi (apikalny) ostro wydłużony. Badania z wykorzystaniem mikroskopu elektronowego wskazują na zmiennokształtny charakter *T. gondii* (owalny, sierpowaty) w zależności od rodzaju szczepu pasożyta oraz narządu żywiciela, w którym on bytuje. Organizm pokryty jest trójwarstwową pellikulą złożoną z plazmolemmy i dwóch blisko siebie położonych błon, tworzących kompleks błony wewnętrznej. Jądro komórkowe zazwyczaj położone jest w centrum komórki, a pomiędzy nim i końcem apikalnym komórki znajduje się 8 do 10 maczugowatych roptrii. W pobliżu apikalnego końca znajdują się także mikronemy. Chociaż tachyzoity mogą poruszać się poprzez ślizganie, zginanie, falowanie i rotację, nie posiadają żadnych widocznych organelli służących do poruszania (Rys. 6).



Rys. 6. A) tachyzoit, B) bradyzoit. Oznaczenia: C-konoid, R-roptrie, M-mikronemy, DG-granule o dużej gęstości, N-jądro komórkowe, AG-ziarna amylopektynowe. [Dubey i wsp., 1998].

Bradyzoity strukturalnie niewiele różnią się od tachyzoitów (Rys. 6). Mają ok. 7 µm długości i 1,5 µm szerokości, a ich jądro komórkowe znajduje się blisko dolnego bieguna komórki. Zawierają dużą ilość mikronem i posiadają tzw. ziarna amylopektynowe, które nie wystepują u tachyzoitów. Ponadto, cechą

charakterystyczną tej formy rozwojowej jest mniejsza zawartość granul o dużej gęstości. Komórka bardyzoitu jest węższa i mniej wrażliwa na działanie enzymów proteolitycznych niż tachyzoity. Młode cysty tkankowe są małe i zawierają tylko dwa bradyzoity, starsze mogą zawierać ich setki. Cysty w mózgu są zwykle sferoidalne i rzadko mają średnicę większą niż 70 μm, podczas gdy cysty w mięśniach są wydłużone i mogą mieć 100 μm długości. Ściana cysty tkankowej jest elastyczna i cienka (<0,5 μm).

Sporozoity mają długość 6-8 µm i 2 µm szerokości. Są podobne do tachyzoitów jednak posiadają więcej mikronem i roptrii oraz ziarna amylopektynowe. Zawierają one również ciałka lipidowe, które są rzadkie u tachyzoitów oraz nieobecne u bradyzoitów. Jądro umieszczone jest bliżej zaokrąglonego końca komórki. Oocysty przed sporulacją są sferyczne, a ich cytoplazma zawiera duże jądro komórkowe. Po sporulacji każda oocysta zawiera dwie elipsoidalne sporocysty (6 µm na 8 µm), a każda sporocysta cztery sporozoity. Ściana oocysty po sporulacji jest trójwarstwowa [Dubey, 1998; Gross i wsp., 1996].

3.4. Bioróżnorodność pasożyta

Rodzaj Toxoplasma obejmuje jeden gatunek, a jego poszczególne szczepy i izolaty zostały podzielone na 3 wewnątrzgatunkowe typy (tzw. linie klonalne: I, II i III), które nie są charakterystyczne dla określonego regionu geograficznego lub żywiciela. Zasięg geograficzny i szerokie spektrum żywicieli pośrednich dają potencjalne możliwości dużej zmienności genetycznej, jednak odmienność w sekwencji DNA trzech typów wynosi zaledwie 1% [Ajioka i wsp., 2001]. Różnice fenotypowe poszczególnych szczepów są niewielkie i wynikają z małej liczby zmian genetycznych zachodzących podczas mejozy. Genom pasożyta jest stosunkowo stabilny i podlega niewielkim zmianom. Również bardzo niewielkie jest zróżnicowanie genetyczne poszczególnych szczepów. Linie (typy) klonalne, klasyfikowane są w oparciu o analizę różnych loci, z zastosowaniem technik RFLP, "nested" PCR, czy też poprzez elektroforetyczne porównanie izoenzymów. Również bardzo ważny jest podziału dokonany w oparciu o zjadliwość pasożyta wobec myszy (Tab. 1) [Boothroyd, 1993]. Pasożyty należące do typu I po dootrzewnowym zarażeniu dawką mniejszą lub równą 100 tachyzoitów powodują ostrą infekcję u myszy prowadzącą do

śmierci. Charakterystyzują się zdolnością do przechodzenia fazy płciowej w cyklu życiowym oraz bardzo rzadko tworzą cysty tkankowe. Do typu II należą natomiast pasożyty, które nie powodują śmierci u myszy nawet w wysokich dawkach (10³ - 10⁵ tachyzoitów), a także rozprzestrzenianie się tachyzoitów jest dużo mniej intensywne. Pasożyty typu II nie powodują żadnych objawów chorobowych. Zdolne są do wytwarzania cyst w mózgu, które świadczą o przewlekłej formie zarażenia. Ten typ pasożyta jest najczęściej izolowany od ludzi chorych na toksoplazmozę. Typ III stanowią pasożyty ze zróżnicowanym genotypem [Darde, 2004; Dytnerska i wsp., 2004].

Tahela	1	Wewnatrzgatunkowe	zróżnicowanie	T aondii
i abeia.	۰.	vewnąuzyalunkowe		r. yonun.

Тур	Szczep pasożyta	Charakterystyka	
I	BK RH FOU	 wysoko zjadliwe dla myszy rzadko izolowane (wyizolowane ze śmiertelnych przypadków wrodzonej i nabytej toksoplazmozy u ludzi) niektóre szczepy nie wytwarzają oocyt, częstość przemiany tachyzoitów w bradyzoity jest wyraźnie zredukowana, bardzo intensywne podziały tachyzoitów 	
II	DX NTE	 słabo zjadliwe dla myszy najczęściej izolowane, zarówno u ludzi, jak i owiec czy świń powodują przewlekłe zarażenia i formowanie cyst tkankowych łatwo ulegają przemianie tachyzoitów w bradyzoity oraz zdolne są do tworzenia cyst tkankowych 	
111	C56 NED	 szczepy o zróżnicowanej zjadliwości dla myszy (większość charakteryzuje się większą zjadliwością niż szczepy typu II) rzadko izolowane u ludzi, częściej występują w organizmach dzikich zwierząt 	

3.5. Inwazja *T. gondii*

T. gondii nie posiada typowych organelli lokomocyjnych (rzęski, wici), nie ma również zdolności przemieszczania się na drodze pełzania. Niezbędną do inwazji ruchliwość pasożyt zawdzięcza ruchowi obrotowo-ślizgowemu zależnemu od gradientu pH, oraz aktywności aktyny, miozyny i mikrotubul. Pierwszym etapem wnikania pasożyta do komórki gospodarza jest jego bezpośrednie związanie z powierzchnią atakowanej komórki. Błona lipidowa zarówno *T. gondii* jak i komórki gospodarza w normalnych warunkach naładowana jest ujemnie. Do pokonania tego niekorzystnego oddziaływania dwóch ujemnie naładowanych błon komórkowych niezbędne jest związanie receptora na powierzchni komórki gospodarza z ligandem pasożyta. Pasożyt wykazuje zdolność do inwazji szerokiego spektrum komórek. W kulturach in vitro T. gondii jest zdolny zainfekować prawie każdą komórkę ssaków, a także owadów i ryb. To szerokie spektrum inwazji wymaga ekspresji przez pasożyta, albo dużej ilości ligandów dla różnych receptorów, albo ekspresji kilku ligandów, które wiążą różne receptory. Dokładna charakterystyka powierzchni pasożyta wykazała występowanie bardzo dużej ilości białek zaliczanych do rodziny antygenów SAG1 [Boothroyd i wsp. 1998]. Białko to odgrywa niezwykle istotną rolę w procesie adhezji. Jest ono rozpoznawane przez receptor glikoproteinowy znajdujący się na powierzchni atakowanej komórki. Jednakże nie jest to jedyne białko, które umożliwia adhezję pasożyta. Mutanty SAG1(-) nadal infekują komórki, ale według odmiennego mechanizmu, wykorzystując inne białka, między innymi antygeny należące do rodziny SAG2. Adhezja jest wtedy mniej wydajna, ale potem pasożyt potrzebuje mniej czasu na wniknięcie do wnętrza atakowanej komórki [Lekutis i wsp., 2001]. Wykazano również, że lamina znajdująca się w błonie komórkowej pasożyta rozpoznawana jest przez znajdujący się w komórce gospodarza receptor - $\alpha\beta1$ integrynę [Bonhomme i wsp., 1999; Carruthers i Sibley, 1999].

Kształt pasożyta ma bardzo polarną strukturę, narzuconą przez budowę cytoszkieletu. *T. gondii* wiąże się z komórką gospodarza swoim apikalnym końcem. Wniknięcie tachyzoitu do wnętrza komórki gospodarza odbywa się dzięki charakterystycznemu spiralnemu ruchowi pasożyta. Jest to proces gwałtowny i aktywny, trwający zaledwie 15-30 sekund zachodzący przy całkowitej bierności komórek makroorganizmu. Pasożyt dzięki obecności konoidu i mikrotubul ma możliwość "wkręcenia się" do atakowanej komórki. Wykorzystywana jest do tego siła powstająca dzięki układowi aktyny i miozyny znajdującej się na apikalnym końcu komórki pasożyta. Podczas wnikania tachyzoitu do komórki następuje zmiana jego kształtu. Staje się on dłuższy i cieńszy, co związane jest ze zmianą organizacji mikrotubul w cytoszkielecie.

Podczas inwazji następuje wydzielanie szeregu białek charakterystycznych dla typu Apicomplexa. W pierwszym etapie inwazji następuje wydzielanie białek zawartych w mikronemach (MIC). Sygnałem do

egzocytozy adhezyn (białek MIC) jest wzrost wewnątrzkomórkowego stężenia jonów Ca²⁺ [Lovett i wsp., 2002]. Białka mikronem nigdy nie funkcjonuja pojednyńczo, ale tworzą tzw. kompleksy adhezyjne. Szczególna rola w procesie inwazji T. gondii do komórki żywiciela została przypisana dwóm białkom mikronem: MIC2 i M2AP (MIC2-associated protein), których domeny cytoplazmatyczne wiaża sie z aldolaza (enzymem glikolitycznym rozkładajacym fruktozo-1,6-bisfosforan), a ta z kolei stanowi pomost między nimi i filamentami aktynowymi. Przemieszczenie tego kompleksu w kierunku od bieguna apikalnego do tylnego, przy udziale miozyny, zapoczątkowuje "wsuwanie się" pasożyta do komórki gospodarza [Soldati i wsp., 2001]. Kolejne białka wydzielane przez pasożyta (antygeny roptrii) umożliwiają rozpoczęcie procesu biogenezy wakuoli pasożytniczej. Zwiększają one lepkość błony komórkowej i dzięki temu następuje wgłębianie się błony atakowanej komórki oraz wzmocnienie inwazji. Tachyzoit zostaje zamknięty w wakuoli pasożytniczej, dzięki temu może się rozwijać i rosnąć w wyspecjalizowanym środowisku. W pełni wykształconej wakuoli stwierdzono obecność białek granularnych o dużej gestości. Prawdopodobnie dzięki nim następuje modyfikacja wakuoli pasożytniczej, w której pasożyt może dojrzewać i replikować się (Rys. 7). [Bonhomme i wsp., 1999; Carruthers i wsp., 1999; Ngô i wsp., 2000; Długońska, 2005].



Rys. 7. Schemat inwazji *T. gondii.* Oznaczenia: ER - retikulum endoplazmatyczne, TVMN – wewnętrzna sieć błon (ang. tubulovesicular membranous network). [Długońska, 2004].

3.6. Charakterystyka antygenowa pasożyta

3.6.1. Definicja antygenu

Antygenami są wszystkie substancje, które indukują odpowiedź immunologiczną. Mogą nimi być białka, węglowodany, a także lipidy. Cząsteczka antygenu może zawierać wiele takich samych lub różnych determinant antygenowych, które w zainfekowanym organizmie mogą doprowadzić do syntezy przeciwciał lub powstania komórek efektorowych. Najmniejsza jednostka (epitop), przeciwko której może zostać wytworzone przeciwciało, składa się najczęściej z trzech do sześciu reszt aminokwasowych w cząsteczce białka, oraz około pięciu do sześciu reszt cukrowych w cząsteczce węglowodanu. Wszystkie duże cząsteczki są wielodeterminantowe.

3.6.2. Antygeny T. gondii

Do antygenów *T. gondii* występujących we wszystkich formach rozwojowych pasożyta zalicza się antygeny ESA (ang. excreted/secreted antigens), które są lokalizowane w granulach o dużej gęstości (GRA) i wydzielane do wakuoli pasożytniczej. Białka GRA1-10 stanowią 90% puli antygenów wykrywanych w surowicy w początkowym stadium zarażenia pasożytem. Do antygenów wspólnych, zarówno dla tachyzoitów jak i bradyzoitów zaliczamy także antygeny mikronem (MIC1-11) oraz roptrii (ROP1-9). Umożliwiają one adhezję oraz penetrację *T. gondii* do komórek żywiciela.

Do głównych antygenów *T. gondii* zalicza się również hydrolazę nukleozylofosforanową (NTP1-2). W cytoplazmie pasożyta wykryto obecność dehydrogenazy mleczanowej w dwóch izoformach: formę LDH1 (o masie 33 kDa, pl=6.0) charakterystyczną dla postaci tachyzoitów, oraz formę LDH2 (o masie 35 kDa, pl=7,0) charakterystyczną dla bradyzoitów. Enzymy te mogą służyć jako marker przemiany stadium rozwojowego tachyzoitu w bradyzoit [Gross i wsp., 1996; Długońska i Dytnerska, 1999]. Ponadto, u *T. gondii* występują dwie glikozylowane izoformy enolaz, ENO1 właściwa dla bradzoitów oraz ENO2 występująca w tachyzoitach, które także uznawane są za markery przemiany fazowej.

3.6.3. Antygeny charakterystyczne dla tachyzoitów

Antygeny powierzchniowe (ang. surface antygen), które charakterystyczne są dla tachyzoitów *T. gondii*, należą do tzw. podrodziny

SAG1 i SAG2. Typowymi białkami tej formy rozwojowej jest antygen SAG1 (P30), SAG2A (P22), a także SAG5B oraz SAG5C. Cechą charakterystyczną wszystkich antygenów SAG jest sposób zakotwiczenia w błonie zewnętrznej pasożyta za pomocą reszt GPI (glikozylofosfatydyloinozytolu). Do tej grupy antygenów zaliczono także białka, których sekwencje są homologiczne do rodziny genów SAG. Oznaczono je jako SRS 1-3 (ang. SAG related sequence). Ostatnio zidentyfikowano kolejne białka należące do tej grupy, m. in. antygeny SRS 4-8. Antygeny powierzchniowe biorą udział w adhezji *T. gondii* do komórek gospodarza. Białko SAG1 stanowi aż 5% puli białek tachyzoitów i może służyć jako marker tej postaci pasożyta. Jest ono silnie immunogenne, indukuje zarówno odpowiedź komórkową, jak i humoralną [Lekutis i wsp., 2001].

Białka charakterystyczne dla tachyzoitów bardzo często występują również u sporozoitów, jednakże często poziom ekspresji genów kodujących te antygeny jest różny. Ostatnie badania udowodniły występowanie również specyficznych antygenów dla sporozoitów, np. białko SporoSAG, należące do superrodziny powierzchniowych białek SAG [Radke i wsp. 2004].

3.6.4. Antygeny charakterystyczne dla bradyzoitów

Dzięki wykorzystaniu przeciwciał mono- i poliklonalnych wykazano obecność kilku antygenów, charakterystycznych wyłącznie dla formy bradyzoitu. Antygenem bradyzoitów należącym do rodziny SAG jest białko SAG4A (18 kDa), BSR4 (p36) oraz SAG5A. Podobnie jak inne antygeny powierzchniowe białka te zakotwiczone są w błonie zewnętrznej za pomocą reszt GPI [Lekutis i wsp., 2001]. U bradyzoitów wykryto również antygen BAG (ang. bradyzoite antigen), o masie 28-30 kDa, oznaczony jako BAG/hsp30 lub BAG5. Antygen ten pojawia się podczas przemiany tachyzoitu w bradyzoit i podobnie jak antygen hsp70 stanowi marker tej postaci pasożyta. Po zakończeniu procesu różnicowania ekspresja białka hsp70 znacznie spada. Inny charakterystyczny dla bradyzoitu antygen to białko macierzy cyst tkankowych MAG1 (ang. matrix antigen) – o masie 65 kDa. W tabeli 2 przedstawiono główne różnice w profilu antygenowym dwóch postaci pasożyta [Gross i wsp., 1996; Długońska i Dytnerska, 1999].

Antygeny Toxoplasma gondii				
Antygeny charakterystyczne dla obu postaci pasożyta	Antygeny specyficzne tachyzoitów	Antygeny specyficzne bradyzoitów		
MIC1-11	SAG1	SAG2c		
ROP1-7	SAG2A	SAG2D		
GRA1-10	SAG5B	SAG4A		
NTP1-2	SAG5C	SAG5A		
SAG3	SRS1-3	BSR4		
	LDH1	BAG/hsp30		
	ROP9	hsp70		
	ENO2	LDH2		
		p-ATpaza		
		ENO1		
		MAG1		

Tabela. 2. Antygeny bradzyzoitów i tachyzoitów.

3.6.5. Charakterystyka antygenu SAG1 pasożyta T. gondii

Białko SAG1 (P30) jest głównym powierzchniowym antygenem tachyzoitów *T. gondii.* Strukturalnie SAG1 spokrewniony jest z antygenem SAG3, z którym wykazuje 24% identyczności w sekwencji aminokwasowej. Ponadto, obydwa antygeny zawierają 12 reszt cysteiny, a także wiele krótkich sekwencji aminokwasowych, które świadczą o ich zbliżonej strukturze [Manger i wsp., 1998]. Gen kodujący to białko został sklonowany, a wyprodukowany antygen wykorzystany w diagnostyce [Kim i wsp., 1994; Harning i wsp., 1996]. Gen *sag1* występuje w jednej kopii i nie zawiera intronów, a jego sekwencja jest wysoce zakonserwowana ewolucyjnie. Obecnie poznano kilka nowych białek powierzchniowych, które zostały zaliczone do rodziny białek SAG1 (Rys. 8).



Rys. 8. Drzewo filogenetyczne powierzchniowych białek pasożyta *T. gondii* [Lekutis i wsp., 2001].

Białko SAG1 razem z antygenem SAG2 jest niezmiernie ważne we wczesnym stadium inwazji T. gondii (bierze udział w adhezji pasożyta do komórek gospodarza) [Manger i wsp., 1998; Lekutis i wsp., 2001]. Antygen SAG1 dzikiego typu zbudowany jest z 319 reszt aminokwasowych, posiada sekwencję sygnalną oraz dwie domeny transmembranowe (Rys. 9). Stanowi 5% puli białek tachyzoitów i z tego powodu czesto służy jako marker tej postaci pasożyta. Antygen ten wzbudza odpowiedź zarówno limfocytów T, jak i B. Limfocyty T rozpoznają głównie sekwencję zawartą między 238 a 256 resztą aminokwasową, natomiast limfocyty B – różne epitopy rozmieszczone w całej cząsteczce białka [Beghetto i wsp., 2003]. U ludzi oraz zwierząt eksperymentalnych SAG1 indukuje silną odpowiedź immunologiczną [Nielsen i wsp., 1999]. Ponieważ antygen ten zakotwiczony jest w błonie poprzez resztę GPI, jego oczyszczanie z tachyzoitów jest trudne, czasochłonne i kosztowne. Z tego powodu zaczęto kłaść nacisk na produkcję rekombinantowej formy białka SAG1, które wykazuje zdolność do indukcji odpowiedzi immunologicznej, dzięki czemu może być wykorzystane w konstrukcji zestawów diagnostycznych [Biemans i wsp., 1998].

- 1 MFPKAVRRAVTAGVFAAPTLMSFLLCGVMASDPPLVANQVVTCPDKKSTA
- 51 AVILTPTENHFTLKCPKTALTEPPTLAYSPNRQICPAGTTSSCTSKAVTL
- 101 SSLIPEAEDSWWTGDSASLDTAGIKLTVPIEKFPVTTQTFVVGCIKGDDA
- 151 QSCMVTVTVQARASSVVNNVARCSYGADSTLGPVKLSAEGPTTMTLVCGK
- 201 DGVKVPQDNNQYCSGTTLTGCNEKSFKDILPKLTENPWQGNASSDKGATL
- **251** TIKKEAFPAESKSVIIGCTGGSPEKHHCTVKLEFAGAAGSAESAAGTASH
- 301 VSIFAMVIGLIGSIAACVA

Rys. 9. Sekwencja aminokwasowa antygenu SAG1. Kolorem zielonym zaznaczono sekwencję sygnalną, czerwonym domeny transmembranowe, a niebieskim sekwencje epitopowe.

3.6.6. Charakterystyka antygenu MAG1 pasożyta T. gondii

Antygen MAG1 (ang. matrix antigen), o masie cząsteczkowej 65 kDa, uznawany był początkowo za białko produkowane wyłącznie przez bradyzoity *T. gondii.* Z tego względu przez długi czas sądzono, że jest to stabilny marker do rozpoznania tego stadium rozwojowego. Jednakże, ostatnie badania udowodniły, że ekspresja genu kodującego białko MAG1 zachodzi również w tachyzoitach [Ferguson i Parmley, 2002; Holec i wsp 2007]. Analiza immunocytochemiczna pozwoliła ustalić lokalizację tego białka antygenowego w komórkach myszy zarażonych pierwotniakiem. Okazało się, że antygen MAG1 stanowi element budulcowy ściany cyst tkankowych oraz jest składnikiem ich macierzy. Natomiast w tachyzoitach, znajdujących się wewnątrz komórek żywiciela, MAG1 zlokalizowany jest w wakuolach pasożytniczych. U tej formy rozwojowej pasożyta ilość tego antygenu jest relatywnie niska lecz sam fakt występowania MAG1 w obu formach rozwojowych *T. gondii* uniemożliwia jego wykorzystywanie jako markera przemiany fazowej [Ferguson i Parmley, 2002; Ferguson, 2004].

W porównaniu do innych antygenów pasożyta białko MAG1 jest stosunkowo słabo poznane. Konstrukcja biblioteki genomowej pierwotniaka Ζ wykorzystaniem faga λ gt11 Sfi-Not oraz mRNA uzyskanego z komórek cyst tkankowych szczepu ME49 T. gondii umożliwiła poznanie sekwencji genu mag1. Okazało się, że otwarta ramka odczytu kodująca 452 reszty aminokwasowe jest przerywana dwukrotnie sekwencją intronową [Parmley i wsp., 1994]. Na N-końcu białka MAG1 występuje sekwencja sygnalna składająca się z 25 reszt aminokwasowych, która odpowiada za transport antygenu do wnętrza cyst tkankowych (Rys. 10). Antygen MAG1 charakteryzuje się występowaniem dużej ilości reszt kwasu glutaminowego, powodujących obniżenie ładunku białka oraz posiadaniem licznych domen o konformacji αhelis. Niestety nie wiadomo jak taka budowa związana jest z funkcją strukturalną MAG1 w komórkach cyst tkankowych. Zauważono pewne analogie do białek neurofilamentu będących składnikami cytoszkieletu komórek ssaków, które również posiadają wysoki ładunek wypadkowy, długie domeny α -helis oraz wysoki stopień fosforylacji. Wskazuje to na możliwy związek takiej konformacji z pełnionymi w komórce funkcjami. Białko MAG1 ma charakter hydrofilowy, lecz w obrębie jego sekwencji występują również fragmenty hydrofobowe: na N-końcu przy sekwencji sygnalnej oraz we fragmencie obejmującym 154-189 reszt aminokwasowych, bogatym w reszty proliny (13 reszt Pro).

Białko MAG1 ma silne właściwości immunogenne. U ludzi jak i zwierząt zainfekowanych pasożytem obserwuje się wysokie miano przeciwciał anty-MAG1 [Gamble i wsp., 2000; Di Cristina i wsp., 2004]. Białko to ma również silne właściwości immunoprotekcyjne, co wzbudza nadzieję na jego wykorzystanie jako antygenu szczepionkowego [Parmley i wsp., 2002; Nielsen i wsp., 2006].

26

MDCGQCRRQLHAAGVLGLFVTLATATVGLSQRVPELPEVEPFDEVGTGAR
 RSGSITALLPQDAVLYENSEDVAVPSDSASTPSYFHVESPSASVEAATGA
 VGEVVPDCEEQEQGDTTLSDHDFHSGGTEQEGLEPTEVAHQHETEEQYGT
 EGMPPPVLPPAPVVHPRFIAVPGPSVPVPFFSLPDIHPDQVVYILRVQGS
 GDFDISFEVGRAVKQLEAIKKAYREATGKLEADELESERGPAVSPRRLV
 DLIKDNQRRLRAALQKIKIQKKLEEIDDLLQLTRALKAMDARLRACQDMA
 PIEEALCHKTKAFGEMVSQKAKEIREKAASLSSLLGVDAVEKQLRRVEPE
 HEDNTRVEARVEELQKALEKAASEAKQLVGTAAGEIEEGVKADTQAVQDS
 SKDVLTKSQLALVEAFKAIQRALLEAKTKELVEPTSKEAEEARQILAEQA
 AA

Rys. 10. Sekwencja aminokwasowa białka MAG1. Kolorem zielonym zaznaczono sekwencję sygnalną, czerownym zaznaczono sekwencję epitopową.

3.6.7. Charakterystyka antygenu GRA1 pasożyta T. gondii

Białko GRA1 (P24) (ang. dence granule antigens), zbudowane ze 190 reszt aminokwasowych, należy do grupy antygenów ESA (and. excreted/secreted antigens) (Rys. 11). Wiekszość z tych antygenów jest zmagazynowana w granulach o dużej gęstości i wydzielana do wakuoli pasożytniczej bądź cysty tkankowej. Antygeny ESA stanowią około 90% puli antygenów wykrywanych w surowicy w początkowym stadium zarażania T. gondii. Białko GRA1 jest głównym antygenem wydzielniczym rozpoznawanym w przypadku chronicznych inwazji, zarówno u ludzi, jak i zwierząt [Cesbron-Delauw i wsp., 1989]. Antygen ten wydzielany jest przez tachyzoity i bradyzoity oraz odgrywa istotną rolę w stymulacji układu odpornościowego gospodarza. Silne właściwości immunogenne i immunoprotekcyjne antygenów ESA, wykazane na wielu modelach doświadczalnych, wzbudzają nadzieje na ich wykorzystanie jako antygenów szczepionkowych [Darcy i wsp. 1988; Duquesne i wsp., 1990, 1991; Zenner i wsp., 1999].

- 1 MVRVSAIVGAAASVFVCLSAGAYAAEGGDNQSSAVSDRASLFGLLSGGTG
- 51 GLGIGESVDLEMMGNTYRVERPTGNPDLLKIAIKASDGSYSEVGNVNVEE
- **101 VIDTMKSMQRDED**IFLRALNKGETVEEAIEDVAQAEGLNSEQTLQLEDAV
- **151** SAVASVVQDEMKVIDDVQQLEKDKQQLKDDIGFLTGERE

Rys. 11. Sekwencja aminokwasowa białka GRA1. Kolorem zielonym zaznaczono sekwencję sygnalną, czerwonym zaznaczono determinantę antygenową.

3.7. Toksoplazmoza

Toksoplazmoza jest chorobą wywoływaną przez pasożyta *T. gondii.* Zarażenie rozpowszechnione jest na całym świecie wśród ludzi i zwierząt (szczury, psy, koty, bydło, owce, kury, świnie). Częstość zarażenia wśród populacji ludzkiej jest bardzo różna i zależy od klimatu, sposobu odżywiania oraz warunków sanitarno-epidemiologicznych i waha się od 5% do 90% [Beazley i Egerman, 1998]. W naszej szerokości geograficznej częstość zarażenia pasożytem wynosi ok. 60% [Tenter i wsp., 2000].

Toksoplazmozę ogólnie można podzielić na wczesną i przewlekłą (utajoną). We wczesnej fazie choroby zmiany histopatologiczne mogą dotyczyć prawie wszystkich narządów i tkanek. W wielu narządach może występować martwica mikro- i makroskopowa. Dotyczy to takich narządów jak: serce, płuca, cały przewód pokarmowy, mięśnie szkieletowe, mięsień macicy, wątroba i śledziona

Po wyleczeniu ostrej postaci toksoplazmozy nie wszystkie pierwotniaki zostają zniszczone. Część z nich wytwarza formy przetrwalne – cysty tkankowe zawierające bradyzoity, które powstają w wyniku rozwoju odpowiedzi immunologicznej pacjenta z prawidłowo funkcjonującym układem odpornościowym. Cysty najczęściej umiejscowiają się w różnych mięśniach (także oka). Nie wyrządzają w organizmie gospodarza żadnych szkód, jednakże nie można ich zniszczyć lekami. Pojawienie się cyst tkankowych związane jest z przejściem fazy wczesnej choroby w przewlekłą.

3.7.1. Toksoplazmoza wrodzona

Toksoplazmoza wrodzona dotyczy płodów zarażonych przez łożysko, podczas czynnej pierwotnej inwazji u matki. Toksoplazmoza wrodzona wystepuje z częstością ok. 1 - 4 przypadków na 1000 urodzeń. Ryzyko zarażenia płodu wzrasta z czasem trwania ciąży i zależy od przepuszczalności łożyska, zjadliwości pasożyta oraz stanu układu odpornościowego płodu.

W I trymestrze ciąży dochodzi do zarażenia płodu tylko w ok. 15% przypadków. W następnym trymestrze ryzyko wzrasta do 45%, a w ostatnim zarażeniu ulega ok. 70% płodów. Trzeba jednak pamiętać, że skutki zarażenia są odwrotnie proporcjonalne do ryzyka zarażenia. Jeżeli zarażenie płodu nastąpi w I trymestrze to zazwyczaj prowadzi to do poronienia, w wyniku zbyt dużych zmian martwiczych w mięśniach i układzie nerwowym. Zarażenie w późniejszych trymestrach może być szybko przezwyciężone przez nienarodzone dziecko, jednak choroba może ujawnić się później (nawet w wieku młodzieńczym lub dojrzałym) jako zaburzenia psychiczno-ruchowe i/lub zaburzenia wzroku.

Ponieważ ryzyko zarażenia płodu jest dosyć duże, a skutki poważne, każda kobieta ciężarna powinna przeprowadzić badanie krwi na obecność przeciwciał anty-*T. gondii.* Wynik słabo dodatni oznacza że kobieta przebyła chorobę dawno temu i nie powinna obawiać się zarażenia, ponieważ w jej organizmie znajdują się przeciwciała anty-*T. gondii,* które są w stanie ochronić płód w momencie ponownego kontaktu z pasożytem. W przypadku wyniku silnie dodatniego niezbędne jest podjęcie leczenia u lekarza. Natomiast wynik negatywny oznacza, że kobieta nie przebyła jeszcze inwazji. Wynik ten kryje duże ryzyko, gdyż zarażenie może nastąpić w każdym momencie trwania ciąży. Choroba może przejść bezobjawowo i zostać niewykryta, dlatego konieczne jest powtórzenie badania krwi w szóstym miesiącu ciąży, oraz na 6-7 tygodni przed terminem porodu [Dymowska i Zielińska, 1976].

3.7.2. Toksoplazmoza nabyta

Zarażenie nabyte w dużej mierze ma charakter bezobjawowy lub skąpoobjawowy. Objawy kliniczne obserwowane są jedynie u 5-20% pacjentów. Przypominają zarażenie grypowe, rzadko są więc właściwie rozpoznawane. Z tego powodu w normalnych warunkach toksoplazmoza właściwie nie wymaga leczenia. Komplikacje występują bardzo rzadko. Różnorodność objawów chorobowych stwierdzanych w przebiegu toksoplazmozy nabytej jest powodem tworzenia licznych podziałów klinicznych. Najczęściej, biorąc pod uwagę dominujące objawy, rozróżnia się toksoplazmozę: węzłową, oczną, nerwową i płucną, a także inne postacie narządowe [Milewska-Bobula, 1992].

3.7.3. Drogi zarażenia

Zarażenie człowieka może nastąpić:

- drogą pokarmową, która jest najczęstszą przyczyną inwazji, w wyniku kontaktu z pożywieniem, glebą oraz wodą zanieczyszczoną oocystami (człowiek zaraża się tylko dojrzałymi oocystami zawierającymi sporozoity); w wyniku spożycia mięsa surowego lub lekko przysmażonego zawierającego cysty;
- 2. poprzez łożysko w wyniku przenikania tachyzoitów z matki do płodu;
- sporadycznie w wyniku przetoczenia krwi zawierającej tachyzoity pierwotniaka, przeszczepu zarażonych narządów, lub w czasie pracy personelu laboratoryjnego z materiałem zakaźnym.

29

3.7.4. Toksoplazmoza u zwierząt

Toksoplazmoza to bardzo ważny problem weterynaryjny, ponieważ stanowi jedną z głównych przyczyn strat reprodukcyjnych w hodowli zwierząt. U zwierząt zarażonych T. gondii występują niespecyficzne objawy kliniczne takie jak: utrata apetytu, wyciek śluzowy z nosa, a także biegunka, wymioty, bolesność powłok brzusznych. Niekiedy stwierdza się podwyższenie i przyśpieszenie tetna, nastroszenie włosa, znaczny spadek masy ciała i ogólne osłabienie. Jednak największe starty weterynaryjne powodowane przez T. gondii wywołane są przez wchłonięcia płodu, poronienia i porody martwego potomstwa, przede wszystkim u owiec, kóz oraz świń [Dubey i Beattie, 1998]. U owiec poronienia występują w każdym wieku, jeżeli zarażenie pasożytem ma miejsce pierwszy raz podczas trwania ciąży. Takie owce pozostają zarażone do końca życia, jednakże nie dochodzi już do kolejnych poronień. Odpowiedź immunologiczna owczego płodu na pierwotniaka T. gondii rozwija się po 70 dniach trwania ciąży. Zarażenia płodu przed tym terminem powoduje jego gwałtowną śmierć i poronienie, natomiast w późniejszym okresie zazwyczaj powoduje porody martwych płodów lub słabych jagniąt, które najczęściej mają uszkodzenia centralnego układu nerwowego [Esteban-Redondo i Innes, 1997].

3.7.5. Odpowiedź immunologiczna

Zarażenie T. gondii u osób z prawidłowo funkcjonującym układem immunologicznym wywołuje kompleksową odpowiedź opartą na mechanizmach nieswoistych oraz swoistych. Przeciwciała powstające w następstwie inwazji pełnią mało znaczącą rolę w obronie organizmu, a związane jest to z wewnątrzkomórkowym sposobem bytowania pasożyta. Działanie przeciwciał ogranicza się jedynie do zewnątrzkomórkowych pasożytów, a więc okresu krótkotrwałej parazytemii w organizmie gospodarza. Uważa się, że odpowiedź limfocytów komórkowa Ζ udziałem Т (pomocniczych Th oraz supresorowych/cytotoksycznych Ts/Tc) jest najistotniejszym mechanizmem kontrolującym zarażenie.

Limfocyty pomocnicze Th zapewniają pomoc limfocytom B poprzez bezpośrednie przekazywanie sygnałów podczas kontaktu między tymi komórkami lub przez wytworzone cytokiny niezbędnej do wzrostu i różnicowania limfocytów B. Znane są dwie subpopulacje limfocytów Th: Th1

30

oraz Th2, uczestniczące w regulacji odmiennych odpowiedzi immunologicznych, co z kolei związane jest z profilem wydzielanych przez nie cytokin. Limfocyty cytotoksyczne Tc biorą udział w zabijaniu komórek zakażonych głównie wirusami.

Kompleks receptorowy limfocytów T składa się z receptora dla antygenu (TCR, zbudowanego z łańcuchów α i β lub y i δ), który połączony jest z wieloma niezbędnymi przekazywania innymi polipeptydami do sygnałów i rozpoznawania. Najważniejszym z nich jest cząsteczka CD3 która zbudowana jest z kilku polipeptydów. Niezwykle ważną cząsteczką występująca na powierzchni limfocytów T jest cząsteczka CD4, która wiążę się z niepolimorficznym regionem MHC klasy II. Na limfocytach cytotoksycznych (Tc) zamiast cząsteczki CD4 występuje cząsteczka CD8 która rozpoznaje niepolimorficzny region MHC klasy I

Zarażenie pierwotniakiem *T. gondii* bezpośrednio aktywuje limfocyty Tαβ. W likwidowaniu tachyzoitów uczestniczą limfocyty Tαβ, zarówno z antygenem różnicowania CD8 (Ts/Tc) działające bezpośrednio cytotoksycznie, jak i CD4 (Th) [Suzuki i Remington, 1988; Gazinelli i wsp.,1992].

Mechanizmy swoistej odporności mediowanej przez limfocyty T można opisać następująco:

- limfocyty CD8 mogą zabijać wolne, pozakomórkowe tachyzoity *T. gondii* (molekularne podstawy tego mechanizmu są nieznane);
- limfocyty CD4 i CD8 zabijają komórki zarażone pasożytem, proces ten podlega restrykcji MHC;
- limfocyty CD4 i CD8, biorą udział w kształtowaniu odporności przeciw *T. gondii* przez wytwarzanie cytokin [Długońska, 2000].

Bardzo ważnym czynnikiem ograniczającym rozprzestrzenianie się pasożyta w organizmie jest interferon gamma (IFN- γ). Tachyzoity stymulują makrofagi do produkcji interleukiny - 12 (IL-12) i martwiczego czynnika nowotworu - α (TNF - ang. tumor necrosis factor). Obecność tych cytokin stymuluje wydzielanie przez komórki NK (ang. natural killer) IFN- γ . Pod jego wpływem makrofagi wytwarzają reaktywne formy tlenu: H₂O₂, O₂, czy [•]OH, wykazujące bezpośrednie działanie pasożytobójcze [Murray i Cohn, 1979]. Również IFN- γ współdziałając z TNF- α umożliwia powstawanie NO[•], który jest wolnym rodnikiem o aktywności cytotoksycznej. Kolejną bardzo istotną rolą IFN- γ jest aktywacja

enzymatycznego rozkładu tryptofanu, który jest niezbędny do namnażania się *T. gondii.* Jednakże, niekontrolowane wytwarzanie IFN-γ jest bardzo niekorzystne dla organizmu (w niektórych przypadkach nawet śmiertelne), dlatego bardzo ważną funkcję pełnią cytokiny regulatorowe. Limfocyty Th2 charakteryzują się wytwarzaniem IL-4, IL-5, IL-6 oraz IL-10, które po pierwsze działają hamująco na makrofagi blokując efekt działania IFNγ, a po drugie, hamują ekspresję cząsteczek MHC klasy II oraz działają hamująco na produkcję cytokin przez limfocyty Th1 (m. in. IL-12). Tak więc odpowiednia relacja między subpopulacjami limfocytów Th1 (promującymi odpowiedź komórkową), a limfocytami Th2 (promującymi odpowiedź humoralną) jest niezwykle ważna i decyduje o rozwoju zarażenia.

3.7.6. Leczenie toksoplazmozy

Na świece do tej pory brak jest ujednoliconego sposobu leczenia toksoplazmozy w odniesieniu do ciężarnych z pierwotną toksoplazmozą, jak i w odniesieniu do noworodków i dzieci z toksoplazmozą wrodzoną. Od początku lat 60-tych zaczęto wykorzystywać spiramycynę (rowamycynę). Lek ten wykazuje aktywność przeciwpasożytniczą, a także wykazano jego ochronne działanie zabezpieczające przy wrodzonym zarażeniu. Zgodnie z rekomendacją WHO, u kobiet z toksoplazmozą nabytą podczas ciąży polecane jest stosowanie spiramycyny do czasu uzyskania informacji odnośnie stanu płodu. Jeżeli płód nie jest zarażony, spiramycyna powinna być podawana nieprzerwanie do końca ciąży. Natomiast jeżeli płód lub łożysko uległy zarażeniu wtedy dodatkowo wykorzystuje się pirymetaninę oraz sulfadizynę. Zamiast tych dwóch leków od lat 80-tych podawany jest kobietom Fansidar (połączenie pirymetaniny i długo działającego sulfonamidu). Toksoplazmoza wrodzona u noworodków wymaga leczenia, bez względu na to czy pojawiły się objawy kliniczne czy nie. W zależności od praktyki klinicznej leczenie to bywa zróżnicowane. Jedne ośrodki wykorzystują pirymetaninę i sulfadizynę podawaną codziennie przez 6 miesięcy, potem przez kolejne 6 miesięcy podawana jest dodatkowo spiromycyna (tzw. "leczenie wysokimi dawkami"). Natomiast inne ośrodki stosują Fansidar podawany raz na tydzień lub czasami raz na 2 tygodnie (tzw. "leczenie niskimi dawkami") [Milewska-Bobula, 1995].

3.7.7. Diagnostyka toksoplazmozy

Prawidłowe rozpoznanie toksoplazmozy jest nieodzownym warunkiem odpowiednich decyzji dotyczących leczenia i zapobiegania inwazji. Metody służące do wykrycia *T. gondii* dzielimy na bezpośrednie i pośrednie. Metody bezpośrednie polegają na wykryciu i izolacji antygenu pasożyta lub całego pasożyta. Natomiast metody pośrednie polegają na badaniu reakcji odpornościowej organizmu – zarówno humoralnej jak i komórkowej.

Największe znaczenie diagnostyczne ma izolacja T. gondii z materiału pobranego od pacjenta (izolacja z krwi, płynu mózgowo- rdzeniowego, łożyska, płynu gałkowego i innych). Ze względu na to, że metody bezpośrednie są bardzo pracochłonne, a także trzeba bardzo długo czekać na wynik (nawet do 6 tygodni) - są bardzo rzadko stosowane. Dlatego w praktyce największe znaczenie mają metody pośrednie (serologiczne), które polegają na wykrywaniu swoistych przeciwciał skierowanych przeciwko białkom powierzchniowym oraz cytoplazmatycznym pasożyta, które powstają w wyniku reakcji odpornościowej organizmu [Pinon i wsp., 2001]. Pierwszym stosowanym w diagnostyce toksoplazmozy odczynem serologicznym był odczyn barwny wprowadzony w 1948 przez Sabina i Feldmana. Twórcy testu zauważyli, że w obecności dopełniacza i specyficznych przeciwciał klasy IgG i IgM, tachyzoity T. gondii nie barwią się. Natomiast gdy nie ma przeciwciał, tachyzoity pochłaniają barwnik jakim jest błekit metylenowy. Odczyn ten jest bardzo czuły, jednak wada jest to, że nie różnicuje klas przeciwciał, a także wymaga pracy z żywymi pasożytami. Obecnie najczęściej stosowanym testem serologicznym jest odczyn immunoenzymatyczny - test ELISA (ang. <u>Enzyme-Linked</u> <u>ImmunoSorbent</u> Assay). Wykrywa on wszystkie typy przeciwciał (IgG, IgM, IgA i IgE). Jest to metoda wysoce czuła i specyficzna. Dzięki zastosowaniu znaczników fluorescencyjnych lub radioaktywnych możliwe jest wykrycie przeciwciał z dużą czułością. Przeciwciało może być również związane z enzymem (fosfatazą alkaliczną lub peroksydazą chrzanową), który zmienia cząsteczki dodanego bezbarwnego substratu w barwne produkty [Bitkowska i wsp., 1989; Aubert i wsp., 2000]. Równie często w diagnostyce T. gondii stosuje się odczyn immunofluorescencji pośredniej IFA (ang. Immuno Fluorescent Assay). Test IFA wykrywa przeciwciała skierowane przeciwko antygenom powierzchniowym pasożyta. Przeciwciała są tutaj znakowane fluorescencyjnie, dzięki temu test

33

ten jest czuły i powtarzalny. Wadą jest możliwość uzyskania wyników fałszywie dodatnich. Kolejnym testem jest test aglutynacji immunoabsorbcyjnej (ISAGA) (ang. ImmunoSorbent AgGlutination Assay). Test ISAGA wykrywa przeciwciała przeciwko T. gondii wykorzystując zjawisko aglutynacji antygenu. Obecnie dostępne są czułe i swoiste testy ISAGA PLUS IgA/IgM i IgE-ISAGA. Wykrywanie przeciwciał ta technika ma szczególne znaczenie w diagnostyce wczesnego okresu zarażenia T. gondii. Kolejnym testem stosowanym w diagnostyce jest odczyn ELIFA (ang. <u>Enzyme-Linked ImmunoFiltration Assay</u>), który bada swoistość przeciwciał metodą immunoprecypitacji i metodą immunofiltracji z zastosowaniem przeciwciał znakowanych enzymem. Metoda ma szczególne zastosowanie w diagnostyce toksoplamozy wrodzonej. Test ten wywodzi się z testu ELISA, ale wykorzystywana jest tutaj membrana filtracyjna, przez którą przefiltrowywana jest próbka, a następnie przeciwciała. Ze względu na dużą pracochłonność i czasochłonność rzadziej stosowane są takie testy jak odczyn pośredniej hemaglutynacji IHA (ang. Indirect Hemagglutination Assay) czy odczyn wiązania dopełniacza (OWD).

Obecnie w diagnostyce tokosoplazmozy oprócz testów serologicznych mogą być stosowane testy badające odpowiedź komórkową organizmu (swoistą i nieswoistą) takie jak: badania subpopulacji limfocytów, test transformacji blastycznej, badanie procesów fagocytozy.

W diagnostyce toksoplazmozy duże możliwości daje zastosowanie technik biologii molekularnej. Najważniejsze to wykrywanie DNA pasożyta dzięki reakcji PCR – stosowane gdy wyniki testów serologicznych nie dają jednoznacznej odpowiedzi diagnostycznej. Dotyczy to przede wszystkim pacjentów z zaburzoną produkcją przeciwciał (chorych na AIDS, osób immunosupresyjnych) lub immunologicznie niedojrzałych płodów [Gołąb, 1995 i 1996].

Pomimo rozwoju metod diagnostyki laboratoryjnej toksoplazmozy, nadal istnieją poważne trudności w odróżnieniu wczesnego i przewlekłego zarażenia u ludzi, oraz wiarygodnego rozpoznania choroby. Inwazja *T. gondii* może być rozpoznana jako choroba tylko wtedy, gdy uzyskano zarówno kliniczne, jak i laboratoryjne dowody jej aktywności, przy użyciu nieraz bardzo drogich i czasochłonnych badań uzupełniających, które muszą być wielokrotnie powtarzane. Do rozpoznania nabytej neurotoksoplazmozy, która początkowo

może być mylona z różnymi zespołami neurologicznymi (m.in. z guzem mózgu, stwardnieniem rozsianym, polineuropatią), nieodzowna jest poza badaniami klinicznymi i serologicznymi kompleksowa analiza płynu mózgowo-rdzeniowego pacjenta, uzupełniona technikami obrazowymi, np. badaniem mózgu za pomocą rezonansu magnetycznego.

Serologicznymi dowodami, często potwierdzającymi aktywność inwazji, jest wystąpienie zjawiska serokonwersji (zmiana ujemnego wyniku badania serologicznego na dodatni), znamienny (czterokrotny) wzrost miana przeciwciał anty-toksoplazmozowych (obecność, bądź wysoki poziom przeciwciał IgM oraz wysoki poziom przeciwciał klasy G), stwierdzany przynajmniej w dwóch kolejnych oznaczeniach, w okresie nie krótszym niż 3 tygodnie.

W celu uzupełnienia rutynowej diagnostyki toksoplazmozy wykonywane są testy umożliwiające: określenie awidności przeciwciał klasy IgG, oznaczenie przeciwciał anty-*T. gondii* w klasie IgA pojawiających się we wczesnej fazie zarażenia oraz nowoczesne techniki diagnostyczne, mające na celu wykrycie tachyzoitów pierwotniaka lub jego krążących antygenów albo DNA w płynach ustrojowych chorego. Wykrycie krążącego antygenu świadczy o rozpoznaniu ostatecznym.

3.8. Szczepionki przeciwko toksoplazmozie

Leczenie toksoplazmozy jest bardzo długotrwałe i skomplikowane, dlatego najlepszym sposobem walki z tą chorobą byłoby jej zapobieganie. Najbardziej skuteczną metodą zapobiegania wielu chorobom infekcyjnym są szczepienia. Ciągły rozwój immunologii, biologii molekularnej prowadzi do nowych strategii w konstruowaniu "idealnej" szczepionki, która będzie całkowicie bezpieczna dla gospodarza, tania, łatwa w podawaniu oraz zdolna do indukcji szerokiej odpowiedzi immunologicznej. Szczepionka taka powinna spełniać trzy podstawowe warunki:

- antygen musi dotrzeć do właściwego przedziału komórki, aby mógł być prezentowany w kontekście cząsteczek MHC klasy I lub II;
- wprowadzenie antygenu powinno indukować wytworzenie odpowiedniego naturalnego środowiska cytokinowego i chemokinowego, które zainicjuje rozwój odporności swoistej;

3. antygen powinien wzbudzić silną ekspresję cząsteczek kostymulacyjnych na komórkach prezentujących antygen i limfocytach T.

Jednakże, spełnienie tych trzech warunków w przypadku szczepionek przeciwpasożytniczych jest niezmiernie trudne. Związane jest to ze złożonym cyklem rozwojowy pasożyta, w którym pojawiają się kolejno różne formy, nie tylko pod względem morfologicznym, ale i antygenowym. Reakcja immunologiczna organizmu żywiciela jest złożona i swoista dla danego pasożyta, a także poszczególnego stadium rozwojowego.

Obecnie dostępna jest tylko jedna szczepionka komercyjna o nazwie "Toxovax". Złożona jest ona z żywych atenuowanych tachyzoitów szczepu S48, który nie ma zdolności tworzenia cyst tkankowych [Buxton, 1993]. Szczepionka ta przeznaczona jest dla owiec, u których powoduje obniżenie częstości poronień wywołanych wewnątrzmacicznym zarażeniem płodu. Główną wadą tej szczepionki jest to, że powoduje wiele efektów ubocznych, m. in. jest przyczyną znacznego spadku masy ciała, ogólnego osłabienia szczepionych owiec, a także, nie chroni przed wertykalnym przenoszeniem pasożyta. Z tego powodu cały czas prowadzone są badania nad nowymi typami szczepionek.

Oprócz atenuowanego szczepu S48 do szczepienia zwierząt wykorzystywane są inne szczepy *T. gondii.* W przypadku szczepienia świń pracuje się nad wykorzystaniem szczepu TS-4 pasożyta [Lindsay i wsp., 1993; Dubey i wsp, 1994]. Natomiast dla kotów obiecujące może być wykorzystanie szczepu T-263, który może indukować odporność, ale nie jest zdolny do wytwarzania męskich gamet, a tym samym nie jest zdolny do zakończenia swojego cyklu płciowego i rozprzestrzeniania [Cornelissen i Schetters, 1996]. Jednakże, z powodu możliwości rewersji pasożyta do postaci zjadliwej, żadna atenuowana szczepionka nie może być rozważana jako potencjalna szczepionka dla ludzi.

W szczepieniu zwierząt możliwe jest wykorzystanie białek izolowanych bezpośrednio z komórek *T. gondii* (tzw. antygenów dzikiego typu). Jednym z takich przykładów jest szczepionka oparta na surowej frakcji białek roptrii wyizolowanych ze szczepu LIV-5 pasożyta połączonych z adjuwantem ISCOM [Garcia i wsp., 2005]. Jednakże, szczepionki oparte na tego rodzaju pojedynczych białkach zazwyczaj dają tylko częściową ochronę przed inwazją. Z tego powodu prace w tym zakresie dotyczą prób określenia właściwości

36
ochronnych wybranych antygenów naturalnych, użytych nie w postaci oczyszczonych pojedynczych białek, ale jako mieszanki odpowiednich antygenów. Dobre rezultaty w uodparnianiu owiec uzyskano wprowadzając im donosowo surowy tzw. poliwalentny antygen (lizat tachyzoitów), zamknięty w mikrokapsułkach z PLG (DL-lactide-co-glycolide) [Stanley i wsp., 2004]. Do immunizacji myszy wykorzystano również wyizolowane chromatograficznie ze szczepu BK *T. gondii* dwa antygeny mikronem: MIC1 i MIC4 [Lourenco i wsp., 2006].

Wraz z rozwojem inżynierii genetycznej pojawiła się nadzieja na produkcję antygenów protekcyjnych pasożyta w zmodyfikowanych genetycznie bakteriach i drożdżach. Szczególne zainteresowanie skupiono dotychczas na antygenie SAG1 i na białkach organelli wydzielniczych, zaangażowanych w proces adhezji pasożyta do komórki gospodarza (antygeny mikronem, MIC), biogenezę (antygeny roptrii, ROP) i funkcje wakuoli pasożytniczej (antygeny granul o dużej gęstości, GRA). Rzadziej badane są właściwości innych antygenów, np. BAG1 (ang. bradyzoite antygen) czy MAG1. Doświadczenia z użyciem antygenów rekombinantowych jako materiału szczepionkowego są dość liczne, ale wyniki niejednoznaczne. Ostatnio potwierdzono silne właściwości ochronne antygenu SAG1 [Liu i wsp., 2006]. Dwukrotne podanie myszom tego białka z adiuwantem Freunda indukowało silną odpowiedź ochronną u myszy. Niestety okazało się, że nie wszystkie antygeny protekcyjne pasożytów ulegają ekspresji w natywnej formie w dostępnych układach ekspresyjnych. Dlatego ostatnio podejmuje się próby opracowania szczepionki opartej na syntetycznych peptydach. Najlepsze rezultaty uzyskano dla 17 peptydów obejmujących region od 1 do 336 reszty aminokwasowej antygenu SAG1 (16 peptydów długości 20 reszt aminokwasowych i jeden zbudowany z 16 reszt aminokwasowych). Myszy immunizowane peptydami obejmującymi region pomiędzy 221 a 336 resztą aminokwasową i zarażone wysoce zjadliwym szczepem RH przeżyły dłużej niż myszy kontrolne [Siachoque i wsp. 2006]. Jednkaże antygeny rekombinantowe wywołują głównie odpowiedź zależną od limfocytów Th2, podczas gdy w większości inwazji pasożytniczych kluczową rolę w protekcji odgrywa odpowiedź immunologiczna zależna od pobudzenia limfocytów Th1.

Szczepionki nowej generacji wykorzystują niepatogenne bakterie jelitowe jako potencjalny nośnik materiału szczepionkowego. Takie rekombinantowe drobnoustroje z genami antygenów pasożyta, podane drogą pokarmową, wywołuja obok odpowiedzi ogólnej silna odporność miejscowa [Darji i wsp. 2000], która może okazać się bardzo skuteczną ochroną m.in. w przypadku zarażenie T. gondii drogą pokarmową. Przykładem takiej szczepionki może być wykorzystanie szczepu Salmonella typhimurium do wprowadzenia eukariotycznego plazmidu z wbudowanymi genami kodującymi dwa powierzchniowe antygeny pasożyta rodziny antygenów SAG: SAG1 i SAG2 oraz podjednostki A2/B toksyny przecinkowców cholery jako adiuwant. Ta doustna szczepionka okazała sporą skuteczność: 40% myszy szczepionych 3krotnie przeżyło zarażenie wysoce zjadliwym szczepem T. gondii (RH), a wytworzona odporność wykazała typowy ochronny profil – z przewagą swoistych przeciwciał izotypu IgG₂ nad IgG₁, silną aktywnością proliferacyjną i cytotoksyczną limfocytów oraz wzmożonym wytwarzaniem przez nie kluczowej ochronnej cytokiny – IFN-γ [Cong i wsp., 2005]. Gorsze rezultaty uzyskano dla Mycobacterium bovis BCG (Bacillus Calmette-Guérin) z wbudowanym genem kodującym antygen GRA1, które okazały się słabym induktorem odporności ochronnej zarówno u myszy jak i owiec. Do immunizacji wykorzystano także rekombinantowe adenowirusy, niezdolne do replikacji, niosace geny zmodyfikowanych antygenów powierzchniowych: SAG1, SAG2 i SAG3, które spowodowały silne zahamowanie wytwarzania cyst tkankowych po zarażeniu cystotwórczym szczepem T. gondii P-Br [Caetano i wsp., 2006].

Jednak najlepsze rezultaty i największym zainteresowaniem (mimo kilku poważnych wad) cieszą się szczepionki oparte na kwasach nukleinowych [Kofta i Wędrychowicz, 2001; Ivory i Chadee, 2004]. W pierwszej fazie prac nad skonstruowaniem efektywnej szczepionki przeciw toksoplazmozie skupiono się przede wszystkim na genie kodującym antygen SAG1 [Nielsen i wsp.,1999], a także na atygenach GRA, ROP oraz MIC. Następnie dla uzyskania lepszej skuteczności zaczęto testować szczepionki wielogenowe, m. in. zastosowano mieszankę plazmidów z wbudowanym genem SAG1 oraz sekwencją ROP2 (196-561 reszty aminokwasowe) [Fachado i wsp. 2003]. Innym przykładem jest zastosowanie mieszanki DNA kodującej fragmenty antygenów mikronem [Beghetto i wsp., 2005]. Plazmidy wykorzystywane do immunizacji mogą zawierać nie tylko geny pasożyta kodujące białka antygenowe, ale także geny kodujące białka wspierające odporność poszczepienną, np. gen kodujący czynnik wzrostu stymulujący rozwój kolonii granulocytów makrofagów (GM-CSF, granulocyte-macrophage colony stimulating factor). Skuteczność takiej szczepionki wykazano na modelu mysim, w którym gen GM-CSF skojarzony z genem SAG1 i GRA4 zwiększył przeżywalność wrażliwego na toksoplazmozę szczczepu myszy. Ostatnio zaczęto prowadzić również badania na szczepionkach opartych na plazmidach z wklonowanymi genami BAG1 lub MAG1 [Nielsen i wsp., 2006].

Ostatnie badania sugerują, że oprócz DNA do szczepień może być również wykorzystane jako materiał szczepionkowy RNA. Mimo tego że preparatyka RNA jest trudna oraz ten rodzaj kwasu nukleinowego jest dużo mniej stabilny niż DNA, to szczepionka oparta na RNA nie ma możliwości integracji z chromosomem immunizowanego organizmu, co jest bardzo dużą zaletą. Szczepionka zawierająca RNA pasożyta chroniła 50% myszy zarażonych letalną dawką cyst tkankowych *T. gondii* 76 K oraz obniżała poziom wytwarzanych w mózgu cyst [Dimier Poisson i wsp., 2006].

Bardzo obiecujące podejście w wakcynologii prezentuje procedura "heterologous prime-boost immunization", w której stosuje się różne wektory podczas szczepienia podstawowego i przypominającego, np. najpierw rekombinantowy plazmid, a potem rekombinantowy wirus, co prowadzi do rozwoju silnej odporności komórkowej [Ramshaw i Ramsay, 2000].

Zupełnie nowym podejściem do szczepionek jest wykorzystanie komórek dendrytycznych oraz exosomów. Tego rodzaju szczepionka powstaje w wyniku pobrania z organizmu komórek dendrytycznych. Następnie komórki te są aktywowane poprzez ich inkubację *in vitro* z antygenami pasożyta i tak zaktywowane komórki lub wydzielane przez nie exosomy, są wprowadzane ponownie do szczepionego organizmu. Wysoką skuteczność tego rodzaju szczepionek potwierdzono na modelach mysich, a przeprowadzone wstępne badania potwierdzają, że mogą być one wykorzystane w immunoprofilkatyce nie tylko zarażeń pasożytniczych, ale także mogą stanowić szczepionki przeciwnowotworowe [Flamand i wsp.,1994; Flohe i wsp., 1998; Aline i wsp., 2004]. Prace dotyczące otrzymywania szczepionek przeciwko toksoplazmozie prowadzone są także od kilku lat w Katedrze Mikrobiologii Politechniki Gdańskiej we współpracy z Lincoln University w Nowej Zelandii. Dotychczas otrzymano i oszacowano przydatność szczepionek opartych na białkowych antygenach rekombinantowych (SAG1, GRA1, p22), a także szczepionek DNA. Jednak problemem przy wykorzystaniu białek rekombinantowych, bądź szczepionek DNA, w tym konkretnym przypadku jest zbyt słaba indukcja odpowiedzi komórkowej organizmu. Mimo, że następuje dość silna stymulacja produkcji przeciwciał owce nie nabywają pełnej odporności. Dlatego chimeryczne fimbrie bakteryjne, które silnie indukują odpowiedź komórkową, wydają się być doskonałym kandydatem na taką szczepionkę [Goluszko i wsp., 1997; Sauer i wsp., 2000].

3.8.1. Sposób podania szczepionki

Ważnym czynnikiem determinującym skuteczność każdej szczepionki wydaje się sposób jej podania. Na przykład tylko dojelitowe, ale nie podskórne, szczepienie temperaturowrażliwym szczepem *T. gondii* TS-4 zapobiegało transmisji pasożytów przez łożysko u myszy [McLeod i wsp.,1988]. O ważności drogi wprowadzenia materiału szczepionkowego i jego formy świadczą również wyniki badań Mohameda i wsp. (2003). Wytworzenie najsilniejszej odporności ochronnej obserwowali oni po iniekcji genu dla HSP70 (heat shock protein 70) techniką "gene gun vaccination", mniej efektywna okazała się droga domięśniowa (mięśnie czworogłowe uda) i dootrzewnowa. Również śródskórna iniekcja plazmidowego DNA wywołuje długotrwałą ekspresję zakodowanego antygenu przez skórne keratocyty, fibroblasty, komórki Langerhansa i makrofagi. Konsekwencją tej ekspresji jest pobudzenie odpowiedzi komórkowej i humoralnej typu Th1, podczas gdy podanie tą samą drogą antygenu w postaci białkowej wywołuje odpowiedź typu Th2.

3.8.2. Adiuwanty

Bardzo ważnym i trudnym problemem do rozwiązania jest użycie adiuwantów. Adiuwanty (łac. a*diuvare* - pomagać) to substancje dodawane do szczepionek w celu pobudzenia lub zwiększenia reakcji immunologicznej organizmu. Wzmagają one nieswoiście odpowiedź immunologiczną na antygen. Niestety wiele z nich wywołuje szereg niebezpiecznych efektów ubocznych. Adiuwanty różnią się między sobą pod względem sposobu działania na układ odpornościowy, jak i efektami ubocznymi wynikającymi z nadmiernej aktywacji systemu immunologicznego. Po raz pierwszy działanie adiuwantowe zaobserwowano w 1920 r. w czasie badań nad produkcją surowic zwierzęcych do celów leczniczych. Odkryto wtedy, że niektóre substancje, np. sole glinu dodane lub zemulgowane z antygenem, wydatnie zwiększają produkcję przeciwciał. Do najbardziej znanych adiuwantów stosowanych w laboratoriach należy tak zwany pełny adiuwant Freunda. Rozwój badań nad środkami wspomagającymi Freunda był następstwem badań nad gruźlicą. Kilku badaczy stwierdziło, że reakcje immunologiczne u zwierząt na różne antygeny były wzmocnione przez wprowadzenie do organizmu zwierzęcia żywych M. tuberculosis (prątków gruźlicy). W obecności tej bakterii uzyskano reakcję typu opóźnionego, przenoszoną z leukocytami. Freund dokonał pomiarów wpływu oleju mineralnego na powodowanie nadwrażliwości opóźnionego typu na zabite pratki. Stwierdził wyraźny wzrost w reakcji wiązania dopełniacza przeciwciała, jak również w opóźnionej reakcji nadwrażliwości. Środek wspomagający Freunda stanowi emulsję wody w oleju wodnego antygenu w parafinie (oleju mineralnym) o niskim ciężarze właściwym i niskiej lepkości. Jako środki emulgujące ogólnie stosowane są Drakeol 6VR i Arlacel A (mannide monooleate). Są dwa środki wspomagające Freunda: niekompletne i kompletne. Niekompletne środki wspomagające Freunda zawierają emulsję wody w oleju bez prątków, natomiast kompletne - te same związki, ale z dodatkiem 5 mg wysuszonych, zabitych przy pomocy podwyższonej temperatury M. tuberculosis lub związków kwasu masłowego. Mechanizm działania środków wspomagających Freunda jest związany z trzema następującymi zjawiskami:

- umieszczenie porcji antygenu w formie stałej w miejscu wstrzyknięcia umożliwia stopniowe i stałe jego uwalnianie w celu stymulowania przeciwciał;
- zapewnienie środka przenoszenia dla zemulsyfikowanego antygenu przez system limfatyczny do oddalonych miejsc, takich jak węzły limfatyczne i śledziona, gdzie mogą powstać nowe ogniska tworzenia przeciwciał;

41

 tworzenie i akumulowanie serii komórek mononuklearnych, które są właściwe dla produkcji przeciwciał lokalnie i w miejscach oddalonych.

Wydaje się, że działanie adiuwantu zależy od dwu jego aktywności: zagęszczania antygenu w miejscu obecności limfocytów (efekt "składu-depot") oraz indukcji cytokin, które regulują ich funkcję. W przypadku ludzi użycie adiuwantów nie jest zalecane, jednak do tej pory dopuszczono do stosowania niektóre sole nieorganiczne (wodorotlenek glinu, fosforan glinu oraz fosforan Th2 wapnia), które wybiórczo wspieraja rozwój swoistei reakcji immunologicznej. Sole glinu prawdopodobnie pełnią funkcję deponowania antygenu, tworząc małe ziarenka, w których obecny jest antygen [Roitt, 2001]. Dobre rezultaty uzyskano także po zastosowaniu innych soli mineralnych metali, jak azotan ceru, siarczan cynku, koloidalny wodorotlenek żelazowy i chlorek wapnia, jednak najlepsze wyniki daje wodorotlenek glinu. Również wodorotlenek berylu znacznie wzmaga odpowiedź immunologiczną organizmu, jednak jest zbyt toksyczny aby mógł być stosowany u ludzi. Fosforan wapnia stosowany był jako adiuwant w równoczesnych szczepieniach przeciwko dyfterytowi, kokluszowi, tężcowi, polio, gruźlicy, żółtej febrze, odrze i zapaleniu wątroby B, również z alergenami [Coursaget i wsp., 1986]. Korzyści ze stosowania tego środka wspomagającego upatrywano w fakcie, że jest on normalnym składnikiem ciała oraz jest lepiej tolerowany od innych adiuwantów. Wyłapuje on bardzo skutecznie antygeny i umożliwia ich powolne uwalnianie. Ponadto organizm, któremu podano ten adiuwant wytwarza duże ilości przeciwciał typu IgG i znacznie mniejsze przeciwciał typu IgE.

Adiuwantami mogą być również produkty bakteryjne. Szczepionki zawierające całe zabite bakterie, a także pewne produkty metaboliczne oraz składniki różnych mikroorganizmów wywołują w odpowiedzi powstawanie przeciwciał i działają jako immunostymulanty. Dodanie takich mikroorganizmów i substancji do szczepionek zwiększa reakcję immunologiczną na inne antygeny znajdujące się w takich szczepionkach. U ludzi stosuje się jako adiuwanty produkty bakteryjne - *Bordetella pertussis* (z toksoidami błoniczym i tężcowym). Innymi często stosowanymi jako adiuwanty produktami bakteryjnymi są: składnik o nazwie P40 uzyskiwany z *Corynebacterium*, toksyna cholery, a także prątki. Również lipopolisacharydy (LPS) są środkami wspomagającymi

odporność humoralną i komórkową. Zwiększają reakcję immunologiczną, zarówno na antygeny białkowe, jak i polisacharydowe. Jednakże, LPS jest zbyt toksyczny i gorączkotwórczy, nawet w znikomych dawkach, aby mógł być stosowany jako środek wspomagający u ludzi. Również prątki i ich składniki wykorzystywane jako adiuwanty okazały się zbyt toksyczne. Produkty bakteryjne działają najprawdopodobniej głównie przez stymulację produkcji przeciwciał. Teorię tę potwierdza fakt, że same cytokiny są skutecznymi adiuwantami, zwłaszcza gdy połączone są bezpośrednio z antygenem.

Dzięki wykonanym badaniom mającym na celu detoksyfikację produktów bakteryjnych otrzymano N-acetyl muranyl-L-analyl-D izoglutaminę oraz dipeptyd muranylu (MDP). Związki te podane bez antygenu zwiększają niespecyficzną odporność przeciwko infekcjom bakteryjnym, grzybiczym, pasożytniczym i wirusowym, a nawet przeciwko pewnym guzom [Woodard i wsp., 1980]. Do głównych wad zaliczyć należy to, iż są one potencjalnie gorączkotwórcze i ich działanie nie jest całkowicie zrozumiałe.

Kolejnym składnikiem bakteryjnym wykorzystywanym jako adiuwanty są tzw. liposomy, składające się z koncentrycznych błon lipidowych zawierających fosfolipidy i inne lipidy w konfiguracji dwóch warstw oddzielonych przez komory wodne. Ich rola polega najprawdopodobniej na zamykaniu antygenu i dostarczeniu bezpośrednio do komórek prezentujących antygen. U ludzi były stosowane pozajelitowo jako nośniki biologicznie aktywnych substancji i są uważane za bezpieczne. Jednym z ostatnio wykorzystywanych adiuwantów o mechanizmie działania takim jak liposomy iest tzw. kompleks immunostymulujący (ISCOMs) [Lovgren i Morein, 1991]. Jest to stosunkowo stabilny, ale niekowalentnie związany, kompleks saponinowego związku wspomagającego Quil-A, cholesterolu i antygenu amfipatycznego w stosunku cząsteczkowym około 1:1:1. Spektrum antygenów kapsydu wirusa i amfipatycznych antygenów niewirusowych o istotnym znaczeniu dla szczepionek przeznaczonych dla ludzi, jakie zawiera ISCOMs, obejmuje grypę, odrę, wściekliznę, gp340 z wirusa EB, gp120 z HIV, Plasmodium falciparum i *Trypanosoma cruzi*. Wykazano, że ISCOMs pobudzają cytotoksyczne limfocyty T. Ponadto, może zostać pobudzona specyficzna reakcja IgA. ISCOMs są stosowane jedynie w szczepionkach weterynaryjnych, częściowo ze względu na ich działanie hemolityczne i pewne reakcje miejscowe (aktywność detergentową cząsteczki Quil-A).

Inne środki wspomagające odpowiedź immunologiczną organizmu to m. in. skwalen. Jest to polimer organiczny, który stosowany był w eksperymentalnych szczepionkach od 1987 roku [Asa i wsp., 2000] i w eksperymentalnych szczepionkach podawanych dużej liczbie uczestników wojny w Zatoce Perskiej. Adiuwant ten spowodował jednak kaskadę reakcji zwanych "syndromem wojny w Zatoce", które stwierdzono u żołnierzy biorących w niej udział. Symptomy, jakie u nich odkryto, obejmowały zapalenie stawów, bóle tkanki łącznej, powiększenie węzłów chłonnych, wysypki uczuleniowe, uczulenie na światło w postaci wysypki, wysypki w okolicy jarzmowej, chroniczne zmęczenie, chroniczne bóle głowy, nienormalną utratę włosów ciała, nie ulegające leczeniu ubytki skóry, owrzodzenia aftowe, zawroty głowy, osłabienie. pamięci, napady, zmiany problemy utrate nastroju. neuropsychiatryczne, uszkodzenia tarczycy, anemię, podwyższone OB, systemowy liszaj rumieniowaty, stwardnienie rozsiane, ALS (stwardnienie zanikowe boczne), zespół Raynauda, syndrom Sjórgena, chroniczną biegunkę, nocne pocenie i stany podgorączkowe. Ta długa lista reakcji ubocznych wskazuje, jak wielkie szkody powodują adiuwanty wykorzystywane w szczepionkach. Dlatego z jednej strony cały czas prowadzone są badania na celu poszukiwanie adiuwantów lepszych od tradycyjnie majace stosowanych, szczególnie dla odpowiedzi komórkowej (zależnej od limfocytów T), m. in. próbuje się jako adiuwanty stosować cytokiny promujące drogę Th1, np. IL-2, IL-12 lub IL-15. Jednak z drugiej strony pracuje się nad innymi rodzajami szczepionek, które stymulowałyby odpowiedź komórkową bez dodawania adiuwantów.

3.9. Bakteryjne systemy heterologiczne jako szczepionki

Systemy pozwalające na ekspresję heterologicznych białek obejmują wykorzystanie zewnątrzkomórkowych struktur bakterii *E. coli* oraz białek zewnątrzbłonowych (białka fimbrii 1 i P, flageliny, białka LamB, PhoE). Wymienione białka mogą być nośnikiem sekwencji heterologicznych determinant antygenowych, enzymów, pojedynczych łańcuchów przeciwciał oraz peptydów chelatujących metale [Kjaergaard i wsp., 2000].

Do najważniejszych zastosowań białek chimerycznych (zawierających białko nośnikowe oraz sekwencję heterologiczną) należy tworzenie szczepionek rekombinantowych oraz otrzymywanie antygenów wykorzystywanych w testach diagnostycznych. Szczepionki, dla których nośnikiem są podjednostki fimbrialne posiadają podobne zalety do szczepionek zawierających oczyszczone białka fimbrialne.

Doświadczenia będące potwierdzeniem tego typu zastosowania adhezyn bakteryjnych to między innymi:

- wprowadzenie epitopu łańcucha B toksyny cholery do białka FimA, tworzącego strukturę rdzenia fimbrii typu 1 uropatogennych szczepów *E. coli* [Stentebjerg-Olesen i wsp., 1997];
- wykorzystanie podjednostki strukturalnej fimbrii K88, FaeG, do wprowadzenia epitopów pochodzących z ludzkiego wirusa grypy (o wielkości od 7-12 reszt aminokwasowych), wirusa HIV1 (o wielkości 11 aminokwasów) [Bakker i wsp., 1990], pilinowej podjednostki białkowej *Neisseria gonorhoea* (o wielkości 11 aminokwasów) i hormonu somatostatyny (o wielkości 14 aminokwasów) [Thiry i wsp., 1989];
- wykorzystanie bakteryjnych adhezyn fimbrii 987P pochodzących z enterotoksycznych szczepów *E. coli* do ekspresji epitów wirusa HSV1 i wirusa TGEV. Immunizacja królików oczyszczonymi białkami chimerycznymi powodowała wytwarzanie wysokiego poziomu przeciwciał skierowanych przeciwko epitopom wirusa HSV1 i TGEV [Rani i wsp., 1999];
- wprowadzenie epitopu HSV1 do białka podjednostkowego fimbrii typu Dr, uropatogennych szczepów *E. coli* [Zalewska i wsp., 2003];
- wykorzystanie oczyszczonego preparatu fimbrii typu Dr jako szczepionki przeciwko chronicznemu zapaleniu ukladu moczowego u myszy [Goluszko i wsp., 2005].

3.10. Adhezyny bakteryjne

W każdej infekcji bakteryjnej pierwszym etapem jest interakcja na poziomie molekularnym pomiędzy bakterią, a komórką gospodarza. Aby zainicjować infekcję patogen najpierw musi skolonizować odpowiednią komórkę docelową. Bez względu czy mamy do czynienia z kolonizacją zewnątrzkomórkową czy wewnątrzkomórkową najpierw następuje adhezja bakterii do powierzchni komórki gospodarza. Proces ten umożliwiaja występujące na powierzchni komórki bakteryjnej różnego rodzaju adhezyny. Są one odpowiedzialne za rozpoznanie i związanie się ze specyficznymi receptorami występującymi na komórkach gospodarza. Wiązanie receptorów komórkowych prowadzi do aktywacji złożonych kaskad transdukcji sygnału. Następuje uruchomienie wrodzonych mechanizmów obronnych organizmu gospodarza, ale również uruchomiane są mechanizmy, które ułatwią proces kolonizacji i inwazji bakterii. Ponadto, adhezja może również aktywować ekspresję nowych genów bakteryjnych ważnych w procesie patogenezy. W wielu przypadkach adhezyny (buduące fimbrie lub pile) są strukturami włosopodobnymi, zbudowanymi z wielu podjednostek białkowych, które wystają ponad powierzchnię bakterii. Różnorodność struktur fimbrialnych jest bardzo duża, jednakże główną funkcją wszystkich typów jest wiązanie się ze specyficznymi receptorami komórkowymi, za co odpowiadaja adhezyny rozmieszczone wzdłuż osi fimbrii lub znajdujące się na szczycie fimbrii. Czasami białko podjednostkowe budujące fimbrie pełni funkcję adhezyny [Westerlund-Wikstrom i Korhonen, 2005]. Większość typów fimbrii osiąga około 2 µm długości, a ich średnica waha się od 2 do 10 nm. Pod względem budowy można podzielić je na dwie główne grupy. Pierwsza z nich obejmuje fimbrie, które zbudowane są z podjednostek tworzących ciasno upakowaną skręconą helisę, w której na jeden skręt przypada około 3,2 podjednostek. Średnica zewnętrzna tego rodzaju fimbri wynosi około 7 nm i ich cechą charakterystyczną jest występowanie w środku otworu o średnicy około 1,5 nm. Druga grupa fimbri jest struktura cieńszą o średnicy 2 do 4 nm i nie posiada wewnątrz otworu. Występują również przypadki kiedy adhezyny związane są bezpośrednio z powierzchnią komórek bakteryjnych, są to tzw. struktury afimbrialne.

W celu wykształcenia adhezyny na powierzchni komórki bakteryjnej, białka budujące tą strukturę muszą zostać przetransportowane przez błonę wewnętrzną i zewnętrzną, a następnie uformowane w odpowiednią strukturę polimeryczną. W procesie ewolucji wykształciły się różne systemy transportu na zewnątrz komórki. Każdy system odpowiedzialny jest za sekrecję zwykle jednego typu organellum. Biogeneza tych struktur może przebiegać w

46

zależności od rodzaju adhezyny z wykorzystaniem jednego z czterech różnych mechanizmów: szlak sekrecji "chaperone/usher" (pile typu P, typu 1 i typu Dr), główny szlak sekrecji (GSP) (pile typu IV), pozakomórkowa precypitacja (fimbrie agregujące) lub alternatywny "chaperonowy" szlak sekrecji (pile typu CS1) [Soto i Hultgren, 1999].

3.10.1. Pile typu P i typu 1

Pile typu P występują na powierzchni większości szczepów *E. coli* wywołujących odmiedniczkowe zapalenie nerek [Kallenius i wsp., 1981]. W biogenezę tego rodzaju struktur zaangażowane jest 11 białek kodowanych przez operon *pap*. Badania strukturalne wykazały, że w budowie fimbrii tego typu można wyróżnić sztywny rdzeń złożony z powtarzających się podjednostek białka PapA (3,28 białka na skręt helisy) oraz występującej na szczycie fimbrii elastycznej struktury zwanej fibrillum zbudowanej z białka PapE. Na samym końcu fimbrii znajduje się adhezyna PapG odpowiedzialna za wiązanie się z resztami Gal $\alpha(1,4)$ Gal, występującymi na powierzchni glikolipidowej błony nabłonka wyściełającego drogi moczowe oraz na powierzchni erytrocytów. Adhezyna PapG połączona jest z fibrillum za pomocą białka adaptorowego PapF, natomiast fibrillum połączone jest z rdzeniem fimbrii za pomocą adaptorowego białka PapK. Cała fimbria do powierzchni komórki bakteryjnej przyłączona jest za pomocą białka PapH. Długość takiej pili wynosi ok. 1 µm i zbudowana jest z ok. 3000 podjednostek białkowych.

Pile typu 1 występują na powierzchni bakterii *E. coli* wywołujących zapalenie pęcherza moczowego, a także na większości bakterii należących do rodziny Enterobacteriaceae. Są one kodowane przez operon *fim* zawierający 9 otwartych ramek odczytu kodujących zarówno białka strukturalne pili jak również białka odpowiedzialne za regulację ekspresji. W strukturze fimbrii tego typu, podobnie jak w przypadku fimbrii typu P, wyróżniamy sztywny rdzeń zbudowany z podjednostek białka FimA (3,125 białka na skręt helisy) oraz elastyczne fibrillum (dużo krótsze niż w przypadku pili typu P) zbudowane z białka FimG występującego na szczycie fimbrii. Adhezyną w przypadku pili typu 1 jest białko FimH odpowiedzialne za wiązanie się z resztami mannozy. Fibrillum do rdzenia fimbrii przyłączone jest za pomocą białka adaptorowego FimF. Pile tego typu mają bardzo zbliżoną budowę do fimbrii typu P.

Fimbrie typu P oraz typu 1 powstają na drodze sekrecji "chaperone/usher". W biogenezę fimbrii zaangażowane są dwa główne białka. Pierwsze z nich to występujące w przestrzeni periplazmatycznej białko opiekuńcze "chaperone" odpowiedzialne za interakcje z białkiem podjednostkowym fimbrii oraz transport białek z błony wewnętrznej do zewnętrznej. Drugie białko charakterystyczne dla tego rodzaju sekrecji to "usher", występujący w błonie zewnętrznej i umożliwiający transport białek podjednostkowych tworzących fimbrie z przestrzeni periplazmatycznej na zewnątrz komórki bakteryjnej (Rys. 12).



Rys. 12. Biogeneza fimbrii typu P [Soto i Hultgren, 1999]. Kolorem czerwonym oznaczono białko opiekuńcze "chaperone", PapA (A) – białko podjednostkowe tworzące rdzeń fimbrii, PapE (E) – białko podjednostkowe tworzące fibrillum, PapF (F) – białko adaptorowe łączące adhezynę z fibrillum, PapG (G) – adhezyna, PapK (K) – białko adaptorowe łączące fibrillum z rdzeniem fimbrii, PapH (H) – białko adaptorowe łączące rdzeń fimbrii z błoną zewnętrzną.

3.10.2. Pile typu IV

Pile typu IV, pełniące różne funkcje, występują na powierzchni wielu gatunków bakterii, m. in. *Pseudomonas aeruginosa*, chorobotwórczych gatunków *Neisseria, Moraxella bovis, Dichelobacter nodosus* czy *Vibrio cholerae* oraz enteropatogennych *E. coli.* Pile tego typu zbudowane są z wielu takich samych podjednostek oraz kilku kopii innych białek. [Rudel i wsp., 1995]. Cechą charakterystyczna pili typu IV jest specyficzna budowa białka podjednostkowego. Struktura krystaliczna pojedynczej podjednostki budującej takie pile u bakterii *Neisseria gonorrhoeae* wykazała m. in. występowanie

długiej hydrofobowej α helisy występującej na N-końcu białka, która umożliwia łączenie się poszczególnych podjednostek w strukturę stabilnej pili.

Pile typu IV powstają z wykorzystaniem głównego szlaku sekrecji (ang. general secretion pathway). System ten funkcjonuje niezależnie od jakiejkolwiek aktywności "chaperonowej", a także nie wymaga systemu transportu podjednostek fimbrialnych formie rozpuszczalnej w przez przestrzeń periplazmatyczną. W biogenezę tego rodzaju fimbrii zaangażowanych jest kilkanaście białek, z których można wymienić kilka charakterystycznych. Pierwsze z nich to peptydaza odcinająca krótkie sekwencje aminokwasowe z białek podjednostkowych fimbrii. Następnie zintegrowane z błoną wewnętrzną białka wykorzystywane są jako platforma w procesie biogenezy. Niezwykle istotne jest również białko, którego funkcją jest dostarczanie energii niezbędnej do biogenezy fimbrii. Występuje ono w cytoplazmie komórki bakteryjnej albo złączone jest z błoną wewnętrzną od strony cytoplazmy. Ostatnie białko charakterystyczne dla tego typu sekrecji występuje w błonie zewnętrznej i tworzy kanał umożliwiający powstanie fimbrii na zewnątrz komórki bakteryjnej. Tego typu system sekrecji wykorzystywany jest nie tylko w przypadku biogenezy fimbrii, ale także w przypadku sekrecji różnego typu proteaz, toksyn czy innych substancji zewnątrzkomórkowych (Rys. 13).



Rys. 13. Biogeneza pili typu IV *N. gonorrhoeae* [Soto i Hultgren, 1999]. PilE – białko podjednostkowe pili, PilD/F/G/T... - grupa białek tworzących platformę w błonie wewnętrznej, PilQ i PilP – białka tworzące kanał w błonie zewnętrznej.

3.10.3. Agregujące fimbrie

Wiele szczepów klinicznych *E. coli* oraz *Salmonella* na swojej powierzchni wytwarza fimbrie, które są cienkie, nieregularne oraz mają zdolność do tworzenia agregatów (ang. curli). Struktury te mają zdolność wiązania się do różnych białek komórkowych i są niezwykle stabilne. Głównym białkiem budującym fimbrie tego typu jest w przypadku *E. coli* białko CsgA, będące homologiem białka AfgA występującego u *Salmonella*. W strukturze fimbrii znajduje się również białko CsgB, które występuje na powierzchni zewnętrznej błony komórkowej lub rozmieszczone jest na całej długości fimbrii. Ponadto, w proces biogenezy fimbrii zaangażowane są takie białka jak CsgE, CsgF oraz CsgG, które zabezpieczają podjednostki białkowe fimbrii przed degradacją lub tworzą kanał umożliwiający ich transport na zewnątrz komórki bakteryjnej. Jednakże, do tej pory nie udało się określić w jaki sposób zachodzą interakcje pomiędzy podjednostkami w procesie tworzenia fimbrii.

Proces ten przebiega w zupełnie odmienny sposób niż w przypadku pili typu P (typu 1) lub typu IV. Tworzenie struktury fimbrii w odróżnieniu od innych systemów następuje na zewnątrz komórki bakteryjnej. Białka podjednostkowe fimbrii (CsgA) ulegają sekrecji do środowiska zewnętrznego gdzie następuje proces precypitacji białka na powierzchni bakterii. Proces polimeryzacji najprawdopodobniej jest inicjowany przez białko CsgB, co zostało pokazane z wykorzystaniem mutantów CsgA⁻ CsgB⁺ oraz CsgA⁺ CsgB⁻ [Hammar i wsp. 1996]. Ponadto białko CsgB może dołączyć się do istniejącej fimbri i zainicjować powstanie rozgałęzienia (Rys. 14).



Rys. 14. Biogeneza fimbrii agregujących *E. coli* [Soto i Hultgren, 1999]. CsgA – białko podjednostkowe tworzące fimbrie, CsgB – białko inicjujące proces polimeryzacji, G (?) – grupa białek umożliwiających transport podjednostek fimbrailnych na zewnątrz komórki.

3.10.4. Pile typu CS1

Pile typu CS1 zostały odkryte na powierzchni enteropatogennych szczepów *E. coli* i zaangażowane są w proces kolonizacji jelita przez te bakterie. Zbudowane są w głównej mierze z jednego białka CooA, a także występującego na końcu fimbrii białka CooD. Ich struktura morfologiczna podobna jest do fimbri typu P i typu 1, jednakże białka strukturalne fimbrii typu CS1 nie posiadają charakterystycznych sekwencji pozwalających zaklasyfikować je do wcześniej wymienionych typów.

W biogenezę tego rodzaju fimbrii zaangażowany jest szlak sekrecji zwany alternatywnym szlakiem "chaperonowym". W tym przypadku wykorzystywane jest białko pełniące funkcję "chaperonu", jednakże o odmiennej budowie niż w przypadku szlaku sekrecji "chaperone/usher". Dla pili typu CS1 "chaperonem" jest białko CooB, które tworzy w przestrzeni periplazmatycznej kompleks z białkami podjednostkowymi fimbrii CooA oraz CooD. Podjednostki biakowe fimbrii transportowane są do przestrzeni periplazmatycznej z wykorzystaniem sytemu sekrecji Sec-zależnej. Oba białka podjednostkowe posiadają zakonserwowane ewolucyjnie sekwencje znajdujące się we fragmencie Ckońcowym, jednakże nie wykazują one homologi z analogicznymi sekwencjami znajdującymi się na końcach białek podjednostkowych fimbrii typu P lub typu 1. W błonie zewnętrznej występuje białko CooC, które tworzy kanał umożliwiający powstawanie fimbrii. Białko to ma możliwość wiązania się ze stabilizującym je "chaperonem" CooB. System biogenezy fimbri typu P (typu 1) oraz system biogenezy fimbrii typu CS powstał najprawdopodobniej na drodze niezależnej ewolucji zbieżnej (Rys. 15).





3.11. Charakterystyka adhezyn rodziny Dr

Patogenne szczepy E. coli powodują szereg różnych chorób. Szczepy te obecnością rożnych białek charakteryzują sie lub całych struktur umożliwiających pokonanie układu odpornościowego atakowanego organizmu. Jedną z sześciu głównych grup patogennych szczepów E. coli są szczepy należące do grupy DAEC (ang. diffusely adhering *E. coli*). Do jednej z klas szczepów DAEC zaliczamy bakterie u których wykryto adhezyny Afa/Dr (Afa/Dr DAEC). Szczepy te powodują między innymi zapalenie dróg moczowych. Adhezyny Afa/Dr zostały odkryte w roku 1984. W wyniku prowadzonych badań stwierdzono, że geny odpowiedzialne za biogenezę tych adhezyn są zlokalizowane w operonach o podobnej strukturze. Kolejność genów w tych operonach jest taka sama, a wielkości odpowiednich genów z poszczególnych operonów są prawie identyczne. Znaczną homologię wykazują geny kodujące białka zaangażowane w biosyntezę struktur adhezyjnych i białka regulatorowe

w przeciwieństwie do genów kodujących adhezyny. Do rodziny adhezyn Afa/Dr zaliczmy struktury o budowie fimbrialnej, afimbrialnej i niefimbrialnej, obejmujące 13 adhezyn o różnej specyficzności receptorowej (Tab. 3). W wyniku prowadzonych badań stwierdzono, że receptorem adhezyn Dr, AfaE-I, AfaE-III oraz F1845 (odkrytych jako pierwsze) jest białko DAF (ang. decayaccelerating factor), będące nośnikiem antygenu grup krwi Dr^a, co dało początek nazwie rodziny adhezyn Dr [Nowicki i wsp. 1989; Carnoy i wsp., 1997; Nowicki i wsp., 2001]. Jak do tej pory najlepiej poznanymi adhezynami są: AfaE-I, AfaE-III, Dr, Dr-II oraz F1845, w przypadku których w pełni zbadano organizację genetyczną, specyfikę receptorową i rolę w patogenezie szczepów Afa/Dr DAEC [Servin, 2005].

			Receptor komórkowy		
Adhezyna	Rodzaj	Pochodzenie	Kolagen	DAF	CEACAMs [*]
	struktury		typu IV		
AfaE-I	afimbrialna	ludzkie	negatywne	pozytywne	negatywne
AfaE-II	afimbrialna	ludzkie	nieznane	pozytywne	nieznane
AfaE-III	afimbrialna	ludzkie	negatywne	pozytywne	pozytywne
AfaE-V	afimbrialna	ludzkie	nieznane	pozytywne	nieznane
AfaE-VII	afimbrialna	bydlęce	nieznane	negatywne	nieznane
AfaE-VIII	afimbrialna	ludzkie, zwierzęce	nieznane	negatywne	nieznane
Dr	fimbrialna	ludzkie	pozytywne	pozytywne	pozytywne
Dr-II	niefimbrialna	ludzkie	negatywne	pozytywne	negatywne
F1845	fimbrialna	ludzkie	negatywne	pozytywne	pozytywne
Nfa-I	niefimbrialna	ludzkie	nieznane	pozytywne	nieznane
AAF-I	fimbrialna	ludzkie	nieznane	nieznane	nieznane
AAF-II	fimbrialna	ludzkie	nieznane	nieznane	nieznane
AAF-III	fimbrialna	ludzkie	nieznane	nieznane	nieznane

Tabela 3. Charakterystyka adhezyn Afa/Dr [Serwin, 2005].

CEACAM1, CEA oraz CEACAM6

3.12. Fimbrie Dr uropatogennych szczepów E. coli

Stworzony w Katedrze Mikrobiologii Politechniki Gdańskiej modelowy system ekspresji chimerycznych fimbrii opiera się na fimbriach typu Dr. Fimbrie Dr produkowane są przez szczepy *E. coli* O75:K5:H⁻ wywołujące

odmiedniczkowe zapalenie nerek. Struktury te kodowane są przez operon *dra*, składający się z sześciu otwartych ramek odczytu (ORF- ang. open reading frames): *draA, draB, draC, draD, draP* oraz *draE* (Rys. 16) [Glouszko i wsp., 1997, Nowicki i wsp., 2001]. Produktami genów operonu *dra* są białka odpowiedzialne za regulację transkrypcji operonu (DraA i DraP), białka zaangażowane w biosyntezę fimbrii (DraB, DraC, DraE) oraz inwazyna DraD. Fimbria Dr zbudowana jest z powtarzających się sekwencji białka podjednostkowego DraE, będącego jednocześnie adhezyną. DraB jest białkiem opiekuńczym, natomiast DraC to białko tworzące kanał w błonie zewnętrznej "usher".



Rys. 16. Schemat operonu *dra. draA* – gen kodujący białko regulatorowe DraA o masie 11 kDa, *draB* – gen kodujący białko opiekuńcze DraB o masie 23 kDa, *draC* – gen kodujący białko DraC o masie 90 kDa tworzące kanał w błonie zewnętrznej, *draD* – gen kodujący inwazynę DraD o masie 13 kDa, *draP* – gen kodujący białko regulatorowe DraP, *draE* – gen kodujący białko podjednostkowe fimbrii DraE o masie 16 kDa.

3.12.1. Biogeneza fimbrii typu Dr

Głównym mechanizmem biosyntezy ponad trzydziestu rodzajów struktur fimbrialnych i afimbrialnych jest mechanizm "chaperone/usher", w którym wymagana jest obecność białka opiekuńczego (ang. chaperone) oraz białka tworzącego kanał w błonie zewnętrznej (ang. usher). Na podstawie homologii sekwencji aminokwasowej pomiędzy białkiem DraB, a "chaperonami" mającymi prawie identyczną strukturę (np. FimC i PapD) stwierdzono, że biosynteza fimbrii kodowanych przez operon *dra* odbywa się również według tego mechanizmu (Rys. 17) [Sauer i wsp., 2000]. Przypuszczenia te zostały potwierdzone w doświadczeniach z wykorzystaniem kompleksów DraE-DraB, a także mutantów delecyjnych białka podjednostkowego DraE [Piątek i wsp., 2005].



Rys. 17. Mechanizm biogenezy fimbrii Dr. Oznaczenia: DraE - białko adhezyny, DraB - białko opiekuńcze, DraC - homooligomeryczne białko tworzące kanał w zewnętrznej błonie komórkowej, DraE/DraB - kompleksy podjednostek fimbrialnych z "chaperonem", a także białka systemu Sec: SecB, SecA, SecY, SecE. Kolorem czerwonym zaznaczono sekwencję sygnalną białka DraE.

W syntetyzowane prekursorowe mechanizmie tym podjednostki fimbrialne DraE (z sekwencją sygnalną na N-końcu) poprzez system Sec ("chaperon" SecB, kompleks translokazy SecA, kompleks białek tworzących kanał w błonie - SecY, SecE) dostają się do periplazmy. Nie mogą one jednak przyjąć spontanicznie formy natywnej i za pomocą domen hydrofobowych wiążą się z błoną wewnętrzną. Periplazmatyczne białko opiekuńcze DraB oddziałuje z taką podjednostką, ułatwiając jej uwolnienie z błony cytoplazmatycznej w wyniku fałdowania się białka DraE w natywną, zdolną do polimeryzacji strukturę, na matrycy "chaperonu" DraB. Dzieje się tak dzięki mechanizmowi komplementacji nici donorowej (ang. donor strand complementaton - DSC). Białko "chaperonowe" zbudowane jest z dwóch domen immunoglobulinopodobnych między którymi znajduje się szczelina. Cechą charakterystyczną "chaperonów", które nie są połączone z białkiem podjenostkowym, są wystające

dwie β harmonijki zawierające ewolucyjnie zakonserwowane hydrofobowe reszty aminokwasowe. Natomiast w białku podjednostkowym DraE, które ma również budowę immunoglobulino-podobną brakuje jednej antyrównoległej β harmonijki, która powoduje powstanie na powierzchni białka dużej hydrofobowej Białko "chaperonowe" wiąże białko podjednostkowe przez szczeliny. pochodzącej z białka "chaperonowego" harmonijki po związaniu W hydrofobowej szczelinie białka akceptorowego staje się integralną częścią hydrofobowego rdzenia białka podjenostkowego (Rys. 18). Białko DraB pozostaje w kompleksie z podjednostką DraE, stabilizując ją i osłaniając aktywną powierzchnię, zapobiegając dzięki temu przedwczesnej agregacji w periplazmie. Kompleksy białko opiekuńcze/podjednostka fimbrialna sa następnie kierowane do białka DraC ("usher"), tworzącego kanał w błonie zewnętrznej, iest miejscem polimeryzacji podjednostek który DraE. Równocześnie białko podjednostkowe związane z "chaperonem" posiada własną wystającą β harmonijkę o zbliżonej budowie do β harmonijki białka "chaperonowego". Dzięki temu możliwe jest łączenie się poszczególnych podjednostek w procesie zwanym donorową wymianą nici (ang. donor strand exchange - DSE). Donorowa β harmonijka białka "chaperonowego" zostaje zastąpiona przez N-końcową część kolejnego białka podjednostkowego. Następnie białko DraB ulega oddysocjowaniu, a fimbria jest wydłużana przez dołączanie kolejnych podjednostek DraE do jej podstawy w błonie zewnętrznej. Cecha charakterystyczna tego procesu jest to, że uwolnienie białka podjednostkowego i polimeryzacja w strukturę fimbrii nie wymaga dostarczenia energii [Smyth i wsp., 1996; Sauer i wsp., 2000; Zavialov i wsp., 2003; Piatek i wsp., 2005].



Rys. 18. Mechanizm DSC/DSE. A) Struktura krystaliczna białka podjednostkowego fimbrii typu P (PapE) przed i po procesie donorowej wymiany nici. Kolorem żółtym zaznaczono β-harmonijkę pochodzącą od białka "chaperonowego", natomiast kolorem czerwonym β-harmonijkę pochodzącą od kolejnego białka podjednostkowego. Cechą charakterystyczną jest zmiana pozycji N i C-końca białka (zamknięcie szczeliny) [Sauer i wsp., 2002]. B) Schemat topologiczny połączonych białek podjednostkowych DraE [Anderson i wsp., 2004].

3.12.2. Charakterystyka fimbrialnej podjednostki strukturalnej DraE

Białko podjednostkowe fimbrii DraE wykazuje budowę immunoglobulinopodobną. Struktura krystaliczna białka AfaE-III, będącego homologiem białka DraE (różnica 3 reszt aminokwasowych), wykazała istnienie dwóch grup β harmonijek ułożonych naprzeciwko siebie. Brak jednej β harmonijki w strukturze podjednostki fimbrialnej potwierdza mechanizm DSC/DSE prowadzący do polimeryzacji podjednostek w strukturę fimbrii [Anderson i wsp., 2004]. Adhezyna DraE wykazuje zdolność wiązania receptora DAF i kolagenu typu IV, a oczyszczone rekombinantowe białko DraE wiąże się z błoną podstawną kanalików nerkowych i torebek Bowman'a [Nowicki i wsp., 2001]. W wiązaniu się do receptora DAF (zlokalizowanego na jego jednej stronie) zaangażowana jest duża część białka podjednostkowego DraE. Białko to ma również możliwość wiązania chloramfenikolu, co powoduje zahamowanie wiązania DraE do receptora DAF. Najprawdopodobniej wynika to z częściowego zakrycia przez związany chloramfenikol powierzchni białka DraE zaangażowanej w wiązanie receptora [Anderson i wsp., 2004]. Dodatkowo adhezyna DraE ma zdolność wiązania się z antygenem karcynoembrionalnym (CEACAMs ang. carcinoembryonic antigenrelated cell adhesion molecules). Antygen ten bierze udział w adhezji międzykomórkowej w wyniku oddziaływań zarówno heterotypowych jak i homotypowych. Do rodziny antygenów CEACAM należą takie antygeny jak CEA, CEACAM1, CEACAM3, CEACAM4, CEACAM6, CEACAM7 i CEACAM8. Wykazano, że białko DraE wiąże się z receptorem CECAM1, CEA oraz CEACAM6 [Berger i wsp., 2004]. Jednakże rola receptorów CEACAM w infekcji E. coli nie jest do końca wyjaśniona. Najprawdopodobniej, tak jak w przypadku N. gonorrhoeae, wiązanie z tymi receptorami powoduje ścisłe przyleganie bakterii do błony zewnętrznej atakowanej komórki i w konsekwencji wchłonięcie bakterii do jej wnętrza [Korotkova i wsp., 2006].

Podjednostka DraE zawiera N-końcową, powierzchniowo eksponowaną, domenę 2. Zakonserwowane reszty cysteiny w pozycji 19 (40 w przypadku białka DraE z sekwencją sygnalną) i 51 (72) białka DraE tworzą mostek disiarczkowy, co powoduje powstanie pętli złożonej z 33 aminokwasów na Nkońcu białka (Rys. 19). Mutacja tych reszt cysteinowych w białku DraE powoduje utratę aktywności hemaglutynacyjnej oraz zdolności wiązania kolagenu typu IV, a także wpływa na biosyntezę i stabilność całej fimbrialnej podjednostki strukturalnej [Carnoy i Moseley, 1997]. Proces polimeryzacji podjednostek fimbrialnych jest determinowany silnie zakonserwowanymi sekwencjami zlokalizowany jest fragment znacznie mniej zakonserwowany i zdolny do akomodacji obcych sekwencji (np. antygenowych) (Rys. 20). Białko adhezyny DraE może zatem pełnić funkcję nośnika determinant antygenowych, a takie chimeryczne podjednostki fimbrialne, z obcymi sekwencjami antygenowymi posiadają zdolność do polimeryzacji w wysoce immunogenną strukturę [Zalewska i wsp., 2003].

1 MKKLAIMAAASMVFAVSSAHAGFTPSGTTGTTKLTVTEECQVRVGDLTVA

51 **KTRGQLTDA**APIGPVTVQALGCDARQVALKADTDNFEQGKFFLISDNNRD

101 KLYVNIRPTDNSAWTTDNGVFYKNDVGSWGGIIGIYVDGQQTNTPPGNYT

151 LTLTGGYWAK

Rys. 19. Sekwencja aminokwasowa białka DraE. Kolorem szarym zaznaczono sekwencję sygnalną, niebieskim sekwencje odpowiedzialne za wiązanie z receptorem DAF, czerwonym sekwencję domeny 2, fioletowym sekwencje odpowiedzialne za wiązanie z kolagenem typu IV, zielonym sekwencje odpowiedzialne za wiązanie z CEA.

Adhezyna DraE zbudowana jest ze 160 reszt aminokwasowych, zawiera sekwencję sygnalną umożliwiającą transport białka do przestrzeni periplazmatycznej. Oszacowana masa cząsteczkowa z wykorzystaniem programu komputerowego (Antheport) wynosi 17,0 kDa dla białka z sekwencją sygnalną i 14,9 kDa dla białka bez sekwencji sygnalnej, a punkt izoelektryczny jest równy 6,55



Rys. 20. Struktura krystaliczcna białka DraE opracowana z wykorzystaniem programu VMD. Kolorem żółtym zaznaczono sekwencję domeny 2, czerwonym oraz białym zaznaczono sekwencję lub poszczególne aminokwasy odpowiedzialne za wiązanie z receptorem DAF [Anderson i wsp., 2004]

3.12.3. Analiza mutacyjna adhezyny DraE

Geny kodujące białka podjednostkowe fimbrii należących do rodziny fimbrii typu Dr wykazują duże zróżnicowanie podczas gdy geny kodujące białka regulatorowe oraz białka zaangażowane w biosyntezę fimbrii są wysoko zakonserwowane ewolucyjnie [Servin, 2005]. Naturalnie występujące punktowe mutacje w genach adhezyn należących do rodziny Dr znacząco wpływają na ich zdolność do oddziaływania z różnymi receptorami. Przykładem może być podjednostka fimbrialna DraE opisana wcześniej i białko AfaE-III różnice się trzema resztami aminokwasowymi. Białko AfaE-III, w odróżnieniu od białka DraE, nie ma zdolności wiązania się do kolagenu oraz wiązanie do receptora DAF i CEA nie jest hamowane przez chloramfenikol [Korotkova i wsp., 2006].

Analiza różnych szczepów E. coli posiadających fimbrie zbudowane z białka należącego do grupy DraE wykazała, że największe zmiany w strukturze i właściwościach białka występują w wyniku mutacji reszt aminokwasowych w pozycjach: D52(73), D61(82), I85(106), T88(109), I111(132) oraz T131(152). W wyniku mutacji poszczególnych aminokwasów zaobserwano różnice w wiązaniu się adhezyny do receptora DAF jak i kolagenu oraz receptora CEA. Zamiana reszty aminokwasowej w pozycji T131N lub I85M, T131A albo G68D, T88M spowodowała wyraźny wzrost zdolności białka do wiązania czerwonych krwinek w teście hemaglutynacji. Równocześnie zaobserwowano, że hamujący hemaglutynację dodatek chloramfenikolu zostaje zniesiony w przypadku adhezyn, w których zostały zmutowane reszty aminokwasowe w pozycji D61G i I111T, a także w białku ze zmutowanym resztami D52M, T88M oraz I111T. Częściową odporność wykazały szczepy bakteryjne posiadające adhezynę ze zmienioną resztą aminokwasową I111T lub T131N. Również zamiana jednego aminokwasu w adhezynie I111T lub T88M powoduje utratę zdolności do wiązania się z kolagenem typu IV, a także zmniejszenie zdolności do wiązania z receptorem CEA [Korotkova i wsp., 2007].

W celu identyfikacji reszt aminokwasowych białka DraE zaangażowanych bezpośrednio w oddziaływanie z receptorem DAF dokonano szeregu pojedynczych mutacji w podjednostce DraE. Pierwsze doniesienia na temat regionu białka DraE odpowiedzialnego za wiązanie z receptorem DAF wykazały, że znajduje się on między 63(82), a 81(100) resztą aminokwasową. Analiza mutacyjna białka DraE wykazała, że wprowadzone w tym regionie

60

mutacje znacznie zmniejszają siłę wiązania się białka DraE z receptorem DAF oraz w dużo mniejszym stopniu wpływają na wiązanie się z kolagenem typu IV. Wykazano również, że najistotniejsze reszty aminokwasowe w wiązaniu receptora DAF to D63(82) i N79(98). Stwierdzono także, że na zdolność wiązania z receptorem wpływają reszty w pozycji T10(29) oraz oraz T131(150) [Van Loy i wsp., 2002]. Kolejne badania pozwoliły stwierdzić, że w proces wiązania z receptorem DAF zaangażowane jest wiele innych reszt aminokwasowych znajdujących się głównie w pozycjach 7(28) – 15(36) oraz 127(148) – 135(156) [Anderson i wsp., 2004]. Ostatnie badania dowodzą, że w proces wiązania się białka DraE z receptorem DAF zaangażowane są trzy regiony: pierwszy obejmuje reszty aminokwasowe 7(28) – 9(30), drugi reszty 61(82) – 79(100) i trzeci 129(150) – 132(153) [Korotkova i wsp., 2007].

Adhezyna DraE jako jedyna w obrębie rodziny Dr charakteryzuje się zdolnością do wiązania kolagenu typu IV. Kolagen typu IV stanowi charakterystyczny składnik błony podstawnej tkanki nabłonkowej dróg moczowych [Van Loy i wsp., 2002]. Zawiera trzy domeny, z których domena N-końcowa (7S) jest miejscem wiązania bakterii *E. coli* Dr⁺ [Westerlund i wsp., 1989]. Oddziaływanie to jest hamowane przez chloramfenikol (podobnie jak w przypadku receptora DAF) [Le Bouguenec i wsp., 1993; Pettigrew i wsp., 2004]. Przeprowadzona wnikliwa analiza mutacyjna adhezyny DraE umożliwiła identyfikację reszty aminokwasowej w pozycji I111(132), która wydaje się mieć istotny wpływ na zdolność wiązania szczepów *E. coli* Dr⁺ z kolagenem typu IV [Carnoy i Moseley, 1997]. Również reszty aminokwasowe znajdujące się w pozycjach P40(61), P43(64), I114(135) i Y115(136) mają bardzo istotny wpływ na wiązanie się białka DraE do kolagenu [Korotkova i wsp., 2007].

Adhezyna DraE ma także zdolność wiązania się z antygenem karcynoembrionalnym CEACAMs. Analiza mutacyjna wykazała, że w wiązanie to zaangażowane są reszty P40(61), P43(64), I85(106), R86(107), I111(132), G113(134) oraz Y115(136). Interesujący jest fakt, że wiązanie się adhezyny do receptora DAF nie powoduje zakłócenia w wiązaniu do receptora CEA, dzięki temu adhezyna może równocześnie wiązać się z dwoma receptorami [Korotkova i wsp., 2006].

Badania krystalograficzne i otrzymane kompleksy DraE z chloramfenikolem wykazały, że jest on związany na powierzchni cząsteczki

61

białka w kieszeni występującej między N-końcową częścią β harmonijki B oraz C-końcową częścią β harmonijki E. Z jednej strony chloramfenikol siłami van der Waalsa związany jest z metylenowymi grupami P40(61), G42(63), P43(64), oraz G113(134), natomiast z drugiej strony łączy się z I111(132) I114(135), a także Y115(136). Wiązanie chloramfenikolu w tym miejscu tłumaczy brak możliwości wiązania białka DraE z receptorem DAF. Spowodowane jest to tym, że chloramfenikol zasłania część powierzchni białka DraE zaangażowanej w wiązanie receptora DAF [Pettigrew i wsp., 2004].



Rys. 21. Wiązanie chloramfenikolu do powierzchni białka DraE. Kolorem czerwonym zaznaczono reszty aminokwasowe odgrywające najważniejszą, pomarańczowym średnią i żółtym małą rolę, w procesie wiązania chloramfenikolu [Pettigrew i wsp., 2004].

3.12.4. Receptor DAF

Mimo, iż białko DraE posiada zdolność wiązania się do kolagenu typu IV, czy antygenów CEACAMs, to oddziaływanie z receptorem DAF odgrywa kluczową rolę w procesie inwazji bakterii do komórek gospodarza. Białko DAF jest receptorem komórkowym nie tylko dla adhezyn DraE, ale również całej rodziny adhezyn Dr. Przeprowadzone badania wykazują, że DAF jest także receptorem komórkowym dla wirusów (np. enterowirusów) oraz niektórych bakterii (*Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria meningitidis*, *Helicobacter pylori* i *Streptococcus pyogenes*) [Das i wsp., 2005].

Ludzki receptor DAF jest glikoproteiną o masie cząsteczkowej od 55 do 70 kDa w zależności od stopnia glikozylacji. Duże ilości tego receptora znajdują się na powierzchni komórek nabłonka wyściełającego błony śluzowe dróg oddechowych lub drogi pokarmowej, kanalików nerkowych, moczowódu czy też pęcherza moczowego. Rolą czynnika przyspieszającego rozpad - DAF (ang. decay-acccelerating factor) jest regulacja aktywacji systemu dopełniacza poprzez bezpośrednie wiązanie C3b oraz C4b, a tym samym hamowanie konwertazy C3 [Nicholson-Weller i Wang., 1994]. Receptor ten zbudowany jest z czterech ok. 60 aminokwasowych domen SCR (ang. short consensus repeats). SCR kodowane są przez powtarzające się homologiczne egzony i stwarzają strukturalne rusztowanie cząsteczki zapewniające swoistość wiązania białka. Oprócz czterech zewnątrzkomórkowych domen (SCR-1, SCR-2, SCR-3 i SCR-4) białko to posiada domenę bogatą w reszty seryny, treoniny oraz proliny, łączącą domeny SCR z resztami glikozylofosfatydyloinozytolu (GPI), dzięki którym białko DAF jest zakotwiczone w błonie zewnętrznej komórki (Rys. 22).

Adhezyny Afa/Dr rozpoznają domenę SCR-3 receptora DAF. Wystarczy pojedyncza zmiana reszty aminokwasowej w tej domenie (seryna 165 na leucynę) aby spowodować całkowitą utratę wiązania adhezyjnej struktury polimerycznej [Nowicki i wsp., 1993; 2001]. Jednakże, strategiczną rolę we wzajemnym oddziaływaniu adhezyn i domeny SCR-3 odgrywa nie reszta seryny w pozycji 165, ale reszta seryny w pozycji 155 oraz reszty Gly 159, Tyr 160 i Leu 162. Również istotną rolę odgrywają reszty fenyloalaniny w pozycjach 123 i 148, zlokalizowane na granicy domen SCR-2 i SCR-3, wymagane do prawidłowego związania z receptorem [Hasan i wsp., 2002]. Dalsze badania wykazały kluczową rolę domen SCR-2 i SCR-3 białka DAF w wiązaniu adhezyn Dr. Ponadto, doświadczenie z wykorzystaniem konstruktów delecyjnych receptora DAF (SCR-1 Δ , SCR-2 Δ , SCR-3 Δ , SCR-4 Δ), wskazuje jednoznacznie, że bakterie *E. coli* Dr⁺ w procesie inwazji wymagają obecności tylko domen SCR-2 i SCR-3 (Rys. 22) [Selvarangan i wsp., 2000].



Rys. 22. Uproszczona struktura receptora DAF przedstawiająca hipotetyczne miejsca przyłączania adhezyn kodowanych przez operony *dra, afa* oraz *daa*. Niektóre z adhezyn rodziny Dr łączą się również z domeną SCR-2 (na rysunku linia przerywana) [Pham i wsp., 1995].

4. Materiały

4.1. Szczepy bakteryjne

Szczep	Genotyp	Pochodzenie
<i>E. coli</i> TOP10F'	F' { <i>lacl^q Tn</i> 10 (Tet ^R)}, <i>mcrA</i> ∆(<i>mrr- hsd</i> RMS- <i>mcr</i> BC) φ80 <i>lac</i> Z∆M15, ∆ <i>lac</i> X74 <i>deo</i> R recA1 araD139 ∆(<i>ava</i> – <i>leu</i>)7697 galU galK rspL endA1 <i>nup</i> G	Invitrogen, USA
<i>E. coli</i> BL21(DE3)pLysS	F ⁻ <i>ompT hsdS_B</i> (r _B ⁻ m _B ⁻) <i>gal dcm</i> (DE3) pLysS (Cm ^R)	Novagen, Wielka Brytania
<i>E. coli</i> Rosetta(DE3)pLysS	F ⁻ <i>ompT hsdS_B</i> (r _B ⁻ m _B ⁻) <i>gal dcm lacY1</i> (DE3) pLacIRARE (Cm ^R)	Novagen, Wielka Brytania

4.2. Materiał genetyczny

- **pUC19** wysokokopijny plazmid wielkości 2686 pz, wykorzystywany do wstępnego klonowania DNA w komórkach *E. coli* (Invitrogen, USA).
- pBJN406 plazmid rekombinantowy otrzymany przez wklonowanie do plazmidu pACYC184 fragmentu DNA zawierającego sekwencję całego operonu *dra*. Fragment DNA z sekwencją operonu *dra* otrzymano przez trawienie genomowego DNA pochodzącego z klinicznych szczepów *Escherichia coli* 075:K5:H enzymem *Hin*dIII. Transformacja niepatogennych szczepów *E. coli* plazmidem pBJN406 powoduje, że stają się one zjadliwe (otrzymany od prof. B. Nowickiego z University of Texas) [Nowicki i wsp., 1987; 1988; Goluszko i wsp., 1997].
- pCC90 plazmid rekombinantowy otrzymany przez wklonowanie do plazmidu pACYC177 fragmentu DNA wielkości 8600 pz, zawierającego sekwencję nukleotydową operonu dra bez genów regulatorowych. Współistnienie w jednej komórce bakteryjnej plazmidu pCC90 razem z plazmidami z origin replikacji z grupy ColE1 (pBR322,

pUC19) umożliwia replikon p15A plazmidu pACYC177 (plazmidy zgodne).

Sekwencję nukleotydową operonu *dra* bez regionu promotorowego i genów regulatorowych otrzymano poprzez wstępne trawienie DNA plazmidu pBJN406 restryktazą *Eco*RI (po wprowadzeniu dodatkowego miejsca rozpoznania dla restryktazy *Eco*RI 45 pz powyżej genu *draB* w plazmidzie pBJN406) (otrzymany od prof. B. Nowickiego z University of Texas) [Carnoy i wsp., 1997].

- pCC90D54stop plazmid rekombinantowy pCC90, w którym przy pomocy mutagenezy miejscowo-specyficznej zastąpiono kodonem stop trójkę nukleotydową (GAC), kodującą kwas asparaginowy (Asp54). Plazmid ten uniemożliwia ekspresję natywnego białka adhezyny DraE (otrzymany od prof. B. Nowickiego z University of Texas) [Carnoy i wsp., 1997].
- plazmidy rekombinantowe otrzymane przez wklonowanie do DNA wektora pUET1 [Dąbrowski i Kur, 1999] DNA insertów kodujących białka antygenowe SAG1, MAG1 lub GRA1 *T. gondii* (kolekcja Katedry Mikrobiologii)

Nazwa	Wklonowany insert	Odnośnik literaturowy
pUET1/SAG1	gen kodujący antygen powierzchniowy SAG1 <i>T. gondii</i> (reszty aminokwasowe od 49 do 313)	[Hiszczyńska- Sawicka i wsp., 2003]
pUET1/GRA1	gen kodujący antygen granul o dużej gęstości GRA1 <i>T. gondii</i> (reszty aminokwasowe od 24 do 190)	[Hiszczyńska- Sawicka i wsp., 2003]
pUET1/MAG1	gen kodujący antygen macierzy cyst taknkowych MAG1 <i>T. gondii</i> (reszty aminokwasowe od 30 do 222)	[Holec i wsp., 2007]

4.3. Pożywki i podłoża bakteriologiczne

Pożywka LB (Luria Bertani): trypton 10 g, ekstrakt drożdżowy 5 g, NaCl
 10 g, woda destylowana do 1000 ml (pH=7,0-7,2)

- Pożywka 2YT: trypton 16 g, ekstrakt drożdżowy 10 g, NaCl 5 g, woda destylowana do 1000 ml (pH=7,0)
- Podłoże LA (Luria Bertani Agar): trypton 10 g, ekstrakt drożdżowy 10 g, NaCl 10 g, agar 15 g, woda destylowana do 1000 ml

Wszystkie pożywki i podłoża sterylizowano 30 min, w temperaturze 120°C.

4.4. Antybiotyki

- Ampicylina roztwór wyjściowy: 100 mg/ml H₂O
- Chloramfenikol roztwór wyjściowy: 34 mg/ml 70% etanolu
- Tetracyklina roztwór wyjściowy: 12,5 mg/ml 70% etanolu
- Kanamycyna roztwór wyjściowy: 20 mg/ml H₂O

4.5. Enzymy i bufory

• Enzymy restrykcyjne i bufory do trawienia:

b			
Enzym restrykcyjny	Rozpoznawana sekwencja	Bufor do trawienia	Optymalna temperatura trawienia
BamHI(BioLabs)	5'-G/GATCC-3'	NEBuffer for BamHI + BSA	37ºC
Cfr10I (Fermentas)	5'-R/CCGGY-3'	<i>Cfr</i> 10I ⁺ buffer	37ºC
EcoRI (BioLabs)	5'-G/AATTC-3'	NEBuffer for EcoRI	37ºC
HindIII (BioLabs)	5'-A/AGCTT-3'	NEBuffer 2	37ºC
KpnI (BioLabs)	5'-GGTAC/C-3'	NEBuffer 1 + BSA	37ºC
Mspl (Fermentas)	5'-C/CGG-3'	Y⁺/Tango (yellow)	37ºC
Ndel (BioLabs)	5'-CA/TATG-3'	NEBuffer 4	37ºC
BstEll(BioLabs)	5'-G/GTNACC-3'	NEBuffer 3 + BSA	60ºC

Skład buforów:

- Ø NEBuffer BamHI + BSA: 150 mM NaCl; 10 mM Tris-HCl; 10 mM MgCl₂;
 1 mM ditiotreitol; 100 μg/ml BSA;
- Ø NEBuffer EcoRI: 50 mM NaCl; 100 mM Tris-HCl; 10 mM MgCl₂; 0,025%
 Triton X-100;
- Ø NEBuffer 1 + BSA: 10 mM Bis Tris-HCl; 10 mM MgCl₂; 1 mM ditiotreitol;
 100 μg/ml BSA;
- Ø NEBuffer 2: 50 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl₂; 1 mM ditiotreitol;

- Ø NEBuffer 3 + BSA: 100 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl₂; 1 mM ditiotreitol; 100 μg/ml BSA;
- Ø NEBuffer 4: 50 mM octan potasu, 20 mM Tris-octan; 10 mM octan magnezu; 1 mM ditiotreitol;
- Ø bufor Y⁺/Tango (yellow): 33 mM Tris-octan; 10 mM octan magnezu, 66 mM octan potasu; 0,1 mg/ml BSA;
- Ø bufor dla enzymu Cfr10I: 10 mM Tris-HCl; 5 mM MgCl₂; 100 mM NaCl;
 0,02% Triton X-100; 0,1 mg/ml BSA.
- polimeraza DNA Pwo (DNA Gdańsk II s.c) polimeraza DNA rekombinantowa Pyrococcus woesei, wykazująca aktywność polimeryzacji 5'-3' i aktywność egzonukleazy 3'-5'. Dzięki aktywności egzonukleolitycznej 3'-5' ma możliwość odłaczania niekomplementarnych nukleozydów, w wyniku czego popełnia mniej błędów w procesie elongacji łańcucha DNA i posiada 12 razy większą wierność syntezy DNA niż polimeraza Taq.
- Enzym i odczynniki do reakcji ligacji:
 - Ø ligaza polinukleotydowa faga T4 (Epicentre);
 - Ø bufor do reakcji ligacji (Epicentre): 100 mM NaCl, 50 mM Tris (pH=7,5); 0,1 mM EDTA; 1 mM ditiotreitol; 0,1% Triton X-100; 50% glicerol;
 - Ø roztwór ATP (Epicentre).

4.6. Bufory i odczynniki do reakcji PCR

- Bufor do reakcji dla polimerazy DNA Pwo (10x stężony) 50 mM KCl, Tris (pH=8,8), 0,1% Triton X-100
- Roztwór 15 mM MgCl₂
- Trifosforany deoksynukleozydów (dNTP): dATP, dGTP, dCTP, dTTP roztwór podstawowy o stężeniu 10 mM dla każdego z nukleotydów
- Woda redestylowana jałowa
- Matryca do reakcji PCR DNA plazmidu pBJN406
- Startery:

Startery do amplifikacji fragmentu DNA genu *draE* kodującego N-terminalną część białka adhezyny DraE z odpowiednimi epitopami SAG1, MAG1 i GRA1:

Ø starter "forward" **1-DraE**:

- 5' CGGCGCGGGTACCCAT ATGAAAAAATTAGCGATCATGGCCG 3' Kpnl Ndel
 - Ø starter "reverse" **2-DraE-SAG-ep1**:
- 5' ATCGGATCCTGTCGATTTTTTATCTGG BamHI sekwencja nukleotydowa kodująca epitop 1 SAG1
 - Ø starter "reverse" **2-DraE-SAG-ep2**:
- 5' ATAGGATCCGCTATCTTCTGCTTCAGG BamHI sekwencja nukleotydowa kodująca epitop 2 SAG1
 - Ø starter "reverse" **2-DraE-SAG1-ep3**:

5' -ATAGGATCCGTTCTCAGTTAATTTTGGCAAAATATCTTTGAACGATTTCT BamHI sekwencja nukleotydowa kodująca epitop 3 SAG1 CGTT

Ø starter "reverse" **2-DraE-MAG1:**

5' – ATAGGATCCCGGAACGGCAACGTCCTCTGAGTTCTCATATAAAACAGCGT BamHI sekwencja nukleotydowa kodująca epitop MAG1 CGGTCAGGTCACCAACCCGTACCTGGC – 3'

ø starter "reverse" **2-DraE-GRA1 :**

ø starter "reverse" 2-DraE-GRA1-nowy:

5' – TAT<mark>GGATCCGTCCTCGGCCTCTGCATGCTTTCATAGTATC</mark>CTTAGCCA BamHI sekwencja nukleotydowa kodująca epitop GRA1 CGGTCAGGTCACCAACCCG -3'

ø starter "reverse" 2-DraE-SAG1-nowy:

5' – ATAGGATCCA<mark>GATAATTTTGGCAAAATATCTTTGAACGATTT</mark>CTTAGCCC BamHI sekwencja nukleotydowa kodująca epitop SAG1 GGTCAGGTGACACCAACCC -3'

Startery wykorzystywane przy amplifikacji fragmentu DNA genu *draE* kodującego C-końcową część białka adhezyny DraE:

Ø starter "forward" 3-DraE:

5' -AGC<u>GGATCC</u>GCACCAATAGGGCCGGTCACCG- 3' BamHI

Ø starter "forward" **3-DraE-nowy:**

5' -AGC<u>GGATCC</u>GTCACCGTGCAAGCGCTGGGATGC - 3' BamHI

Ø starter "reverse" **4-DraE-:**

5' -GCGAGGAAGCTTGAATTCTCATTTTGCCCAGTAACCCCCGG- 3' HindIII EcoRI

4.7. Markery wielkości

- Markery wielkości DNA:
 - Ø marker wielkości M1 (DNA Gdańsk II s.c.): 110, 111, 147, 190, 242, 331, 404, 489, 501 pz
 - Ø marker wielkości M100-500 (DNA Gdańsk II s.c.): 100, 200, 300, 400, 500 pz
 - Ø marker wielkości λ/BstEII: 702, 1264,1371,1929, 2323, 3646, 4324, 4822, 5686, 6369, 7242, 8454 pz
 - Ø marker wielkości GeneRuler™ 100 bp DNA (Fermentas, SM 0243):
 80, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1031 pz
 - Ø marker wielkości GeneRuler™ 100 bp DNA (Fermentas, SM 0321):
 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1001, 1200, 1500, 2000,
 3000 pz
- Markery białkowe:
 - Ø marker białkowy firmy Sigma (M-4038): 6,5; 14,2; 20,1; 24; 29; 36;
 45; 55; 66; 84; 97,4; 116; 205 kDa
 - Ø marker białkowy firmy Fermentas (SM 0671): 10; 16; 24; 35; 48; 54;
 73; 100; 130; 180 kDa
 - Ø marker białkowy firmy Fermentas (SM 0431): 14,4; 18,4; 25; 35; 45;
 66,2; 116 kDa

4.8. Roztwory i bufory do elektroforezy agarozowej

- Bufor do elektroforezy agarozowej:
 - § bufor 1 x TAE

- § skład buforu podstawowego 50 x TAE: 242 g Tris; 100 ml 0,5 M EDTA; 57 ml kwas octowy; woda destylowana do 1000 ml
- Barwnik obciążający: 0,25% błękit bromofenolowy; 40% sacharoza
- Roztwór podstawowy bromku etydyny (Sigma): 5 mg/ml

4.9. Roztwory i bufory do elektroforezy poliakrylamidowej

- Żel poliakrylamidowy do rozdziału białek w warunkach denaturujących (SDS-PAGE):
 - § 30% roztwór akrylamidów (29% akrylamidu, 1% N,N-metylenobisakrylamidu)
 - § 10% SDS (Sigma)
 - § 1,5 M Tris-HCI (pH=8,8) (Sigma)
 - § 1 M Tris-HCI (pH=6,8) (Sigma)
 - § 10% nadsiarczan amonu (Sigma)
 - § TEMED (Sigma)
- Barwnik do nanoszenia próbek na żel: 0,25% błękit bromofenolowy; 10% glicerol; 10% SDS; 1 M β-merkaptoetanol; 1 M Tris-HCI (pH=6,8)
- Roztwór barwiący do żeli poliakrylamidowych: 50% metanol; 10% kwas octowy; 0,05% Coomasie Brilant Blue R-250 (Sigma)
- Roztwór odbarwiający do żeli poliakrylamidowych: 40% metanol; 7% kwas octowy
- Bufor do przeprowadzenia elektroforezy poliakrylamidowej:
 - § 1 x Tris-glicyna (pH=8,3)
 - § skład buforu podstawowego 5 x Tris-glicyna (pH=8,3): 15,1 g Tris;
 94 g glicyna; 50 ml 10% SDS; woda destylowana do 1000 ml

4.10. Inne bufory i roztwory

- Bufor TE (pH=8,0): 10 mM Tris; 1 mM EDTA
- Roztwór do indukcji: 1 M IPTG, (Sigma)
- 100 mM roztwór CaCl₂ (Fluka)
- 10% roztwór glicerolu
- Bufor PBS (pH=7,5): 80 mM Na₂HPO₄; 20 mM NaH₂PO₄; 100 mM NaCl

- Odczynnik Bradforda: 85% kwas ortofosforowy 100 ml; 95% alkohol etylowy – 50 ml; Coomassie Brilliant Blue G 250 – 100 mg; woda destylowana do 1000 ml
- 4.11. Bufory stosowane do oczyszczania białek metodą chromatografii metalopowinowactwa i do regeneracji złoża
 - Bufor podstawowy A (pH=7,9): 5 mM imidazol; 20 mM Tris; 0,5 M NaCl; 0,1% TritonX-100
 - Bufor płuczący MA (pH=7,9): bufor A zawierający 5 M mocznik
 - Bufor płuczący MB (pH=7,9): bufor MA zwierający 50 mM imidazol
 - Bufor elucyjny C (pH=7,9): bufor A zwierający 0,5 M imidazol
 - Bufor do regeneracji kolumny (His•bind® Resin, Novagen) (pH=8,0): 0,05 M EDTA; 1% SDS

4.12. Bufory i odczynniki do techniki Western blotting

- przeciwciała pierwszorzędowe:
 - poliklonalne królicze przeciwciała anty-Dr, specyficzne dla białka adhezyny DraE (otrzymane od prof. B. Nowickiego z University of Texas)
 - poliklonalne królicze przeciwciała anty-SAG1, specyficzne dla antygenowego białka SAG1*T. gondii* (otrzymane od prof. H. Długońskiej z Uniwersytetu Łódzkiego)
 - poliklonalne królicze przeciwciała anty-GRA1, specyficzne dla antygenowego białka GRA1 *T. gondii* (otrzymane od prof. H. Długońskiej z Uniwersytetu Łódzkiego)
 - poliklonalne królicze przeciwciała anty-MAG1, specyficzne dla antygenowego białka MAG1 *T. gondii* (otrzymane od prof. H. Długońskiej z Uniwersytetu Łódzkiego)
- przeciwciała drugorzędowe:
 - przeciwciała anty-mysie wyznakowane peroksydazą chrzanową (ang. Anti-Mouse IgG peroxidase conjugate) - Sigma, nr A-4416
 - przeciwciała anty-królicze wyznakowane peroksydazą chrzanową (ang. Anti-Rabbit IgG Peroxidase Conjugate) - Sigma, nr A-6154
- Bufor TBST (pH=7,5): 10 mM Tris; 150 mM NaCl; 0,1% Tween 20
- Bufor blokujący: bufor TBST (pH=7,5) zawierający 5% odtłuszczone mleko w proszku
- Bufor do elektrotransferu białek z żelu poliakrylamidowego na błonę nitrocelulozową: 12,5 mM Tris; 96 mM glicyna; 10% metanol
- Błona nitrocelulozowa wielkość porów 0,45 µm; (Sigma)
- Bibuła Whatman 3 MM (Sigma)
- Odczynnik do detekcji:
 - § DAB (3,3'diaminobenzydyna, 3,3',4,4'-tetra-aminobifenyl otrzymywany w postaci tetrachlorowodorku (C₁₂H₁₄N₄·4HCl) (Sigma) Przygotowanie: 6 mg DAB + 10 ml 0,05 M buforu Tris-HCl (pH=7,6)
- 30% roztwór H₂O₂ dodawano 0,1 ml H₂O₂ na 9 ml roztworu odczynnika do detekcji DAB w 0,05 M buforze Tris-HCl (pH 7,6)

4.13. Bufory i odczynniki do testu ELISA

- Bufor opłaszczający (pH=9,6): 50 mM bufor węglanowy
- Bufor płuczący (pH=7,4): 50 mM Tris; 0,88% NaCl; 0,1% Tween 20
- Bufor blokujący (pH=7,2): 0,5 M NaCl; 3 mM KCl; 1 mM KH₂PO₄×2H₂O; 1%TritonX-100; 1% BSA; 0,001% czerwień fenolowa
- Bufor substratowy i substrat reakcji barwnej: Fast o-phenylenediamine dihydrochloride (Sigma)
 Przygotowanie: na 20 ml wody - 1 tabletka buforu + 1 tabletka substratu
- Roztwór stopujący reakcję barwną: 1N H₂SO₄
- Przeciwciała: anty-królicze IgG, wyznakowane peroksydazą chrzanową (ang. Anti-Rabitt IgG Peroxidase Conjugate) (Sigma)
- § Poliwalentny antygen natywny (TLA ang. Toxoplasma Lysate Antigen) w stężeniu 1 µg/ml (otrzymany od prof. H. Długońskiej z Uniwersytetu Łódzkiego)
- Frakcja elucyjna otrzymana podczas oczyszczania lizatu komórek szczepu *E. coli* szczepu BL21(DE3) metodą chromatografii metalopowinowactwa
- Mikropłytki do testu ELISA (NUNC Immuno[™]Plates, Surface MaxiSorp)

4.14. Odczynniki do izolacji białek podjednostkowych natywnych fimbrii Dr oraz chimerycznych fimbrii Dr-epitop

- bufor PBS (pH 7,5): 80 mM Na₂HPO₄, 20 mM NaH₂PO₄, 100 mM NaCl
- 40% (NH₄)₂SO₄ w buforze PBS
- błona dializacyjna (M.W. 12,000) Sigma, nr D-9652

4.15. Bufory i odczynniki do mikroskopii immunofluorescencyjnej

- bufor PBS (pH 7,5): 80 mM Na₂HPO₄, 20 mM NaH₂PO₄, 100 mM NaCl;
- przeciwciała pierwszorzędowe:
 - poliklonalne królicze przeciwciała anty-Dr, specyficzne dla białka adhezyny DraE
- przeciwciała drugorzędowe:
 - przeciwciała anty-królicze (ang. Anti-Rabbit IgG from goat, Whole
 Molecule) znakowane FITC Sigma, nr F-0382
- olejek imersyjny (Olympus)
- szkiełka mikroskopowe (76 x 26 mm) i szkiełka nakrywkowe (15 x 15 mm) (Medlab)

4.16. Materiały wykorzystane do badań na liniach komórkowych

- linie komórkowe HeLa Ohio (ECACC 84 121901) komórki raka szyjki macicy
- pożywka minimalna (ang. minimum essential medium) zawierająca sole Earle'a oraz L-glutamine (GIBCO Laboratories, France)
- 10% płodowa surowica bydlęca inaktywowana termicznie (GIBCO)
- 1% mieszanina aminokwasów (ICN Biomedicals, Costa Mesa, Calif.)
- 0,25% roztwór trypsyny
- Antybiotyki pencilana-streptomycyna (Sigma)
- Barwnik Giemsa

4.17. Aparatura

- Aparat do elektroforezy agarozowej Delfin (DNA Gdańsk II s.c.)
- Aparat do elektroforezy poliakrylamidowej (DNA Gdańsk II s.c.)
- Aparat do HPLC (Merck-Hitachi), kolumna Superdex 75 (Amersham)
- Aparat do techniki Western Blotting (Fermentas)
- Autoklaw (Systec lub/i PrestigeMedical)
- Czytnik płytek ELISA: VICTOR 3V Perkin Elmer
- Dezintegrator ultradźwiękowy Soniprep 150 MSE (SANYO)
- Komora laminarna
- Kuchenka mikrofalowa
- Mieszadło magnetyczne (ATM)
- MicroPulser Electroporator firmy Bio-Rad
- Mikroskop immunofluorescencyjny (Olympus BX-60).
- Mikrowirówka Sigma (typ MPW-210)
- pH-metr (Amersham)
- Spektrofotometr SPEKTRO 23 (LabMed)
- Termoblok (DNA Gdańsk II s.c.)
- Termocykler (Perkin Elmer 2400)
- Transiluminator UV (Sigma)
- Versa Doc, Imagin System Model 1000 (BIO-RAD)
- Waga laboratoryjna
- Wirówka High Speed Bruchless Centrifuge MPW 350R
- Wirówka Sigma 1-15, nr 66315 (SIGMA)
- Wytrząsarka (DNA Gdańsk II s.c.)
- Zasilacz stabilizowany prądu stałego (DNA Gdańsk II s.c.)

5. Metody

5.1. Hodowle bakteryjne

- Hodowle bakterii *E. coli* w pożywce LB [Materiały 4.3] prowadzono w wytrząsarce powietrznej, w temperaturze 37°C lub 30°C.
- Hodowle bakterii *E. coli* na podłożu LA [Materiały 4.3] wylanym na płytki Petriego prowadzono w cieplarce w temperaturze 37°C.

W razie potrzeby do hodowli dodawano ampicylinę do stężenia 100 µg/ml, chloramfenikol do stężenia 34 µg/ml, kanamycynę do stężenia 20 µg/ml, tetracyklinę do stężenia 12,5 µg/ml [Materiały 4.4], X-Gal do stężenia 32 µg/ml oraz IPTG do stężenia 80 µg/ml [Materiały 4.10].

5.2. Amplifikacja fragmentu genu *draE* kodującego N-końcową część białka adhezyny DraE z wprowadzonym epitopem białka SAG1, GRA1 lub MAG1 *T. gondii*

We wszystkich przeprowadzonych standardowych reakcjach PCR wykorzystano:

- polimerazę DNA Pwo [Materiały 4.5];
- bufor do reakcji (10x stężony) [Materiały 4.6];
- trifosforany deoksynukleozydów (dNTP) [Materiały 4.6];
- roztwór 15 mM MgCl₂ [Materiały 4.6];
- odpowiednie startery.

Zastosowany profil temperaturowo-czasowy we wszystkich przeprowadzonych reakcjach PCR przedstawiono w poniższej tabeli:

Temperatura [°C]	Czas [sekundy]	Liczba cykli							
94	120	1							
94	30								
65	30	35							
72	30								
72	300	1							
	Schłodzenie do 4 °C								

• skład mieszaniny reakcyjnej (objętość całkowita 50 µl):

Składnik	llość [µl]
Matryca DNA plazmidu pBNJ406	1
Bufor dla polimerazy Pwo (10x stęż.)	5
dNTP	5
Starter 1-DraE	2
Starter 2-DraE-ep1-SAG1; 2-DraE-SAG1- ep2, 2-DraE-SAG1-ep3, 2-DraE-MAG1, 2- DraE-GRA1 lub 2-DraE-SAG1-nowy, 2-DraE- GRA1-nowy	2
MgCl ₂	2
Redestylowana woda jałowa	32
Polimeraza DNA <i>Pwo</i>	1

Amplifikację przeprowadzano w termocyklerze Perkin Elmer 2400.

- 5.3. Amplifikacja fragmentu genu *draE* kodującego C-końcową część białka adhezyny DraE
 - zastosowane startery 3-DraE lub 3-DraEN oraz 4-DraE oraz;
 - wykorzystana polimeraza DNA polimeraza DNA Pwo;
 - profil temperaturowo czasowy:

Temperatura [°C]	Czas [sekundy]	Liczba cykli						
94	120	1						
94	30							
65	30	35						
72	30							
72	300	1						
Schłodzenie do 4 °C								

• skład mieszaniny reakcyjnej:

Składnik	llość [µl]
Matryca DNA plazmidu pBNJ406	1
Bufor dla polimerazy DNA (10xstęż.)	5
dNTP	5
Starter 1 3-DraE lub 3-DraE-nowy	2
Starter 2 4-DraE	2
MgCl ₂	2
Redestylowana woda jałowa	32
Polimeraza DNA <i>Pwo</i>	1

Amplifikację przeprowadzano w termocyklerze Perkin Elmer 2400.

5.4. Techniki wykorzystywane przy klonowaniu fragmentów DNA

5.4.1. Izolacja DNA plazmidowego wysokiej czystości

DNA z 1,5 – 3 ml hodowli bakteryjnej izolowano z użyciem zestawu "Plasmid Miniprep Plus" firmy A&A Biotechnology (Polska).

5.4.2. Oczyszczanie DNA po reakcji trawienia enzymami restrykcyjnymi

DNA po reakcjach enzymatycznych oczyszczano z użyciem zestawu "Clean Up" firmy A&A Biotechnology (Polska).

5.4.3. Izolacja fragmentu DNA z żelu agarozowego

Fragmenty restrykcyjne rozdzielano w żelu agarozowym (1-1,5%) w buforze 1 x TAE [Materiały 4.8]. Wycinano z żelu bloczek agarozowy zawierający odpowiedni fragment DNA. Izolację fragmentów DNA z żelu agarozowego przeprowadzano z użyciem zestawu "DNA Gel Out" firmy A&A Biotechnology (Polska).

5.4.4. Reakcja trawienia DNA (insertów i wektorów do klonowania) enzymami restrykcyjnymi

Reakcję trawienia DNA enzymami restrykcyjnymi prowadzono w odpowiednim buforze do trawienia dla danego enzymu restrykcyjnego, w temperaturze 37°C (w cieplarce lub w termobloku), przez 1 do 1,5 godziny. Objętość końcowa mieszaniny reakcyjnej wynosiła od 20 do 50 µl. Wyniki reakcji trawienia obserwowano po przeprowadzeniu rozdziału elektroforetycznego w 1%, 1,5%, 1,7% lub 2% żelu agarozowym.

5.4.5. Reakcja ligacji DNA wektora z insertem

Reakcję ligacji prowadzono przez dodanie do mieszaniny reakcyjnej: DNA wektora i insertu, buforu dla ligazy DNA, roztworu ATP oraz ligazy DNA faga T4 [Materiały 4.5]. Tak przygotowaną mieszaninę reakcyjną inkubowano przez 2 do 3 godziny w temperaturze 18°C.

Skład poszczególnych mieszanin ligacyjnych i ich objętość końcowa (25-50 µl) uzależniona była od stężenia ligowanych fragmentów DNA (wektorów i insertów).

5.5. Sekwencjonowanie DNA plazmidowego

DNA plazmidowe sekwencjonowano w firmie AGOWA GmbH (Berlin, Niemcy).

5.6. Transformacja komórek *E. coli* plazmidowym DNA

Komórki kompetentne *E. coli* określonego szczepu i transformację komórek kompetentnych DNA plazmidowym wykonywano według standardowej procedury [Sambrook i wsp., 1989].

5.7. Techniki elektroforetyczne

5.7.1. Elektroforeza w żelu agarozowym

Elektoforezę agarozową prowadzono w 1; 1,5, 1,7% lub 2% żelu agarozowym (w zależności od wielkości rozdzielanych cząsteczek DNA) [Sambrook i wsp., 1989].

5.7.2. Elektroforeza białek w żelu poliakrylamidowym w warunkach denaturujacych (SDS-PAGE)

Elektroforezę w żelu poliakrylamidowym prowadzono według metody Laemmli w 5% żelu zagęszczającym i 12% żelu rozdzielającym, w buforze 1 x Tris-glicyna, przy napięciu prądu 80 V (żel zagęszczający) i 120 V (żel rozdzielający) [Laemmli, 1970]. Rozdział kończono w momencie, kiedy barwnik dosięgał końca żelu. Żel barwiano roztworem barwiącym zawierającym Coomassie Brilliant Blue [Materiały 4.9], a następnie odbarwiano roztworem odbarwiającym [Materiały 4.9] przez 2 godziny.

Lizaty komórkowe do analizy elektroforetycznej przygotowywano przez zawieszenie osadu komórek z 1 ml hodowli bakteryjnej w 0,4 ml buforu TE [Materiały 4.10]. Następnie 10 µl tak przygotowanej próbki mieszano z 5 µl barwnika do nanoszenia próbek na żel [Materiały 4.9], próbkę worteksowano i inkubowano w temperaturze 98°C, przez 10 minut. Po zakończeniu inkubacji lizaty wirowano (30 sekund, przy 12000 x *g*) i nanoszono na żel.

5.8. Ekspresja genów kodujących poszczególne białka rekombinantowe *T. gondii* w układzie Tabora-Studiera

Komórki poszczególnych szczepów *E. coli,* zawierające odpowiednie plazmidy rekombinantowe, zaszczepiano w 20 ml pożywki LB zawierającej antybiotyki: ampicylinę i chloramfenikol. Hodowlę inkubowano przez noc w

wytrząsarce w odpowiedniej temperaturze (37°C, 30°C lub 20°C). Następnie 20 ml hodowli przenoszono do 1000 ml świeżej pożywki LB, zawierającej takie same antybiotyki. Gdy hodowla osiągnęła odpowiednią gęstość optyczną (OD₆₀₀), indukowano ekspresję genu przez dodatek roztworu IPTG [Materiały 4.10] do końcowego stężenia 1 mM. Następnie hodowlę inkubowano w odpowiedniej temperaturze z wytrząsaniem przez odpowiedni okres czasu (od 4 do 18 godzin w zależności od produkowanego białka).

Podczas inkubacji pobierano próbki hodowli o objętości 1 ml bezpośrednio przed indukcją oraz w kolejnych godzinach prowadzenia hodowli bakteryjnej aż do momentu jej zakończenia, po czym całą hodowlę wirowano przez 10 minut przy 4000 x *g*. Uzyskany osad zamrażano do dalszych badań.

Przeprowadzano rozdział elektroforetyczny uzyskanych próbek całkowitych lizatów bakteryjnych, w celu stwierdzenia obecności i oszacowania ilości wyprodukowanych białek rekombinantowych.

5.9. Oczyszczanie białek rekombinantowych metodą chromatografii metalopowinowactwa

Białka rekombinantowe oczyszczano z użyciem metody chromatografii metalopowinowactwa na kolumnie (10 ml objętości martwej) wypełnionej złożem Ni²⁺-IDA (His•Bind® Resin, Novagen). Przed użyciem złoże regenerowano przemywając buforem do regeneracji (3-5 objętości złoża) [Materiały 4.11], a następnie płukano wodą (10-20 objętości złoża) i nanoszono roztwór NiCl₂ (3-5 objętości złoża), po czym płukano buforem A o pH=7,9 (5-10 objętości złoża) [Materiały 4.11].

Osad komórek *E. coli* nadprodukujących odpowiednie białka fuzyjne z 1000 ml hodowli zawieszano w ok. 80 ml buforu MA o pH=7,9 [Materiały 4.11]. Następnie przeprowadzano dezintegrację komórek przez sonifikację (3 x 1 minuta, przy mocy 50 W, w temperaturze 4°C), po czym wirowano lizat przy 9000 x *g* przez 20 minut. Uzyskany supernatant nanoszono na kolumnę, po czym złoże płukano buforem MA (ok. 15 objętości złoża), buforem MB (ok. 20 objętości złoża), a następnie eluowano odpowiednie białka rekombinantowe trzema – sześcioma 5 ml porcjami buforu C o pH=7,9 [Materiały 4.11].

5.10. Elektrotransformacja komórek *E. coli* BL21(DE3) DNA plazmidu pCC90 lub *E. coli* BL21(DE3)pCC90D54Stop DNA plazmidu pDraE-epitop

Nocną hodowlę odpowiednich komórek bakteryjnych odmładzano w 50 ml pożywki LB i inkubowano z wytrząsaniem w 37°C do otrzymania OD₆₀₀ = 0,5-0,7. Następnie komórki trzymano w łaźni wodnej o temperaturze 0°C, przez 20 minut. Po schłodzeniu hodowlę wirowano przez 15 minut, w temperaturze 4°C przy 4000 x g. Osad zawieszono w 50 ml 10% zimnego glicerolu i wirowano przez 15 minut, w 4°C, przy 4000 x g. Tak uzyskany osad zawieszano w 25 ml 10 % glicerolu i ponownie wirowano przez 15 minut, przy 4000 x g. Osad końcowy zawieszano w 2 ml 10% glicerolu. Następnie do 50 µl komórek dodawano 10 µl DNA odpowiedniego plazmidu rekombinantowego. Po wymieszaniu, zawartość probówki przenoszono do kuwety, którą następnie umieszczano w pojemniku elektropulsora [Materiały 4.16]. Na generatorze impulsu elektrycznego ustawiano odpowiednie parametry napięcia oraz czasu trwania impulsu. Po wykonaniu impulsu do kuwety natychmiast dodawano pożywkę LB. Zawartość kuwety mieszano i przenoszono do próbówki, którą wytrząsano przez 1 godzinę w 37°C. Natępnie wysiewano komórki na płytki LA z dodatkiem odpowiednich antybiotyków. Płytki inkubowano przez 16 godzin w 37ºC.

Otrzymany rekombinantowy szczep *E. coli* BL21(DE)pCC90 umożliwia ekspresję natywnych fimbrii typu Dr na powierzchni komórek bakteryjnych. Natomiast szczep bakterii *E. coli* BL21(DE)pCC90D54stop/pDraE-epitop wykorzystano do produkcji białek chimerycznych DraE.

Szczep bakterii *E. coli* BL21(DE)pCC90D54stop stanowił kontrolę negatywną doświadczenia ze względu na brak ekspresji natywnych fimbrii typu Dr na powierzchni komórek bakteryjnych.

5.11. Ekspresja i izolacja natywnych fimbrii typu Dr i chimerycznych fimbrii Dr-epitop

Pojedyncze kolonie bakteryjne *E. coli* BL21(DE3)pCC90 oraz *E. coli* BL21(DE3)pCC90D54stop/pDraE-epitop oraz E. *coli* BL21(DE3)pCC90D54stop zawieszano w buforze PBS [Materiały 4.14] (każdą kolonię bakteryjną zawieszano w 400 µl buforu PBS) i wykonywano posiew zawiesin bakteryjnych na płytki o średnicy 150 mm (350 µl zawiesiny bakteryjnej na każdą płytkę) z

podłożem stałym LA i dodatkiem odpowiednich antybiotyków oraz IPTG w przypadku fimbrii chimerycznych [Matriały 4.3 i 4.4]. Po 24 godzinach inkubacji w temperaturze 37°C komórki bakteryjne zbierano z płytek za pomocą jałowej, jednorazowej głaszczki i zawieszano w 15 ml buforu PBS. Tak przygotowaną zawiesinę bakteryjną worteksowano przez 1 minutę i inkubowano w łaźni wodnej przez 1 godzinę w temperaturze 65°C. Następnie zawiesinę bakteryjną wirowano w wirówce Sorvall przy 6000 x *g*, przez 10 minut. Uzyskany supernantant komórkowy zbierano do jałowych probówek wirowniczych. Białka precypitowano siarczanem amonu do końcowego stężenia 20% przez noc, w temperaturze 4°C [Materiały 4.14]. Po 24 godzinach inkubacji wytrącone białka wirowano w wirówce Sorvall przy 2500 x *g*, przez 30 minut, w temperaturze 4°C, zawieszano w 3 ml buforu PBS i dializowano do buforu PBS przez noc w temperaturze 4°C. Uzyskane frakcje fimbrialne poddawano analizie w 15% żelu poliakrylamidowym w warunkach denaturujących [Metody 5.7.2].

5.12. Dializa

Dializę prowadzono wobec buforu PBS [Materiały 4.14], przy delikatnym mieszaniu za pomocą mieszadełka magnetycznego, przez 24 godziny w temperaturze 4°C. Proces prowadzono trzykrotnie, używając po 2 litry buforu.

5.13. Oznaczanie stężenia białka

Do 0,1 ml preparatu dodawano 1 ml odczynnika Bradforda [Materiały 4.10], inkubowano 15 minut, a następnie mierzono absorbcję przy długości fali 595 nm. Stężenie wyznaczano według krzywej wzorcowej sporządzonej dla roztworów BSA w zakresie 5 - 200 µg/ml.

5.14. Testy immunologiczne

5.14.1. Test Western blotting

- Przeprowadzono elektroforezę białek w 12% żelu poliakrylamidowym w warunkach denaturujących (SDS-PAGE), a następnie wykonano elektrotransfer białek z żelu na błonę nitrocelulozową:
 - na powierzchni aparatu (elektroda naładowana dodatnio) umieszczano trzy, odpowiednio wycięte bibuły, namoczone w buforze do transferu [Materiały 4.12];

- następnie kładziono przyciętą, namoczoną w buforze do transferu błonę nitrocelulozową, a na niej żel przemyty kilkakrotnie tym samym buforem (dokładnie usunięto powstałe pęcherze powietrza między błoną a żelem);
- żel przykrywano trzema nasączonymi bibułami, następnie zamykano aparat.
- Transfer prowadzono przy natężeniu prądu wynoszącym 0,8 mA na cm² żelu, przez 1 godzinę.
- Po zakończonym transferze żel umieszczano w buforze blokującym [Materiały 4.12] i inkubowano w temperaturze pokojowej przez 1 godzinę, z wytrząsaniem.
- Błonę płukano trzykrotnie buforem TBST [Materiały 4.12], przez 5 minut w temperaturze pokojowej.
- Następnie błonę inkubowano z przeciwciałami anty-Dr w rozcieńczeniu 1:2000, przez 1 godzinę, w temperaturze pokojowej z wytrząsaniem. W kolejnym etapie płukano błonę 3 x 5 minut buforem TBST, po czym inkubawano z drugorzędowymi przeciwciałami anty-króliczymi w rozcieńczeniu 1:2000, przez 1 godzinę z wytrząsaniem. Następnie błonę płukano 3 x 5 minut buforem TBST i wywoływano roztworem diaminobenzydyny [Materiały 4.12], do pojawienia brązowych prążków, które świadczyły o dodatnim wyniku reakcji immunoenzymatycznej.

5.14.2. Test ELISA

- Do studzienek na mikropłytce do testu ELISA nanoszono: po 100 µl odpowiednio rozcieńczonych rekombinantowych białek antygenowych *T. gondii*; po 100 µl poliwalentnego antygenu natywnego (TLA) w stężeniu 1 µg/ml; po 100 µl roztworu frakcji elucyjnej otrzymanej podczas oczyszczania lizatu komórek szczepu *E. coli* BL21(DE3)pLysS/pUET1 w rozcieńczeniu 1:500, a także po 100 µl/ml oczyszczonych frakcji fimbrii natywnych lub chimerycznych. Wszystkie rozcieńczenia wykonywano w buforze opłaszczającym (węglanowym) [Materiały 4.13].
- Opłaszczone płytki inkubowano przez całą noc w temperaturze 4°C.

- Po inkubacji płukano studzienki trzykrotnie po 2 minuty z 200-300 µl buforu płuczącego na każdą ze studzienek [Materiały 4.13].
- Dodawano do każdej studzienki po 100 µl buforu blokującego [Materiały 4.13] i inkubowano płytkę przez 35 minut w temperaturze pokojowej, po czym płytkę płukano 3 x 5 minut buforem płuczącym (200-300 µl buforu na jedną studzienkę).
- Nanoszono po 100 µl surowic rozcieńczonych 1:100 w buforze blokującym [Materiały 4.13].
- Inkubowano płytkę w temperaturze 37°C, przez 45 minut.
- Płukano studzienki 3 x 5 minut buforem płuczącym (200-300 µl na każdą studzienkę).
- Nanoszono do studzienek po 100 µl roztworu przeciwciał anty-króliczych [Materiały 4.13], rozcieńczonych 1:4000 w buforze blokującym i inkubowano w ciemni w temperaturze 37°C, przez 40 minut.
- Płukano studzienki 3 x 5 minut buforem płuczącym (200-300 µl na każdą studzienkę).
- Do każdej ze studzienek nanoszono po 100 µl substratu [Materiały 4.13] i inkubowano płytkę w ciemni w temperaturze 37°C, przez 40 minut. W studzienkach, w których zaszła reakcja antygen–przeciwciało obserwowano żółto–brązowe zabarwienie.
- Reakcję hamowano poprzez dodawanie do studzienek po 100 µl roztworu stopującego reakcję barwną [Materiały 4.13].
- Mierzono absorbancję przy długości fali 490 nm.

5.14.3. Mikroskopia immunofulorescencyjna

Do badań mikroskopii immunofluorescencyjnej wykorzystano hodowle bakteryjne:

- E. coli BL21(DE)pCC90 eksprymujące natywne fimbrie typu Dr (kontrola pozytywna);
- *E. coli* BL21(DE)pCC90D54stop-pDraE-ep3-SAG1, eksprymujące chimeryczne fimbrie typu Dr-ep3-SAG1;
- E. coli BL21(DE)pCC90D54stop-pDraE-GRA1, eksprymujące chimeryczne fimbrie typu Dr-GRA1;

- E. coli BL21(DE)pCC90D54stop-pDraE-MAG1, eksprymujące chimeryczne fimbrie typu Dr-MAG1;
- E. coli BL21(DE)pCC90D54stop nie eksprymujące natywnych fimbrii typu Dr (kontrola negatywna).

Komórki bakteryjne z podłóż stałych przenoszono za pomocą jałowych ez do jałowych probówek Eppendorfa, płukano trzykrotnie 1 ml buforu PBS i rozcieńczano w buforze PBS. Przygotowane frakcje, stanowiące zawiesiny bakterii powyższych rekombinantowych szczepów *E. coli* w buforze PBS, inkubowano z przeciwciałami pierwotnymi i wtórnymi zgodnie z poniższą procedurą:

- 100 μl zawiesin odpowiednich bakterii w buforze PBS inkubowano z 50 μl króliczych poliklonalnych przeciwciał anty-Dr (rozcieńczonych w stosunku 1:500), specyficznych dla białka adhezyny DraE [Materiały 4.15], w temperaturze pokojowej, przez 60 minut.
- Nadmiar niezwiązanych przeciwciał usuwano przez trzykrotne płukanie 1 ml buforu PBS [Materiały 4.14].
- Następnie 100 μl zawiesin odpowiednich bakterii w buforze PBS inkubowano z 50 μl przeciwciał anty-króliczych (rozcieńczonych w stosunku 1:25) znakowanych FITC, w temperaturze pokojowej przez 60 minut [Materiały 4.15].
- Nadmiar niezwiązanych przeciwciał usuwano przez trzykrotne płukanie 1 ml buforu PBS.
- Po 10 μl każdej zawiesiny bakteryjnej nanoszono na szkiełka mikroskopowe i obserwowano pod mikroskopem immunofluorescencyjnym (Olympus BX-60).

5.15. Badania na liniach komórkowych

5.15.1. Prowadzenie hodowli komórek HeLa

Hodowlę ludzkich komórek raka szyjki macicy (HeLa) prowadzono w pożywce MEM z 10% dodatkiem płodowej surowicy bydlęcej i antybiotykami (streptomycyna 0,1 µg/ml; penicylina 100 U/ml), w inkubatorze zapewniającym odpowiednie stałe, kontrolowane warunki środowiska – 5% CO₂, 95% wilgotność i temperatura 37°C.

5.15.2. Badanie zdolności adhezji komórek *E. coli* do powierzchni komórek HeLa

- Zawiesinę komórek HeLa, będących w logarytmicznej fazie wzrostu wysiewano do płytek hodowlanych 6-cio studzienkowych, w których umieszczono szkiełko nakrywkowe i inkubowano przez 24 godziny.
- Do komórek HeLa dodawano odpowiednie bakterie *E. coli* zawieszone w buforze PBS (OD₆₀₀=0,4).
- Komórki HeLa z bakteriami inkubowano przez 2 godziny w temperaturze 37°C.
- Po inkubacji komórki utrwalono 70% etanolem.
- Płukano 3 x 4 ml buforu PBS.
- Barwiono barwnikiem Giemsa i szkiełka nakrywkowe oglądano pod mikroskopem (Olympus BX-60).

5.15.3. Badanie zdolności wiązania chimerycznego białka DraE-epitop do powierzchni komórek HeLa

- Zawiesinę komórek HeLa będących w logarytmicznej fazie wzrostu wysiewano do płytek hodowlanych 6-cio studzienkowych, w których umieszczono szkiełko nakrywkowe i inkubowano przez 24 godziny.
- Do komórek HeLa dodawano odpowiednie kuleczki polistyrenowe opłaszczone wg standardowej procedury, oczyszczoną frakcją fimbrialną zawierającą chimeryczne białko DraE-epitop lub białko DraE dzikiego typu. Jako kontrolę negatywną wykorzystano kuleczki polistyrenowe opłaszczone białkiem BSA.
- Komórki HeLa z opłaszczonymi kuleczkami polistyrenowymi inkubowano przez 2 godziny, w temperaturze 37°C.
- Po inkubacji komórki utrwalono 70% etanolem.
- Płukano 3 x 4 ml buforu PBS.
- Do komórek dodawano przeciwciałi anty-Dr (rozcieńczonych w stosunku 1:500), specyficznych dla białka adhezyny DraE [Materiały 4.15], w temperaturze pokojowej, przez 60 minut.
- Nadmiar niezwiązanych przeciwciał usuwano przez trzykrotne płukanie 1 ml buforu PBS [Materiały 4.14].

- Następnie komórki inkubowano z przeciwciałami anty-króliczymi (rozcieńczonymi w stosunku 1:25) znakowanymi TRITC, w temperaturze pokojowej przez 60 minut [Materiały 4.15].
- Nadmiar niezwiązanych przeciwciał usuwano przez trzykrotne płukanie 1 ml buforu PBS.
- Nakrywkowe szkiełka mikroskopowe obserwowano pod mikroskopem immunofluorescencyjnym (Olympus BX-60).

5.16. Badania na zwierzętach

Eksperymenty na zwierzętach zostały wykonane we współpracy z prof. Henryką Długońską z Uniwersytetu Łódzkiego. Lokalna komisja etyczna wyraziła zgodę na przeprowadzenie doświadczeń na zwierzętach w zakresie złożonego wniosku (uchwała nr. 19/ŁB323/2006 z dnia 17 lipca 2006).

Do przeprowadzenia pierwszego eksperymentu wybrano 42 myszy płci męskiej, szczepu BALB/c, które podzielono na 6 grup po 7 osobników. Procedurę immunizacji przestawono w poniższej tabeli.

procedu	ra	kolejne dni od pierwszej immunizacji	dawka preparatów / mysz	miejsce podania preparatu
immunizacja	I	0	100 μg + kompletny adiuwant Freunda	podeszwy łap,podskórnie,dootrzewnowo
	11	16	50 µg + niekompletny adiuwant Freunda	podskórnie,dootrzewnowo
	111	30	50 µg + niekompletny adiuwant Freunda	dootrzewnowo
pobieranie krwi		45		 splot żylny oczodołu

Do przeprowadzenia drugiego eksperymentu wybrano 42 myszy płci męskiej, szczepu C3H/HeJ (odpornego na lipopolisacharyd), które podzielono na 3 grupy po 8 osobników i 2 po 9 osobników. Procedurę immunizacji przestawono w poniższej tabeli.

procedu	ra	kolejne dni od pierwszej immunizacji	dawka preparatów / mysz	miejsce podania preparatu
immunizacja	I	0	100 μg + kompletny adiuwant Freunda	podeszwy łap,podskórnie,dootrzewnowo
	I	14	100 µg + niekompletny adiuwant Freunda	podskórnie,dootrzewnowo
	III	28	100 µg + niekompletny adiuwant Freunda	 dootrzewnowo
pobieranie krwi		56		 splot żylny oczodołu
zarażenie <i>T. gondii</i> DX		58	5 cyst	dootrzewnowo

5.17. Programy komputerowe

- Analizę restrykcyjną oraz symulację klonowania wykonano przy zastosowaniu programu Clone 3.1 (Scientific & Educational Software).
- Analizę domen transmembranowych, sekwencji sygnalnych oraz obliczenie punktów izoelektrycznych i teoretyczne oszacowanie mas cząsteczkowych wykonano przy pomocy programu Antheprot 5.0 (Institute of Biology and Chemistry of Proteins, Lyon).
- Analizę determinant antygenowych wykonano przy zastosowaniu programów dostępnych na stornie internetowej: http://www.expasy.com [Chow i Fasman, 1978; Hopp i Woods, 1981; Kyte i Doolittle, 1982].
- Procentową zawartość białek uzyskaną podczas oczyszczania oszacowano densytometrycznie z wykorzystaniem systemu Versa Doc (program Quantity One).
- Analizę struktur krystalicznych białek wykonano przy zastosowaniu programu VMD (http://www.ks.uiuc.edu/Research/vmd/)

6. Wyniki

6.1. Fimbrie jako szczepionka

Fimbrie są to cienkie podobne do włosa struktury do 2 µm długości, występujące w liczbie ok. 100-500 kopii na komórkę bakteryjną. Biorąc pod uwagę fakt, że każda fimbria zbudowana jest z kilkuset połączonych ze sobą samych podjednostek białka DraE możliwe jest stworzenie takich chimerycznych fmbrii, gdzie każde białko podjednostkowe będzie zawierało wybraną przez nas sekwencję epitopową. Taki modelowy system ekspresji chimerycznych fimbrii został stworzony w Katedrze Mikrobiologii Politechniki Gdańskiej. System ten polega na koekspresji białek z wprowadzonych do komórek E. coli dwóch plazmidów tworzących fimbrie, zawierające w białku podjednostkowym DraE immunogenny epitop wirusa HSV1 [Zalewska i wsp., 2003]. Białko DraE będące podjednostką fimbrialną zmodyfikowane jest w ten sposób, że zamiast sekwencji kodującej domenę 2 wprowadzona jest sekwencja odpowiedniego epitopu. Takie zmodyfikowane białko DraE może nadal tworzyć strukturę fimbrii i zachowuje swoje własności adhezyjne oraz posiada epitop, który indukuje odpowiedź immunologiczną. Elementem ograniczającym zastosowanie bakteryjnych adhezyn jako nośników determinant antygenowych jest ich wielkość, która nie może zaburzać struktury adhezyny w takim stopniu, aby uniemożliwić jej polimeryzację w strukturę fimbrii.

Skonstruowane chimeryczne fimbrie bakteryjne mogą być podawane zwierzętom w dwóch postaciach. Pierwszą postacią otrzymanej szczepionki może być oczyszczony preparat chimerycznych fimbrii, występujących w bardzo dużej liczbie na powierzchni komórek *E. coli.* Otrzymanie oczyszczonych preparatów fimbriowych jest metodą prostą, ekonomiczną i bardzo wydajną. Drugą postacią szczepionki mogą być oczyszczone kompleksy białka opiekuńczego z białkiem podjednostkowym fimbrii zawierającym odpowiednie determinanty antygenowe. Takie kompleksy wykazują również bardzo duże własności immunogenne [Zavialov i wsp., 2002].

6.2. Konstrukcja ekspresyjnego plazmidu rekombinantowego pDraEepitop

6.2.1. Amplifikacja DNA fragmentów genu *draE* kodujących C- i Nkońcową część białka adhezyny DraE z wprowadzoną sekwencją kodującą odpowiedni epitop białek pasożyta *T. gondii*

Pierwszym etapem otrzymania plazmidów rekombinantowych było przeprowadzenie reakcji amplifikacji. Jako matrycy użyto DNA plazmidu rekombinantowego pBJN406 zawierającego cały operon dra. Fragmenty DNA kodujące N- i C-końcową część białka adhezyny DraE uzyskano metodą PCR z wykorzystaniem starterów [Materiały 4.6], umożliwiających wprowadzenie następujących sekwencji epitopowych: trzech sekwencji pochodzących z białka (PDKKSTGS, SAG1 PEAEDSGS antygenowego oraz NEKSFKDILPKLTENGS), sekwencji DAVLYENSEDVAVPGS pochodzącej z antygenu MAG1 oraz EVIDTMKSMQRDEDGS pochodzącej z antygenu GRA1 T. gondii. Wszystkie sekwencje epitopowe zostały wybrane w oparciu o dane literaturowe [Biemans i wsp., 1998; Nielsen i wsp., 1999; Beghettoet i wsp., 2001 i 2003; Cristina i wsp., 2004], a także dzięki przeprowadzonej analizie komputerowej. Poszczególne epitopy wprowadzono do sekwencji aminokwasowej białka DraE zamiast fragmentu 11 reszt aminokwasowych (VAKTRGQLTDA) N-końcowej powierzchniowo eksponowanej domeny 2. Reszty aminokwasowe zaznaczone kolorem niebieskim (GS) w przedstawionej sekwencji epitopowej, pochodzą od wprowadzonego miejsca rozpoznania dla restryktazy BamHI.

Startery wykorzystane w reakcji PCR zaprojektowano w taki sposób, aby umożliwiały efektywne klonowanie produktów reakcji PCR do wektorów docelowych. Skład mieszaniny reakcyjnej oraz zastosowany profil temperaturowo - czasowy reakcji amplifikacji we wszystkich przypadkach był identyczny [Metody 5.2].



Rys. 23. Rozdział elektroforetyczny produktów reakcji PCR w 2% żelu agarozowym.

- M marker wielkości M 100-500 (DNA Gdańsk)
- 1 produkt reakcji PCR wielkości 186 pz zawierający epitop 1 SAG1
- 2 produkt reakcji PCR wielkości 186 pz zawierający epitop 2 SAG1
- 3 produkt reakcji PCR wielkości 213 pz zawierający epitop 3 SAG1
- 4 produkt reakcji PCR wielkości 210 pz zawierający epitop MAG1
- 5 produkt reakcji PCR wielkości 210 pz zawierający epitop GRA1
- 6 produkt reakcji wielkości 333 pz
- 7 kontrola ujemna reakcji PCR

W wyniku reakcji amplifikacji otrzymano pięć fragmentów DNA kodujących N-końcową część białka DraE z epitopami: ep1-SAG1 (186 pz), ep2-SAG1 (186 pz), ep3-SAG1 (213 pz), MAG1 (210 pz) i GRA1 (210 pz) (Rys. 23). Do produktów PCR na końcu 5' wprowadzone zostało miejsce rozpoznania dla restryktaz KpnI i NdeI, a na końcu 3' sekwencje kodujące odpowiednie determinanty antygenowe białek SAG1, MAG1 lub GRA1 *T. gondii* oraz miejsce rozpoznania dla restryktazy BamHI (Rys. 24).

Α

 Kpnl
 Ndel

 1
 cggcgcggta
 cccatatgaa
 aaaattagcg
 atcatggccg
 cggccagcat

 51
 ggtgttcgcc
 gtgagctccg
 cgcatgctgg
 gttcaccccg
 agtggcacca

 101
 ccggcaccac
 caaactcaca
 gttaccgaag
 agtgccaggt
 acgggttggt

 151
 gacctgaccc
 cagataaaaa
 atcgacagga
 tccgat

 sekwencja kodująca epitop 1 SAG1

_	Kpn	l Ndel									
1	<u>cggcgc<mark>ggta</mark></u>	<u>cc</u> catatgaa	aaaattagcg	atcatggccg	cggccagcat						
51	ggtgttcgcc	gtgagctccg	cgcatgctgg	gttcaccccg	agtggcacca						
101	ccggcaccac	caaactcaca	gttaccgaag	agtgccaggt	acgggttggt						
151	gacctgacc c	ctgaagcaga	agatagc <mark>gga</mark>	tccgat							
sekwencja kodująca epitop 2 SAG1 BamHI											

KpnI	Ndel												
cggcgc <mark>ggta</mark>	cccatatgaa	aaaattagcg	atcatggccg	cggccagcat									
ggtgttcgcc	gtgagctccg	cgcatgctgg	gttcaccccg	agtggcacca									
ccggcaccac	caaactcaca	gttaccgaag	agtgccaggt	acgggttggt									
gacctgacc a	acgagaaatc	gttcaaagat	attttgccaa	aattaactga									
sekwencja kodująca epitop 3 SAG1													
gaacggatcc	gat												
BamHI													
Kpnl	Ndel												
cggcgc <mark>ggta</mark>	cccatatgaa	aaaattagcg	atcatggccg	cggccagcat									
ggtgttcgcc	gtgagctccg	cgcatgctgg	gttcaccccg	agtggcacca									
ccggcaccac	caaactcaca	gttaccgaag	agtgccaggt	acgggttggt									
gacctgaccg	acgctgtttt	atatgagaac	tcagaggacg	ttgccgttcc									
	sekw	vencja kodująca ep	itop MAG1										
g ggatccgat													
BamHI													
Knn	l Ndel												
caacacaata		aaaattagcg	atcatogcco	caaccaacat									
agtattcacc	atgageteeg	cacatactaa	attracccca	agtggcagcae									
3353556366	gegageeeeg		actageaget	ageggedeed									
CCCCCCCCCCC	caaactcaca	or raccoaao	ad drieadd										
ccggcaccac	caaactcaca	tactatgaaa	agratacaga	acgggttggt									
	Kpnl CggCgCggta ggtgttcgcc ccggcaccac gacctgacca gaacggatcc BamHI Kpnl CggCgCggta ggtgttcgcc ccggcaccac gacctgaccg gggatccgat BamHI	KpnlNdelcggcgcggtacccatatgaaggtgttcgccgtgagctccgccggcaccaccaaactcacagacctgaccaacgagaaatcgaacggatccgatBamHIsekwggggggggggggggggggggggggggggggggggg	KpnlNdelcggcgcggtacccatatgaaaaaattagcgggtgttcgccgtgagctccgcgcatgctgggacctgaccaacgagaaatcgttcaaagatgaccggatccgatgaacggatccgatBamHIKpnlNdelcggcgcggtacccatatgaaaaaattagcgggtgttcgccgtgagctccgcgcatgctggggcgcggtacccatatgaaaaaattagcgggtgttcgccgtgagctccgcgcatgctgggggatccgatcccatatgaaaaaattagcggggatccgatsekwencja kodująca epgggatccgatgggatccgatgggatccgatgggatccgatBamHINdelcggcgcggtacccatatgaagaactgaccgacaattagcggggatccgatggggtgttcgccggggtgttcgccgtgagctccgggggtgttcgccgtgagctccggggggtgtcgccgtgagctccggggggtgtcgccgtgagctccggggggtgtcgccgtgagctccggggggtgtcgccgtgagctccggggggtgtcgccgtgagctccgggggggggggggggggggggggggggggggggggg	KpnlNdelcggcgcggtacccatatgaaaaaattagcgatcatggccgggtgttcgccgtgagctccgcgcatgctgggtcaccccggacctgaccaacgagaaatcgttcaaagatattttgccaasekwencja kodująca epitop 3 SAG1gacgggtaCccatatgaaaaaattagcgatcatggcggacgggtacccatatgaaaaaattagcgatcatggcagggcgcggtacccatatgaaaaaattagcgggcgcggtacccatatgaagagctccgcgcatgctggggcgcggtacccatatgaaaaaattagcgatcatggccgggcgcggtacccatatgaagggatccgatggcgcggtacccatatgaaaaaattagcgatcatggccgggcgcggtacccatatgaaaaaattagcgatcatggccgggcgcggtacccatatgaaaaaattagcgatcatggccgggggtccgatggcgcggtaccatatgaaaaaattagcgaccatatgaaaaaattagcgaccatatgaaaaaattagcgaccatatgaaaaaattagcgaccatatgaaaaaattagcgaccatatgaaaaaattagcgaccatatgaaaaaattagcgaccatatgaaaaaattagcgggggtccggSekwencja kodująca epitop MAG1 <td< th=""></td<>									

201 <u>cggatcc</u>ata BamHI

Rys. 24. Sekwencje nukleotydowe produktów PCR otrzymanych w wyniku reakcji amplifikacji (fragmentu genu *draE* kodującego N-końcową część adhezyny DraE) z wprowadzonymi fragmentami kodującymi: A) epitop 1 SAG1, B) epitop 2 SAG1, C) epitop 3 SAG1, D) epitop MAG1, E) epitop GRA1. Podkreślono sekwencje pochodzące ze starterów, a w nich kolorem zielonym zaznaczono sekwencje komplementarne do matrycy; kolor czerwony i niebieski wskazują miejsca rozpoznania dla odpowiednich enzymów restrykcyjnych; pogrubiono sekwencję kodującą odpowiednie epitopy.

W kolejnym etapie otrzymano fragment DNA kodujący C-końcową część białka DraE o wielkości 333 pz (Rys. 23). W wyniku reakcji amplifikacji do produktu PCR na koniec 5' została wprowadzona sekwencja rozpoznania dla enzymu restrykcyjnego BamHI, a na koniec 3' miejsce rozpoznania dla restryktaz EcoRI i HindIII (Rys. 25) [Metody 5.3].

	BamHl				
1	<u>agcggatccg</u>	caccaatagg	gccggtcacc	gtgcaagcgc	tgggatgcga
51	cgcccgccag	gtcgcgttga	aggcagacac	cgataacttc	gaacagggca
101	agttcttcct	gatcagcgac	aacaataggg	ataagctcta	tgtcaatata
151	cggcctacgg	ataactccgc	ctggacgacc	gacaatggtg	tcttctacaa
201	aaacgatgtc	gggagctggg	gtggaattat	cgggatctac	gtagatgggc
251	aacaaacgaa	cacaccgccc	ggcaactaca	cactgaccct	gaccgggggt
301	tactgggcaa	aatgagaatt	<pre>caagcttcct</pre>	cgc	
		EcoRI	HindIII		

Rys. 25. Sekwencja nukleotydowa produktu PCR otrzymanego w wyniku reakcji amplifikacji fragmenu genu *draE* kodującego C-końcową część białka DraE. Podkreślono sekwencje pochodzące ze starterów, a w nich kolorem zielonym zaznaczono sekwencje komplementarne do matrycy; kolor czerwony i niebieski wskazują miejsca rozpoznania dla odpowiednich enzymów restrykcyjnych.

6.2.2. Konstrukcja DNA plazmidów rekombinantowych pUC19-epitopA

Wstępne klonowanie do wektora pUC19 [Materiały 4.2] ma na celu utrwalenie produktu amplifikacji DNA w postaci stabilniejszej formy i warunkuje otrzymanie dużej ilości DNA zawierającego gen *draE* z wprowadzoną sekwencją odpowiedniego epitopu.

Uzyskane w wyniku reakcji amplifikacji fragmenty kodujące N-końcową część białka DraE z sekwencją epitopową, a także plazmid pUC19 poddano reakcji trawienia enzymami restrykcyjnymi BamHI i KpnI w odpowiednich buforach, przez jedną godzinę, w temperaturze 37°C [Metody 5.4.4]. Liniowe cząsteczki DNA insertu i wektora poddane zostały reakcji ligacji w układzie na "lepko" [Metody 5.4.5]. Następnie mieszaniną ligacyjną transformowano komórki kompetentne *E. coli* TOP10F' [Metody 5.6]. W wyniku transformacji otrzymano szereg białych i niebieskich kolonii na płytkach z podłożem LA zawierającym ampicylinę, tetracyklinę, IPTG oraz X-Gal. Białe kolonie z płytek po transformacji przesiano na nowe płytki Petriego, które inkubowano przez 18 godzin w temperaturze 37°C. Po inkubacji z białych kolonii bakteryjnych izolowano plazmidy wykorzystując zestaw do izolacji ultraczystego DNA plazmidowego [Metody 5.4.1].

W celu potwierdzenia czy DNA plazmidów wytypowanych na podstawie różnicy wielkości w stosunku do natywnego plazmidu pUC19 są właściwymi plazmidami rekombinantowymi, poddano je analizie restrykcyjnej z wykorzystaniem enzymów Mspl i Ndel [Materiały 4.5]. Wielkość fragmentów powstałych w wyniku reakcji trawienia oszacowano z wykorzystaniem programu Clone [Metody 5.17].

Zastosowana analiza restrykcyjna potwierdziła poprawność skonstruowanych plazmidów rekombinantowych pUC19-epitopA (pUC19-ep1-SAG1A, pUC19-ep2-SAG1A pUC19-ep3-SAG1A, pUC19-MAG1A oraz pUC19-GRA1A), zawierających wklonowane DNA kodujące N-końcową część białka DraE z sekwencją odpowiedniego epitopu antygenu *T. gondii.*

6.2.3. Konstrukcja DNA plazmidów rekombinantowych pUC19-epitopB

Następnym etapem było otrzymanie plazmidów pUC19-epitopB, zawierających cały gen kodujący adhezynę DraE z wprowadzoną sekwencją odpowiedniego epitopu. Do ich konstrukcji wykorzystano odpowiednie plazmidy rekombinantowe pUC19-epitopA otrzymane w poprzednim etapie.

Uzyskany w wyniku reakcji amplifikacji fragment DNA o wielkości 333 pz, kodujący C-końcowa część białka DraE, a także odpowiednie plazmidy pUC19epitopA, poddano reakcji trawienia enzymami restrykcyjnymi BamHI i HindIII, w odpowiednich buforach, przez jedną godzinę, w temperaturze 37°C [Metody 5.4.4]. W rezultacie otrzymano cząsteczki DNA zawierające 5' i 3' "lepkie" końce. Liniowe cząsteczki DNA insertu i wektora, poddane zostały reakcji ligacji w układzie na "lepko" [Metody 5.4.5]. Następnie mieszaniną ligacyjną transformowano komórki kompetentne E. coli TOP10F' [Metody 5.6]. Kolonie otrzymane po transformacji przesiano na nowe płytki Petriego z podłożem LA zawierającym ampicylinę i tetracyklinę. Po inkubacji kolonie zaszczepiano na pożywkę LB z ampicyliną oraz tetracykliną i hodowano przez 18 godzin w wytrząsarce, w temperaturze 37°C. Następnie hodowle wirowano i izolowano plazmidy wykorzystując zestaw do izolacji ultraczystego DNA plazmidowego [Metody 5.4.1]. W celu potwierdzenia czy otrzymane plazmidy są właściwymi plazmidami rekombinantowymi, poddano je analizie restrykcyjnej Ζ wykorzystaniem restryktaz EcoRI i Cfr10I [Materiały 4.5]. Wielkość fragmentów powstających po reakcji trawienia oszacowano z wykorzystaniem programu komputerowego Clone [Metody 5.17].

W wyniku przeprowadzonych doświadczeń otrzymano DNA plazmidów rekombinantowych pUC19-epitopB (pUC19-ep1-SAG1B, pUC19-ep2-SAG1B, pUC19-ep3-SAG1B, pUC19-MAG1B oraz pUC19-GRA1B), zawierających gen kodujący całe białko DraE z wprowadzoną sekwencją epitopową odpowiednich antygenów *T. gondii.* Analiza restrykcyjna wszystkich plazmidów potwierdziła

poprawność otrzymanych konstruktów. Otrzymane plazmidy rekombinantowe pUC19-epitopB wykorzystano następnie do otrzymania rekombinantowych plazmidów ekspresyjnych.

6.2.4. Konstrukcja DNA rekombinantowych plazmidów ekspresyjnych pDraE-epitop

Ostatnim etapem konstrukcji plazmidów ekspresyjnych było przeklonowanie genu kodującego białko DraE z wprowadzoną odpowiednią sekwencją epitopową białka SAG1, MAG1 lub GRA1 *T. gondii* z plazmidu pUC19-epitopB do plazmidu ekspresyjnego pET-30LIC, umożliwiającego kontrolowaną i wydajną ekspresję chimerycznego białka DraE w komórkach *E. coli* BL21(DE3) w systemie ekspresyjnym Tabora-Studiera [Materiały 4.2].

DNA genu kodującego białko DraE z wprowadzoną sekwencją odpowiedniej determinanty antygenowej białka SAG1, MAG1 lub GRA1 otrzymano przez trawienie plazmidu pUC19-epitopB enzymami restrykcyjnymi Ndel i EcoRI [Metody 5.4.4]. Tmi samymi enzymami restrykcyjnymi trawiono DNA plazmidu pET-30LIC. Następnie przeprowadzono reakcje ligacji [Metody 5.4.5] i mieszaniną ligacyjną transformowano komórki kompetentne E. coli TOP10F' [Metody 5.6]. Kolonie otrzymane w wyniku transformacji przesiewano na nowe płytki z podłożem LA zawierającym kanamycynę i tetracyklinę, które następnie inkubowano przez 18 godzin w temperaturze 37°C. Po inkubacji kolonie zaszczepiano do pożywki płynnej LB z tymi samymi antybiotykami i hodowano przez 18 godzin w wytrząsarce, w temperaturze 37°C. Następnie hodowle wirowano i izolowano plazmidy wykorzystując zestaw do izolacji ultraczystego DNA plazmidowego [Metody 5.4.1]. W celu potwierdzenia poprawności konstrukcji plazmidów ekspresyjnych poddano je analizie restrykcyjnej przy użyciu enzymu restrykcyjnego BstEII [Materiały 4.5]. Wielkość produktów powstających w wyniku reakcji trawienia oszacowano z wykorzystaniem programu komputerowego Clone [Metody 5.17].

Schemat całej procedury klonowania w celu uzyskania rekombinantowych plazmidów ekspresyjnych pDraE-epitop przedstawiono na rysunku 26.



Rys. 26. Schemat podsumowujący konstrukcję plazmidu rekombinantowego pDraE-epitop.

W wyniku przeprowadzonych doświadczeń skonstruowano pięć ekspresyjnych plazmidów rekombinantowych pDraE-epitop: pDraE-ep1-SAG1 (o wielkości 5746 pz - Rys. 27), pDraE-ep2-SAG1(5746 pz - Rys. 28), pDraE-ep3-SAG1 (5773 pz - Rys. 29), pDraE-MAG1 (5770 pz - Rys. 30) oraz pDraE-GRA1 (5770 pz - Rys. 31), zawierających sekwencję genu kodującego adhezynę DraE z wprowadzonym odpowiednim epitopem białek SAG1, MAG1 lub GRA1, znajdującego się pod kontrolą fagowego promotora T7. Wszystkie plazmidy rekombinantowe zostały zsekwencjonowane [Metody 5.5].

Plazmidy rekombinantowe pDraE-epitop można użyć do koekspresji białek zaangażowanych w biosyntezę fimbrii Dr z plazmidu pDraE-epitop oraz plazmidu pCC90D54stop zawierającego operon *dra* z mutacją w genie *draE*, prowadzącą do przedwczesnej terminacji syntezy białka DraE.

GGATCGAGATCGATCTCGATCCCGCGAAATTA	promotor T7 \rightarrow ATACGACTCACTATAGGGGAATTGTGA
<i>lac</i> operator <u>GCGGATAACAATTCC</u> CCTCTAGAAATAATTTTC	rbs Nde GTTTAACTTTAAG <u>AAGGAG</u> ATATA <u>CAT</u>
$\begin{array}{c} \text{1-DraE} \rightarrow \\ \underline{\text{ATGAAAAAATTAGCGATCATGGCCG}CGGCCAGG} \\ \hline M & K & L & A & I & M & A & A & S \end{array}$	CATGGTGTTCGCCGTGAGCTCCGCGCA M V F A V S S A H
TGCTGGGTTCACCCCGAGTGGCACCACCGGCA A G F T P S G T T G T	CCACCAAACTCACAGTTACCGAAGAGT T T K L T V T E E
$\leftarrow 2\text{-}DraE\text{-}SAG\text{-}ep1 sekwencja$ GCCAGGTACGGGTTGGTGACCTGACCCCAGATZ C Q V R V G D L T P D	a pierwszego epitopu białka SAG1 AAAAAATCGACAGGATCCGCACCAATA K K S T G S A P I
$\begin{array}{c} \textbf{3-DraE} \rightarrow \\ \underline{\text{GGGCCGGTCACCG}} \text{TGCAAGCGCTGGGATGCGAC} \\ \hline \textbf{G} \textbf{P} \textbf{V} \textbf{T} \textbf{V} \textbf{Q} \textbf{A} \textbf{L} \textbf{G} \textbf{C} \textbf{D} \end{array}$	CGCCCGCCAGGTCGCGTTGAAGGCAGA A R Q V A L K A D
CACCGATAACTTCGAACAGGGCAAGTTCTTCC T D N F E Q G K F F I	TGATCAGCGACAACAATAGGGATAAGC L I S D N N R D K
TCTATGTCAATATACGGCCTACGGATAACTCCC L Y V N I R P T D N S	GCCTGGACGACCGACAATSGTGTCTTC A W T T D N G V F
TACAAAAACGATGTCGGGAGCTGGGGTGGAAT Y K N D V G S W G G I	TATCGGGATCTACGTAGATGGGCAACA I G I Y V D G Q Q
AACGAACACACCGCCCGGCAACTACACACTGA	← 4-DraE stop CCCTGACCGGGGGGTTACTGGGCAAAA T
TNTPPGNYTL	T L T G G Y W A K

EcoRI GAGAATTCGCGGCCGCACTCGAGCACCACCACCACCACCAGGATCCGGCTGCTAAC

Terminator T7 CCTTGGGGCCTCTAAACGGGTCTTGAGGGGGTTTTTTG

Rys. 27. Sekwencja nukleotydowa i aminokwasowa plazmidu ekspresyjnego pDraE-ep1-SAG1 w rejonie insercji genu, kodującego białko adhezyny DraE z pierwszym epitopem białka SAG1. Kolor czerwony - sekwencja nukleotydowa i aminokwasowa wprowadzonego epitopu białka SAG1.

GGAT	CGAGATCGA	TCTCGA'	TCCCGC	'GAAA'	ГТААТ	pror TACGA	notor ACTCA	I7 → .CTAT.	AGGG	GAATI	GTGA
lac o GCGG	operator ATAACAATT	CCCCCTC	TAGAAA	TAAT	FTTGI	TTAA	CTTT	AAGA	rbs AGGA(<u>G</u> ATAI	Ndel TACAT
1-Dral ATGA M	∃→ <u>aaaaattag</u> k k l	CGATCA	IGGCCG M A	CGGC	CAGCA S	ATGGI M V	'G	••••			
GCCA C Q	← 2-D I GGTA <u>CGGG</u> T V R V	raE-SAG-(TGGTGA) GD	ep2 CCTGAC L T	sekwe CCCTC P	encja o GAAGO E A	drugie CAGAA A E	go ep GATA D	itopu .GCGG. S G	biała s ATCC S	SAG1 GCACC A E	CAATA
3- GGGC G	DraE → CGGTCACCG P V T	TGCAAG VQ	CGCTGG A L	GATG(G C	CGACG D	GCCCG A R	CCAG 2 Q				
AACG. T E	AACACACCG N T P coRI	CCCGGC P G	AACTAC N Y	ACAC T 1	IGACC L T	CCTGA L Term	CCGG T G	← 4-D GGGT" ∀ G T7	raE TACT(Y I	GGGCA W A	stop AAAA T K
GAGA Rys. 28. Se w rejonie ins SAG1. Kolo	ATTCG <u>C</u> kwencja nukl sercji genu, k r czerwonv ·	eotydowa odującego sekwenc	AACCCC i amino b białko cia nukle	tread kwasov adhezy eotvdov	GGCCI wa pla: vny Dra va i ar	ZMIDU ZMIDU	ACGG ekspr rugą s vasow	GTCT esyjne sekwer a wpro	<u>TGAG</u> go pD icją ep owadz	GGGTI raE-ep bitopow	2-SAG1 2-SAG1 vą białka epitopu
białka SAG1	CGAGATCGA	ATCTCGA'	ICCCGC	'GAAA'	r <u>taat</u>	pror TACGA	notor ⁻	$\Gamma 7 \rightarrow CTAT.$	<u>A</u> GG <u>G</u>	GAATI	<u>IGTGA</u>
lac o GCGG.	operator ATAACAATT	CCCCCTC	TAGAAA	TAAT	FTTGI	TTAA	CTTT	AAGA	rbs AGGA(<u>G</u> ATA1	Ndel TA <u>CAT</u>
1-Dral ATGA M	$\Xi \rightarrow$ AAAAATTAG K K L	CGATCA	IGGCCG M A	CGGC	CAGCA S	ATGGI M V	'G				
GCCA	← 2-DraE-S	AG-ep3	CCTGAC	seł CAACO	Wenc BAGAA	ja trze ATCG	ciego TTCA F	epitoj AAGA:	ou bia rattī t	Ha SAC	G1 AAAA

						- 3	-Dra	E →										
TTAA	CTG	AGA	ACG	GAT	CCG	CAC	CAA	TAG	GGC	CGG	TCA	CCG	TGC.	AAG				
\mathbf{L}	Т	Е	Ν	G	S	А	Ρ	I	G	Ρ	V	Т	V	Q				
													←	4-D	raF			ston
		ימרים	CCC		aar		יידע		СТС		ירידים	acc	ada.	CGT	TAC	тсс	GCA	ΔΔΔΤ
<i>i</i> micc					000	1110	Inc	11011		100		mee	000	001	Inc	100	ucn	<u>, , , , , , , ,</u>
Т	N	Т	Ρ	Ρ	G	Ν	Y	Т	L	Т	L	Т	G	G	Y	W	А	K
E	EcoR	I									Terr	ninat	or T	7				
GA GA	ATT	'CG.	<u>c</u>	TAG	CAT	'AAC	CCC	TTG	GGG	CCI	CTA	AAC	GGG	TCT	TGA	GGG	GTT	TTTTG

Rys. 29. Sekwencja nukleotydowa i aminokwasowa plazmidu ekspresyjnego pDraE-ep3-SAG1 w rejonie insercji genu, kodującego białko adhezyny DraE z trzecim epitopem białka SAG1. Kolor czerwony - sekwencja nukleotydowa i aminokwasowa wprowadzonego epitopu białka SAG1.

promotor T7 \rightarrow GGATCGAGATCGATCTCGATCCCGCGAAATTAATACGACTCACTATAGGGGAATTGTGA											
<u>GCGGATAACAATTCC</u> CCTCTAGAAATAATTTTGTTTAACTTTAAG <u>AAGGAG</u> ATATA <u>CAT</u>											
1-DraE →											
ATGAAAAAATTAGCGATCATGGCCGCGGCCAGCATGGTG											
M K K L A I M A A A S M V											
← 2-DraF-MAG1 sekwencia enitonu biała MΔG1											
GCCAGGTACGGGTTGGTGACCTGACCGACGCTGTTTTATATGAGAACTCAGAGGACGT											
C Q V R V G D L T D A V L Y E N S E D V											
3-DraE →											
TGCCGTTCCGGGATCCGCACCAATAGGGCCGGTCACCGTGCAAGCGC											
AVPGSAPIGPVTVQA											
← 4-DraE stop											
AACGAACACCGCCCGGCAACTACACACTGACCCTGACCGGGGGTTACTGGGCAAAAT											
T N T P P G N Y T L T L T G G Y W A K											
EcoBI Terminator T7											
GAGAATTCGCTAGCATAACCCCTTGGGGGCCTCTAAACGGGTCTTGAGGGGGTTTTTTG											

Rys. 30. Sekwencja nukleotydowa i aminokwasowa plazmidu ekspresyjnego pDraE-MAG1 w rejonie insercji genu, kodującego białko adhezyny DraE z sekwencją epitopową białka MAG1. Kolor czerwony - sekwencja nukleotydowa i aminokwasowa wprowadzonego epitopu białka MAG1.

$promotor \ T7 \rightarrow GGATCGAGATCGATCTCGATCCCGCGAAAT \underline{TAATACGACTCACTATA}GGGGGAATTGTGA$													
<i>lac</i> operator	rbs	Ndel											
<u>GCGGATAACAATTCC</u> CCTCTAGAAATAATTTTGTTTAACTTTAAG <u>AAGGAG</u> ATATA <u>CAT</u>													
1-DraE → ATGAAAAAATTAGCGATCATGGCCGCGGCCAGCATGGTG													
MKKLAIMAAASMV													
← 2-DraE-GRA1 sekwencja epitopu biała GRA1													
GCCAGGTACGGGTTGGTGACCTGACC <mark>GAGGTGATTGATACTATGAAAAGCATG</mark>													
C Q V R V G D L T E V I D T	M K	S M											

starter 3-DraE																		
CAGAGGGACGAGGACGCACCAATAGGGCCGGTCACCGTGCAAGCGC											· • • • •							
Q	R	D	Е	D	G	S	А	Ρ	I	G	Ρ	V	Т	V				
													← 4-DraE					stop
AACGAACACCGCCCGGCAACTACACACTGACCCTGACCGGGGGTTACTGGGCAAAAT									AAA T									
Т	Ν	Т	Ρ	Ρ	G	Ν	Y	Т	L	Т	L	Т	G	G	Y	W	А	K
EcoRI					Terminator T7													
$\mathbf{GA} \texttt{GA} \texttt{GA} \texttt{A} \texttt{TTCG} \dots \texttt{CTA} \texttt{GC} \texttt{C} \texttt{TTA} \texttt{A} \texttt{C} \texttt{C} \texttt{C} \texttt{C} \texttt{T} \texttt{T} \texttt{T} \texttt{T} \texttt{G} \texttt{G} \texttt{G} \texttt{G} \texttt{G} \texttt{C} \texttt{T} \texttt{T} \texttt{T} \texttt{T} \texttt{T} \texttt{G} \texttt{G} \texttt{G} \texttt{G} \texttt{G} \texttt{G} \texttt{T} \texttt{T} \texttt{T} \texttt{T} \texttt{T} \texttt{T} \texttt{G} \texttt{G} \texttt{G} \texttt{G} \texttt{G} \texttt{G} \texttt{G} G$																		

Rys. 31. Sekwencja nukleotydowa i aminokwasowa plazmidu ekspresyjnego pDraE-GRA1 w rejonie insercji genu, kodującego białko adhezyny DraE z sekwencją epitopową białka GRA1. Kolor czerwony - sekwencja nukleotydowa i aminokwasowa wprowadzonej determinanty antygenowej białka GRA1.

Skonstruowane plazmidy rekombinantowe pDraE-epitop pozwoliły na uzyskanie następujących białek fuzyjnych (Rys. 32):

- DraE-ep1-SAG1 zbudowanego ze 157 reszt aminokwasowych o masie cząsteczkowej (oszacowanej z wykorzystaniem programu Antheport) 16,8 kDa dla białka z sekwencją sygnalną, umożliwiającą jego transport do przestrzeni periplazmatycznej i 14,6 kDa dla białka bez sekwencji sygnalnej oraz punkcie izoelektrycznym (pl) równym 6,55 [Metody 5.17];
- DraE-ep2-SAG zbudowanego ze 157 reszt aminokwasowych o masie 16,7 kDa (14,6 kDa) oraz pl = 4,83;
- DraE-ep3-SAG zbudowanego ze 166 reszt aminokwasowych, o masie 17,8 kDa (15,6 kDa) oraz pl = 5,77;
- DraE-MAG1 zbudowanego ze 165 reszt aminokwasowych, o masie 17,5 kDa (15,4 kDa) oraz pl = 4,70 oraz
- DraE-GRA1 zbudowanego ze 165 reszt aminokwasowych, o masie 17,7 kDa (15,6 kDa) i pl = 4,88.

Α

1 MKKLAIMAAA SMVFAVSSAH AGFTPSGTTG TTKLTVTEEC QVRVGDLTPD 51 KKSTGSAPIG PVTVQALGCD ARQVALKADT DNFEQGKFFL ISDNNRDKLY 101 VNIRPTDNSA WTTDNGVFYK NDVGSWGGII GIYVDGQQTN TPPGNYTLTL 151 TGGYWAK

В

1 MKKLAIMAAA SMVFAVSSAH AGFTPSGTTG TTKLTVTEEC QVRVGDLTPE 51 AEDSGSAPIG PVTVQALGCD ARQVALKADT DNFEQGKFFL ISDNNRDKLY 101 VNIRPTDNSA WTTDNGVFYK NDVGSWGGII GIYVDGQQTN TPPGNYTLTL 151 TGGYWAK

С

1MKKLAIMAAA SMVFAVSSAH AGFTPSGTTG TTKLTVTEEC QVRVGDLTNE51KSFKDILPKL TENGSAPIGP VTVQALGCDA RQVALKADTD NFEQGKFFLI101SDNNRDKLYV NIRPTDNSAW TTDNGVFYKN DVGSWGGIIG IYVDGQQTNT151PPGNYTLTLT GGYWAK

D

1MKKLAIMAAASMVFAVSSAHAGFTPSGTTGTTKLTVTEECQVRVGDLTDA51VLYENSEDVAVPGSAPIGPVTVQALGCDARQVALKADTDNFEQGKFFLIS101DNNRDKLYVNIRPTDNSAWTTDNGVFYKNDVGSWGGIIGIYVDGQQTNTP151PGNYTLTLTGGYWAK

Ε

- 1 MKKLAIMAAASMVFAVSSAHAGFTPSGTTGTTKLTVTEECQVRVGDLTEV
- 51 IDTMKSMQRDEDGSAPIGPVTVQALGCDARQVALKADTDNFEQGKFFLIS
- 101 DNNRDKLYVNIRPTDNSAWTTDNGVFYKNDVGSWGGIIGIYVDGQQTNTP

151 PGNYTLTLTGGYWAK

Rys. 32. Sekwencje aminokwasowe białek DraE z wprowadzoną sekwencją epitopową odpowiednich antygenów *T. gondii*: A) ep1-SAG1, B) ep2-SAG1, C) ep3-SAG1, D) MAG1, E) GRA1. Podkreślono sekwencję sygnalną, kolorem niebieskim oznaczono pierwszy aminokwas w dojrzałym białku, zielonym wprowadzoną sekwencję odpowiedniego epitopu.

6.3. Ekspresja genu kodującego rekombinantowe białko DraE-epitop w komórkach *E. coli* BL21(DE3)

Komórki *E. coli* BL21(DE3) transformowano DNA plazmidów rekombinantowych pDraE-epitop (pDraE-ep1-SAG1, pDraE-ep2-SAG1, pDraE-ep3-SAG1, pDraE-MAG1 oraz pDraE-GRA1) [Metody 5.10]. Pojedyncze kolonie bakteryjne, otrzymane w wyniku transformacji, zaszczepiano do 20 ml pożywki LB z kanamycyną [Materiały 4.3] i hodowano w wytrząsarce powietrznej, w temperaturze 30°C, przez 18 godzin. Następnie hodowlę odmładzano w 1000 ml pożywki LB z dodatkiem antybiotyku [Metody 5.1] i prowadzono ekspresję [Metody 5.8].

Przeprowadzano rozdział elektroforetyczny uzyskanych próbek całkowitych lizatów bakteryjnych w 15% żelu poliakrylamidowym w warunkach denaturujących [Metody 5.7.2]. Przykładowy rozdział elektroforetyczny białek zawartych we frakcjach całkowitych lizatów pokazany jest na rysunku 33

DraE-ep3-SAG1

Rys. 33. Przykładowy rozdział elektroforetyczny białek zawartych we frakcjach całkowitych lizatów komórek *E. coli* BL21(DE3) zbieranych podczas prowadzenia ekspresji genu kodującego DraE-ep3-SAG1.

1- 15µl lizatu komórek E. coli BL21(DE3) + pDraE- ep3-SAG1 pobranych przed indukcją;

2- 15µl lizatu komórek E. coli BL21(DE3) + pDraE- ep3-SAG1 pobranych 1h po indukcji;

3- 15µl lizatu komórek E. coli BL21(DE3) + pDraE- ep3-SAG1 pobranych 2h po indukcji

4- 15µl lizatu komórek E. coli BL21(DE3) + pDraE- ep3-SAG1 pobranych 3h po indukcji;

5- 15µl lizatu komórek E. coli BL21(DE3) + pDraE- ep3-SAG1 pobranych 4h po indukcji;

6- 15µl lizatu komórek E. coli BL21(DE3) + pDraE- ep3-SAG1 pobranych 5h po indukcji;

7- 15µl lizatu komórek E. coli BL21(DE3) + pDraE- ep3-SAG1 pobranych 20h po indukcji.

Na podstawie przeprowadzonych elektroforez poliakrylamidowych dla pięciu badanych systemów ekspresyjnych stwierdzono wysoki poziom produkcji białka rekombinantowego we frakcjach całkowitych lizatów zebranych po 3, 4 i 5 godzinach od momentu indukcji. Na elektroforogramach widoczne są wyraźne prążki białka na tle pozostałych białek komórkowych, których masy cząsteczkowe odpowiadały masom białek rekombinantowych DraE-epitop bez sekwencji sygnalnej. Największa ilość żądanych białek zawarta była w lizatach pobranych po 3 lub 4 godzinach od momentu indukcji, po czym ich ilości wyraźnie spadają (Rys. 33).

6.4. Immunoidentyfikacja białek DraE-epitop metodą Western blotting

W celu detekcji poszczególnych białek rekombinantowych DraE-epitop przeprowadzono elektroforezę w warunkach denaturujacych w 15% żelu poliakrylamidowym [Metody 5.7.2] próbek całkowitych lizatów komórek *E. coli* BL21(DE3) zawierających plazmid rekombinantowy pDraE-epitop pobranych podczas zoptymalizowanej procedury prowadzenia ekspresji, a następnie wykonano elektrotransfer rozdzielonych białek na błonę nitrocelulozową. Do enzymatycznej detekcji białka DraE-epitop użyto 3,3'-diaminobenzydyny i H₂O₂ jako substratów dla peroksydazy chrzanowej [Metody 5.14.1].



Rys. 34. Wynik testu Western blotting z wykorzystaniem przeciwciał anty-Dr.

- M- marker wielkości (Fermentas);
- 1- lizat komórek E. coli BL21(DE3) kontrola negatywna;
- 2- lizat komórek E. coli BL21(DE3) + pDraE-ep3-SAG1 pobranych 4h po indukcji;
- 3- lizat komórek E. coli BL21(DE3) + pDraE-GRA1 pobranych 4h po indukcj;

4- oczyszczona frakcja piliowa- kontrola pozytywna.

Pozytywny wynik przeprowadzonej analizy w przypadku zastosowania przeciwciał antv-Dr świadczv 0 poprawności konstrukcii białek rekombinantowych DraE-epitop. Przykładowy wynik testu Western blotting pokazano na rysunku 34. Zmiana sekwencji genu draE nie spowodowała trwałych zmian w strukturze determinant antygenowych rozpoznawanych przez przeciwciała anty-Dr, co było argumentem do zastosowania rekombinantowego plazmidu pDraE-epitop w eksperymentach komplementacji zmutowanego genu draE w plazmidzie rekombinantowym pCC90D54stop oraz ekspresji chimerycznych fimbrii typu DraE-epitop na powierzchni komórek bakteryjnych E. coli BL21(DE3)pCC90D54stop/pDraE-epitop.

6.5. Produkcja natywnych fimbrii typu Dr i chimerycznych fimbrii typu Dr-epitop oraz izolacja fimbrialnych białek podjednostkowych DraE i DraE-epitop

Wykonano elektrotransformację komórek kompetentnych *E. coli* BL21(DE3) DNA plazmidu rekombinantowego pCC90 oraz niezależnie transformację DNA plazmidu rekombinantowego pCC90D54stop [Materiały 4.2; Metody 5.10]. W ten sposób uzyskano rekombinantowy szczep *E. coli* BL21(DE3)pCC90 pozwalający na ekspresję natywnych fimbrii typu Dr, zbudowanych z podjednostek białkowych adhezyny DraE oraz rekombinantowy szczep *E. coli* BL21(DE3)pCC90D54stop, stanowiący kontrolę negatywną doświadczenia ze względu na brak wytwarzania na powierzchni komórek bakteryjnych natywnych fimbrii typu Dr, spowodowany przedwczesną terminacją syntezy podjednostek fimbrialnych DraE.

Następnie wykonano transformację komórek kompetentnych *E. coli* BL21(DE3)pCC90D54stop DNA plazmidu rekominantowego pDraE-epitop, kodującego białko DraE z odpowiednim epitopem białka SAG1, MAG1 lub GRA1 *T. gondii* [Metody 5.10]. Uzyskano rekombinantowe szczepy *E. coli* BL21(DE3)pCC90D54stop/pDraE-epitop, warunkujące (przy odpowiednich warunkach prowadzenia hodowli bakteryjnej) produkcję chimerycznych fimbrii typu Dr-epitop zbudowanych z podjednostek fimbrialnych DraE-epitop. Plazmidy rekombinantowe pDraE-epitop kodujące fuzyjne białko DraE z epitopem wykorzystano do komplementacji *in trans* zmutowanego genu *draE* w plazmidzie pCC90D54stop i ekspresji chimerycznych fimbrii typu Dr-epitop na powierzchni komórek bakteryjnych *E. coli*. Dodatkowo sprawdzono możliwość koekspresji białek zaangażowanych w biosyntezę fimbrii z dwóch plazmidów w komórkach szczepu *E. coli* BL21(DE3)pCC90D54stop/pDraE-epitop.

W celu ekspresji natywnych fimbrii typu Dr oraz chimerycznych fimbrii typu Dr-epitop wykorzystano hodowle rekombinantowych szczepów bakterii *E. coli* BL21(DE3)pCC90 oraz *E. coli* BL21(DE3)pCC90D54stop/pDraE-epitop na podłożach stałych z dodatkiem odpowiednich antybiotyków [Materiały 4.3; Metody 5.1] oraz roztworu IPTG w przypadku ekspresji chimerycznych fimbrii typu Dr-epitop [Metody 5.11]. Uzyskane frakcje fimbrialne poddano analizie w 15% żelu poliakrylamidowym w warunkach denaturujących (Rys. 35) [Metody, 5.7.2].

M^1 1 2 M^2 3 4 5 6



Rys. 35. Rozdział elektroforetyczny frakcji fimbrialnych w 15% żelu polikarylamidowym. M¹- marker wielkości (Sigma)

- 1 10µl frakcji fimbrialnej komórek *E.coli* BL21(DE3)pCC90D54stop/pDraE-ep1-SAG1 2 - 10µl frakcji fimbrialnej komórek *E.coli* BL21(DE3)pCC90D54stop/pDraE-ep2-SAG1
- M^2 marker wielkości (Fermentas)
- 3 10µl frakcji fimbrialnej komórek E.coli BL21(DE3)pCC90D54stop/pDraE-ep3-SAG1

4 - 10µl frakcji fimbrialnej komórek E.coli BL21(DE3)pCC90D54stop/pDraE-MAG1

5 - 10µl frakcji fimbrialnej komórek E.coli BL21(DE3)pCC90D54stop/pDraE-GRA1

6 - 10µl frakcji fimbrialnej komórek *E.coli* BL21(DE3)pCC90

Na podstawie przeprowadzonej elektroforezy stwierdzono wysoki poziom fimbrialnych białek DraE i DraE-epitop w wyizolowanych frakcjach fimbrii Dr i Dr-epitop (Rys. 35). Widoczne są intensywne prążki wśród innych białek powierzchniowych, których masa cząsteczkowa odpowiada masie białka DraE dzikiego typu bez sekwencji sygnalnej oraz chimerycznych białkek DraE-epitop bez sekwencji sygnalnej. Jedynie w przypadku białek DraE-ep2-SAG1 oraz DraE-MAG1 powstające białko ma masę nieco większą niż masa białka DraE dzikiego typu. Spowodowane jest to najprawdopodobniej tym, że punkt izoelektryczny białek DraE-ep2-SAG1 (pI=4,83) oraz DraE-MAG1 (pI=4,70) jest dużo niższy od punktu izoelektrycznego natywnego białka DraE (pI=6,55) i w związku z tym może zachodzić anormalna migracja białek podczas rozdziału elektorofretycznego.

6.6. Immunoidentyfikacja białka DraE-epitop metodą ELISA z wykorzystaniem przeciwciał anty-epitop

W celu wstępnego sprawdzenia czy wprowadzona sekwencja epitopowa do białka DraE jest zdolna do oddziaływania z przeciwciałami anty-epitop, wykonano test pośredni ELISA. Na podłożu stałym unieruchomiono natywne białko DraE (kontrola doświadczenia) oraz chimeryczne białka DraE-epitop (DraE-ep1-SAG1, DraE-ep2-SAG1, DraE-ep3-SAG1, DraE-GRA1 oraz DraE-MAG1), a następnie dodawano poliklonalne przeciwciała anty-SAG1, anty-GRA1 lub anty-MAG1 uzyskane z surowicy królika immunnizowanego odpowiednimi białkami rekombinantowymi [Metody 5.14.2]. Wyniki przedstawiono na Rys. 36.





W wyniku przeprowadzonego testu ELISA z wykorzystaniem przeciwciał anty-epitop stwierdzono, że natywne białko DraE nie ma zdolności do oddziaływania z przeciwciałami anty-epitop. Skonstruowane białka DraE-ep1-SAG1 oraz DraE-ep2-SAG1 również nie wykazują zdolności do wiązania się ze specyficznymi przeciwciałami anty-SAG1. Spowodowane jest to najprawdopodobniej tym, że wprowadzone sekwencje epitopowe, zbudowane z

6 reszt amionkwasowych, są zbyt krótkie aby mogły wiązać przeciwciało. W przypadku pozostałych trzech białek zachodzi wyraźna reakcja z odpowiednimi przeciwciałami i dlatego tylko te trzy białka zostały wykorzystane do dalszych badań.

6.7. Badanie zdolności tworzenia struktur fimbrialnych przez białka DraE-epitop z wykorzystaniem metody Western blotting

W celu określenia zdolności skonstruowanych białek DraE-epitop do polimeryzacji i tworzenia struktury fimbrii przeprowadzono rozdział elektroforetyczny otrzymanych frakcji fimbrialnych bez wstępnej denaturacji termicznej w 15% żelu poliakrylamidowym, a następnie wykonano test Western blotting z wykorzystaniem przeciwciał anty-Dr (Rys. 37) [Metody 5.14.1].



Rys. 37. Wynik testu Western blotting z wykorzystaniem przeciwciał anty-Dr. M - Marker wielkości (Fermentas)

1 – 20 μl frakcji fimbrialnej komórek *E.coli* BL21(DE3)pCC90 po 10 min denaturacji próbki w 98°C

2 – 20 µl frakcji fimbrialnej komórek E.coli BL21(DE3)pCC90 bez denaturacji termicznej

3 – 20 µl frakcji fimbrialnej komórek *E.coli* BL21(DE3)pCC90D54stop-pDraE-GRA1 po 10 minutach denaturacji próbki w 98° C

4 – 20 μl frakcji fimbrialnej komórek *E.coli* BL21(DE3)pCC90D54stop-pDraE-GRA1 bez denaturacji termicznej

5 – 20 μl frakcji fimbrialnej komórek *E.coli* BL21(DE3)pCC90D54stop-pDraE-SAG1 po 10 minutach denaturacji próbki w 98°C

6 – 20 μl frakcji fimbrialnej komórek *E.coli* BL21(DE3)pCC90D54stop-pDraE-SAG1 bez denaturacji termicznej

7 – 20 μl frakcji fimbrialnej komórek *E.coli* BL21(DE3)pCC90D54stop-pDraE-MAG1 po 10 minutach denaturacji próbki w 98°C

8 – 20 μl frakcji fimbrialnej komórek *E.coli* BL21(DE3)pCC90D54stop-pDraE-MAG1 bez denaturacji termicznej

Natywne białko DraE tworzy bardzo stabilną strukturę fimbrii. Nawet po podgrzaniu próbki przez 10 minut w 98°C struktura fimbrii nie ulega całkowitemu zniszczeniu. Na przedstawionym zdjęciu widać wyraźnie sygnały pochodzące od dimerów, trimerów oraz multimerów białka DraE. W próbce niedenaturowanej termicznie monomeryczne białko DraE nie występuje. Natomiast w przypadku skonstruowanych chimerycznych białek DraE-epitop jedynie w przypadku białka DraE-GRA1 możliwe jest zaobserwowanie sygnałów pochodzących od dimerów, trimerów oraz tertramerów (brak sygnału od multimerów tego białka). W przypadku białek DraE-SAG1 oraz DraE-MAG1 nie zaobserwowano różnic między próbkami denaturowanymi oraz niedenaturowanymi, co może świadczyć o tym, że wprowadzone sekwencje epitopowe zakłócają proces polimeryzacji chimerycznego białka DraE w strukturę fimbrii lub struktury te są labilne i ulegają łatwo rozpadowi w czasie elektroforetycznego rozdziału lub pod wpływem SDS-u.

6.8. Badanie zdolności tworzenia struktur fimbrialnych przez białka DraE-epitop z wykorzystaniem metody sączenia molekularnego

Z tego względu, iż eksperyment w którym rozdzielano denaturowanane lub niedenaturowane termicznie próbki w żelu poliakrylamidowym nie był przeprowadzony w natywnych warunkach istniała możliwość, że chimeryczne fimbrie ulegały rozpadowi pod wpływem np. SDS-u zawartego w roztworach do elektroforezy poliakrylamidowej. Zatem w celu przeprowadzenia rozdziału frakcji fimbrialnej w warunkach natywnych, preparat białkowy poddano sączeniu molekularnemu na kolumnie Superdex 75 (Amersham) sprzężonej z aparatem HPLC firmy Merck-Hitachi. Na kolumnę jednorazowo nastrzykiwano 200 µl próby (do rozdziału używano buforu PBS). Otrzymane wyniki przedstawiono na rysunkach 38, 39, 40,41 i 42.


Rys. 38. Chromatogram przedstawiający zależność absorbancji (280 nm) od czasu retencji uzyskany dla frakcji fimbrialnej białka DraE dzikiego typu.



Rys. 39. Chromatogram przedstawiający zależność absorbancji (280 nm) od czasu retencji uzyskany dla frakcji fimbrialnej chimerycznego białka DraE-GRA1.



Rys. 40. Chromatogram przedstawiający zależność absorbancji (280 nm) od czasu retencji uzyskany dla frakcji fimbrialnej chimerycznego białka DraE-SAG1.



Rys. 41. Chromatogram przedstawiający zależność absorbancji (280 nm) od czasu retencji uzyskany dla frakcji fimbrialnej chimerycznego białka DraE-MAG1.

Wykorzystana do sączenia molekularnego kolumna Superdex 75 (Amersham) ma zdolność rozdzielczą do 75 kDa. W przypadku natywnych fimbrii typu Dr białko eluowane jest po czasie 16,00 minut (Rys. 38) co odpowiada martwej objętości kolumny. Z tego względu można wnioskować, że natywne białko DraE (o masie ok. 14,9 kDa) w warunkach natywnych polimeryzuje tworząc struktury o masie powyżej 75 kDa. W przypadku fimbrii typu DraE-GRA1 (Rys. 39) maksimum elucji następuje po 16,85 minuty co odpowiada masie białka około 70 kDa (wartość oszacowana na podstawie wykresu wzorcowego). Oszacowana masa białka DraE-GRA1, Ζ wykorzystaniem programy komputerowego Antheprot, wynosi ok. 15,5 kDa, tak więc w tym przypadku można wnioskować, że w warunkach natywnych białko DraE-GRA1 przybiera formę tetrameru. W przypadku fimbrii typu DraE-SAG1 otrzymujemy czas retencji wynoszący 17,51 minuty, czyli jest to najprawdopodobniej trimer lub dimer (Rys. 40). Natomiast w przypadku fimbrii typu Dr-MAG1 czas retencji wynosi 21,08 minuty co odpowiada elucji białka o masie około 16 kDa (Rys. 41). Wyniki te potwierdziły dane otrzymane w eksperymencie z wykorzystaniem metody Western blotting. Należy zwrócić również uwagę na fakt, że w przypadku białek DraE-MAG1 oraz DraE-SAG1 poziom absorbancji jest zdecydowanie niższy niż w przypadku białek DraE i DraE-GRA1, co również może świadczyć o lepszej zdolności do tworzenia struktur multimerycznych przez białko DraE-GRA1 w porównaniu do antygenów

DraE-MAG1 oraz DraE-SAG1. Wprowadzona sekwencja epitopowa zakłóca proces polimeryzacji fimbrii, a tym samym chimeryczne białka typu DraE-epitop nie są zdolne do stworzenia stabilnych struktur fimbrialnych tak jak białko dzikiego typu.

6.9. Badanie zdolności tworzenia struktur fimbrialnych przez białka DraE-epitop z wykorzystaniem mikroskopii immunofluorescencyjnej

Do badań imunofluorescencyjnych zostały wykorzystane hodowle bakteryjne *E. coli*:

- Ø szczepu BL21(DE3)pCC90, eksprymującego natywne fimbrie typu Dr (kontrola pozytywna);
- Ø szczepu BL21(DE3)pCC90D54stop/pDraE-epitop, eksprymującego chimeryczne fimbrie typu Dr-epitop;
- Ø szczepu BL21(DE3)pCC90D54stop nie eksprymującego fimbrii (kontrola negatywna).

Hodowle bakteryjne odpowiednich szczepów rozcieńczono w buforze PBS, a następnie inkubowano z pierwotnymi przeciwciałami anty-Dr oraz wtórnymi przeciwciałami anty-króliczymi znakowanymi fluorescencyjnie [Metody 5.14.3].





Rys. 42. Mikroskopia immunofluorescencyja komórek bakteryjnych *E. coli* szczepu BL21(DE3) zawierających plazmidy: A) pCC90, B) pCC90D54stop, C) pCC90D54stop/pDraE-GRA1, D) pCC90D54stop/pDraE-SAG1, E) pCC90D54stop/pDraE-MAG1, inkubowanych z przeciwciałami króliczymi anty-Dr i anty-króliczymi znakowanymi FITC. Prawa część panelu – światło widzialne, lewa - UV (powiększenie X 2500; mikroskop immunofluorescencyjny Olympus BX60).

Mikroskopia immunofluorescencyjna komórek bakteryjnych E. coli określonych szczepów eksprymujących natywne fimbrie Dr lub chimeryczne fimbrie DraE-epitop z użyciem pierwszorzędowych przeciwciał anty-Dr oraz drugorzędowych przeciwciał znakowanych FITC pozwoliła na stwierdzenie obecności białka DraE na powierzchni komórek bakteryjnych szczepu E. coli BL21(DE3)pCC90. Jednakże. w szczepach baktervinych E. coli BL21(DE3)pCC90D54stop/pDraE-epitop, eksprymujących chimeryczne fimbrie Dr-SAG1, DraE-MAG1 lub DraE-GRA1, stwierdzono sygnały różniące się od sygnału otrzymanego w przypadku fimbrii natywnych (Rys. 42). Potwierdza to wcześniej wysunięty wniosek, iż wprowadzone sekwecje epitopowe w znacznym stopniu zakłóciły proces polimeryzacji białka DraE.

6.10. Badanie zdolności adhezyjnych chimerycznych białek DraE-epitop do powierzchni komórek HeLa

Bakterie zaopatrzone w fimbrie Dr, zbudowane z adhezyny DraE, zdolne są do wiązania się z komórkami zawierającymi na swojej powierzchni receptor DAF. Zatem możliwe jest sprawdzenie czy wprowadzenie sekwencji epitopowej do adhezyny DraE nie powoduje hamowania wiązania się z tym receptorem komórkowym. Do badań adhezji na liniach komórkowych HeLa zostały wykorzystane hodowle bakteryjne *E. coli*:

- Ø szczepu BL21(DE3)pCC90, eksprymującego natywne fimbrie typu Dr (kontrola pozytywna);
- Ø szczepu BL21(DE3)pCC90D54stop/pDraE-epitop, eksprymującego chimeryczne fimbrie typu Dr-epitop;
- Ø szczepu BL21(DE3)pCC90D54stop nie eksprymującego fimbrii (kontrola negatywna).

Hodowle bakteryjne odpowiednich szczepów inkubowano z komórkami HeLa, a następnie dodano do komórek barwnika Giemsy [Metody 5.15.2].



Rys. 43. Mikrofotografia komórek HeLa inkubowanych z komórkami *E. coli* BL21(DE3) zawierającymi plazmid: A) pCC90, B) pCC90D54stop, C) pCC90D54stop/pDraE-GRA1, D) pCC90D54stop/pDraE-SAG1, E) pCC90D54stop/pDraE-MAG1. Powiększenie x 2500; mikroskop immunofluorescencyjny Olympus BX60, barwienie barwnikiem Giemsy.

W wyniku przeprowadzonego eksperymentu okazało się, że bakterie E. coli szczepu BL21(DE3)pCC90D54stop/DraE-epitop zachowują w bardzo niewielkim stopniu zdolność wiązania się z powierzchnią komórek HeLa. W porównaniu do komórek bakteryjnych eksprymujących natywne fimbrie typu Dr, które ulegają bardzo wydajnej adhezji, tylko nieliczne bakterie eksprymujące chimeryczne fimbrie uległy adhezji. Jest to kolejny dowód potwierdzający fakt, że wprowadzenie sekwencji epitopowej do adhezyny DraE w znacznym stopniu zakłóca proces biogenzy fimbrii. Jednakże, w dalszym ciągu możliwe jest oczyszczenie podjednostkowego białka DraE z powierzchni komórek E. coli szczepu BL21(DE3)pCC90D54stop/DraE-epitop. W celu sprawdzenia czy oczyszczone chimeryczne białko DraE nie utraciło zdolności wiązania się z komórkami HeLa wykorzystano oczyszczone frakcje fimbrialne pochodzące ze szczepów E. coli: BL21(DE3)pCC90 oraz BL21(DE3)pCC90D54stop/pDraEepitop. Następnie opłaszczano polistyrenowe kulki oczyszczonymi chimerycznymi białkami DraE. Jako kontrolę negatywną doświadczenia wykorzystano kulki polistyrenowe opłaszczone białkiem BSA [Metody 5.15.3].



Rys. 44 Mikrofotografia komórek HeLa inkubowanych z polistyrenowymi kuleczkami opłaszczonymi oczyszczoną frakcją fimbrialną szczepu *E. coli* BL21(DE3), zawierających plazmidy: A) pCC90, B) pCC90D54stop, C) pCC90D54stop/pDraE-GRA1, D) pCC90D54stop/pDraE-SAG1, E) pCC90D54stop/pDraE-MAG1 inkubowanych z przeciwciałami króliczymi anty-Dr i anty-króliczymi znakowanymi TRITC. Prawa część panelu – światło widzialne, lewa - UV (powiększenie X 2500; mikroskop immunofluorescencyjny Olympus BX60).

Przeciwnie w stosunku do badań przedstawionych powyżej, w których wykazano, że bakteryjne szczepy E. coli BL21(DE3)pCC90D54stop/pDraEepitop nie są w stanie stworzyć stabilnej struktury fimbrii o budowie zbliżonej do fimbrii natywnych, okazało się, że oczyszczone białka DraE-epitop nie straciły swojej zdolności adhezyjnej. Na przedstawionych zdjęciach wyraźnie widać komórki HeLa zwiazanymi swoiei powierzchni ze na kuleczkami polistyrenowymi, opłaszczonymi natywnym jak i chimerycznymi białkami DraE (Rys. 44). W przypadku białek DraE-SAG1 oraz DraE-GRA1 uzyskano identyczne wyniki jak w przypadku białka DraE dzikiego typu. Jedynie w przypadku białka DraE-MAG1 adhezja była nieco niższa. CO najprawdopodobniej było spowodowane prawie całkowitym brakiem zdolności polimeryzacyjnych tego białka. Te wyniki były podstawą do przeprowadzenia badań na zwierzętach dla oszacowania potencjału szczepionkowego badanych preparatów białek DraE-epitop.

6.11. Badanie skuteczności chimerycznych fimbrii Dr oraz białek rekombinantowych SAG1, MAG1 i GRA1 jako szczepionki

Pomimo, iż wprowadzenie epitopów antygenów SAG1, MAG1 oraz GRA1 *T. gondii* do białka DraE zakłóciło proces biogenezy fimbrii nadal możliwe jest wykorzystanie podjednostkowych białek fimbrialnych jako szczepionki przeciwko toksoplazmozie. Otrzymane preparaty chimerycznych fimbrii nie straciły swojej zdolności adhezyjnej, a także wyraźnie reagowały z przeciwciałami anty-epitop. W celu sprawdzenia skuteczności szczepionek opartych na chimerycznych fimbriach typu Dr niezbędne było przeprowadzenie doświadczeń na zwierzętach. Tylko takie badania mogły dać odpowiedź na pytanie czy chimeryczne fimbrie typu Dr-epitop pobudzą odpowiedź humoralną, a przede wszystkim komórkową immunizowanego organizmu.

6.11.1. Otrzymanie białek do szczepień zwierząt

Dodatkowo do szczepień jako kontrolę wykorzystano białka rekombinantowe SAG1, MAG1 oraz GRA1. Wykorzystując systemy ekspresyjne *E. coli* skonstruowane uprzednio w Katedrze Mikrobiologii PG [Hiszczyńska-Sawicka i wsp., 2003; Holec i wsp., 2007] otrzymano odpowiednie preparaty do szczepień. Antygeny rekombinantowe zawierały na N- i C-końcu sekwencje oligohistydynowe umożliwiając ich oczyszczanie z wykorzystaniem

chromatografii metalopowinowactwa. Z białek tych zostały również usunięte sekwencje domen transmembranowych oraz sekwecje sygnalne (Rys. 45).

Α

MHHHHHHSSG LVPRGSGMKE TAAAKFERQH MDSPDLGTDD DDKSPGFSST
 MAISDPEGGD NQSSAVSDRA SLFGLLSGGT GQGLGIGESV DLEMMGNTYR
 VERPTGNPDL LKIAIKASDG SYSEVGNVNV EEVIDTMKSM QRDEDIFLRA
 LNKGETVEEA IEDVAQAEGL NSEQTLQLED AVSAVASVVQ DEMKVIDDVQ
 QLEKDKQQLK DDIGFLTGER EGINSSSVDK LAAALEHHHH HH

В

1	MHHHHHHSSG	LVPRGSGMKE	TAAAKFERQH	MDSPDPPLVA	NQVVTCPDKK
51	STAAVILTPT	ENHFTLKCPK	TALTEPPTLA	YSPNRQICPA	GTTSSCTSKA
101	VTLSSLIPEA	EDSWWTGDSA	SLDTAGIKLT	VPIEKFPVTT	QTFVVGCIKG
151	DDAQSCMVTV	TVQARASSVV	NNVARCSYGA	DSTLGPVKLS	AEGPTTMTLV
201	CGKDGVKVPQ	DNNQYCSGTT	LTGCNEKSFK	DILPKLTENP	WQGNASSDKG
251	ATLTIKKEAF	PAESKSVIIG	CTGGSPEKHH	CTVKLEFAGA	AGSAKSAGIN
301	SSSVDKLAAA	LEHHHHHH			

С

1	MHHHHHHSSG	LVPRGSGMKE	TAAAKFERQH	MDSPDL <mark>SQRV</mark>	PELPEVESFD
51	EVGTGARRSG	SIATLLPQDA	GLYENSEDVA	VPSDSASTPS	YFHVESPSAS
101	VEAATGAVGE	VVPGCEERQE	QGDTTLSDHD	FHSGGTEGEG	LPETEVAHQH
151	ETEEQYGTEG	MPPPVLPPAP	VVHPRFIAVP	GPSVPVPFFS	LPDIHPDQVV
201	YILRVQGSGK	LAAALEHHHH	HH		

Rys. 45. Sekwencje aminokwasowe białek fuzyjnych. A) His₆-GRA1-His₆, B) His₆-SAG1-His₆, C) His₆-MAG1-His₆. Kolorem czarnym oznaczono sekwencję pochodzącą z wektora pUET1.

Ekspresję genów kodujących białka rekombinatowe SAG1, GRA1 i MAG1 w komórkach *E. coli* BL21(DE3)pLysS, zawierających odpowiednie plazmidy rekombinantowe (pUET1/SAG1, pUET1/GRA1 oraz pUET1/MAG1), przeprowadzono zgodnie z procedurą opisaną przez Hiszczyńską-Sawicką i wsp., (2003), z pewnymi modyfikacjami. Hodowlę startową inkubowano w 37°C (w przypadku szczepu produkującego białko MAG1 w 20°C) przez 18 godzin. Następnie 2 ml hodowli bakteryjnej odmładzano w 1000 ml pożywki płynnej LB zawierającej ampicylinę i chloramfenikol i hodowano w wytrząsarce w 37°C do uzyskania OD₅₉₅=0,2 (około 2 godzin), po czym dodawano IPTG do końcowego stężenia 1 mM. Po indukcji ekspresji prowadzano hodowlę przez noc (16 godzin), w temperaturze 37°C. Pobierano próbki hodowli bakteryjnej bezpośrednio przed indukcją, oraz 1, 2, 3, 4 i 16 godzin po indukcji. Próbki

przygotowywano wg standardowej procedury [Metody 5.9], a następnie rozdzielano elektroforetycznie w 12% żelu poliakrylamidowym w warunkach denaturujących [Metody 5.7.2] (Rys. 46).



Rys. 46. Rozdział elektroforetyczny lizatów bakteryjnych *E. coli* BL21(DE3) pLysS nadprodukujących rekombinantowe białka: A) His₆-MAG1-His₆, B) His₆-GRA1-His₆, C) His₆-SAG1-His₆.

- M marker wielkości (Sigma)
- 1 10µl lizatu komórek pobranych przed indukcją
- 2 10µl lizatu komórek pobranych 1 h po indukcji
- 3 10µl lizatu komórek pobranych 2 h po indukcji
- 4 10µl lizatu komórek pobranych 3 h po indukcji
- 5 10µl lizatu komórek pobranych 4 h po indukcji
- 6 10µl lizatu komórek pobranych 16 h po indukcji

Analiza otrzymanych elektroforogramów pozwoliła zoptymalizować produkcję białek rekombinantowych. Maksymalną produkcję białka GRA1 i SAG1 uzyskano w temperaturze 37°C po 16 godzinach od momentu indukcji, a w przypadku MAG1 w temperaturze 20°C również po 16 godzinach od momentu indukcji. Powyższe zoptymalizowane warunki prowadzenia hodowli zastosowano do wyprodukowania dostatecznej ilości białek rekombinantowych do szczepień.

Następnie białka His₆-SAG1-His₆, His₆-MAG1-His₆ oraz His₆-GRA1-His₆ oczyszczano z lizatów komórkowych, stosując chromatografię metalopowinowactwa na złożu Ni²⁺-IDA (His•Bind® Resin, firmy Novagen) [Metody 5.9]. Wyniki oczyszczania przedstawiono na rysunku 47. Otrzymano wysoko oczyszczone preparaty antygenów rekombinantowych, które zostały zastosowane do szczepień zwierząt.



Rys. 47. Rozdział elektroforetyczny w 12% żelu poliakrylamidowym (SDS-PAGE) białek zawartych we frakcjach uzyskanych podczas ekspresji i oczyszczania białka fuzyjnego. A) His₆-MAG1-His₆, B) His₆-GRA1-His₆, oraz C) His₆-SAG1-His₆.

- M marker wielkości (Sigma)
- 1 10μl lizatu komórek *E. coli* BL21(DE3) pLysS zawierających plazmid rekombinantowy pUET1/MAG1 lub pUET1/GRA1 lub pUET1/SAG1 przed indukcją
- 2 10µl lizatu komórek *E. coli* BL21(DE3) pLysS zawierających plazmid rekombinantowy pUET1/MAG1 lub pUET1/GRA1 lub pUET1/SAG1 pobranych 16 godzin po indukcji ekspresji IPTG
- 3 10µl frakcji białek zebranych po płukaniu buforem zawierającym 0,5 M imidazol

Czystość preparatów oszacowanych z wykorzystaniem systemu VersaDoc wynosiła 90-95%. Po zmierzeniu stężenia białka [Metody 5.13], oszacowano ilość poszczególnych białek rekombinantowych otrzymywanych z jednego litra hodowli bakteryjnej na ok. 55 mg dla białka MAG1, 45 mg dla białka GRA1 oraz 30 mg dla białka SAG1.

6.11.2. Immunizacja myszy oraz przeprowadzenie testu ELISA

Badania na zwierzętach zostały wykonane we współpracy z prof. H. Długońską z Uniwersytetu Łódzkiego. Do przeprowadzenia eksperymentu wybrano 42 myszy szczepu BALB/c, które podzielono na 6 grup (po 7 osobników). Myszy immunizowane były następującymi preparatami:

- grupa 1 PBS (grupa kontrolna);
- grupa 2 poliwalentny antygen natywnym TLA szczepu BK *T. gondii* (TLAvBK) z adiuwantem (grupa kontrolna);
- grupa 3 natywne fimbrie z adiuwantem;
- grupa 4 chimeryczne fimbrie DraE-SAG1 oraz DraE-GRA1 z adiuwantem;
- grupa 5 natywne fimbrie;
- grupa 6 chimeryczne fimbrie DraE-SAG1 oraz DraE-GRA1.

W pierwszym przeprowadzonym eksperymencie myszy otrzymały 3 dawki preparatów w odstępach 2 tygodni [Metody 5.16]. Pierwsza dawka (z kompletnym adiuwantem Freunda dla grup 3 i 4) była podawana do poduszek łap, podskórnie i dootrzewnowo. Do szczepienia zostały wykorzystane preparaty chimerycznych fimbrii typu DraE-SAG1 oraz DraE-GRA1, które otrzymano wg wcześniej opisanej procedury [Metody 5.11] (jednak bez strącania siarczanem amonu). Szacowana czystość preparatu wynosiła ok. 50%. Druga dawka (z niekompletnym adiuwantem Freunda dla grup 3 i 4) podana została podskórnie i dootrzewnowo, natomiast trzecia (również z niekompletnym adiuwantem Freunda dla grup 3 i 4) tylko dootrzewnowo. Niestety w wyniku szoku endotoksycznego trzy myszy z grupy 3 nie przeżyły pierwszej dawki szczepionki, z tego względu dwie kolejne dawki zostały dwukrotnie zmniejszone. Niestety po kolejnych dwóch dawkach padły jeszcze dwie myszy z grupy 3. Również do końca eksperymentu nie przeżyły dwie myszy z grupy 4.

Dwa tygodnie po ostatniej dawce szczepionki, od wszystkich myszy została pobrana krew i poddana analizie. Test wykonano z użyciem metody ELISA, w której płytki opłaszczono preparatem fimbrii typu Dr, preparatem chimerycznych fimbrii typu DraE-SAG1, preparatem chimerycznych fimbrii typu DraE-GRA1, białkiem rekombinantowym SAG1, białkiem rekombinantowym GRA1, poliwalentnym antygenem natywnym (TLAvBK) oraz lizatem komórek *E. coli* BL(21). Początkowo wszystkie uzyskane surowice zostały przetestowane w jednym rozcieńczeniu 1:100. Okazało się jednak, że reaktywność wielu surowic z niektórymi preparatami antygenowymi jest bardzo wysoka, dlatego wykonano

drugi test z surowicami o wysokim mianie w dwóch rozcieńczeniach: 1:1000 i 1:10000 [Metody 5.14.2]. Uzyskane wyniki przedstawiono na wykresach w postaci słupków, przy czym jeden słupek reprezentuje wartość absorbancji w reakcji jednej surowicy z danym preparatem antygenowym (Rys. 48, 49, 50, 51, 52, 53).





Surowcie pobrane po immunizacji preparatem PBS nie wykazują reaktywności z białkami rekombinantowymi SAG1 oraz GRA1, a także z lizatem *T. gondii* (TLAvBK). Jednakże należy zwrócić uwagę na stosunkowo wysoki poziom przeciwciał zawartych w surowicach przed immunizacją skierowanych na oczyszczone preparaty fimbrii typu DraE oraz DraE-SAG1 czy DraE-GRA1 (Rys. 48).



Rys. 49. Wynik testu ELISA surowic myszy grupy 2 traktowanych TLAvBK z adiuwantem. Kolorem niebieskim zaznaczono surowice pobrane od dwóch myszy z grupy 2 przed immunizacją. Kolorem czerwonym surowice pobrane 2 tygodnie po ostatniej immunizacji od 7 myszy z grupy 2. Kolorem żółtym zaznaczono surowicę pobraną od myszy zarażonej *T. gondii.* Kolorem zielonym zaznaczono tło rekacji.

Surowice pobrane od myszy z grupy 2 po ostatniej immunizacji bardzo silnie reagowały z lizatem TLAvBK oraz z białkami rekombinatowymi. Widoczna jest również (chociaż znacznie słabiej) reakcja tych surowic z preparatami chimerycznych fimbrii (Rys. 49).





Z grupy 3, myszy immunizowanych oczyszczonym preparatem fimbrii typu DraE, do końca eksperymentu przeżyły tylko dwa osobniki. Śmierć nastąpiła najprawdopodobniej w wyniku szoku endotoksycznego. Przy analizie wyników zwraca uwagę wysoki poziom reakcji przeciwciał zawartych w surowicach szczepionych myszy z preparatami fimbrii typu DraE-SAG1 i DraE-GRA1, porównywalny z preparatem fimbrii dzikiego typu (Rys. 50).



Rys. 51. Wynik testu ELISA surowic myszy grupy 4 traktowanych frakcją chimerycznych fimbrii DraE-epitop z adiuwantem. Kolorem niebieskim zaznaczono surowice pobrane od dwóch myszy z grupy 4 przed immunizacją. Kolorem jasnozielonym surowice pobrane 2 tygodnie po ostatniej immunizacji rozcieńczone 1:10000. Kolorem żółtym zaznaczono surowicę pobraną od myszy zarażonej *T. gondii.* Kolorem zielonym zaznaczono tło rekacji.

Badania przeprowadzone na surowicach pobranych od myszy z grupy 4 (szczepionych preparatem chimerycznych fimbrii) wykazały, że fimbrie typu Dr (natywne i chimeryczne) stymulują bardzo silną produkcję przeciwciał. W przypadku rozcieńczenia surowic 1:100 otrzymywano wyniki w granicach plateau. Z tego powodu wykonano drugi test, w którym wykorzystano rozcieńczenia surowic 1:10000. Mimo tak dużego rozcieńczenia otrzymano bardzo silny sygnał dla białek DraE oraz rekombinantowego białka GRA1 (dla białka SAG1 sygnał był również silny jednak nieco niższy). Niestety, mimo zastosowania niskiego rozcieńczenia surowic (1:100) nie zaobserwowano sygnału z TLAvBK (Rys. 51).



Rys. 52. Wynik testu ELISA surowic myszy grupy 5 traktowanych frakcją fimbrii DraE bez adiuwantem. Kolorem niebieskim zaznaczono surowice pobrane od dwóch myszy z grupy 5 przed immunizacją. Kolorem czerwonym surowice pobrane 2 tygodnie po ostatniej immunizacji od 7 myszy z grupy 5. Kolorem żółtym zaznaczono surowicę pobraną od myszy zarażonej *T. gondii.* Kolorem zielonym zaznaczono tło rekacji.

Surowice pobrane od myszy z grupy 5 (szczepionych fimbriami typu Dr bez adiuwantu) bardzo silnie zareagowały z preparatami chimerycznych i natywnych fimbrii typu Dr. Natomiast zgodnie z przewidywaniami reakcja z białkami rekombinantowymi SAG1 i GRA1 oraz z poliwalentnym antygenem natywnym (TLA) była stosunkowo niska (Rys. 52).



Rys. 53. Wynik testu ELISA surowic myszy grupy 6 traktowanych frakcją chimerycznych fimbrii DraE-epitop bez adiuwantem Kolorem niebieskim zaznaczono surowice pobrane od dwóch myszy z grupy 6 przed immunizacją. Kolorem czerwonym surowice pobrane 2 tygodnie po ostatniej immunizacji (tylko 3 myszy przeżyły) Kolorem jasnozielonym surowice pobrane 2 tygodnie po ostatniej immunizacji rozcieńczone 1:10000. Kolorem żółtym zaznaczono surowicę pobraną od myszy zarażonej *T. gondii.* Kolorem zielonym zaznaczono tło rekacji.

Na rysunku 53 przedstawiono poziom absorbancji w przeprowadzonym teście ELISA, w którym badano surowice pobrane od myszy z grupy 6 (szczepionych preparatem chimerycznych fimbrii bez adiuwantu) rozcieńczonych 1:10000. Zaobserwowano wysoki poziom reakcji z preparatami chimerycznych jak i natywnych fimbrii typu Dr, a także z białkami rekombinantowymi SAG1 oraz GRA1. Niestety nie zaobserwowano wyraźnej reakcji z preparatem TLAvBK.

Podsumowanie pierwszego eksperymentu na zwierzętach

Myszy odpowiadają bardzo silnie na immunizację zarówno fimbriami jak i poliwalentnym antygenem natywnym (TLAvBK). Zgodnie z oczekiwaniami surowice od myszy kontrolnych, którym podawano PBS reagują bardzo słabo z antygenami rekombinantowymi, TLAvBK i lizatem E. coli szczepu BL(21)DE3 (przygotowanym w analogiczny sposób jak białka rekombinantowe). Natomiast wykazuja reaktywność w stosunku do fimbrii. Najprawdopodobniej spowodowane jest to obecnością innych białek E. coli w preparacie opłaszczonym na mikropłytkach. Podczas oczyszczania frakcji fimbrialnej (bez strącania siarczanem amonu) białko DraE stanowi ok. 50% uzyskanego preparatu. Resztę stanowia inne powierzchniowe białka bakteryjne. Prawdopodobnie przeciwciała skierowane na białka E. coli były obecne w krwi myszy przed eksperymentem.

Surowice od myszy immunizowanych TLAvBK w teście ELISA reagują z TLA immobilizowanym na płytce, ale również z antygenami rekombinantowymi GRA1 i SAG1. W przypadku naturalnych zarażeń myszy obserwowuje się silniejszą reakcję z antygenem SAG1 eksponowanym na powierzchni tachyzoitów. W przeprowadzonym eksperymencie surowice reagują silniej z antygenem GRA1, co można było przewidzieć biorąc pod uwagę, że TLAvBK stanowi lizat komórek zawierający głównie białka wydzielnicze. Myszy immunizowane fimbriami odpowiadają silnie na ten antygen, przy czym immunizacja z adiuwantem stymuluje silniejszą produkcję przeciwciał. Równocześnie surowice od myszy immunizowanych fimbriami z epitopami rozpoznają antygeny rekombinantowe, ale nieoczekiwanie nie reagują z TLAvBK. Zwraca uwagę wysoka reaktywność z lizatem kontrolnym *E. coli* BL(21)DE3, jednak reakcja z antygenami rekombinantowymi (zwłaszcza GRA1) wydaje się zdecydowanie wyższa.

W przypadku surowic myszy immunizowanych chimerycznymi fimbriami z epitopami (bez adiuwantu) obserwuje sie bardzo wysoka odpowiedź na sam fimbrii, niemniej jednak reaktywność z antygen preparatami fimbrii zawierajacymi epitopy wydaje W sie nieco wyższa. arupie myszy immunizowanych fimbriami z epitopami i adiuwantem produkcja przeciwciał była tak silna, że nawet przy rozcieńczeniu surowic 1:10000 uzyskuje się wartości w granicach plateau. W tym przypadku także można zauważyć, że surowice te reagują trochę wyżej z chimerycznymi fimbriami niż z natywnymi. Wydaje się, że surowice rozpoznają lepiej epitopy GRA1 w obrębie fimbrii DraE i reakcja z preparatem DraE-GRA1 jest nieco wyższa niż z DraE-SAG1. Prawdopodobnie spowodowane jest to tym, że białko DraE-GRA1 jest w stanie polimeryzować, tworząc struktury o większej masie cząsteczkowej. Wpływ na poziom reakcji może mieć także dobór epitopów, które są eksponowane na powierzchni chimerycznych białek DraE.

Surowice myszy immunizowanych natywnymi fimbriami reagują ze wszystkimi preparatami fimbrii, ale najsilniej w układzie homologicznym (czyli z natywnymi fimbriami).

6.11.3. Immunizacja myszy i zarażenie *T. gondii* szczepem DX

Wyniki pierwszego eksperymentu na zwierzętach pokazały, że frakcje fimbrialne podawane zwierzętom powinny być lepiej oczyszczone. Otrzymane frakcje fimbrialne bez strącania siarcznem amonu o czystości ok. 50% okazały się zbyt toksyczne dla zwierząt (liczne padnięcia myszy w czasie eksperymentu). Dlatego do drugiego eksperymentu zostały przygotowane preparaty o większej czystości (70%- 80%). Użyto 42 myszy szczepu C3H/HeJ (bardziej odpornego na endotoksyny), podzielonych na 5 grup, którym podawano:

- grupa 1 PBS (grupa kontrolna) (8 osobników);
- grupa 2 poliwalentny antygen natywny TLA szczepu BK *T. gondii* (TLAvBK) z adiuwantem (grupa kontrolna) (8 osobników);
- grupa 3 natywne fimbrie z adiuwantem (8 osobników);

- grupa 4 chimeryczne fimbrie DraE-SAG1, DraE-MAG1oraz DraE-GRA1 z adiuwantem (9 osobników);
- grupa 5 białka rekombinantow SAG1, MAG1 oraz GRA1 z adiuwantem (9 osobników).

Podobnie jak w pierwszym eksperymencie myszy otrzymały 3 dawki preparatów w odstępach 2 tygodni przy zastosowaniu takiej samej procedury szczepień. Następnie po upływie 4 tygodni myszom została pobrana krew, a następnie po 2 dniach zostały zarażone dootrzewnowo pasożytem *T. gondii* szczepu DX (szczep cystotwórczy). Pierwszy eksperyment wykazał, że odpowiedź z adiuwantem ma taki sam profil jak w przypadku szczepień bez adiuwantu, ale jest zdecydowanie silniejsza. Dlatego w drugim eksperymencie immunizowano zwierzęta tylko preparatami z adiuwantem.

Niestety również w tym wypadku preparat okazał się zbyt toksyczny chociaż nie było konieczności zmniejszania dawki. Jedynie myszy z grupy 5 przeżyły po wszystkich dawkach szczepień i zarażeniu pasożytem. W przypadku myszy z grupy 3 jeden osobnik padł po drugiej dawce szczepionki oraz 3 po trzeciej dawce szczepionki. Trochę bardziej odporne były myszy z grupy 4, dwie padły po trzeciej dawce szczepionki i następne dwie po zarażeniu pasożytem. Również padła jedna mysz z grupy 2 i cztery myszy z grupy 1. Jednakże w przypadku tych dwóch grup były to padnięcia przypadkowe związane ze złą reakcję na eter stosowany przy pobieraniu krwi.

Celem tego eksperymentu było stwierdzenie czy szczepionka oparta na chimerycznych fimbriach jest w stanie ochronić mysz przed zarażeniem cystotwórczym szczepem pasożyta. Dlatego po wszystkich szczepieniach myszy były zarażane pasożytem, a następnie zabijane i sprawdzano ilość cyst utworzonych przez pasożyta w mózgu myszy (Tab. 5).

Nr grupy	Immunizacja preparatem		llość	ć cyst w	/ykryta	w móz	gach p	oszcze	gólnyc	h mysz	у
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	średnia
1	PBS/FA	242	524	201	169	-	-	-	-		284
2	TLA/FA	6	12	7	13	8	17	11	-		11
3	DraE-SAG1+DraE- GRA1+DraE-MAG1/FA	267	179	67	136	-	-	-	-	-	162
4	DraE/FA	119	220	236	184	364	-	-	-		225
5	SAG1+GRA1+MAG1 /FA	46	37	7	19	13	60	59	23	6	30

Tabela 5. llość cyst wytworzonych przez *T. gondii* w mózgach immunizowanych myszy.

Podsumowanie drugiego eksperymentu

Podobnie jak w pierwszym eksperymencie tak i w drugim myszy odpowiadają bardzo silnie na immunizację zarówno fimbriami jak i poliwalentnym antygenem natywnym (TLAvBK). U wszystkich zwierząt (oprócz grupy 1) stwierdzono dużo wyższe miano przeciwciał niż w pierwszym eksperymencie. Spowodowane to było tym, że immunizowane myszy szczepu C3H/HeJ były dużo bardziej odporne na zawarty w preparatach LPS od myszy BALB/c, a tym samym mogły być immunizowane większą dawką szczepionki. Ponadto, preparat chimerycznych fimbrii, którym szczepiono myszy był dużo czystszy w porównaniu do preparatu użytego w pierwszym eksperymencie. Profil powstałych przeciwciał był identyczny jak w pierwszym eksperymencie. Surowice od myszy immunizowanych TLAvBK w teście ELISA reagują z TLA immobilizowanym na płytce, ale również z antygenami rekombinantowymi GRA1, MAG1 i SAG1. Natomiast myszy immunizowane fimbriami z epitopami podobnie jak w przypadku pierwszego eksperymentu rozpoznają odpowiednie antygeny rekombinantowe, ale bardzo słabo reagują z TLAvBK. Okazało się, że preparaty do immunizacji, mimo większej czystości zawierały nadal endotoksyny wywołujące niekorzystne efekty uboczne. Wszystkie myszy po trzeciej immunizacji zarówno preparatem natywnych fimbrii, jak również chimerycznych fimbrii, wyglądały na bardzo osłabione, a część z nich zarażana pasożytem *T. gondii* szczepem cystotwórczym DX, który nie jest zjadliwy, padła. Z tych powodów mało prawdopodobne jest wykorzystanie preparatów chimerycznych fimbrii jako szczepionki. Otrzymanie preparatu czystszego i pozbawionego endotoksyn jest bardzo czaso- i pracochłonne co niweluje jedną z zalet potencjalnych szczepionek opartych na chimerycznych fimbriach jaką jest, łatwość otrzymania. Trzeba również zaznaczyć, że drugi eksperyment wykonywany był na myszach szczepu C3H/HeJ, które są bardziej odporne na endotoksyny, natomiast docelowy eksperyment miał być wykonywany na myszach szczepu C57BL/6, bardzo wrażliwego na endotoksyny.

Porównująć ilość cyst wytworzonych przez pasożyta w mózgach immunizowanych myszy można stwierdzć, że w przypadku grupy kontrolnej ilość ta wahała się od 169 do 524 (średnio 284). W przypadku myszy, którym podano preparat natywnych fimbrii średnia ilość cyst zmniejszyła się do 225 Natomiast w przypadku myszy immunizowanych chimerycznymi fimbriami ilość ta zmniejszyła się do 162. Wyniki te jednak są zdecydowanie niezadowalające. Z jednej strony obserwujemy spadek ilości cyst, ale jest on generalnie niski, nie jest statystycznie znaczący. Występuje zbyt duża rozbieżność otrzymanych wyników (od 67 do 267), aby można mówić o znaczących właściwościach protekcyjnych chimerycznych fimbrii. Zdecydowanie lepsze wyniki otrzymano w przypadku myszy z grup 2 oraz 5, które immunizowano odpowiednio preparatem TLA oraz mieszanką antygenów rekombinantowych. W tych przypadkach otrzymaliśmy powtarzalne wyniki i średnie wartości 11 cyst w przypadku myszy immunizowanych TLA oraz 30 cyst w przypadku myszy immunizowanych mieszanką antygenów rekombinantowych. Tak wiec szczepionka oparta nie na chimerycznych fimbriach, ale na rekombinantowych białkach antygenowych okazała się dużo bardziej skuteczna. Jednakże trzeba zwrócić uwagę, że wszytkie preparaty podawane były razem z adiuwantem Freunda co w znacznym stopniu poprawiło ich właściwości immunoprotekcyjne.

6.12. Próba uzyskania preparatów fimbrialnych DraE-epitop o wysokim stopniu polimeryzacji

Wyboru sekwencji VAKTRGQLTDA występującej w białku DraE, którą zastępowano sekwencją epitopową pochodzącą z antygenów *T. gondii* dokonano na podstawie danych literaturowych oraz komputerowej analizy sekwencji białka. W trakcie wykonywanych badań została opublikowana

struktura krystaliczna adhezyny DraE [Andreson i wsp., 2004]. Dzięki temu możliwe było bardziej racjonalne wybranie miejsca wprowadzenia epitopu. Okazało się, że trzy pierwsze reszty aminokwasowe z wymienianej sekwencji domeny 2 należą do jednej z β harmonijek białka DraE. Taka lokalizacja insercji mogła być przyczyną niskiego stopnia polimeryzacji chimerycznych fimbrii DraE-epitop. W celu ewentualnego poprawienia stopnia polimeryzacji badanych chimerycznych fimbrii postanowiono skonstruować dwa nowe szczepy rekombinantowe *E. coli* produkujące białka DraE z przesuniętą wymienianą sekwencją (Rys. 54).



Rys. 54. Porównanie miejsca wstawienia sekwencji epitopowej w białku DraE. Kolorem zielonym zaznaczono wymienianą sekwencję w białkach: A) DraE-epitop, B) DraE-epitop-nowe.

Całą procedurę klonowania przeprowadzno w analogiczny sposób jak opisano to wcześniej. Fragmenty DNA kodujące N- i C-końcową część białka adhezyny DraE uzyskano metodą PCR [Metody 5.2]. Do reakcji amplifikacji użyto DNA plazmidu rekombinantowego pBJN406. Startery wykorzystane do reakcji PCR [Materiały 4.9] umożliwiły wprowadzenie następujących sekwencji epitopowych: sekwencja pochodząca z białka antygenowego SAG1 KSFKDILPKLTGS oraz sekwencja DTMKSMQRDEDGS pochodząca z antygenu GRA1 *T. gondii.* Sekwencje epitopowe były odpowiednio o 4 i 3 reszty aminokwasowe krótsze w porównaniu do wcześniejszych konstruktów tak, aby

białko DraE-epitop-nowy miało ilość chimeryczne identyczna reszt aminokwasowych jak białko DraE dzikiego typu. Sekwencje te wprowadzono zamiast fragmentu kodującego 13 reszt aminokwasowych (TRGQLTDAAPIGP) N-końcowej powierzchniowo eksponowanej domeny 2 białka adhezyny DraE – przesunięcie o trzy reszty aminokwasowe. W przedstawionych sekwencjach kolorem niebieskim epitopowych zaznaczono resztv aminokwasowe pochodzące od wprowadzonego miejsca rozpoznania dla restryktazy BamHI (GS).

W wyniku reakcji amplifikacji otrzymano fragmenty DNA kodujące Nkońcową część białka DraE o wielkości 210 pz (Rys. 55). Do produktu PCR na końcu 5' wprowadzone zostało miejsce rozpoznania dla restryktaz KpnI i Ndel, a na końcu 3' sekwencja kodująca determinantę antygenową białka SAG1 lub GRA1 *T. gondii* oraz miejsce rozpoznania dla restryktazy BamHI.

Kpnl Ndel cggcgcggta cccatatgaa aaaattagcg atcatggccg cggccagcat ggtgttcgcc gtgagctccg cgcatgctgg gttcaccccg agtggcacca ccggcaccac caaactcaca gttaccgaag agtgccaggt accgggttggt gacctgaccg tggctaagaa atcgttcaaa gatattttgc caaaattatc sekwencja kodująca epitop białka SAG1 tggatcctat

В

	Kpnl	Ndel			
1	<u>cggcgc<mark>ggta</mark></u>	<u>cc</u> catatgaa	aaaattagcg	atcatggccg	cggccagcat
51	ggtgttcgcc	gtgagctccg	cgcatgctgg	gttcaccccg	agtggcacca
101	ccggcaccac	caaactcaca	gttaccgaag	agtgccaggt	acgggttggt
151	gacctgaccg	tggctaag ga	tactatgaaa	agcatgcaga	gggacgagga
			sekwencja	kodująca epitop b	iałka GRA1
201	<u>cggatcc</u> ata				
	BamHI				

Rys. 55. Sekwencje nukleotydowe produktów PCR otrzymanych w wyniku reakcji amplifikacji fragmentu genu *draE* kodującego N-końcową część adhezyny DraE z wprowadzonymi sekwencjami kodującymi epitop: A) SAG1, B) GRA1. Podkreślono sekwencje pochodzące ze starterów, a w nich kolorem zielonym zaznaczono sekwencje komplementarne do matrycy; kolor czerwony i niebieski wskazują miejsca rozpoznania dla odpowiednich enzymów restrykcyjnych; pogrubiono sekwencję kodującą odpowiednie epitopy.

Otrzymano również fragment DNA kodujący C-końcową część białka DraE o wielkości 318 pz. W wyniku reakcji amplifikacji do produktu PCR na końcu 5' została wprowadzona sekwencja zawierająca miejsce rozpoznania dla restryktazy BamHI, a na końcu 3' miejsce rozpoznania dla restryktaz EcoRI i HindIII (Rys. 56).

BamHI

1 agcggatccg tcaccgtgca agcgctggga tgcgacgcc gccaggtcgc 51 gttgaaggca gacaccgata acttcgaaca gggcaagttc ttcctgatca 101 gcgacaacaa tagggataag ctctatgtca atatacggcc tacggataac 151 tccgcctgga cgaccgacaa tggtgtcttc tacaaaaacg atgtcgggag 201 ctggggtgga attatcggga tctacgtaga tgggcaacaa acgaacacac 251 cgcccggcaa ctacacactg accctgaccg ggggttactg ggcaaaatga 301 gaattcaagc ttcctcgc EcoRI HindII

Rys. 56. Sekwencja nukleotydowa produktu PCR otrzymanego w wyniku reakcji amplifikacji fragmentu genu *draE* kodującego C-końcową część białka DraE. Podkreślono sekwencje pochodzące ze starterów, a w nich kolorem zielonym zaznaczono sekwencje komplementarne do matrycy; kolor czerwony i niebieski wskazują miejsca rozpoznania dla odpowiednich enzymów restrykcyjnych.

6.12.1. Konstrukcja DNA plazmidu rekombinantowego pDraE-GRA1N oraz pDraE-SAG1N

W wyniku przeprowadzonych analogicznych do wcześniej opisywanych doświadczeń skonstruowano dwa ekspresyjne plazmidy rekombinantowe pDraE-epitopN (pDraE-SAG1N oraz pDraE-GRA1N, o wielkościach 5755 pz), zawierające sekwencję genu kodującego białko DraE z wprowadzoną sekwencją kodującą odpowiedni epitop SAG1 lub GRA1, znajdującego się pod kontrolą fagowego promotora T7 (Rys. 57 i 58).

GGA	TCG	AGA	TC	GAT	CTC	GAT	CCCG	GCGI	AA	г <u>та</u>	ATA	.CG2	ACI	pr CA	omo .CT2	otor ATA	T7 – GG <u>G</u>	→ ¦GA <i>I</i>	ATT	GT(GA	
GCG	la GAT	с ор ААС	erat 'AA'	or FTC(<u>-</u> 2CC'	ГСТИ	AGAA	ATA	AT:	TTT	GTT	TAZ	ACI	TT	AA	GAA	<i>rbs</i> GGA	. <u>G</u> A1	TAT	N AC2	del AT	
1-Dra ATG	aE – AAA	→ AAA	TT	AGC	GAT	CAT	GGCC	<u>CG</u> CG	GC	CAG	CAT	GG.	ГGІ	TC	GC	CGT	GAG	CTC	CCG	CG	CA	
М	Κ	Κ	L	А	I	М	A	А	A	S	M	7	J	F	Α	V	S	c.	3	A	Η	
TGC' A	TGG G	GTT F	'CA(CGA P	GTG(S (GCAC G I	CAC	CCG(C (GCA G	CCA T	.CCA T	AAA K	LCT	CA	CAG' F	TTA V	.CCC T	GAA E	GA(E	GΤ	
GCC.	AGG	TAC	GGG	← 2 GTT(2 -Dr a	a E-S / GAC	AG-n CTGA	owy	GTG	GCT	sek AAG	wei G <mark>A</mark> /	ncja AAT	a ep 'CG	oito TTC	pow CAA	a ar AGA	ntyg TAT	enu TTT	I SA TG(G1	
С	Q	V	R	V	G	D	L	Т	V	A	K	ŀ	C	S	F	K	D)]		L		
	ልልጥ	ጥልጥ	ירידנ	GA	TCC	3-Di	aE-n ⊾⊂⊂c	owy	→ ∆∆r	<u> </u>	CTC	GGI	ልጥር	rca	ACO	200	rqr		аст	CG	٦Ċ	
P :	K	L	S	G	S	V	T	V	Q	A	L	G	C	1	D	A	R	Q	V	i i	A 1	[
AAG K	GCA A	GAC D	ACC T	CGA: D	TAA N	CTT(F	CGAA E	ACAG Q	GGG	CAA K	GTI F	CT	ГСС ŗ	TG L	AT(I	CAG S	CGA D		ACA J	ATZ N	AGG R	

D K L Y V N I R P T D N S A W T T D N G GTCTTCTACAAAAACGATGTCGGGAGCTGGGGTGGAATTATCGGGATCTACGTAGATGGG V F Y K N D V G S W G G I I G I Y V D G ← 4-DraE CAACAAACGAACACCGCCCGGCAACTACACACTGACCCTGACCGGGGGTTACTGGGCA Q T N T P P G N Y T L T L Т G G 0 ΥW Α stop EcoRI AAA**TGA**GAATTCGCGGCCGCACTCGAGCACCACCACCACCACCACCACTGAGATCCGGCTGCT AACAAAGCCCGAAAGGAAGCTGAGTTGGCTGCTGCCACCGCTGAGCAGTAACTAGCATAA **Terminator T7** CCCCTTGGGGCCTCTAAACGGGTCTTGAGGGGTTTTTTG

Rys. 57. Sekwencja nukleotydowa i aminokwasowa fragmentu plazmidu ekspresyjnego pDraE-SAG1N w rejonie insercji genu kodującego białko adhezyny DraE z sekwencją epitopową białka SAG1. Kolor czerwony - sekwencja nukleotydowa i aminokwasowa wprowadzonegoepitopu antygenu SAG1.

GGA'	ГСGА	AGAI	ſĊĠ₽	ATC:	ГСG	ATC	CCG	CGA	AAA	TAZ	ATA	pro CGAC	mot CTC	or T7 ACT2	$7 \rightarrow ATA$	GGG	GAA	TT(GTG	A
GCG	lac Gat <i>i</i>	cope AAC	eratoi AATT	r <u>CCC</u> (CCT	CTA	GAA	ATA	ATT	TTC	TT:	ΓΑΑΟ	ĊTT	TAA	<u>gaa</u>	<i>rbs</i> GGA	<u>G</u> AI	TAT	Nd ACA	el T
1-Dra	aE→	• • • • • •			л m a ·	۵۳۵	aaa						1 mm		200	a 7 a			700	7
M	AAAA K	K	L	A	I	M	A A	<u>GCC</u> A	A	S S	M	V	F	A CGC0 A	V	GAG	5 5	S I	LGC A	A H
TGC' A	TGG(G	GTT(F	CACC T	CCC(P	GAG' S	TGG G	CAC T	CAC ' I	CCGO C G	GCAC ; 7	CA(CCAF F F	AAC' C	TCA(L	CAG T	TTA V	ICCO T	BAA(E	GAG E	Т
GCC C (AGG: Q V	ГА <u>СС</u> Л F	GGGI ? 7	\leftarrow TTG(7 (2-Dr GTG2 G 1	aE-S	SAG TGA L	-nov .CCC T	vy GTGC V	GCTA A	Sek AG K	wenc GATA D	ija e ACT. T	e pito ATGI M	рож ААА К	a ar AGC S	ntyg 'ATC M	enu SCA(Q	GR GAG R	A1 G
GAC D	GAG(E	GACC D	G G	rcc <u>(</u> S	GTC2 V	3-[ACC T	DraE GTG V	-no CAP Q	My — AGCO A	→ GCTC L	GGG2 G	ATG(C	CGA D	CGC(A	CCG R	CC.			•••	
CGA T 1	ACA(N 7	CACO F E	CGCC P I	CCG(p (GCAJ G 1	ACT. N	ACA Y	.CAC T	CTGA L	ACCC T	CTG2 L	A <u>CCC</u> T	← GGG(G	4-Dr GGT G	aE TAC Y	TGG W	GCA A	AAZ K	sto ATG	ор <u>А</u>
E GAA	coRI	J	. <u>CT</u>	AGCZ	ATA	ACC	CCT	TGG	GGGC	CCTC	Ter TAZ	mina AACC	itor ⁻ GGG'	Г7 ГСТ'	ΓGA	GGG	GTI	TT	ΓTG	-

Rys. 58. Sekwencja nukleotydowa i aminokwasowa fragmentu plazmidu ekspresyjnego pDraE-GRA1N w rejonie insercji genu, kodującego białko adhezyny DraE z sekwencją epitopową białka GRA1. Kolor czerwony - sekwencja nukleotydowa i aminokwasowa wprowadzonego epitopu antygenu GRA1. Skonstruowane plazmidy rekombinantowe pDraE-epitopN umożliwiają uzyskanie dwóch białek chimerycznych DraE-SAG1-nowy oraz DraE-GRA1-nowy. Białka te zbudowane są ze 160 reszt aminokwasowych, a punkty izoelektryczne wynoszą odpowiednio 8,51 oraz 5,30 (Rys. 59).

Α

1 MKKLAIMAAA SMVFAVSSAH AGFTPSGTTG TTKLTVTEEC QVRVGDLTVA
51 KKSFKDILPK LSGSVTVQAL GCDARQVALK ADTDNFEQGK FFLISDNNRD
101 KLYVNIRPTD NSAWTTDNGV FYKNDVGSWG GIIGIYVDGQ QTNTPPGNYT
151 LTLTGGYWAK

В

1 MKKLAIMAAA SMVFAVSSAH AGFTPSGTTG TTKLTVTEEC QVRVGDLTVA 51 KDTMKSMQRD EDGSVTVQAL GCDARQVALK ADTDNFEQGK FFLISDNNRD 101 KLYVNIRPTD NSAWTTDNGV FYKNDVGSWG GIIGIYVDGQ QTNTPPGNYT 151 LTLTGGYWAK

Rys. 59. Sekwencja aminokwasowa białka DraE z wprowadzoną sekwencją epitopową antygenów *T. gondii*: A) SAG1, B) GRA1. Podkreślono sekwencję sygnalną, kolorem niebieskim oznaczono pierwszy aminokwas w dojrzałych białkach, zielonym wprowadzoną sekwencję epitopową.

Porównanie sekwencji aminokwasowej otrzymanych chimerycznych białek DraE-SAG1-nowy oraz DraE-GRA1-nowy z sekwencjami aminokwasowymi otrzymanych wcześniej białek DraE-SAG1 oraz DraE-GRA1 przedstawiono na rysunku 60.

А



Rys. 60. Porównanie sekwencji aminokwasowej fragmentów białek: A) DraE, DraE-SAG1 i DraE-GRA1, B) DraE, DraE-SAG1-nowy i DraE-GRA1-nowy. Kolorem zielonym zaznaczono wymienianą sekwencję w pierwszych konstruktach, czerwonym wymienianą sekwencję przesuniętą o trzy reszty aminokwasowe w kolejnych konstruktach, niebieskim kolorem podkreślono wprowadzaną krótszą sekwencję epitopową do białek DraE-SAG1-nowy oraz DraE-GRA1-nowy.

6.12.2. Ekspresja genu kodującego chimeryczne fimbrie typu DraEepitop-nowy

Ekspresję genów kodujących nowe chimeryczne fimbrie (DraE-SAG1nowy, DraE-GRA1-nowy) przeprowadzono w sposób analogiczny jak dla uprzednio opisanych fimbrii DraE-epitop [Materiały 4.2; Metody 5.10 i 5.11].

Uzyskane lizaty komórek bakteryjnych rekombinantowych szczepów *E. coli* BL21(DE3)pCC90D54stop/pDraE-epitopN poddano analizie w 15% żelu poliakrylamidowym w warunkach denaturujących (Rys. 61) [Metody 5.7.2].



Rys. 61. Rozdział elektroforetyczny białek zawartych we frakcjach całkowitych lizatów komórek *E. coli* BL21(DE3) w 15% żelu polikarylamidowym

1 - 10µl lizatu komórek *E.coli* BL21(DE3)pCC90

2 - 10µl lizatu komórek E.coli BL21(DE3)pCC90D54stop/pDraE-SAG1N

3 - 10µl lizatu komórek E.coli BL21(DE3)pCC90D54stop/pDraE-GRA1N

Na podstawie przeprowadzonej elektroforezy białek całkowitych lizatów komórek *E. coli* BL21(DE3)pCC90D54stop/pDraE-epitopN, w warunkach denaturujących stwierdzono wysoki poziom produkcji fimbrialnych, nowych białek DraE-SAG1N oraz DraE-GRA1N.

6.12.3. Badanie zdolności tworzenia struktur polimerycznych przez białka DraE-epitop-nowe z wykorzystaniem metody Western blotting

W celu oszacowania zdolności polimeryzacyjnych białek DraE-SAG1nowy oraz DraE-GRA1-nowy, przeprowadzono elektroforezę próbek całkowitych lizatów komórek *E. coli* BL21(DE3)pCC90D54stop/pDraE-epitopN w warunkach denaturujacych w 15% żelu poliakrylamidowym, bez wstępnej denaturacji [Metody 5.7.2]. Następnie wykonano elektrotransfer rozdzielonych białek na błonę nitrocelulozową [Metody 5.14.1].



Rys. 62. Wynik testu Western blotting z wykorzystaniem przeciwciał anty-Dr.

- M marker wielkości (Fermentas):
- 1 15 μl lizatu komórek *E. coli* BL21(DE3)pCC90D54stop (kontrola negatywna);
- 2 15μl lizatu komórek *E. coli* BL21(DE3)pCC90D54stop/pDraE-SAG1N pobranych 16h po indukcji – próbka niedenaturowana termicznie;
- 3 15μl lizatu komórek *E. coli* BL21(DE3)pCC90D54stop/pDraE-GRA1N pobranych 16h po indukcji – próbka niedenaturowana termicznie;
- 4 15µl lizatu komórek *E. coli* BL21(DE3)pCC90 (kontrola pozytywna) próbka niedenaturowana termicznie;

Podobnie jak we wcześniejszych eksperymentach wprowadzenie sekwencji epitopowej pochodzącej z antygenów pasożyta *T. gondii* do białka DraE nie zniosło reaktywności epitopów z przeciwciałami anty-Dr. Jednakże, białka DraE-SAG1-nowe i DraE-GRA1-nowe wykazały brak tworzenia się jakichkolwiek struktur multimetrycznych, co było nieoczekiwane ze względu na przesunięcie sekwencji wymienianej, dokładnie w pętle domeny 2 białka DraE.

6.12.4. Badanie zdolności tworzenia struktur fimbrialnych przez białka DraE-epitop-nowy z wykorzystaniem metody sączenia molekularnego

W celu sprawdzenia zdolności chimerycznych białek DraE-epitop-nowy do tworzenia struktur polimerycznych i porównania uzyskania wyników z wynikami otrzymanymi w przypadku białek DraE-epitop, preparat białkowy poddano sączeniu molekularnemu na kolumnie Superdex 75 (Amersham) sprzężonej z aparatem HPLC firmy Merck-Hitachi. Otrzymane wyniki przedstawiono na poniższym wykresie (Rys. 63).



Rys. 63. Nałożone trzy chromatogramy przedstawiające zależność absorbancji (280 nm) od czasu retencji, uzyskane dla frakcji fimbrialnej białka DraE dzikiego typu (kolor zielony), dla frakcji fimbrialnej chimerycznego białka DraE-GRA1 (kolor czerwony) oraz dla frakcji fimbrialnej chimerycznego białka DraE-GRA1-nowy (kolor niebieski).

W przypadku nowo otrzymanych fimbrii typu DraE-GRA1-nowy czas elucji wynosił 17,00 minut, jednak na przedstawionym chromatografie wyraźnie widać, że zdecydowanie więcej białka eluowane jest w późniejszym czasie. Na podstawie tego doświadczenia stwierdzono, że nowo otrzymane białko DraE-GRA1-nowe ma zdecydowanie gorsze zdolności do polimeryzacji niż białko DraE-GRA1.

W przypadku białka DraE-SAG1N nie udało się otrzymać frakcji fimbrialnej według standardowej metody oczyszczania fimbrii. Prawdopodobnie struktura tego białka została zakłócona w stopniu uniemożliwiającym jego transport na powierzchnię komórki bakteryjnej.

W związku z tym, że przesunięcie wymienienej sekwencji w białku DraE dzikiego typu nie poprawiło, a wręcz pogorszyło zdolności polimeryzacyjne chimerycznych białek DraE, zaprzestano dalszych doświadczeń z wykorzystaniem szczepów bakteryjnych produkujących chimeryczne białka DraE-GRA1-nowy oraz DraE-SAG1-nowy.

7. Podsumowanie i wnioski końcowe

Przeprowadzone badania dotyczyły otrzymania chimerycznych fimbrii typu Dr zawierających epitopy białek antygenowych (SAG1, MAG1 i GRA1) pasożyta T. gondii, a następnie ocenienia ich przydatności jako szczepionki W przeciwko toksoplazmozie. konstrukcji chimerycznych białek podjednostkowych fimbrii najważniejsze jest odpowiednie dobranie wprowadzanej sekwencji epitopowej, która z jednej strony powinna silnie stymulować układ odpornościowy immunizowanego organizmu, a z drugiej nie zakłócać zdolności białka DraE do polimeryzowania w długie fimbrie. W przypadku otrzymanych w tej pracy konstruktów stwierdzono, iż wprowadzane sekwencje epitopowe hamowały proces biogenezy fimbrii. Prawdopodobnie jedną z przyczyn tego była zmiana punktu izoelektrycznego otrzymanych białek w porównaniu do białka DraE dzikiego typu. Epitopy antygenowe posiadają zdefiniowaną sekwencję aminokwasową i z tego powodu nie ma możliwości wprowadzania jakichkolwiek zmian w jej obrębie tej sekwencji. Na podstawie uzyskanych wyników stwierdzono, że wytypowanie sekwencji epitopowej, która nie zmieniałaby charakteru fizyko-chemicznego i strukturalnego białka podjednostkowego fimbrii, a także nie zakłócała procesu jego polimeryzacji jest skomplikowane. Również racjonalne wybranie miejsca insercji sekwencji epitopowej, na podstawie struktury krystalicznej białka DraE nie wpłynęło na poprawę zdolności polimeryzacyjnych chimerycznych białek DraE.

Jednakże, mimo znacznego zakłócenia procesu biogenzy fimbrii, polegającego na obniżeniu zdolności polimeryzacyjnych białek DraE-epitop, w dalszym ciągu możliwe było oczyszczenie chimerycznych fimbrii w stosunkowo dużych ilościach. Dzięki temu, a także dzięki zachowanej zdolności chimerycznych białek do wiązania się z receptorami DAF znajdującymi się na powierzchni komórek HeLa, możliwe było wykorzystanie otrzymanych przeprowadzonych immunizacji W preparatów do myszy. wyniku eksperymentów okazało się, że chimeryczne białka DraE-epitop bardzo silnie stymulują układ odpornościowy immunizowanych zwierząt. Jednakże po przebadaniu surowic tych zwierząt stwierdzono bardzo wysokie miano przeciwciał skierowanych na białko DraE, natomiast niski poziom produkcji przeciwciał skierowanych na wprowadzone epitopy. Znacznie lepsze własności

immunizacyjne wykazały zastosowane do szczepień białka rekombinantowe SAG1, MAG1 i GRA1 T. gondii. Ponadto, oczyszczone preparaty fimbrii były bardzo toksyczne dla zwierząt. W przypadku myszy szczepu BALB/c, którym podano preparaty chimerycznych, bądź natywnych fimbri z adiuwantem Freuda widoczne były wyraźne efekty uboczne (ogólne osłabienie, wypadanie sierści, śmierć) już po pierwszej dawce szczepionki. Dalsze badania na myszach z wykorzystaniem szczepu C3H/HeJ wykazały, że preparaty chimerycznych fimbrii nie posiadają znaczących własności protekcyjnych u immunizowanych zwierząt. Dużo lepsze wyniki otrzymano dla rekombinantowych białek podawanych razem z adiuwantem. Wyniki wykonanych eksperymentów wyraźnie wskazują na słabe zdolności chimerycznych białek podjednostkowych DraE-epitop do polimeryzacji w strukturę fimbrii oraz słabe właściwości protekcyjne. Dyskwalifikuje to chimeryczne fimbrie jako potencjalne szczepionki przeciwko zarażeniom T. gondii. Poszukiwanie skutecznej szczepionki anty-T. *gondii* powinno być w przyszłości nakierowane na wykorzystanie odpowiednich mieszanek antygenów rekominantowych pasożyta lub szczepionki DNA.

8. Dorobek naukowy. Nagrody i wyróżnienia

<u>Publikacje</u>

- Hiszczyńska-Sawicka, E., Kur, J., Pietkiewicz, H., Holec, L., Gąsior, A., Myjak P. 2005. Efficient production of the *Toxoplasma gondii* GRA6, p35 and SAG2 recombinant antigens and their applications in the serodiagnosis of toxoplasmosis. *Acta Parasitologica*. 50:249-254.
- Holec, L., Hiszczyńska-Sawicka, E., Gąsior, A., Brillowska-Dąbrowska, A., Kur, J. 2007. Use of MAG1 recombinant antigen for detection of *Toxoplasma* gondii infection in humans. *Clin Vac Immunol*. 14:220-225.
- 3) Długońska, H., Gatkowska, J., Kur, J., **Gąsior, A**. Szczepionki przeciw toksoplazmozie aktualny stan badań *Wiad. Parazytol*. (w druku):
- Holec, L., Gąsior, A., Brillowska-Dąbrowska, A., Kur, J. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay using different fragments of recombinant microneme protein 1 (MIC1) of *Toxoplasma gondii* for detection of immunoglobulin G antibodies (manuskrypt publikacji w recenzji).
- 5) Gatkowska, J., **Gasior, A**., Kur, J., Długońska, H. *Toxoplasma gondii*: chimeric Dr fimbriae as a recombinant vaccine against toxoplasmosis (manuskrypt publikacji w recenzji).

Doniesienia zjazdowe związane z tematyką pracy

- Gąsior, A., Hiszczyńska-Sawicka, E., Holec, L., Kur, J. Chimeryczne fimbrie typu Dr-SAG1 – potencjalna szczepionka przeciwko toksoplazmozie. I Polski Kongres Genetyki (Gdańsk, 6-9 IX 2004) ISBN:83-920827-2-0.
- Gąsior, A. Ekspresja chimerycznych fimbrii typu Dr-SAG1 na powierzchni komórek bakteryjnych *Escherichia coli.* Sesja Sprawozdawcza Studium Doktoranckiego przy Wydziale Chemicznym Politechniki Gdańskiej. (Gdańsk, 23-24 IX 2004) ISBN:83-919081-3-5.
- Gąsior, A., Holec, L., Piątek, R., Zalewska, B., Bury, K., Mróz, M., Kur, J. Chimeric Dr fimbriae with a GRA1 *Toxoplasma gondii* epitope – construction of a potential vaccine. II Ogólnopolska Konferencja pt. Biotechnologia Molekularna (Gdańsk, 14-15 X 2005) ISBN:83-922424-1-6.
- Gąsior, A. Konstrukcja i ekspresja chimerycznych fimbrii typu Dr-epitop na powierzchni komórek bakteryjnych *Escherichia coli* – potencjalna szczepionka przeciwko toksoplazmozie. Sesja Sprawozdawcza Studium Doktoranckiego przy Wydziale Chemicznym Politechniki Gdańskiej. (Gdańsk, 22-23 IX 2005) ISBN:83-922424-0-8.

- Gąsior, A. Konstrukcja i wstępna ocena użyteczności szczepionek przeciwko toksoplazmozie opartych na chimerycznych fimbriach typu Dr z epitopami antygenów SAG1, GRA1 MAG1 *Toxoplasma* gondii Sesja Naukowa Doktoranci Politechniki Gdańskiej dla Gospodarki Innowacyjnej Regionu (Gdańsk, 9 XI 2006) ISBN:83-922424-5-9.
- Gąsior, A. Konstrukcja i wstępna ocena użyteczności szczepionek przeciwko toksoplazmozie opartych na chimerycznych fimbriach typu Dr z epitopami antygenów SAG1, GRA1 MAG1 *Toxoplasma* gondii Sesja Sprawozdawcza Studium Doktoranckiego przy Wydziale Chemicznym Politechniki Gdańskiej (Gdańsk, 25-26 IX 2006) ISBN:83-922424-3-2.

Pozostałe doniesienia zjazdowe

- Holec, L., Hiszczyńska-Sawicka, E., Gąsior, A., Kur, J. Rekombinantowe antygeny *Toxoplasma gondii* – oszacowanie przydatności w immunodiagnostyce. I Polski Kongres Genetyki (Gdańsk, 6-9 IX 2004). ISBN:83-920827-2-0.
- Holec, L., Hiszczyńska-Sawicka, E., Gąsior, A., Kur, J. Konstrukcja bakteryjnych systemów ekspresyjnych do produkcji rekombinantowych białek antygenowych (SAG4, ROP1, GRA2) *Toxoplasma gondii* do immunodiagnostyki. XXV Jubileuszowy Zjazd Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów. (Bydgoszcz, 23-25 IX 2004) 2004. 43 (Supl. 1):120.
- Holec, L., Hiszczyńska-Sawicka, E., Gąsior, A., Kur, J. Rekombinantowe białko antygenowe MAG1 *Toxoplasma gondii* – zastosowanie w różnicowaniu fazy toksoplazmozy. I Konferencja Naukowa Komitetu Mikrobiologii PAN pt. W.J.H. Kunicki-Goldfinger mikrobiolog – filozof – mistrz (Warszawa, 22 X 2005). *Postępy mikrobiologii* 2004. 43 (Supl. 1): 332.
- Holec, L., Gąsior, A., Zalewska, B., Piątek, R., Bury, K., Mróz, M., Kur, J. Construction of expression systems and production of *Toxoplasma gondii* recombinant antigens (MIC3, GRA4, GRA9) for the serodiagnosis of toxoplasmosis. II Ogólnopolska Konferencja pt. Biotechnologia Molekularna (Gdańsk, 14-15 X 2005) ISBN:83-922424-1-6.
- Bury, K., Zalewska, B., Piątek, R., Mróz, M., Holec, L., Gąsior, A., Kur, J. Construction and analysis of DraE-AfaE-III hybrids – identification of amino acids responsible for different motphological structures. II Ogólnopolska Konferencja pt. Biotechnologia Molekularna (Gdańsk, 14-15 X 2005) ISBN:83-922424-1-6.
- Zalewska, B., Piątek, R., Bury, K., Mróz, M., Holec, L., Gąsior, A., Kur, J. Display of Pk epitope of Simian Virus 5 by chimeric Dr fimbriae – construction of a potential vaccine. II Ogólnopolska Konferencja pt. Biotechnologia Molekularna (Gdańsk, 14-15 X 2005) ISBN:83-922424-1-6.

- Piątek, R., Zalewska, B., Bury, K., Mróz, M., Holec, L., Gąsior, A., Kur, J. Analysis of interaction between DraD invasin and DraE adhesin encoded by a *dra* gene cluster of uropathogenic *E. coli* Dr⁺ strain. II Ogólnopolska Konferencja pt. Biotechnologia Molekularna (Gdańsk, 14-15 X 2005) ISBN:83-922424-1-6.
- Mróz, M., Piątek, R., Zalewska, B., Bury, K., Holec, L., Gąsior, A., Kur, J. Fimbriae biogenesis – study of interaction between DraE adhesin, DraD invasin and usher DraC. II Ogólnopolska Konferencja pt. Biotechnologia Molekularna (Gdańsk, 14-15 X 2005) ISBN:83-922424-1-6.

Nagrody i wyróżnienia

 Nagroda im. Prof. W. Kunickiego-Goldfingera za najlepszą pracę (pod tytułem: "Rekombinantowe białko antygenowe MAG1 *Toxoplasma gondii* – zastosowanie w różnicowaniu faz toksoplazmozy") podczas I Konferencji Naukowej Komitetu Mikrobiologii Polskiej Akademii Nauk pt. W.J.H. Kunicki-Goldfinger mikrobiolog – filozof – mistrz, dla zespołu badawczego: Holec, L., Hiszczyńska-Sawicka, E., Gąsior, A., Kur, J. (Warszawa, 22 X 2005).

Wnioski grantowe

Opisywane badania były częściowo finansowane przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego w ramach projektu grantowego własnego p. "Otrzymanie chimerycznych fimbrii typu Dr-SAG1, Dr-ROP9, Dr-GRA1 i ich zastosowanie do produkcji fimbrialnych szczepionek przeciwko toksoplazmozie" nr 2P06K02428.

9. Opis stosowanych skrótów

AIDS	zespół nabytego niedoboru odporności (ang. acquired immunodeficiency syndrome)
ang.	z angielskiego
ATP	adenozynotrifosforan
BSA	albumina osocza krwi bydlęcej (ang. Bovine Serum Albumin)
Da	Dalton
DAB	3,3' diaminobenzydyna
DNA	kwas deoksyrybonukleinowy
EDTA	sól sodowa kwasu etylenodiaminotetraoctowego
ELIFA	test immunofiltracyjny (ang. Enzyme-Linked Immunofiltration Assay)
ELISA	test immunoenzymatyczny (ang. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)
FITC	izotiocyjanian fluoresceiny (ang. Fluorescein isothiocyanate)
gr.	z greckiego
HSP	białko szoku termicznego (ang. Heat-Shock Protein)
IFN	Interferon
lg	immunoglobulina
IL	Interluekina
IPTG	izopropylo-β-D-tiogalaktozyd
ISAGA	test aglutynacji immunoabsorbcyjnej (ang. Immunosorbent Agglutination Assay)
м	stężenie molowe [mol/dm ³]
MCS	miejsce wielokrotnego klonowania (ang. Multyply Cloning Site)
МНС	główny układ zgodności tkankowej (ang. Major Histocompatibility Complex)
PCR	łańcuchowa reakcja polimerazy (ang. Polymerase Chain Reaction)
pz	par zasad
SDS	sól sodowa siarczanu dodecylu
SDS-PAGE	elektrofreza w żelu poliakrylamidowym w warunkach denaturujących z użyciem SDS (ang. SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis)
RBS	miejsce wiązania RNA (ang. RNA Binding Site)
RNA	kwas rybonukleinowy
Тс	limfocyt T cytotoksyczny
TCR	receptor limfocytu T (ang. T Cell Receptor)
Th	limfocyt T pomocniczy
TLA	poliwalentny antygen natywny (ang. Toxoplasma Lysate Antigen)
TNF	czynnik martwicy nowotworu (ang. Tumor Necrosis Factor)
Tris	tris[hydroksymetylo]aminometan
TRITC	izocyjanian tetrametylorodaminy (ang. Tetramethylrhodamine isothiocyanate)
X-Gal	5-bromo-4-chloro-3-indolilo-β-D-galaktopiranozyd

10. Literatura

- 1. Ajioka, J.W., Fitzpatrick, J.M., Reitter, C.P. 2001. *Toxoplasma gondii* genomics: shedding light on pathogenesis and chemotherapy. *Expert Rev Mol Med.* 6:1-19.
- 2. Aline, F., Bout, D., Amigorena, S., Roingeard, P., Dimier-Poisson, I. 2004. *Toxoplasma gondii* antigen-pulsed-dendritic cell-derived exosomes induce a protective immune response against *T. gondii* infection. *Infect Immun.* 72:4127-37.
- Anderson, K.L., Billington, J., Pettigrew, D., Cota, E., Simpson, P., Roversi, P., Chen, H.A., Urvil, P., du Merle, L., Barlow, P.N., Medof, M.E., Smith, R.A., Nowicki, B., Le Bouguenec, C., Lea, S.M., Matthews, S. 2004. An atomic resolution model for assembly, architecture, and function of the Dr adhesins. *Mol Cell*. 15:647-57.
- 4. Asa, P.B., Cao, Y., Garry, R.F. 2000. Antibodies to squalene in Gulf War syndrome. *Exp Mol Pathol.* 68:55-64.
- Aubert, D., Maine, G.T., Vllena, I., Hunt, J.C., Howward, L., Sheu, M., Brojanac, S., Chovan, LE., Nowlan, S.F., Pinon, J.M. 2000. Recombinant Antigens To detect *Toxoplasma gondii*-Specific Immunoglobulin G and Immunoglobulin M in Human Sera by Enzyme Immunoassay. *J. Clin. Microb.* 38:1144-1150.
- 6. Bakker, D., van Zijderveld, F.G., van der Veen, S., Oudega, B., de Graaf, F.K. 1990. K88 fimbriae as carries of heterologus antigenic determinants. *Microb. Pathog.* 8:343-352.
- 7. Beazley, D.M., Egerman, R.S. 1998. Toxoplasmosis. Semin Perinatol. 22:332-338.
- Beghetto, E., Spadoni, A., Buffolano, W., Del Pezzo, M., Minenkova, O., Pavoni, E., Pucci, A., Cortese, R., Felici, F., Gargano, N. 2003. Molecular dissection of the human B-cell response against *Toxoplasma gondii* infection by lambda display of cDNA libraries. *Int J Parasitol.* 33:163-73.
- 9. Beghetto, E., Nielsen, H.V., Del Porto, P., Buffolano, W., Guglietta, S., Felici, F., Petersen, E., Gargano, N. 2005. A combination of antigenic regions of *Toxoplasma gondii* microneme proteins induces protective immunity against oral infection with parasite cysts. *J Infect Dis.* 191:637-45.
- Berger, C.N., Billker, O., Meyer, T.F., Servin, A.L., Kansau, I. 2004. Differential recognition of members of the carcinoembryonic antigen family by Afa/Dr adhesins of diffusely adhering *Escherichia coli* (Afa/Dr DAEC). *Mol Microbiol*. 52:963-83.
- 11. Biemans, R., Grégoire, D., Haumont, M., Bosseloir, A., Garcia, L., Jacquet, A., Dubeaux, C., Bollen, A. 1998. The conformation of purified *Toxoplasma gondii* SAG1 antigen, secreted from engineered *Pichia pastoris*, is adequate for serorecognition and cell proliferation. *J Biotechnol.* 66:137-46.
- 12. Bitkowska, E., Dzbeński, T.H. 1989. Wykrywanie krążącego antygenu Toxoplasma gondii metodą dot Elisa. Wiad. Parazytol. 35:283-242.
- 13. Black, M. W, Boothroyd, J. C. 2000. Lytic Cycle of *Toxoplasma gondii. Microb. Mol. Biol. Rev.* 64:607-623.
- 14. Bonhomme, A., Bouchot, A., Pezzella, N., Gomez, J., Le Moal, H., Pinon, JM. 1999. Signaling during the invasion of host cells by *Toxoplasma gondii*. *FEMS Microbiol Rev*. 23:551-61.

- 15. Boothroyd, J.C. 1993. Population biology of *Toxoplasma*: clonality, virulence, and speciation (or not). *Infect Agents Dis.* 2:100-2.
- 16. Boothroyd, J.C., Hehl, A., Knoll, L.J., Manger, I.D. 1998. The surface of *Toxoplasma*: more and less. *Int. J. Parasitol.* 28:3-9.
- 17. Buxton D., 1993. Toxoplasmosis: the first commercial vaccine. *Parasitol. Today.* 9:335-337.
- Caetano, B.C., Bruña-Romero, O., Fux, B., Mendes, E.A., Penido, M.L., Gazzinelli, R.T. 2006. Vaccination with replication-deficient recombinant adenoviruses encoding the main surface antigens of *Toxoplasma gondii* induces immune response and protection against infection in mice. *Hum Gene Ther.* 17:415-26.
- 19. Carnoy, C., Moseley, S.L. 1997. Mutational analysis of receptor binding mediated by the Dr family of *Escherichia coli* adhesins. *Mol Microbiol*. 23:365-79.
- Caramello, P. 2001. Atlas of Medical Parasytology. Carlo Denegri Foundation, Turino [on-line].
- 21. Carruthers, V.B., Sibley, L.D. 1999. Mobilization of intracellular calcium stimulates microneme discharge in *Toxoplasma gondii*. *Mol Microbiol*. 31:421-8.
- 22. Cesbron-Delauw, M.F., Guy, B., Torpier, G., Pierce, R.J., Lenzen, G., Cesbron, J.Y., Charif, H., Lepage, P., Darcy, F., Lecocq, J.P. 1989. Molecular characterization of a 23-kilodalton major antigen secreted by *Toxoplasma gondii*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 86:7537-41.
- Chow, P.Y., Fasman, G.D., 1978. Prediction of the secondary structure of proteins from their amino acid sequence. Adv. Enzymol. 47:45–57.
- Cong, H., Gu, Q.M., Jiang, Y., He, S.Y., Zhou, H.Y., Yang, T.T., Li, Y., Zhao, Q.L. 2005. Oral immunization with a live recombinant attenuated *Salmonella typhimurium* protects mice against *Toxoplasma gondii*. *Parasite Immunol*. 27:29-35.
- Cornelissen, A.W., Schetters, T.P. 1996. Vaccines against protozoal diseases of veterinary importance. FEMS Immunol Med Microbiol. 15:61-72.
- Coursaget, P., Yvonnet, B., Relyveld, E.H., Barres, J.L., Diop-Mar, I., Chiron, J.P. 1986. Simultaneous administration of diphtheria-tetanus-pertussis-polio and hepatitis B vaccines in a simplified immunization program: immune response to diphtheria toxoid, tetanus toxoid, pertussis, and hepatitis B surface antigen. *Infect Immun.* 51:784-7.
- Darcy, F., Deslee, D., Santoro, F., Charif, H., Auriault, C., Decoster, A., Duquesne, V., Capron, A. 1988. Induction of a protective antibody-dependent response against toxoplasmosis by in vitro excreted/secreted antigens from tachyzoites of *Toxoplasma gondii*. *Parasite Immunol*. 10:553-67.
- 28. Darde, M.L. 2004. Genetic analysis of the diversity in *Toxoplasma gondii. Ann Ist Super Sanita*. 40:57-63.
- Darji, A., zur Lage, S., Garbe, A.I., Chakraborty, T., Weiss, S. 2000. Oral delivery of DNA vaccines using attenuated *Salmonella typhimurium* as carrier. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 27:341-9.
- Das, M., Hart-Van Tassell, A., Urvil, PT., Lea, S., Pettigrew, D., Anderson, K.L., Samet, A., Kur, J., Matthews, S., Nowicki, S., Popov, V., Goluszko, P., Nowicki, B.J. 2005. Hydrophilic domain II of *Escherichia coli* Dr fimbriae facilitates cell invasion. *Infect Immun.* 73:6119-26.
- 31. Dabrowski, S., Kur, J. 1999. Cloning, overexpression, and purification of the recombinant His-tagged SSB protein of *Escherichia coli* and use in polymerase chain reaction amplification. *Protein Expr Purif.* 16:96-102.
- 32. Di Cristina, M., Del Porto, P., Buffolano, W., Beghetto, E., Spadoni, A., Guglietta, S., Piccolella, E., Felici, F., Gargano, N. 2004. The *Toxoplasma gondii* bradyzoite antigens BAG1 and MAG1 induce early humoral and cell-mediated immune responses upon human infection. *Microbes Infect.* 6:164-71.
- 33. Dimier-Poisson, I., Aline, F., Bout, D., Mevelec, M.N. 2006. Induction of protective immunity against toxoplasmosis in mice by immunization with *Toxoplasma gondii* RNA. *Vaccine* 24:1705-9.
- 34. Długońska, H. i Dytnerska, K. 1999. Antygeny *Toxoplasma gondii. Wiad. Parazytol.* 45:473-480.
- 35. Długońska, H. 2000. Odporność w zarażeniachwywoływanych przez Toxoplasma gondii. Post. Hig. Med. Dośw. 54:53-65
- Długońska, H. 2004. Molecular modifications of host cells by Toxoplasma gondii Pol J Microbiol 53 Suppl:45-54.
- 37. Długońska, H. 2005. Inwazyjność i wewnątrzkomórkowe pasożytnictwo *Toxoplasma* gondii. Wiad parazytol. 51:213-217.
- 38. Dubey, J.P., Beattie, C.P. 1988. Toxoplasmosis of animals and man. *Boca Raton, FL*: CRC Press.
- Dubey, J.P., Baker, D.G., Davis, S.W., Urban, J.F., Shen S.K. 1994. Persistence of immunity to toxoplasmosis in pigs vaccinated with a nonpersistent strain of *Toxoplasma gondii. Am J Vet Res.* 55:982-7.
- 40. Dubey, J.P. 1998. Advances in the life cycle of *Toxoplasma gondii*. Int J Parasitol. 28:1019-24.
- 41. Dubey, J.P., Lindsay D.S., Speer, C.A. 1998. Structures of *Toxoplasma gondii* tachyzoites, bradyzoites and sporozoites and biology and development of tissue cysts. *Clin. Microb. Rev.* 11:267-299.
- 42. Duquesne, V., Auriault, C., Darcy, F., Decavel, J.P., Capron, A. 1990. Protection of nude rats against *Toxoplasma* infection by excreted-secreted antigen-specific helper T cells. *Infect Immun.* 58:2120-6.
- Duquesne, V., Auriault, C., Gras-Masse, H., Boutillon, C., Darcy, F., Cesbron-Delauw, M.F., Tartar, A., Capron, A. 1991. Identification of T cell epitopes within a 23-kD antigen (P24) of *Toxoplasma gondii*. *Clin Exp Immunol*. 84:527-34.
- 44. Dymowska, Z., Zielińska, E. 1976. Badania nad udziałem pasożyta Toksoplasma gondii w powstawaniu wad wrodzonych. Ped. Pol. 1043-1048.
- 45. Dytnerska, K., Stączek, P., Długońska, H. 2004. Toxoplasma gondii kosmopolityczny pasożyt o małym zróżnicowaniu genetycznym. *Post Mikrobiol* 43:141-154.
- 46. Esteban-Redondo, I., Innes, E.A., 1997. *Toxoplasma gondii* infection in sheep and cattle. *Comp. Immun. Microbiol. Infect. Dis.* 20:191-196.
- Fachado, A., Rodriguez, A., Angel, S.O., Pinto, D.C., Vila, I., Acosta, A., Amendoeira, R.R., Lannes-Vieira, J. 2003 Protective effect of a naked DNA vaccine cocktail against lethal toxoplasmosis in mice. *Vaccine*. 21:1327-35.

- 48. Ferguson, D.J., Parmley, S.F. 2002. *Toxoplasma gondii* MAG1 protein expression. *Trends Parasitol.* 18:482.
- 49. Ferguson, D.J. 2004. Use of molecular and ultrastructural markers to evaluate stage conversion of *Toxoplasma gondii* in both the intermediate and definitive host. *Int J Parasitol.* 34:347-60.
- 50. Flamand, V., Sornasse, T., Thielemans, K., Demanet, C., Bakkus, M., Bazin, H., Tielemans, F., Leo, O., Urbain, J., Moser, M. 1994. Murine dendritic cells pulsed in vitro with tumor antigen induce tumor resistance in vivo. *Eur J Immunol.* 24:605-10.
- 51. Flohe, S.B., Bauer, C., Flohe, S., Moll, H. 1998. Antigen-pulsed epidermal Langerhans cells protect susceptible mice from infection with the intracellular parasite *Leishmania major. Eur J Immunol.* 28:3800-11.
- 52. Gamble, H.R., Andrews, C.D., Dubey, J.P., Webert, D.W., Parmley, S.F. 2000. Use of recombinant antigens for detection of *Toxoplasma gondii* infection in swine. *J Parasitol.* 86:459-62.
- Garcia, J.L., Gennari, S.M., Navarro, I.T., Machado, R.Z., Sinhorini, I.L., Freire, R.L., Marana, E.R., Tsutsui, V., Contente, A.P., Begale, L.P. 2005. Partial protection against tissue cysts formation in pigs vaccinated with crude rhoptry proteins of *Toxoplasma gondii*. Vet Parasitol. 129:209-17.
- 54. Gazzinelli, R.T. 1996. Molecular and cellular basis of interleukin 12 activity in prophylaxis and therapy against infectious diseases. *Mol Med Today*. 2:258-67.
- 55. Goluszko, P., Popov, V., Selvarangan, R., Nowicki, S., Pham, T., Nowicki, B. 1997. Dr fimbriae operon of uropathogenic *Escherichia coli* mediate microtubule-dependent invasion to the HeLa epithelial cell line. *J. Inf. Dis.* 176:158-167.
- 56. Goluszko, P., Goluszko, E., Nowicki, B., Nowicki, S., Popov, V., Wang, H.Q. 2005. Vaccination with purified Dr Fimbriae reduces mortality associated with chronic urinary tract infection due to *Escherichia coli* bearing Dr adhesin. *Infect Immun.* 73:627-31.
- 57. Gołąb, E. 1995. Wykrywanie DNA *Toxoplasma gondii* w płynach ustrojowych metodą PCR. *Wiad. Parazytol.* 40:13-18.
- 58. Gołąb, E. 1996. Zastosowanie reakcji łańcuchowej polimerazy (PCR) do diagnostyki toksoplazmozy. *Med. Dośw. Mikrobiol.* 48:189-200.
- Gross, U., Bohne, W., Soēte, M., Dubremetz, J.F. 1996. Development Differentiation between Tachyzoites and Bradyzoites of *Toxoplasma gondii*. Parasitol. *Today*. 12:30-33.
- 60. Hammar, M., Bian, Z., Normark, S. 1996. Nucleator-dependent intercellular assembly of adhesive curli organelles in *Escherichia coli. Proc Natl Acad Sci U S A.* 93:6562-6.
- Harning, D., Spenter, J., Metsis, A., Vuust, J., Petersen, E. 1996. Recombinant Toxoplasma gondii surface antigen 1 (P30) expressed in *Escherichia coli* is recognized by human *Toxoplasma*-specific immunoglobulin M (IgM) and IgG antibodies. *Clin Diagn Lab Immunol.* 3:355-7.
- Hasan, R.J., Pawelczyk, E., Urvil, P.T., Venkatarajan, M.S., Goluszko, P., Kur, J., Selvarangan, R., Nowicki, S., Braun, W.A., Nowicki, B.J. 2002. Structure-function analysis of decay-accelerating factor: identification of residues important for binding of the *Escherichia coli* Dr adhesin and complement regulation. *Infect Immun.* 70:4485-93.

- 63. Hiszczynska-Sawicka, E., Brillowska-Dabrowska, A., Dabrowski, S., Pietkiewicz, H., Myjak, P., Kur, J. 2003. High yield expression and single-step purification of *Toxoplasma gondii* SAG1, GRA1, and GRA7 antigens in *Escherichia coli. Protein Expr Purif.* 27:150-7.
- 64. Holec, L., Hiszczynska-Sawicka, E., Gasior, A., Brillowska-Dabrowska, A., Kur, J. 2007. Use of MAG1 recombinant antigen for diagnosis of *Toxoplasma gondii* infection in humans. *Clin Vaccine Immunol*. 14:220-5.
- 65. Hopp, T.P., Woods, K.R., 1981. Prediction of protein antigenic determinants from amino acid sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 78:3824–3828.
- 66. Ivory, C., Chadee, K. 2004. DNA vaccines: designing strategies against parasitic infections. *Genet Vaccines Ther.* 2:17.
- 67. Johnson, A.M. 1997. Speculation of Possible Life Cycles for the Clonal Lineages in the Genus *Toxoplasma Parasitol. Today.* 13:393-397.
- Kallenius, G., Svenson, S. B., Hultberg, H., Molby, R., Helin, I., Cedergen, B., Windberg, J. 1981. Occurrence of P fimbriated *Escherichia coli* in urinary tract infection. *Lancet* 2:1369–1372.
- 69. Kim, K., Bulow, R., Kampmeier, J., Boothroyd, J.C. 1994. Conformationally appropriate expression of the *Toxoplasma antigen* SAG1 (p30) in CHO cells. *Infect Immun.* 62:203-209.
- 70. Kjaergaard, K., Sorensen, J., Schembri, M., Klemm, P. 2000. Sequestration of zinc oxide by fimbrial designer chelators. *App. Environ. Microbiol.* 66:10-14.
- 71. Kofta, W., Wedrychowicz, H. 2001. c-DNA vaccination against parasitic infections: advantages and disadvantages. *Vet Parasitol*. 100:3-12.
- Korotkova, N., Cota, E., Lebedin, Y., Monpouet, S., Guignot, J., Servin, A.L., Matthews, S., Moseley, S.L. 2006. A subfamily of Dr adhesins of *Escherichia coli* bind independently to decay-accelerating factor and the N-domain of carcinoembryonic antigen. *J Biol Chem.* 281:29120-30.
- Korotkova, N., Chattopadhyay, S., Tabata, T.A., Beskhlebnaya, V., Vigdorovich, V., Kaiser, B.K., Strong, R.K., Dykhuizen, D.E., Sokurenko, E.V., Moseley, S.L. 2007. Selection for functional diversity drives accumulation of point mutations in Dr adhesins of *Escherichia coli. Mol Microbiol* 64:180-94.
- 74. Krupa, K., Bartoszcze, M. 1990. Rezerwuary toksoplazmozy. *Przegl Epidemiol.* 44:317-21.
- 75. Kyte, J., Doolittle, R.F., 1982. A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J. Mol. Biol.* 157:105–132.
- 76. Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 227:680-5.
- 77. Le Bouguenec, C., Garcia, M.I., Ouin, V., Desperrier, J.M., Gounon, P., Labigne, A. 1993. Characterization of plasmid-borne afa-3 gene clusters encoding afimbrial adhesins expressed by *Escherichia coli* strains associated with intestinal or urinary tract infections. *Infect Immun.* 61:5106-14.
- 78. Lekutis, C., Ferguson, D.J.P., Grigg, M.E., Camps, M., Boothroyd, J.C. 2001. Surface antigens of *Toxoplasma gondii*: variations on theme. *Inter. J. Parasitol.* 31:1285-1292.

- Lindsay, D.S., Blagburn, B.L., Dubey, J.P. 1993. Safety and results of challenge of weaned pigs given a temperature-sensitive mutant of *Toxoplasma gondii*. J Parasitol. 79:71-6.
- Liu, K.Y., Zhang, D.B., Wei, Q.K., Li, J., Li, G.P., Yu, J.Z. 2006. Biological role of surface *Toxoplasma gondii* antigen in development of vaccine. *World J Gastroenterol*. 12:2363-8.
- 81. Lourenco, E.V., Bernardes, E.S., Silva, N.M., Mineo, J.R., Panunto-Castelo, A., Roque-Barreira, M.C. 2006. Immunization with MIC1 and MIC4 induces protective immunity against *Toxoplasma gondii*. *Microbes Infect*. 8:1244-51.
- 82. Lovett, J.L., Marchesini, N., Moreno, S.N., Sibley, L.D. 2002. Toxoplasma gondii microneme secretion involves intracellular Ca(2+) release from inositol 1,4,5-triphosphate (IP(3))/ryanodine-sensitive stores. *J Biol Chem.* 277:25870-6.
- 83. Lovgren, K., Morein, B. 1991. The ISCOM: an antigen delivery system with built-in adjuvant. *Mol Immunol.* 28:285-6.
- 84. Manger, I.D., Hehl, A.B., Boothroyd, J.C. 1998. The surface of *Toxoplasma* tachyzoites is dominated by a family of glycosylphosphatidylinositol-anchored antigens related to SAG1. *Infect Immun*. 66:2237-44.
- 85. McLeod, R., Frenkel, J.K., Estes, R.G., Mack, D.G., Eisenhauer, P.B., Gibori, G. 1988. Subcutaneous and intestinal vaccination with tachyzoites of *Toxoplasma gondii* and acquisition of immunity to peroral and congenital toxoplasma challenge. *J Immunol*. 140:1632-7.
- 86. Milewska-Bobula, B., 1992. Rozpoznawanie, przebieg kliniczny i leczenie toksoplazmozy. *Wyd. CZD Warszawa*
- 87. Milewska-Bobula, B. 1995. Leczenie toksoplazmozy wrodzonej. *Kliniczna perinatologia i ginekologia* supl. 11 ISNN:1230-6584.
- Mohamed, R.M., Aosai, F., Chen, M., Mun, H.S., Norose, K., Belal, U.S., Piao, L.X., Yano, A. 2003. Induction of protective immunity by DNA vaccination with *Toxoplasma* gondii HSP70, HSP30 and SAG1 genes. *Vaccine*. 21:2852-61.
- 89. Murray, H.W., Cohn, Z.A. 1979. Macrophage oxygen-dependent antimicrobial activity. I. Susceptibility of *Toxoplasma gondii* to oxygen intermediates. *J Exp Med.* 150:938-49.
- 90. Ngô, H.M., Hoppe, H.C., Joiner, K.A. 2000. Different sorting and post-secretory targetig of proteins in parasitic invasion. *Trends in Cell Biology* 10:67-72.
- 91. Nicholson-Weller, A., Wang, C.E. 1994. Structure and function of decay accelerating factor CD55. *J Lab Clin Med.* 123:485-91.
- Nielsen, H.V., Lauemøller, S.L., Christiansen, L., Buus, S., Fomsgaard, A., Petersen, E. 1999. Complete protection against lethal *Toxoplasma gondii* infection in mice immunized with a plasmid encoding the SAG1 gene. *Infect Immun.* 67:6358-63.
- Nielsen, H.V., Di Cristina, M., Beghetto, E., Spadoni, A., Petersen, E., Gargano, N. 2006. *Toxoplasma gondii*: DNA vaccination with bradyzoite antigens induces protective immunity in mice against oral infection with parasite cysts. *Exp Parasitol*. 112:274-9.
- 94. Nowicki, B., Svanborg-Eden, C., Hull, R., Hull, S. 1989. Molecular analysis and epidemiology of the Dr hemagglutinin of uropathogenic *Escherichia coli. Infect Immun.* 57:446-51.

- 95. Nowicki, B., Hart, A., Coyne, K.E., Lublin, D.M., Nowicki, S. 1993. Short consensus repeat-3 domain of recombinant decay-accelerating factor is recognized by *Escherichia coli* recombinant Dr adhesin in a model of a cell-cell interaction. *J Exp Med.* 178:2115-21.
- 96. Nowicki, B., Selvarangan, R., Nowicki, S. 2001. Family of *Escherichia coli* Dr adhesins: decay-accelerating factor receptor recognition and invasiveness. *J Infect Dis.* 183 Suppl 1:S24-7.
- 97. Parmley, S.F., Yang, S., Harth, G., Sibley, L.D., Sucharczuk, A., Remington, J.S. 1994. Molecular characterization of a 65-kilodalton *Toxoplasma gondii* antigen expressed abundantly in the matrix of tissue cysts. *Mol Biochem Parasitol*. 66:283-96.
- Parmley, S., Slifer, T., Araujo, F. 2002. Protective effects of immunization with a recombinant cyst antigen in mouse models of infection with *Toxoplasma gondii* tissue cysts. *J Infect Dis* 185 Suppl 1:S90-5.
- Pettigrew, D., Anderson, K.L., Billington, J., Cota, E., Simpson, P., Urvil, P., Rabuzin, F., Roversi, P., Nowicki, B., du Merle, L., Le Bouguenec, C., Matthews, S., Lea, S.M. 2004. High resolution studies of the Afa/Dr adhesin DraE and its interaction with chloramphenicol. *J Biol Chem.* 279:46851-7.
- Piątek, R., Zalewska, B., Kolaj, O., Ferens, M., Nowicki, B., Kur, J. 2005. Molecular aspects of biogenesis of *Escherichia coli* Dr Fimbriae: characterization of DraB-DraE complexes. *Infect Immun*. 73:135-45.
- 101. Pinon, J. M., Dumon, H., Chemla, C., Franck, J., Petersen, E., Lebech, M., Zufferey, J., Bessieres, M.H., Marty, P., Holiman, R., Johnson, J., Luyasu, V., Lecolier, B., Guy, E., Joynson, D.H., Decoster, A., Enders, G., Pelloux, H., Candolfi, E. 2001. Strategy for Diagnosis of Congenital Toxoplasmosis: Evaluation of Methods Comparing Mothers and Newborns and Standard Methods for Postnatal Detection of Immunoglobulin G, M, and A Antibodies J. Cliln. Microb. 39:2267-2271.
- Radke, J.R., Gubbels, M.J., Jerome, M.E., Radke, J.B., Striepen, B., White, M.W. 2004. Identification of a sporozoite-specific member of the *Toxoplasma* SAG superfamily via genetic complementation *Mol Microbiol*. 52:93-105.
- 103. Ramshaw, I.A., Ramsay, A.J. 2000. The prime-boost strategy: exciting prospects for improved vaccination. *Immunol Today*. 21:163-5.
- 104. Rani, D.B.R., Bayer, M.E., Schifferli, D.E. 1999. Polymeric display of immunogenic epitopes from herpes simplex virus and transmissible gastroenterititis virus surface proteins on an enetroadherent fimbriae. *Clin. Diagn. Lab. Immun.* 6:30-40.
- 105. Roitt, I., Brostoff, J., Male, D. 2000. Immunologia. Wyd. Lekarskie PZWL, Warszawa i Wyd. Medyczne Słowiński Verlag, Brema.
- 106. Rudel, T., Boxberger, H.J., Meyer, T.F. 1995. Pilus biogenesis and epithelial cell adherence of *Neisseria gonorrhoeae* pilC double knock-out mutants. *Mol Microbiol*. 17:1057-71.
- 107. Sambrook, J. Manniatis, T., Fritsch, E.F. 1989. *Molecular Cloning. A laboratory Manual.* Manniatis T and Sambrook Editors. *Cold Spring Harbor Laboratory Press Edit Second Edition. New York.*
- 108. Sauer, F.G., Mulvey, M.A., Schilling, J.D., Martinez, J.J., Hultgren, S.J. 2000. Bacterial pili: molecular mechanisms of pathogenesis. *Curr Opin Microbiol.* 3:65-72.

- Sauer, F.G, Pinkner, J.S., Waksman, G., Hultgren, S.J. 2002. Chaperone Priming of Pilus Subunits Facilitates a Topological Transition that Drives Fiber Formation. *Cell* 111:543-551.
- Selvarangan, R., Goluszko, P., Popov, V., Singhal, J., Pham, T., Lublin, D.M., Nowicki, S., Nowicki, B. 2000. Role of decay-accelerating factor domains and anchorage in internalization of Dr-fimbriated *Escherichia coli. Infect Immun.* 68:1391-9.
- 111. Servin, A.L. 2005. Pathogenesis of Afa/Dr diffusely adhering *Escherichia coli. Clin Microbiol Rev.* 18:264-92.
- 112. Siachoque, H., Guzman, F., Burgos, J., Patarroyo, M.E., Gomez Marin, J.E. 2006. *Toxoplasma gondii*: immunogenicity and protection by P30 peptides in a murine model. *Exp Parasitol*. 114:62-5.
- 113. Smyth, C.J., Marron, M.B., Twohig, J.M., Smith, S.G. 1996. Fimbrial adhesins: similarities and variations in structure and biogenesis. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 16:127-39.
- 114. Soldati, D., Dubremetz, J.F., Lebrun, M. 2001. Microneme proteins: structural and functional requirements to promote adhesion and invasion by the apicomplexan parasite *Toxoplasma gondii*. *Int J Parasitol*. 31:1293-302.
- 115. Soto, G.E., Hultgren, S.J. 1999. Bacterial Adhesins: Common Themes and Variations in Architecture and Assembly. *J. Bacteriol.* 181:1059-1071.
- 116. Stanley, A.C., Buxton, D., Innes, E.A., Huntley, J.F. 2004. Intranasal immunisation with *Toxoplasma gondii* tachyzoite antigen encapsulated into PLG microspheres induces humoral and cell-mediated immunity in sheep. *Vaccine*. 22:3929-41.
- 117. Stentebjerg-Olesen, B., Pallesen, L., Jensen, L., Christiansen, G., Klemm, P. 1997. Authentic display of a cholera toxin epitope by chimeric type 1 fimbriae: effects of insert position and host background. *Microbiol.* 143:2027-2038.
- 118. Suzuki, Y., Remington, J.S. 1988. Dual regulation of resistance against *Toxoplasma gondii* infection by Lyt-2+ and Lyt-1+, L3T4+ T cells in mice. *J Immunol.* 140:3943-6.
- 119. Tenter, A.M., Heckeroth, A.R., Weiss, L.M. 2000. *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. *Int J Parasitol*. 30:1217-58.
- Thiry, G., Clippe, A., Scarcez, T., Petre J. 1989. Cloning of DNA sequences encoding foreign peptides and their expression in the K88 pili. *Appl. Environ. Microbiol.* 55:984-993.
- Van Loy, C.P., Sokurenko, E.V., Samudrala, R., Moseley, S.L. 2002. Identification of amino acids in the Dr adhesin required for binding to decay-accelerating factor. *Mol Microbiol.* 45:439-52.
- Westerlund, B., Kuusela, P., Risteli, J., Risteli, L., Vartio, T., Rauvala, H., Virkola, R., Korhonen, T.K. 1989. The O75X adhesin of uropathogenic *Escherichia coli* is a type IV collagen-binding protein. *Mol Microbiol*. 3:329-37.
- 123. Westerlund-Wikstrom, B., Korhonen, T.K. 2005. Molecular structure of adhesin domains in *Escherichia coli* fimbriae. *Int J Med Microbiol*. 295:479-86.
- 124. Woodard, L.F., Toone, N.M., McLaughlin, C.A. 1980. Comparison of muramyl dipeptide, trehalose dimycolate, and dimethyl dioctadecyl ammonium bromide as adjuvants in Brucella abortus 45/20 vaccines. *Infect Immun.* 30:409-12.

- 125. Zalewska, B., Piątek, R., Konopa, G., Nowicki, B., Nowicki, S., Kur, J. 2003. Chimeric Dr fimbriae with herpes simplex virus type 1 epitope as model for recombinant vaccine. *Infect. Immun.* 71:5505-5513.
- Zavialov, A.V., Kersley, J., Korpela, T., Zaviyalov, V.P., MacIntyre, S. i Knight, S.D. 2002. Donor strand complementation mechanism in the biogenesis of non-pilus systems. *Mol Microbiol* 45: 983-95.
- 127. Zenner, L., Estaquier, J., Darcy, F., Maes, P., Capron, A., Cesbron-Delauw, M.F. 1999. Protective immunity in the rat model of congenital toxoplasmosis and the potential of excreted-secreted antigens as vaccine components. *Parasite Immunol.* 21:261-72.